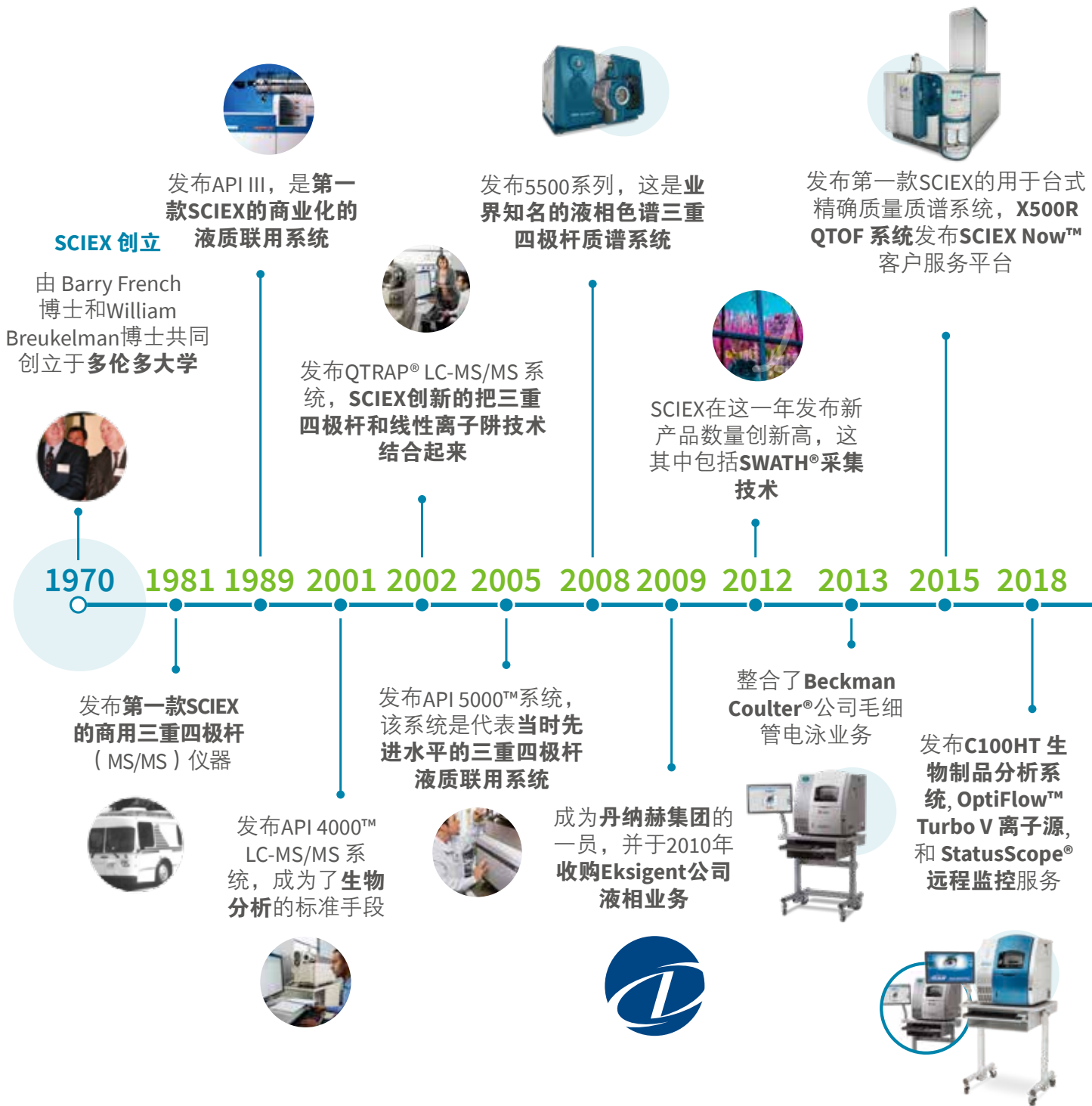


SCIEX 新型药物研究解决方案



超过 50 年的创新历程



内容提要



发布ECHO™ MS系统，这是一款基于**声波激发耦合质谱 (AEMS)** 技术的超高检测样品通量的系统



发布BioPhase® 8800 系统，一款可以同时检测8份样品的多通道毛细管电泳系统



发布Intabio® ZT 系统，这是第一款SCIEX的完整整合全柱成像等电聚焦毛细管电泳紫外检测 (icIEF-UV) 和质谱 (MS) 的系统



五十周年纪念

2020

发布SCIEX Triple Quad™ 7500 系统，开启灵敏度的新时代



发布专门控制三重四极杆质谱的**SCIEX OS 软件**，是SCIEX创新的核心动力



2021

发布ZenoTOF® 7600系统，这是一款高分辨精确质量质谱，是SCIEX跨越式质谱创新发展



发布Zeno™ SWATH® DIA，全新一代数据非依赖型采集技术，把生物标记物发现和转化研究流程显著地向前推进一步



2022

发布ExionLC™ 2.0和ExionLC™ 2.0+ 系统，与SCIEX质谱系统兼容，实现一体化控制



2023

在SCIEX总部为ECHO® MS卓越中心揭幕



期待未来

在中国总部为**本土化质谱产品**揭幕



前言

药物发现与开发是一个投资巨大且耗时的过程，从先导化合物的发现到临床前研究到成功上市，在流程中的每一阶段获得正确的信息，对为市场带来安全有效的药物均是至关重要的。

SCIEX 一直致力于帮助科研人员从事药物发现、开发和质控，利用 LC-MS 和 CE 技术提升产能和效率，同时节省时间、成本和资源。我们为新型药物及制剂如 PROTAC，吸入制剂以及中药研究等提供全面高效的分析方案，解决灵敏度难题，助力您快速推进药物研发的进程；借助创新性的质谱技术提供高度灵敏且重现性良好的分析方法，并为生物分析实验室能够提供具有良好分析通量的高质量数据；在中药研究领域，为中药活性成分鉴定，中药代谢物研究、中药机理探索方面，提供高灵敏度的全面解决方案

SCIEX 通过整合的软硬件产品和服务支持，有助于客户得到更高质量的数据，将复杂的工作流程变得更简便、更高效，以提升效率和成功机会。

携手客户，助力您加速药物研发的进程。



内容提要

一、SCIEX 串联质谱技术在新型药物及制剂研究中的应用 6

- ➔ 血浆基质中 PROTAC 药物定量分析方案 7
- ➔ SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析血浆样品中分子胶药物 Eragidomide 9
- ➔ β 2 受体激动剂类吸入粉雾剂化合物 LC-MRM 定量灵敏度的提高 13
- ➔ 采用 SCIEX Triple Quad™ LC-MS/MS 质谱系统检测人血清中的帕罗韦德 16
- ➔ Achieving low-pg/mL quantitation of leuprolidein human plasma 19
- ➔ 采用 SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready 串联质谱系统对注射用丹参多酚酸中活性成分的鉴定策略 24

二、SCIEX 高分辨质谱在代谢物鉴定及中药研究中的应用 32

- ➔ 利用 SCIEX ZenoTOF® 7600 系统进行 PROTAC 药物 ARV-110 的代谢产物鉴定 33
- ➔ 使用正交二级数据进行全面的代谢物表征 37
- ➔ Confident identification of phase 1 metabolites using electron-activated dissociation (EAD) 40
- ➔ 利用 SCIEX ZenoTOF® 7600 系统的 EAD 技术区分龟甲胶特征肽段中的亮氨酸和异亮氨酸 47
- ➔ 采用 SCIEX 高分辨质谱进行动物源中药斑蝥成分研究 50

精确分析，稳定释能



SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS 系统 - QTRAP™ Ready

拓展灵敏度新纪元



SCIEX Triple Quad™ 6500

卓越的灵敏度、速度和性能

SCIEX Echo MS 系统

迅捷，为高效而生



内容提要 

血浆基质中PROTAC药物定量分析方案

蛋白水解靶向嵌合体 (PROteolysis TArgeting Chimeras, PROTACs), 是一种利用泛素-蛋白酶系统 (Ubiquitin-Proteasome System, UPS) 对靶蛋白进行降解的药物开发技术。PROTAC是一个两端含有不同配体的化学分子, 一端是结合E3连接酶的配体, 另一端是结合细胞内蛋白质的配体, 这两个配体再由一段连接子连接起来。这样的化学分子既可以结合E3泛素连接酶, 又可以结合细胞内蛋白质, 通过把靶向的蛋白质招募到E3泛素连接酶附近来实现靶向蛋白质的多泛素化, 最后被蛋白酶体降解。

PROTAC的特点是可以循环使用, 而不被蛋白酶体降解。在患者体内, PROTAC的靶蛋白配体和靶蛋白结合, E3泛素连接酶配体和细胞内的E3泛素连接酶的底物结合区结合, 从而通过连接子把靶蛋白拉进到E3泛素连接酶旁边, 实现UPS系统将靶蛋白降解^[1]

传统小分子需要知晓靶蛋白的内在此位点和机制来结合然后起效, 而PROTAC则不用重视靶蛋白本身机制, 无需竞争位点, 只要结合上就直接将靶蛋白泛素化标记后降解^[2]。由于它的机制特殊, 仅需要少量就可发挥药效, 用量常常是纳摩尔级别, 这也给它的安全性和活性评价带来一定难度。

SCIEX公司已开发多种PROTAC类药物的血浆基质定量方案。

一、血浆基质中PROTAC药物ARV-110定量分析

ARV-110 (Bavdegalutamide)是一种治疗转移性去势抵抗性前列腺癌的PROTAC药物, 目前的报道显示其在临床试验中展现出持续的抗肿瘤活性和患者获益证据。

本方法采用沉淀蛋白后再吹干复溶的方式进行血浆前处理, 通过SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血浆中ARV-110进行直接定量分析, 在血浆基质中定量下限LLOQ可达5 pg/mL (图1), 方法选择性好, 灵敏度高。ARV-110化合

物的回归方程和线性范围见图2, ARV-110在5~5000 pg/mL的浓度范围内线性关系良好。

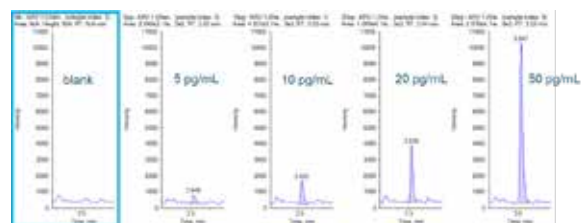


图1. ARV-110在空白血浆、5 pg/mL、10 pg/mL、20 pg/mL和50 pg/mL大鼠血浆基质中峰图信息。

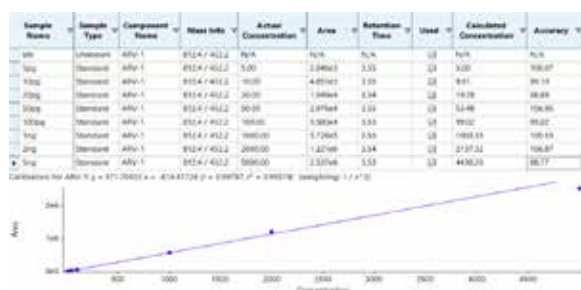


图2. ARV-110的标准曲线和线性图谱, 线性范围5~5000 pg/mL, 线性相关系数r=0.998

二、血浆基质中PROTAC药物GNE-987定量分析

GNE-987是一种降解溴结构域蛋白4 (BRD4) 的PROTAC, 由VHL配体、BRD4配体与间隔基团组成, 具有皮摩尔级别的BRD4降解活性, 所以这也给它的安全性和活性评价带来了一定难度。

本方法采用甲基叔丁基醚萃取后再用氮气吹干并复溶的方式进行血浆前处理, 通过SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血浆中PROTAC药物GNE-987进行直接定量分析。方法



前处理简单，灵敏度高，定量下限LLOQ可达2 pg/ml（图3），浓度范围在2 pg/ml ~ 10 ng/ml呈良好的线性关系（图4）。

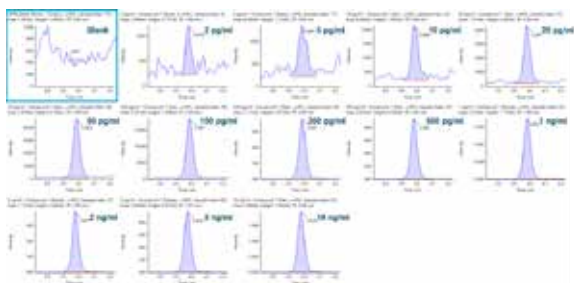


图3. GNE-987在空白血浆和不同浓度血浆样品中的峰图信息



图4. GNE-987的线性关系图

参考文献

1. Louise M. Sternicki, Jim Nonomiya, Miaomiao Liu, et al. Native Mass Spectrometry for the Study of PROTAC GNE-987-Containing Ternary Complexes [J]. Chem Med Chem, 2021, 16, 1-6.
2. Lawrence B. Snyder, ArvinasInc, New Haven, CT. Discovery of ARV-110, a first in class androgen receptor degrading PROTAC® for the treatment of men with metastatic castration resistant prostate cancer. www.arvinas.com





SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析血浆样品中分子胶药物 Eragidomide

Quantitative Analysis of the molecular glue drugs Eragidomide in Plasma by SCIEX Triple Quad™ System

谢亚平, 司丹丹, 龙志敏
Yaping Xie, Dandan Si, Zhimin Long
SCIEX应用技术中心, 中国
SCIEX, China

关键词: SCIEX Triple Quad™ system, molecular glue drugs, Eragidomide

前言

分子胶降解剂是一类可诱导E3泛素连接酶底物受体与靶蛋白之间新型相互作用, 从而导致靶蛋白降解的小分子。分子胶的作用机制为发现全新类型药物开辟了新途径, 到目前为止, 靶向蛋白降解中的分子胶降解剂主要依赖于招募E3泛素连接酶。分子胶降解剂诱导或稳定泛素连接酶和靶蛋白(底物)之间的蛋白相互作用(PPI), 导致蛋白质泛素化和随后的基于蛋白酶体的降解。这类化合物通常通过增强预先存在的蛋白相互作用(PPI)或诱导与E3泛素连接酶的底物受体形成新的蛋白相互作用(PPI)复合物来招募目标蛋白质进行降解。

埃拉吉度胺(Eragidomide)是一种基于CRBN的分子胶。它是治疗急性白血病ANL和骨髓增生异常综合征MDS的II期临床候选药物, 可选择性靶向GSPT1进行泛素化和蛋白酶体降解。用埃拉吉度胺(Eragidomide)耗竭GSPT1可迅速诱导急性白血病ANL细胞凋亡, 减少原发患者的白血病植入和白血病干细胞。埃拉吉度胺(Eragidomide)是第一个针对GSPT1进行降解的分子胶药物。

分子胶药物不仅可靶向降解蛋白, 由于它具有更小的体积, 具有更有利的物理化学性质和可开发性, 从而备受关注。一些分子胶药物例如CFT7455效力明显增强, 显示出皮摩尔水平的IC50(半数抑制浓度), 因此需要更为灵敏的定量检测方法。

技术特点

本方法采用SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血浆中分子胶药物Eragidomide进行定量分析, 方法特点如下:

1. 使用 SCIEX Triple Quad™ 系统, 能够实现快速分析的同时获得较高的检测灵敏度, 最低定量限可达血浆样品 5 pg/mL
2. 前处理采用沉淀蛋白, 快速简单, 提高通量, 方法开发周期短、开发成本低、特异性强
3. 较宽的线性范围(5~10000 pg/mL)以及较好的低浓度点定量重现性(RSD=3.24%)
4. 简单的数据管理流程: 使用SCIEX操作系统软件实现快速、直观和集成的数据采集和处理

RUO-MKT-02-15567-ZH-A

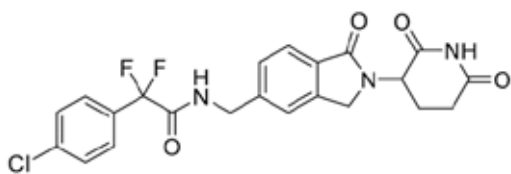


图1. 埃拉吉度胺 (Eragidomide) 的结构式

实验方法

1. 样品制备

10 μ L 标准品溶液 (乙腈溶解) 加入到90 μ L 大鼠血浆中配制成一定浓度的血浆样品, 涡旋混匀。加入400 μ L 沉淀剂乙腈对血浆样品进行蛋白沉淀, 涡旋混匀30 s。离心机平衡至4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm 转速下离心5 min。取上清液直接进样分析。

2. 液相条件

液相: Nexera LC-40 AD 系统

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5 (50 \times 2.1 mm, 2.6 μ m)

流动相: A: 水 (含5 mM 甲酸铵)

B: 甲醇 (含5 mM 甲酸铵)

流速: 0.3 ml/min

柱温: 40 $^{\circ}$ C

梯度洗脱, 洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	90	10
1	90	10
7	5	95
9	5	95
9.1	90	10
10	90	10

RUO-MKT-02-15567-ZH-A

3. 质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 系统

数据采集方法: MRM (多反应监测)

离子源: ESI 源

离子源参数:

IS 电压: 1500 V

气帘气 CUR: 40 psi

碰撞气 CAD: 7

雾化气 GS1: 40 psi

辅助气 GS2: 70 psi

源温度 TEM: 550 $^{\circ}$ C

多反应监测离子通道如表2:

表2. 埃拉吉度胺 (Eragidomide) 的 MRM 离子对信息

化合物	母离子 Q1 (m/z)	子离子 Q3 (m/z)	碰撞能量 CE (V)	碰撞池出口电压 CXP (V)
Eragidomide	462.1	351.0	24	10

4. 数据处理

使用 SCIEX OS 软件 3.0 版进行数据采集、分析和定量。使用 MQ4 算法自动整合峰值。使用 $1/x^2$ 的权重进行线性拟合。

实验结果

专属性和灵敏度

本实验采用沉淀蛋白方式进行血浆前处理, 方法简单快速。通过 SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血浆中的 Eragidomide 直接定量, 血浆基质最低定量限 (LLOQ) 可达 5 pg/mL (图2), 且空白血浆基质中无干扰, 方法选择性好, 灵敏度高。

线性范围

10 μ L 标准品溶液 (乙腈溶解) 加入到90 μ L 大鼠血浆中分别配制成基质浓度为 5 pg/mL、10 pg/mL、50 pg/mL、100 pg/mL、1000 pg/mL、2000 pg/mL、5000 pg/mL、10000 pg/mL 的血浆样品, 涡旋混匀。加入 400 μ L 沉淀剂乙



臍对血浆样品进行蛋白沉淀，涡旋混匀30 s。离心机平衡至4℃，12000 rpm转速下离心5 min。取上清液直接进样分析。埃拉吉度胺（Eragidomide）在5~10000 pg/mL的浓度范围内线性关系良好， $r=0.99953$ ，准确度 Accuracy均在95.96%-104.3%范围内，如图3所示。

重现性

为了考察仪器的重现性，将处理好的10 pg/mL血浆样品进行重现性考察。6针样品连续采集，相对标准偏差（RSD）为3.24%，重现性较好，连续进样6针血浆样品色谱图如图4所示。

