

利用多反射飞行时间质谱产生的LC-MS精细同位素结构提高生物转化鉴定效率

Michael McCullagh, Martin Palmer, William Johnson

Waters Corporation

摘要

当存在复杂基质（例如血液和尿液）时，可能难以检测和鉴定具有潜在毒性的药物代谢物。采用多种分析方法提高检出率和鉴定可信度会增加成本，但更重要的是，这样会减慢做出“前进”（go）还是“停止”（no-go）的决策。提高LC-MS数据的特异性可以帮助解决这些瓶颈问题。

之前使用SELECT SERIES™ MRT以10 Hz的采集速率，系统质量分辨率> 200,000 FWHM，执行了一项UPLC-MS^E（ES+和ES-）数据非依赖型采集(DIA)尿液筛查分析。母离子和碎片离子的十亿分之一(ppb)精确质量数测量有助于鉴定患者尿液样品中存在的三种治疗药物代谢物。

研究中还使用了超高质量分辨率MS联用超高效LC™(UPLC™)进行了进一步确证。分辨率增强模式(REM)的系统分辨率> 300,000 FWHM，可提供质量精度为ppb的精细同位素结构(FIS)，提供高度特异性的鉴定标准，是确定元素组成和促进代谢物鉴定可靠分配的强大工具。

优势

通过提高质量分辨率、质量测量准确度和色谱时间尺度上的精细同位素结构，提高药物代谢物工作流程的效率。

- 更可靠地鉴定未知物，降低误检率，提高分析效率
- 使用LC-MS，质量分辨率>300,000 FWHM，可改善复杂生物基质中的分析物检测

- ppb级质量精度的精细同位素结构分布可提供附加标准，有助于提高小分子治疗药物及其代谢物鉴定的可信度

简介

高分辨率质谱-液相色谱联用系统是在复杂生物基质中发现和鉴定药物及其代谢物的理想分析工具，可助力药物开发的工作流程。质量分辨率和质量精度的提高会进一步增加化合物分配的可信度。

SELECT SERIES MRT (图1) 是一款先进的混合四极杆多反射飞行时间(MRT)质谱仪¹。在MRT模式下，离子只通过一次MRT质量分析器，该模式创新地结合了高质量分辨率(>200,000 FWHM)与ppb级常规分析质量精度，且不受采集速率的影响^{2,3}。在分辨率增强模式(REM)下，离子两次通过MRT质量分析器，可实现> 300,000 FWHM的系统质量分辨率。

研究中使用超高效LC与SELECT SERIES MRT联用 (系统分辨率 > 200,000 FWHM) ，采用ES+/ES-对一名健康人类志愿者进行了非靶向尿液筛查，相关详细信息在别处已有详细描述^{2,3}。我们利用代谢物鉴定工作流程成功鉴定出了萘普生、痛痉宁、对乙酰氨基酚治疗药物及其代谢物。在>200,000 FWHM下，获得了精细的同位素结构，增加了鉴定复杂生物基质中存在的生物转化产物时的可信度。在这项研究的延伸研究中，我们使用REM分析样品，生成了具有更精细同位素分布信息的质谱图，有助于已知物和未知物的鉴定。

本研究展示了REM的优势，并展示了已鉴定的生物转化产物 (图2) ，包括解析了它们的精细同位素分布，包括²H、¹³C、¹⁵N、¹⁸O、³³S和³⁴S。

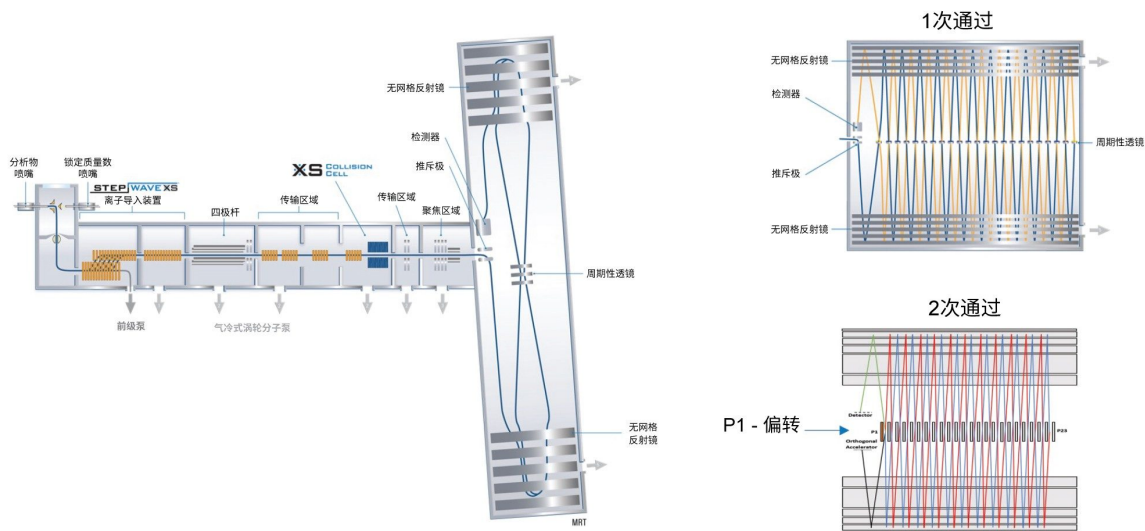


图1.SELECT SERIES MRT仪器示意图，展示了一次通过模式(>200,000 FWHM)和两次通过REM模式(>300,000 FWHM)。

实验

样品描述

人尿液样品以1:10（水）的比例稀释

剂量：痛痉宁（2 × 200 mg片剂）、对乙酰氨基酚（2 × 500 mg片剂）、萘普生（1 × 500 mg片剂）。

采样时间点：给药后0、2、4和6小时

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY™ UPLC I-Class Premier色谱仪

色谱柱：

ACQUITY UPLC HSS™ T3 C₁₈ (100 mm × 2.1

mm, 1.8 μ m)色谱柱

柱温: 40 °C

样品温度: 4 °C

进样体积: 5 μ L

流速: 0.5 mL/min

流动相A: 水 (含0.1%甲酸, v/v)

