

DMPK研究中的串联四极杆采集模式

Robert S. Plumb

Waters Corporation

摘要

串联四极杆质谱仪的功能非常强大且灵活。它们是高灵敏度定量分析的首选仪器，检测限可轻松达到pg/mL水平，因此被广泛用于支持DMPK研究，例如首次人体(first time in human, FTIH)研究。串联四极杆仪器的配置与现代快速数据采集技术相结合，有利于多种其他数据采集模式的应用，例如中性丢失、母离子扫描、子离子扫描和极性切换，使DMPK科学家能够轻松快速地解析样品，辅助药物发现或监管机构的提交流程。

优势

Waters Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪是一款功能强大、灵活性高的仪器，具有多种采集模式。支持DMPK科学家使用各种采集模式（例如全扫描、母离子扫描和恒定中性丢失）快速开发高灵敏度的定量和代谢物筛查方法。

简介

串联四极杆质谱仪由于其选择性、特异性和灵敏度而成为定量LC-MS/MS分析的主力工具，非常适用于分析复杂混合物（例如生物体液、废水、制剂和食品等）中的痕量目标分析物¹。在制药行业中，串联四极杆仪器被用于测定生产过程中原料药和药品中痕量水平的杂质。它们还广泛用于定量生物体液中的药物及其代谢物，支持药物发现、临床前开发和临床开发研究^{2,3}。多重反应监测模式(MRM)具有出众的灵敏度，目标分析物的常规测量可达到pg/mL甚至fg/mL的水平，动态范围较宽，可达4~5个数量级⁴。现代串联四极杆仪器的数据采集速度快，非常适

合与高分辨率色谱方法联用，例如毛细管GC或UHPLC，这些方法可获得1~2秒的峰宽。由于具有这些特性，串联四极杆质谱仪与液相色谱联用并使用多重反应监测模式(MRM)，已成为支持药物发现和开发DMPK研究的首选技术。

除了定量分析生物体液（例如尿液、血浆、血清、组织、胆汁、脑脊液(CSF)等）中的药物及其代谢物以外，还需要解析这些样品，确定药物相关代谢物的存在；目的是为确保毒理学分析的全面性，检测新代谢物，并监测生物转化，这些生物转化可作为药物相关毒性的指标（例如谷胱甘肽）^{5,6}。串联四极杆质谱仪的独特配置和离子光学元件有利于进行多种不同的采集模式，例如中性丢失、母离子扫描、子离子扫描和极性切换，以及结合两种或多种上述采集模式进行的其他数据依赖型采集。尽管根据ACS指南，这些名义质量数采集模式不能用于确定性结构报告，但它们是有价值的附加数据采集模式，除了能够高灵敏度定量之外，还增加了串联四极杆质谱仪器的多功能性，例如方法开发、故障诊断和筛查。

这些采集模式可通过特征碎片离子来监测药物相关物质、筛查药物代谢物类别（例如硫酸盐和葡糖苷酸），以及通过特征碎片离子筛查药物相关杂质。这些采集模式还可以通过数据依赖型采集(DDA)，使用子离子扫描触发MS/MS采集（切换或不切换极性），确认有毒生物转化（例如谷胱甘肽）的存在。本文将介绍这些不同采集模式在药物代谢研究中的应用，并着重介绍Waters™串联四极杆仪器的操作简便性和多功能性。

实验

样品描述

美沙吡啶及其代谢物获自连续5天重复静脉注射(IV)给药的雄性wistar大鼠尿样。静脉注射美沙吡啶(150 mg/Kg)。在样本采集过程中，动物单独饲养在专用的代谢物收集碗中。分析前，在冰上收集尿样并在-20°C下冷冻储存。将50 µL尿液与200 µL冰冷的乙腈混合以制备样品，样品经涡旋混合，然后在-20 °C下储存1小时。随后将所得样品在9,000 g下离心5分钟，将上清液转移至全回收样品瓶中，进行LC/MS/MS分析。D2、D4和D6给药后24小时通过腔静脉采集末次血液，收集到Minivette POCT HeLi涂层毛细管中。涡旋混合后，加入200 µL乙腈:甲醇(90:10)沉淀蛋白质，制备大鼠血浆样品(50 µL)，然后在25000 g下离心5分钟。取1 µL萃取物进样到色谱系统中，进行UPLC-MS/MS分析。

研究中使用的大鼠饲养于Evotec法国SAS动物机构。该机构已获得法国农业部以及国际实验动物护理评估与认证协会(AAALAC)的认证。本研究符合相应项目APAFIS #32640-2021101419119467 v5的要求。该项目经Evotec法国伦理委员会（下文简称为CEPAL: CE 029）的审查，并获得了法国教育、高等研究和研究部门的授权。

方法条件

将2 μ L等分尿样进样到2.1 \times 100 mm CORTECS™ C₈ 2.7 μ m色谱柱中进行筛查。色谱柱柱温保持在40 $^{\circ}$ C，使用0.1%甲酸水溶液作为流动相溶剂A，含0.1%甲酸的95:5 (v/v)乙腈:水溶液作为流动相B，在10分钟内以线性反相梯度，在600 μ L/min的流速下洗脱（表1）。通过正离子ESI质谱监测色谱柱洗脱液，运行模式包括：i) 全扫描、ii) 中性丢失、iii) 母离子扫描，或iv) 子离子扫描模式。将2 μ L等分样品进样至2.1 \times 50 mm CORTECS C₈ 2.7 μ m色谱柱中，对血浆样品进行分析。色谱柱柱温保持在40 $^{\circ}$ C，使用0.1%甲酸水溶液作为流动相溶剂A，含0.1%甲酸的95:5 (v/v)乙腈:水溶液作为流动相B在2.5分钟内以线性反相梯度，在600 μ L/min的流速下洗脱（表2）。色谱柱洗脱液采用正离子ESI质谱在MRM模式下进行监测，通道 $m/z = 262\sim 119$ ，锥孔电压为30 V，碰撞能量为25 eV。