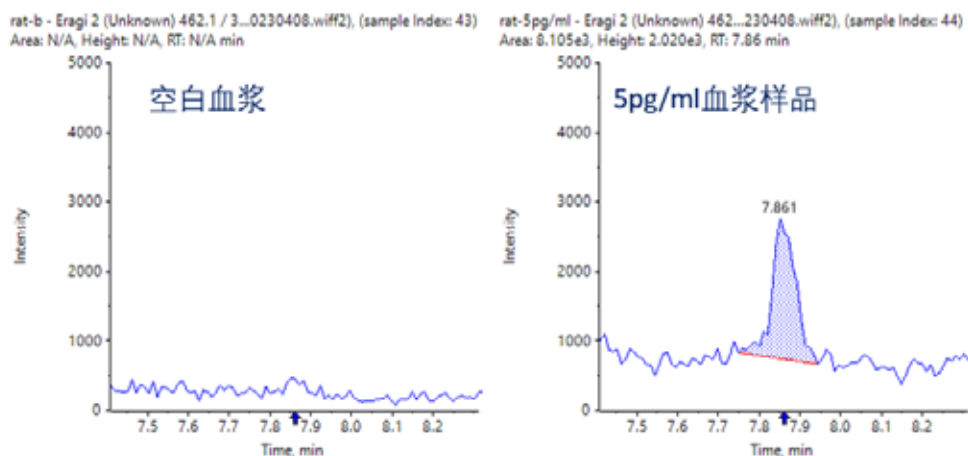


图2. 空白血浆样品与最低定量限（5 pg/ml血浆样品）色谱图

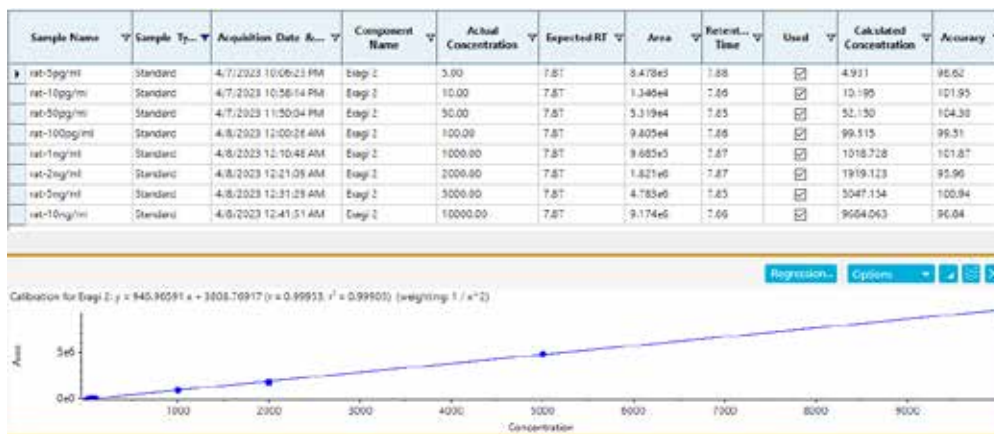


图3. 埃拉吉度胺（Eragidomide）线性范围

RUO-MKT-02-15567-ZH-A

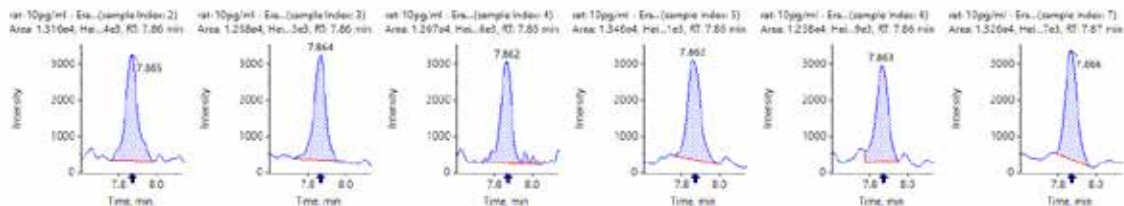


图4. 10 pg/ml血浆样品连续进样6针色谱图

基质效应与提取回收率

本实验考察了不同的有机相蛋白沉淀效果（包括甲醇、乙腈以及甲醇乙腈混合液），最终采用乙腈进行蛋白沉淀，并考察了低高两个不同浓度血浆样品的提取回收率和基质效应（平行双样本）。结果表明，埃拉吉度胺（Eragidomide）在低高2个浓度下的回收率均大于91%，基质效应在98.2%~107.9%之间（如表3）。

表3. 血浆中埃拉吉度胺（Eragidomide）在低高浓度下的提取回收率和基质效应

样品浓度 (pg/ml)	经过提取后的样品峰面积	空白基质加标的峰面积	同浓度水代血浆样品峰面积	提取回收率	基质效应
50	6.5455e4	7.321e4	7.192e4	91.0%	98.2%
1000	1.021e6	1.0145e6	1.1015e6	100.6%	107.9%

符合法规要求的SCIEX OS操作系统软件

SCIEX OS软件满足21 CFR Part 11法规要求，SCIEX操作系统软件是一个封闭系统，需要以电子方式存储记录和签名。SCIEX OS软件的工作流程完全符合法规要求，提供了硬件和软件配置的技术控制，网络安全和安全操作系统和策略，以及程序和用户培训。

总结

本方法直接采用沉淀蛋白方法进行血浆样品前处理，操作快速简单，并通过 SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血

浆中的埃拉吉度胺（Eragidomide）进行定量分析。该LC-MS/MS检测方法灵敏度高、特异性好、空白血浆无干扰、最低定量限可达到血浆样品5pg/ml；线性范围较宽，在5~10000 pg/mL的浓度范围内线性关系良好；低浓度血浆样品也可达到较好的重现性（RSD=3.24%）；低高两个浓度血浆样品均可达到较好的提取回收率（≥91%）和基质效应（98.2%~107.9%）。SCIEX OS软件完全满足法规要求，可快速进行数据采集、分析、定量和管理。整个分析方法具有操作快速简单、灵敏度高、通量高、特异性好等特点，可为血浆基质中分子胶药物埃拉吉度胺（Eragidomide）的定量分析提供参考。

参考文献

1. Surka C, Jin L, Mbong N, et al. CC-90009, a novel cereblon E3 ligase modulator, targets acute myeloid leukemia blasts and leukemia stem cells[J]. Blood, 2021, 137(5): 661-677.
2. Hansen J D, Correa M, Alexander M, et al. CC-90009: a cereblon E3 ligase modulating drug that promotes selective degradation of GSPT1 for the treatment of acute myeloid leukemia[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 64(4): 1835-1843.
3. Dong G, Ding Y, He S, Sheng C. Molecular Glues for Targeted Protein Degradation: From Serendipity to Rational Discovery. J Med Chem. 2021 Aug 12;64(15):10606-10620. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00895. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34319094.

RUO-MKT-02-15567-ZH-A

β 2受体激动剂类吸入粉雾剂化合物LC-MRM定量灵敏度的提高

Improved LC-MRM Quantification Sensitivity for Powder for Inhalation from the Beta2 Agonist Family

钟晨春, 龙志敏
SCIEX中国, 应用支持中心

Key Words: Quantification, Indacaterol, Olodacaterol, Beta2 Agonist, Inhalation, MRM, Triple Quad

慢性阻塞性肺疾病（简称：慢阻肺）是世界卫生组织（WHO）列出的全球五大慢性非传染性疾病之一¹。数据显示，我国慢阻肺患病人数近一亿，但在知晓率和诊断率方面仍远不理想，规范性治疗方面也有巨大提升空间²。支气管舒张剂是慢阻肺症状管理的中心²，能够有效改善肺功能、提高生活质量。其中，长效β 2受体激动剂（LABA）和长效胆碱能受体拮抗剂（LAMA）是两种常用的吸入型支气管扩张剂，可以显著改善患者肺功能、呼吸困难、健康状况，并降低急性加重发生率³。由于药代活性优异，这些化合物通常给药剂量相对较低，给药后人体血中药物浓度最大值（C_{max}）约为200-300 pg/mL⁴，准确定量对体内暴露水平测定和动态变化过程评价的要求很高，需要检测仪器有极高的灵敏度。在以往的测定中需要尽量提高进样体积以及严苛的前处理过程来达到测定的需

求，费时费力。

在本项研究中，选择了来自β 2受体激动剂类的两个化合物：茛达特罗（Indacaterol）和奥达特罗（Olodacaterol）作为模型化合物用于质谱定量灵敏度性能测试。测试结果发现，在10 μL体积进样的情况下，茛达特罗和奥达特罗在血浆中的定量限为5 和0.5 pg/mL。在获得优异灵敏度的同时，出色的分析重现性、准确性和定量线性使得整个分析流程更加可靠。

实验方法

样品前处理：1 mL空白血浆经过3 mL乙腈溶液沉淀处理后，上清加入10 mL纯水稀释，全部稀释后的溶液经过活化好的固相萃取小柱处理后，用1 mL 50%乙腈水溶液等洗脱，洗脱液作为处理过的血浆基质溶液。茛达特罗和奥达特罗标准物质加入处理过后的血浆基质。通过用处理过后的血浆进行连续稀释制备标准曲线样品用于分析。

液质联用条件：样品通过串联ExionLC™系统的SCIEX三重四极杆质谱系统进行三次平行分析。详尽方法列于表1和2。

数据处理：数据通过SCIEX OS软件 2.0中的定量功能（点击“Analytics”）进行处理。

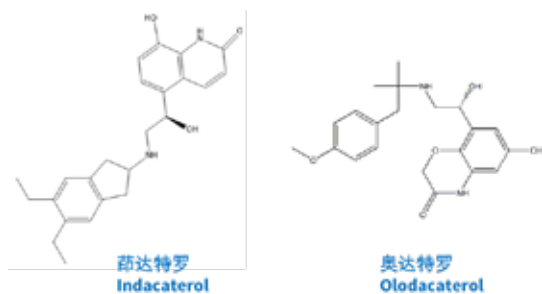


图1. 茛达特罗和奥达特罗的化合物结构。

RUO-MKT-02-13481-ZH-A



表1. 色谱条件

参数	数值
色谱柱	Welch Ultimate XB-C18 (5 μm, 50 × 2.1 mm)
流动相A	含10 mM碳酸氢铵的水
流动相B	乙腈
流速	1 mL/min
柱温	40 °C
进样体积	10 μL

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	80	20
1.5	30	70
1.6	5	95
2.2	5	95
2.3	80	20
3	80	20

表2. SCIEX 7500系统的质谱参数

参数	数值	参数	数值
气帘气	38 psi	源温度	400 °C
雾化气	25 psi	辅助气	70 psi
碰撞诱导解离气	11	离子喷雾电压	3000 V

名称	Q1	Q3	碰撞能量	碰撞池出口电压
茛达特罗	393.2	173.1	34	9
奥达特罗	387.0	121.1	48	15

β2受体激动剂类化合物定量结果

通过对液质联用分析条件的优化，获得化合物检测的良好灵敏度。

如图2、图3和图4所示，在血浆中茛达特罗和奥达特罗的定量下限为5和0.5 pg/mL，在整个定量范围（5-500 pg/mL和0.5-500 pg/mL）内重现性差异小（CV<5.33%和

<4.13%），准确度高（89-111%和91-107%）。500 pg/mL为此样品配制的最高浓度，但由于100 ng/mL并未出现信号饱和，故定量上限可能更高。

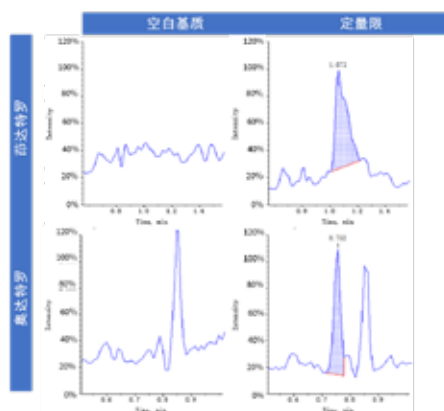


图2. 血浆中典型的茛达特罗和奥达特罗 MRM提取离子流图。

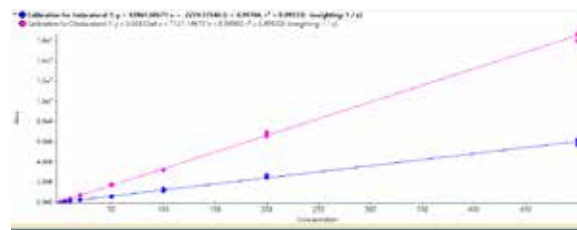


图3. 血浆中茛达特罗和奥达特罗5 - 500 pg/mL、0.5 - 500 pg/mL的标准曲线

Run	Component No.	Actual Concentration	Peak Value	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
1	Salmetrol 1	0.05	3.473	4.08	0.22	4.25	81.67
2	Salmetrol 1	0.05	3.473	4.01	0.21	5.22	94.89
3	Salmetrol 1	0.05	3.473	3.754	0.30	7.98	108.19
4	Salmetrol 1	0.05	3.473	3.781	0.27	4.75	106.84
5	Salmetrol 1	0.05	3.473	3.680	0.10	2.74	104.83
6	Salmetrol 1	0.05	3.473	3.833	0.24	6.19	108.73
7	Salmetrol 1	0.05	3.473	4.017	0.34	8.48	105.60

Run	Component No.	Actual Concentration	Peak Value	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
1	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.68	0.21	12.50	111.58
2	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.81	0.24	13.15	123.14
3	Olodaterol 1	0.01	1.473	2.10	0.24	11.07	143.24
4	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.94	0.19	9.83	131.89
5	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.74	0.17	9.74	121.47
6	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.618	0.41	25.36	101.81
7	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.81	0.26	14.34	121.63
8	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.91	0.27	14.11	128.41
9	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.91	0.27	14.11	128.41
10	Olodaterol 1	0.01	1.473	1.91	0.27	14.11	128.41

图4. 血浆中茛达特罗和奥达特罗的定量信息总结

RUO-MKT-02-13481-ZH-A



结论

- 本文在SCIEX 三重四极杆质谱系统上建立了 $\beta 2$ 受体激动剂类化合物定量的方法，该方法灵敏度高。
- 茚达特罗和奥达特罗在血浆中的定量下限为5和0.5 pg/mL，分析方法重现性、准确度、定量线性良好。
- SCIEX三重四极杆质谱系统为高活性药物分子的生物样本分析工作提供了准确可靠的分析平台。

参考文献

1. <https://www.who.int/ncds/en>.
2. Wang C, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study[J]. Lancet. 2018, 391(10131):1706-1717.
3. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2020 report[J]. <https://goldcopd.org/gold-reports/>
4. Vaidya S, et al. Pharmacokinetics of indacaterol, glycopyrronium and mometasone furoate following once-daily inhalation as a combination in healthy subjects. Pulm Pharmacol Ther 2020 10;64.

RUO-MKT-02-13481-ZH-A

采用SCIEX Triple Quad™ LC-MS/MS质谱系统检测人血清中的帕罗韦德

Determination of Paxlovid on SCIEX Triple Quad™ LC-MS/MS

满卓, 司丹丹, 龙志敏

Zhuo Man, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX应用支持中心, 中国

Key words: SCIEX Triple Quad™ LC-MS/MS; Paxlovid

前言

帕罗韦德 (Paxlovid) 是美国辉瑞公司2021年上市的新药, 主要用于发病5天以内的轻、中型且伴有进展为重症高风险因素的新冠病毒 (SARS-CoV-2) 感染成年患者。帕罗韦德为奈玛特韦片 (Nimatrelvir) 和利托那韦片 (Ritonavir) 的组合包装, 分别放在不同的药片中。奈玛特韦是一种对抗SARS-CoV-2的抗病毒药物, 它与蛋白酶抑制剂利托那韦联合使用; 利托那韦在新冠肺炎病例中主要作为酶阻断剂, 防止奈玛特韦的过早代谢消除, 以帮助其在较高浓度下在体内保持更长时间的活性。通过奈玛特韦和利托那韦的治疗药物监测 (TDM), 可以进一步提高奈玛特韦片/利托那韦片组合包装治疗的安全性和有效性。

本研究旨在建立一种简单、快速、灵敏的HPLC-MS/MS法用于检测人血清中帕罗韦德浓度的通用检测方法, 并为帕罗韦德的药代动力学研究提供帮助, 进而指导临床合理用药。图1为帕罗韦德两个主要成份奈玛特韦和利托那韦的结构式。

本文使用SCIEX Triple Quad™ LC-MS/MS建立了人血清中的帕罗韦德的定量方法。该方法具有以下特点:

1. 前处理简单、快速、方便;
2. 仪器的灵敏度高, 方法定量下限可低至31.25 pg/mL。

3. 仪器和方法的重现性好, 低中高不同浓度质控QC样品的RSD%均小于5%。
4. 仪器和方法的特异性好, 定量准确度高, 准确度均在95%-105%之间。

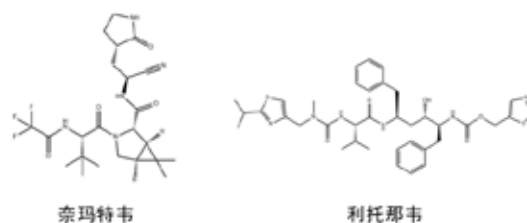


图1. 帕罗韦德两个成份奈玛特韦和利托那韦的结构式

仪器设备

SCIEX ExionLC™ 超高效液相系统联用SCIEX Triple Quad™三重四极杆复合质谱系统



图2. ExionLC™系统和SCIEX Triple Quad™ LC-MS/MS系统

RUO-MKT-02-15473-ZH-A



色谱方法:

色谱柱: Phenomenex Kinetex F5 100 × 3.0mm, 2.6 μm

流动相: A: 水+5mM NH₄FA; B: 甲醇

洗脱方式: 梯度洗脱10min

进样量: 5 μL

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 60°C;

质谱方法:

离子源: ESI电喷雾电离源

扫描方式: POS正模式

气帘气CUR: 30psi

喷雾电压IS: 4000v

源温度 Temp: 650°C

雾化气Gas1: 45psi

辅助气GAS2: 55psi

碰撞气CAD: 9psi

定量分析采集方式设置: MRM多反应监测模式

标准品离子对信息请见表1。

表1. MRM质谱离子对参数

Compounds	Q1	Q3	CE
rito 1	721.3	426.1	25
rito 2*	721.3	296.2	26
nir 1	500.2	319.1	24
nir 2*	500.2	110.2	34

备注: *为定量离子对

定量结果

1. 特异性

分别取50 μL的空白人血清, 加入150 μL乙腈:甲醇(1:1)沉淀蛋白后, 作为空白血清溶液; 空白血清中在待测物保留时间处无干扰; 奈玛特韦和利托那韦的LLOQ定量限分别

