

## 使用来自不同仪器平台的预测和实测CCS值，在SELECT SERIES Cyclic IMS上进行异构体分离

---

David Higton, Christian Lanshoeft, Frederic Lozac'h

Waters Corporation, Novartis Pharma AG

---

### 摘要

生物转化活动需要跨物种和研究比较代谢物。通常采用色谱保留时间、精确质量数测量和质谱数据对齐代谢物。异构体代谢物比较可能更为棘手，特别是对于保留时间可能因所用分析条件而异的情况。此外，元素化学式和串联质谱(MS/MS)谱图可能相同，这显著增加了数据解析和生物转化定位的复杂性。本研究使用碰撞横截面(CCS)值比较了使用不同机构的SELECT SERIES Cyclic IMS和SYNAPT G2-Si QTof仪器分析代谢物的结果，证明了这种分析物特异性理化性质对跨研究对齐代谢物的好处。

此外，CCS值的计算预测可以提供额外的数据资产，以便比较CCS的预测值和实测值，从而进一步提供更多信息以区分异构体。该预测还可用于建议使用额外循环离子淌度分离(cIMS)帮助分离异构体的时机，并增加使用更高离子淌度分离进行任何分配的可信度。本文所述示例使用cIMS分离雷尼替丁和丙咪嗪的含氧代谢物；这种替代分离机制增加了超高效液相色谱(UPLC)的分离能力，非常适用于共流出的异构体。

### 优势

- 利用灵活的资源配置，因为CCS值支持使用离子淌度仪器进行跨研究、物种和机构追踪代谢物
-

- CCSOnDemand可预测CCS值，并且有可能协助代谢物结构表征
- 通过cIMS提供的更高离子淌度分辨率区分异构体代谢物

---

## 简介

体外和体内代谢研究是药物开发过程中的关键要素。通常，随着药物开发的推进，复杂性水平和研究详细程度也会增加，旨在解决与人类特异性或不成比例的代谢物有关的安全性问题，并确定有助于药理活性的代谢物。

在药物发现阶段，使用短梯度的通用高通量液质联用(LC-MS)法，主要关注主要代谢物，以鉴定潜在候选药物中的分子组成。相比之下，在药物开发阶段使用长梯度的专用LC-MS方法，对所有观察到的代谢物进行色谱分离和结构表征，以确保按照卫生当局的要求保证任何人类代谢物在动物中的安全性<sup>1,2</sup>。

传统方法通过保留时间和质谱数据鉴定跨物种和研究的代谢物。但这种方法对于邻近洗脱的异构体代谢物可能会产生问题，尤其是当它们的MS/MS谱图难以区分时。此外，洗脱顺序可能会因为内部或外部服务提供商使用的色谱条件而改变。离子淌度质谱(IMS)带来了另外的分析维度，能够根据分子的漂移时间计算出CCS值。这种理化性质具有分析物特异性，是一种稳定的参数，可用于跨多个平台、各种条件、基质和研究的代谢物追踪，因为它不受这些变化的影响。此外，通过机器学习或量子力学等计算技术预测CCS值，对于辅助代谢物结构鉴定和推导代谢途径具有重要意义。

本研究比较了使用两种支持IMS的质谱仪（SELECT SERIES Cyclic IMS和SYNAPT G2-Si QTof）获得的一系列批准药物及其代谢物的CCS值，这两种质谱仪位于不同的机构中，由不同的科学家操作。此外，CCSOnDemand<sup>3</sup>是一种机器学习算法，用于预测CCS值并将理论值与每个仪器的CCS实测值进行比较。通过进一步使用cIMS技术，以更高的IMS分辨率区分异构体代谢物，这是市售的线性IMS设备无法实现的。

---

## 实验

### 样品描述

先将批准药物及其代谢物的参比标准品（共26种化合物）用二甲基亚砜溶解，获得1 mM的储备液。随后用乙腈/水(1/1, v/v)稀释每种储备液，为每种化合物制备10 μM的工作溶液，然后用于分析。

