

应用纪要

使用快速梯度微孔UPLC方法和FDA批准的小分子药物数据库进行高通量非靶向筛查

Michael McCullagh, Jeff Goshawk, Russell J. Mortishire-Smith

Waters Corporation



摘要

将快速梯度微孔超高效液相色谱与离子淌度质谱联用(RGM-UPLC-IM-MS)，生成一组FDA批准的小分子药物参

考数据库。纳入碰撞截面(CCS)值是一种常规且强大的非靶向筛查思路，该值与保留时间、精确质量数和子离子等信息结合能够提高多因子认证特异性。RGM-UPLC-IM-MS数据库包含1206个ES+测量数据和756个ES-测量数据（总共代表1285种药物）。快速梯度微孔色谱法与常规色谱法相比总峰容量相对较低，但与离子淌度质谱分离结合使用时，可保留峰容量，同时提高非靶向分析筛查效率¹。RGM-UPLC-IM-MS非靶向筛查可用于研究领域，这些领域对提高样品通量、时间效率和降低成本势在必行。我们使用生成的数据库对人类受试者的尿样进行药物筛查，以鉴定施用的药物化合物并将其与复杂生物基质中的内源性化合物区分开来。实测CCS值在数据库数值的1%范围内，以质量精度在5 ppm以内、子离子计数 ≥ 1 为附加筛查条件确认了鉴定结果。该筛查思路有助于提高样品通量，并且观察到与常规UPLC-IM-MS相当的检出率。

优势

- 生成包含保留时间、母离子、子离子和CCS的高通量RGM-UPLC-IM-MS小分子数据库
- 生成总共包含1285种化合物的ES+和ES-数据库
- 提高分析灵活性
- 增强复杂基质样品的鉴定可信度

简介

参考之前描述的质谱数据库生成策略²，利用快速梯度微孔超高效液相色谱-离子淌度质谱联用系统(RGM-UPLC-IM-MS)表征一组FDA批准的小分子药物。生成的数据库对串联质谱、ToF或IM分析均有帮助。采用的策略为所表征的分析物提供了保留时间(t_r)、母离子、子离子和碰撞截面(CCS)数据。之前使用常规UPLC方法生成质谱数据库，总运行周期为12 min，使用2.1 mm $\times$ 100 mm色谱柱，应用的洗脱液流速为0.5 mL/min。本研究使用快速微孔代谢谱分析UPLC-MS方法生成了等效的快速梯度微孔UPLC-IM-MS数据库，该方法采用1 mm $\times$ 50 mm色谱柱和0.4 mL/min的洗脱液流速，这些条件使总分析周期缩短至2.5 min。常规和快速梯度UPLC-MS所提供的峰容量分别为150和50³。

高分辨率质谱仪(HRMS)，例如四极杆飞行时间(Q-ToF)质量分析器，已成为临床、法医毒理学和代谢物鉴定研究领域越来越常用的筛查工具^{4,5}。在非靶向“全扫描”数据采集，只需一次分析即可完成数千次检测，随后进行回顾性靶向数据分析⁶。对于许多研究领域（例如农药、真菌毒素和天然植物毒素的检测）而言，提高样品通量、时间效率和降低成本势在必行，由此推动了多类别化合物分析的发展⁷。鉴于样品复杂性是一项常见的挑战，这样的目标也存在于代谢表型分析中，该分析的目的在于分子水平了解基因型、环境与生活方式之间的相互作用。这些研究可能包括数以千计的临床前代谢/毒理学、临床和流行病学样品³。

Dwivedi等人探讨了LC、MS与IM的正交性，表明峰容量提高至2~10倍（具体取决于MS和IM分辨率）⁸。将

RGM-UPLC方法与离子淌度质谱法相结合，可以增强峰容量、特异性和分析灵活性，样品通量提高至5倍，同时保持该策略的时间效率^{9,10}。UPLC-IM包括离子淌度技术（MS分析前的气相分离）与UPLC技术（中性物质分离）^{11,12}。UPLC（秒）、IMS（毫秒）和飞行时间MS（微秒）的时间尺度符合复杂样品的高通量分析要求。化合物的离子淌度分离是气相离子在质谱仪中充满气体的行波离子淌度(TWIM) RF离子导向装置内发生分离，再进入质量分析器。淌度分离通过使用相对较弱的电场驱动离子包穿过惰性缓冲气体（氮气）来实现。离子与缓冲气体之间的碰撞次数导致漂移时间差异。分离结果基于沿RF离子导向装置施加的重复DC脉冲；离子周期性地被脉冲或波超越，淌度较低的物质比淌度较高的物质更频繁地被超越。因此，穿越装置的时间取决于淌度，并受离子质量、电荷和形状等因素的控制。离子淌度在CCS（碰撞截面，一种补充性的鉴定指标）之外，还为LC（疏水性）和MS (m/z)提供了额外的分离维度。CCS在提高鉴定特异性方面的作用已在各种应用中得到证实，包括代谢物鉴定、农药分析、真菌毒素筛查、药用植物物种形成研究和食品添加剂分析^{10,13-17}。