流动相B: 乙腈 (含0.1%甲酸, v/v)

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.5	99	1	初始
1.0	0.5	99	1	6
3.0	0.5	85	15	6
6.0	0.5	50	50	6
9.0	0.5	5	95	6
10.0	0.5	5	95	6
10.1	0.5	99	1	6
12.0	0.5	99	1	6

MS条件

采集: ES+和ES-

毛细管电压: 0.8 kV/1 kV

脱溶剂气温度:	500 °C
离子源温度:	120 °C
锥孔电压:	20 V
质量范围:	m/z 200~600
采集速率:	10 Hz
采集/处理软件:	MassLynx™ v4.2 SCN1026和waters_connect™ 3.1.0.243

结果与讨论

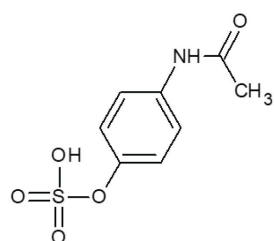
高质量分辨率可增强复杂基质中分析物的离子选择性。由于获得了ppb级高质量精度数据，可能生成的元素成分数量有所减少，从而提高了分析物鉴定的可信度。在涉及小分子的研究中（例如代谢物鉴定），质量精度特异性的增加，配合精细的同位素结构，能够提高鉴定的确定性。

利用REM模式的优势可参见图3，其中在300,000 FWHM下执行LC-MS (10 Hz)分析，解析得到了对乙酰氨基酚硫酸盐结合A+1和A+2精细同位素分布的9个峰。相比之下，在200,000 FWHM下只解析出六个精细同位素峰。

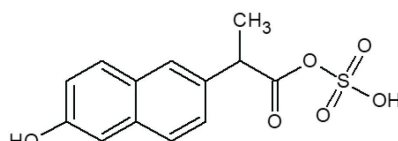
图4中展示了使用200,000 FWHM和300,000 FWHM测定对乙酰氨基酚的乙酰-S-半胱氨酸偶联物得到的FIS比较。FIS提供了额外的鉴定特异性，对于对乙酰氨基酚-乙酰基-S-半胱氨酸偶联物，可以生成双极性FIS峰簇。在300,000 FWHM下，对于ES+/ES- A+1和A+2精细同位素分布组合，共解析出18个同位素峰，可用于确认生物转化鉴定。

我们之前通过人尿液筛查报告了去甲基萘普生硫酸盐([M-H]⁻ m/z 295)和痛痉宁羟基硫酸盐代谢物([M-H]⁻ m/z 331)的鉴定^{2,3}。这两种代谢物的相关报道很少⁴⁻¹¹。但是，母离子和碎片离子的ppb级质量精度结合200,000 FWHM的FIS，提高了鉴定结果的可信度（参见图5）。对于这些色谱共洗脱(t_r 4.80)生物转化产物，已经获得了REM数据（参见图6）。图6再次展示了REM的优势，对于[去甲基萘普生硫酸盐-H]⁻，FIS分离度得到了改善，对于[痛痉宁-o-硫酸盐-H]⁻，结合A+1和A+2共解析出10个FIS峰。对于痛痉宁-o-硫酸盐，七个精细同位素分布峰的质量

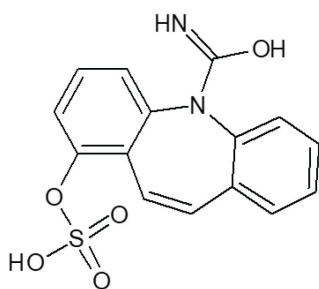
精度均达到ppb水平。这额外的七个鉴定点进一步增加了所检测到生物转化产物分配的可信度。所示示例已获得足够的强度来测量A+1和A+2同位素的精细结构。对于[痛症宁-o-硫酸盐-H]⁻，观察到精细同位素峰“d”，其质量数测量误差为1.8 ppm，这是由于所得中心数据中来自精细同位素峰“c”的影响。利用REM还进一步确定了在4.66分钟、4.8分钟和5.28分钟处洗脱的三种组分（图6 (I)）是同分异构生物转化产物。在相应的系统分辨率下，测量的精细同位素结构峰绝大部分对应于模拟同位素分布的位置¹²。



