

# 液相層析質譜儀：分析膳食補充劑的關鍵性儀器

## LC/MS: A Key Instrument for Dietary Supplements Analysis

陳仁焜、侯雅慧、凌永健

Ren-Kun Chen, Ya-Hui Hou, Yong-Chien Ling

膳食補充劑往往含有複雜的基質，嚴重干擾到其成分分析，而辨識功能強大的質譜儀結合分離利器的液相層析儀，可在複雜混合物中分離並鑑定出特定化合物的工作中，扮演關鍵性的角色。本文從液相層析儀、游離法與質量分析器的介紹，討論常見市售液相層析質譜儀的特色，提出相關的應用實例，以期能協助使用者有效應用液相層析質譜儀於膳食補充劑的分析研究。

Dietary supplements usually contain complex matrix, which will severely interfere the ingredients determination. The powerful characterization technique of mass spectrometry (MS) coupled with efficient separation tool of high-performance liquid chromatography (LC) can play a key role for separating and identifying target compounds from complex mixtures. This article introduces the features of LC, ionization methods, mass analyzers, and popular commercial LC/MS first, followed by demonstrating with several real examples on dietary supplements analysis. The aim is to help the readers to effectively use LC/MS for dietary supplements analysis and research.

### 一、前言

近年來，服用膳食補充品 (dietary supplements) 的風氣日益興盛，膳食補充品的化學組成不同於藥品，而較接近食品，因此往往具有多種的有效成分 (active ingredients)，而這些成分被包含於不具活性的複雜混合物基質當中。就管理的層面而言，膳食補充品內的有效成分或指標化合物 (marker

compounds) 以及可能的摻假物 (adulterants)、污染物 (contaminants) 或有害物 (harmful components) 都必須以化學分析的手段進行瞭解<sup>(1)</sup>。

常見的膳食補充品的原物料，可能來自植物的葉、花、果實或根，再製成粉末或萃取液的形式販售。然而，過多的製劑型態以及極度複雜的基質，對分析化學家提出嚴苛的挑戰，除了分析原物料中的成分之外，製造過程的監測，包括：中間體

(intermediates)、濃縮液 (concentrates)、粗產品 (bulk products)，以及成品的臨床研究、安定性測試等，都需要仰賴有效的化學分析方法來進行。

欲符合上列需求，質譜儀連接高效液相層析儀的分析系統是少數可行方案之一，因為高效液相層析儀可提供分離與淨化的功能，而質譜儀能夠提供分子量與化學結構的資訊，本文將介紹近年來應用液相層析／質譜儀 (LC/MS) 在分析膳食補充品的相關研究。

## 二、液相層析系統

在液相層析／質譜儀的系統中，液相層析儀的技術已趨成熟，因此近年來並無太大的變革。善用液相層析的功能可以提供適當的分離，為組成複雜的樣品提供更完整的解析。影響液相層析儀分離效果的最重要因素為靜相 (stationary phase)，其次則為動相 (mobile phase) 組成與流速。

目前應用於分析膳食補充劑成分的文獻顯示，絕大多數採用逆相 (reverse phase) 層析管柱，其中以選擇 C18 最多，或依照待測物特性而選擇 C8、phenyl、C4 等管柱。其次，液相層析的動相流速影響質譜儀的表現甚巨，必須與層析管柱、離子源種類及離子源操作參數做適當的搭配，目前已有商業化的奈米級液相層析儀 (nano-LC) 問世，一般在 200 nL/min 的流速下進行操作，配合毛細管分離管柱 (capillary column) 能大幅提高解析度，同時搭配適合之質譜介面將可有效降低偵測極限。

另外，目前商業化的 nano-LC 系統亦能執行多維液相層析 (multi-dimension LC) 的操作，使用者可以選用不同類型的分離管柱進行搭配，以達成最佳之分離效果。

## 三、游離法

應用在 LC/MS 系統的游離法均屬大氣壓游離法 (atmospheric pressure ionization, API)，其中目前使用最廣的是電灑游離 (electrospray ionization, ESI)，其次為大氣壓化學游離 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)，已有許多文獻報導其原

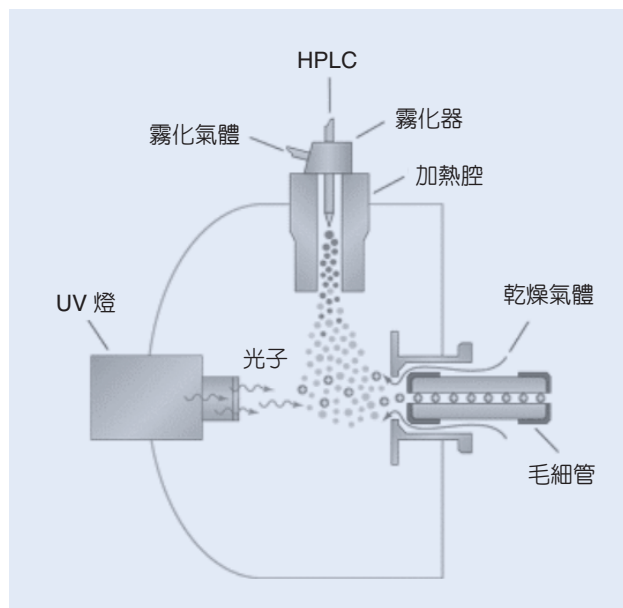


圖 1. APPI 的構造圖<sup>(3)</sup>。

理，本文不再加以贅述<sup>(2)</sup>。

值得一提的是，最近問市的大氣壓光子游離 (atmospheric pressure photon ionization, APPI) 已成功的與現有的 LC/MS 結合，其基本構造如圖 1 所示<sup>(3)</sup>。主要是以一個 UV 燈源產生能量 10 eV 左右的光子，利用此一光子直接游離待測物，或先游離摻雜試劑 (dopant) 後，再藉由離子-分子反應游離待測物 (如圖 2)。由表 1 列出 ESI、APCI 及 APPI 三種離子源的基本特色來看，可以發現 APPI 與 APCI 較為相似。