我们使用一组FDA批准的小分子药物数据库对人类健康志愿者的尿样进行药物筛查，以鉴定施用的药物化合物并将其与复杂生物基质中的内源性化合物区分开来。通过比较常规UPLC-IM-MS和RGM-UPLC-IM-MS数据库的应用，评估了该方法的可行性。

实验

样品描述

人尿样用水稀释10倍

给药后6 h取样

痛痉宁片，剂量2 × 200 mg

对乙酰氨基酚片，剂量2 × 500 mg

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统：

Waters ACQUITY UPLC I-Class

样品瓶：

通过LCMS认证的透明玻璃12 × 32 mm螺纹口全回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，溶剂1 mL，部件号600000671CV

液相色谱条件

色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 C ₁₈ (50 mm x 1.0 mm, 1.8 μm)
色谱柱温度：	40 °C
样品温度：	4 °C
进样体积：	4 μL
流速：	0.4 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

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.4 mL/min	99.0	1	初始
0.14	0.4 mL/min	99.0	1	6
0.42	0.4 mL/min	85	15	6
0.83	0.4 mL/min	50	50	6
1.25	0.4 mL/min	5	95	6
1.50	0.4 mL/min	5	95	6
1.51	0.4 mL/min	99	1	6
2.5	0.4 mL/min	99	1	6

质谱条件

质谱系统：	SYNAPT G2-Si
电离模式：	ESI+
采集范围：	m/z 50-1200
采集速率：	每秒10幅谱图
毛细管电压：	1.5kV
脱溶剂气温度：	550 °C
离子源温度：	150 °C
校正标样：	亮氨酸脑啡肽(m/z 556.2766)
采集模式：	HDMS ^E
碰撞能量：	碰撞能量梯度(15~25 eV)
IMS参数：	缺省参数包括：T-Wave速度梯度 = 开始：1000 m/s，结束：300 m/s；T-Wave脉冲高度 = 40 V，在相应的气体池中使用氦气流180 mL和氮气（缓冲气体）90 mL，使IM池压力达到约3.2 mBar
校准：	IMS/ToF校准试剂盒（部件号186008113）（沃特世公司，英国）

数据管理

色谱软件：	MassLynx v4.2 SCN 983
质谱软件：	MassLynx v4.2 SCN 983

信息学软件：

UNIFI v1.94

数据库平均CCS值使用内部版本的UNIFI v1.94测定

结果与讨论

筛查数据库中包含1285种化合物的数据，其中1206个条目在正离子模式下获得（由1082种 $[M+H]^+$ 和766种 $[M+Na]^+$ 物质组成）。该数据库包含762个负离子模式下的条目（由732种 $[M-H]^-$ 和104种 $[M-H+HCOO]^-$ 物质组成）。（FDA批准的药物分析CCS数据库 <<https://ims.waters.com/discover-ims-ms/ccs-libraries/>>）。

使用快速梯度策略已被证明可使峰容量降低约66%³。运用离子淌度技术可以采取高通量策略，还能获得更高的峰容量（与常规MS相比）。本研究考察了离子淌度技术对常规UPLC-IM-MS数据库检测效率的影响。此外，还使用采集后处理工作流程评估了保留时间筛查参数应用范围非常广时的价值。

这种基于数据库的筛查方法提供了一种从复杂生物基质（如尿液）的内源性组分中区分生外源物质的途径。尿液基质的复杂性如图1所示，其中提取的基峰离子色谱图由1000种主要组分和次要组分组成（检测到10,482个候选质量数的强度>100计数）。

