

应用纪要

FDA批准小分子药物数据库中所含成分的保留时间、子离子和CCS表征

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

Waters Corporation



摘要

利用一组FDA批准的小分子药物生成UPLC-IM-MS数据库，内容包括ES+模式下1343个条目和ES-模式下950个

条目的保留时间 t_r 、母离子、子离子和CCS值。与常规质谱库相比，离子淌度增强质谱库具有更高的累积特异性，有利于降低误检率并提高复杂基质样品鉴定的可信度。

执行一种非靶向筛查方法，将CCS值与保留时间、母离子和子离子一起使用以评估人尿样。鉴定出异生物质外源组分卡马西平、卡马西平-10,11-环氧化物和对乙酰氨基酚以及各种内源性基质组分。与生成的质谱库相比，常规获得的 Δ CCS值 $<1\%$ ，并在子离子计数 ≥ 1 、质量精度 <5 ppm的情况下确认了鉴定结果。后处理工作流程能够筛选初始60个检测结果中的假阳性匹配，最终鉴定出5种化合物。

通过非靶向筛查人尿液复杂生物基质样品，对包含海量信息的数据库进行了验证。生成的数据库可促进非靶向筛查，从而监测治疗性异生物质。

优势

- 与常规质谱库相比，启用离子淌度的多因子认证质谱库提供了更高的特异性
- 降低误检率并提高复杂基质样品鉴定的可信度
- 数据库提供的 t_r 、母离子和子离子信息可应用于不含离子淌度数据的分析中

简介

高分辨率质谱仪(HRMS)，例如四极杆飞行时间质量分析器(Q-TOF)，在临床、法医毒理学和代谢物鉴定中用作筛选工具越来越普遍，这些应用的目标组分都存在于复杂的生物基质（例如尿液和血液）中^{1,2}。使用非靶向“全扫描”数据采集，单次分析即可完成数千次检测，然后进行回顾性靶向数据分析。提高样品通量的动力非常普遍，有关提高时间效率和降低成本的要求推动了多类别化合物分析的发展。这种方法已被用于分析农药、真菌毒素、天然植物毒素³和有机污染物^{4,5}，这些分析物也存在于各种复杂的样品基质中，从食品⁶到环境样品（例如污水）均涵盖在内^{7,8}。筛查方法的目的是快速检测并鉴定所考察样品中的目标化合物，同时尽可能降低误检率。借助化合物的实测特性，例如精确质量数、同位素模式和子离子谱图，可以应用适当的筛选条件来确定样品中是否存在相应的化合物。但是，对于在复杂生物基质中仅以低浓度存在的目标化合物，单独使用这些特性来鉴定基质或分析物可能会比较困难，需要采用其他方法开发策略。对于此类复杂的分析，IM分离所提供的额外维度有助于应对此类分析挑战，并通过碰撞截面(CCS)获得更高的鉴定特异性。

采用之前报道的质谱库生成策略⁹，用超高效液相色谱-离子淌度质谱(UPLC-IM-MS)表征一组获得FDA批准的市售药物。该策略能够确定保留时间(t_r)、母离子、子离子和CCS。IM仪器（沃特世公司：SYNAPT (2006)、Vion (2015)、Cyclic IMS (2018)）上市后，不断涌现出更多的同行评审论文（截至2014/2015年，超过1250篇）¹⁰⁻¹¹，我们又开发出利用CCS作为额外终点以提高鉴定特异性的分析策略，例如农药筛查分析¹²。此后，CCS在小分子分析中的常规应用在多个研究领域中不断增加，包括制药（代谢、代谢组学、脂质）和食品

安全（兽药、真菌毒素、类固醇、天然产物筛查、天然毒素）。生成了CCS可搜索数据库，由此可以使用CCS指标来提高鉴定的累积特异性并降低误检率。近期研究介绍了如何生成天然产物和食品添加剂数据库以及如何评价CCS测量的长期稳定性和重现性¹⁴⁻¹⁷。