根據圖 3 所示，ESI、APCI 與 APPI 此三種離子源具有互補的特性，ESI 適用於中度極性以上之大分子或小分子，APCI 適用於低極性到中度極性的小分子，而 APPI 則適用於 APCI 難以游離的範圍。由此可見，目前並無任何游離法可以涵蓋所有的待測物，慎選適當的游離源才是上策。

## 四、質量分析器

質量分析器的選用必須考慮價格、質量上限、質量解析度等要素，以膳食補充劑的成分分析而言，表 2 列出四種常見於 LC/MS 的質量分析器，包括單段四極柱式 (single quadrupole)、三段四極柱

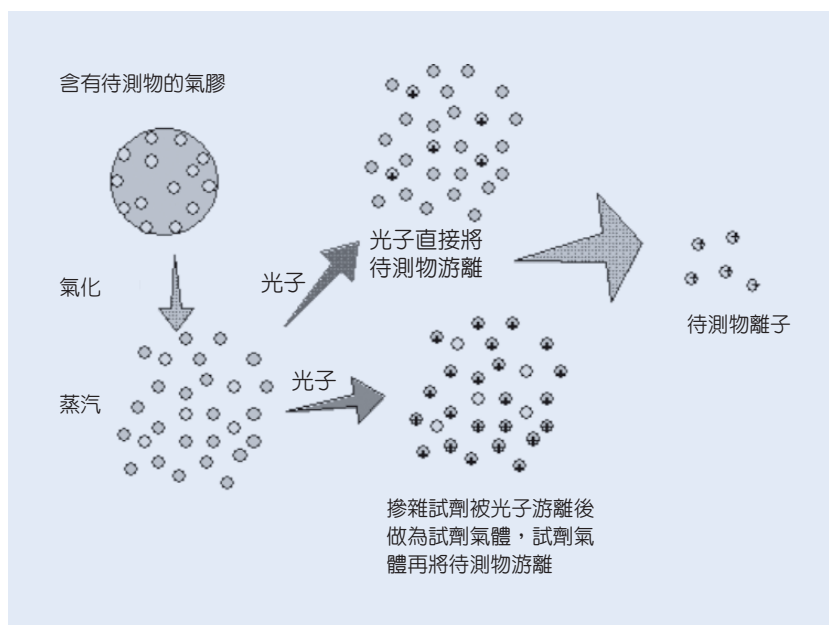


圖 2.  
APPI 的游離機制示意圖<sup>(3)</sup>。

式 (triple quadrupole)、離子阱式 (ion trap) 及四極柱－飛行時間式 (Q-TOF) 等，其基本特性雖不相同，但是均能用於膳食補充劑的分析。

其中，四極柱－飛行時間式質量分析器不論在掃描速度、靈敏度、質量上限與質量解析度等方面均為最佳之選，然而其價格亦最為昂貴。而單段四極柱的價格最低，操作也最為簡單，適合用於例行性分析。目前文獻上用於分析膳食補充劑的 LC/MS 以離子阱式最多，而三段四極柱式居次；在價格上離子阱系統的價格較低廉，而在功能上離子阱的全離子掃描靈敏度較佳，同時具備多階段質量分析器

(MS<sup>n</sup>) 之功能，十分適合複雜樣品中未知物的篩選與結構解析。三段四極柱質譜儀之選擇離子掃描及多重反應監測的靈敏度較佳，並能執行母離子掃描，因此比較適合用在已知物的定量分析、化學結構類似物的快速篩選以及藥物動力學的研究。

## 五、應用實例

以下依照使用質量分析器的不同，分別介紹分析膳食補充劑的應用實例與特點。

表 1.  
應用在 LC/MS 中各種離子源之基本特性比較。

離子源種類	基本特性
電灑游離 (ESI)	從 LC 流出之液體流經一施加高電壓之毛細管，並產生氣膠 (aerosol) 顆粒，此氣膠顆粒之溶劑持續揮發，使得氣膠顆粒之表面電荷密度超出雷利安定極限 (Rayleigh stability limit)，促使帶電液滴逐步分裂成帶電離子。
大氣壓化學游離 (APCI)	從 LC 流出之液體經過加熱腔 (250–600 °C) 使溶劑揮發，被氯化之溶劑分子因電暈放電而離子化，這些大量的離子作為試劑氣體 (reagent gas) 再與待測分子發生離子－分子反應，游離待測物。
大氣壓光子游離 (APPI)	與 APCI 相似，改用光子取代電暈放電，可能有兩種游離機制發生，其一是以光子直接游離待測物，其二是光子先將參雜試劑 (dopant) 游離後 (作為試劑氣體)，再與待測物反應發生離子－分子反應，游離待測物。