## 方法条件

使用CCSOnDemand（一种基于实验性预测机器学习的算法）获得CCS预测值。

在诺华（瑞士巴塞尔）的SYNAPT G2-Si QToF或沃特世（英国威姆斯洛）的SELECT SERIES Cyclic IMS（单圈模式）上进行HDMS<sup>E</sup>分析（n = 3）后确定CCS实测值。相应的LC-MS条件总结如下。这两种仪器实验均使用MassLynx (v4.2)采集数据，使用UNIFI (v1.9.4)处理数据以确定CCS实测值。使用DriftScope (v3.0)和MassLynx (v4.2)获得到达时间分布(ATD)图。

为了进一步证明cIMS分离异构体代谢物的能力，将异构体代谢物的混合物以5  $\mu$ L/min的速度注入离子源，并以单圈和多圈模式采集数据。

## UPLC条件

UPLC系统:	Waters ACQUITY™ UPLC™ I Class <sup>a</sup>	Waters ACQUITY UPLC I-Class PLUS <sup>b</sup>
样品瓶:	LCMS认证总回收样品瓶 (SKU: 600000671CV)	TruView™ LCMS认证最大回收样品瓶 (SKU: 186005662CV)
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 × 150 mm, 1.8 $\mu$ m (SKU: 186003540)	ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 × 100 mm, 1.8 $\mu$ m (SKU: 186003539)
柱温:	40 °C	40 °C
样品温度:	关	10 °C
流动相A:	水 + 0.1%甲酸	水 + 0.1%甲酸
流动相B:	乙腈 + 0.1%甲酸	乙腈 + 0.1%甲酸
进样体积:	10 $\mu$ L	1 $\mu$ L

<sup>a</sup> 位于诺华，与SYNAPT G2-Si QToF联用

<sup>b</sup> 位于沃特世，与SELECT SERIES Cyclic IMS联用

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	95	5	6
1.0	0.4	95	5	6
7.8	0.4	5	95	6
8.5	0.4	5	95	6
8.6	0.4	95	5	6
10.0	0.4	95	5	6

---

## 结果与讨论

在SYNAPT G2-Si QToF或SELECT SERIES Cyclic IMS上对总共26种化合物进行三次重复分析并以MassLynx采集数据后，将HDMS<sup>E</sup>数据导入UNIFI以确定CCS值（表1）。所有测量的均方根误差(RMSE)为1.0%，表明两个数据集之间的一致性非常好。

化合物	预测的 $^{TW}CCS_{N_2}$ ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>a</sup>	实测的 $^{TW}CCS_{N_2}$ ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>b</sup>	仪器 偏差 (%) <sup>c</sup>	预测值与 实测值的偏差 (%) <sup>d</sup>
雷尼替丁	169.2	166.8/167.8	-0.6	-1.4/-0.8
雷尼替丁N-氧化物	172.2	169.9/171.2	-0.8	-1.3/-0.6
雷尼替丁S-氧化物	175.2	167.3/171.8	-2.6	-4.5/-1.9
雷尼替丁N,S-二氧化物	176.4	170.8/168.0	-1.7	-3.2/-4.8
丙咪嗪	165.2	165.1/165.6	-0.3	-0.1/0.3
2-羟基丙咪嗪	171.9	169.4/169.7	-0.1	-1.4/-1.3
丙咪嗪N-氧化物	169.6	169.0/170.0	-0.6	-0.4/0.2
10-羟基丙咪嗪	172.7	166.4/167.1	-0.4	-3.6/-3.3
对乙酰氨基酚	130.6	128.0/130.5	-1.9	-2.0/-0.1
4-对乙酰氨基酚硫酸盐	146.9	149.3/152.3	-2.0	1.6/3.7
对乙酰氨基酚谷胱甘肽	202.1	200.4/201.8	-0.7	-0.9/-0.1
4-对乙酰氨基酚 $\beta$ -D-葡萄糖苷酸	172.6	170.0/172.8	-1.6	-1.5/0.1
双氯芬酸	157.0	156.7/158.1	-0.9	-0.2/0.7
4-羟基双氯芬酸	164.9	161.5/162.2	-0.4	-2.0/-1.6
5-羟基双氯芬酸	164.9	161.2/161.9	-0.4	-2.2/-1.8
双氯芬酸酰基 $\beta$ -D-葡萄糖苷酸	197.5	207.3/202.2	2.6	5.0/2.4
兰索拉唑	177.2	179.2/180.3	-0.6	1.1/1.8
5-羟基兰索拉唑	185.8	184.3/185.2	-0.5	-0.8 /-0.3
兰索拉唑砷	183.1	182.9/182.5	0.2	-0.1/-0.4
兰索拉唑硫化物	176.7	176.5/177.1	-0.3	-0.1/0.2
阿普洛尔	160.3	158.2/159.9	-1.1	-1.3/-0.2
阿托伐他汀	234.3	233.7/230.7	1.3	-0.3/-1.6
氯氮平	178.4	177.8/178.4	-0.4	-0.4/0.0
氯氮平N-氧化物	181.7	180.0/181.2	-0.6	-0.9/-0.3
度洛西汀	169.4	168.7/171.3	-1.5	-0.4/1.1
4-羟基葡萄糖苷酸度洛西汀	212.6	207.6/207.5	0.1	-2.3/-2.4
RMSE			1.0	2.0/1.7