UPLC-IM包括离子淌度（MS分析之前的气相分离）和UPLC（中性物质分离）^{18,19}。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。化合物离子淌度分离的原理是：气相离子在质谱仪中质量分析器之前充满气体的行波离子淌度(TWIM) RF离子导向装置内分离。淌度分离通过惰性缓冲气体（氮气）或使用相对较弱的电场驱动离子包来实现。离子与缓冲气体之间的碰撞次数导致漂移时间差异。由此实现的分离基于沿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，其中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，并且是离子质量数、电荷和形状等因素的函数。离子淌度在LC（疏水性）和MS (m/z)之外提供了第三个分离维度。

我们生成了一个包含海量FDA批准的小分子药物的数据库，并使用该数据库对患者尿样进行非靶向筛查，鉴定患者服用的药物化合物。

实验

样品描述

用水稀释10倍的人尿样。

给药后6 h取样。

卡马西平剂量：2片 × 200 mg。

对乙酰氨基酚剂量：2片 × 500 mg。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class
样品瓶：	通过LCGC认证的透明玻璃12 × 32 mm螺纹颈口 全回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积1 mL [600000671CV]
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 C ₁₈ 色谱柱(100 mm ×

	2.1 mm, 1.8 μm)
柱温：	40 °C
样品温度：	4 °C
进样体积：	10 μL
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	0.5 mL/min	99.0	1	初始
1	0.5 mL/min	99.0	1	6
3	0.5 mL/min	85	15	6
6	0.5 mL/min	50	50	6
9	0.5 mL/min	5	95	6
10	0.5 mL/min	5	95	6
10.1	0.5 mL/min	99	1	6
12	0.5 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
实时质量校正标样：	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和氮气流（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(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

使用内部版本的UNIFI v1.94，测定数据库平均
CCS值

结果与讨论

生成的小分子数据库包含1453种化合物，其中正离子电喷雾模式下包含1343个条目（由1277种 $[M+H]^+$ 和958种 $[M+Na]^+$ 物质组成），负离子模式下包含950个条目（由903种 $[M-H]^-$ 和238种 $[M-H+HCOO]^-$ 物质组成）。（FDA批准药物分析CCS数据库 <<https://ims.waters.com/discover-ims-ms/ccs-libraries/>>）。

生成UPLC-IM-MS数据库基于双重理由。主要理由是该数据库有利于以高特异性检测治疗性异生物质存在与否。数据库特异性还提供了一种区分目标组分与复杂生物基质（例如尿液）的外源性/内源性组分的途径。人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多种主要强度组分和次要强度组分组成（检测到8646个强度计数大于100的候选质量数）。还展示了相应的离子淌度分离结果（包括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。这有利于根据漂移时间和保留时间匹配的物质生成具有相应子离子谱图的非靶向单组分母离子。如图2中的卡马西平鉴定结果所示。