梯度表1（尿液分析）

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.6	95	5	初始
1	0.6	95	5	6
10	0.6	60	40	6
10.1	0.6	5	5	6
12	0.6	5	5	6
12.1	0.6	95	5	6

梯度表2（血浆分析）

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.6	95	5	初始
0.5	0.6	95	5	6
2.5	0.6	60	40	6
2.51	0.6	5	5	6
3.0	0.6	5	5	6
3.1	0.6	95	5	6

梯度表2（尿液分析）

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.6	95	5	初始
1	0.6	95	5	6
10	0.6	60	40	6
10.1	0.6	5	5	6
11	0.6	5	5	6
11.1	0.6	95	5	6

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ I Class UPLC™
检测:	Xevo™ TQ-XS
样品瓶:	沃特世全回收样品瓶 (P/N: 186004631)
色谱柱:	CORTECS Premier T3色谱柱, 2.7 μm, 2.1 × 50 mm (P/N: 186010472) , 或CORTECS Premier T3色谱柱, 2.7 μm, 2.1 × 100 mm (P/N: 186010473)
柱温:	40 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	2 μL (尿液) , 1 μL (血浆)
流速:	600 μL/min
流动相A:	0.1 %(v/v)甲酸水溶液

流动相B: 含0.1%甲酸(v/v)的95%乙腈:5%水溶液

梯度: 参见梯度表

质谱条件

质谱系统: Xevo TQ-XS

电离模式: 正离子

采集范围: ESI

毛细管电压: 2.0 Kv

碰撞能量: 30 eV

锥孔电压: 30 V

采集: MRM、全扫描、子离子扫描、恒定中性丢失、母离子扫描

数据管理

色谱软件: MassLynx™ v4.2

质谱软件: MassLynxv4.2

信息学软件: MassLynx v4.2

*注 5.指定每种软件的版本

结果与讨论

Waters Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪的离子路径几何结构支持多种质谱仪采集模式，包括全扫描MS(MS)、SIR（选择离子监测）/MRM（多重反应监测）、中性丢失、子离子扫描、母离子扫描以及这些采集模式的组合（参见表3）。本研究使用大鼠尿样中的抗组胺药和抗胆碱药物美沙吡啶（图1）及其代谢物来说明使用这些不同采集模式获得的LC-MS结果⁷。

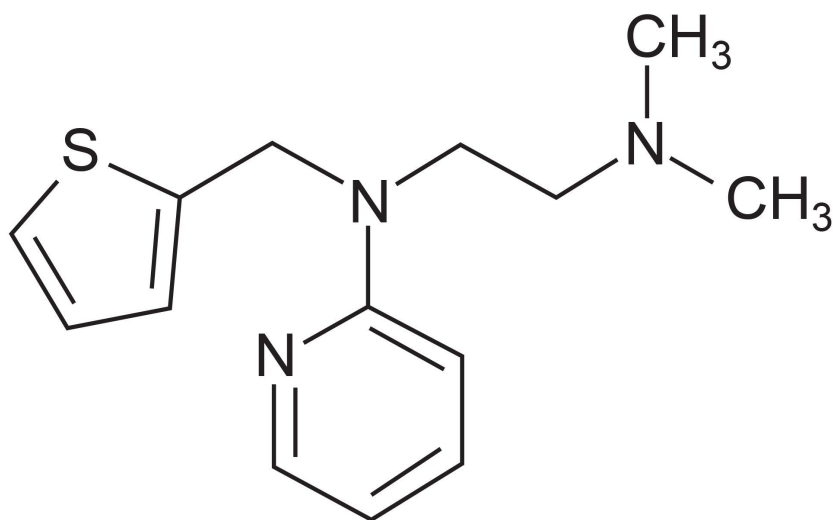


图1.美沙吡啶。

表3

采集模式	应用	优势
全扫描	方法开发、故障诊断	无偏差样品分析，监测所有可电离分析物
子离子扫描	方法开发、结构查看	测定基团中的特征碎片离子
SIR/MRM	定量	用于痕量定量的高灵敏度分析。选择性、特异性
母离子扫描	相关分析物/化合物的检测	诊断碎片离子，用于筛查相关物质、杂质/代谢物
恒定中性丢失	根据分析物类别筛查样品	特异性和选择性

全扫描MS可能是最简单的MS数据采集形式。在这种采集模式下，所有可电离的样品均在预设的质量范围内通过质谱仪，并在质谱仪检测器上显示信号，如图2所示。 m/z 值通过扫描其中一个四极杆来确定（在预设的范围内，例如， m/z 50~800），确保在任何时间点都只有特定 m/z 的离子到达检测器。每种分析物的响应大小取决于分析物的浓度、接受电荷的能力、电离效率、溶剂pH值、缓冲液浓度、有机溶剂组成等等。在这种分析模式下，可以同时检测化学物质的母离子和子离子。该采集模式可在同一分析中进行-ve和+ve离子模式的检测。图3所示的数据展示了通过分析浓度为100 ng/mL的美沙吡啶标准品获得的LC-MS正离子色谱图和质谱图，标准品在 $t_R = 2.45$ min处洗脱。从图中可以看出，基峰的质量数为 $m/z = 262.23$ ，并且在 $m/z = 217.14$ 、166.24和96.88处还存在美沙吡啶碎片离子。这些离子可能是电离过程中源内碎裂所致。