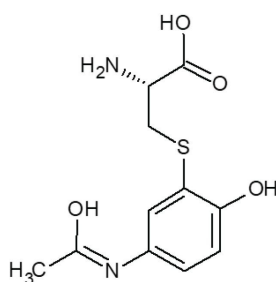
对乙酰氨基酚硫酸盐



去甲基萘普生硫酸盐



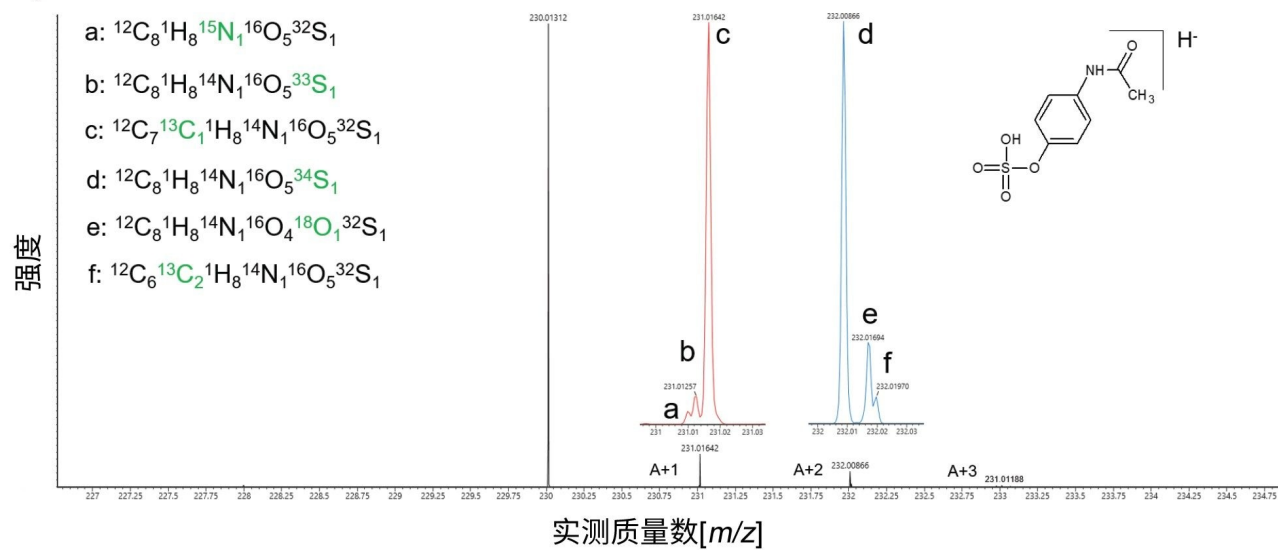
痛症宁-o-硫酸盐



乙酰氨基酚-乙酰基-S-半胱氨酸偶联物

图2.通过LC-MS ES+和ES- (>300,000 FWHM)人尿液筛查鉴定精细同位素结构的代谢物示例。

l)