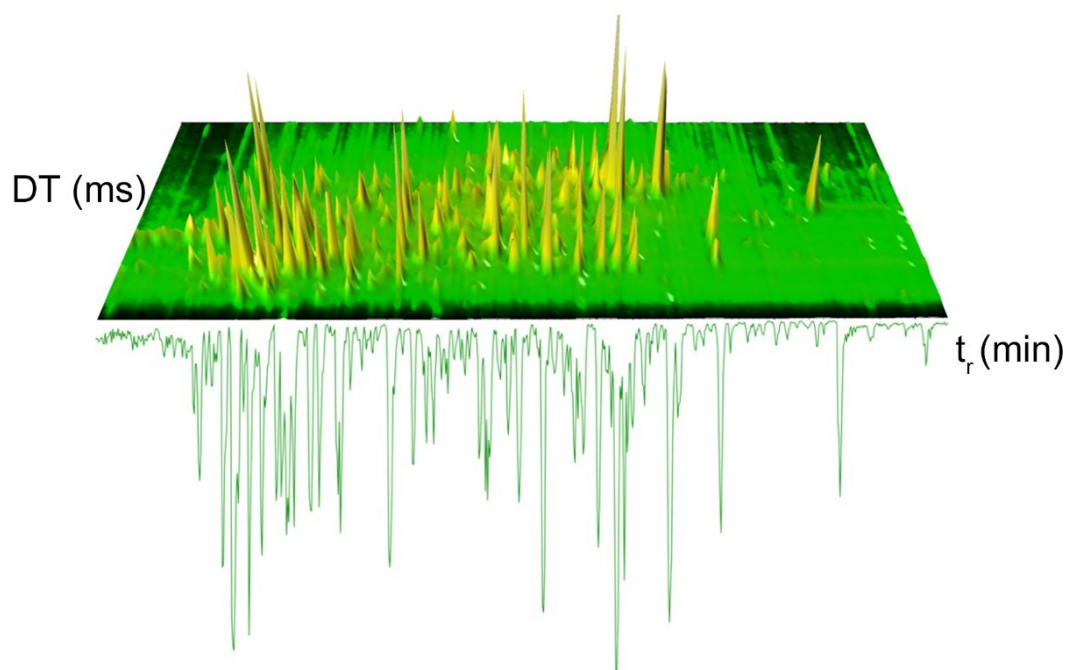


图1.非靶向尿液筛查获得的UPLC-IM-MS分离结果

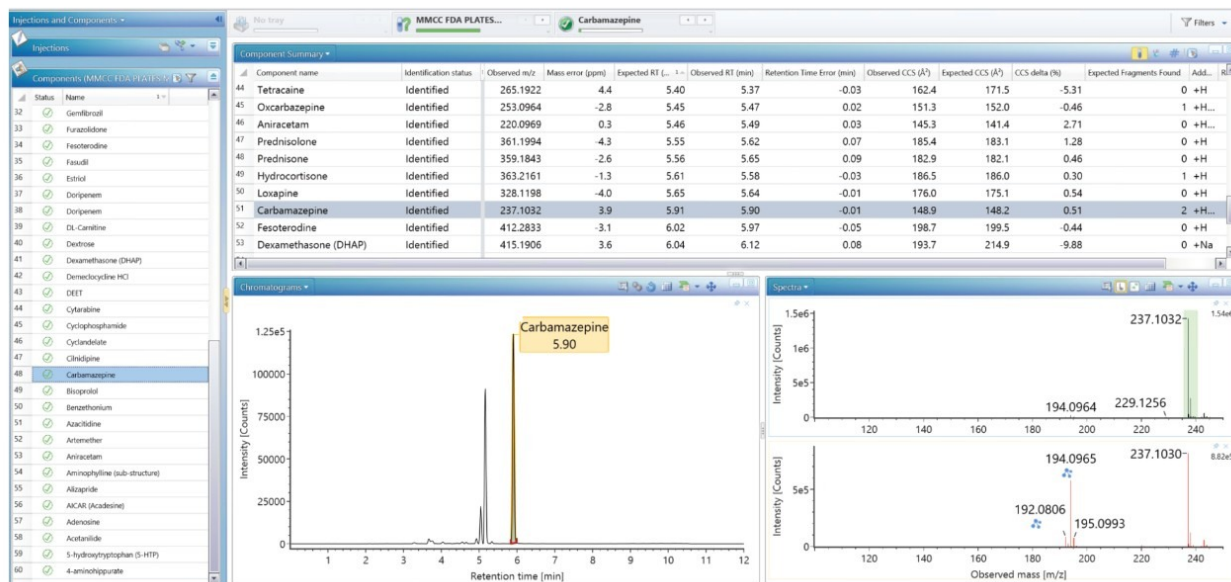


图2.经采集后处理工作流程筛选的检测结果（鉴定出60种化合物），这些结果使用FDA批准的小分子药物数据库筛查获得，应用的容差为 t_r 0.1 min，质量精度 $\pm$ 5 ppm。

