

LCMS-9030 液相串联四极杆飞行时间质谱仪定性分析抗精神病药物及其代谢物

LCMS-QTOF-012

摘要： 本文利用岛津公司 LCMS-9030 超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用仪对常见的抗精神病药物及其代谢物进行鉴定。采用蛋白沉淀的前处理方式，结合高分辨质谱特性可以快速定性分析药物及其代谢物，结果显示：在 14 个临床血清样本中定性分析出 23 种抗精神病药物及其代谢物，其中定性出的 10 种原药与给药情况基本吻合，所有化合物的质量数偏差均小于 2 ppm，其定性出的药物与代谢物在做多样本测试中能重现。岛津 QTOF 质量数偏差小、软件多元化，可以进行快速、准确的定性分析。

关键词： LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱 血清 精神病药物

非典型抗精神病药物 (又称第二代抗精神病药, atypical antipsychotics, AAs), 包括氯氮平、奥氮平、利培酮、喹硫平、阿立哌唑、齐拉西酮等药物, 与传统抗精神病药物相比, 具有作用谱广、疗效好、安全性好等优点, 能提高患者的生活质量。非典型抗精神病药物的代谢主要经细胞色素 P450 酶 (CYP) 系统代谢, 影响药物代谢酶活性的各种因素均可能导致非典型抗精神病

药物代谢的改变, 从而升高或降低血药浓度, 使药理作用和毒性作用发生改变; 尤其目前为达到最佳治疗效果常使用联合用药, 药物的相互作用也会影响代谢情况, 因此监控其代谢物为临床用药提供参考。

本文利用岛津公司 LCMS-9030 超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用仪定性分析常见的抗精神病药物及其代谢物, 供临床研究人员参考。

实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪, 具体配置: LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A_{5R} 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪, LabSolutions V5.96 工作站软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Shim-pack GIST, 2.1 mm I.D.
×100 mm L., 2.0 μm

流动相: A: 0.1% 甲酸水溶液; B: 乙腈

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 5 μL

柱温: 40°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1。

表1 时间程序

时间(min)	单元	命令	值
1.00	泵	B.Conc	10
6.00	泵	B.Conc	95
7.00	泵	B.Conc	95
7.10	泵	B.Conc	10
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: +4.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

加热气: 空气 10 L/min

碰撞气: 氦气

脱溶剂管温度: 150°C

加热模块温度: 500°C

接口温度: 300°C

扫描模式: MS Scan (m/z 100 -800)

&DDA (m/z 50 -800)

1.3 样品前处理

准确量取 300 μ L 血清样品置于 EP 管中, 再加入 900 μ L 乙腈, 振荡 1 min, 以 10000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液至 1.5 mL 样品瓶, 待测。

样本: 收集了 14 个给药的病人血清样本, 2 个空白人血清样本

结果与讨论

2.1 以 4 号样本为例进行定性分析

4 号样本给了 3 种药: 利培酮、9-羟基利培酮、氟伏沙明。参考给药信息, 结合代谢物库, 使用 Labsolutions Insight Explore 软件和分子式预测软件, 对照空白血清样本 MS¹, 从 4 号样本的 MS¹TIC 图中初步筛选出添加的药物及其可能的代谢物, 给出 m/z 和分子式。再对其 MS² 质谱图进行进一步的定性分析。

2.1.1 4 号样本的色谱图

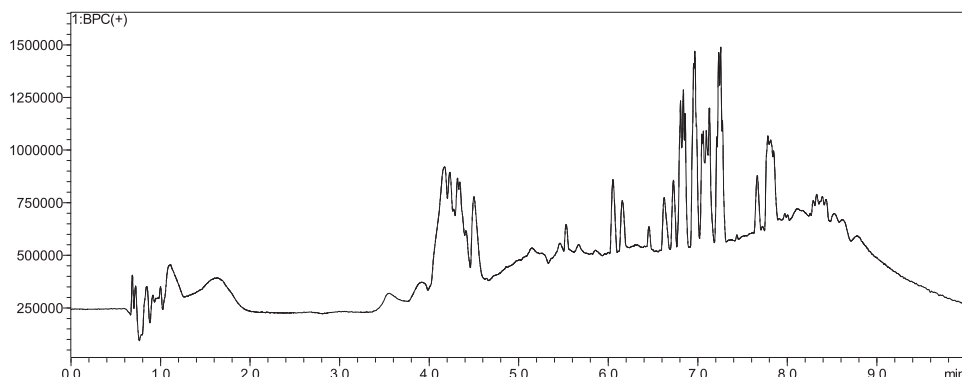


图1 4号样本的BPC图 (基峰图)