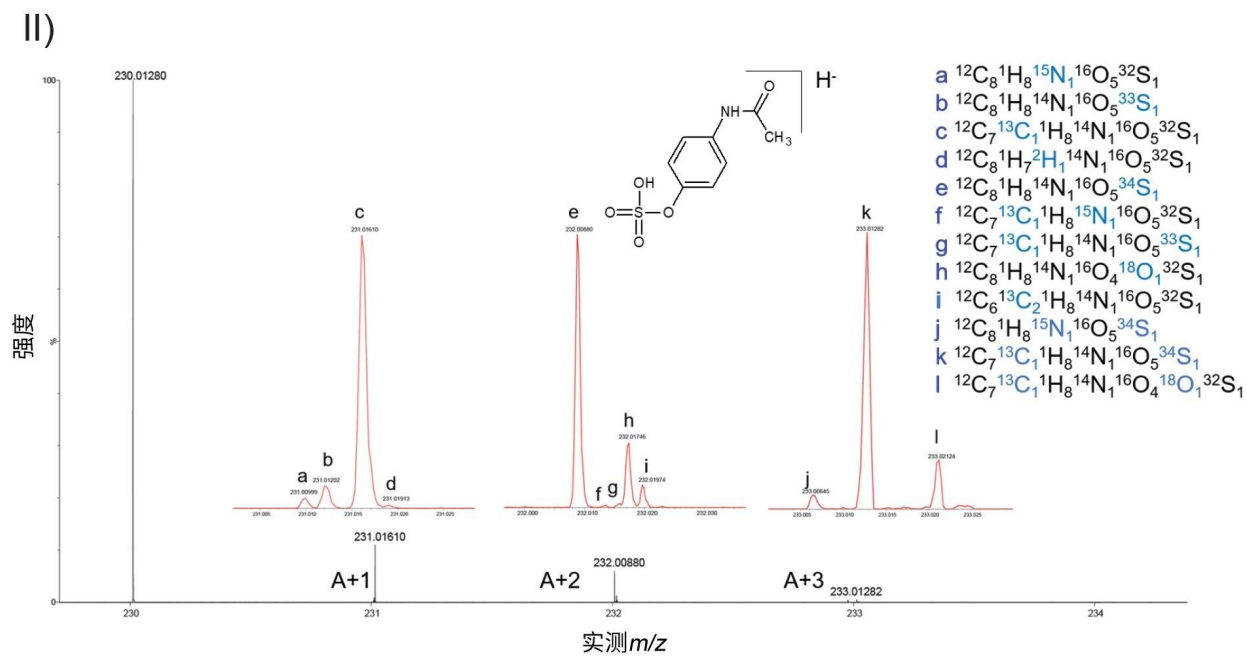
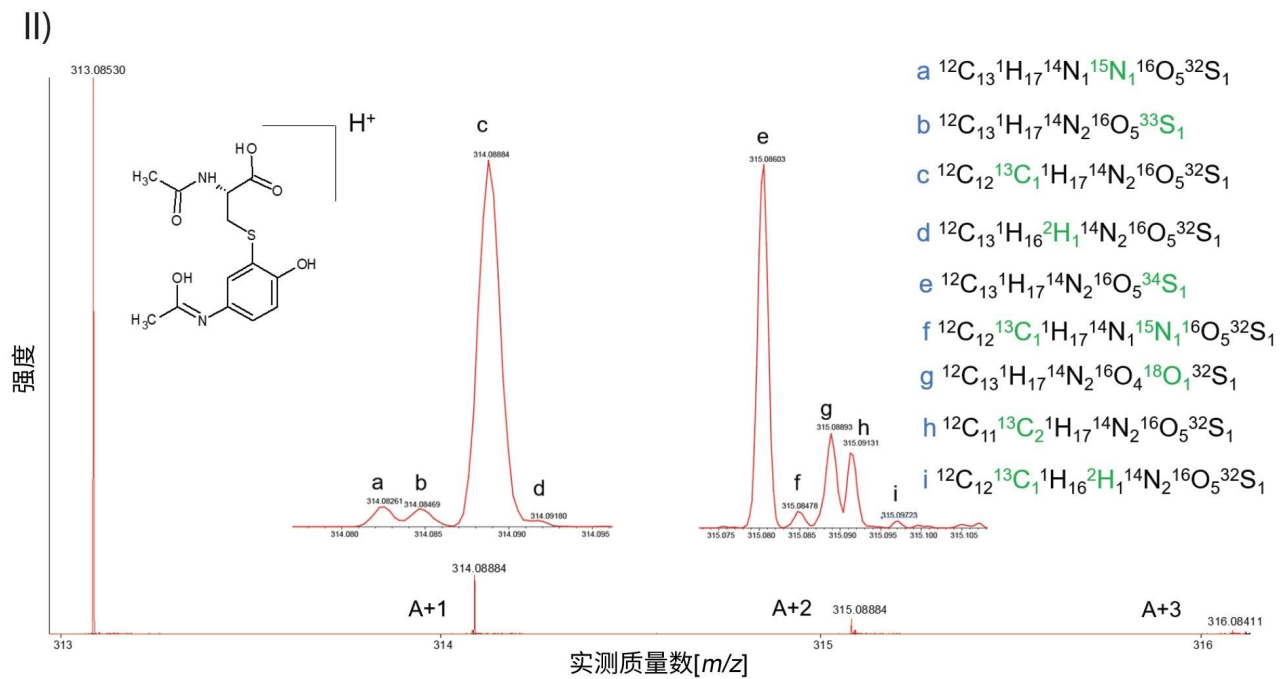
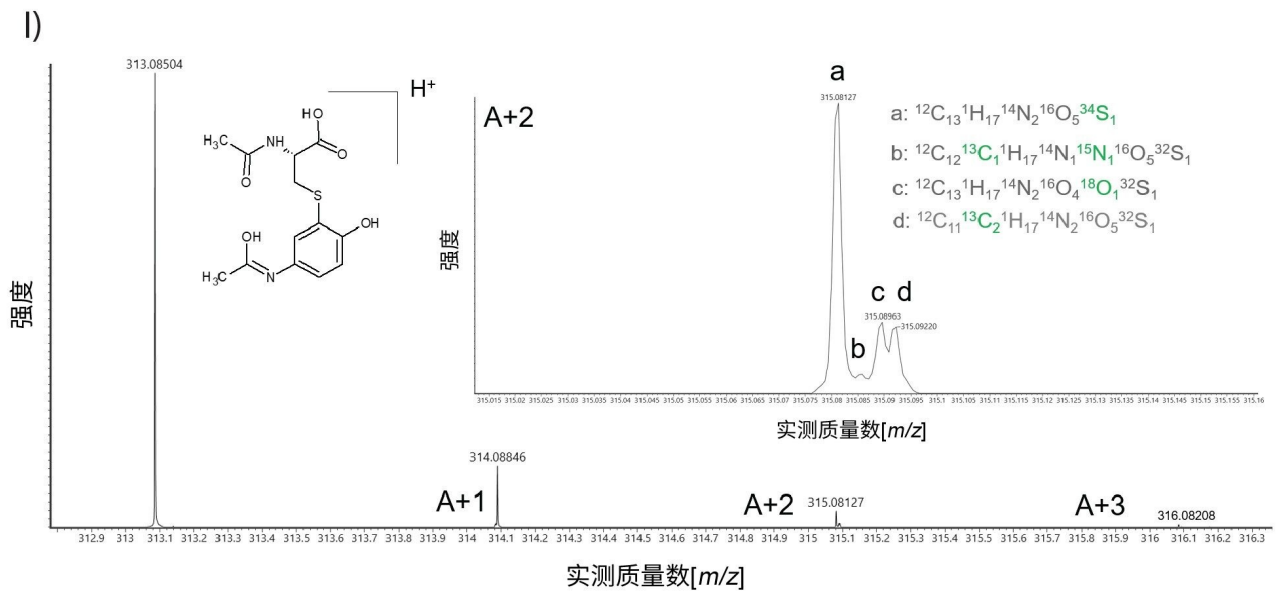


图3.I) 在10 Hz UPLC MRT ES-下获得的[对乙酰氨基酚硫酸盐-H]⁻母离子精细同位素谱图(200,000 FWHM)。II) 在10 Hz UPLC MRT ES-下获得的[对乙酰氨基酚硫酸盐-H]⁻母离子精细同位素谱图(300,000 FWHM)。



III)