使用典型的非靶向筛查容差5 ppm和保留时间容差0.1 min，包括卡马西平在内共鉴定出60种化合物。应用2%

ΔCCS容差后去除了23个误检结果（见图3）。应用至少一种预期子离子（列于UPLC-IM-MS数据库中）的鉴定标准，进一步去除了18个假阳性结果，最终得到5个检测结果（见图4）。

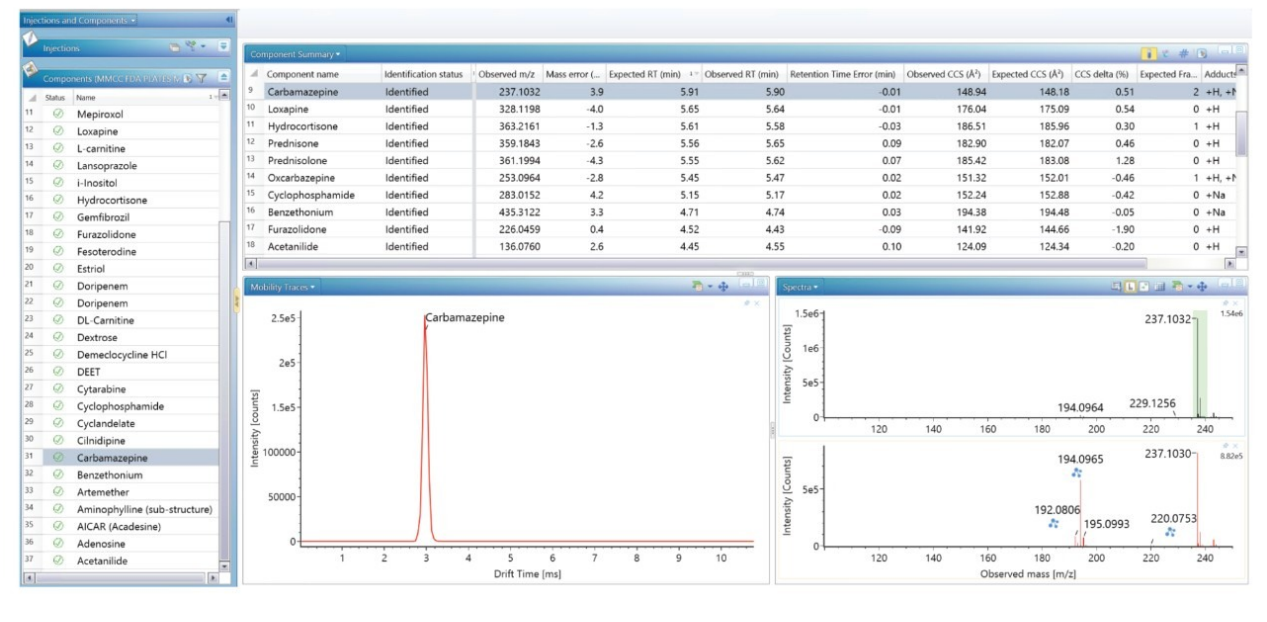


图3.经采集后处理工作流程筛选的检测结果（鉴定出37种化合物），这些结果根据FDA批准的小分子药物数据库筛查获得，应用的容差为 t_r 0.1 min、质量精度 ± 5 ppm和 Δ CCS < 2%。