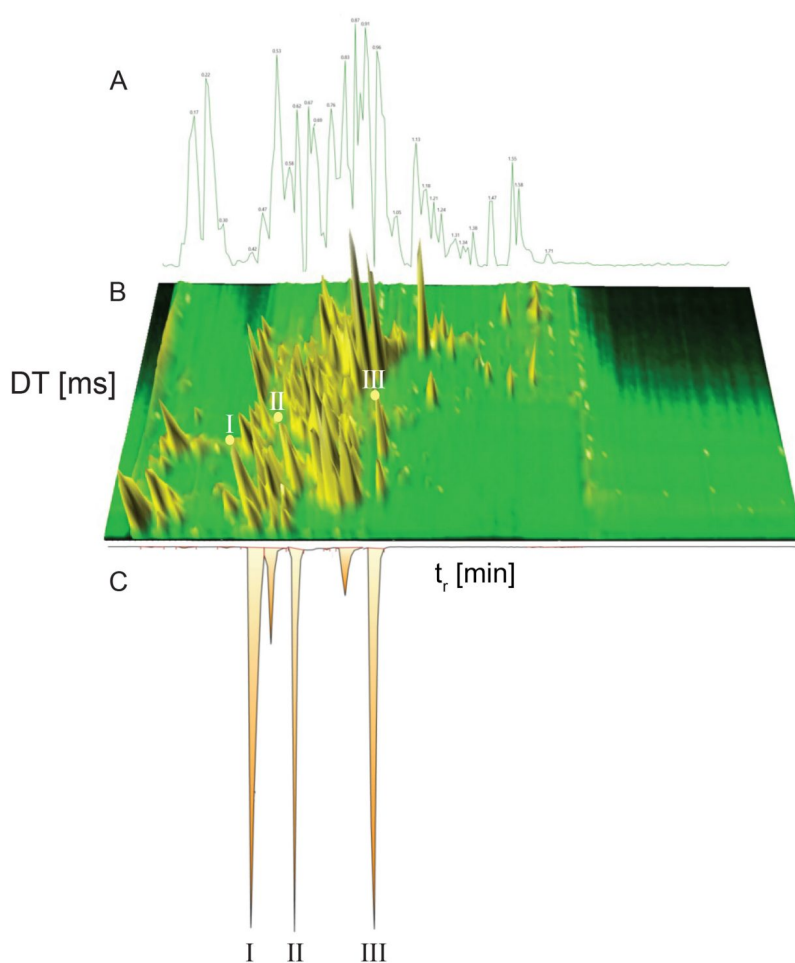


图1.使用快速微孔梯度UPLC-IM-MS进行人尿样筛查获得的分离结果。A) 基峰离子色谱图，B)离子淌度漂移时间分离。C)组合重构提取质谱图：(I)对乙酰氨基酚、(II)咖啡因和(III)痛疼宁。

然而，与常规UPLC相比，色谱峰容量有所下降，但图1所示的对乙酰氨基酚、咖啡因和痛疼宁提取质谱图表明色谱完整性得以保留。从离子淌度轴(DT[ms])可以看出，在UPLC-IM的组合下观察到二维分离，峰容量有所增加。峰容量增加有利于生成单组分漂移时间和保留时间匹配的子离子谱图，从而能够同时生成非目标分析物的子离子谱图以及保留时间和碰撞截面。

图1展示了离子淌度分离结果，显示了UPLC-IM的组合峰容量，其中色谱共洗脱组分在IM维度上发生分离。图2、图3和图4中分别显示了鉴定出的组分痛疼宁-10,11-氧化物、对乙酰氨基酚和痛疼宁的高特异性 t_r /DT母离子和子离子谱图。使用典型的非靶向筛查偏差 (t_r (0.1 min)、质量精度(± 5 ppm)、 ΔCCS (<2%)以及子离子计数(≥ 1))，观察到5种鉴定结果（包括痛疼宁）。对于痛疼宁，获得了精确质量数测量值(2.7 ppm)、保留时间偏差(0.01 min)、子离子(4)和 ΔCCS (0.56%)。表1汇总了在0.1 min的保留时间偏差内连续应用采集后处理工作流筛查参数以减少误检结果的影响。最终，使用快速筛查方法仅观察到1个误检结果，鉴定为托格列净

。使用常规UPLC-IM-MS方法获得的结果表明，接受尿液筛查的受试者服用了对乙酰氨基酚和痛症宁。还检测到代谢物痛症宁-10,11-环氧化物以及咖啡因生物转化产物茶碱。

