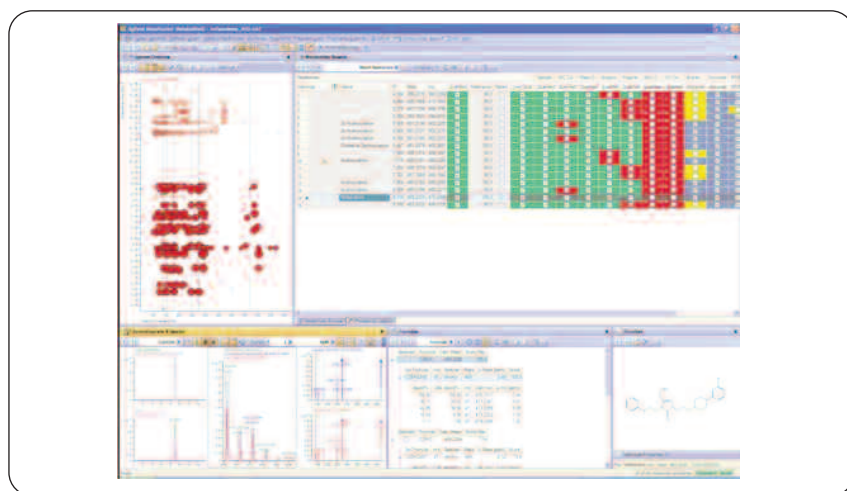


用于药物代谢物计算机辅助鉴定的一种交织的多算法方法

使用安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件，通过精确的 QTOF MS 和 MS/MS 数据对药物代谢物进行快速鉴定

应用简报

Edgar Nägele, Frank Wolf,
Uwe Nassal, Rainer Jäger,
Horst Lehmann, Frank Kuhlmann,
Karina Subramanian



摘要

本应用简报系基于 2007 年 6 月 4 日于美国印第安纳州印第安纳波利斯举行的 ASMS 质谱会议上参展的科学展报 MOP 253 进行撰写的。本简报将介绍以下内容：

- 使用多算法方法对药物代谢物进行快速计算机辅助鉴定
- 实现体外实验药物代谢物的高分离度色谱分离
- 使用 QTOF MS 和 MS/MS 实现药物代谢物的高质量数准确度测定

安捷伦仪器设备：

1200 系列高分离度快速液相色谱系统
6510 四极杆飞行时间 LC/MS
ZORBAX RRLC 色谱柱
MassHunter 代谢物鉴定
软件

应用领域：

药物筛选和研发过程中的代谢物鉴定



Agilent Technologies

前言

在现代药物研发中，对新化学实体所有可能的代谢物进行鉴定的工作是非常重要的，因为我们需要掌握它对人体可能产生的毒副作用并对其成为新型药用物质的可能性加以评估。现在，我们可以利用体外和体内代谢实验的高分辨率和高质量数准确度 QTOF MS 和 MS/MS 数据¹，对药物筛选和研发过程中不同阶段的代谢物进行鉴定。为了充分利用这些数据中包含的潜在信息，使用不同的和互补的计算机算法进行数据分析是非常必要的。每种算法采用特定的方式分析数据的特定部分，可提供一个独立的结果。当这些算法以交织的形式共同工作时，即可实现计算机辅助数据分析的真正优势，并且使整体结果具有更高的可靠性。为实现这一优势，需要采用用户设定的因子将各算法生成的所有得分进行整合和加权处理。本应用简报使用包含上述方法的安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件，介绍了对 QTOF 数据进行分析的实例，数据来自药物化合物奈法唑酮² 代谢物鉴定实验。

实验部分

仪器设备

- Agilent 1200 系列快速高分离度液相色谱系统，包括脱气机、二元泵 SL、带恒温室的高效自动进样器 SL、柱温箱和二极管阵列检测器 SL
- Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱，2.1 x 150 mm，粒径 1.8 μm
- Agilent 6510 四极杆飞行时间 LC/MS 系统

样品制备

- 储备液：
 - 20 mg/mL S9 肝匀浆制剂
 - 0.1 mg/mL 奈法唑酮水溶液
 - 将 1.6 mg NADP 溶于 1.6 mL pH 7.4 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液中
 - 50 mM 异柠檬酸/MgCl₂ 溶液（于 20 mL 水中加入 203 mg MgCl₂·6H₂O 和 258.1 mg 异柠檬酸）
 - 0.33 U/mL 异柠檬酸脱氢酶溶液