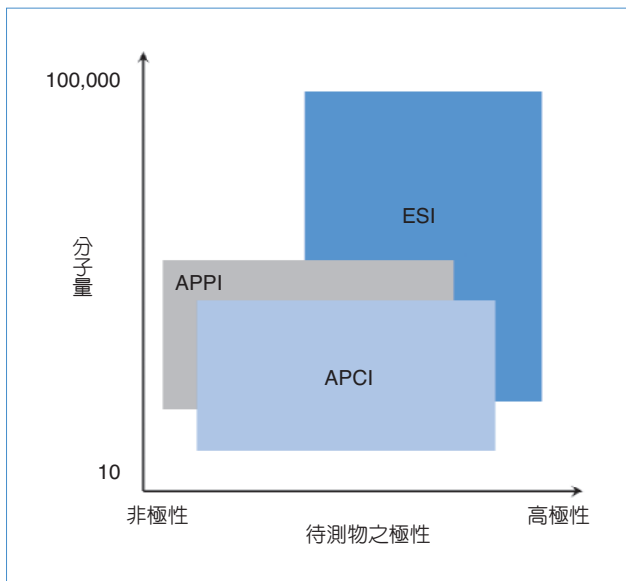


圖 3. 三種游離源的適用範圍示意圖<sup>(3)</sup>。

## 1. 單段四極柱式之液相層析／質譜儀

以單一四極柱作為質量分析器的 LC/MS 是操作最為簡便的一種分析系統，文獻報導可以直接導入 (direct infusion) 的方式分析花青素 (anthocyanins)、黃酮 (flavones)、異黃酮 (isoflavones)、黃烷酮 (flavanones)、萜烯 (terpenes)、三萜烯 (triterpenes)、人參皂苷 (ginsenosides) 及兒茶素 (catechins) 等天然物<sup>(4)</sup>，圖 4 所示為分析綠茶萃取物所得之質譜圖，可以辨識出五種兒茶素成分，所產生之質譜訊號均為鈉的加成離子 ( $[M + Na]^+$ )。未經層析管柱分離而採用直接導入樣品的方式，使得此種方法具有高通量 (high throughput) 的特色，不過由於樣品並未經過淨化的前處理，使得此種方法的應用被侷限於基質較單純的樣品，適合應用在已知化合物的快速篩檢分析。

質量分析器種類	基本特性
單段四極柱 (Single quadrupole)	由四根相互平行的柱狀電極所組成，電極上施加直流電壓與射頻電壓所產生的電場，能夠將帶電粒子依照其 $m/z$ 的不同進行掃描，特定 $m/z$ 值的離子在特定的電場下能夠穩定通過四極柱，而被四極柱後方的偵檢器所紀錄。可執行全掃描 (full scan)、選擇離子監測 (selected ion monitoring, SIM)、離子源內碰撞誘導解離。
三段四極柱 (Triple quadrupole)	將三組四極柱串連，第一、三組四極柱 (Q1、Q3) 具有質量分析器的功能，第二組四極柱 (Q2，亦可為六極柱或八極柱) 則用來進行碰撞誘導解離 (collision induced dissociation, CID)，除了具有與單段四極柱相同的功能外，還能執行質譜／質譜功能，可執行子離子掃描 (daughter ion scan)、母離子掃描 (parent ion scan)、定質量中性分子丟失 (constant neutral loss)、多重反應監測 (multiple reaction monitoring, MRM) 等掃描模式。
離子阱 (Ion trap)	類似四極柱的操作原理，主要由一個環電極 (ring electrode) 及兩個端蓋電極 (endcap electrode) 所組成，交流電壓與射頻電壓所形成的三度空間電場可同時將不同 $m/z$ 值的離子儲存在離子阱內，利用端蓋電極施加的射頻電壓改變可將特定 $m/z$ 值的離子排出離子阱完成掃描動作。一個離子阱可以模擬三段四極柱的運作，具有質譜／質譜 ( $MS^2$ ) 功能，因此價格便宜許多，高階的機種更具有 $MS^n$ 的功能。
四極柱／飛行時間 (Quadrupole/TOF)	飛行時間式的質量分析器是利用離子在固定長度的飛行管內飛行時間的不同而達成質量解析的目的，不同質量的離子因所受的加速電壓相同而具有相同的動能，故離子在飛行管中的速度與其質量倒數的平方根成正比。飛行時間式質量分析器與四極柱結合後，能夠提供與三段四極柱相同的功能，在掃描速度、靈敏度、質量上限與質量解析度等方面均有大幅度之提升。

表 2.