达到31.25pg/mL。图3分别为奈玛特韦和利托那韦的空白人血清和LLOQ 31.25pg/mL。

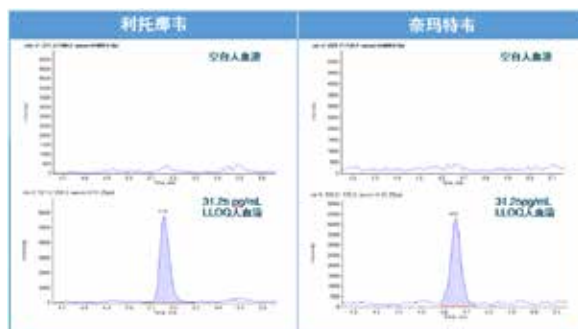


图3. 利托那韦和奈玛特韦的空白人血清和LLOQ 31.25pg/mL的XIC提取离子流图

2. 定量标准曲线

分别取50 μL的空白人血清, 加入150 μL乙腈:甲醇(1:1)沉淀蛋白, 配置奈玛特韦和利托那韦的人血清的标准工作溶液至31.25 pg/mL, 62.50 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2000 pg/mL, 以峰面积对浓度做标准曲线。图4为奈玛特韦和利托那韦的人血清的线性范围、线性方程和相关系数, 线性回归系数 r^2 均大于0.995, 满足检测要求。

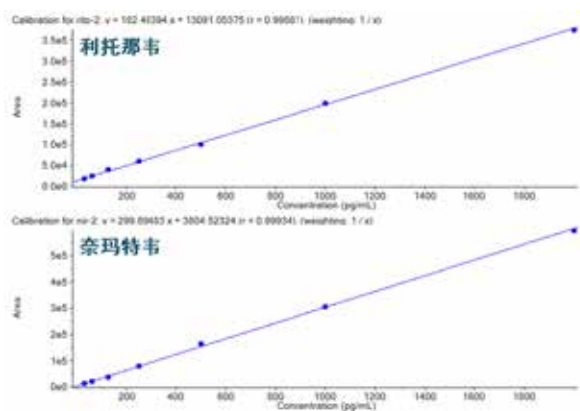


图4. 奈玛特韦和利托那韦的人血清的标准曲线

RUO-MKT-02-15473-ZH-A



3. 准确度和重现性

分别取50 μL 的空白人血清，加入150 μL 乙腈:甲醇(1:1)沉淀蛋白，加标溶液平行制备三份，浓度分别在LQC，MQC和HQC作为QC样品，离心取上清液上机。测定结果请见表2和表3。加标样品的准确度均在95-105%，平行样品的RSD% < 5%，准确度和重现性均满足测试要求，测试结果良好。图5和图6分别为奈玛特韦和利托那韦的LLOQ最低定量限31.25 pg/mL 的连续六针进样XIC谱图，RSD分别为1.44%和1.96%，重现性良好。

表2. 利托那韦的准确度和精密度测试结果

质控点	理论浓度 (pg/mL)	实测浓度平均值 (pg/mL)	相对标准偏差 RSD%	平均准确度 (%)
LQC	62.50	60.69	1.70	97.10
MQC	500	510.85	1.56	102.17
HQC	2000	1911.12	0.75	95.56

表3. 奈玛特韦的准确度和精密度测试结果

质控点	理论浓度 (pg/mL)	实测浓度平均值 (pg/mL)	相对标准偏差 RSD%	平均准确度 (%)
LQC	62.5	62.20	1.30	99.52
MQC	500	500.92	1.71	100.18
HQC	2000	1986.33	1.98	100.99

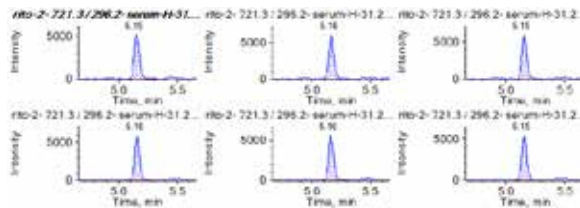


图5. 利托那韦的LLOQ浓度的6个XIC提取离子流图

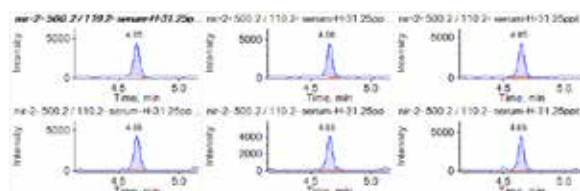


图6. 奈玛特韦的LLOQ浓度的6个XIC提取离子流图

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 液质系统建立了LC-MS/MS方法测定人血清中帕罗韦德两个主要成份奈玛特韦和利托那韦的浓度含量。结果表明，该方法的特异性好，无干扰；奈玛特韦和利托那韦的血清线性范围分别为31.25 pg/mL -2000 pg/mL ，在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.995；低、中、高浓度的QC加标准确度以及重现性良好，满足方法学要求。

Achieving low-pg/mL quantitation of leuprolide in human plasma

This technical note demonstrates a sensitive method to quantify leuprolide in human plasma on a SCIEX 7500 system. A lower limit of quantitation (LLOQ) of 2.5 pg/mL was determined using a 5-minute LC-MS/MS method (Figure 1).

Leuprolide acetate is a synthetic peptide GnRH agonist that inhibits the synthesis of estrogen and androgen hormones in women and men (Figure 1B). Long-acting depot formulations have been used in suppressive treatments in men with prostate cancer, women with endometriosis and uterine fibroids and pediatric patients with central precocious puberty.¹ Aside from long-acting depot formulations, leuprolide could be administered daily in microdose regimens.

Since different dosage regimens are required in hormone therapy, sensitive and selective assays for high-confidence detection and quantitative performance in biological matrices are needed to ensure the safety and efficacy of the promising therapeutic peptides.

Quantitation of peptides and proteins has been commonly performed using immunoassays, such as ELISA. However, immunoassays inherently face analytical challenges, such as poor selectivity, limited dynamic range and cross-reactivity.

LC-MS/MS methods are increasingly applied for the quantitation of therapeutics as they offer the most sensitive and selective platforms for bioanalysis.

The presented method demonstrates a sensitive method to quantify leuprolide in human plasma using an efficient solid-phase extraction (SPE) technique. Sensitivity at the low-pg/mL level was achieved across a linear dynamic range (LDR) spanning 3.6 orders of magnitude in human plasma using the SCIEX 7500 system. Front-end enhancements on the instrument facilitated improved overall ion generation, capture and transmission, therefore providing optimal quantitative sensitivity.

Key features of the quantitation of leuprolide using the SCIEX 7500 system

- Low-pg/mL level quantitation of a GnRH-releasing agonist: Achieve a 2.5 pg/mL LLOQ for leuprolide in human plasma on the SCIEX 7500 system
- Ideal analytical performance: Achieve accurate quantitative performance with %CV <10% at all

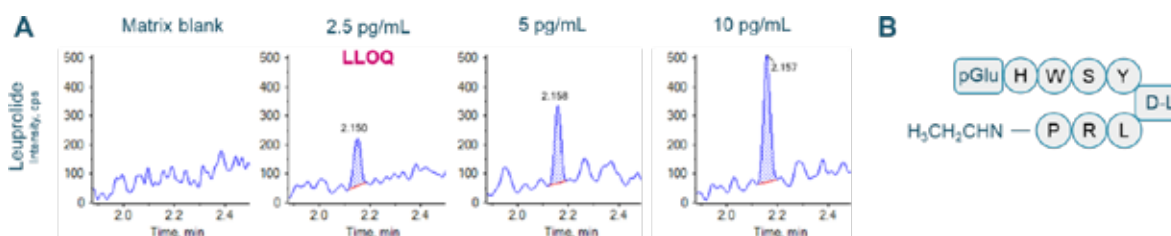



Figure 1. Representative extracted ion chromatograms (XICs) and structure of leuprolide. An LLOQ of 2.5 pg/mL (0.025 pg on column) was achieved for leuprolide in human plasma. No matrix interference was observed at the retention time of the analyte (A). Leuprolide is a synthetic nonapeptide used to suppress gonadal steroid synthesis (B).



concentration levels across a linear dynamic range (LDR) spanning 3.6 orders of magnitude

- Enhanced sensitivity unlocked: Improved front-end technology with the D Jet ion guide, OptiFlow Pro ion source and E Lens probe enhanced ion generation, capture and transmission, enabling users to reach desired quantitative sensitivity
- Streamlined data management: Data acquisition and processing are integrated into SCIEX OS software, a 21 CFR Part 11 compliance-ready platform

Methods

Sample preparation: The commercially available leuprolide (Figure 1B) was reconstituted in dimethyl sulfoxide. Individual concentrations were prepared by diluting leuprolide in a solvent containing 75:25 (v/v), water/acetonitrile with 1% formic acid and 0.05% human plasma. Individual concentrations were spiked into 100 μ L of human plasma ranging from 2.5 pg/mL to 10000 pg/mL. Protein precipitation was performed with 100 μ L of 5% aqueous ammonia in 90:10 (v/v), acetonitrile/water mixture. Samples were vortexed for 30 seconds and centrifuged at 12000 rcf for 10 minutes at room temperature. The supernatant was transferred to a new Eppendorf tube containing 800 μ L of water and samples were briefly vortexed and centrifuged. Then, 500 μ L of each sample was loaded twice on a Phenomenex Strata-X PRO microelution 96-well plate operated under positive pressure. Samples were washed with 20% acetonitrile in water. Finally, elution was performed using 50 μ L of 1% trifluoroacetic acid in 75:25 (v/v), acetonitrile/water. After elution, samples were diluted with 50 μ L of water after the elution to a final volume of 100 μ L.

Chromatography: Sample separation was performed using an ExionLC system at a 0.6 mL/min flow rate on a Phenomenex Kinetex XB C18 (2.1 x 50 mm, 2.6 μ m, 100 \AA) column. Two cycles of wash in high organic with a flow rate of 1 mL/min were added for column cleaning after the elution of leuprolide (Table 1). A 5-minute gradient was run

using 0.1% formic acid in water as mobile phase A and 0.1% formic acid in acetonitrile as mobile phase B (Table 1). The column temperature was maintained at 55 $^{\circ}$ C. An injection volume of 10 μ L was used for analysis. A mixture of 1:1:1 (v/v/v), acetonitrile/methanol/water was used as a needle wash solvent.

Table 1. Chromatographic gradient for leuprolide.

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0.0	90	10
0.2	90	10
2.5	70	30
2.6*	2	98
2.9*	2	98
3.0	90	10
3.4	90	10
3.5*	2	98
3.9*	2	98
4.0	90	10
5.0	90	10

*Flow rate was set to 1 mL/min

Mass spectrometry: The optimized source and gas parameters are listed in Table 2 and the analyte-dependent MRM parameters are included in Table 3.

Table 2. Source and gas parameters.

Parameter	Value
Polarity	Positive
Ion source gas 1	50 psi
Ion source gas 2	60 psi
Curtain gas	50 psi
Source temperature	500 $^{\circ}$ C
Ion spray voltage	2500 V
CAD gas	12



Table 3. MRM parameters used for quantitation.

ID	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	CE (V)	CXP (V)	Q0D (V)
Leuprolide	605.6	249.1	40	5	5

Data processing: Data collection and analysis were performed in SCIEX OS software, version 3.0. Peaks were automatically integrated using the MQ4 algorithm and a weighting of $1/x^2$ was used for quantitation.

Quantitative performance

The circulating concentrations in human plasma for depot leuprolide injections vary between high-pg/mL to ng/mL levels.² For lower dose regimens, achieving low-pg/mL sensitivity levels is critical for pharmacokinetic profiling of leuprolide. Here, a sensitive and robust LC-MS/MS quantitation assay with a wide LDR was achieved with a 5-min chromatographic run time.

The calibration curve ranged from 2.5 pg/mL to 10000 pg/mL and was prepared as described in the sample preparation section. Individual concentrations were run in triplicate.

An LLOQ of 2.5 pg/mL was achieved for leuprolide (Figure 1). No interferences were observed in the human plasma matrix blank (Figure 1).

Linearity was achieved between 2.5 pg/mL and 10000 pg/mL with a coefficient of determination (r^2) of 0.993 (Figure 2). An LDR spanning 3.6 orders of magnitude was achieved.

Analytical performance was evaluated for accuracy and precision. The accuracy of the calculated mean was expected to be between 80% and 120% at the LLOQ and between 85% and 115% at higher concentrations. The %CV of the calculated mean for each concentration was expected to be <20% at the LLOQ and <15% at higher concentrations.

Accuracy was within $\pm 12\%$ of the nominal concentration and the %CV was <10% for leuprolide (Figure 3). Calculated accuracy and %CV values met the acceptance criteria at each concentration level.

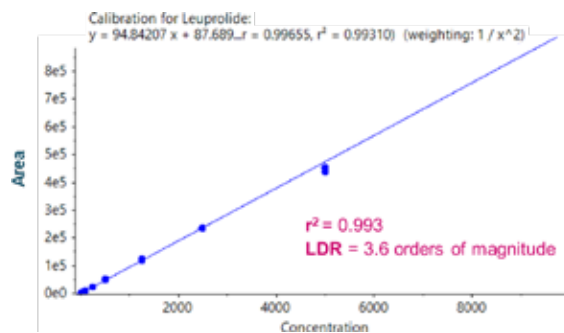


Figure 2. Calibration curve for leuprolide. The peak area of leuprolide was used to generate a calibration curve. Each concentration level was run in triplicate. Linearity was achieved between 2.5 pg/mL and 10000 pg/mL, spanning an LDR of 3.6 orders of magnitude with an r^2 of 0.993.

Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Average Accuracy across Replicates	Value #1	Value #2	Value #3
Leuprolide	2.50	3 of 3	2.650e0	2.620e-1	9.88	106.01	2.502e0	2.496e0	2.953e0
Leuprolide	5.00	3 of 3	4.448e0	7.175e-2	1.61	88.97	4.369e0	4.466e0	4.508e0
Leuprolide	10.00	3 of 3	9.428e0	6.557e-1	6.96	94.28	9.407e0	8.783e0	1.009e1
Leuprolide	25.00	3 of 3	2.602e1	1.625e0	6.24	104.07	2.775e1	2.452e1	2.578e1
Leuprolide	50.00	3 of 3	5.446e1	9.280e-1	1.70	108.93	5.554e1	5.395e1	5.391e1
Leuprolide	100.00	3 of 3	1.018e2	4.910e0	4.82	101.77	9.984e1	9.812e1	1.074e2
Leuprolide	250.00	3 of 3	2.479e2	1.099e0	0.44	99.18	2.492e2	2.472e2	2.474e2
Leuprolide	500.00	3 of 3	5.453e2	2.255e1	4.14	109.05	5.669e2	5.409e2	5.219e2
Leuprolide	1250.00	3 of 3	1.269e3	4.649e1	3.66	101.50	1.321e3	1.252e3	1.233e3
Leuprolide	2500.00	3 of 3	2.476e3	3.136e1	1.27	99.03	2.466e3	2.450e3	2.511e3
Leuprolide	5000.00	3 of 3	4.728e3	9.001e1	1.90	94.57	4.805e3	4.629e3	4.751e3
Leuprolide	10000.00	3 of 3	9.264e3	6.284e1	0.68	92.64	8.192e3	9.304e3	9.298e3

Figure 3. Quantitative performance for leuprolide analysis. Reproducibility and accuracy results were determined from the calibration curve across 3 replicates at each concentration. Statistical results were summarized using the Analytics module in SCIEX OS software.

Compliance-ready SCIEX OS software

SCIEX OS software is a closed system and requires records and signatures to be stored electronically, meeting the regulations outlined by 21 CFR Part 11. SCIEX OS software can open raw data files from any visible storage location within a closed network by using designated processing workstations. Figure 4 illustrates the features of SCIEX OS software that are used for monitoring the audit trail, acquiring and processing data and configuring user access.

The audit trail feature enables users to audit critical user actions and locks in data integrity. The Central Administrator Console (CAC) feature allows users to centralize acquisition and processing using a single platform to maximize efficiency for multi-instrument laboratories, independent of compliance standards. The configuration module allows users to assign roles and access as the administrator, method developer, analyst and reviewer.

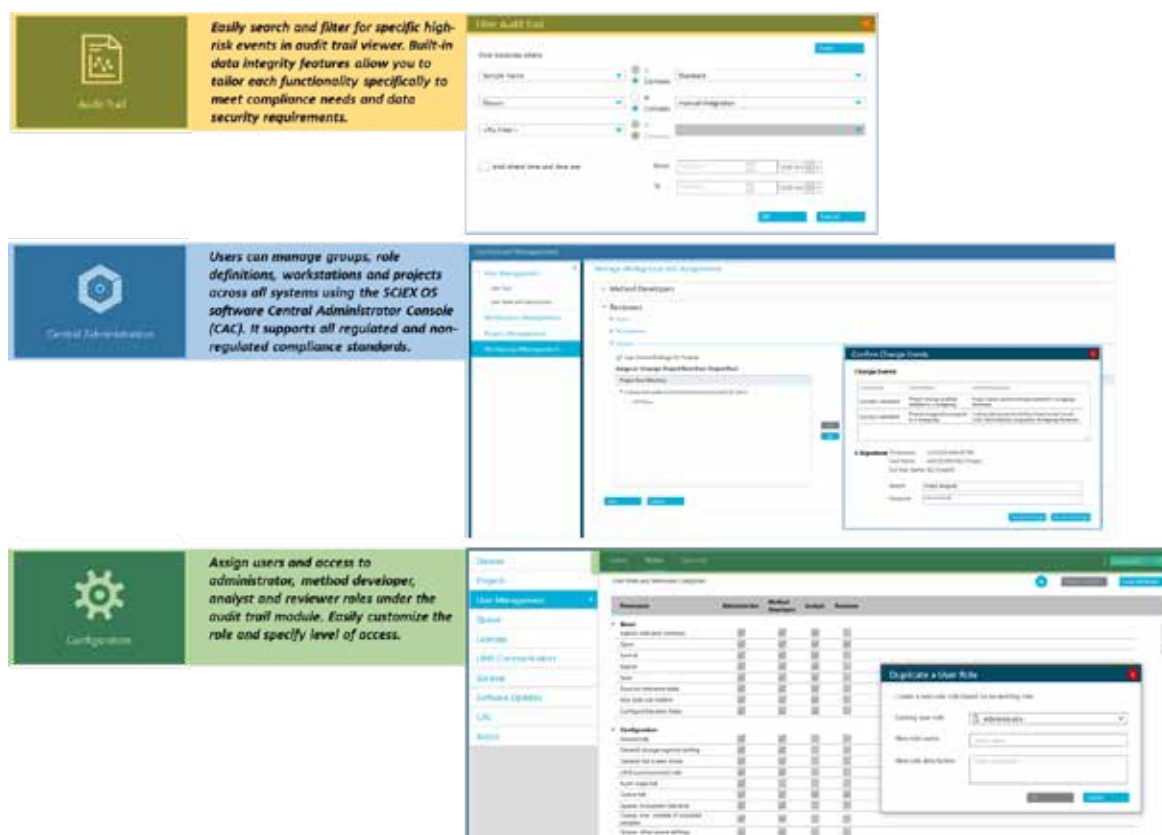


Figure 4. Features of the SCIEX OS software for monitoring user access and evaluating the audit trail. The audit trail view allows users to filter for high-risk events easily and enables data integrity features to meet compliance requirements. The software features a Central Administrator Console (CAC) to manage users and groups, role definitions, workstations and projects across all systems. The CAC feature supports both regulated and non-regulated compliance standards. The configuration module enables users to quickly set up roles and levels of access for the administrator, method developer, analyst and reviewer levels.