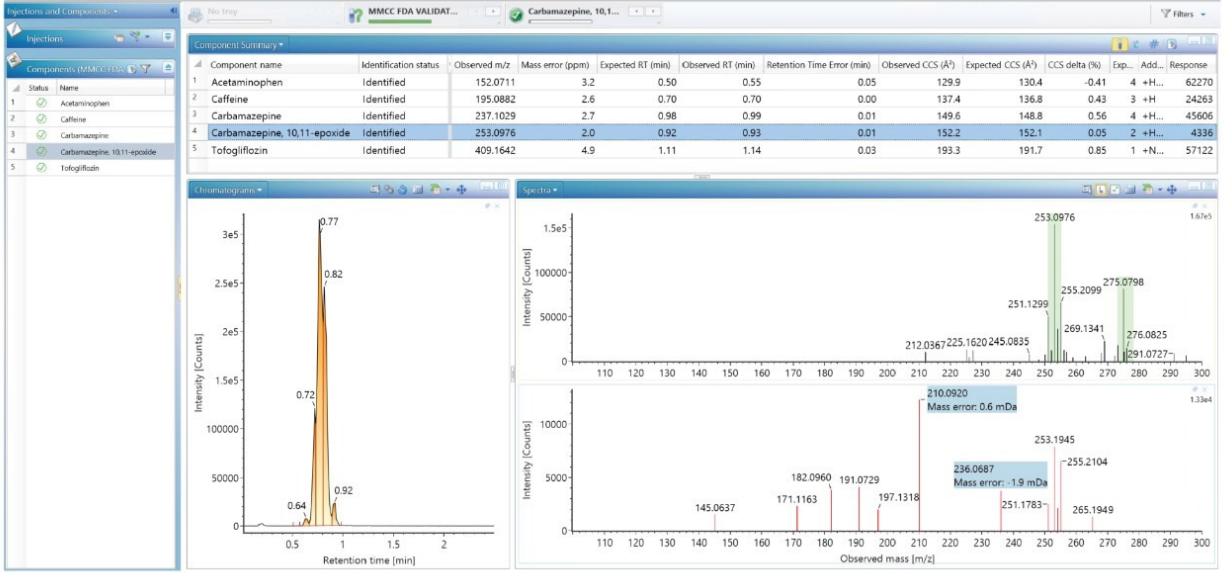


图2.根据快速梯度FDA小分子数据库筛查的检测结果（鉴定出5种化合物），应用了 t_r 偏差0.1 min和质量精度 ± 5 ppm。

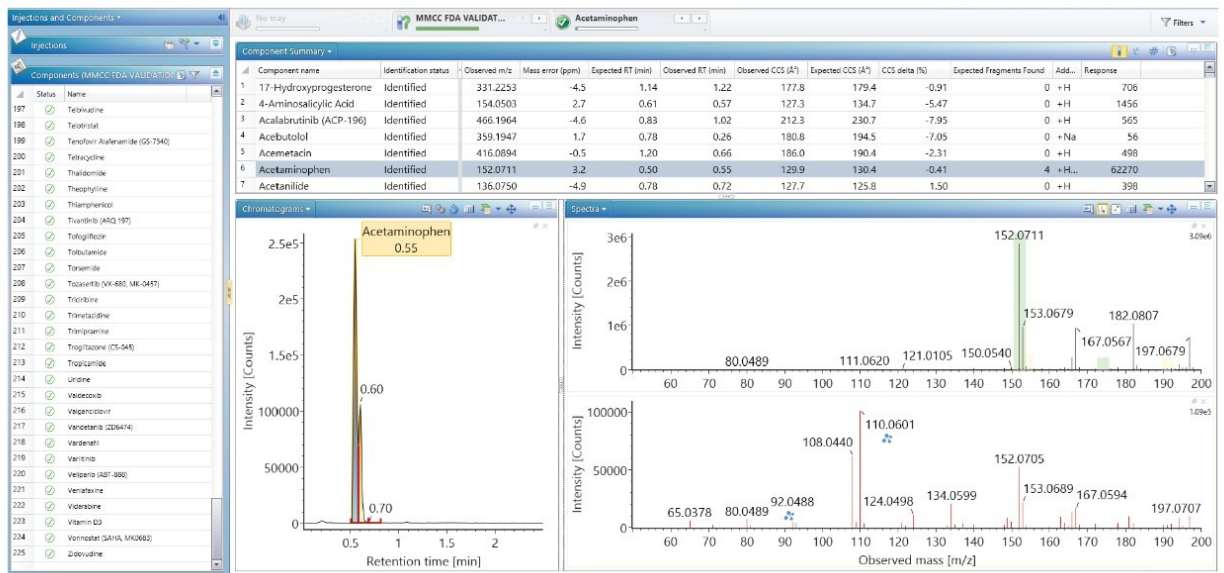


图3.根据FDA批准的小分子药物数据库筛查经采集后处理工作流程筛选的检测结果（鉴定出225种化合物），应用了 t_r 偏差2.0 min和质量精度 ± 5 ppm。