<sup>a</sup>用CCSonDemand确定

<sup>b</sup>使用SYNAPT G2-Si QToF/SELECT SERIES Cyclic IMS获得的三次重复分析的平均值。

SYNAPT G2-Si QToF和SELECT SERIES Cyclic IMS的CV分别为>0.9%和>0.1%。

<sup>c</sup>100 x (SYNAPT G2-Si QToF - SELECT SERIES Cyclic IMS)/SELECT SERIES Cyclic IMS

<sup>d</sup>100 x (实测值 - 预测值)/预测值

表1.在SYNAPT G2-Si或SELECT SERIES Cyclic IMS平台上获得的26种化合物的CCS预测值与实测值比较。

对于多种批准药物及其代谢物，这两个平台的CCS值非常一致，由此证明，除了保留时间和质谱数据以外，CCS值也有助于跨不同研究、方法和机构追踪代谢物。当无法区分异构体代谢物的产物离子质谱图<sup>4,5</sup>、由于新代谢物的分离时间延长而导致保留时间不同<sup>6</sup>，或在药物开发过程中改变了LC条件/设备时，CCS值可能特别有用。

此外，本研究还使用CCSOnDemand预测了所有化合物的CCS值。无论使用何种平台，所有26种化合物的CCS预测值和平均实测值之间的差异均在±5.0%以内。偏差的RMSE计算值为2.0%和1.7%，证实了CCSOnDemand预测特定代谢物CCS值的能力。这些预测不仅有助于结构表征和更好地分配生物转化定位，还可以更有效地表征代谢途径。

此外，CCS预测值还可以指示离子淌度是否能分离异构体代谢物。例如，雷尼替丁N-和S-氧化物的CCS预测值相差 $3 \text{ \AA}^2$ ，这一结果已经通过平均CCS实测值得到证实（表1）。假设两种异构体代谢物在色谱分离时发生共流出，并获得相同的质谱和线性IMS数据（类似于cIMS单圈实验），将得出仅存在一种异构体的结论。不过，通过增加cIMS分析的圈数，显著提高IMS分辨率<sup>7</sup>，则能够分离两种异构体，如相应的ATD图所示（图1）。