2.1.2 根据 MS¹ 筛查出可能的化合物

表2 4号样本初步筛选出的结果

编号	化合物	保留时间	实测m/z [M+H] ⁺	理论m/z [M+H] ⁺	相对误差 (ppm)	同位素得分	预测的分子式
1	利培酮	4.70	411.21921	411.21908	0.29	97.5	C23H27N4O2F
2	9-羟基利培酮	4.64	427.21411	427.21400	0.24	98.5	C23H27N4O3F
3	氟伏沙明	5.30	319.16305	319.16279	0.98	98.2	C15H21N2O2F3
4	氟伏沙明-代谢物1	6.52	361.17362	361.17335	0.74	99.1	C17H23N2O3F3
5	氟伏沙明-代谢物2	4.95	319.12657	319.12640	0.55	99.6	C14H17N2O3F3

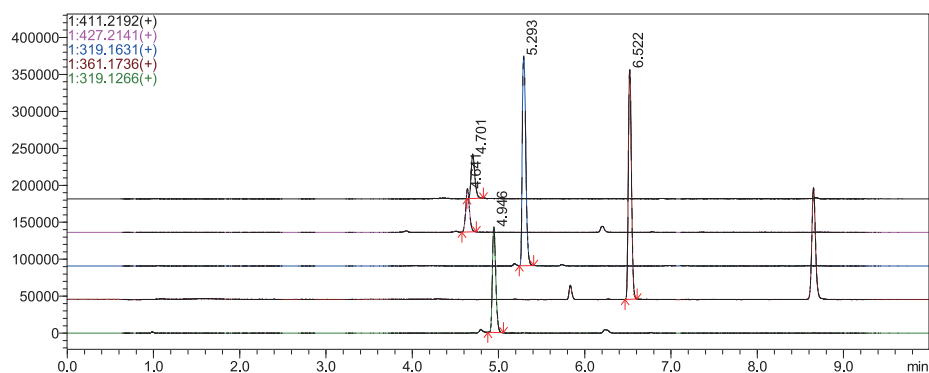


图2 4号样本初步筛选出m/z的EIC图 (提取离子流图)



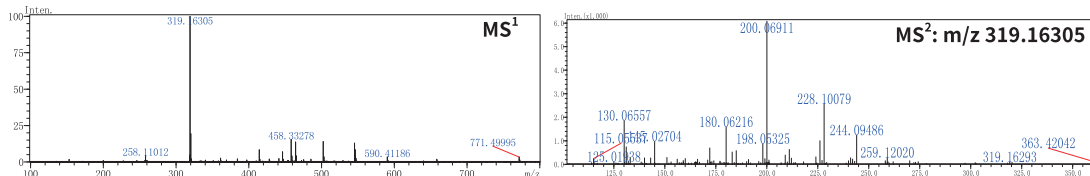
图3 Labsolutions Insight Explore软件中分子式预测结果的截图

2.1.3 MS² 质谱图的解析

<1> 氟伏沙明、利培酮、9-羟基利培酮三种给药的 MS² 分析

以氟伏沙明为例：通过 MS¹ 预测出可能的分子式后，初步判断可能是氟伏沙明。利用 ACDmanager 软件中碎片离子预测的功能，比较理论的 MS² 碎片离子与实测的 MS² 质谱图，其结果吻合如图 4 所示（红色线部分表示匹配的离子），再次确认 m/z 319.16309 为氟伏沙明。说明 4 号样本中含有氟伏沙明。

同样方法确认 4 号样本中含有利培酮和 9-羟基利培酮（如图 5-6）。9-羟基利培酮又名帕潘立酮，是利培酮主要的代谢产物，可以做为联合给药的一种，同利培酮一起给药。