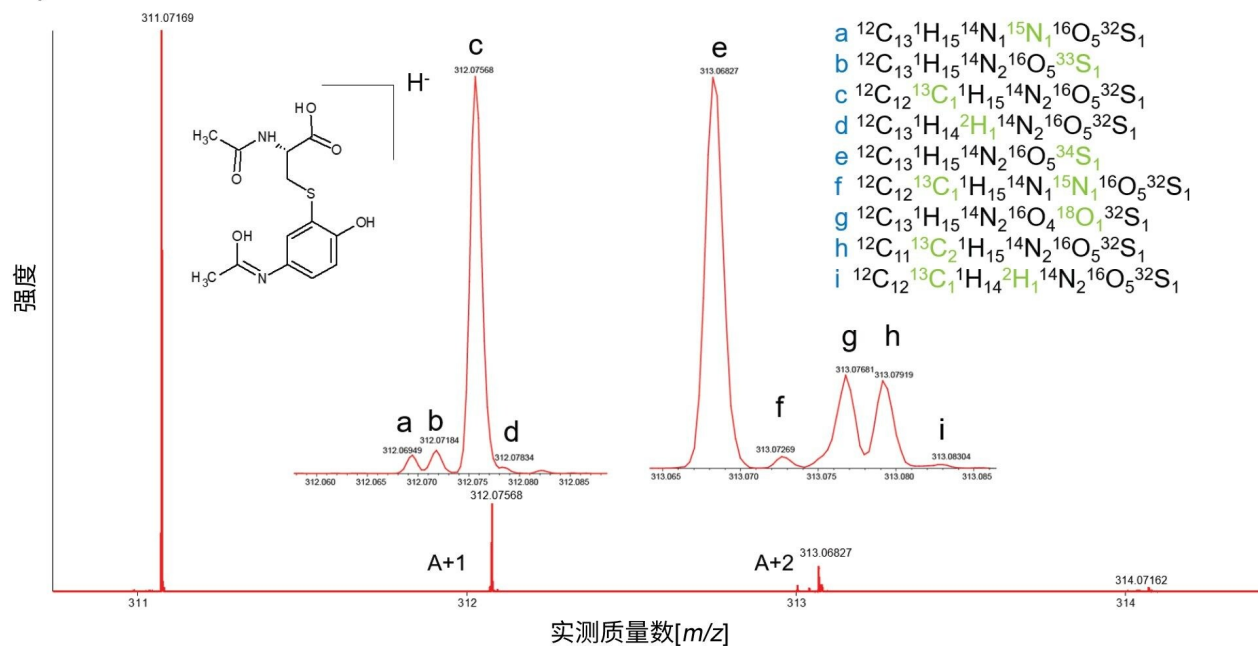
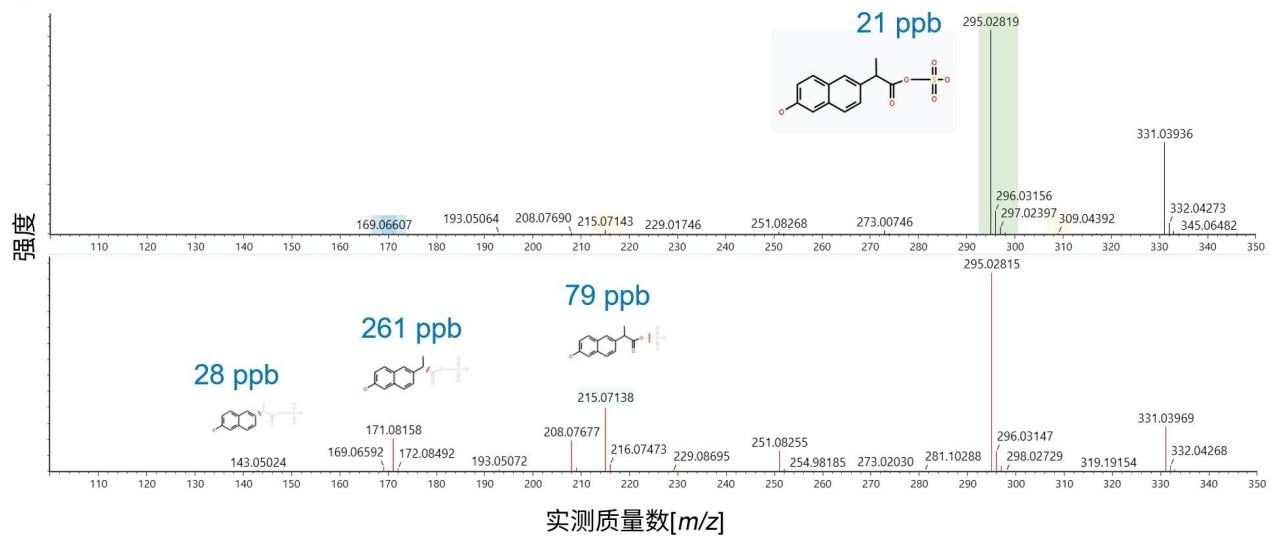
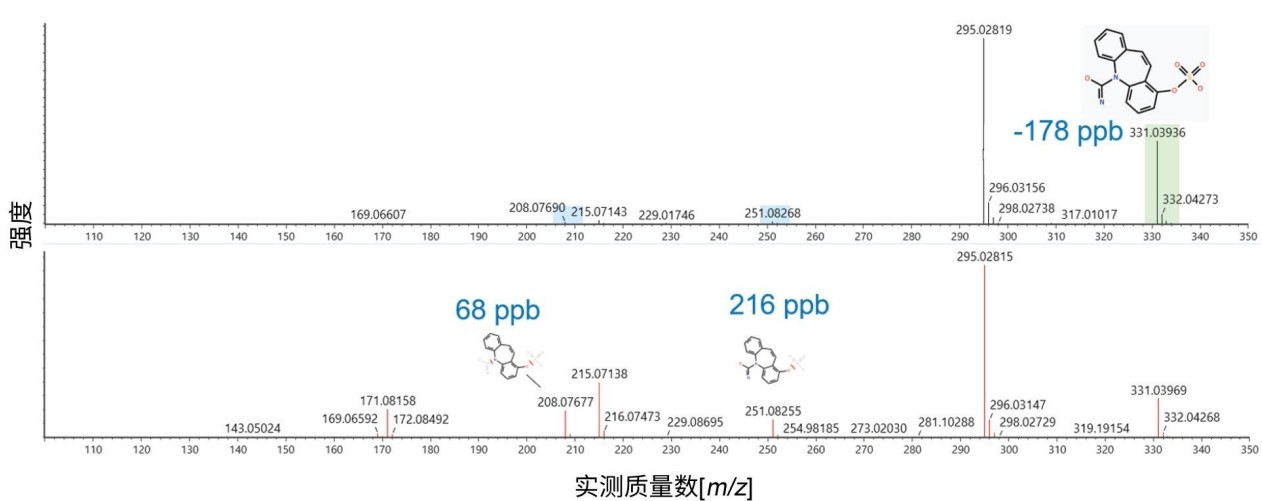