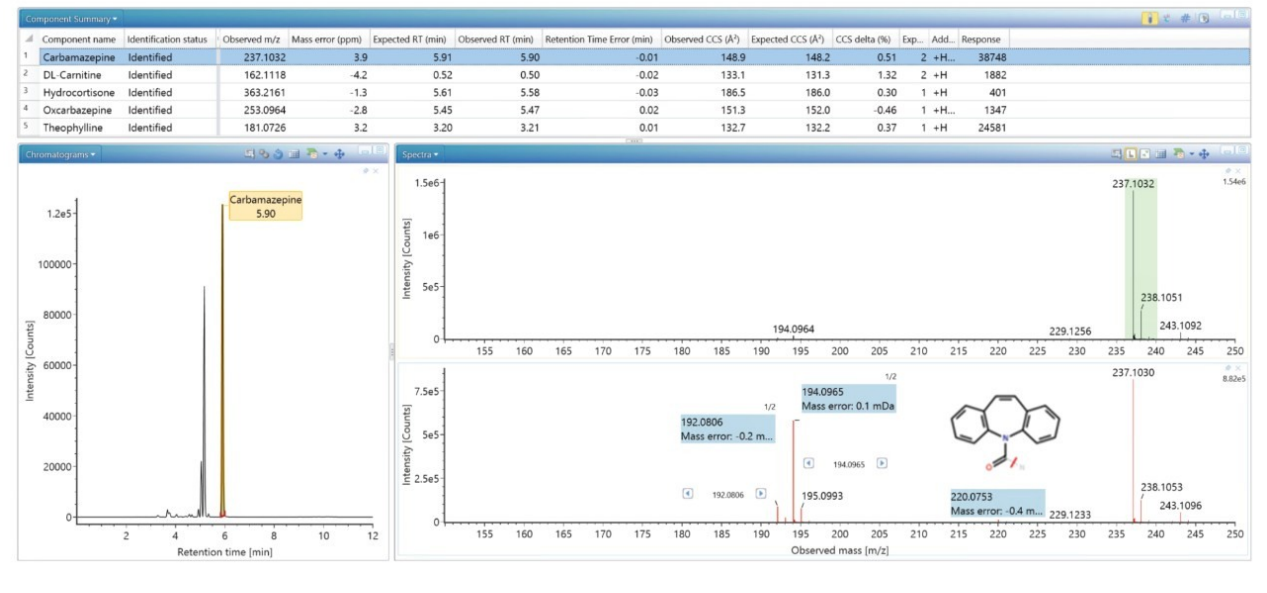


图4.经采集后处理工作流程筛选的检测结果（鉴定出5种化合物），这些结果根据FDA批准的小分子药物数据库筛查获得，应用的容差为 t_r 0.1 min、质量精度 ± 5 ppm、 Δ CCS < 2%和子离子计数 ≥ 1 。

在上述结果中观察到卡马西平的响应最大，此鉴定结果基于以下容差标准获得：精确质量数测量容差5 ppm（实际结果3.9 ppm）、 t_r 容差0.1 min（实际结果0.01 min）、子离子计数 ≥ 1 （实际为2）和 $\Delta\text{CCS} < 2\%$ （实际为0.51%）。这种药物以抗惊厥剂或抗癫痫药著称，还用于缓解某些类型的神经疼痛。卡马西平是一种全球范围内应用的处方药，2011年和2017年仅在美国就分别开出600万份和350万份处方。卡马西平用于预防和控制癫痫发作。图4还展示了内源性化合物DL-肉碱（来源于氨基酸，几乎存在于体内的所有细胞中）和氢化可的松（由肾上腺产生的一种天然物质（皮质类固醇激素））的鉴定结果。此外还鉴定出奥卡西平，但认为正确的鉴定结果应为备选分配，即卡马西平-10,11-环氧化物代谢物($\text{CCS } 151.8 \text{ \AA}^2$)。还鉴定出外源性茶碱，其精确质量数测量偏差在3.2 ppm以内，保留时间偏差在0.01 min以内，子离子为2种，且 ΔCCS 小于0.37%。虽然茶碱是用于预防和治疗呼吸系统疾病的药物，但在本例中检测到这种化合物的一个可能原因是：采集的尿样来自饮用过咖啡的受试者。咖啡因属于一组称为黄嘌呤的化合物，会代谢为茶碱。为进一步证明有关尿样中茶碱来源的假设，对数据进行了进一步解析。将天然产物数据库中咖啡因的母离子、子离子和CCS值输入分析方法中。利用精确质量数测量偏差(-1.0 ppm)、子离子(4)和 ΔCCS (0.06%)确认了咖啡因的鉴定结果（见图5）。非靶向筛查策略通常旨在使误检率低于5%。在后处理工作流程中连续应用组合筛查参数以降低误检率，如表1所示。