常用於 LC/MS 系統中的幾種質量分析器之基本特性比較。

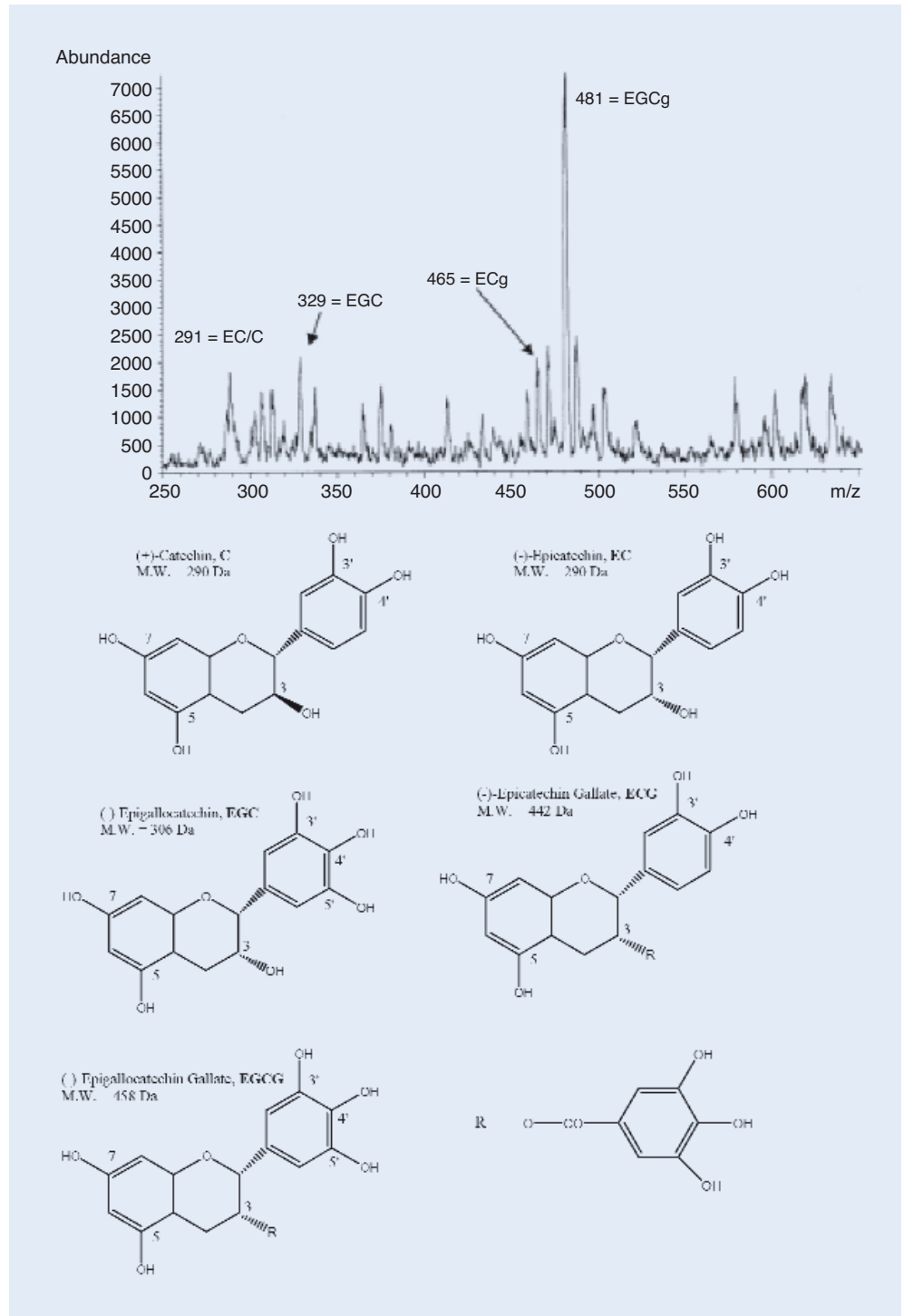


圖 4.  
綠茶萃取物以直接導入  
LC/MS 分析之質譜圖<sup>(4)</sup>。

## 2. 三段四極柱式液相層析／質譜儀

使用三段四極柱為質量分析器之質譜儀具備質譜／質譜 (MS/MS, MS<sup>2</sup>) 的功能，能進行子離子掃描 (daughter ion scan)、母離子掃描 (parent ion scan)、定質量中性分子丟失 (constant neutral loss)

及多重反應監測 (multiple reaction monitoring, MRM) 等掃描模式，因此在實際應用上更具優勢，其中尤以母離子掃描、多重反應監測這兩種掃描模式最具威力。

以植物中常見的毒性化合物來說，三段四極柱

LC/MS 可以全面性的快速篩檢化學結構相似之生物鹼，當待測分子的化學結構極為類似時，可能因為碰撞誘導解離而產生相同的子離子，此時若使用母離子掃描即可同時偵測到多種未知物。另外一方面，一般民間認為中草藥的藥性溫和且副作用少，然而卻忽略中草藥含有生物鹼及類固醇的問題，這些天然化合物同時具有毒性與療效，因此從品質管制的觀點上來看，如何正確定量草藥中有毒物質成為非常重要的課題。

Wong 等人曾經開發一個以多重反應監測為基礎的 LC/MS/MS 分析方法，可同時定性並定量分屬 diterpenoid、indole、quinolizidine 及 bufadienolide 等四個種類共 12 種化合物<sup>(5)</sup>。以 strychnine 為例 (圖 5)，經碰撞誘導解離後， $m/z$  335 的質子化分子離子會產生  $m/z$  264 與  $m/z$  184 兩個子離子，其中  $m/z$  335  $\rightarrow$   $m/z$  184 作為定量之用。由於目前商業化的 LC/MS 均以柔式游離法 (soft ionization) 作為游離源，待測物游離後發生碎裂的可能性較低，因此需透過碰撞誘導解離才能提供足夠的化學結構資訊以供定性，故此方法的特异性大為提高，能夠有效測得複雜基質中的待測物，並降低偵測極限。