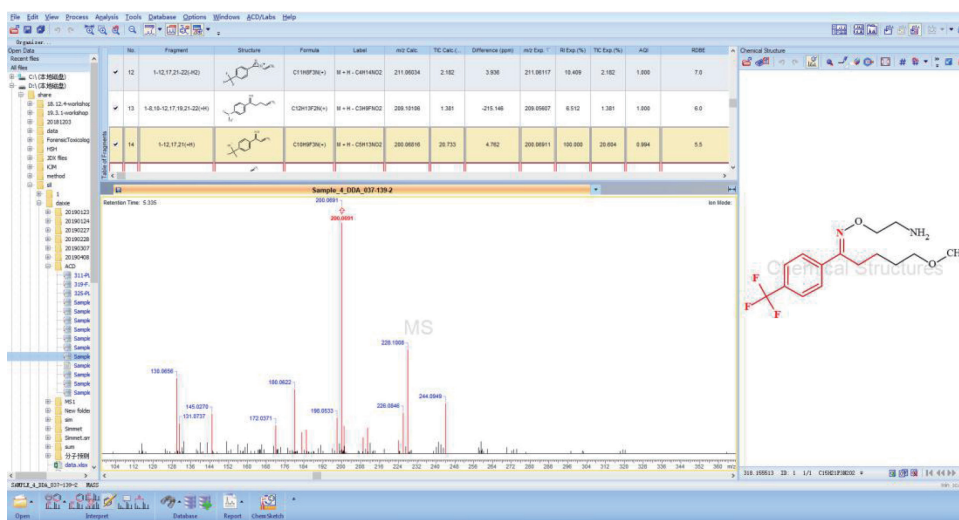


图4 4号样本中氟伏沙明 (m/z 319.16305) 的MS¹和MS²质谱图及其ACD软件匹配结果

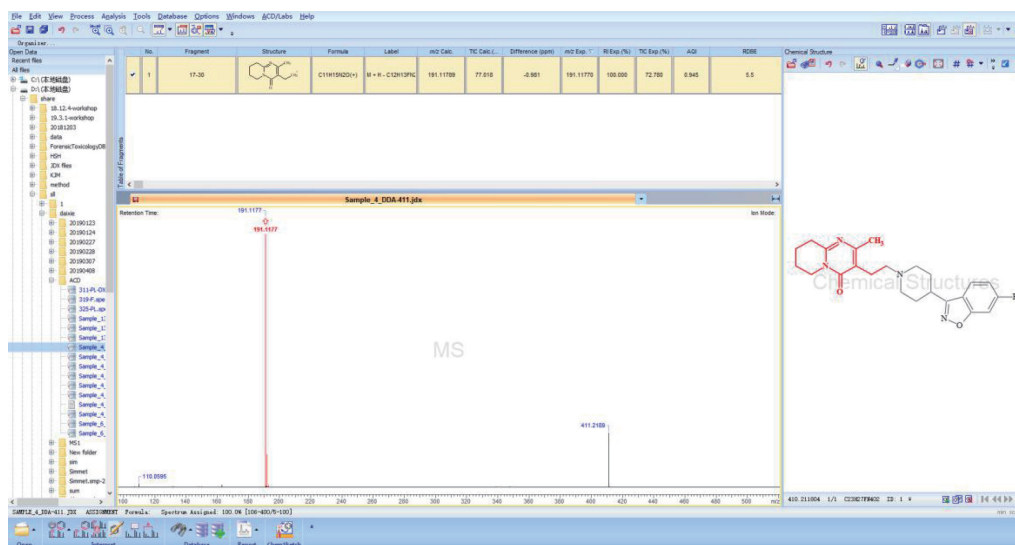
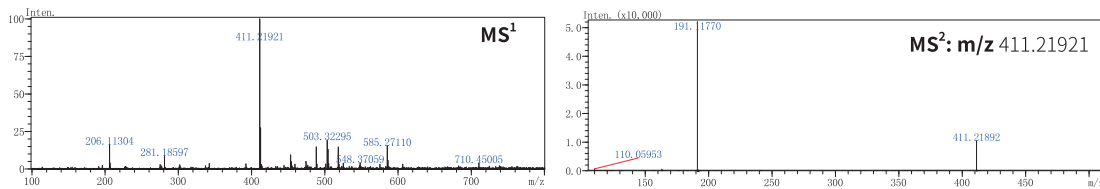
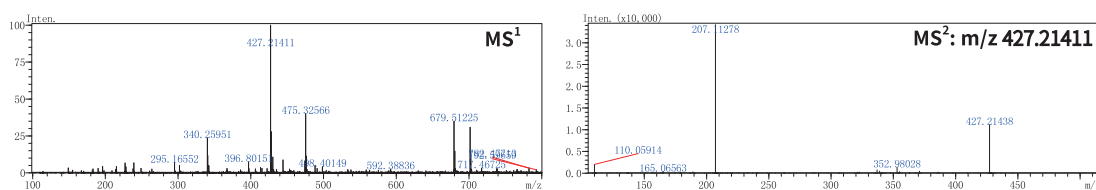