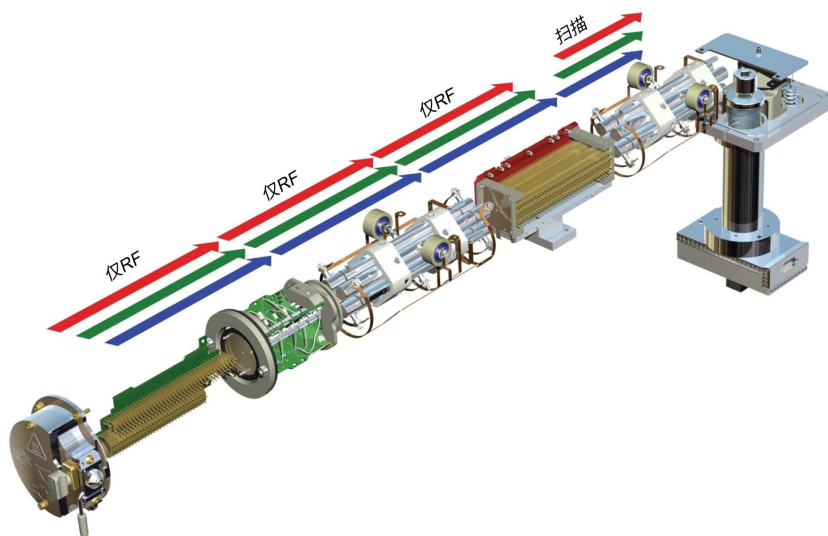


图2.全扫描采集模式。

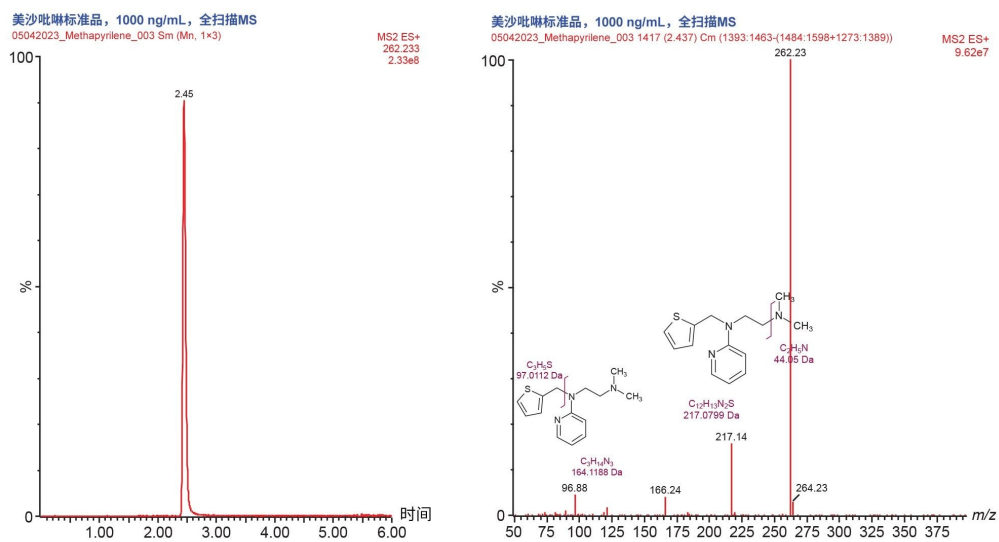


图3.浓度为100 ng/mL的美沙吡啶确证标准品的LC-MS色谱图和全扫描MS分析。

全扫描MS/MS

在第一个分离四极杆中预选特定离子或 m/z 值后，还可以采集全扫描MS/MS（子离子扫描）数据，然后特定离子被引导至碰撞室。离子在电势作用下加速，然后与中性气体（例如氩气）碰撞（图4），产生结构碎片。由此产生的碎片离子随后被最终的分选四极杆扫描，并由质谱检测器产生信号。图5展示了以 $m/z = 262.23$ 作为MS1中选择的质数，在 $t_R = 2.45$ min处洗脱的美沙吡啶峰的碎片离子谱图示例。从图中可以看出， $m/z = 262.23$ 离子产生的主要子离子为 $m/z = 217.09$ 、133.07、121.08和119。这种数据采集模式可用于提供特定的碎片离子数据，通过与确证标准品比较来确认特定化合物的鉴定结果。