Conclusions

- An LLOQ of 2.5 pg/mL was reached for the quantitation of leuprolide in human plasma
- Linearity was achieved between 2.5 pg/mL and 10000 pg/mL, with an r^2 of 0.993
- The method demonstrated accurate and highly reproducible (%CV <10%) quantitative performance at all concentrations
- Sensitivity was achieved on the SCIEX 7500 system with an improved front-end technology for better ion generation, capture and transmission
- SCIEX OS software is compliance-ready to support 21 CFR Part 11 and integrates with a triple quadrupole mass spectrometer to support data acquisition, processing and management on a single platform

References

1. Kristof Chwalisz. Clinical development of the GnRH agonist leuprolide acetate depot. F S Rep. 2022 Nov 21;4(2 Suppl):33-39.
2. Piero Periti, Teresita Mazzei, Enrico Mini. Clinical pharmacokinetics of depot leuprorelin. Clin Pharmacokinet. 2002;41(7):485-504.



采用SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready串联质谱系统对注射用丹参多酚酸中活性成分的鉴定策略

An integrated strategy for chemical characterization of Salviaolate lyophilized Injection by SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready System

满卓¹, 司丹丹¹, 龙志敏¹, 郭立海¹, 郭亚清², 韩立峰²

Zhuo Man¹, Dandan Si¹, Zhimin Long¹, Lihai Guo¹, Yaqing Guo², Lifeng Han²

¹ SCIEX应用支持中心, 中国

² 天津中医药大学

Keywords: 7500; QTRAP; Salviaolate Lyophilized Injection (SLI); pMRM-IDA-EPI

前言

注射用丹参多酚酸 (SLI) 是一种从丹参水提物中提取的冻干粉针剂, 由丹参水溶性提取物制成。它具有活血通络、抗炎、抗氧化、神经营养和神经保护等功能。在临床上, 它经常用于治疗中风恢复期经络中的血瘀和侧支阻塞综合征 (轻度至中度脑梗死)。由于SLI是一种成分复杂的中药注射剂, 其临床应用的安全性一直是以往研究中不可避免的话题。迄今为止, 如何全面表征SLI的活性成份, 特别是具有潜在生物活性的微量成分, 仍然具有很大的挑战。

本实验使用超高效液相色谱-三重四极杆-线性离子阱质谱(UHPLC-QTRAP-MS/MS)相结合, 提出了一种新颖、灵敏且简单的策略, 用于系统和快速分析SLI的化学成分。该策略具有以下特点:

1. 通过QTRAP® System独特的多种采集模式复合联用的方式, 一针进样, 同时得到一级和二级碎片信息。采

用四种扫描模式 (EMS-IDA-EPI, Pre-IDA-EPI, NL-IDA-EPI, pMRM-IDA-EPI) 具有互补性的新策略。

2. 结合LightSight软件自动预测相似结构未知物的功能, 从而快速、灵敏地分析SLI中的活性成分。
3. 从SLI中鉴定出总共171种化合物。其中, 27个痕量成分以前没有报道过。这种策略可以显著提高对于SLI中大量痕量活性成份的鉴定及异构体的区分, 从而全面的鉴定到SLI中不同含量水平的活性成份。
4. 另外, 对定性结果选出的13个代表性成份在15批次SLI中的进行准确定量。其中, 丹酚酸A (Sal A)、Sal B、Sal D、紫精酸 (LA) 和迷迭香酸 (RA) 被证明是主要成分。这15批样品均一性良好, 均未出现异常批次。
5. 这种新策略可以显著提高对于未发现的化学成分的鉴定, 并为鉴定其它中药的有效成分提供了很好的思路。

仪器设备

SCIEX ExionLC™ AD超高效液相系统联用SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready四极杆-线性离子阱复合质谱系统

RUO-MKT-02-14815-ZH-A



图1. ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready系统

样品信息:

样品: 制备样品SLI时, 用1 mL超纯水稀释。在6000转的转速下旋转并离心10分钟, 过滤, 上机分析。

定性分析批号为20180903

定量分析的15个批号分别为20200101、20200102、20200104、20200105、20200201、20200202、20200203、20200204、20200206、20200207、20200401、20200402、20200404、20200405和20200406。

标准品信息:

标准品: 丹参素、咖啡酸、阿魏酸、异芥酸、丹酚酸C、原儿茶酸、紫草酸、香草醛酸、丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸D、原儿茶酸醛、迷迭香酸。

13种参考标准溶液的储备标准溶液在浓度为2.0 mg/mL的甲醇溶液。然后, 按比例混合储备溶液, 并用10%ACN稀释, 以制备最终混合标准溶液。通过将标准溶液与10%ACN的混合物连续稀释, 制备了一系列工作标准溶液。

色谱方法:

色谱柱: ACQUITY HSS T3 column (2.1 × 100 mm, 1.8 μm)

流动相: A: 水+0.03%甲酸

B: 乙腈; 甲醇 (1:1) +0.03%甲酸

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40°C;

定性梯度洗脱30min;

定量梯度洗脱10min;

质谱方法:

离子源: ESI电喷雾电离源

扫描方式: NEG负模式

气帘气CUR: 45psi

喷雾电压IS: -4500v

源温度Temp: 350°C

雾化气Gas1: 35psi

辅助气GAS2: 70psi

碰撞气CAD: 9psi

定性分析采集方式设置: 多种扫描方式结合采集

定量分析采集方式设置: MRM多反应监测模式

用于定量的标准品离子对信息请见表1。

实验流程:

实验设计流程如图2所示:

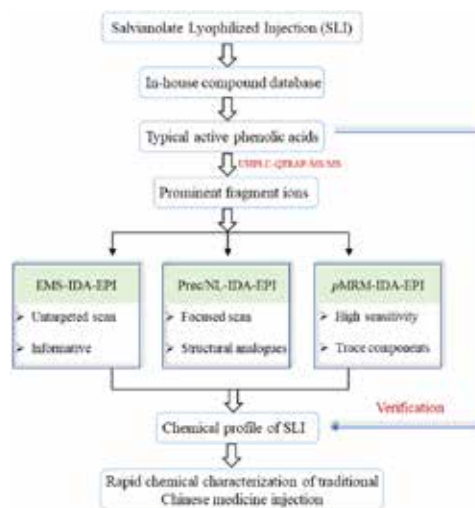


图2. 实验设计流程

RUO-MKT-02-14815-ZH-A

表1. 13种SLI的活性成分的质谱离子对参数

Compounds	Q1	Q3	CE
Danshensu 1	197	135	-40
Danshensu 2	197	123	-40
Lithospermic acid 1	537.1	185	-10
Lithospermic acid 2	537.1	295.1	-60
Caffeic acid 1	179	134	-40
Caffeic acid 2	179	135	-40
Vanillic acid 1	167	108	-40
Vanillic acid 2	167	152	-20
Ferulic acid 1	193.1	133	-40
Ferulic acid 2	193.1	134	-40
Isoferulic acid 1	193.1	133	-40
Isoferulic acid 2	193.1	134	-40
Salvianolic acid A 1	493.1	185	-60
Salvianolic acid A 2	493.1	109	-10
Salvianolic acid B 1	717.1	321	-10
Salvianolic acid B 2	717.1	339.1	-10
Salvianolic acid C 1	491	293	-40
Salvianolic acid C 2	491	311	-40
Salvianolic acid D 1	417.1	175	-60
Salvianolic acid D 2	417.1	135	-10
Protocatechuic aldehyde 1	137	108	-40
Protocatechuic aldehyde 2	137	92	-40
Protocatechuic acid 1	153	109	-40
Protocatechuic acid 2	153	91	-40
Rosmarinic acid 1	359.1	161	-70
Rosmarinic acid 2	359.1	133	-70

1. 建立丹参水溶性提取物成分的自建库。
2. 使用非靶向增强扫描模式 (EMS) -信息依赖型采集 (IDA) -增强子离子扫描模式 (EPI) 获得 SLI 中代表性组分的碎裂行为, 适合于含量较高的成份。

3. 利用获得的特定碎片进行前体母离子扫描 (Prec) 和中性丢失扫描 (NL) -IDA-EPI 扫描, 从SLI获得更多的同系列相似结构的活性成份。特征子离子设置: 192, 109等, 中性丢失分子设置: 198, 162等。
4. 基于典型的碎片离子和合理的预测, 以及对酚酸可能发生的化学反应的合理预测, 并结合LightSight软件自动预测和建立多种扫描模式, 开发了一种具有454个预测MRM离子对的高灵敏多反应监测 (pMRM) -IDA-EPI 扫描方法, 以提高SLI中低浓度未知活性成份的鉴定。

实验结果

1. 定性结果

1.1 EMS、Prec、NL和pMRM-IDA-EPI扫描模式的特征离子筛选

SLI来源于丹参的水提取物, 主要由各种酚酸组成, 主要包括丹参素和咖啡酸, 另外原儿茶酸和原儿茶醛也被认为是重要的单体化合物。其次, 酚酸容易发生氧化、还原、糖基化和其他反应。基于这些衍生化代谢反应, 可以推测它们在裂解途径中可能存在的碎片离子。图3显示了丹参素等主要活性成分的碎片信息。这些化合物的二级质谱图显示了特征碎片 m/z 197、179、135、109等。此外, 还考虑了一些已知标准品 (如紫草次酸、迷迭香酸和丹酚酸B) 的典型特征碎片离子, 如 m/z 519、353、321、295、185和159。另外, 化合物可通过198 Da (丹参素, -C₉H₁₀O₅)、180 Da (咖啡酸, -C₉H₈O₄)、162 Da (葡萄糖, -C₆H₁₀O₅) 的中性丢失(NL)生成产物离子, 或同时失去两个或更多中性分子。

因此, 将子离子 m/z 197、179、161和109用于Prec-IDA-EPI前体母离子增强扫描设置; NL198、180和162被选择用于SLI的NL-IDA-EPI中性丢失扫描。另外, 非靶向EMS-IDA-EPI扫描, 以获得SLI中所有可检测的化合物。

pMRM的预测离子对信息通过LightSight软件实现, 根据典型的酚酸母核结构, 可以快速高效的预测相关裂解途径的衍生化化合物, 共得到SLI潜在组分的454个pMRM离子对, 并直接导出为采集方法, 方便、快捷、高效。

RUO-MKT-02-14815-ZH-A

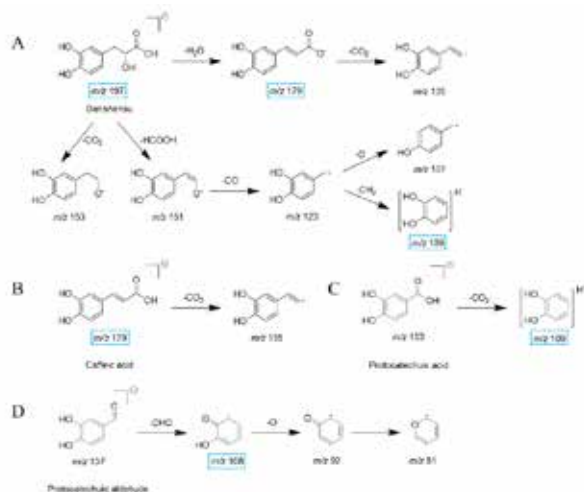


图3. 负离子作用下 SLI 中四个主要活性组分的二级质谱图。(A) 丹参素、(B) 咖啡酸、(C) 原儿茶酸和(D) 原儿茶醛。

1.2 SLI的四种扫描模式汇总结果

如图4所示，将pMRM、EMS、Prec和NL四种采集方式进行了韦恩图汇总，表明四种采集方式均有各自的优势。在这四种扫描模式的帮助下，共鉴定到171种成分，其中12种与标准品对照确认，保证鉴定准确度。此外，27种痕量成分以前从未报告过。其中一些是黄酮类化合物，如黄芩苷和尤帕林（化合物114和170）。大多数仍然属于酚酸。此外，在pMRM、EMS、Prec和NL中分别检测到168、76、37和33种化合物。这些化合物可分为以下类型：单体、二聚体、三聚体、四聚体酚酸及其异构体和衍生物（即糖基化、烷基化、水解、脱氧、脱羧、脱氢、氧化等）。

根据各自扫描模式的优势互补，首先使用基于QTRAP系统的EMS-IDA-EPI扫描来获取非靶向化学信息。然后利用代表性组分的典型碎片离子进行半靶向的Prec和NL-IDA-EPI扫描，得到更多结构相关且含量相对较高的化合物。



图4. 四种扫描方式的鉴定结果汇总的韦恩图

随后，总结了碎片离子的特征和典型性，以及可能的衍生代谢途径。基于以上信息，可以开发出灵敏度和选择性更高的pMRM扫描方法，以获得全面的化合物，尤其是痕量化合物。因此，EMS、Prec和NL-IDA-EPI可以被视为与靶向的pMRM-IDA-EPI的补充策略，以获取更多对结构解析有用的片段信息。

EMS作为一种非靶向扫描模式，可以全面挖掘分析物的MS碎片信息。Prec和NL，也称为半靶向策略，可以选择性地检测与母核结构相似的化合物。如图5所示，化合物48和50（图5A和5B）通过EMS检测到，而47和38（图5C和5D）通过Prec（m/z109）和NL（198Da）分别检测到。化合物48(RT,7.30min)在m/z327处产生[M-H]⁻并进一步脱羧产生m/z283处的碎片离子。其产物离子m/z267表明甲基化发生在C-3'或C-4'。随后，m/z267离子在m/z159和109处产生碎片离子，这与丹酚酸F的碎裂一致。因此，化合物48被鉴定为3'或4'-甲基丹酚酸F。

SLI中的酚酸具有结构相似但含量差异较大的特点。一些痕量成分，例如一系列酚酸衍生物，可能具有潜在的生物活性，但难以检测。pMRM-IDA-EPI扫描模式作为一种靶向策略，灵敏度高，干扰少，一次进样即可同时检测不同含量水平的组分，并且得到丰富的增强二级扫描质

RUO-MKT-02-14815-ZH-A

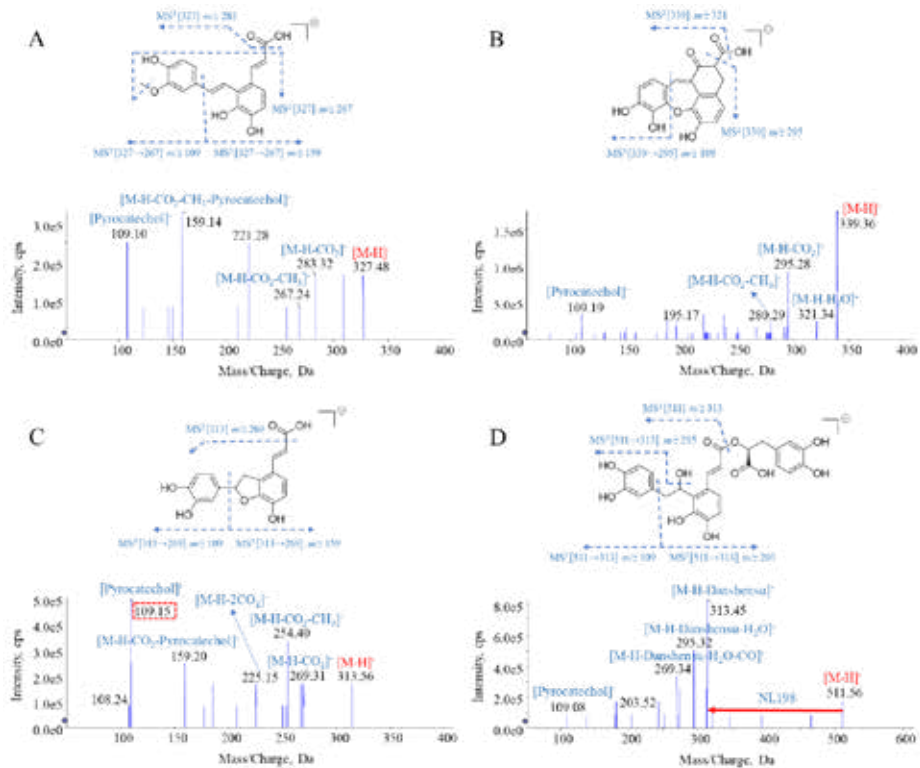


图5. EMS、Prec 和NL 扫描模式检测到的4 种 SLI 化合物的 MS/MS 谱图和建议的碎裂行为。(A)化合物48、3'或4'-丹酚酸甲酯F，通过EMS；(B)化合物50，丹酚酸G，通过EMS；(C)化合物47，(E)-3-(2-(3,4-二羟基苯基)-7-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-4-基)丙烯酸，通过Prec (m/z 109)；(D)化合物38，7'-氢-8'-羟基-丹酚酸A，NL(198 Da)。

谱图。如图6所示，以图6A的化合物75为例，它们仅通过pMRM 扫描模式可以检测到。由于75和79（图6B）之间的保留时间更近且结构相似，EMS的非选择性以及Prec和NL扫描模式提供的信息较少，使得这三种方法难以检测到它们。然而，根据酚酸可能的反应，预测的MRM离子对 m/z 745.1 > 321.0 和 m/z 745.1 > 519.0，以及 m/z 715.1 > 321.0 和 m/z 715.1 > 295.1，可以通过pMRM 扫描模式轻松检测和区分化合物75和79。此外，该方法的高灵敏度还体现在异

构体的鉴定上，以化合物79为例，本研究共鉴定出6种异构体，即化合物37、99、109、112和143。pMRM均能检测到，EMS只能检测到37，而Prec和NL均未检测到。在本研究中，我们还举了一些其他例子来说明pMRM的优势。它们的详细碎片概况如图6所示。