图5 4号样本中利培酮 (m/z 411.21921) 的MS¹和MS²质谱图及其ACD软件匹配结果



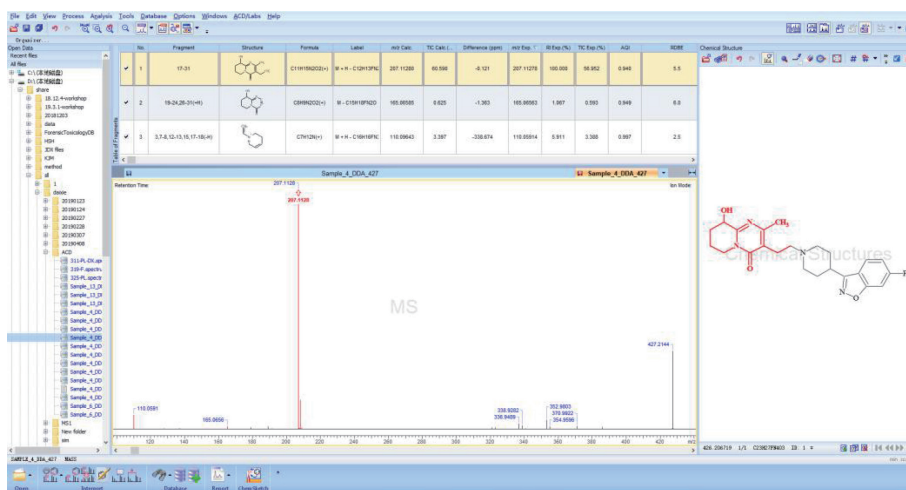


图6 4号样本中9-羟基利培酮 (m/z 427.21411) 的 MS^1 和 MS^2 质谱图及其ACD软件匹配结果

<2> 2 种氟伏沙明代谢物的 MS^2 分析

a. 代谢物 1: m/z 361.17363

代谢物 1 分子式是 $C_{17}H_{23}N_2O_3F_3$ 和氟伏沙明分子式 $C_{15}H_{21}N_2O_2F_3$ 相比, 相差了 C_2H_2O , 将代谢物 1 的 MS^2 质谱图与氟伏沙明的 MS^2 质谱图对比, 两者的 m/z 258 以前的部分主要碎片离子是吻合的, 具体的碎片离子结果如图 7 所示, 因此该代谢物 2 可能是氟伏沙明乙酰化后的产物。

