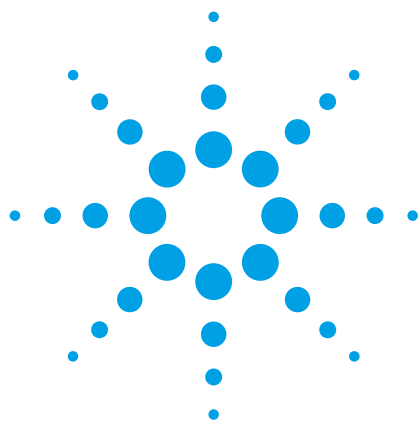




药物的主要代谢产物软件辅助下高通量鉴定

用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱、飞行时间和四极杆-飞行时间仪器快速采集数据，并用安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件对代谢物进行鉴定

应用报告

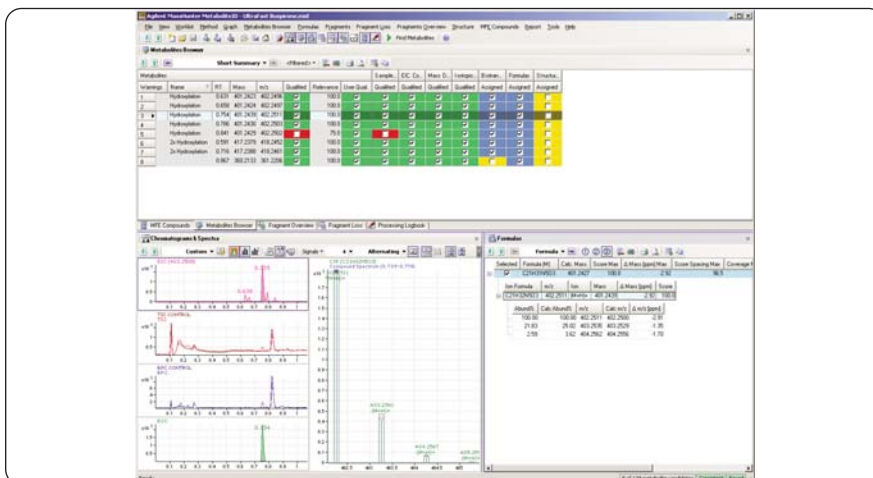
药物研究与开发中代谢产物的鉴定

作者

Edgar Naegele

安捷伦科技公司

Waldbronn, Germany



摘要

本应用报告报导了：

- 用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统对体外试验获得的代谢物进行快速分离
- 用 Agilent 6530 精确质量四极杆飞行时间液质联用系统快速采集飞行时间质谱图
- 用安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件对体外试验的主要代谢物进行软件辅助下的快速鉴定
- 用安捷伦 MassHunter 软件对鉴定出的代谢物生成报告



Agilent Technologies

前言

在现代药物开发中，至关重要的是对可能的候选新药的吸收、分布、代谢和排泄（统称为 ADME）性质进行分析，以便尽快确定是否继续对特定化合物的开发投入经费。要找到具有合适性质的化合物，首先要在大量化合物中进行 ADME 性质筛查，这要求在高通量环境下工作。本应用报告报导了用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统、Agilent 6530 四极杆-飞行时间质谱系统和 MassHunter 代谢物鉴定软件对新药候选化合物的主要代谢物进行的快速、高通量鉴定。

实验

仪器

- Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，由集成式脱气的 1290 Infinity 二元泵、1290 高效恒温自动进样器，和 1290 Infinity 柱温箱组成。
- Agilent 6530 精确质量四极杆-飞行时间液质联用系统
- 安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定 (MetID) 软件
- 色谱柱：ZORBAX SB-C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m

样品制备

使用下列储备溶液：

- 20 mg/mL 微粒体 S9 的制备
- 0.1 mg/mL 丁螺环酮水溶液
- 1.6 mg NADP 溶于 1.6 mL 0.1 M 磷酸盐缓冲液，pH 为 7.4

- 50 mM 异柠檬酸盐/MgCl₂(将 203 mg MgCl₂·6H₂O + 258.1 mg 异柠檬酸盐溶于 20 mL 水中)
- 异柠檬酸脱氢酶 0.33 unit/ μ L

NADPH 再生系统：1.6 mL NADP 溶液 + 1.6 mL 异柠檬酸盐溶液 + 100 μ L IDH 溶液。

保温混合物：3.85 μ L 底物 + 200 μ L NADPH 再生系统+ 746.15 μ L 磷酸盐缓冲液+ 50 μ L S9。

37 °C 下保温 60 分钟。在开始 (t=0) 和终止 (t=60 分钟) 时各取 100 μ L。加入 6 μ L 高氯酸和 100 μ L 乙腈在 14,000 rpm 下离心 15 分钟后终止反应。用 SpeedVac 浓缩仪蒸干上清中的溶剂，再用含 0.1 %甲酸的水复溶，进行 LC/MS 分析。用 0 保温时间的样品进行对照。

LC 方法

溶剂 A： 水+ 0.1 % 甲酸
溶剂 B： 丙烯腈 + 0.1 % 甲酸
流速： 0.8 mL/min
梯度 0 分钟， 5 %B； 0.10 分钟， 5 %B； 1.10 分钟， 75 %B；
停止时间： 1.1.0 分钟
平衡时间： 1 分钟
进样： 进样量 5 μ L，样品在 4 °C 冷却，用 50 % 甲醇冲洗针头 5 秒，在 0.1 分钟时从进样环转至旁路冲洗，冲洗因子为 16
色谱柱： 柱温为 60 °C