- NADPH 再生系统：
 - 1.6 mL NADP 溶液 + 1.6 mL 异柠檬酸溶液 + 100 μL 异柠檬酸脱氢酶溶液
- 孵育混合体系：
 - 3.85 μL 底物 + 200 μL NADPH 再生系统 + 746.15 μL 磷酸盐缓冲液 + 50 μL S9 肝匀浆液

在 37 °C 下孵育 60 min，分别在 0 和 60 min 时取出 100 μL 溶液。加入 6 μL 高氯酸和 100 μL 乙腈中止反应，在 14,000 g 的条件下离心 15 min。取上清液采用 SpeedVac 浓缩器挥干，残渣采用 0.1% 甲酸 (FA) 水溶液复溶，并按照下述条件进行 LC/MS 分析。0 min 停止的孵育溶液作为对照。

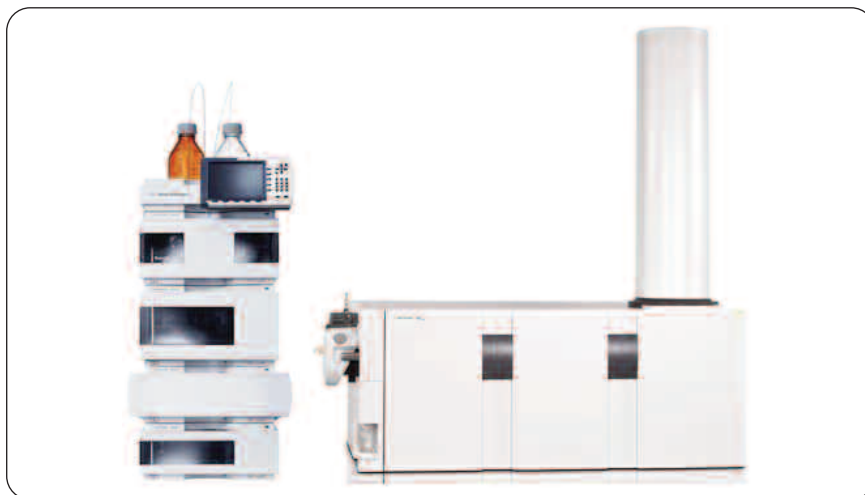


图 1
用于代谢物鉴定实验的系统配置，包括 Agilent 1200 系列快速高分离度液相色谱，1.8 μm 粒径填料色谱柱和 Agilent 6510 QTOF LC/MS

高分离度 LC/MS 方法

- Agilent 1200 系列二元泵 SL
溶剂 A: 水 + 0.1% FA,
溶剂 B: ACN + 0.1% FA
流速: 0.5 mL/min
梯度程序: 0 min, 5% B;
15 min, 75% B;
15.1 min, 95% B;
16 min, 95% B
- Agilent 1200 系列自动进样器 SL
进样体积:

1-10 μL ,
带洗针

样品温度: 4 $^{\circ}\text{C}$
自动延迟体积降低

- Agilent 1200 系列二极管阵列检测器 SL
检测波长: 210 nm (± 4 nm)
参比波长: 360 nm (± 16 nm)
流通池: 体积 2 μL ,
光程 3 mm
- Agilent 1200 系列柱温箱
柱温: 60 $^{\circ}\text{C}$

QTOF MS 和 MS/MS 方法

- Agilent 6510 QTOF LC/MS 系统
离子源: ESI, 正离子模式
对于参比质量数
溶液配备双喷雾
干燥气流速: 12.0 L/min
(m/z 121.005 和
m/z 922.00)
干燥气温度: 300 $^{\circ}\text{C}$
雾化器压力: 60 psi
质量数范围: 100-1000
碎裂电压: 200 V
截取锥电压: 60 V
毛细管电压: 4000 V
碰撞能量: 35 V
数据依赖型 MS/MS: 2 个化合物,
2 张 MS/MS 图谱,
未计入 0.03 min