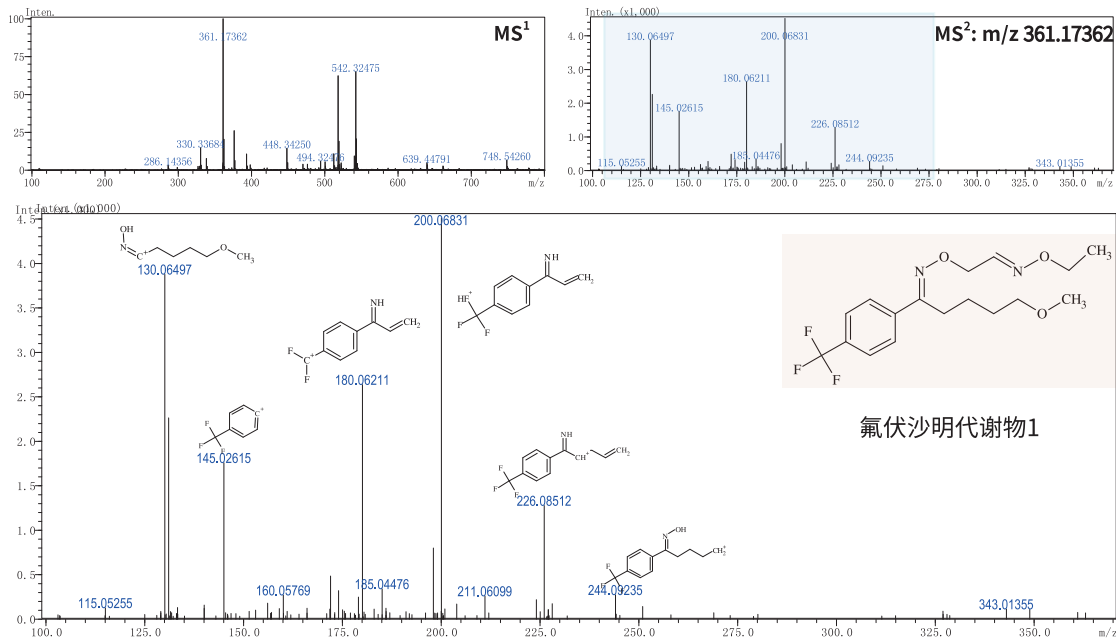


图7 氟伏沙明代谢物1的 MS^1 和 MS^2 质谱图 (上图) 以及 MS^2 碎片离子解析结果 (下图)

b. 代谢物 2: m/z 319.12657

代谢物 2 分子式是 $C_{14}H_{17}N_2O_3F_3$, 通过公共数据库 ChemSpider 或 Metlin 搜索, 得到其可能是 Fluvoxamine Acid, 根据其结构式, 利用 ACD 软件预测出理论的二级碎片离子, 并与实测的 MS^2 质谱图上的离子比较。80% 以上的离子吻合, 说明代谢物 2 可能是氟伏沙明的代谢产物; 是氟伏沙明去甲基脱氢氧化 (+O,-CH₂,-H₂) 后的产物。