图4.I) 在10 Hz UPLC MRT ES+下实测得到的对乙酰氨基酚-乙酰基-S-半胱氨酸偶联物精细同位素结构(>200,000 FWHM)。II) 在10 Hz UPLC MRT ES+下实测得到的对乙酰氨基酚-乙酰基-S-半胱氨酸偶联物精细同位素结构(300,000 FWHM)。III) 在10 Hz UPLC MRT ES-下实测得到的对乙酰氨基酚-乙酰基-S-半胱氨酸偶联物精细同位素结构(>300,000 FWHM)。

I)



II)



III)

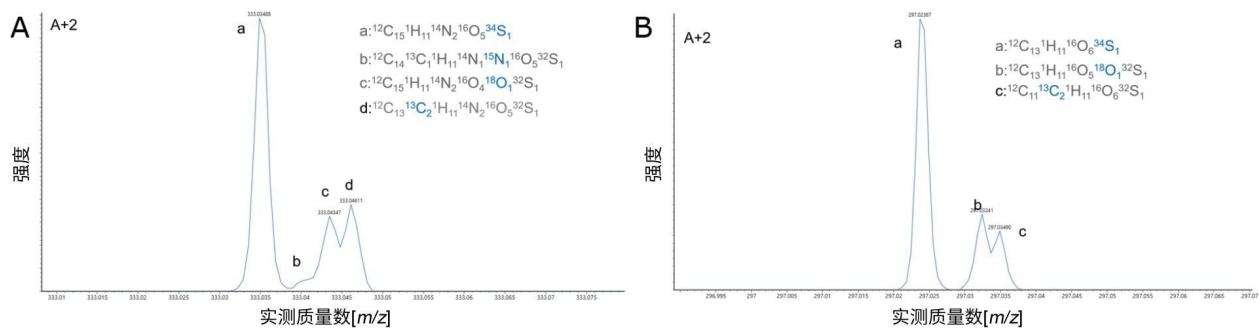
