

高效液相色谱-高分辨质谱法 研究药物代谢产物的数据处理策略

张 丹, 王彩虹, 金 滢, 王 喆, 张金兰

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 高效液相色谱-高分辨质谱(HPLC-HRMS)联用技术具有高灵敏度、快速和高质量准确度的特点, 是药物代谢产物分析的有力手段。通过使用 HPLC-HRMS 产生高分辨质谱数据(高分辨质量数、多级质谱数据、同位素分布), 结合多重采集后数据处理技术, 可用于药物代谢产物的快速发现和结构鉴定。本工作综述了近年来基于 HPLC-HRMS 技术应用最为广泛的几种数据挖掘策略及应用, 如, 提取离子色谱、质量亏损过滤、同位素过滤、本底扣除、产物离子过滤、质谱树状图过滤、SWATH 和 MS^E 以及这些技术的联用等。通过合理地使用其中一种或几种策略对 HPLC-HRMS 产生的数据进行处理, 可以有效地进行药物代谢产物的发现和鉴定。

关键词: 高效液相色谱-高分辨质谱(HPLC-HRMS); 代谢产物; 数据处理策略; 综述

中图分类号: O657. 63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2017)04-0410-07

doi: 10. 7538/zpxb. 2017. 0076

Identification of Drug Metabolites Using Data Post-Processing Strategies Based on High Performance Chromatography Coupled with High Resolution Mass Spectrometer

ZHANG Dan, WANG Cai-hong, JIN Ying, WANG Zhe, ZHANG Jin-lan

(Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: High performance chromatography coupled with high-resolution mass spectrometer (HPLC-HRMS) has been widely used to discover and identify drug metabolites due to its high sensitivity, rapidity and high mass accuracy. Drug metabolites can be rapidly detected and identified based on mass data (high resolution mass and multiple stage mass) and mass data processing strategy. This paper reviews the strategies and applications for the discovery and identification of drug metabolites using HPLC-HRMS after consulting related papers in recent years. These strategies, including extracted-ion chromatography (EIC), mass defect filter (MDF), isotope pattern filter (IPF), background subtraction (BS), product ion filter (PIF), mass spectral trees similarity filter (MTSF), SWATH and MS^E , were developed for the detection and identification of

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-05-23

作者简介: 张 丹(1993—), 女(汉族), 山东人, 硕士研究生, 药物分析专业。E-mail: zhangdan@imm. ac. cn

通信作者: 张金兰(1969—), 女(汉族), 内蒙古人, 研究员, 从事药物分析研究。E-mail: zhjl@imm. ac. cn

drug metabolites in complex biologic systems. Drug metabolites can be effectively detected and identified through the joint application of one or more strategies.

Key words: high performance chromatography coupled with high-resolution mass spectrometer (HPLC-HRMS); drug metabolites; data post-processing strategies; review

高效液相色谱(HPLC)和超高效液相色谱(UPLC)因其载样量大、适用性好、分离度高等优点,已成为分析药物代谢产物的有效手段^[1-3],它们一般采用质谱作为检测器^[1,4]。与其它检测技术相比,质谱能够提供更高的选择性、灵敏度以及更丰富的结构信息^[5]。特别是与高分辨质谱(HRMS)杂化的多功能质谱仪^[6],通过高分辨质谱获得的准确质量数,结合杂化的多功能质谱获得的多级质谱数据,可高灵敏度、高选择性地对体内复杂基质中代谢产物进行快速检测和结构鉴定^[2,7],如飞行时间质谱(TOF MS)、傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR MS)和静电场轨道阱质谱(Orbitrap MS)等。本工作将重点介绍基于高效液相色谱-高分辨质谱联用技术(HPLC-HRMS)的代谢产物检测和鉴定的策略及应用。

1 代谢物检测和鉴定策略

1.1 提取离子色谱

提取离子色谱(extracted-ion chromatography, EIC)是对预期代谢产物高分辨的 m/z 值进行提取处理,能够简单高效地检测代谢产物,借助数据库预测可能存在的代谢产物,建立预期代谢产物高分辨 m/z 值目录,以大大提高 EIC 的处理效率。然而,由于此类数据库是基于每个检测化合物的结构独特性,需要集成软件以满足高通量分析^[8]。因此,EIC 技术的最大限制是对非常规或由多重代谢转化反应形成的代谢产物的检测不全面。