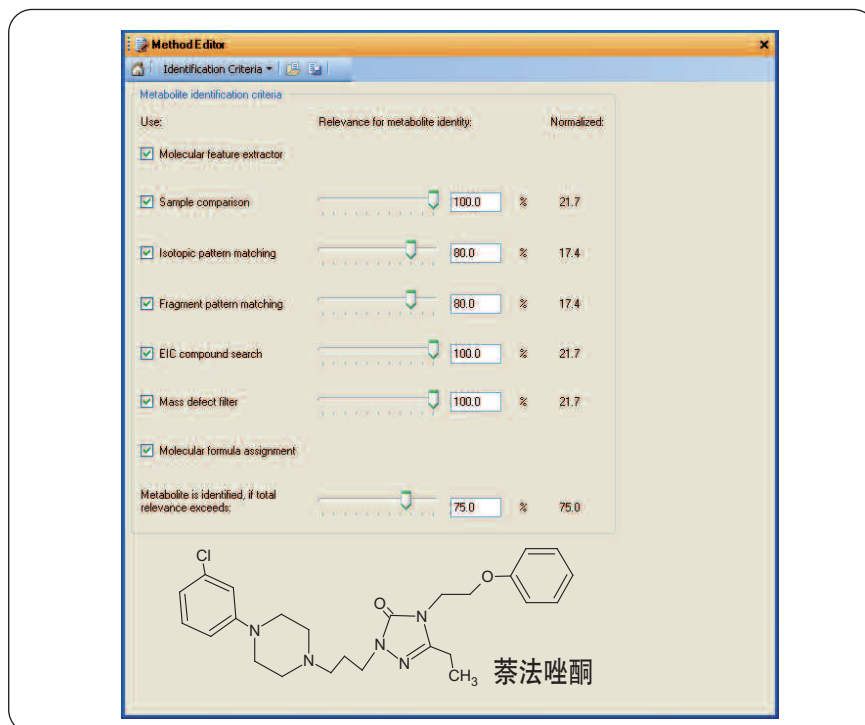


图 2
每个单独算法的代谢物相关性得分, 以及加权总体鉴定相关性得分临界值的设置

数据分析

数据分析的第一步包括化合物结构式的引入和分子量的计算, 然后对包含代谢物化合物 (样品, 孵育时间 $t>0$) 的数据文件和只有母体药物 (对照, 孵育时间 $t=0$) 的数据文件进行比较。在该比较中, 采用分子特征提取 (MFE) 算法将所有检测到的质量信号从 MS 数据中提取出来。相关化合物的同位素质量和加合质量被分组到离散的分子特征里, 从而消除了化学干扰。然后将代谢样品的化合物列表与对照进

行比较。代谢样品中新的或增加的所有化合物均被视为潜在的代谢物, 并采用用户可设置的不同算法对它们进行进一步分析 (图 2)。这些算法可以对新的代谢物进行鉴定和定性, 或者仅对由其它算法发现的代谢物进行定性。将所有代谢物鉴定算法的结果加权并整合为最终的鉴定相关性得分。当它们的最终得分高于定义的相关性临界值时, 我们即可定性相应代谢物。我们将所有算法的结果汇总到结果一览表中, 便于进行检查。