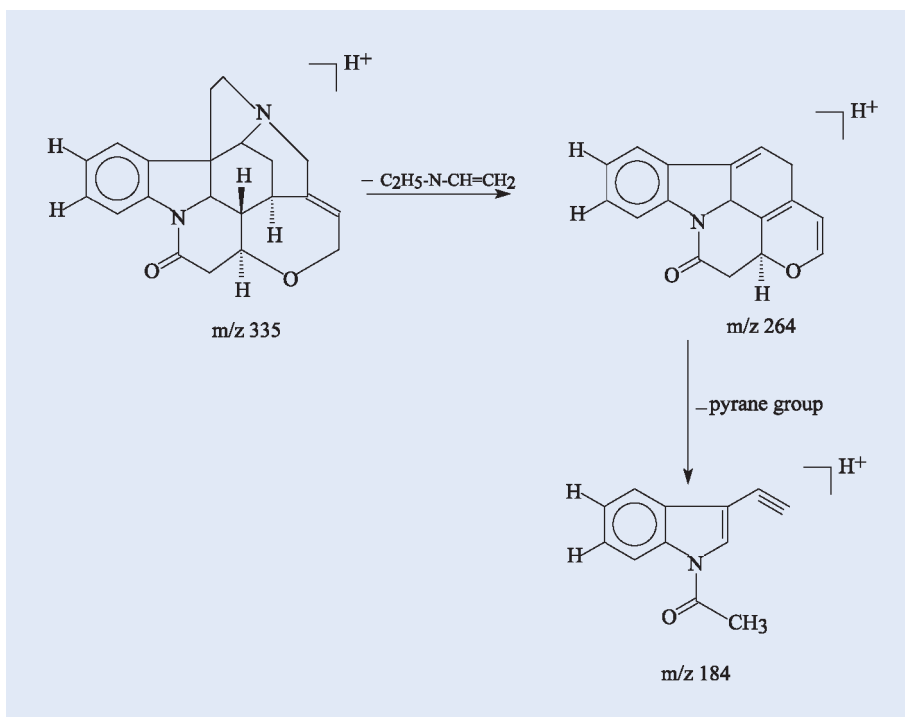


圖 5. 推測 strychnine 經碰撞誘導解離之碎裂機制<sup>(5)</sup>。

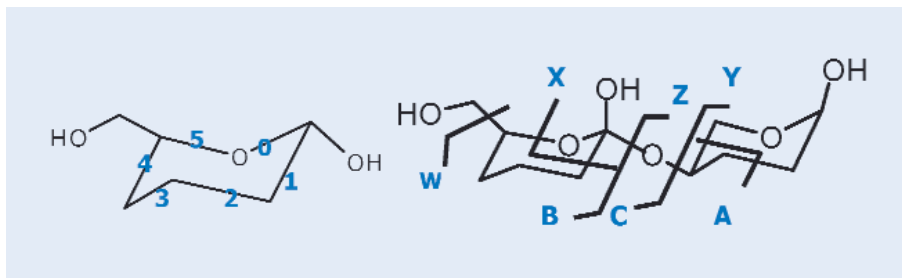
### 3. 離子阱式液相層析／質譜儀

使用此類儀器的最大優點在於以單一離子阱即能提供多階段串聯質譜 ( $MS^n$ ) 的功能，對於複雜化學結構的解析有相當大的助益，以 Cui 等人對於刺五加 (*Acanthopanax senticosus*) 所含的皂素 (saponins) 化學結構分析為例，具有  $MS^n$  功能的離子阱特別適用於含有多糖結構的天然物<sup>(6)</sup>。配糖體在電灑游離法下形成之碎裂離子有一系統性的命名方法 (如圖 6 所示)：碎裂後電荷分布於還原端的碎裂離子命名為  $^{k,l}X_j, Y_j, Z_j$  型離子，碎裂後電荷分布於非還原端的碎裂離子命名為  $^{k,l}A_i, B_i, C_i$  型離子。其中  $^{k,l}X_j, Y_j, Z_j$  型離子大多與非糖基的部分相連，下標  $j$  代表糖基的序列，由與非糖基連結的第一個糖基編號為 0 ( $j \geq 0$ )， $^{k,l}A_i, B_i, C_i$  型離子則只含糖基，下標  $i$  表示的糖基序列由末端的第一個糖基開始編號為 1 ( $i \geq 1$ )，而上標則指示出形成  $^{k,l}X_j, ^{k,l}A_i$  所需斷裂的內配糖體鍵位置。在這些眾多的碎裂可能性當中，形成 Y 類碎裂離子的可能性最高，同時也有助於糖基的定序。

圖 7(a) 為刺五加萃取物以矽膠管柱初步分離後，其中一個分份 (fraction) 再以 ESI-MS 分析所得之質譜圖，由於皂素對鹼金屬陽離子的親和力極

圖 6.