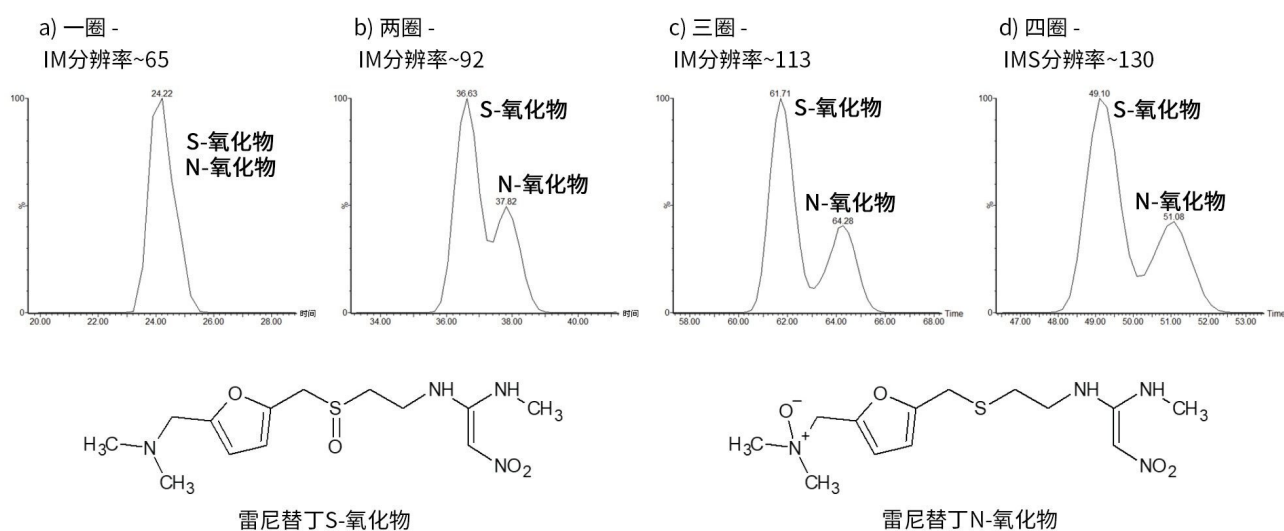


图1.经过1~4圈cIMS分析后，雷尼替丁N-和S-氧化物的 $m/z$  331.1440  $[M+H]^+$ 的ATD图

丙咪嗪的含氧代谢物也出现了类似的情况（图2）。2-羟基丙咪嗪、丙咪嗪N-氧化物和10-羟基丙咪嗪的预测CCS值表明，使用离子淌度法可以分离这些异构体代谢物。单圈通过后，三种异构体未得到分离。不过，10-羟基丙咪嗪在两圈后观察到肩峰，四圈后基本实现基线分离。直到13圈后看到两个最大值，才能区分剩余的两种含氧代谢物。为了分离2-羟基丙咪嗪和丙咪嗪N-氧化物，从环状阵列中发射10-羟基丙咪嗪，另外两种异构体代谢物在25圈后通过cIMS分离，得到325 ( $\Omega/\Delta\Omega$ )的分辨率。

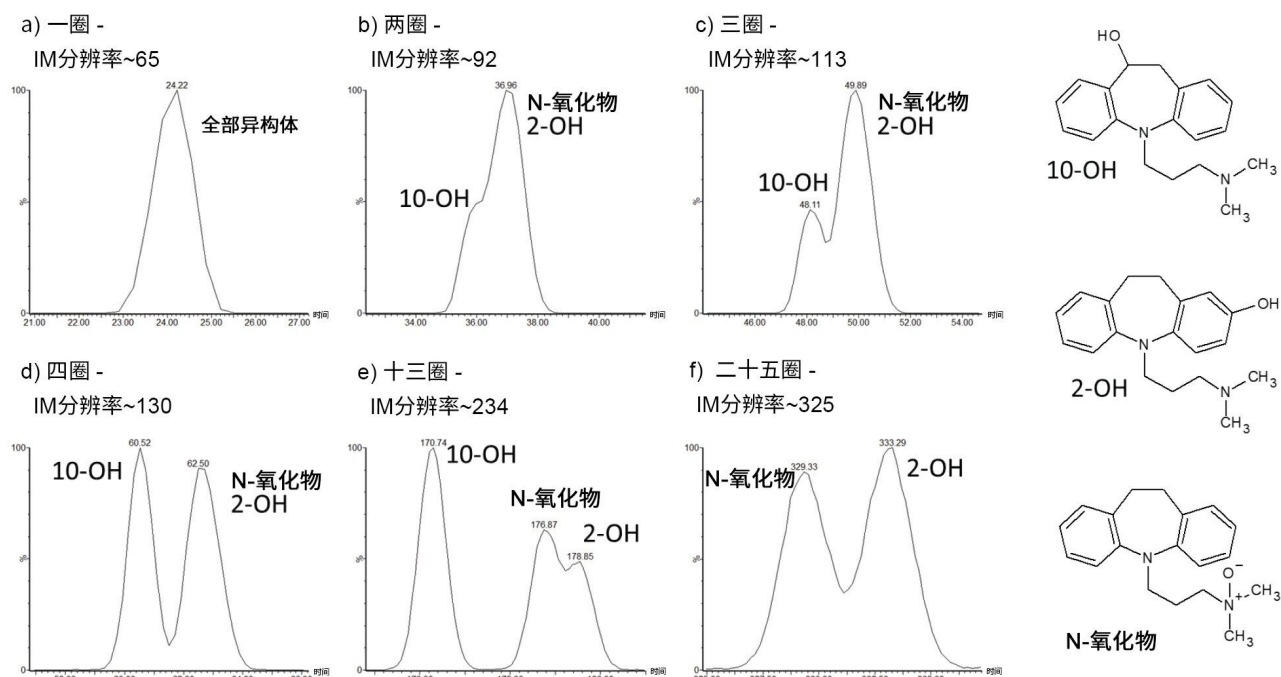


图2.经过1~4、13和25\*圈*c*/IMS分析后，含氧丙咪嗪代谢物的 $m/z$  297.1967  $[M+H]^+$ 的ATD图 (\*在发射10-羟基丙咪嗪之后)