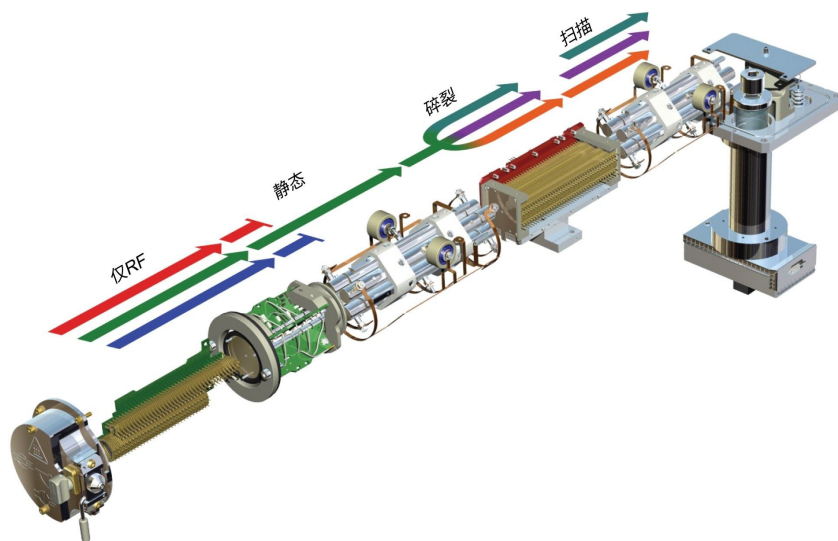


图4.子离子扫描模式。

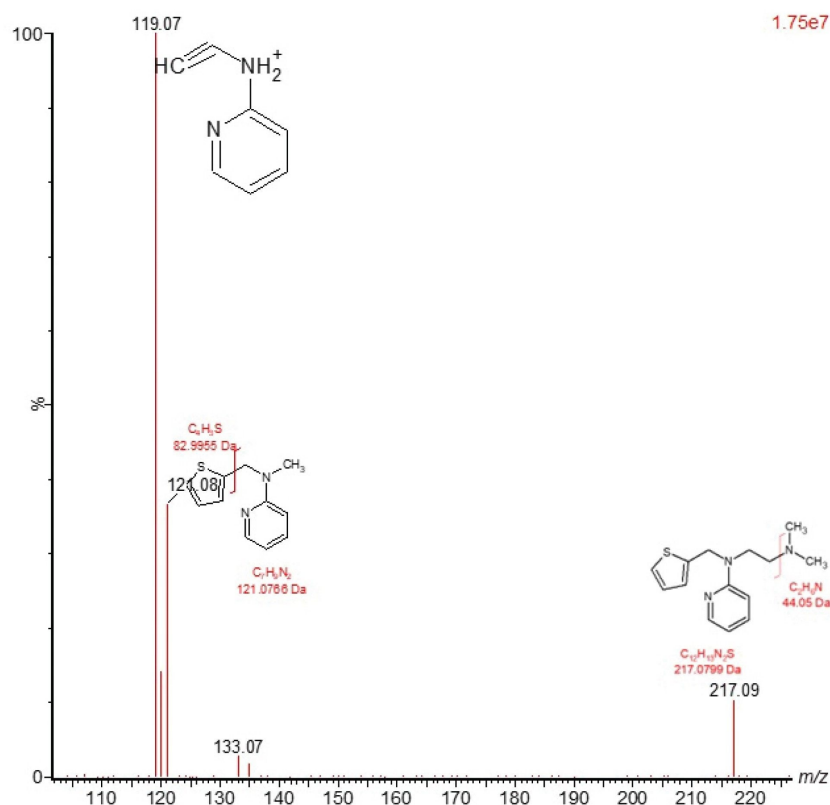


图5.美沙吡啉确证标准品的子离子MS/MS分析, $m/z = 262.23$, 浓度为100 ng/mL, 在保留时间 $t_R = 2.45$ min处洗脱。

SIR和MRM

串联（或称为三重）四极杆质谱仪主要用于在SIR或MRM模式下进行定量分析，它们具有出色的选择性和特异性，因此具有极高的灵敏度。在这些分析模式下，只有单个或所选的少数几种离子通过质谱仪并到达检测器进行分析。在选择离子监测(SIR)模式下，所有离子都可以通过第一个分离四极杆和碰撞室，随后在最终分离的四极杆中选择单个离子或少量完整（即未碎裂）的离子，到达检测器进行测定，如图6A所示。在MRM模式下，第一个分离四极杆选择单个离子，然后该离子被引导至碰撞室进行碎裂，然后在最终的四极杆中选择特定子离子，到达检测器中进行测定，如图6B所示。正离子和负离子的MRM或SIR数据采集可在同一采集中进行。监测母离子到碎片离子反应具有特异性，因此多重反应监测(MRM)分析是环境科学和药物代谢研究中最常用的分析模式，这类研究需要测量食品或生物体液等复杂混合物中极低浓度的目标分析物。图7展示了使用快速RPLC梯度测定大鼠血浆中的美沙吡啉（浓度1 ng/mL）的MRM分析示例。从这些数据中我们可以看出，该方法能够轻松检出1 ng/mL的样品