Ruan 等^[8]采用全扫描 MS 数据集的高分辨 EIC 分析,在大鼠肝 S9 孵育液中检测到 11 个茚地那韦代谢产物,高分辨质谱的高质量准确度极大地提高了 EIC 处理的选择性。

Falck 等^[9]利用 LC-HRMS/MS² 结合 EIC 技术从大鼠的尿液中共检测到 7 种艾芬地尔及其代谢物,其中包含 2 种 I 相代谢物,5 种 II 相代谢物,并发现主要的体内代谢物为葡萄糖醛酸结合物。Poschner 等^[10]运用 LC-HRMS 结

合 EIC 技术从人的乳腺癌细胞中同时定量检测了 10 种非共轭激素前体、雄激素、雌激素及其各自的缀合代谢物。

1.2 质量亏损过滤技术

以母体药物和核心亚结构作为过滤模板的质量亏损过滤(mass defect filter, MDF)技术^[8]是快速检测复杂生物基质中药物代谢产物的方法^[11]。

“质量亏损”指一个元素(或者化合物)的精确质量数和它最接近的整数值之间的差异。由于代谢产物的质量亏损通常位于较窄的范围内,根据母体药物和被选择的核心亚结构的质量亏损,可以估算这些代谢产物的质量亏损所处的区间。预先设定过滤标准,采用质量亏损过滤,从干扰离子中过滤出代谢产物离子,将所有处于期望范围之外的离子排除,从而挖掘出可能的代谢产物^[8,12]。因此,运用 MDF 方法检测代谢产物,依赖代谢产物与过滤模板间的质量亏损相似性,不需要考虑不同代谢产物的裂解类型^[13]。MDF 技术可有效地去除所有的干扰离子,得到“干净”的色谱图,简化质谱解析,已广泛用于检测常规和非常规代谢产物,包括分子质量比母体药物小很多的代谢产物^[11,13]。近年来,由于 MDF 技术在代谢产物分析中的优势,其发展愈发迅猛,越来越多地应用于药物代谢分析研究中^[14-17]。

Ruan 等^[8]采用 MDF 技术使用药物过滤模板的方法检测到茚地那韦在鼠肝 S9 孵育液中的 9 种常规代谢产物(M5~M13),此外,还检测到 1 个未被报道过的代谢产物 M14, M14 的全扫描 MS 谱在 m/z 521.313 4 处显示含有 1 个质子化分子,比 M2 少 2 个质子。根据二者的 MS/MS 谱可知, M14 的碎片离子与 M2 相似,说明这两个代谢产物具有相同的骨架结构, M14 缺少的 2 个质子发生在氨基吡啶部分。基于以上结果,提出 M14 的形成是经历了 3-甲基吡啶基团丢失和氨基吡啶被氧化成氨基茚酮 2 个代谢转化反应。除常规代谢产物外,

利用母体药物和核心结构过滤模板的方法还发现了非常规代谢物,检测到了分别经 *N*-脱烷基和单烷基化反应得到的 M3 和 M4。

Zhu 等^[13]采用色谱-高分辨质谱联用技术结合 MDF 方法筛选和鉴定活性代谢产物。通过采用 HPLC 联合 Orbitrap 或 FTICR 质谱技术分析人肝微粒体(HLM)中的扑热息痛、双氯芬酸、卡马西平、氯氮平、*p*-甲酚、4-乙苯酚和 3-甲基吲哚的 GSH-辄和的活性代谢产物。

Wang 等^[18]采用 UPLC-MS/MS 结合 MDF 技术从大鼠血浆、尿液等体液和排泄物中共发现了 97 种小檗碱代谢物。

1.3 同位素过滤技术

同位素过滤(isotope pattern filter, IPF)技术用于筛查具有不同的同位素模型的代谢产物,包括天然同位素和放射标记同位素,其主要用于研究含 Cl^- 和 Br^- 的化合物。