內配糖體鍵之位置及雙糖的斷裂情形<sup>(6)</sup>。



強，因此特別容易觀察到  $M + Na$  離子。以  $m/z$  1081 為例，經 MS/MS 分析，可得到  $m/z$  935、757、611、493、405、347 等離子 (如圖 7(b))， $m/z$  1081 與  $m/z$  935 的質量差為 146 Da，代表損失一個 deoxyhexose sugar，而  $m/z$  1081 與  $m/z$  611 的質量差為 470 Da，則代表損失一個 deoxyhexose sugar 與兩個 hexose sugar。而  $m/z$  493 的離子，經 MS<sup>5</sup> 後則可得到  $m/z$  289，各階段之碎裂離子如圖 8 所推測之碎裂機制，根據推算結果顯示出此未知物末

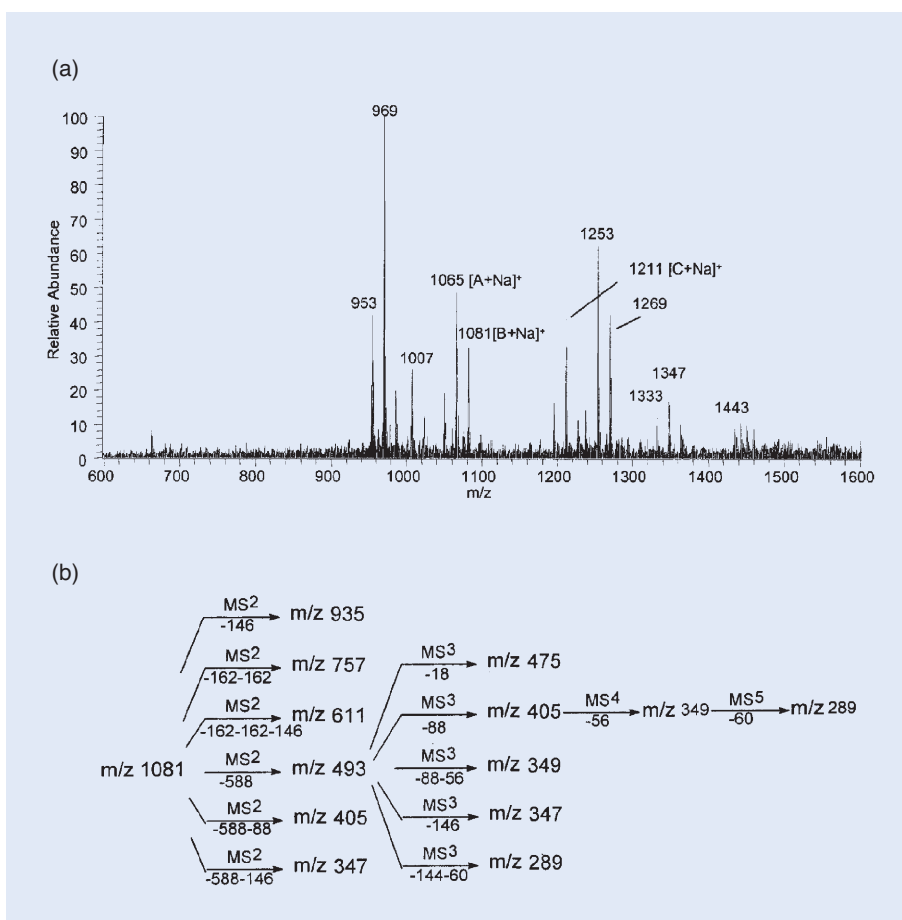
端含有 Rha-Glc-Glc 的三糖結構。上述實驗結果顯示，ESI-MS<sup>n</sup> 可用於快速篩檢植物萃取物中所含之成分，利用多重串聯質譜的分析模式，可以單獨分離出某一分子以進行結構解析，而不需採用耗時費力的純化分離手段。

#### 4. 四極柱－飛行時間式液相層析／質譜儀

相對於前述幾種質量分析器，四極柱－飛行時間式質譜儀能達到最高的靈敏度，因為以飛行管

圖 7.

(a) 刺五加萃取物以離子阱式質譜儀分析所得之質譜圖，  
(b)  $m/z$  1081 經 MS<sup>n</sup> 分析所得之子離子訊號關係圖<sup>(6)</sup>。