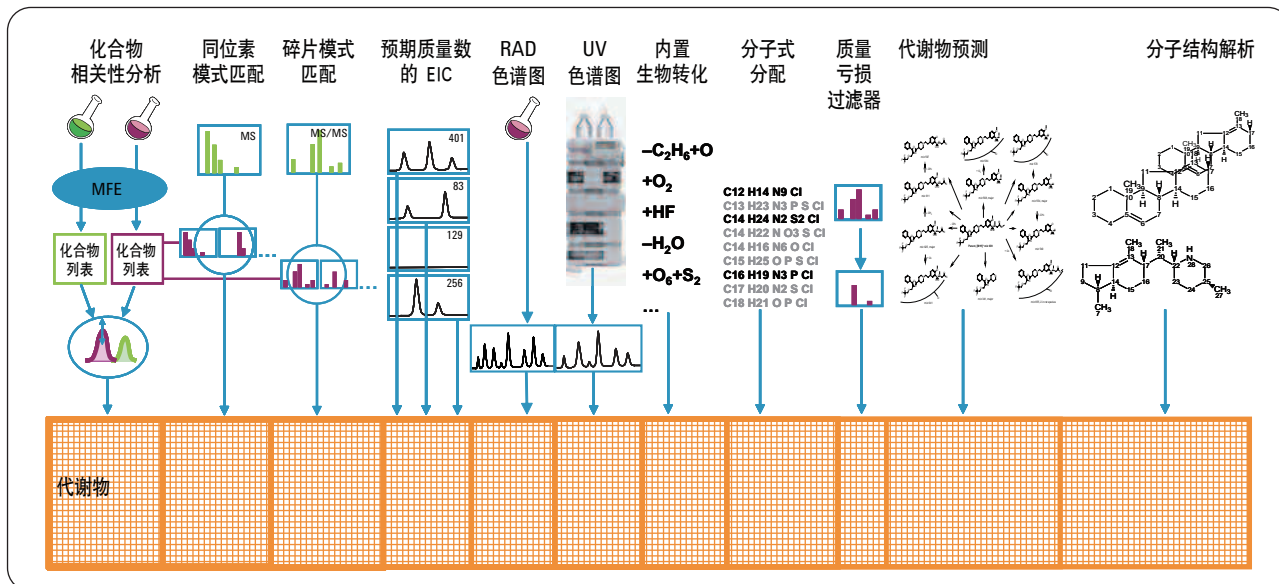


图 3 代谢物鉴定软件工作流程，在此展示了不同的数据分析算法。每当发现了一个新的代谢物，就在表中新添加一行。在表中添加列来确认现有代谢物，并且列出单个算法的结果

结果与讨论

使用交织多算法的代谢物鉴定工作流程（图 3）生成了潜在代谢物的结果表。使用了多个不同的步骤对代谢物进行鉴定。每当发现了一个新的代谢物，就在表中新添加一行。对于发现或定性潜在代谢物的各单独算法，在结果表中新加一列来显示结果。下述几点描述了各单独算法及其生成最终结果表时的交互作用。

Control				Metabolite			
Cpd	Vol.	Mass	RT	Cpd	Vol.	Mass	RT
				22	12372377	501.2137	6.084
				23	8829556	501.2140	6.160
				24	333526	451.2578	6.447
				25	540594	501.1779	6.552
6	818180	272.1599	6.552				
7	182866	451.2586	6.805				
				26	152763	287.1267	7.049
				27	1725493	305.1374	7.049
				28	99662	343.0843	7.049
				29	281726	327.1192	7.050
				30	218708	313.1390	7.114
				31	1198567	291.1575	7.122

图 4 分别在质量数 451.2578 和 501.2140 处的二羟基和脱氯代谢物的对照和代谢样品间的比较表

1. 样品-对照比较（图 4）- 在样品比较表中，代谢样品（时间 > 0，母体药物被代谢）中发现的化合物与对照（时间 = 0）进行比较，并且根据其质量数和保留时间排列。这样可以同时检测到代谢样品中预期和意外的代谢物

- 同位素模式匹配 (图 5) – 将来自预期生物转化的代谢物的同位素模式与母体药物生物转化的理论同位素模式进行比较, 同时, 将意外代谢物的同位素模式与母体药物的理论同位素模式进行比较
- 碎片模式匹配或 MS/MS 相关性分析 (图 6) – 该程序将每个潜在代谢物的 MS/MS 谱图与母体药物的 MS/MS 谱图进行关联。使用该程序可检测和直观地查看由生物转化造成的碎片离子质量数偏移