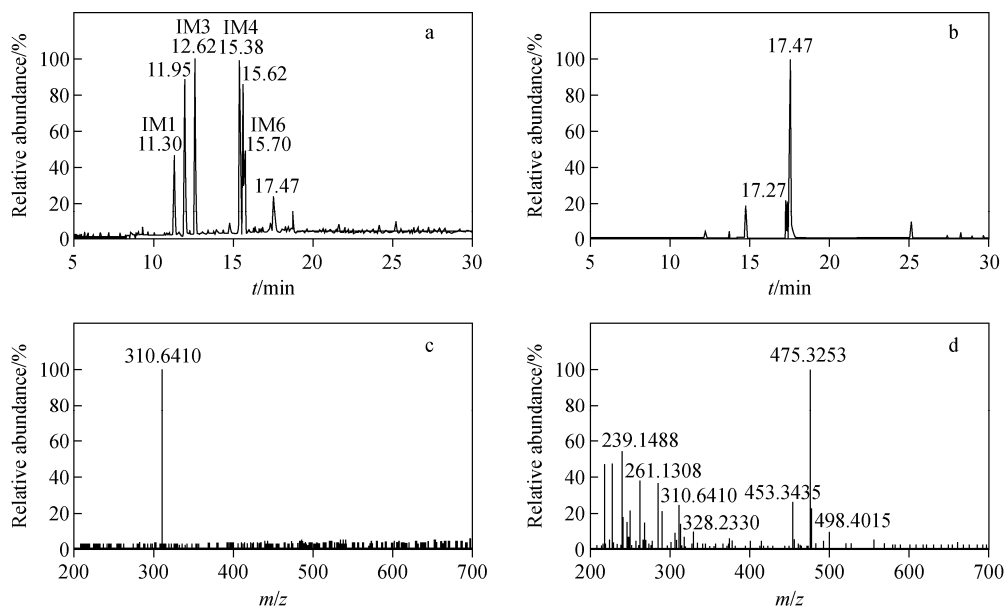
Zhu 等^[19]建立了一种基于精确质量数的平均同位素过滤(AMSA-IPF)技术,该技术相比于传统的 IPF 改进了 3 个功能:1) 在 IPF 之前进行谱图平均,以减小离子强度的变异;2) IPF 过程严格基于精确质量数;3) 过滤标准中包含(M+2 : M)和(M+1 : M)同位素丰度

比,提高了该方法的特异性。作者利用 AMSA-IPF 方法有效地鉴定了大鼠血浆、尿液、胆汁和粪便样品中的氯雷他定及其 39 种代谢物,比 EIC 技术多检测到 16 种代谢物,说明该方法能够发现低强度的代谢物。

1.4 本底扣除技术

本底扣除(background subtraction, BS)技术是根据新的算法,从给药后生物样本的高分辨数据中扣除空白样本内源性本底干扰信号,选择性地检测代谢产物。此方法需要很好地从药物相关离子中区分背景和基质相关离子,根据它们的准确质量,从分析物样本中完全扣除所有干扰离子。该方法能够快速地检测体内外代谢产物,不需要假设它们的分子质量、裂解类型和质量亏损。

Ma 等^[11]将 BS 方法成功地应用于 HLM 孵育中的 4 个测试药物(氯氮平,双氯芬酸,丙米嗪和他克林)与谷胱甘肽结合物的快速检测,结果示于图 1。图 1a 显示了 6 个不同的 GSH 缀合物色谱峰(IM1~IM6),但在未处理的原始色谱图中,难以发现这些代谢物。背景扣除后的谱图相对简单,能够较容易地发现 GSH 加合物的分子离子。扣除背景后,IM1 的双电



注: a. 经彻底背景扣除后,丙米嗪与 HLM 和 GSH 孵育的色谱图; b. 丙米嗪与 HLM 和 GSH 孵育的原始色谱图; c. 扣除背景后,IM1 的双电荷准分子离子质谱图; d. 未处理的 IM1 的双电荷准分子离子质谱图

图 1 丙米嗪谷胱甘肽结合物的色谱及质谱图^[11]

Fig. 1 Chromatogram and mass spectra of imipramine-GSH

荷准分子离子 m/z 310.641 0非常清晰,几乎没有干扰离子,而在未经处理的质谱图中,该离子受到许多内源性物质离子的干扰。这说明该方法适合检测在电喷雾离子化中形成双电荷离子的 GSH 结合物。

1.5 产物离子过滤和中性丢失过滤技术

产物离子过滤(product ion filter, PIF)和中性丢失过滤(neutral loss filter, NLF)是依赖代谢产物 MS/MS 谱的有效性,以及代谢产物与母体药物或已知代谢产物裂解规律相似性的技术。根据预期的代谢产物碎片离子或裂解规律,从复杂样本中检测代谢产物,使用多个产物离子或者中性丢失进行数据挖掘,能够检测某些 EIC 或 MDF 无法检测到的代谢产物^[8]。PIF 和 NLF 技术可用于同时搜索已预测和未预测的代谢物,无需额外的样品注射,特别适用于缀合的代谢物筛选^[20]。