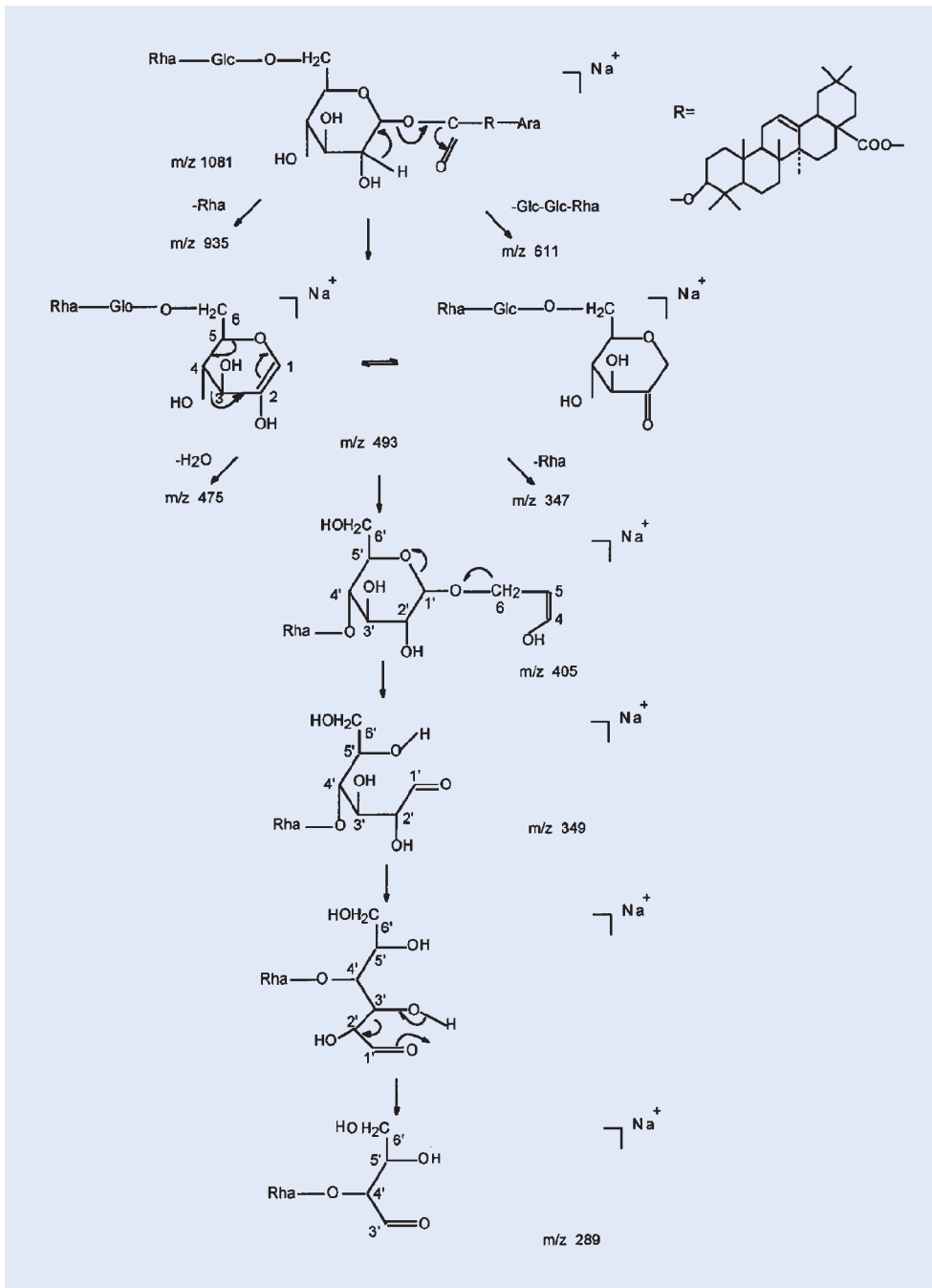


圖 8. 推測  $m/z$  1081 離子經  $MS^n$  分析之碎裂機制<sup>(6)</sup>。

(flight tube) 作為質量分析器能提供遠高於四極柱的離子傳輸效率，因此非常適合用來分析極微量的待測物，特別是近年來蓬勃發展的蛋白質體學領域，採用此型儀器的比例最高。

至於目前市售的膳食補充劑中，有一類硒元素的補充劑是以酵母菌培養後之抽出物製造而成，微量的硒元素 (selenium) 經酵母菌代謝之後，可能產

生許多硒物種 (selenium species)，而個別物種的含量勢必更低。因此，若要釐清此類膳食補充劑的有效成分或指標成分，使用四極柱－飛行時間式 (Q-TOF) 液相層析／質譜儀將可滿足此類需求。

根據 Lindemann 等人的研究顯示<sup>(7)</sup>，以 HPLC/ICPMS 分析市售含硒之膳食補充劑，如圖 9(a) 發現有兩個主要波峰出現，可能代表硒元素與兩種不