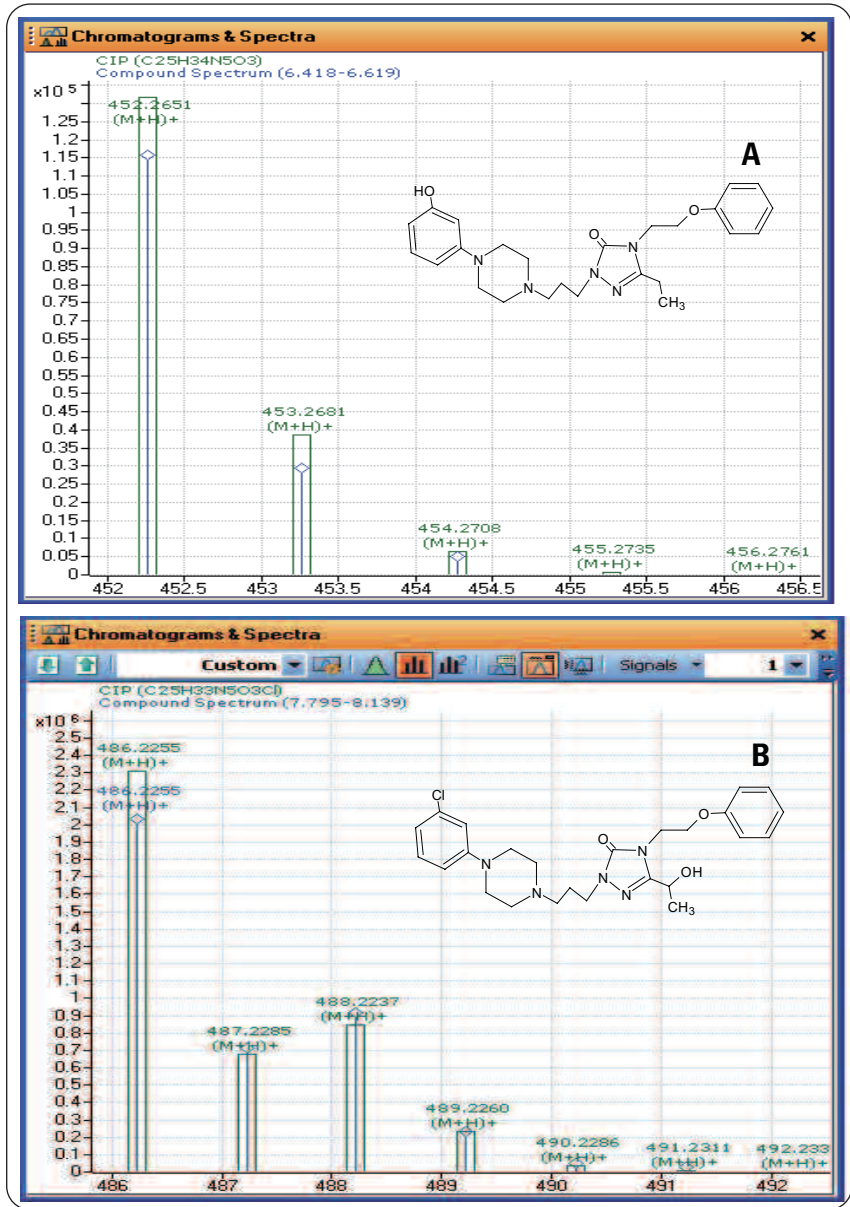


图 5
A) 通过与母体药物分子经生物转化计算的同位素模式 (CIP) 进行对比对脱氯代谢物进行同位素模式匹配
B) 通过与氯化母体药物计算的同位素模式进行对比对氯化羟基代谢物进行同位素模式匹配

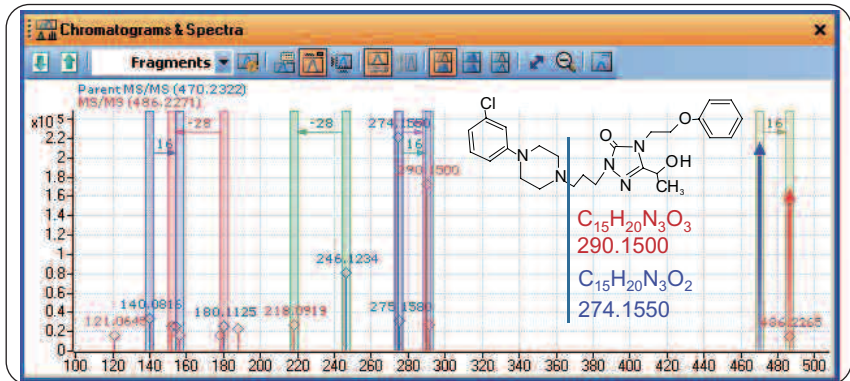


图 6
利用生物转化质量数偏移分配对质子化母体药物 (m/z 470.2323) 和质子化羟基代谢物 (m/z 486.2265) 进行 MS/MS 碎片模式匹配。对于羟基化代谢反应, 来自母体药物的 MS/MS 碎片离子 m/z 274.1550 在质量数偏移 15.9999 后, 于 m/z 290.1500 处出现关联。

4. 色谱图的提取 (图 7) – 包括从数据中直接生成提取离子色谱图 (EIC), 以及从提取的分子特征中生成提取化合物色谱图 (ECC)

5. 在 RAD (放射性检测) 色谱图中进行化合物搜索 (本文未作介绍)

6. 在 UV (紫外) 色谱图或其它检测方法中进行化合物搜索 (本文未作介绍)

7. 生物转化标记 (图 6 和 10) – 通过将母离子质量数偏移与已知生物转化表进行比较来确证预期代谢物, 这些化合物将在结果表中以生物转化反应的名称进行标记 (图 10)