RUO-MKT-02-14815-ZH-A

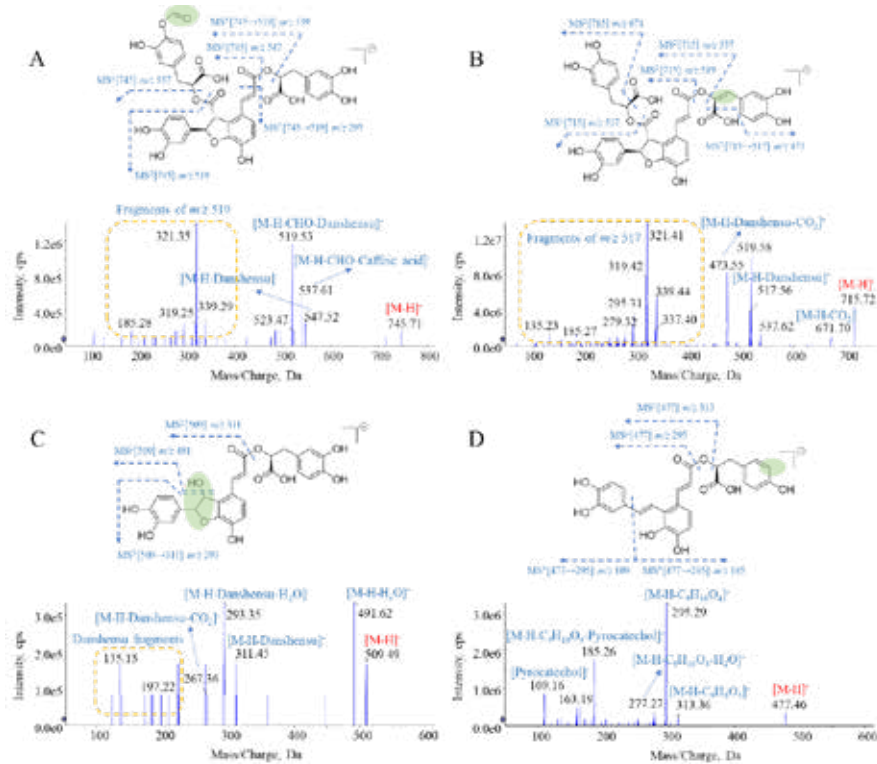


图6. pMRM 扫描模式下SLI中4种组分的MS/MS谱图注释。(A) 化合物75、3'''或4'''-甲酰基丹酚酸B, Sal B的甲酰化产物；(B) 化合物79, 7'', 8''-二去氢-水杨酸B, Sal B的脱氢产物；(C) 化合物91, (E)-3-(3,4-二羟基苯基)-2-((3-(2-(3,4-二羟基苯基)-3,7-二羟基-2,3-二氢苯并呋喃-4-基)丙烯酰基)氧基)丙酸, Sal A的氧化产物；(D) 化合物120, 2-(((E)-3-(2-((E)-3,4-二羟基苯基)-3,4-二羟基苯基)丙烯酰基)氧基)-3-(4-羟基苯基)丙酸, Sal A的脱氧产物。绿色阴影代表生化反应位点, 丹酚酸缩写为Sal。

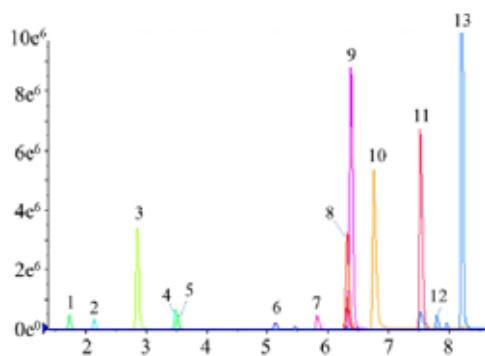


图7. 13种活性成分标准品溶液的XIC提取离子流色谱图

2. 定量结果

2.1 13种标准品XIC提取离子流色谱图请见图7。

2.2 线性、精密度和准确度

13个定量分析成分的回归方程、相关系数和线性范围如表2所示。结果表明, 所有13种分析物均显示出良好的线性关系, 线性相关系数r值大于0.997。

RUO-MKT-02-14815-ZH-A



表2. 标准曲线汇总

Compounds	Regression equations	Linearity ranges (ng·mL ⁻¹)	Correlation coefficients (r)
Danshensu	$y = 3.68 \times 10^3 x + 4.10 \times 10^3$	1.00-1000	0.9978
Lithospermic acid	$y = 2.42 \times 10^4 x + 2.11 \times 10^4$	2.50-1000	0.9997
Caffeic acid	$y = 4.49 \times 10^4 x + 1.88 \times 10^3$	0.10-100	0.9997
Vanillic acid	$y = 3.29 \times 10^3 x + 1.08 \times 10^3$	1.00-1000	0.9998
Ferulic acid	$y = 1.45 \times 10^4 x + 1.56 \times 10^3$	0.50-100	0.9997
Isoferulic acid	$y = 5.24 \times 10^3 x + 4.22 \times 10^2$	1.00-100	0.9995
Salvianolic acid A	$y = 6.93 \times 10^3 x + 3.20 \times 10^3$	2.50-1000	0.9975
Salvianolic acid B	$y = 2.49 \times 10^4 x + 1.46 \times 10^5$	2.50- 500	0.9997
Salvianolic acid C	$y = 1.14 \times 10^4 x + 4.10 \times 10^3$	1.25-500	0.9992
Salvianolic acid D	$y = 8.32 \times 10^3 x + 1.26 \times 10^3$	0.50-100	0.9997
Protocatechuic aldehyde	$y = 5.75 \times 10^4 x + 2.85 \times 10^4$	1.25-100	0.9983
Protocatechuic acid	$y = 1.96 \times 10^4 x + 2.24 \times 10^3$	0.25-100	0.9995
Rosmarinic acid	$y = 6.62 \times 10^4 x + 1.31 \times 10^4$	1.00-1000	0.9987

通过向样品中添加80%、100%和120%已知浓度的标准品溶液，对应三个不同的浓度水平（低、中、高），进行加标回收实验，从而考察本方法的回收率和精密度。对每种浓度水平进行一式三份分析，并使用以下公式计算结果：回收率（%）=（检测量-原始量）/加标量×100。如表3所示，目标化合物的回收率在77.05%到99.30%之间，RSD值在0.45%到5.80%之间。

2.4 不同批次丹参注射液的含量结果

通过SLI的三个平行实验确定定量结果，如表4所示。从图8可以看出，13种成分的含量差别很大。丹酚酸A（Sal A）、Sal B、Sal D、紫草次酸（LA）和迷迭香酸（RA）是主要成分。其中，Sal B的含量最高（195.08-350.46 μg/mg），然后是LA、Sal A和RA，具有几乎相同的特征。如前所述，基于化学成分鉴定、来源分析、靶细胞提取物和药代动力学研究，Sal B、RA、LA和Sal D被筛选并确定为SLI的有效标记物。此外，香草醛、阿魏酸、Sal C、原儿茶醛和原儿茶酸的含量较低，这些都是SLI的重要活性成分。

表3. 精密度和准确度

Compounds	Precision RSD (%)	Recovery	
		Mean (%)	RSD (%)
Danshensu	2.88	93.90	3.95
Lithospermic acid	3.78	82.20	0.45
Caffeic acid	3.93	98.80	0.80
Vanillic acid	1.74	98.75	5.80
Ferulic acid	5.69	92.60	2.45
Isoferulic acid	5.84	88.10	1.85
Salvianolic acid A	2.85	77.05	1.70
Salvianolic acid B	4.30	85.00	1.35
Salvianolic acid C	3.73	89.05	1.60
Salvianolic acid D	2.72	78.00	2.30
Protocatechuic aldehyde	2.30	98.95	1.20
Protocatechuic acid	4.02	99.30	5.45
Rosmarinic acid	4.04	82.75	1.45

RUO-MKT-02-14815-ZH-A



表4. 不同批次丹参注射液的含量结果汇总

Component	Batches														
	20200101	20200102	20200104	20200105	20200201	20200202	20200203	20200204	20200206	20200207	20200401	20200402	20200404	20200405	20200406
Danshensu	0.7262	0.7906	0.2253	0.7004	0.8513	0.3666	0.9992	0.0474	0.7126	0.7629	0.6946	0.3246	0.7444	0.0207	0.0215
Lithospermic acid	23.666	25.362	24.232	23.602	22.325	24.205	23.277	25.483	23.263	24.214	22.013	21.532	23.723	22.262	22.183
Caffeic acid	0.3754	0.4462	0.4938	0.4754	0.4692	0.5754	0.4223	0.5385	0.3646	0.4431	0.4330	0.4330	0.3821	0.1905	0.2524
Vanillic acid	0.0254	0.0254	0.0254	0.0253	0.0254	0.0254	0.0253	0.0253	0.0254	0.0254	0.0254	0.0254	0.0253	0.0254	0.0254
Ferulic acid	0.0132	0.0140	0.0143	0.0146	0.0171	0.0163	0.0184	0.0184	0.0134	0.0150	0.0104	0.0117	0.0060	0.0030	0.0134
Isoferulic acid	0.0230	0.0474	0.0433	0.0425	0.0560	0.0544	0.0490	0.0593	0.0472	0.0539	0.0361	0.0406	0.0357	0.0392	0.0270
Salvianolic acid A	22.622	22.231	24.509	23.497	19.460	24.446	22.205	27.725	22.466	24.130	21.197	22.766	22.766	22.352	22.226
Salvianolic acid B	305.35	299.25	319.86	253.32	294.77	310.46	326.02	344.62	204.31	220.02	165.00	146.15	246.62	220.92	238.86
Salvianolic acid C	0.0690	0.0696	0.0564	0.0471	0.0502	0.0445	0.0306	0.0390	0.0384	0.0475	0.0157	0.0442	0.0455	0.0174	0.0134
Salvianolic acid D	2.0223	1.4692	1.4735	1.1092	0.9015	1.2000	1.2500	1.4015	1.6735	1.4130	1.9646	1.2277	1.3169	0.9477	1.0015
Protocatechuic aldehyde	0.0432	0.0721	0.0439	0.0630	0.0630	0.0681	0.0421	0.0741	0.0696	0.0474	0.0320	0.0706	0.0652	0.0310	0.0627
Protocatechuic acid	0.0254	0.0071	0.0065	0.0065	0.0079	0.0072	0.0065	0.0074	0.0050	0.0050	0.0060	0.0061	0.0066	0.0050	0.0070
Rosmarinic acid	25.195	27.456	25.711	27.765	27.274	26.429	24.700	27.054	25.075	26.734	21.003	27.642	26.163	27.232	25.912

总结

本实验在UHPLC-QTRAP LC-MS/MS系统上, 采用一种新颖、灵敏且简单的方法策略, 根据EMS、Prec、NL和pMRM-IDA-EPI各自扫描方式的优势, 系统和快速地表征了SLI中的化学成分。共鉴定到171种成份, 27种微量成分首次在SLI中发现。根据定性结果选择的13种代表性成分在15批SLI中进行准确定量。这15批样品均表现出良好的均匀性, 重现性好。

总体而言, 这种新策略可以加速提高对于未发现的中药成分的鉴定能力, 尤其是对于痕量成分; 可以作为一种推荐方法用于其它中药成份的深入分析鉴定, 从而灵敏、快速的实现对于中药复杂组分的深度表征。

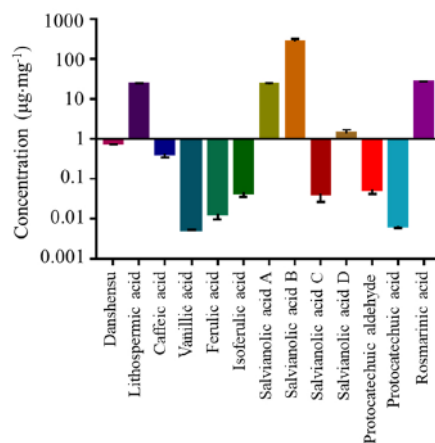


图8. 不同15批次SLI中13种成分的含量分布

参考文献:

1. Yaqing Guo, Rui Mao, Yuanyuan Zhang, Rongrong Li, Patrick Kwabena Oduro, Dandan Si, Lifeng Han, Yuhong Huang, Guixiang Pan. An integrated strategy for the systematic chemical characterization of Salvianolate lyophilized injection using four scan modes based on the ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 215 (2022) 114769 doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114769;

RUO-MKT-02-14815-ZH-A

精确分析，灵活定性



SCIEX ZenoTOF® 7600 系统

EAD + Zeno™ trap (Zeno 阱) 技术，结合了高灵敏度和高信息含量，适用于对重要，低水平代谢产物进行表征。



Molecule Profiler 软件

更好的洞察代谢物及杂质信息

内容提要 



利用SCIEX ZenoTOF® 7600系统进行PROTAC药物ARV-110的代谢产物鉴定

Metabolites Identification of the Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradar ARV-110 Using SCIEX ZenoTOF® 7600 System

陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏

Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX 应用支持中心, 中国

Keywords: SCIEX ZenoTOF® 7600, Metabolites Identification, PROTAC degrader, ARV-110

引言

药物代谢产物分析是新药研发流程中重要的一环, 是决定药物能否上市的关键因素之一。大多数药物代谢途径被认为是去毒过程, 即药物在体内药物代谢酶的介导下发生生物转换生成具有更大极性、更高水溶性的代谢产物。与原型药物相比, 这些代谢产物的药理活性通常会减弱或者完全消失。但是在少数情况下, 一些药物在代谢过程中可能产生反应性代谢中间体, 该中间体进一步与蛋白质、DNA等生物大分子发生共价结合, 导致细胞损伤从而产生毒性。进行药物代谢产物分析, 可以了解药物前体被显著代谢后的代谢产物、毒性或者药效如何, 对于药效学 and 安全性评价非常重要。

药物化学结构的多样性和生物转化途径的复杂性使得药物代谢产物鉴定研究具有较高的挑战性。超高效液相色谱质谱联用技术具备了液相色谱的高分离能力和质谱的高灵敏度及优异的选择性, 可以用来开展高通量、高效率的药物代谢产物分析研究。而质谱分析在药物代谢研究领域的发展也十分迅速, 尤其是高分辨率质谱以其高分辨率和突出的定性分析能力等优势逐渐成为研究药物代谢产物及代谢转化途径的强有力工具^[1]。

本方法采用SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统对人肝微粒体孵育方式进行处理PROTAC 药物 ARV-110进行代谢产物分析。采用SCIEX Molecule Profiler软件进行数据分析, 结合ZenoTOF® 7600独特的EAD碎裂方式对代谢位点进行预测。

ZenoTOF® 7600系统进行代谢产物分析的优势:

1. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统具有灵敏度高和扫描速度快的特点, 一次进样采集到更全面的一级和二级谱图信息。
2. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统含有Zeno™ trap离子阱集功能, 在进行数据采集时可提高低丰度代谢物的二级灵敏度, 得到更高质量的二级谱图用于代谢物结构解析。
3. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统独有的电子活化解离碎裂方式(EAD), 与常规的碰撞诱导解离(CID)相比可得到更多、更丰富的二级碎片信息, 帮助进行代谢位点的预测。
4. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统进行数据采集, Molecule Profiler软件进行代谢物分析, 两者结合可简化

RUO-MKT-02-15679-ZH-A

数据采集和数据处理流程，实现从数据采集到代谢位点预测的全流程分析。

实验方法

样品制备

取肝微粒体储备液与ARV-110储备液混合，于37°C孵育5 min，加入NADPH和UDPGA混合溶液，涡旋混匀后在37°C孵育120 min，加入冰乙醇终止反应。反应液经涡旋离心后，上清液氮气吹干。用50%乙醇水复溶后进液质分析。

液相条件：

液相：LC 40AD液相系统

色谱柱：HSS T3 (100 × 2.1 mm, 1.8 μm)

流动相：A: 水 (含0.1% 甲酸)

B: 乙醇 (含0.1% 甲酸)

流速：0.3 ml/min

柱温：40°C

梯度洗脱，洗脱程序如表1：

表1. 液相洗脱梯度

时间 (min)	A%	B%
0	95	5
2	95	5
15	5	95
17	5	95
17.1	95	5
20	95	5

质谱条件：

SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统

电离模式：电喷雾 (ESI) 模式

扫描方式：信息依赖采集 (IDA) + 动态背景扣除 (DBS)

气帘气CUR: 25psi

源温度 Tem: 550°C

雾化气Gas1: 55psi

辅助气Gas2: 55psi

EAD及CID参数：如表2

表2. EAD及CID质谱参数

参数名称	参数值
一级扫描范围	100-1500 Da
一级累积时间	0.15 s
二级扫描范围	100-1500 Da
二级累积时间	0.04 s
去簇电压 (DP)	60 V
碰撞能量 (CID)	40 V
碰撞能量 (EAD)	12 V
电子束电流	7000 nA
电子动能	15 eV
Zeno阱	ON

数据处理：SCIEX OS 3.0软件进行数据采集，Molecule Profiler 1.3软件用于代谢产物分析及代谢位点预测。

实验结果

ARV-110在CID和EAD模式下采集到的二级谱图如图1，图中可以看出，在EAD模式下可以得到更丰富的二级碎片信息，用来进行结构解析。采用Molecule Profiler 1.3软件进行数据分析，图2展示了Molecule Profiler软件结果查看界面，在ARV-110的孵育样本中分析检测到19种代谢产物，并全部进行了结构式预测。结果显示，ARV-110的主要代谢方式为自身的降解，以及在自身降解的基础上进行的氧化、甲基化和葡萄糖醛酸化等反应。

RUO-MKT-02-15679-ZH-A

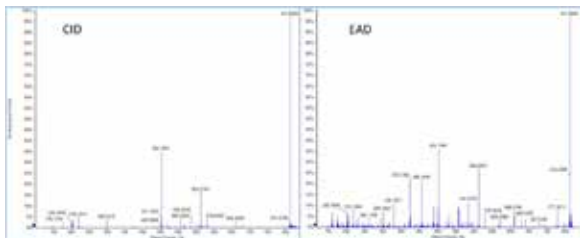


图1. ARV-110在CID和EAD碎裂模式下的二级谱图



图2. Molecule Profiler软件中的结果查看界面

以葡萄糖醛酸化代谢为例进行代谢位点解析，在RT 5.9min和RT 6.3分钟均检测到m/z 495.2446的一级离子，判断为[M+H]⁺峰，预测分子式为C₂₃H₃₄N₄O₈，两个峰的质量偏差均为-0.6ppm。根据其精确分子量及二级碎片信息推测为ARV-110母药丢失左侧含氯6元环及右侧4个环后再进行葡萄糖醛酸化代谢，从降解后的母药结构式中可看出有三个可能产生葡萄糖醛酸化的代谢位点。通过对RT 5.9 min的二级谱图进行分析发现，在该保留时间位置目标物m/z 495.2446的EAD二级谱图中有多个碎片离子如m/z 246.1437、m/z 251.1128和m/z 257.1342可进行代谢位点确定，经过二级质谱碎片归属分析，推测RT 5.9 min处化合物对应左侧羟基位置连接葡萄糖醛酸化基团，而在CID谱图中没有发现这些碎片信息，详细EAD谱图信息如图3。在对RT 6.3 min目标化合物m/z 495.2446的EAD二级谱图分析中可看到特征碎片信息如m/z 265.1560、m/z 347.1904和m/z 387.2368分别对应含葡萄糖醛酸化基团的二级碎片信息，