Zhou 等^[20]利用 NLF 和 PIF 技术成功地鉴定了人尿液中三环抗抑郁药阿米替林的 28 种代谢物。

1.6 质谱树状图过滤技术

本课题组运用高效液相色谱-高分辨质谱/多级质谱技术(HPLC-HRMS/MSⁿ)和质谱树状图相似度过滤(MTSF)技术^[21],建立了一种药物体内成分及其代谢产物发现和鉴定的新方法。通过全扫描模式获得化合物的一级高分辨质谱图作为质谱树状图的树干,数据依赖扫描模式获得化合物的多级质谱图作为树枝,构建被检测化合物的质谱树状图,并将已知结构的化合物质谱树状图作为模板导入自建的质谱树状图数据库。将被检测样品的质谱树状图与自建的质谱树状图库进行相似度比较,根据相似度结果发现潜在代谢产物。相似度匹配得分的阈值高于 200 时,可以过滤掉约 80%的干扰,获得一定可信度的体内成分和代谢产物信息。将该方法运用在淫羊藿药材提取物给药后的大鼠生物样品中,共发现和鉴定了 115 个代谢产物,并推测了淫羊藿黄酮的代谢途径。与广泛使用的 NLF、PIF 和 MDF 技术相比,MTSF 技术在发现代谢产物方面优于 NLF 和 PIF 技术,与 MDF 技术互补。MTSF 技术还可用于代谢产物的结构鉴定,特别适用于结构多样、代谢广泛的中药体内代谢产物的研究^[22]。

1.7 SWATH 和 MS^E 技术

每个窗口所有碎片离子的顺序采集(Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical fragment ions, SWATH)和 MS^E 是新型的多级质谱扫描技术,将扫描范围分为几十个 Da 为间隔的一系列区间,通过高速扫描可以获得扫描范围内所有分子离子的全部碎片信息和结构信息,对于代谢物的发现和鉴定具有高分辨、高扫描速率和高灵敏度的特点,适用于结构多样、含量较少的代谢物的定性与定量研究。Sun 等^[23]利用 MS^E 结合 UPLC-Q-TOF MS 技术从中药复方开心散中快速鉴定了 107 种化合物。

Scheidweiler 等^[24]采用 LC/MS 结合 SWATH 技术成功地鉴定了人的尿液中 47 种合成大麻素代谢物。

2 不同技术的联用

对使用 HPLC-HRMS 技术获得的高分辨质谱数据,采用 EIC、MDF、PIF、NLF 和 MTSF 等数据处理技术,可用于复杂基质中代谢产物的快速发现和结构鉴定^[25-28],这些技术的特点示于图 2。不同技术之间具有互补性,可以全面地发现常规和非常规的代谢产物,并进行高效地结构鉴定。

Xing 等^[16]利用 HRMS 结合 MDF 和 BS 两种数据处理技术,从人的血浆及尿液中筛选和鉴定了甲硝唑、泮托拉唑和克拉霉素药物结合物的相关代谢产物。首先利用非靶向 BS 进行数据处理,再利用靶向改进的 MDF 对甲硝唑、泮托拉唑和克拉霉素的代谢物进行了更有效地鉴别,最后根据全扫描 MS 谱对 MDF 处理色谱图中存在的单个峰进行快速确认,共发现 44 种药物相关代谢物。BS 可滤掉大多数背景信号,根据处理结果获得适当的代谢物 MDF 模板,将其与已有的 MDF 模板同时应用于代谢物的鉴别。

Liu 等^[29]开发了多重质量亏损过滤器(MMDF)与依赖于动态背景扣除(DBS)的在线数据采集技术相结合的方法,以追踪五味子甲素的所有可能代谢物,共发现了 51 种五味子甲素的代谢物,包括 49 种 I 相代谢物和 2 种 II 相代谢物。MMDF 和 DBS 方法可以触发由背景噪声和内源性成分掩盖的低水平代谢物的信息