图4.根据FDA批准的小分子药物数据库（包含1285种化合物）筛查经采集后处理工作流程筛选的检测结果（鉴定出93种化合物），应用了 t_r 偏差2.0 min和质量精度 ± 5 ppm及 Δ CCS <2%。

后处理工作流程 步骤 0.1 min	质量精度偏差	Δ CCS	预期碎片 离子数	检测次数	去除的误检 结果
1	5 ppm			80	
2	5 ppm	<2%		43	37
3	5 ppm	<2%	≥ 1	5	75
数据审查				5 (包括1个误检结果)	

表1.连续应用采集后处理工作流程筛选参数组合以减少误检结果，应用了 t_r 偏差0.1 min。

为进一步说明使用累积特异性可以获得的分析灵活性以及结合精确质量数测量、保留时间、子离子和CCS的实用性，调整数据处理参数，设置更宽的保留时间偏差。将保留时间偏差增加至0.5 min，可以灵活克服在分析复杂基质时可能发生的保留时间偏移问题¹⁸（从而避免潜在的假阴性检测），并且灵活地使用不同的色谱梯度洗脱方法。表2汇总了保留时间偏差增加至0.5 min后连续应用组合采集后处理工作流筛查参数以减少误检结果的影响。将保留时间偏差增加至原来的5倍后，观察到一种额外的检测结果（腺苷），但其检测响应较低（578），观察到的质量数测量误差为1.4 ppm，具有一种匹配的子离子且保留时间误差为0.12 min，将其鉴定为可能是内源性腺苷。

后处理工作流程 步骤 0.5 min	质量精度偏差	Δ CCS	预期碎片 离子数	检测次数	去除的误检 结果
1	5 ppm			178	
2	5 ppm	<2%		80	98
3	5 ppm	<2%	≥ 1	6	74
数据审查				6 (包括1个误检结果)	

表2.连续应用采集后处理工作流程筛选参数组合以减少误检结果，应用了 t_r 偏差0.5 min。

后处理工作流程 步骤 2.0 min	质量精度偏差	Δ CCS	预期碎片 离子数	检测次数	去除的误检 结果
1	5 ppm			225	
2	5 ppm	<2%		93	132
3	5 ppm	<2%	≥ 1	7	87
数据审查				6 (包括1个误检结果)	

表3.连续应用采集后处理工作流程筛选参数组合以减少误检结果，应用了 t_r 偏差2.0 min。

使用采集后处理工作流程对假阳性检出率的影响如图3、4和5所示。图5显示了一种可应用后处理偏差筛选参数的工作流程。使用 ± 5 ppm质量精度偏差和2.0 min保留时间偏差，观察到225种检测结果（图3）。纳入CCS值增加特异性，检测结果减少至93种，去除了132种误检结果。筛选子离子计数 ≥ 1 的鉴定结果，观察到的检测结果数量减少至7种。可以看出，当保留时间偏差从0.5 min增加至2 min时，观察到一种额外的检测结果（茶碱），将其鉴定为色谱柱穿透峰。将CCS纳入质谱数据库并用于非靶向筛查工作流程中，可以使用多因子认证策略提高鉴定特异性，同时提高分析策略的灵活性并增强样品通量效率。