经过二级质谱碎片归属分析，判定RT 6.3 min处化合物对应中间的氨基位置连接葡萄糖醛酸化基团，详细谱图信息如图4。



图3. RT 5.9 min处m/z 495.2446的EAD二级谱图及特征碎片结构归属，图中结构式黑色加粗部分为碎片对应的结构位置。



图4. RT 6.3 min处m/z 495.2446的EAD二级谱图及特征碎片结构归属，图中结构式黑色加粗部分为碎片对应的结构位置。

总结

本文使用SCIEX ZenoTOF® 7600系统和Molecule Profiler软件建立了PROTAC药物ARV-110的体外代谢产物快速分析方法。ZenoTOF® 7600高分辨系统中的Zeno™ trap离子阱集成功能可进行二级碎片离子的富集从而得到高灵敏度的二级谱图用于低含量代谢物的谱图解析；CID碎裂模式结合EAD碎裂模式可得到更丰富的二级碎片信息，在判断到代谢路径的同时为代谢物结构式的预测及代谢位点的判断提供依据。Molecule Profiler软件可同时处理CID和EAD数据，从大

RUO-MKT-02-15679-ZH-A



量基质背景中快速提取代谢物的一级和二级质谱峰并自动进行结构式预测。

参考文献

- [1]. 利用SCIEX ZenoTOF® 7600准确鉴定PROTAC药物GNE-987的I相氧化代谢产物。RUO-MKT-02-15644-ZH-A

RUO-MKT-02-15679-ZH-A

使用正交二级数据进行全面的代谢物表征

Eva Duchoslav; Disha Thakkar; Yves Le Blanc; Jason Causon SCIEX, Concord, Canada

摘要

本文阐述了利用母离子产生的互补的“正交”二级碎片进行全面的代谢物表征。基于液质联用技术对在大鼠肝脏细胞中孵育的模式药提取物进行检测，发现在两种不同碎裂机制下，均有可用于结构表征的特征峰。互补的二级信息的整合有助于对所研究的药物代谢物进行可靠的结构表征。

材料和方法：

样品制备：维拉帕米、丁螺环酮和奈法唑酮以 1 μ M 起始浓度在大鼠肝细胞中孵育，在 0、30 和 120 分钟的时间点将样本从孵育反应中分离并用乙腈淬灭

高效液相色谱条件：

色谱柱：Phenomenex Luna Omega Polar C18, 150 mm；
进样量：5 μ L 液相梯度：流动相A为0.1% 甲酸水溶液，流动相B为乙腈从 5%B 到 95%B 用时4.75分钟，总运行时间为 6.5 分钟。

MS/MS 条件：

使用 ZenoTOF® 7600系统的Zeno CID IDA 和 Zeno EAD IDA 信息依赖模式分析样品。

TOFMS一级累积时间为50ms，质量范围为100~1000；同时采集10个化合物的二级，使用DBS动态背景扣除以及质量亏损过滤（可选）功能。CID MS/MS数据采集，累积时间 20 ms，质量范围40~1000，碰撞能量 45 ± 15 eV；EAD数据采集时间为90ms，质量范围为60~1000，Electron KE值10eV。

数据处理：

LC RMS 数据使用原版Molecule Profiler 软件进行处理，该软件可进行母离子类型确定，对 TOF MS 峰进行分组，针对CID 和 EAD 的MS/MS处理，每种代谢物的多个 MS/MS 谱图的整合和相互作用。

RUO-MKT-10-14711-ZH-A

表1. 模式药及其代谢物总结

名称	CID 二级覆盖度	EAD 二级覆盖度	一相氧化代谢物	开环代谢物	葡萄糖醛酸结合物
丁螺环酮	91%	100	7	2	
奈法唑酮	83%	92%	11	3	
维拉帕米	94%	92%	5	5	5

结果与讨论

在CID和EAD两种碎裂模式下，IDA 数据为一级峰提供了出色的MS/MS覆盖率；平均92%的预测和非预期代谢物可获得其对应的二级数据。

由于在 Molecule Profiler 软件中检测 TOF MS 峰，因此也可以确定这些峰的离子类型。这使得可以对化合物的多个 TOF MS 特征及其对应的MS/MS谱图进行分组（图 1）。



图 1. 丁螺环酮一级质谱图个准分子离子峰信息。丁螺环酮对应的4个母离子（红色箭头所示）产生的EAD二级质谱图。源内裂解碎片 $[M-C_9H_{10}O_2+H]^+$ 产生的MS/MS 中发现了新的碎片，例如m/z 127.12，可以辅助相应的开环代谢物的归属。



在 Molecule Profiler 软件的定性处理中，母药的 MS/MS 谱图中的峰对母药的结构进行了充分注释，该注释可用于对未知代谢物结构的提取和排序¹。换句话说，对于具有与母药完全不同的结构或通过不同的断裂机制获得的具有显著差异的碎片指纹的结构，该碎片可通过假设结构进行注释，而无需依赖母药的 MS/MS²。

不同碎裂机制 CID 和 EAD 可以获得不同特征峰的 MS/MS 谱图；因此，每种碎片类型都需要不同的碎裂方法设置，才能提到特征峰并对可能的代谢物结构进行排序。例如，EAD 光谱注释使用了更大的碎片集，而且更可能出现自由基碎片。

通过 Zeno CID 和 Zeno EAD MS/MS 数据可以减少结构预测时的不确定因素，并确认位置异构体，以此为化合物位点的修饰提供证据（图 2）。我们发现对于葡萄糖苷酸结合物，EAD 与 CID 的数据相比，可以提供比更多的特征 MS/MS 碎片，进而可以确认修饰的位点。我们发现随着 Zeno 功能提高了 TOF MS/MS 的灵敏度， $[M+Na]^+$ 产生的低丰度但准确的 MS/MS 碎片也可用于确认和做为补充支持药物代谢物的结构表征的证据（未显示）。

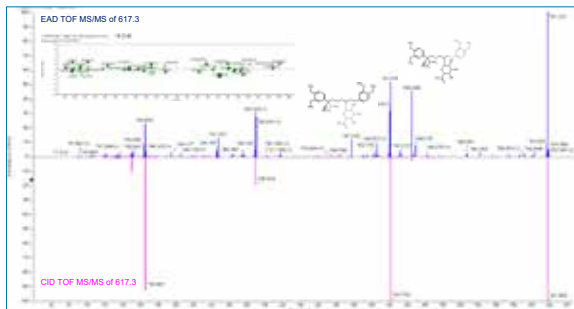


图2. 维拉帕米在3.62min时产生的“CH₂丢失和葡萄糖醛酸化”代谢物（详见图3）。CID和EAD二级质谱对比发现，EAD特征碎片可以为所研究化合物的结构提供明确的诊断信息，例如碎片397和465可用于对N-葡萄糖醛酸结合的诊断。EAD TOF MS/MS片段质量精度在2mDa之内。

RUO-MKT-10-14711-ZH-A



图3. 大鼠肝细胞中主要的维拉帕米代谢物（t=30min）。软件自动对15个主要代谢物的推定结构进行了归属。

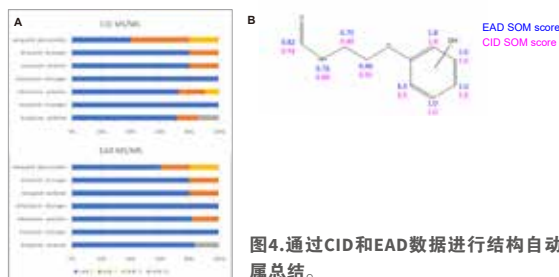


图4.通过CID和EAD数据进行结构自动归属总结。

A，研究了表 1 中列出的代谢物。其中丁螺环酮的一种氧化代谢物由于核心结构重排没有自动生成其结构。研究的代谢物中80%具有正确的结构归属。B，奈法唑酮代谢物上羟基位置的结构归属分数归一化（SOM）。EAD二级谱图与CID相比具有更多的碎片信息，对于修饰位点的确认更具优势。

结论

- ZenoTOF® 7600系统在快速 LC 梯度方法下使用两种不同的碎裂机制可产生准确且全面的 HR MS/MS 数据。
- 在保持质量准确度的同时提高了 MS/MS 的灵敏度，为化合物表征提供了全面的碎片集。
- 正交CID 和EAD MS/MS 数据可以提高代谢物结构分配的可信度和结果。



- 研究级 Molecule Profiler SW 提供了简化的 CID 和 EAD 数据处理和交互，允许快速浏览定性结果。

参考文献

1. Dindyal-Popescu, A., Shek, I., Jooyhandeh, M., Moore, I., Duchoslav, E., ASMS 2017 conference proceedings, WP 106
2. Bruderer, T., Varesio, E., Hidasi, A., Duchoslav, E., Burton, L., Bonner, R., Hopfgartner, G. (2018). Analytical and Bioanalytical Chemistry. 410. 10.1007/s00216-018-0860-x.
3. Narayanaswami, P., Duchoslav E., ASMS conference 2022, TP 386
4. Molecule Profiler Software Brochure (sciex.com)

RUO-MKT-10-14711-ZH-A

Confident identification of phase 1 metabolites using electron-activated dissociation (EAD)

This technical note describes the identification of pioglitazone phase 1 metabolites from a hepatocyte incubation using comprehensive spectral data from an orthogonal fragmentation technique. More informative MS/MS spectra provided by EAD aided in the software-based identification of phase 1 metabolites to support drug metabolism studies.

Drug metabolism plays a vital role in drug discovery

● Spectrum from UPLC: Pioglitazone EAD 150min, 100°C (pow., 1000) from 3.023 min Precursor: 287.1 Da, +1, CE: 12, C

● Spectrum from MetS: Pioglitazone CID 150min, 100°C (pow., 1000) from 3.023 min Precursor: 287.1 Da, +1, CE: 15, C

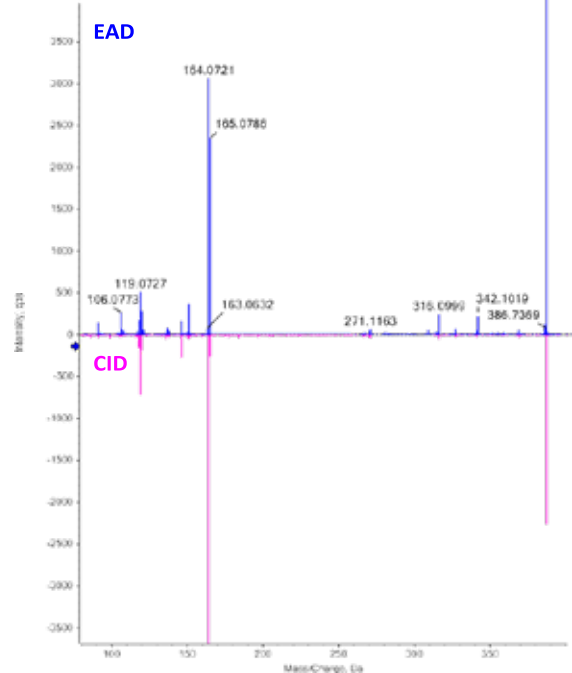


Figure 1. EAD provided rich MS/MS spectra for confident identification of pioglitazone phase 1 metabolites. EAD (top) and CID (bottom) spectra for a metabolite showing aliphatic hydroxylation and alcoholic oxidation at a retention time of 3.77 minutes.

and development, affecting pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety. Studies of in vitro metabolism of drugs in human and animal tissues help identify major metabolism pathways ("soft spots").¹

The Mass-MetaSite software employs several algorithms to detect the peaks corresponding to metabolites in the mass spectra obtained from incubated samples. This process includes background subtraction, noise suppression, isotope pattern analysis, retention time analysis and mass shift analysis based on cyp, non-cyp and other uncommon reactions. A potential metabolite is scored based on the number of matches between its fragments and the parent compound. Site of metabolism (SoM) predictions generated by the Mass-MetaSite software can be used to distinguish between potential regioisometric metabolites that have the same fragmentation patterns and mass shifts. This technical note demonstrates an efficient soft-spot identification workflow using a novel orthogonal fragmentation technique, EAD, on the ZenoTOF 7600 system (Figure 1). Sites of metabolism were predicted using the Mass-MetaSite software.

Key features for the identification of metabolites using the ZenoTOF 7600 system

- **Confident identification:** Acquire more fragments to confidently identify the site of metabolism for phase 1 metabolites with EAD. EAD spectra were more informative than collision-induced dissociation (CID) spectra for metabolite identification.
- **Fast characterization and identification:** Achieve rapid and efficient software-aided characterization and identification of drug metabolites from hepatocyte



incubations using the ZenoTOF 7600 system

- **Detection of low-level metabolites:** Identify low-level metabolites present in drug metabolism studies with enhanced MS/MS sensitivity provided by the Zeno trap
- **Streamlined data acquisition and processing workflow:** Develop confident structure-metabolic stability relationships for drugs using a quick, easy-to-use workflow from acquisition to analysis

Methods

Sample preparation: Pioglitazone was incubated at 37 °C in human hepatocytes at a starting concentration of 5µM. Samples were removed from incubation and quenched with acetonitrile at 0-, 30-, 60-, 90- and 120-minute intervals.

Chromatography: Separation was performed on a Phenomenex Kinetex Polar C18 column (2.1 x 100 mm, 2.6 µm, 100 Å) at a column temperature of 40°C. Mobile phase A was 0.1% (v/v) formic acid in water and mobile phase B was 0.1% (v/v) formic acid in methanol. An injection of 5 µL was subjected for analysis.

The chromatographic gradient conditions used are summarized in Table 1.

Table 1. Chromatographic gradient.

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0.0	95	5
1.0	95	5
7.0	5	95
9.0	5	95
9.1	95	5
10	95	5

Mass spectrometry: The samples were analyzed using the data-dependent acquisition (DDA) method with Zeno CID DDA and Zeno EAD DDA on the ZenoTOF 7600 system. The source and gas conditions used are summarized in Table 2.

The method conditions are summarized in Table 3.

Table 2. Source and gas conditions.

Parameter	Setting
Curtain gas	40 psi
Ion source gas 1	55 psi
Ion source gas 2	65 psi
CAD gas	7
Ion spray voltage	5500 V
Source temperature	500 °C

Table 3. Zeno DDA parameters.

Parameter	Setting
Method duration	10 min
TOF MS start-stop mass	100–1000 Da
Maximum candidate ions	5
Accumulation time (TOF MS)	0.1 s
TOF MS/MS start-stop mass	50–1000 Da
Accumulation time (TOF MS/MS)	0.1 s
Collision energy (CID)	40 V
Collision energy spread (CID)	15 V
Electron kinetic energy (EAD)	12 eV
Electron beam current (EAD)	6000 nA

Data processing: SCIEX OS software, version 3.0 was used for data acquisition. The Mass-MetaSite software was used to predict biotransformation sites using Zeno CID DDA and Zeno EAD DDA data.⁴⁻⁹





EAD provides positional information to identify the site of metabolism

In the 120-minute incubation sample, 3 peaks at retention times of 3.53, 3.77 and 4.13 minutes were identified as hydroxy pioglitazone.

The Mass-MetaSite software identified the peaks as hydroxy pioglitazone using both Zeno CID DDA and Zeno EAD DDA

data. The Zeno EAD data for the hydroxy pioglitazone peak at 3.53 minutes yielded 10 product ion matches. Therefore, the software labeled this peak hydroxy pioglitazone (M-VII). In comparison, for the Zeno CID data, the software predicted 2 possibilities for hydroxylation, which included hydroxy pioglitazone (M-II) and hydroxy pioglitazone (M-IV). These 2 structures were predicted with equal likelihoods and 7 product ion matches each (Figure 2).

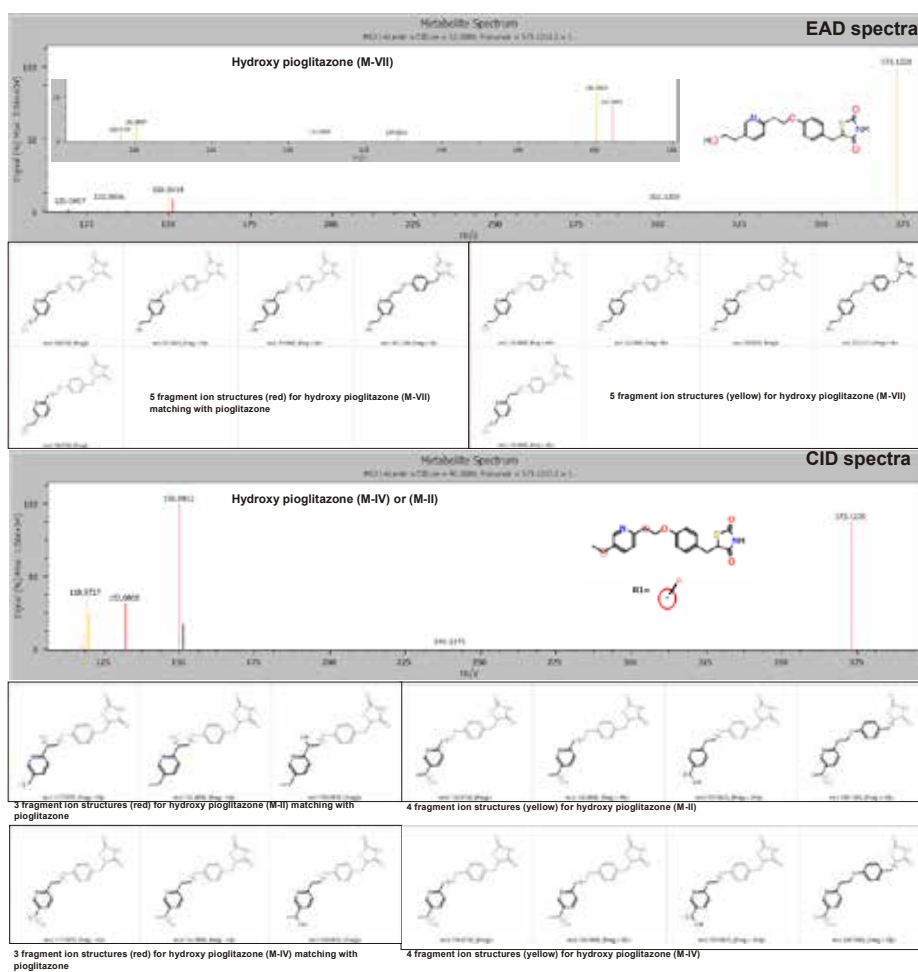


Figure 2. EAD and CID spectra for the hydroxy pioglitazone metabolite at retention time 3.53 minutes with fragment ion matches for structures predicted by Mass-MetaSite software. Product ion matches with pioglitazone are displayed in red and metabolite-specific matches are indicated in yellow.



The hydroxy pioglitazone peak at retention time 3.77 minutes was scored highest for hydroxy pioglitazone (M-IV) based on 6 product ion matches. The hydroxy pioglitazone (M-II) was ranked second with 6 fragment matches from

CID data. EAD data resulted in 6 possible structures for the hydroxyl metabolite. The hydroxy pioglitazone (M-IV) was ranked first with the highest score and 7 product ion matches (Figure 3).