8. 分子式分配 (图 8 和 9) – 根据只有一种元素组成适合测定的产物精确质量数, 以及该相同元素组成的子集必须能够解释产物 MS/MS 图谱中的碎片质量及其中性丢失的假设进行分子式分配

9. 质量亏损过滤器 – 质量亏损在定义的母体药物质量亏损窗之外的潜在代谢物将被过滤掉

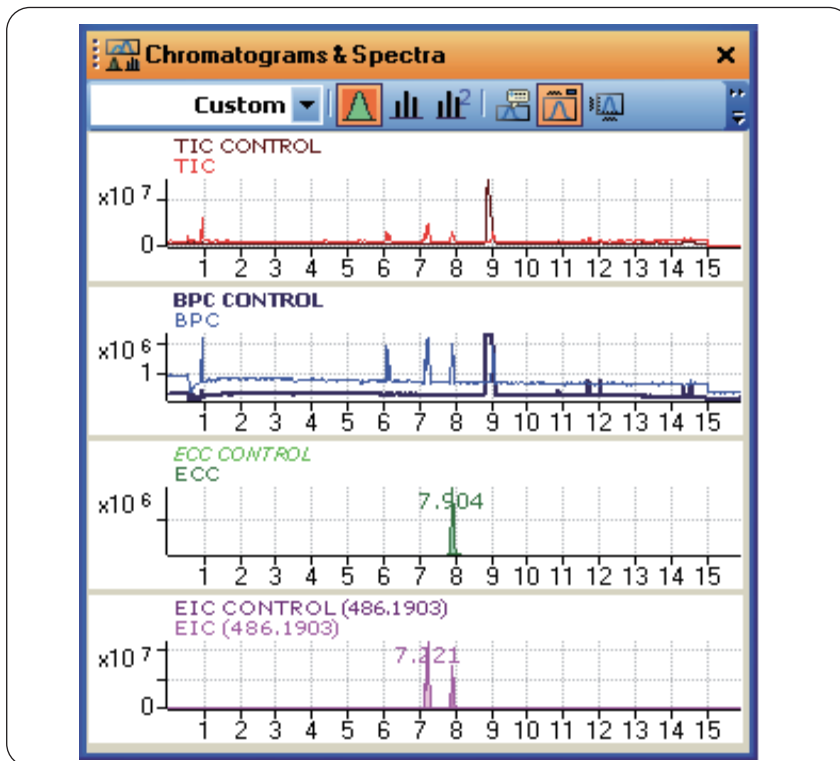


图 7

对于对照和代谢样品, 提取离子色谱图 (EIC) 可直接从测定数据中获得, 而提取化合物色谱图 (ECC) 从提取分子特征中获得 – 此处展示的是分别在 7.2 和 7.9 min 保留时间处 m/z 486.1903 的两种不同羟基代谢物。对照样品中不存在这两种代谢物

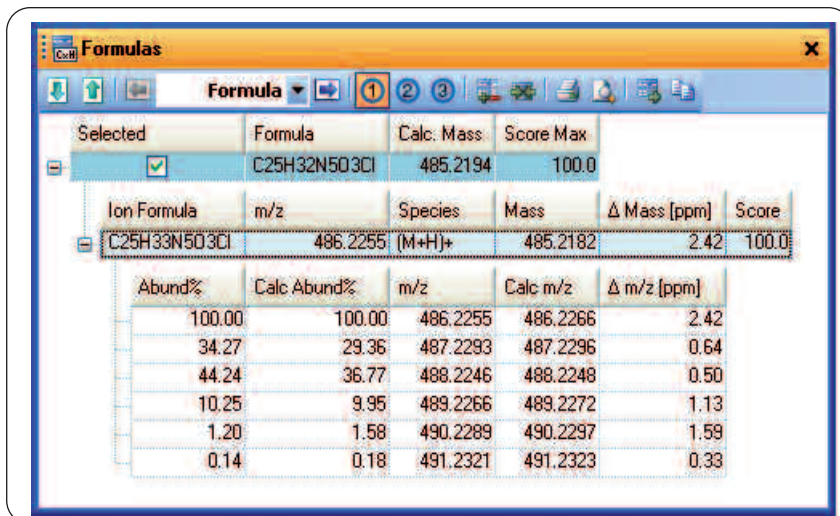


图 8

计算得出的最高得分羟基代谢物的分子式, 以及同位素模式的丰度和质量数。计算得出的相对质量数误差为 2.42 ppm

10. 代谢物预测 – 手工或计算机辅助预测的代谢物结构被分配给结果表中鉴定的化合物

11. 分子结构解析 – 综合所有数据用于结构解析和分子式分配

12. 生成最终代谢物结果表 (图 10):
将鉴定的代谢物汇总到结果表中, 该表列出了化合物的主要信息和各个单独算法对其的定性, 以及其它可利用的信息。还可以生成和报告更为详细的结果表