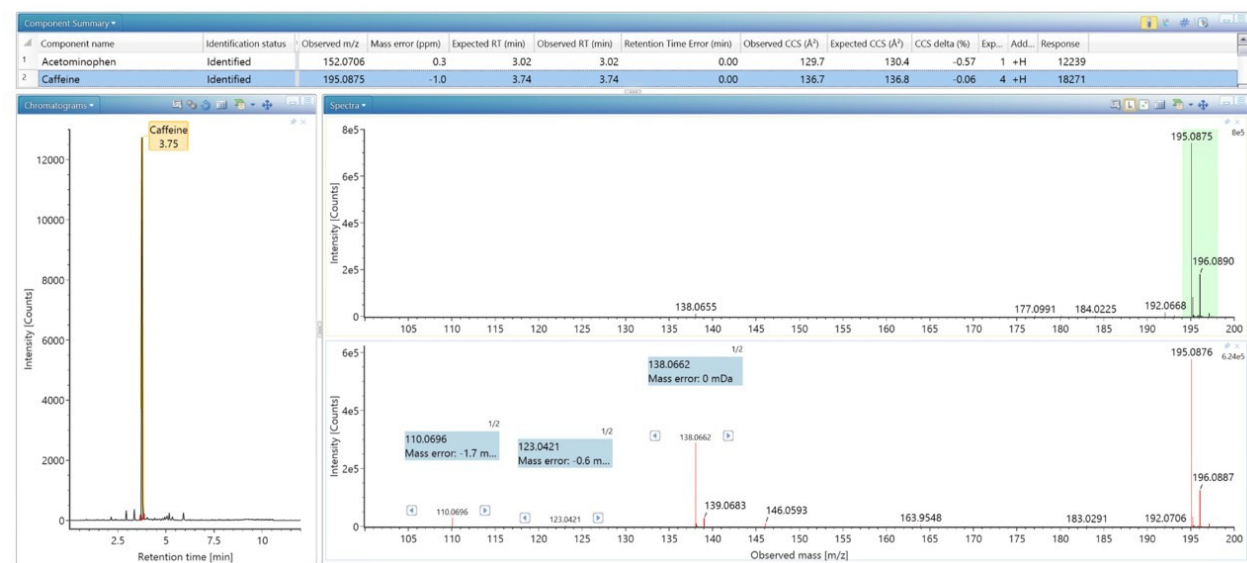


图5.利用天然产物和法医毒理学数据库鉴定出的其他分析物

后处理 工作流程	质量精度容差	Δ CCS	预期	检测次数	去除的误检 结果
步骤			碎片离子		
1	5ppm			60	
2	5ppm	<2%		37	23
3	5ppm	<2%	>1	5	55

表1.连续应用组合工作流程筛选参数以降低误检率

在手动数据审查过程中，观察到表明受试者同时服用对乙酰氨基酚的证据，因此也将相应的CCS和母离子数据（来自法医毒理学数据库）输入分析方法中。还使用精确质量数测量偏差(0.3 ppm)、子离子(1)和 Δ CCS (0.57%)确认了对乙酰氨基酚的鉴定结果（与保留时间无关）。展示了更高的特异性以及分析灵活性，仅根据母离子、子离子和CCS并结合宽泛的保留时间容差即鉴定出对乙酰氨基酚和咖啡因。无法使用保留时间信息，因为数据库中上述化合物获取CCS和子离子信息所用的色谱条件不同于本文所述的条件。通过额外鉴定代谢物对乙酰氨基酚葡萄糖醛酸苷（ t_r 2.48 min，实测CCS 181 Å²）和对乙酰氨基酚硫酸盐（ t_r 2.82 min，实测CCS 149.7 Å²），可进一步提高对乙酰氨基酚检测的可信度。该方法展示了生成的UPLC-IM数据库的通用性以及CCS值额外增加分析选择性的实用之处。