，而空白血浆样品在相同的保留时间($t_R = 1.69$ min)处没有显示药物存在。

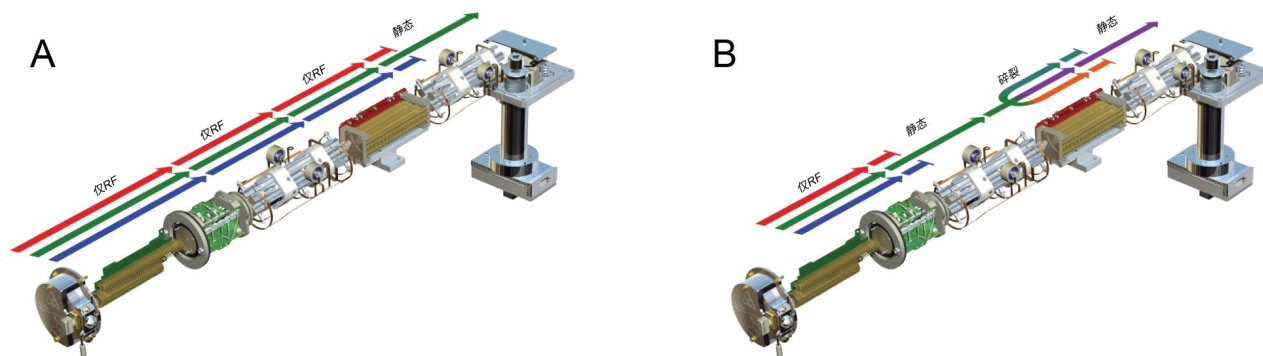


图6.单离子扫描(SIR) (A)和多重反应监测(MRM) (B)。

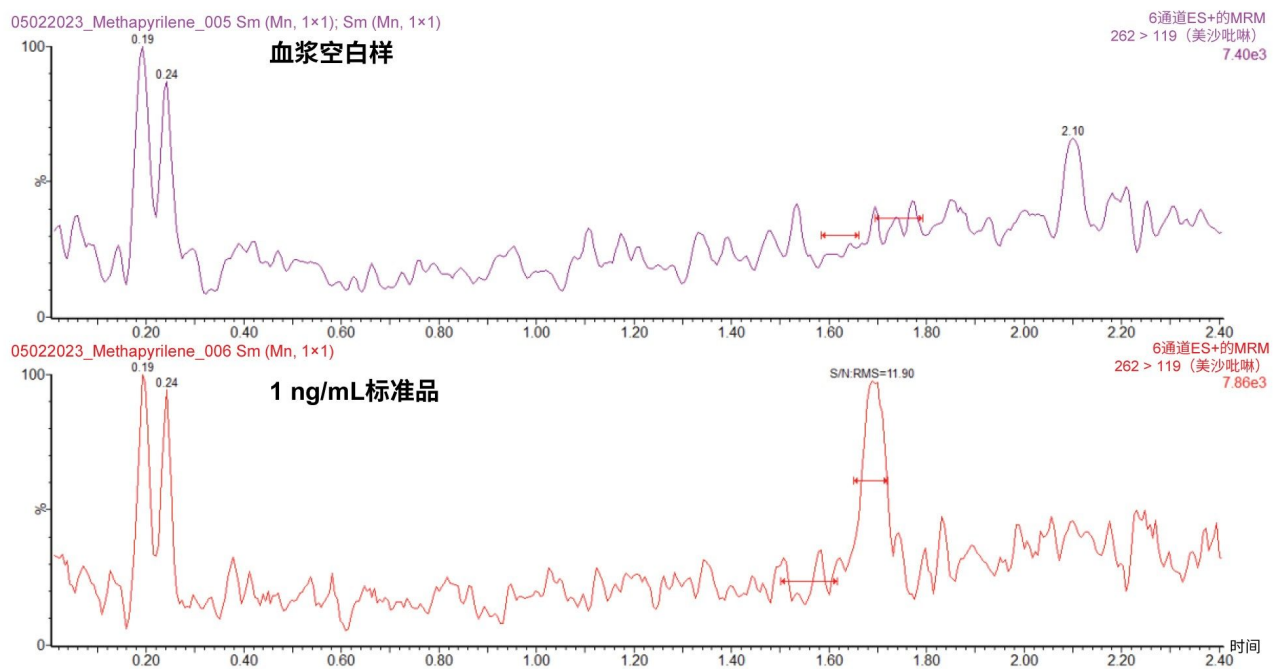


图7.使用UHPLC-MS/MS MRM监测(262~119)在正离子模式下分析蛋白沉淀大鼠血浆中的美沙吡啶 (浓度1 ng/mL) 与空白提取的大鼠血浆。

母离子扫描

母离子扫描能够鉴定样品中产生共有（和预定义）碎片离子的所有特定母离子的质量数。母离子扫描结合了扫描、碎裂和选择离子监测。在这种分析模式下，第一个分离四极杆被设置为扫描特定的质量范围。离开Q1的离子被引导至碰撞室，在碰撞室中通过单一碰撞能量或碰撞能量梯度进行碎裂。离开碰撞室的碎片离子随后被最终分离四极杆(Q3)过滤，Q3以静态模式运行，只允许具有特定（和预定义）质荷比的离子通过，如图8所示。仅具有特定离子 m/z 值碎片离子的分析物会被检测到。研究人员能够通过所得结果直观地看到哪些母离子产生了Q3中选择的特征碎片离子。