m/z	Formula	Calc Mass	Δ Mass [ppm]	Loss Formula	Loss Mass
152.0816	C7H9N3O	151.0746	1.78	C18H23N2O2Cl	334.1448
156.0762	C6H9N3O2	155.0695	3.27	C19H23N2OCl	330.1499
178.0972	C9H11N3O	177.0902	1.76	C16H21N2O2Cl	308.1292
188.1065	C12H13NO	187.0997	2.68	C13H19N4O2Cl	298.1197
218.0919	C11H11N3O2	217.0851	2.11	C14H21N2OCl	268.1342
290.1500	C15H19N3O3	289.1426	-0.20	C10H13N2Cl	196.0767

图 9

m/z 486.2255 处质子化羟基代谢物的 MS/MS 碎片测定质量数和计算得出的碎片分子式。展示了丢失质量数以及计算得出的丢失碎片分子式。计算得出 m/z 290.1500 处碎片的相对质量数误差为 -0.20 ppm

结论

对 QTOF MS 和 MS/MS 数据应用多种交织算法, 采用计算机辅助的方法对药物化合物奈法唑酮的代谢物进行自动化鉴定。基于分子特征提取 (MFE) 对代谢样品和对照进行比较以提取代谢物。我们可以采集到低个位数相对质量数误差的高质量

数准确度 MS 和 MS/MS 数据, 并将其用于分子式生成 (MFG)。在最终的结果一览表中, 针对鉴定的代谢物生成了总体相关性得分, 它是由各算法的相关性得分加权计算得来的。

Metabolites						Sample Co...	EIC Co...	Mass D...	Isotopic...	Fragmen...	Biotran...	Formulas	MS/MS...
Name	RT	Mass	m/z	Qualified	Relevance	Qualified	Qualified	Qualified	Qualified	Qualified	Assigned	Assigned	MS/MS
1	Oxidative Dechlorination	6.447	451.2578	452.2651	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	Methylene to Ketone	9.109	483.2032	484.2105	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	Hydroxylation and Ketone Formation	7.284	499.1974	500.2047	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	Hydroxylation	7.215	485.2181	486.2254	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	Hydroxylation	7.904	485.2182	486.2255	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	3x Hydroxylation	4.369	517.2082	518.2155	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	2x Hydroxylation	5.455	501.2136	502.2209	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	2x Hydroxylation	6.084	501.2137	502.2210	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

图 10

所有定性代谢物的最终结果表, 均与已知的生化代谢反应相关。得自算法“样品-对比较”、“同位素模式匹配”、“碎片模式匹配”和“质量亏损过滤器”的定性结果标记为绿色。其它信息如“分配的生物转化 2”, “计算的分子式”和“适用的 MS/MS”谱图标记为蓝色。可以使用相同的算法从数据中提取与已知生物转化不相关的代谢物

参考文献

1.

Hopfgartner G., Chernushevich I. V., Covey T., Plomley J. B., Bonner R., "Exact mass measurement of product ions for the structural elucidation of drug metabolites with a tandem quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10, 1305-1314, **1999**.

2.

Peterman S. M., Duczak J. N., Kalgutkar A. S., Lame M. E., Soglia J. R., "Application of a linear ion trap/orbitrap mass spectrometer in metabolite characterization studies: Examination of the human liver microsomal metabolism of the non-tricyclic anti-depressant nefazodone using data-dependent accurate mass measurement", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17, 363-375, **2006**.

Edgar Nägele 是应用化学家，*Frank Wolf*、*Uwe Nassal*、*Rainer Jäger* 和 *Karina Subramanian* 是软件研发科学家，*Horst Lehmann* 和 *Frank Kuhlmann* 是产品经理，他们均来自位于德国瓦尔德布隆的安捷伦科技公司。

www.agilent.com/chem/cn

© 2007 安捷伦科技公司

2007 年 9 月 1 日出版
出版号 5989-7375CHCN