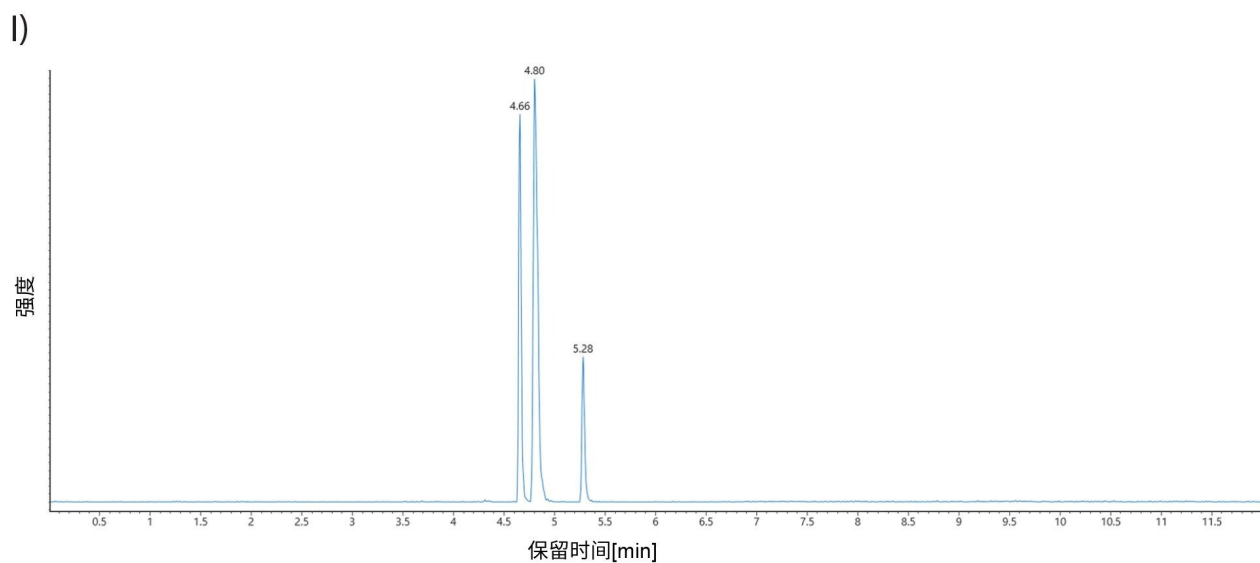
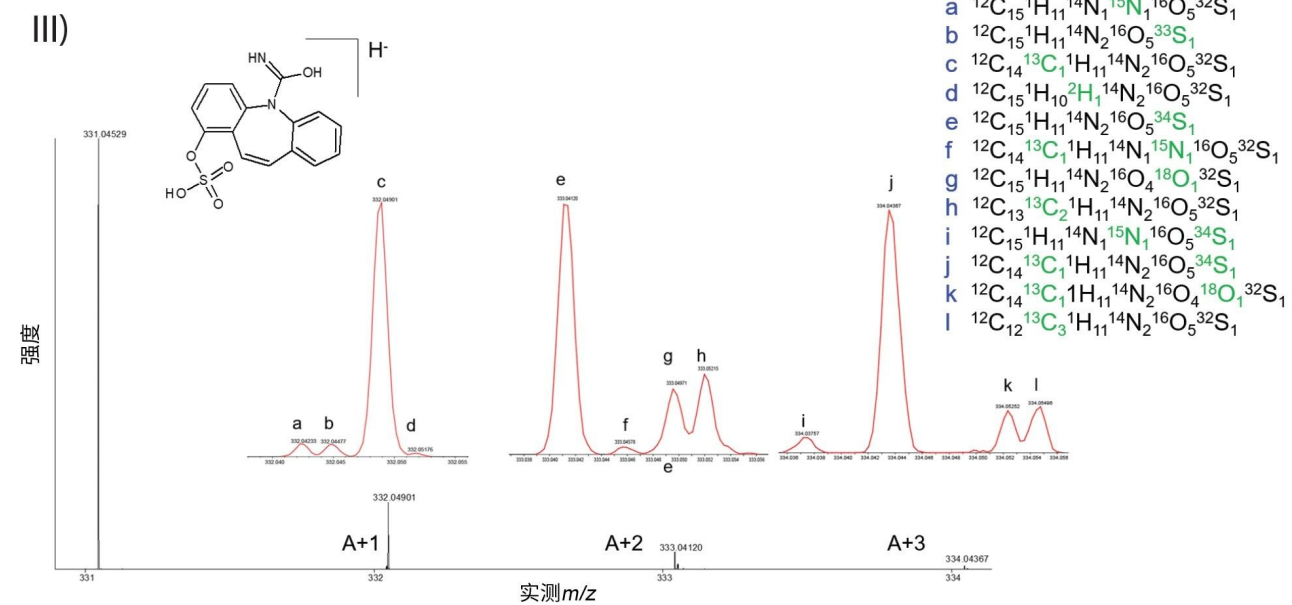
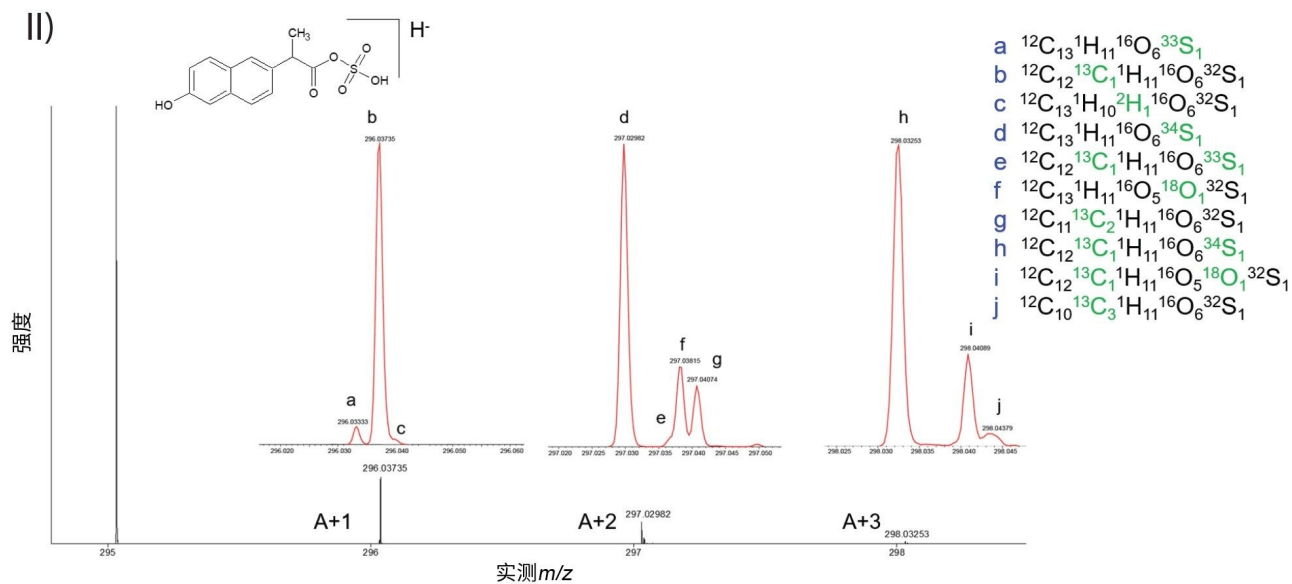


图5. $ES-MS^E$ 分析(>200,000 FWHM)获得的共洗脱 I) [去甲基萘普生硫酸盐- H^-] 和 II) [痛痉宁- O -硫酸盐- H^-] 母离子和碎片离子谱图。III) 通过10 Hz UPLC MRT ES -确认获得的 (A) 痛痉宁- o -硫酸盐和 (B) 去甲基萘普生硫酸盐的A+2 精细同位素结构。





IV)