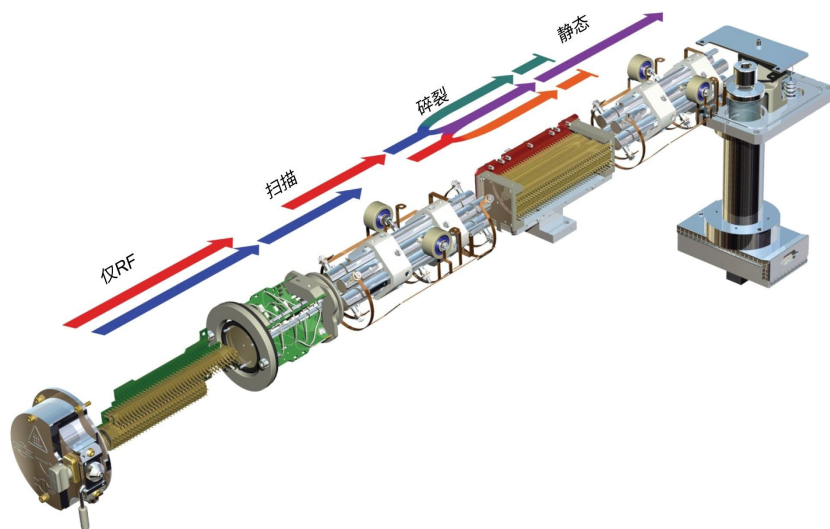


图8.母离子扫描采集模式。

母离子扫描在药物代谢研究中被用于鉴定复杂基质（例如胆汁、尿液、血浆和粪便）中药物相关的生物转化作用。图9所示数据为口服美沙吡啶150 mg/Kg的大鼠给药后24小时的尿液分析结果。样品采用正离子模式，对碎片离子 $m/z=96.88$ 进行母离子扫描分析。所得色谱图（图9左图）展示了检测到的所有母离子峰，它们产生的子离子 $m/z=96.88$ 。在图9右图中，从保留时间 $t_R = 3.04$ min处洗脱的峰提取MS²谱图。该分析物的基峰 $m/z = 294.25$ ，源内碎片离子 $m/z=233.22$ 。这是美沙吡啶的常见碎片离子，确定的母离子 $m/z 294.25$ ，与母体药物的质量数发生了+32 Da的质量数漂移，表明该峰与药物相关，可能是美沙吡啶的二羟基代谢物。图3所示的MS谱图以及以往发表的对美沙吡啶代谢归趋的研究结果表明，该代谢物很可能是美沙吡啶的二羟基代谢物。 $m/z = 233.22$ 的离子提示羟基化位于吡啶-硫醇环碎片上，另一个羟基化位置在叔胺基上⁸。

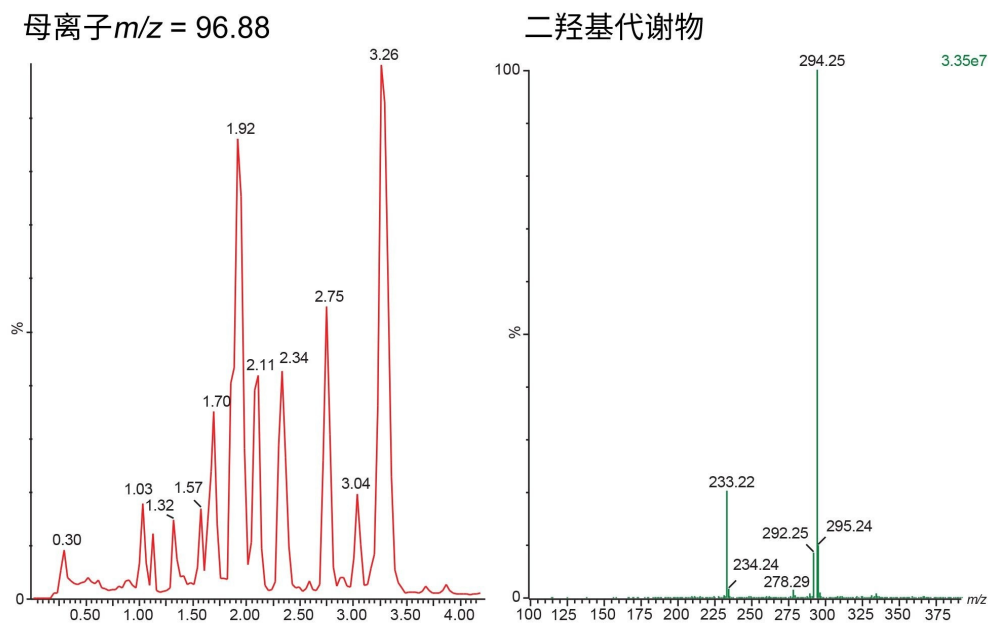


图9.使用母离子扫描($m/z = 97.88$)对大鼠尿液 (给药后24小时) 进行正离子LC-MS/MS分析, 其中美沙吡啶的口服给药剂量为150 mg/Kg。右侧的提取离子流色谱图展示了 $t_R = 3.04 \text{ min}$ 处洗脱峰的MS谱图。

恒定中性丢失

恒定中性丢失采集模式利用第一个分离四极杆和最终分离四极杆同时扫描的方法, 离子在碰撞室中以预设能量或碰撞能量梯度碎裂。两个四极杆Q1和Q3设置为在扫描过程中保持固定的质量差, 如图10所示。这种采集模式用来筛查具有共同结构特征 (如硫酸盐或磷酸基团) 的分析物。