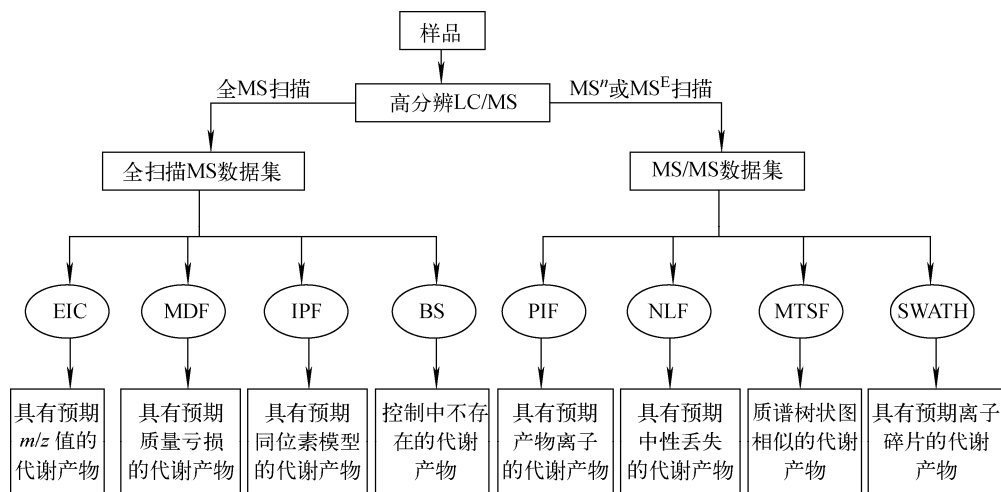


图2 药物代谢产物发现和鉴定方法

Fig. 2 Method for the discovery and identification of drug metabolites

依赖型数据获取 (information dependent acquisition, IDA)。采用 MDF、PIF 和 NLF 等数据处理方法的联合应用来鉴定五味子甲素的代谢物, 根据准确分子质量、母体药物的质谱碎裂规律和药物代谢转化合理途径来确定代谢物的结构。

Du 等^[30] 使用高分辨质谱分析大鼠胆汁中噻氯匹定缀合物, 应用各种数据采集和处理工具进行鉴定。使用 EIC、MDF 和 IPF 进行数据处理; 使用 EIC 和 IPF 技术检测到的假阳性代谢物很少, 但不能发现非预期和失去氯原子的噻氯匹定缀合物; 使用 MDF 技术能够检测到几乎所有噻氯匹定缀合物, 但是存在许多假阳性代谢物。因此, 联合应用这三种方法, 可达到优势互补, 更加全面有效地发现代谢物。

Liu 等^[31] 建立了一种 LC-Q TOF MS 的分析方法, 从人的血浆、尿液和粪便中查找抗肿瘤新药埃克替尼的代谢物。为了高效准确地发现并鉴定代谢物, 使用 MDF 法查找代谢物, 并利用核磁共振技术 (NMR) 对发现的可能代谢物进行结构鉴定, 共鉴定到人体内 29 种埃克替尼代谢物。

3 结语

HPLC-HRMS 技术由于其高灵敏度、高准确度和高分离能力, 成为药物代谢产物分析的有力技术手段; 通过结合各种数据处理方法, 可用于代谢物的表征, 以及未知微量代谢产物的

检测和结构鉴定。但是, 仅依靠 HPLC-HRMS 技术不能确定所有代谢物的结构, 需要更多新的技术和研究方法来应对这一挑战。比如, LC-HRMS 具有较高的灵敏度, NMR 具有较强的结构鉴定能力, 二者联用能够更加全面准确地鉴定复杂基质中的代谢物^[31]。

参考文献:

- [1] STEINMANN D, GANZERA M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 55(4): 744-757.
- [2] ROUX A, LISON D, JUNOT C, et al. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: a review [J]. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44(1): 119-135.
- [3] JIWAN J L, WALLEMACQ P, HÉRENT M F. HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? [J]. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44(1): 136-147.
- [4] MAKAROV A, SCIGELOVA M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(25): 3 938-3 945.
- [5] KEUN H C. Metabonomic modeling of drug toxicity [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, 109(1/2): 92-106.
- [6] TOLONEN A, TURPEINEN M, PELKONEN O. Liquid chromatography-mass spectrometry in