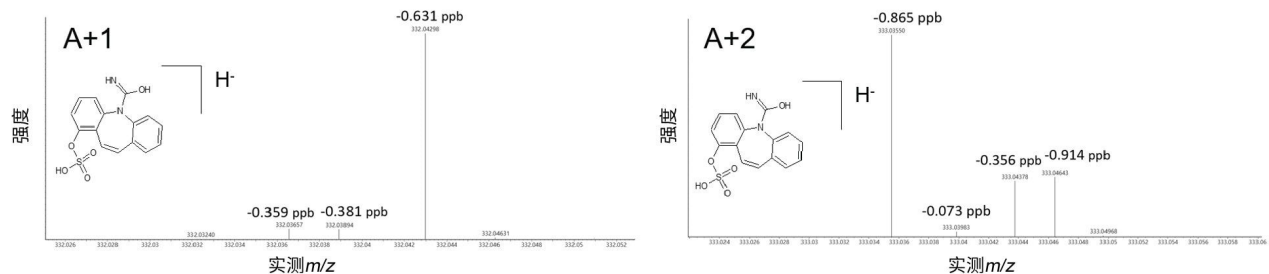


图6.I) 10 Hz UPLC MRT ES+ [痛痉宁-o-硫酸盐-H]⁻ m/z 331提取质量色谱图。II) ES- 下实测得到的[去甲基萘普生硫酸盐-H]⁻和III) [痛痉宁-o-硫酸盐-H]⁻精细同位素结构(300,000 FWHM)。IV) [痛痉宁-o-硫酸盐-H]⁻的A+1和A+2精细同位素精确质量数谱图。

结论

使用SELECT SERIES MRT，在ES+和ES- LC-MS设置，10 Hz（系统分辨率>200,000 FWHM）下进行复杂的尿液非靶向筛查分析时，母离子和碎片离子的常规质量精度可以达到ppb级。利用MRT REM模式，系统分辨率可提高到300,000以上，有利于常规ppb级质量精度的精细结构峰分布测量。

在>200,000 FWHM和>300,000 FWHM下进行的LC-MS采集中，实测FIS峰绝大部分对应于模拟同位素分布的位置。当LC-MS时间框架内解析的FIS结构达到ppb级质量精度时，将提高治疗药物异生物质和代谢物鉴定的可信度。这种革新性的FIS质量数测量方法增加了可选的鉴定标准，从而有效提升了鉴定已知和未知生物转化产物的可信度。

本研究检测到与磺化羟基痛痉宁共流出的第II阶段代谢物去甲基萘普生硫酸盐以及同分异构生物转化产物，展示了代谢物鉴定可信度有所提升。

MRT REM质谱分析提供了利用多方面优势的机会，包括在数据处理工作流程中利用FIS增强特异性，稳定同位素标记应用，并在非不稳定化合物缺乏碎片离子信息的情况下提供额外的鉴定标准。

参考资料

1. Cooper-Shepherd D, Wildgoose J, Kozlov B, Johnson WJ, Tyldesley-Worster R, Palmer M, Hoyes J, McCullagh M, Jones E, Tonge R, Marsden-Edwards E, Nixon P, Verenchikov A, and Langridge J. Novel Hybrid Quadrupole-Multireflecting Time-of-Flight Mass Spectrometry System. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2023 34 (2), 264–272.
2. McCullagh M, Palmer M, Eatough D, Marsden-Edwards E, Langridge J, Cooper-Shepherd D. 使用配备 UPLC™的多反射飞行时间质谱仪探索ppb质量精度对代谢物鉴定的影响 (A部分) . [720007896ZH](#), 2023年4月.
3. McCullagh M, Palmer M, Eatough D, Marsden-Edwards E, Langridge J, Cooper-Shepherd D. Exploring the Impact of Part Per Billion Mass Accuracy for Metabolite Identification using Multi Reflecting Time-Of-Flight MS with UPLC Part B. [720007889](#), April 2023.
4. Falany CN, Ström P, Swedmark S. Sulphation of o-desmethylnaproxen and related compounds by human cytosolic sulfotransferases. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Dec;60(6):632–40.
5. Kiang CH, Lee C, Kushinsky S. Isolation and identification of 6- desmethylnaproxen sulfate as a new metabolite of naproxen in human plasma. *Drug Metab Dispos* 1989; 17: 43–8.
6. Nagao T, Yukihiro D, Fujimura Y, et al. Power of isotopic fine structure for unambiguous determination of metabolite elemental compositions: in silico evaluation and metabolomic application. *Anal Chim Acta.* 2014;813:70–76.
7. Lertratanakoon K and Horning M G. Metabolism of carbamazepine. *Drug Metabolism and Disposition* January 1982, 10 (1) 1–10.
8. Bahlmann A, Brack W, Schneider RJ, Krauss M. Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res.* 2014 Jun 15;57:104–14. doi: 10.1016/j.watres.2014.03.022. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24704908.
9. Richter WJ, Kriemler P, Faigle JW. (1978). Newer Aspects of the Biotransformation of Carbamazepine: Structural Characterization of Highly Polar Metabolites. In: *Frigerio, A. (eds) Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine.* Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3991-5_1
10. Russell JL, Spiller HA, Baker DD. Markedly elevated carbamazepine-10,11-epoxide/carbamazepine ratio in a fatal carbamazepine ingestion, Case Rep. *Med.* 2015 (2015), 369707.

11. Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, Klein SM, Kroetz DL, Gonzalez FJ, Levy R, Human liver carbamazepine metabolism: Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation, *Biochemical Pharmacology*, Volume 47, Issue 11, 1994, Pages 1969-1979, ISSN 0006-2952.
12. Loos, M., Gerber, C., Corona, F., Hollender, J., Singer, H. (2015). Accelerated isotope fine structure calculation using pruned transition trees, *Analytical Chemistry* 87(11), 5738-5744.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[SELECT SERIES MRT <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135082877>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135082877)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

720008080ZH, 2023年11月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)