结论

本研究生成了一个FDA批准的小分子药物UPLC-IM-MS数据库（包含1343个ES+条目和950个ES-条目），内容包括保留时间 t_r 、母离子、子离子和CCS值。该数据库有利于促进非靶向筛查，以执行药物监测和违禁药物使用情况分析。通过非靶向筛查人尿液复杂生物基质样品验证了生成的数据库。所执行的研究只产生了一种需要进一步考察的检测结果，即观察到奥卡西平，但是该结果可以得到合理解释和重新分配。鉴定出外源性异生物质和天然内源性物质；未见误检结果。UNIFI功能可对所执行的研究快速地重新分配疑似误检结果。使用FDA批准的数据库、天然产物和法医毒理学数据库条目，展示了UPLC-IM数据库的通用性。在UNIFI采集后处理工作流程中利用CCS筛选非靶向筛查分析的检测结果，在非靶向分析环境中提供了出色的靶向数据审查灵活性。

参考资料

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Pérez-Ortega P, Lara-Ortega FJ, García-Reyes JF, Gilbert-López B, Trojanowicz M, Molina-Díaz, A. A Feasibility Study of UHPLC-HRMS Accurate-Mass Screening Methods for Multiclass Testing of Organic Contaminants in Food, *Talanta* 160 (2016) 704–712.
5. Pérez-Ortega P, Lara-Ortega FJ, Gilbert-López B, Moreno-González D, García-Reyes JF, Molina-Díaz A. Screening of Over 600 Pesticides, Veterinary Drugs, Food-Packaging Contaminants, Mycotoxins, and Other Chemicals in Food by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC-QTOFMS). *Food Anal. Methods*.2017;10:1216-1244.
6. Romero-González R. Food Safety: How Analytical Chemists Ensure It. *Anal. Methods*.2015;7:7193-7201.
7. Coscollà C, León N, Pastor A, Yusà V. Combined Target and Post-Run Target Strategy for a Comprehensive Analysis of Pesticides in Ambient Air Using Liquid Chromatography-Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2014;1368:132–142.
8. Sjerps RMA, Vughs D, van Leerdam JA, ter Laak TL, van Wezel AP. Data-driven Prioritization of Chemicals for Various Water Types Using Suspect Screening LC-HRMS. *Water Research* .2016;93:254-264.
9. Goshawk J, Barknowitz G, McCullagh M. A Workflow for Automatic MS Library Creation from Time-of-Flight Full-Spectra Data Processed in UNIFI. [720006783EN < https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006783en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006783en.pdf) .2020 Feb.

10. 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;18:2401–2414.
11. 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. *Int J Mass Spectrom.* 2007;261(1):1–12.
12. Goscinny S and McCullagh M. A Novel Approach to the Reduction of False Positive and Negative Identifications in Screening of Pesticide Residues in Food Analysis. *Proceedings of the 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Minneapolis, Minnesota.* June, 2013.
13. S. Goscinny, McCullagh M, Far J, 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):34–48.
14. McCullagh M, Goshawk J, Goscinny S. Use of Ion Mobility TWCCSN2 Values in Non-Targeted Food Additives Screening. *Waters Application Note 720006768EN* <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006768en.pdf>> .2020 Feb.
15. McCullagh M, Goshawk J, Mortishire-Smith R. Enhancing Analysis Specificity and Deconvolution of Natural Products Using a Positive Mode Ion Mobility Mass Spectrometry Library. *Waters Application Note 720006650EN* <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006650en.pdf>> .2019 Sep.
16. McCullagh M, Mortishire-Smith R, Goshawk J. UnParalleled Multi-Factor Authentication Mass Spectrometry of Complex Natural Products Utilizing UPLC and Ion Mobility. *Waters Application Note 720006791EN* <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006791en.pdf>> .2020 Mar.
17. McCullagh M, Wood M, Mistry N, Goscinny S, Dalsgaard P. Small Molecule Ion Mobility Investigations into Cross-Platform and Long-Term Robustness of a CCS Metric. *Waters Application Note 720006769EN* <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006769en.pdf>> .2020 Mar.
18. 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.
19. 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.

特色产品

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

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>>

720007175ZH, 2021年4月修订