通常情况下，多圈后使用的分离时间与UPLC分离兼容，因为四圈后的漂移时间小于100 ms，每圈的传输损失（约2.4%<sup>8</sup>）对数据的影响极小。因此这些多圈实验可以与UPLC结合使用，提供比单靠质量分辨率更高的分辨率。

## 结论

无论使用何种IMS平台（SYNAPT G2-Si QToF或SELECT SERIES Cyclic IMS），平均CCS实测值均相同，并且与使用CCS on Demand机器学习算法得到的CCS预测值一致。CCS值稳定并具有分析物特异性，因此，这项理化参数可以在涉及多种研究、机构和分析方法的药物发现和开发阶段帮助生物转化科学家。由于异构体代谢物的保留时间和质谱数据相似，因此尤其适合在代谢研究过程中使用CCS值简化已鉴定异构体代谢物的结构表征。此外，通过根据相对CCS值指定代谢物的来源，可以更有效地推导出代谢途径，从而为生成的代谢数据提供更高的可信度。

最后，准确的CCS预测值可作为是否需要更高的离子淌度分辨率来分离异构体代谢物的指标。本文通过SELECT SERIES Cyclic IMS独特的多圈循环离子淌度在整个研究中分离几种异构体代谢物的能力，证明此实验需要高达325 ( $\Omega/\Delta\Omega$ )的离子淌度分辨率。

## 致谢

作者非常感谢Markus Walles（诺华）、Mario Mergelsberg（沃特世）和Emma Harry（沃特世）的支持。

David Higton - 沃特世公司

Christian Lanshoeft, Frederic Lozac'h - Novartis Pharma AG。

---

## 参考资料

1. ICH M3 (R2) [Non-clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals](https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals#current-effective-version-section) <<https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals#current-effective-version-section>> , 2013.
2. FDA Guidance for Industry. [Safety Testing of Drug Metabolites](https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/safety-testing-drug-metabolites) <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/safety-testing-drug-metabolites>> , 2020.
3. Broeckling C, Yao L, Isaac G, Gioioso M, Ianchis V, Vissers JPC. Application of Predicted Collisional Cross Section to Metabolome Databases to Probabilistically Describe the Current and Future Ion Mobility Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, 32, 661–669.
4. Higton D, Palmer ME, Vissers JPC, Mullin LG, Plumb RS, Wilson ID. Use of Cyclic Ion Mobility Spectrometry (cIM)-Mass Spectrometry to Study the Intramolecular Transacylation of Diclofenac Acyl Glucuronide. *Anal Chem*, 2021, 93, 20, 7413–7421.
5. Connolly JFRB, Munoz-Muriedas J, Laphorn C, Higton D, Vissers JPC, Webb A, Beaumont C, Dear G.J. Investigation into Small Molecule Isomeric Glucuronide Metabolite Differentiation Using In Silico and Experimental Collision Cross-Section Values. *J. Am.Soc.Mass Spectrom.* 2021; 32 (8): 1976–1986.
6. Holdsworth C, Clayton R, Robinson H, Lord-Mears C, Kendrick J. Utilization of Ion Mobility Enabled



Collisional Cross Section Measurements for the Comparison of Metabolites across Differing Chromatographic Methods. Poster DMDG 2016.

7. Giles K, Ujma J, Wildgoose J, Pringle S, Richardson K, Langridge D, Green M. A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. *Anal. Chem.* 2019, 91, 13, 8564–8573.

---

## 特色产品

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

[SELECT SERIES Cyclic IMS <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297)

[SYNAPT G2-Si质谱仪 <https://www.waters.com/134740653>](https://www.waters.com/134740653)

[基于UNIFI的代谢物鉴定应用解决方案 <https://www.waters.com/134682897>](https://www.waters.com/134682897)

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

720007514ZH, 2022年2月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号