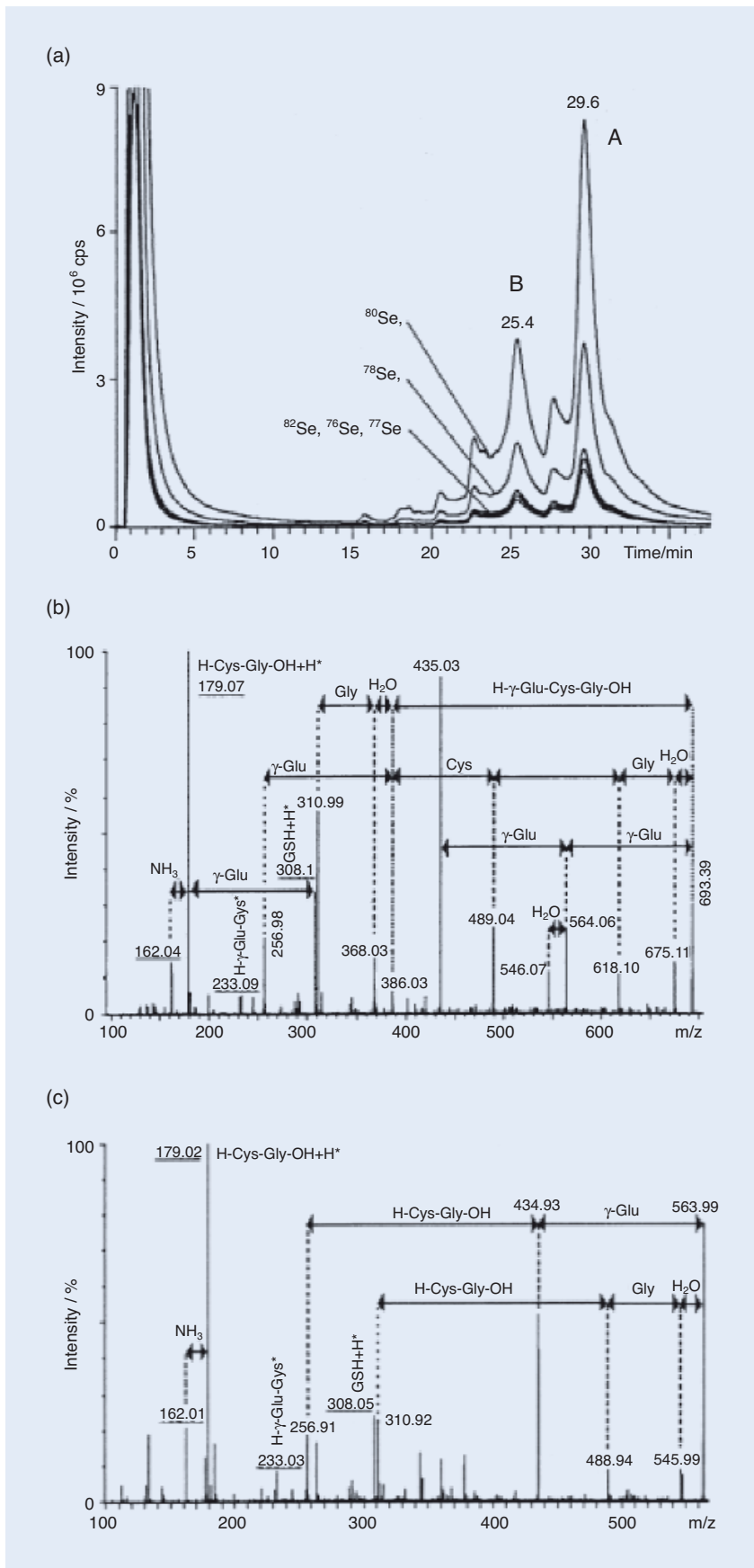


圖 9.

(a) 以 HPLC/ICPMS 分析硒的膳食補充劑所得之層析圖，(b) 圖 9(a) 中波峰 A 經 MS/MS 分析所得之質譜圖，(c) 圖 9(a) 中波峰 B 經 MS/MS 分析所得之質譜圖<sup>(7)</sup>。

同的有機分子團結合，波峰 A、B 分別經過 ESI-MS/MS 分析後，可得到如圖 9(b) 與 9(c) 的質譜圖，經過推算，發現波峰 A ( $m/z$  693.39) 為 1 個硒原子與 2 個穀胱甘肽 (glutathione, GSH) 以 Se-S 鍵結合而成的分子，波峰 B ( $m/z$  563.99) 則是 1 個硒原子與 1 個穀胱甘肽及 1 個 Cys-Gly 雙胜肽結合而成的物種。Encinar 等人亦曾以相同的儀器設備做過類似的研究，發現硒與 SIP18 (分子量 8874 Da 的蛋白質) 及 HSP12 (分子量 11693 Da 的蛋白質) 結合<sup>(8)</sup>，證明此種研究方法對於探究膳食補充劑中的微量成分確實可行。

## 六、總結

近幾年來，LC/MS 成功的示範在製藥工業及蛋白質體學的應用，證明此項技術可用於膳食補充劑的分析，能精確的解析複雜基質中的關鍵性成分，也由於商業化儀器的迅速開發與成熟，使得 LC/MS 能夠更廣泛應用在植物樣品中的活性成分、指標成分以及不純物的分析。

目前分析天然物中的未知成分，仍然有諸多困難需要克服，往往需要結合多種儀器的分析結果，才能正確鑑定出未知物的化學結構。相較於其他技術，LC/MS 僅需用到微量的樣品，在相當短的時間內得到最多的資訊，國內若能著重和加速此一領域人才的培養，相信未來對兼具藥與膳特性之中醫藥的研發工作，必有舉足輕重的貢獻。

## 參考文獻

1. J. R. Jordan, *Key Instrumentation to Dietary Supplement Analysis*, Inside Laboratory Management, p.31, AOAC International, July/August 2003.
2. 李美貴, 凌永健, 科儀新知, **13** (5), 38 (1992).
3. [www.nskw.co.jp/bunseki/mg4/Appi.htm](http://www.nskw.co.jp/bunseki/mg4/Appi.htm)
4. P. Mauri and P. Pietta, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23**, 61 (2000).
5. S. K. Wong, S. K. Tsui, and S. Y. Kwan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 161 (2002).
6. M. Cui, W. Sun, F. Song, Z. Liu, and S. Liu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 873 (1999).
7. T. Lindemann and H. Hintelmann, *Anal. Chem.*, **74**, 4602 (2002).
8. J. R. Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, and J. Szpunar, *Anal. Chem.*, **75**, 3765 (2003).

- 
- 陳仁焜先生為國立清華大學化學系博士班學生。
  - 侯雅慧小姐為國立清華大學化學系碩士班學生。
  - 凌永健先生為美國佛羅里達州立大學博士，現任國立清華大學化學系教授。
  - Ren-Kun Chen is a Ph.D. candidate in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.
  - Ya-Hui Hou is a M.S. graduate student in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.
  - Yong-Chien Ling received his Ph.D. from Florida State University, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.