- in vitro* drug metabolite screening[J]. Drug Discovery Today, 2009, 14(3/4): 120-133.
- [7] BROWN S C, KRUPPA G, DASSEUX J L. Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2005, 24(2): 223-231.
- [8] RUAN Q, PETERMAN S, SZEWC M A, et al. An integrated method for metabolite detection and identification using a linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer and multiple data processing techniques: application to indinavir metabolite detection[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2008, 43(2): 251-261.
- [9] FALCK E, BEGROW F, VERSPOHL E, et al. Metabolism studies of ifenprodil, a potent GluN2B receptor antagonist[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 88: 96-105.
- [10] POSCHNER S, ZEHL M, MAIER-SALAMON A, et al. Simultaneous quantification of estrogens, their precursors and conjugated metabolites in human breast cancer cells by LC-HRMS without derivatization[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 138: 344-350.
- [11] MA S G, ZHU M S. Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites[J]. Chemico-Biological Interactions, 2009, 179(1): 25-37.
- [12] ZHANG H Y, ZHANG D L, RAY K, et al. Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2009, 44(7): 999-1 016.
- [13] ZHU M S, MA L, ZHANG H Y, et al. Detection and structural characterization of glutathione-trapped reactive metabolites using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(21): 8 333-8 341.
- [14] NI S, QIAN D, DUAN J, et al. UPLC-Q TOF/MS-based screening and identification of the constituents and their metabolites in rat plasma and urine after oral administration of Glechoma longituba extract[J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878(28): 2 741-2 750.
- [15] ZHU M, MA L, ZHANG D, et al. Detection and characterization of metabolites in biological matrices using mass defect filtering of liquid chromatography/high resolution mass spectrometry data[J]. Drug Metabolism and Disposition, 2006, 34(10): 1 722-1 733.
- [16] XING J, ZANG M, ZHANG H, et al. The application of high-resolution mass spectrometry-based data-mining tools in tandem to metabolite profiling of a triple drug combination in humans[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 897: 34-44.
- [17] TAO J H, ZHAO M, WANG D G, et al. UPLC-Q-TOF/MS-based screening and identification of two major bioactive components and their metabolites in normal and CKD rat plasma, urine and feces after oral administration of Rehmannia glutinosa Libosch extract[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 1 001: 98-106.
- [18] WANG K, CHAI L, FENG X, et al. Metabolites identification of berberine in rats using ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 139: 73-86.
- [19] ZHU P, TONG W, ALTON K, et al. An accurate-mass-based spectral-averaging isotope-pattern-filtering algorithm for extraction of drug metabolites possessing a distinct isotope pattern from LC-MS data[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(14): 5 910-5 917.
- [20] ZHOU X, CHEN C, ZHANG F, et al. Metabolism and bioactivation of the tricyclic antidepressant amitriptyline in human liver microsomes and human urine[J]. Bioanalysis, 2016, 8(13): 1 365-1 381.
- [21] JIN Y, WU C S, ZHANG J L, et al. A new strategy for the discovery of epimedium metabolites using high-performance liquid chromatography with high resolution mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 768(1): 111-117.
- [22] WU C S, ZHANG H, WANG C H, et al. An integrated approach for studying exposure, metabolism, and disposition of multiple component herbal medicines using high-resolution mass spectrometry and multiple data processing tools[J]. Drug Metabolism and Disposition, 2016, 44(6): 800-808.

- [23] SUN H, LIU C, ZHANG A, et al. Rapid discovery and global characterization of multiple constituents from Kai-Xin-San using an integrated MS^E data acquisition mode strategy based on ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(1): 279-286.
- [24] SCHEIDWEILER K B, JARVIS M J Y, HUESTIS M A. Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(3): 883-897.
- [25] LI Y, CAI W, CAI Q, et al. Comprehensive characterization of the *in vitro* and *in vivo* metabolites of geniposide in rats using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer[J]. *Xenobiotica*, 2016, 46(4): 357-368.
- [26] ZHANG J, CAI W, ZHOU Y, et al. Profiling and identification of the metabolites of baicalin and study on their tissue distribution in rats by ultra-high-performance liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer[J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, (985): 91-102.
- [27] WANG J, QI P, HOU J, et al. Profiling and identification of metabolites of isorhynchophylline in rats by ultra high performance liquid chromatography and linear ion trap Orbitrap mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1033/1034: 147-156.
- [28] YANG A, ZANG M, LIU H, et al. Metabolite identification of the antimalarial piperazine *in vivo* using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in combination with multiple data-mining tools in tandem[J]. *Biomedical Chromatography*, 2016, 30(8): 1 324-1 330.
- [29] LIU M, ZHAO S, WANG Z, et al. Identification of metabolites of deoxyschizandrin in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS based on multiple mass defect filter data acquisition and multiple data processing techniques[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 950(4): 115-126.
- [30] DU F, RUAN Q, ZHU M, et al. Detection and characterization of ticlopidine conjugates in rat bile using high-resolution mass spectrometry: applications of various data acquisition and processing tools[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, 48(3): 413-422.
- [31] LIU D, JIANG J, ZHANG L, et al. Metabolite characterization of a novel anti-cancer agent, icotinib, in humans through liquid chromatography/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25(15): 2 131-2 140.