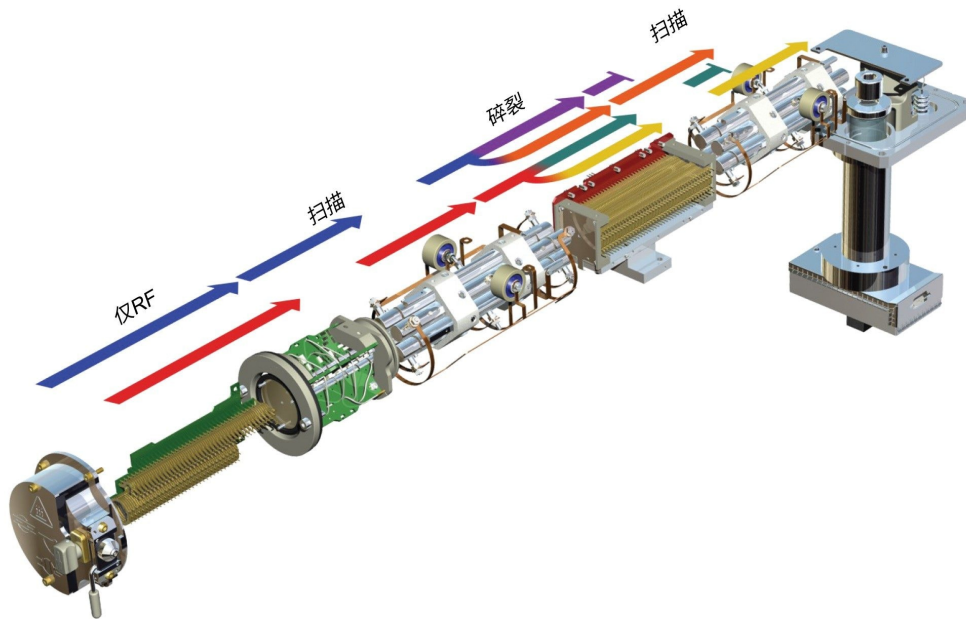


图10.恒定中性丢失采集模式。

代谢研究人员广泛采用恒定中性丢失采集模式来筛查药物偶联物（例如硫酸盐、葡糖苷酸）和具有潜在毒性的代谢物（例如谷胱甘肽）。葡糖醛酸化和硫酸化是哺乳动物药物代谢中两种最常见的偶联途径，在正离子模式的MS中，176.12 Da的中性丢失是丢失葡糖醛酸部分的特征。图11展示了使用恒定中性丢失176.12 Da的数据分析大鼠口服美沙吡啶后(150 mg/Kg, D6)的尿液所得的正离子ESI LC-MS/MS色谱图。从该数据中可以看出，使用中性丢失176.12 Da时检测到多个峰，其中大多数是内源性代谢物的葡糖苷酸偶联物。

大鼠18 D6 150 mg/Kg中性丢失
05102023_Methapyrilene_027

3: 中性丢失176ES+
TIC
3.05e8

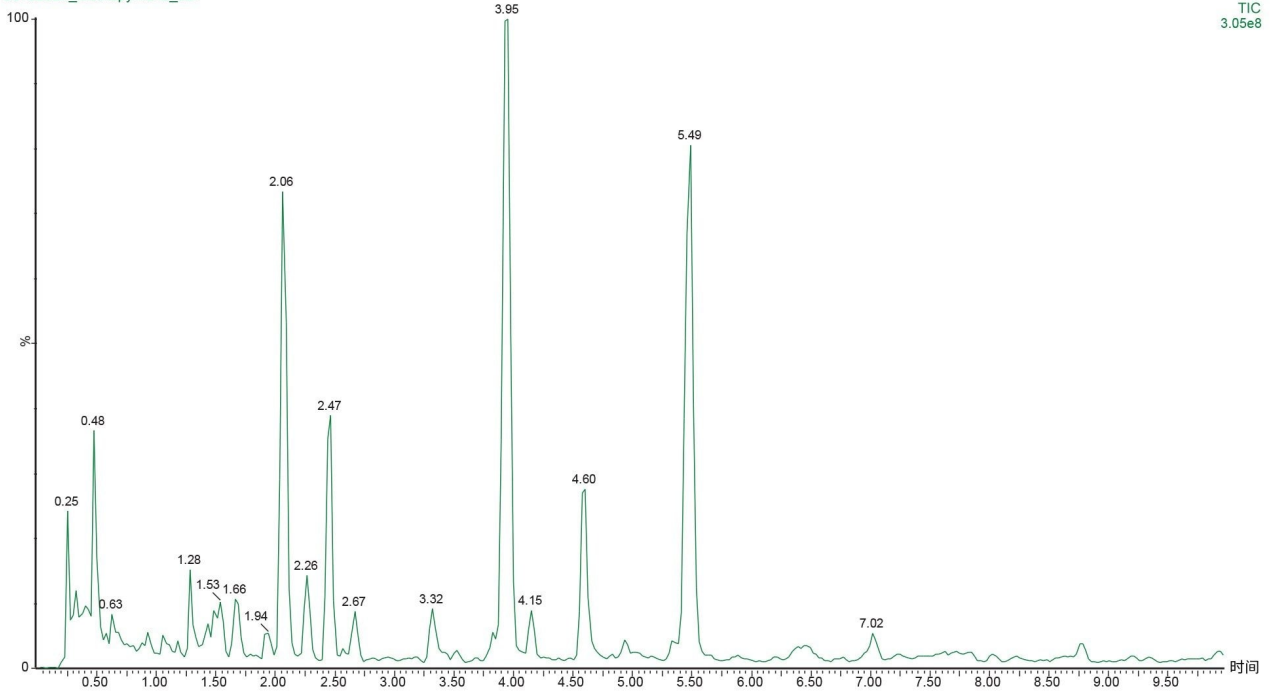


图11.大鼠重复口服给药美沙吡啶(150 mg/Kg, D6)24 h后, 通过恒定中性丢失176.12 Da分析获得的正离子LC-MS-MS色谱图。

先前有文章报道, O-葡糖醛酸化是消除美沙吡啶的一个主要途径, m/z 信号= 454.20。图12A的提取离子流色谱图显示了存在3个色谱峰, 其母离子质量数 $m/z = 454.20$, 中性丢失为176.12 Da。图12B展示了由 $t_R = 1.91$ min处洗脱峰获得的谱图, 数据显示存在 $m/z = 454.2$ 处的峰, 以及 $m/z = 409.20$ 、313.20、310.20和245.20处的峰。