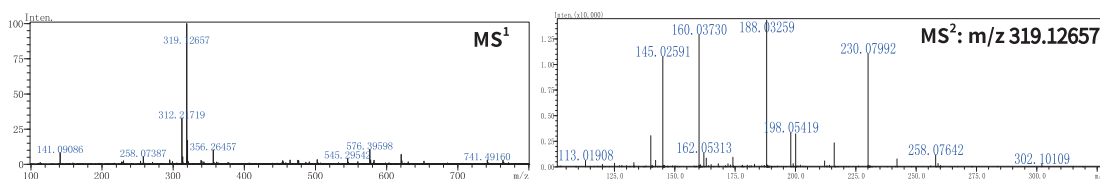


图8 氟伏沙明代谢物2的MS¹和MS²质谱图

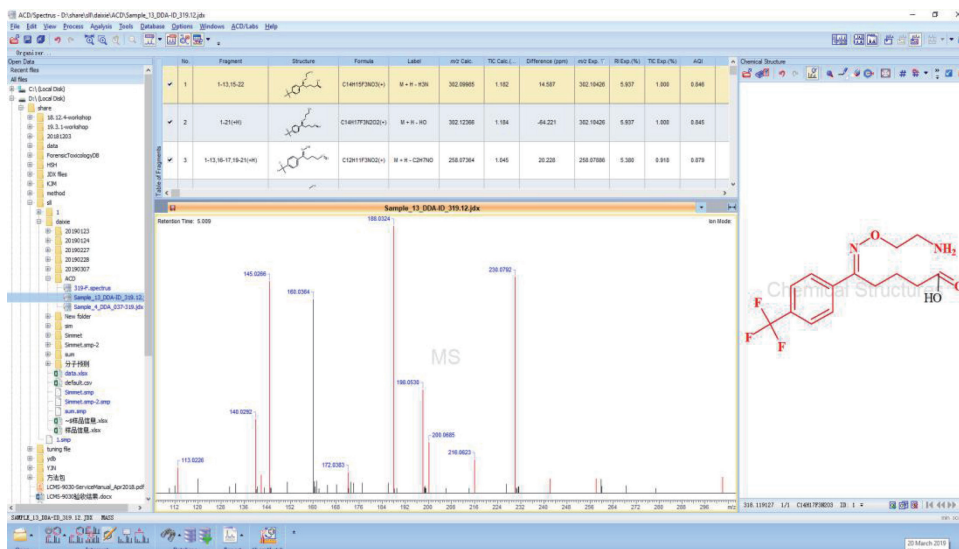
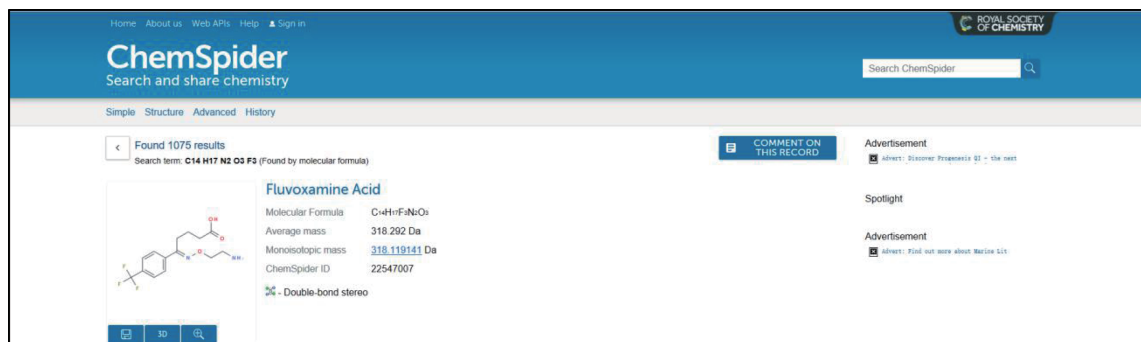


图9 代谢物2 (m/z 319.12657) ChemSpider搜索结果与ACD软件匹配结果

2.2 分析多个样品中利培酮、9-羟基利培酮、氟伏沙明及其代谢物

对含有利培酮、9-羟基利培酮和氟伏沙明药物的样本进行测试，并列出了利培酮、氟伏沙明及其代谢物的质量数精度与强度。即使质量数强度不同，质量数偏差都是 <2 ppm。

表3 多个样品中利培酮、9羟基利培酮的质量准确度及其强度

样本编号	利培酮 (理论m/z 411.21908)			9-羟基利培酮 (理论m/z 427.21400)		
	实测m/z	偏差	峰面积	实测m/z	偏差	峰面积
1号	411.21922	0.34	206550	427.21410	0.25	290987
2号	411.21923	0.36	223013	427.21425	0.60	235650
3号	411.21940	0.78	153289	427.21439	0.92	179631
4号	411.21921	0.29	179868	427.21411	0.24	175915
11号	411.21974	1.56	33709	427.21472	1.51	306716

表4 多个样品中氟伏沙明及其代谢物的质量准确度及其强度

样本编号	氟伏沙明 (理论m/z 319.16279)			氟伏沙明代谢物1 (理论m/z 361.17335)			氟伏沙明代谢物2 (理论m/z 319.12640)		
	实测m/z	偏差	峰面积	实测m/z	偏差	峰面积	实测m/z	偏差	峰面积
1号	319.16267	-0.37	239073	361.17339	0.10	239775	319.12632	-0.26	62926
4号	319.16305	0.26	808066	361.17362	0.74	791777	319.12658	0.55	392141
13号	319.16328	0.63	2500583	361.17391	1.10	1074572	319.12678	0.62	337791