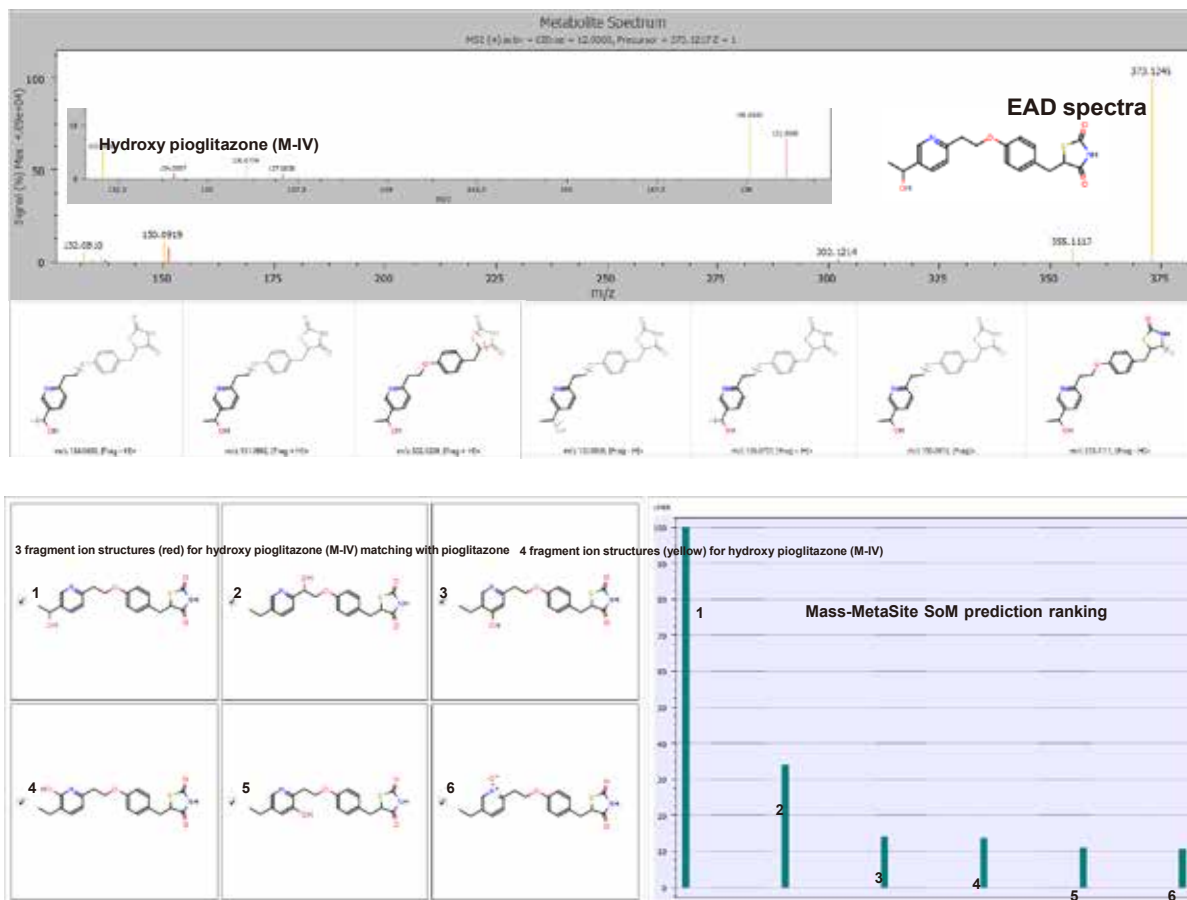


Figure 3. EAD spectra for the hydroxy pioglitazone metabolite at retention time 3.77 minutes with fragment ion matches for structures predicted by Mass-MetaSite software and SoM prioritization ranking. Product ion matches with pioglitazone are displayed in red and metabolite-specific matches are indicated in yellow. The SoM prioritization ranking indicated the highest probability match for hydroxy pioglitazone (M-IV).



The hydroxy pioglitazone peak at retention time 4.13 minutes was labeled as a possible amide hydrolysis and dehydrogenation based on 6 product ion matches or hydroxy pioglitazone (M-II) with low probability based on 5 product ion matches from the CID data. The EAD data

indicated a higher likelihood that the peak corresponded to hydroxy pioglitazone (M-II) based on 8 product ion matches (Figure 4).

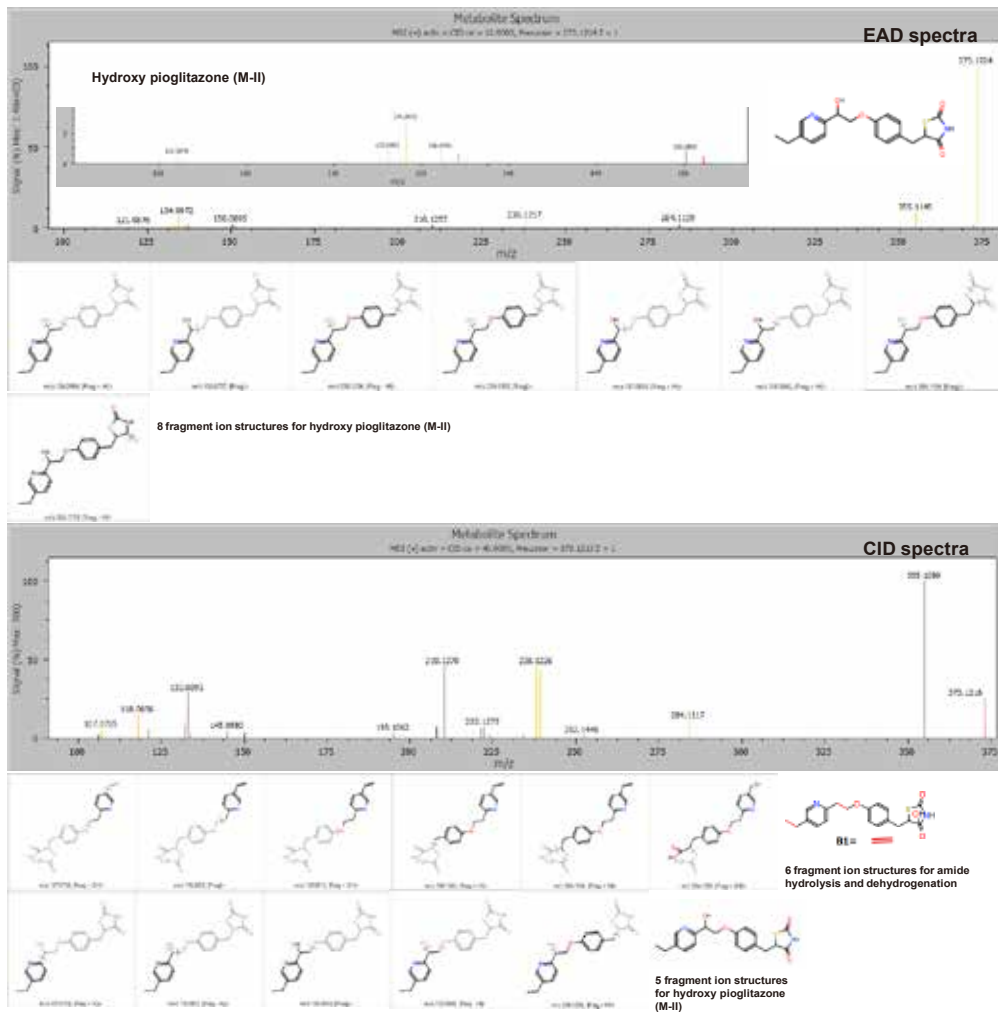


Figure 4. EAD and CID spectra for the hydroxy pioglitazone metabolite at retention time 4.13 minutes with fragment ion matches for structures predicted by Mass-MetaSite software. Product ion matches with pioglitazone are displayed in red and metabolite-specific matches are indicated in yellow.



A metabolite with aliphatic hydroxylation and alcoholic oxidation was labeled at retention time 3.78 minutes using both EAD and CID spectra. The rich MS/MS spectra collected

by EAD enabled a more confident structure assignment. The EAD data yielded 8 fragment matches, whereas the CID data yielded only 3 fragment matches (Figure 5).³⁻⁹

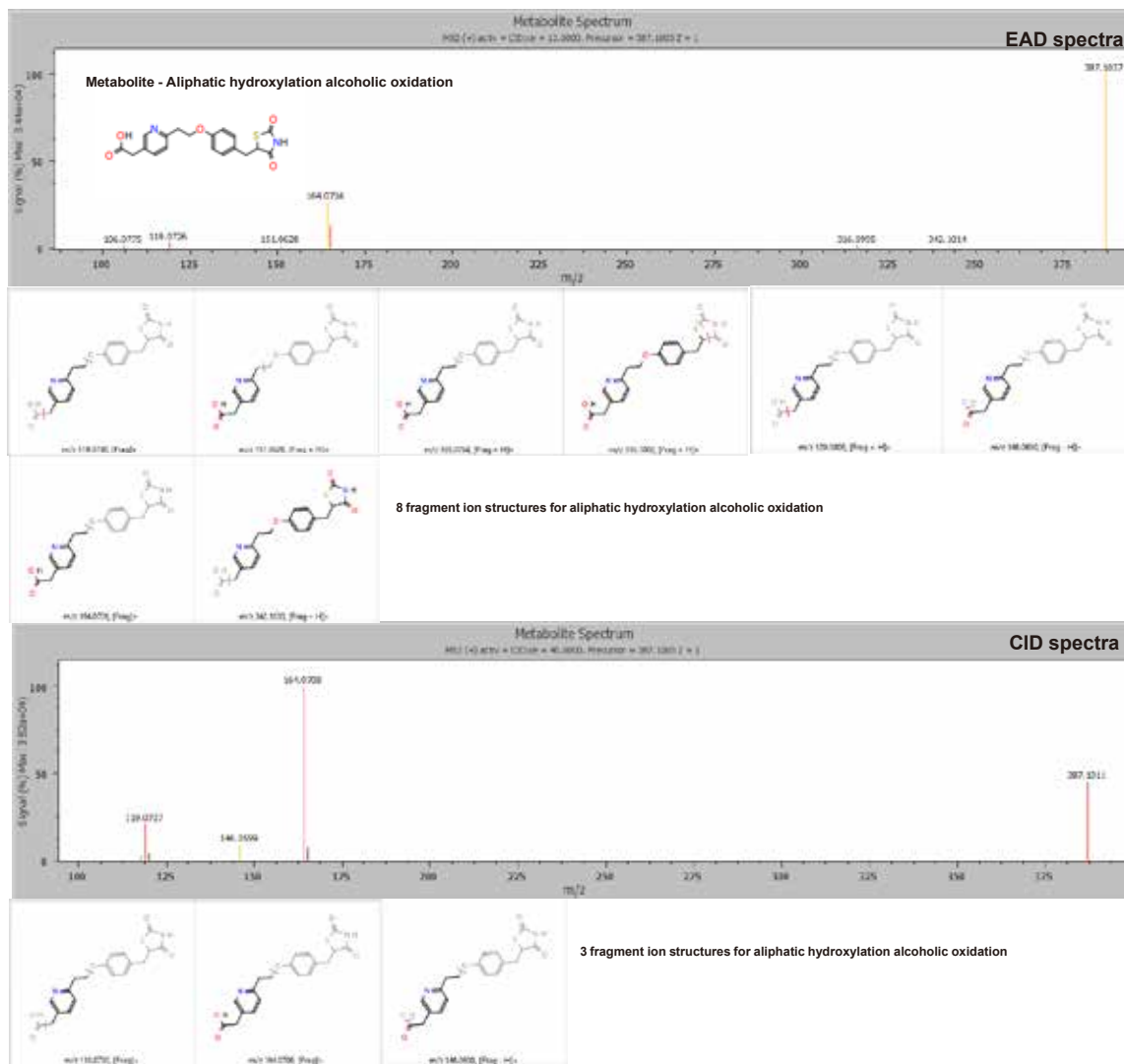


Figure 5. EAD and CID spectra for a metabolite showing aliphatic hydroxylation and alcoholic oxidation with fragment ion matches for structures predicted by Mass-MetaSite software. Product ion matches with pioglitazone are displayed in red and metabolite-specific matches are indicated in yellow.



All 3 pioglitazone hydroxy metabolites (M-VII, M-IV and M-II) were confirmed by matching their respective retention time with standard solution injections. The ZenoTOF 7600 system demonstrated excellent mass accuracy for the workflow. All metabolites and fragments were identified with <2 ppm error, which enabled the confident identification of phase 1 metabolites present in an in vitro metabolism study of pioglitazone. Furthermore, the identification of phase 1 metabolites was easily and confidently performed with the MS/MS coverage provided by Zeno EAD on the ZenoTOF 7600 system.

Conclusions

- More information-rich product ion spectra provided by EAD aided in the rapid software-aided characterization and identification of phase 1 metabolites from hepatocyte incubations of pioglitazone on the ZenoTOF 7600 system
- The presented workflow can be easily adapted for in vivo metabolism studies for the detection of low-level metabolites with the enhanced sensitivity provided by the Zeno trap
- A streamlined data acquisition and processing workflow was utilized to expedite data reduction and develop confident structure-metabolic stability relationships for pharmaceutical drugs

References

1. Zhang, Z.; Tang, W. (2018). Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharm Sin B*. 8(5): 721-732. Orthogonal fragmentation mechanism enables new levels of metabolite characterization, SCIEX technical note, RUO-MKT- 02-13348-A.
2. Boon, B. et al. (2010). Enhanced metabolite identification with MS(E) and a semi-automated software for structural elucidation. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 24(21): 3127-38.
3. Zamora, I. et al. (2013). High-throughput, computer-assisted, specific MetID. A revolution for drug discovery. *Drug Discovery Today Technol*. 10(1): e199-205.
4. Strano-Rossi, S. et al (2014). Metabolism of JWH-015, JWH-098, JWH-251, and JWH-307 in silico and in vitro: a pilot study for the detection of unknown synthetic cannabinoids metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406(15): 3621-3636.
5. Zelesky, V. (2013). Software automation tools for increased throughput metabolic soft-spot identification in early drug discovery. *Bioanalysis*, 5(10): 1165-1179.
6. Li, A.C. (2013). Update on hydrocodone metabolites in rats and dogs aided with a semi-automatic software for metabolite identification *Mass-MetaSite*. *Xenobiotica*, 43(4): 390-398.
7. Brink, A. et al. (2014). Post-acquisition analysis of untargeted accurate mass quadrupole time-of-flight MS(E) data for multiple collision-induced neutral losses and fragment ions of glutathione conjugates. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 28(24): 2695-703.
8. Ge, S; Tu, Y; Hu, M. Challenges and opportunities with predicting in vivo phase II metabolism via glucuronidation from in vitro data (2016). *Curr Pharmacol Rep*. 2(6): 326-338



利用SCIEX ZenoTOF® 7600系统的EAD技术区分龟甲胶特征肽段中的亮氨酸和异亮氨酸

Using The EAD Technology of SCIEX ZenoTOF® 7600 system to Identify leucine and Isoleucine in TESTUDINIS CARAPACIS ET PLASTRI COLLA

史晓媛, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Xiaoyuan Shi, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX 应用支持中心, 中国

Key Words: ZenoTOF® 7600, EAD, Zeno™ Trap, TESTUDINIS CARAPACIS ET PLASTRI COLLA

依赖采集+动态背景扣除+ Zeno™ 阱开启 (IDA+DBS+Zeno™ Trap on) 数据采集模式, 使用SCIEX OS软件对龟甲胶特征肽进行序列测定。

引言

龟甲胶是龟科动物乌龟的背甲及腹甲经水煎煮、浓缩制成的固体胶, 历版《中国药典》均有收载, 是中国名贵中药, 其味甘、咸, 性平, 归肝、肾经, 可滋阴, 补血, 主治阴虚潮热、骨蒸盗汗、腰膝酸软、血虚萎黄等症。龟甲胶的氨基酸序列中含有大量Isoleucine (异亮氨酸) 和 Leucine (亮氨酸), 但因为其具有天然异构性, 传统的CID (Collision-induced dissociation, 碰撞诱导裂解) 无法区分亮氨酸和异亮氨酸。然而, EAD (Electron Activated Dissociation, 电子活化解离) 技术可以从产生的额外碎片离子中识别这些异构体, 对于亮氨酸/异亮氨酸, 由主链z离子进一步碎裂引起的二级离子碎片可用于鉴定。对于亮氨酸, z离子从侧链丢失43 Da, 而异亮氨酸从z离子侧链丢失29 Da。本实验利用ZenoTOF® 7600系统的EAD (Electron activated dissociation, 电子活化解离) 技术, 获得更多的二级碎片, 从而得到更准确的鉴定结果, 同时采用数据

ZenoTOF® 7600 系统用于特征肽序列测定的主要特点

1. ZenoTOF® 7600 系统的EAD (Electron activated dissociation, 电子活化解离) 裂解技术可以获得更多的二级碎片, 提高定性分析结果准确性、使得氨基酸序列的鉴定结果更加准确。
2. 在Zeno IDA模式下, Zeno™ Trap可以提高离子占空比, 富集MS/MS碎片离子, 显著提高二级灵敏度和二级谱图质量。
3. SCIEX OS软件中的Bio Tool Kit可以快速、准确地进行氨基酸序列的解析。

RUO-MKT-02-15623

实验设备



SCIEX ExionLC™系统+ ZenoTOF® 7600系统

1. 仪器设备

液相方法

色谱柱: T3 (100 × 2.1mm, 1.7 μm)

流动相: A: 水 (含0.1%甲酸);

B: 乙腈 (含0.1%甲酸)

流速: 0.3 mL/min;

梯度洗脱

时间(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
25.0	80	20
40.0	50	50
42.0	10	90
45.0	10	90
45.1	95	5
50.0	95	5

进样体积: 5 μL

质谱方法

参数	数值	参数	数值
气帘气	35psi	源温度	550°C
雾化气	55psi	辅助气	55 psi
碰撞诱导解离气	8	离子喷雾电压	550 V
一级质荷比范围	100-1000	二级质荷比范围	50-1000
一级扫描时间	0.2 s	二级扫描时间	40 ms/ 45 ms (CID/EAD)
动态背景扣除	开	Zeno阱	开
去簇电压	80 V	碎裂能量	EAD模式: KE 5eV