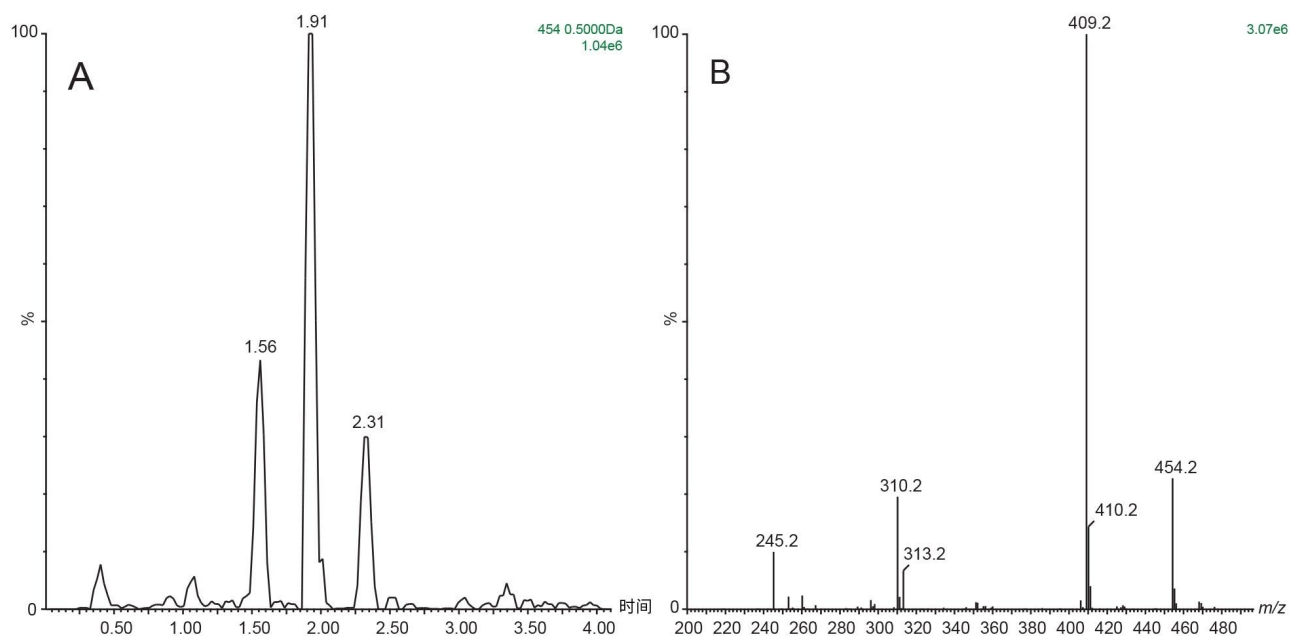


图12.大鼠口服给药美沙吡啶(150 mg/Kg, D6)后24小时, 使用中性丢失176.12 Da, 通过正离子ESI LC-MS/MS分析得到的尿液提取离子流色谱图, $m/z = 454.20 (+/- 0.5)$ (A)。 $t_R = 1.91$ min处洗脱峰的MS谱图(B)。

结论

DMPK涉及体外样品和生物体液中候选药物的定量, 以及对其代谢物的检测、表征, 通常还包括定量。在药物开发的发现阶段, 需要快速的方法开发、定量生物分析和代谢物筛查。在开发阶段, 需要使用经过验证的高灵敏度分析方法来支持首次人体研究的临床前研究。Xevo TQ-XS串联(三重)四极杆质谱仪是一款非常灵活、灵敏的仪器, 为使用MRM数据采集的定量分析提供了一个高灵敏度平台。它还提供有多种采集模式, 例如中性丢失、母离子扫描和子离子扫描, 可帮助研究人员分析样品中的药物相关代谢物和潜在毒性代谢物。本文介绍了如何使用全扫描MS和MS/MS来分析美沙吡啶的碎片离子谱图, 使用MRM数据采集对血浆和尿液中的药物进行高灵敏度定量分析, 使用母离子扫描和恒定中性丢失采集来监测尿液中的药物相关代谢物。这些数据展示了Waters Xevo TQ-XS在DMPK发现研究和核心实验室操作中的出色灵敏度、灵活性和易用性。

参考资料

1. C Sack, M Smoker, N Chamkasem, R Thompson, G Satterfield, C Masse, G Mercer, B Neuhaus, I Cassias, E Chang, Y Lin, S Macmahon, J Wong, K Zhang, RE Smith. Collaborative Validation of the QuEChERS Procedure for the Determination of Pesticides in Food by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem*. 2011 22;59(12):6383–411. doi: 10.1021/jf201618q.
2. M Jemal. High-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Biomed*. 2000 14(6):422–9. doi: 10.1002/1099-0801.
3. RN Xu, L Fan, MJ Rieser, TA El-Shourbagy. Recent Advances in High-Throughput Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 28;44(2):342-55. doi: 10.1016.
4. S Krishnaswami, H Möllmann, H Derendorf, G Hochhaus. A Sensitive LC-MS/MS Method for the Quantification of Fluticasone Propionate in Human Plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;22(1):123-9. doi: 10.1016/s0731-7085.
5. BJ Molloy, A King, LG Mullin, LA Gethings, R Riley, RS Plumb, ID Wilson. Rapid Determination of the Pharmacokinetics and Metabolic Fate of Gefitinib in the Mouse Using a Combination of UPLC-MS/MS, UPLC-QToF/MS, and ion mobility (IM)-enabled UPLC-QToF/MS. *Xenobiotica*. 2021;51(4):434-446. doi: 10.1080/00498254.2020.
6. IA Blair. Analysis of Endogenous Glutathione-Adducts and Their Metabolites. *Biomed Chromatogr*. 2010;24(1):29-38. doi: 10.1002/bmc.1374.
7. Graichen ME, Neptun DA, Dent JG, Popp JA, and Leonard TB (1985) Effects of Methapyrilene on Rat Hepatic Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Liver Morphology. *Fundam Appl Toxicol* 5:165–174.
8. Geenen S, Guallar-Hoyas C, Michopoulos F, Kenna JG, Kolaja KL, Westerhoff HV, Thomas P, Wilson ID. HPLC-MS/MS Methods for the Quantitative Analysis of 5-oxoproline (pyroglutamate) in Rat Plasma and Hepatic Cell Line Culture Medium. *J Pharm Biomed Anal*. 2011 1;56(3):655-63. doi: 10.1016/j.jpba.2011.06.001.

特色产品

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

[Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

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

720008016ZH, 2023年9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](#)