2.3 14 个样本中定性出抗精神病药物与代谢物的结果汇总

参考 3.1 定性手段, 从 14 个样本中定性出 23 种抗精神药物及其代谢物, 结果见表 5。

表5 23种精神病药物及其代谢物的定性结果

编号	化合物	保留时间	理论m/z[M+H] ⁺	分子式	代谢途径
1	利培酮	4.71	411.21908	C23H27N4O2F	-
2	9-羟基利培酮	4.65	427.21400	C23H27N4O3F	氧化
3	氟伏沙明	5.30	319.16279	C15H21N2O2F3	-
4	氟伏沙明-代谢物1	6.53	361.17335	C17H23N2O3F3	乙酰化
5	氟伏沙明-代谢物3	4.95	319.12640	C14H17N2O3F3	氧化+去甲基+脱氢
6	阿立哌唑	5.32	448.15531	C23H27N3O2Cl2	-
7	阿立哌唑-代谢物1	5.20	446.13966	C23H25N3O2Cl2	脱氢化
8	奥氮平	3.60	313.14814	C17H20N4S	-
9	奥氮平-代谢物1*	4.51	329.14306	C17H20N4OS	氧化
10	阿普唑仑	5.72	309.09020	C17H13ClN4	-
11	舍曲林	5.49	306.08110	C17H17Cl2N	-
12	舍曲林-代谢物1*	5.42	292.06543	C16H14Cl2N	去甲基化
13	舍曲林-代谢物2	6.29	498.10808	C23H25NO7Cl2	氧化+葡萄糖醛酸化
14	舍曲林-代谢物3	6.21	350.07153	C18H17NO2Cl2	-
15	舍曲林-代谢物4*	6.67	306.04537	C16H13NOCl2	氧化+去甲基+脱氢
16	舍曲林-代谢物5*	6.07	336.05551	C17H15NO2Cl2	羧基化
17	舍曲林-代谢物6*	6.02	484.09243	C22H23NO7Cl2	去甲基+氧化+葡萄糖醛酸化
18	艾司西酞普兰	8.68	325.17110	C20H21FN2O	-
19	艾司西酞普兰-代谢物1	5.06	311.15540	C19H19FN2O	去甲基化
20	氨磺必利	4.24	370.17950	C17H27N3O4S	-
21	齐拉西酮	4.97	413.11974	C21H21ClN4OS	-
22	齐拉西酮-代谢物1*	5.76	429.11465	C21H21N4O2SCl	氧化
23	齐拉西酮-代谢物2*	4.187	443.09392	C21H19N4O3SCl	羧基化

备注：“*”：响应较弱，无法对二级碎片进行分析；仅通过MS1来推测的结果。

23 种药物及其代谢物在 14 个样本中 MS¹ 质量数偏差分布如图 10 所示, 均在 2 ppm 以内; 这些药物在样本中的具体检出结果如表 6 所示。

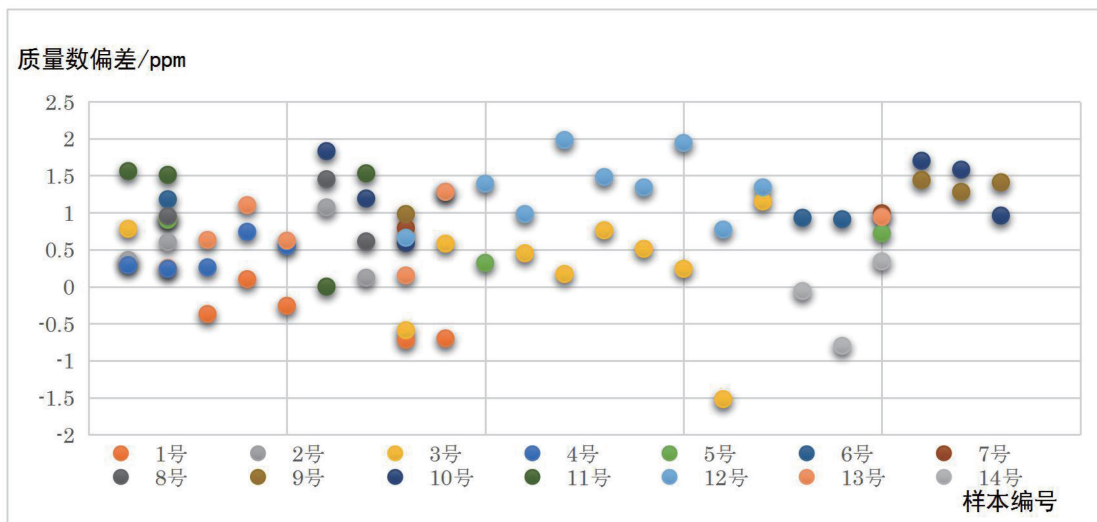


图10 14个样本中23种代谢物质量数偏差的分布图

图6 23种药物及其代谢物在14个样本中的检出结果 (●表示检出)