实验结果

1.1 CID模式下特征肽解析

在特征肽的氨基酸序列中, 可能含有亮氨酸或者异亮氨酸, 在CID模式下, 这两个氨基酸的碎片结构一样, 无法准确进行鉴定。

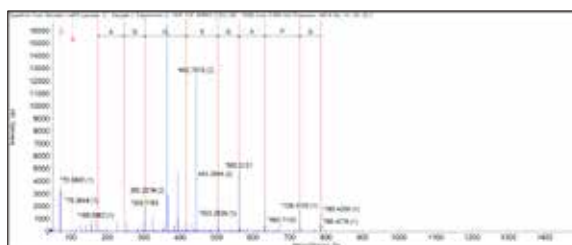


图1. CID MS/MS谱图, I/L的碎片离子一样

1.2 EAD模式下特征肽解析

EAD碎裂模式下, 同时产生z离子-29的特征离子, 从而判断序列中含有的是异亮氨酸, 最终确证特征肽氨基酸序列为VGPAGSIGAR。

RUO-MKT-02-15623

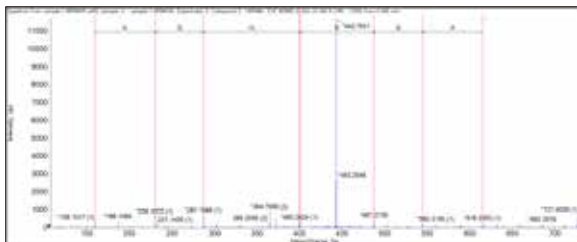


图2. EAD MS/MS 谱图，EAD 碎裂能获得更多肽段的二级离子信息，可协助确定I/L

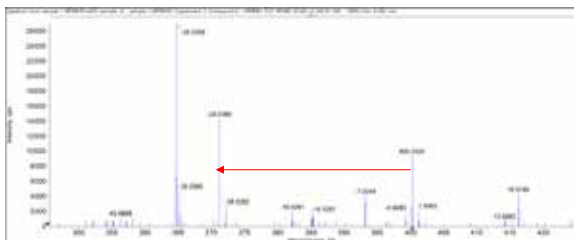


图3. EAD MS/MS 谱图，产生z离子-29的特征离子，确定是异亮氨酸

总结

本文使用SCIEX ZenoTOF® 7600系统完成对龟甲胶特征肽的氨基酸序列鉴定方法。Zeno™ Trap技术显著提升了二级质量，提高定性结果的准确性。EAD碎裂技术产生区别于CID碎裂方式的二级碎片信息，可以获得更多的二级碎片，使得氨基酸序列的鉴定结果更加准确。Bio Tool Kit可以快速、准确地进行氨基酸序列的解析。

RUO-MKT-02-15623



采用SCIEX高分辨质谱进行动物源中药斑蝥成分研究

Study on the components of Traditional Chinese medicine

Cantharides by SCIEX High Resolution Mass Spectrometry

谢亚平, 司丹丹, 龙志敏

Yaping Xie, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX 应用支持中心, 中国

关键词: SCIEX High Resolution Mass Spectrometry system, Traditional Chinese medicine, cantharides, component identification

引言

斑蝥, 中药名。为芫青科昆虫南方大斑蝥 *Mylabris phalerata* Pallas 或黄黑小斑蝥 *Mylabris cichorii* Linnaeus 的干燥体。具有破血逐瘀, 散结消癥, 攻毒蚀疮的功效。主要用于症瘕, 经闭, 顽癣, 瘰疬, 赘疣, 痈疽不溃, 恶疮死肌。斑蝥中斑蝥素是存在于斑蝥体内的一种天然防御性、剧毒化合物, 可用作除草、抑菌和杀虫等。近年来, 对斑蝥素及其衍生物抗肿瘤活性研究成为热点, 活性实验显示该类衍生物具有较强的抗癌效果, 临床主要用于治疗肿瘤, 对贲门癌、食道癌、胃癌等多种消化道肿瘤有治疗作用, 目前在原发性肝癌的治疗中较为普遍。

本文采用SCIEX高分辨质谱系统独有的IDA+DBS采集模式, 结合超快的扫描速度(最高 100HZ)保证采集到动物源性中药斑蝥中更多的MS和MS/MS质谱信息, 保证数据采集的全面性和有效性。采用SCIEX靶向和非靶向鉴定流程快速完成斑蝥中成分鉴定, 为斑蝥中有效成分尤其斑蝥素及衍生物研究提供参考。

技术特点

1. SCIEX高分辨质谱系统超快的扫描速度(最高133HZ或100HZ)保证采集到斑蝥中更多的MS和MS/MS质谱信息, 保证数据采集的全面性
2. SCIEX高分辨质谱系统独有的IDA+DBS采集模式, 保证采集到更高质量的MS/MS质谱信息, 保证数据采集的有效性
3. 采用SCIEX靶向和非靶向鉴定流程快速完成斑蝥中成分鉴定

仪器设备

SCIEX ExionLC™ AD系统和SCIEX 高分辨质谱系统



图1. ExionLC™ AD系统和SCIEX 高分辨质谱系统

RUO-MKT-02-15491-ZH-A



液相条件

液相系统: SCIEX ExionLC™ AD系统
色谱柱: Phenomenex Luna Omega Polar C18
(100 × 2.1 mm, 1.6 μm)
流动相: A: 水(含0.05%甲酸) B: 甲醇:乙腈 =1:1
流速: 0.3 mL/min
柱温: 40 °C
液相梯度:

时间(min)	A(%)	B(%)
1	80	20
13	50	50
16	25	75
17	10	90
18	10	90
18.1	90	10
21	90	10

质谱条件

扫描模式: ESI+/- TOF MS-IDA-15TOF MS/MS
扫描范围: 一级m/z 50-1000 二级m/z 50-1000
CDS自动校正
动态背景扣除 (DBS) 开启
离子源参数:
喷雾电压: 5500V/-4500 V 气帘气 CUR: 30 psi
雾化气 GS1: 50 psi 雾化气 GS2: 50 psi
源温度: 550 °C DP电压: ± 60 V
碰撞能量: ± 40 ± 20

RUO-MKT-02-15491-ZH-A

实验流程

本方案采用SCIEX高分辨系统进行数据采集, 一次数据采集同时获得成分一级和二级离子信息。数据采用SCIEX OS软件进行处理, 结合中药MS/MS高分辨质谱数据库 (TCM MS/MS Library) 和在线ChemSpider数据库大大提高数据处理效率, 如图2所示。

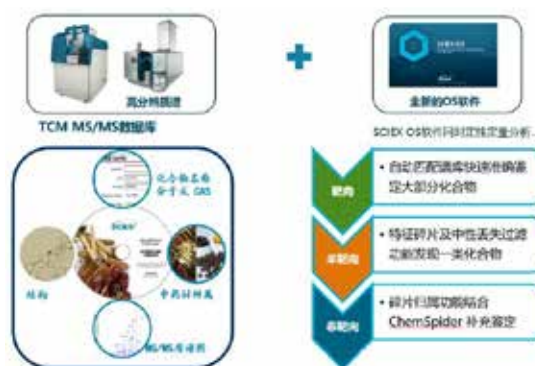


图2. 实验流程

实验结果

1. 斑蝥成分靶向鉴定结果

SCIEX中药MS/MS高分辨质谱数据库基于《中国药典》一部中的中药品种的有效成分为基础, 包含有皂苷类、黄酮类、黄酮苷类、三萜类、苯乙醇苷、有机酸等1300多种化合物。在SCIEX OS软件中导入中药MS/MS高分辨质谱数据库中化合物列表进行峰提取和数据库匹配, 根据化合物的质量准确度、同位素分布和MS/MS的匹配度, 综合评判得分。图1以斑蝥素 (Cantharidin) 为例, 展示了数据库鉴定和确证流程, 快速、准确, 如图3所示。

靶向鉴定结果列表中, 软件自动给出质量偏差、同位素匹配、谱库匹配度等信息 (黄框标记), 筛选原则为交通信号灯原则 (绿√通过), 快速准确, 为得到准确鉴定结果提供多重保障。



2. 斑蝥成分非靶向鉴定结果

对于中药MS/MS高分辨质谱本地数据库中不存在的成分，无法通过本地谱库匹配完成鉴定，完全未知成分的鉴定通过SCIEX OS软件内置的峰提取和Formula Finder功能进行分子式预测，并结合在线ChemSpider数据库检索其可能结构，从而完成结构鉴定。以Soyasaponin I为例展示鉴定流程，图4所示。

SCIEX OS软件自动提取保留时间RT=17.155min未知物色谱峰并进行分子式预测，预测结果为C₄₈H₇₈O₁₈，将该化合物MS/MS图谱自动链接至ChemSpider网络数据库进行结构式预测，最终预测可能性最大的化合物为大豆苷I (Soyasaponin I)，结构式如图所示，匹配度达92.3%。

3. 鉴定结果

采用靶向结合非靶向鉴定流程，对斑蝥进行成分分析，共鉴定出234个化合物，包括斑蝥素类似物，黄酮类，内源性成分以及少量皂苷，部分鉴定如表1所示。典型提取离子流色谱图见图5。所有化合物的质量偏差均在5 ppm以内，MS/MS结果均经过与本地库或理论碎片匹配，鉴定结果可靠。

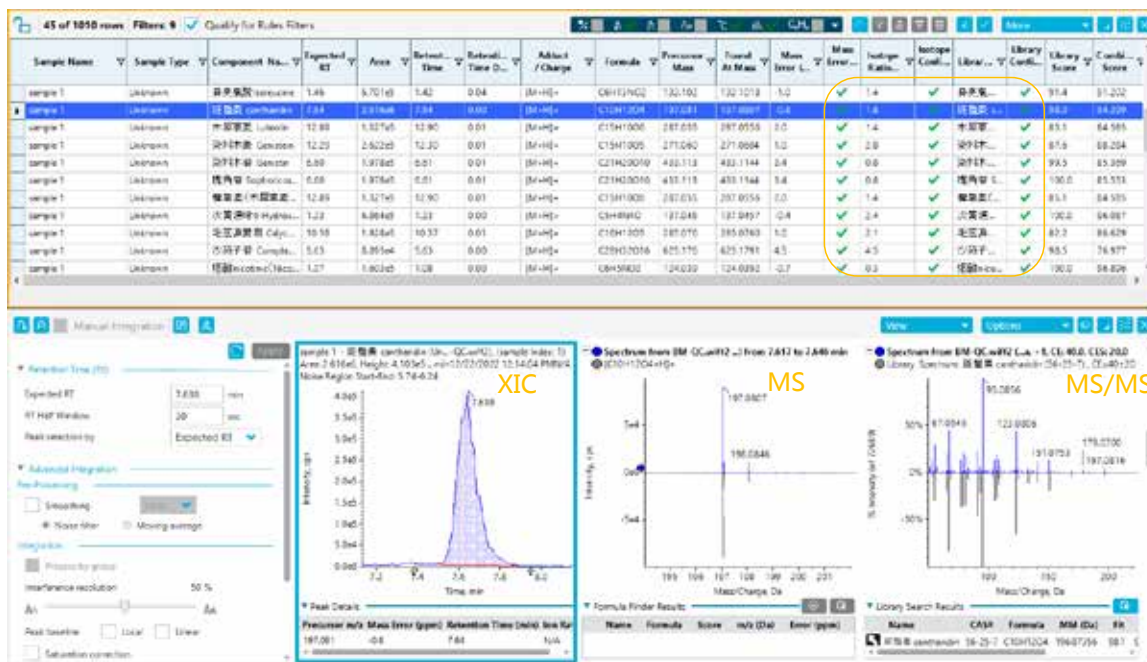


图3. 斑蝥素靶向鉴定结果

RUO-MKT-02-15491-ZH-A



图4. Soyasaponin I非靶向鉴定结果

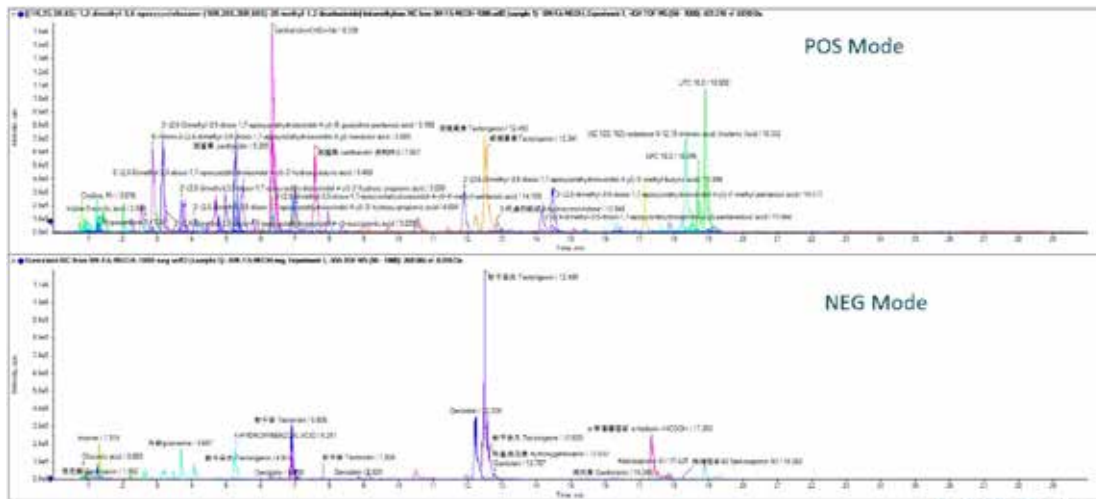


图5. 斑蝥样品正负模式下 (POS Mode 和NEG Mode) 提取离子流色谱图

RUO-MKT-02-15491-ZH-A

表1. 部分鉴定结果列表

NO	Component Name	Area	Retention Time	Adduct / Charge	Formula	m/z	Mass Error
黄酮类							
1	methylluteolin-5-O-GLU	2.00E+06	6.94	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.1238	0.8
2	Trihydroxyflavone	9.04E+05	12.24	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0602	0.3
3	木犀草素 Luteolin	7.52E+05	12.85	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0553	0.8
4	染料木素 Genistein	9.04E+05	12.24	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0602	0.3
5	毛蕊异黄酮 Calycosin	6.51E+05	10.52	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.0762	1.7
6	红车轴草素-7-O-D-葡萄糖苷 Pratensein-7-O-glucoside	2.00E+06	6.94	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.1238	0.8
7	芫花素 Genkwanin	3.27E+05	10.5	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0608	-1.2
8	野黄芩素 Scutellarein	7.52E+05	12.85	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0553	0.8
9	金合欢素 Acacetin	3.27E+05	10.5	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0608	-1.2
10	高良姜素 Galangin	9.04E+05	12.24	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0602	0.3
11	鸢尾黄素 Tectorigenin	5.32E+06	12.51	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.0708	0.5
12	黄豆黄素 Glycetein	3.27E+05	10.5	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0608	-1.2
斑蝥素及类似物							
13	斑蝥素 cantharidin	3.62E+06	7.58	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	197.0807	-0.7
14	斑蝥素 cantharidin 异构1体3	6.01E+06	6.34	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	197.0807	-0.6
15	斑蝥素 cantharidin 异构2体1	3.40E+05	4.83	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	197.0808	0.1
16	斑蝥素 cantharidin 异构3体2	3.88E+06	5.26	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	197.0807	-0.8
17	cantharidin+CH ₂ (+14)	1.06E+07	6.34	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	211.0964	-0.4
18	cantharidin+CH ₂ O(+14+18)	4.55E+06	6.33	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	229.1073	1.3
19	cantharidin+H ₂ O(+18)	1.10E+05	4.81	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	215.0918	1.6
20	cantharidin+H ₂ O(+18)1	1.40E+06	5.27	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	215.0916	0.9
21	cantharidin-CH ₂ (-14)	1.49E+05	3.62	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₀ O ₄	183.0652	0.3
22	Cantharimide	1.83E+05	4.48	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	196.0968	-0.1
23	Cantharimide 异构体1	3.19E+04	1.27	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	196.0973	2.4
24	Cantharimide 异构体2	5.37E+04	2.78	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	196.0969	0.5
皂苷类及蒽类							
25	大豆皂苷 I Soyasaponin I	1.40E+06	17.14	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	943.5288	2.9
26	早莲苷 A Ecliptasaponin A	1.01E+05	17.9	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	633.3996	-1.9
27	柴胡皂苷 B2 Saikosaponin B2	1.29E+05	17.68	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	779.4573	-1.9
28	竹节参皂苷 IV a Chikusetsusaponin Iva	4.92E+04	17.89	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	793.4369	-1.3
29	竹节香附素 A Raddeanin A	1.43E+05	17.8	[M-H] ⁻	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	895.5044	-1.9
30	常春藤皂苷元 Hederagenin	1.47E+04	18.64	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.3476	-0.8
31	Kaikasaponin III	2.67E+05	17.42	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	925.5138	-3.1
其他							
32	琥珀酸 Succinic acid	9.48E+04	1.4	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₄	117.0194	0.8
33	精氨酸 L(+)-Arginine	5.89E+04	0.79	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	173.1044	-0.3
34	维生素 B2 Vitamin B2	2.84E+05	4.25	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	377.1465	2.5
35	缬氨酸 L-Valine	5.26E+05	0.89	[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.0861	-0.9
36	胞苷 Cytidine	3.81E+04	0.89	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	244.0932	1.6
37	腺嘌呤 Adenine	6.51E+04	0.9	[M-H] ⁻	C ₅ H ₅ N ₅	134.0469	-2.1
38	腺苷 Adenosine [Smart Confirmation]	5.76E+04	1.32	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.1043	1
39	色氨酸 L-Tryptophan	2.32E+05	2.67	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.0823	-1.4
40	谷氨酸 Glutamic acid	1.81E+05	0.85	[M-H] ⁻	C ₅ H ₉ NO ₄	146.0457	-1.1

RUO-MKT-02-15491-ZH-A



总结

本实验展现了SCIEX高分辨质谱系统在动物源性中药成分鉴定领域的优势，一次进样获得大量高分辨的TOF MS和TOF MS/MS数据，结合SCIEX OS软件靶向非靶向鉴定流程，利用SCIEX中药及网络数据库全面鉴定到斑蝥中主要成分。SCIEX高分辨液质联用系统能够为中药成分鉴定研究提供高质量数据，可提供高效、快捷、一体化的中药鉴定解决方案。

RUO-MKT-02-15491-ZH-A

SCIEX Now™支持网络

一站式满足您所有的支持需求

产品和数据安全

合规性服务提升您的信心，帮助您保护数据安全，确保数据完整性，以及数据管理系统的溯源性。

新手上路

我们将帮助您在SCIEX Now 学习中心在线注册，邀请您在SCIEX Now 学习中心注册学习，并向您发送欢迎电子邮件。

实验室增强服务
SCIEX实验室增强服务计划，为您的实验室提供整体服务解决方案，以提高工作效率并减少系统停机时间。



SCIEX Now 学习中心
优质的内容，个性化的学习方式 - 使用全新的科学记忆方式设计的课程。

自我学习资源

我们的知识库和社区，将帮助您提升科学知识水平，并从SCIEX专家或者同行那里找到您所需要的答案。

全工作流程技术支持

只要您在实验过程中，遇到困难挑战，SCIEX 支持团队都会帮助您高效地解决问题，实现科学目标。

立即开始成功之路： sciex.com.cn/support

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

Echo 和 Echo MS是属于美国或在其他国家地区的Labcyte, Inc.的商标或注册商标，该商标经许可可使用。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-29782-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
上海公司及中国区应用支持中心
广州办公室
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

北京市朝阳区酒仙桥中路24号院1号楼5层
上海市长宁区福泉北路518号1座502室
广州国际生物岛星岛环北路1号B2栋501、502单元

电话：010-5808-1388
电话：021-2419-7201
电话：020-8842-4017
官网：sciex.com.cn

传真：010-5808-1390
传真：021-2419-7333
官方微信：SCIEX-China