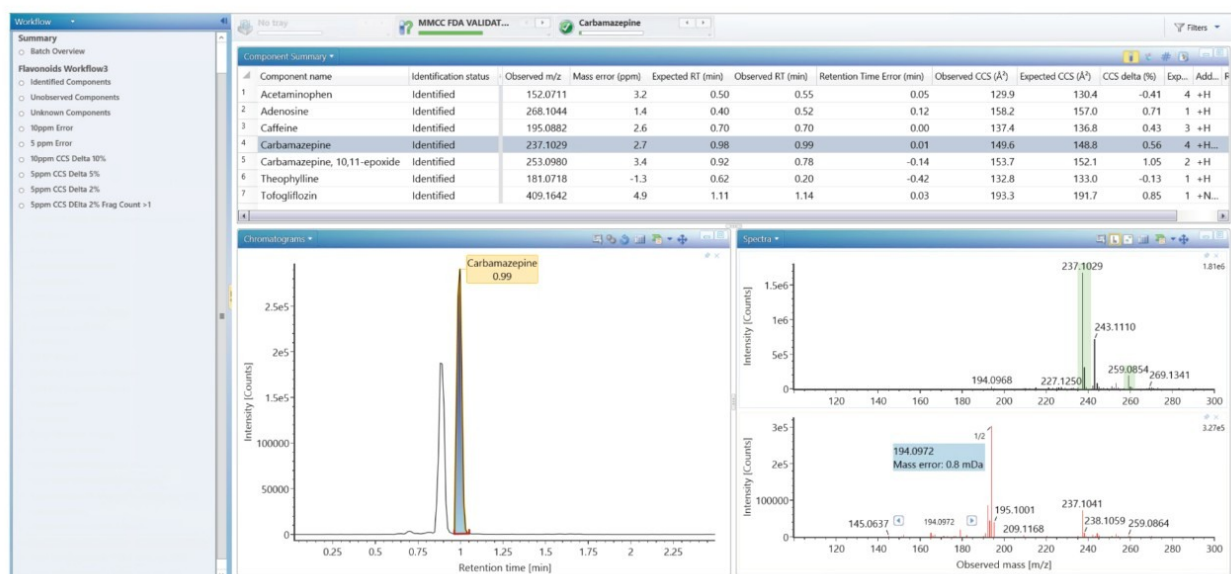


图5.根据FDA批准的小分子药物数据库筛查经采集后处理工作流程筛选的检测结果（鉴定出7种化合物），应用了 t_r 偏差 2.0 min、质量精度 ± 5 ppm、 $\Delta\text{CCS} < 2\%$ 和子离子 ≥ 1 。

结论

使用一组FDA批准的小分子药物数据库（1285个ES+结果和756个ES-结果）来促进对健康受试者尿样的非靶向筛查。使用非特异性保留时间偏差筛查人尿样中存在的复杂生物基质，获得了与UPLC-IM-MS方法（耗时较长）相当的检出率。将CCS纳入质谱数据库中并用于非靶向筛查工作流程中，可以提高鉴定特异性，同时提高采集策略的灵活性。展示了UPLC-IM数据库的通用性，其有利于实现高通量筛选，随后提升分析效率并节省成本。该方法也有助于减少溶剂消耗及相关成本。

参考资料

1. Rainville PD, Wilson ID, Nicholson JK, Isaac G, Mullin L, Langridge JL, Plumb RS. [Ion Mobility Spectrometry Combined with Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Metabolic Phenotyping of Urine: Effects of Column Length, Gradient Duration and Ion Mobility Spectrometry on Metabolite Detection](#) <