No.	化合物	理论m/z[M+H] ⁺	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	利培酮	411.21908	●	●	●	●							●			
2	9-羟基利培酮	427.21400	●	●	●	●	●	●		●			●			
3	氟伏沙明	319.16279	●			●									●	
4	氟伏沙明-代谢物1	361.17335	●			●									●	
5	氟伏沙明-代谢物2	319.12640				●									●	
6	阿立哌唑	448.15531		●						●		●	●			
7	阿立哌唑-代谢物1	446.13966		●						●		●	●			
8	奥氮平	313.14814	●		●				●		●	●		●	●	
9	奥氮平-代谢物1	329.14306	●		●									●	●	
10	阿普唑仑	309.09020					●							●		
11	舍曲林	306.08110			●									●		
12	舍曲林-代谢物1	292.06543			●									●		
13	舍曲林-代谢物2	498.10808			●									●		
14	舍曲林-代谢物3	350.07153			●									●		
15	舍曲林-代谢物4	306.04537			●									●		
16	舍曲林-代谢物5	336.05551			●									●		
17	舍曲林-代谢物6	484.09243			●									●		
18	艾司西酞普兰	325.17110						●								●
19	艾司西酞普兰-代谢物1	311.15540						●								●
20	氨磺必利	370.17950					●		●						●	●
21	齐拉西酮	413.11974									●	●				
22	齐拉西酮-代谢物1	429.11465									●	●				
23	齐拉西酮-代谢物2	443.09392									●	●				

2.4 空白血清中的 MIC 图

平行测试 2 个空白血清，上述检出的 23 种药物及其代谢物均未检出。空白血清样品的提取离子流图如图 11 所示。

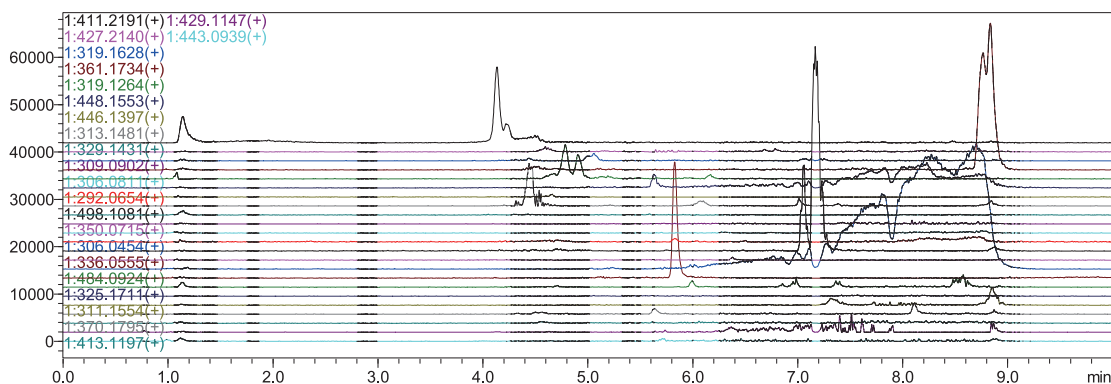


图11 空白血清的MIC图

结论

本文利用岛津公司 LCMS-9030 超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用仪定性分析临床病人血清中精神病药物及其代谢；从 14 个临床血清样本中定性分析出 10 种常见的抗精神病药物和 13 种其相关代谢物，定性出的 10 种原药与给药情况基本吻合。岛津 LCMS-9030 高分辨质谱具有质量数准确性高，一级质谱数的偏差均在 2 ppm 以内；分子式预测软件、ACDmanager 软件等多元化的辅助定性软件，可以简单、快速的进行定性分析；为临床监控药物的快速定性分析提供参考。

致谢：该报告是与广州医科大学附属脑科医院合作完成，感谢其提供测试样本。