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267017307249#!>> .Analytica Chimica Acta <<https://www.sciencedirect.com/journal/analytica-chimica-acta>> .Volume 982 <<https://www.sciencedirect.com/journal/analytica-chimica-acta/vol/982/suppl/C>> , 22 August 2017, Pages 1–8.
2. Goshawk J, Barknowitz G, McCullagh M. Workflow for Automatic MS Library Creation from Time-of-Flight Full-Spectra Data Processed in UNIFI.Waters Application Note [720006783EN](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006783en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006783en.pdf>> , 2020 Feb.
 3. Gray N, Adesina-Georgiadis K, Chekmeneva E, Plumb RS, Wilson ID, Nicholson JK. Development of a Rapid Microbore Metabolic Profiling UltraPerformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Approach for High-Throughput Phenotyping Studies. Anal. Chem. 2016, 88, 5742–575.
 4. Sundström M, Pelander A, Ojanperä I. Comparison Between Drug Screening by Immunoassay and Ultra-High Performance Liquid Chromatography/High-Resolution Time-Of-Flight Mass Spectrometry in Post-Mortem Urine. Drug Test. Anal. 2015; 7:420–427.
 5. Mollerup CB, Dalsgaard PW, Mardal M, Linnet, K. Targeted and Non-Targeted Drug Screening in Whole Blood by UHPLC-TOF-MS with Data-Independent Acquisition. Drug Test. Anal. 2016; DOI: 10.1002/dta.2120.
 6. López M, Fussell R, Stead S, Roberts D, McCullagh M, Rao R. Evaluation and Validation of an Accurate Mass Screening Method for the Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables Using Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight-Mass Spectrometry with Automated Detection. Journal of Chromatography A, 1373, 2014, 40–50.
 7. Dzumanova Z, Zachariasova M, Veprikova Z, Godulova M, Hajdlová J. Multi-Analyte High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Tandem Mass Spectrometry Method for Control of Pesticide Residues, Mycotoxins, and Pyrrolizidine Alkaloids. Anal. Chim. Acta .2015; 863:29–40.
 8. Dwivedi P, Puzon G, Tam M, Langlais D, Jackson S, Kaplan K. Metabolic Profiling of Escherichia coli by Ion Mobility-Mass Spectrometry with MALDI Ion Source. J. Mass Spectrom. 2010, 45 (12), 1383–1393.
 9. Letertre M, Munjoma NC, Slade SE, Plumb RS, Swann J, Coen M, Nicholson JK, Wilson ID. [Metabolic Phenotyping Using UPLC–MS and Rapid Microbore UPLC–IM–MS: Determination of the Effect of Different Dietary Regimes on the Urinary Metabolome of the Rat Chromatographia](#) <

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10337-020-03900-4.pdf> . Volume 83, Pages 853–861 (2020).

10. McCullagh M, Douce D, Van Hoeck E, Goscinny S. Exploring the Complexity of Steviol Glycosides Analysis Using Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal.Chem.* 2018, 90, 4585-4595.
11. Giles K, Pringle SD, Worthington KR, Little D, Wildgoose J, Bateman RH. Applications of a Travelling Wave-Based Radio-Frequency Only Stacked Ring Ion Guide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18, 2401.
12. Pringle SD, Giles K, Wildgoose, J. An Investigation of the Mobility Separation of Some Peptide and Protein Ions Using a New Hybrid Quadrupole/Travelling Wave IMS/oa-ToF Instrument. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2014, 26, 1-12.
13. McCullagh M, Pereira C.A.M, Yariwake JH. Use of Ion Mobility Mass Spectrometry to Enhance Cumulative Analytical Specificity and Separation to Profile 6 - C/8 - C glycosylflavone Critical Isomer Pairs and Known–Unknowns in Medicinal Plants. *Phytochemical Analysis.* 2019, 30(4), 1–13.
14. Goscinny S, McCullagh M, Far F, De Pauw E, Eppe G. Towards the Use of Ion Mobility Mass Spectrometry Derived Collision Cross Section as a Screening Approach for Unambiguous Identification of Targeted Pesticides in Food. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2019, 33(S2), 1–15.
15. Nye LC, Williams, JP, Munjoma NC, Letertre, MPM, Coen M, Bouwmeester R, Nicholson, JK, Plumb RS, McCullagh M, Gethings L, Lai S, Langridge J, Vissers JPC, Wilson ID. A Comparison of Collision Cross Section Values Obtained via Ion Mobility Spectrometry Following Direct Infusion and an Evaluation of U(H)PLC-IM-MS for the Characterisation of Metabolites in Rat Urine. *J Chromatogr A.* 2019 Sep 27; 1602:386–396.
16. McCullagh M, Goshawk J, Eatough D, Mortishire-Smith R, Pereira CAM, Yariwake JH, Vissers JPC. Profiling of the Known-Unknown Passiflora variant Complement by Liquid Chromatography - Ion Mobility - Mass Spectrometry. *Vissers. Talanta* 221, 2021, 121311.
17. Righetti L, Dreolin N, Celma A, McCullagh M, Barknowitz G, Sancho JV, Dall’ Asta C. Travelling Wave Ion Mobility-Derived Collision Cross Section for Mycotoxins: Investigating Interlaboratory and Inter-Platform Reproducibility. *J. Agric. Food Chem.* 2020, Publication Date: September 1, 2020.
18. Fang N, Shangong Y, Ronis M, and Badger M. Matrix Effects Break the LC Behavior Rule for Analytes in LC-MS/MS Analysis of Biological Samples. *Experimental Biology and Medicine* 2015; 240: 488–497.

特色产品

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

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

SYNAPT G2-Si高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/134740622>>

720007174ZH, 2021年3月