飞行时间质谱方法

离子源： ESI 正离子
毛细管电压： 3500 V
干燥气体： 12 L/min
雾化器： 55 psi
气体温度： 350 °C
锥孔电压： 65 V
碎裂电压： 200 V
质量范围： 100-1000 m/z
采集速率： 5 图谱/秒
参考质量数： 121.0508 和 922.0080

MetID 软件中的数据分析方法

分析的第一步就是将含代谢物（代谢样品）的数据文件和只含母体药物（对照样品）的数据文件进行对比，用分子特征提取（MFE）算法从达到 MS 限的数据中提取所有检测到的质量信号。将相关的化合物同位素质量和加合质量均归为离散的分子特征，并去除化学噪音。然后对代谢样品和对照组所列出的化合物进行比较。

所有新的或那些在代谢样品中增加 2 倍的化合物均被认为是潜在代谢物，要用不同的算法再进一步进行分析。这些算法可以鉴定和验证新代谢物，或只是对其它算法找到的代谢物进行验证。在这个高通量实验中，所有算法的结果都权重相当，结合在一起形成最后的鉴定关联分值。当其最后的分值在严格定义的关联阈值之上时就确定为代谢物。所有算法得到的结果列在一张结果表中，可以随时浏览和出报告¹。

结果和讨论

在 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统上采用 1 分钟梯度洗脱就可在一根 50 mm、1.8 μm 粒度柱上实现代谢物的快速分离。代谢物由测试药物丁螺环酮体外试验产生。飞行时间质谱仪检测的数据采集速率为 5 Hz 时可得到满意的检测结果。

数据生成后即被载入 MetID 软件，并用通用方法进行分析。MetID 软件将结果列在快速一览表中，在该表中可以查找到每个代谢物结果的更多信息（图 1）。从结果列表可以生成总结报告，显示每个代谢物的可用信息（图 2）。更详细的报告包含了每个代谢物的详细结果。这里以丁螺环酮的单羟基代谢物（图 3 到图 5）和二羟基代谢物（图 6 到图 8）为例进行讨论。

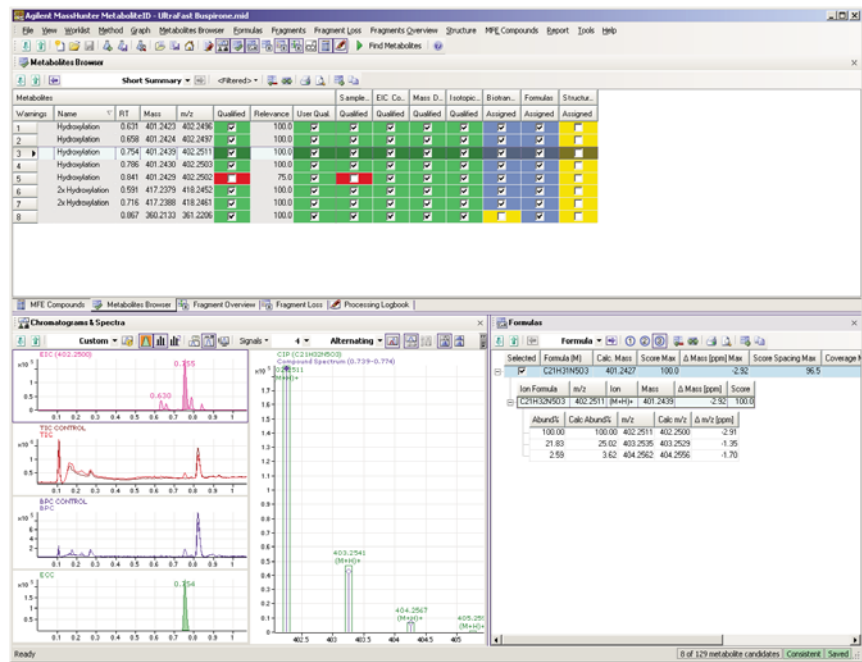


图 1 结果列表中显示了丁螺环酮代谢物分析的一览总结，包括全部鉴定出的代谢物、提取离子色谱图（EIC）、提取的化合物色谱图（ECC）、同位素分布模式分析和计算分子式

名称	质量	保留时间	Rel.	根据分值认定	用户认定	对照样品比较	同位素分布匹配	提取离子色谱图	质量缺损过滤器	计算分子式	BioXF
二次羟基化	417.2379	0.59	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
羟基化	401.2423	0.63	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
羟基化	401.2424	0.66	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
二次羟基化	417.2388	0.72	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
羟基化	401.2439	0.75	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
羟基化	401.2430	0.79	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
丁螺环酮	385.2478	0.82	—	—	—	—	✓	✓	✓	✓	—
羟基化	401.2429	0.84	75.00	×	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓

图 2 结果总结报告，包括按保留时间（RT）、代谢物名称和相对分值、分子量及各种计算结果通过的用户权限。SC= 对照样品比较，IPM = 同位素分布匹配，EIC = 提取离子色谱图，MDF = 质量缺损过滤器，Form. = 计算分子式，BioXF = 指定的生物转化，Qual. = 根据分值认定，User = 用户认定

在 0.75 分钟后出峰质核化为 402.2511 的单羟基代谢物的详细报告，显示了该代谢物本身的详细信息，例如测定的精确质量、计算分子式、制定的生物转化和离子类型。另外，报告还显示了每种算法的详细信息，这些算法包括分子特征提取（MFE）、提取离子色谱图（EIC）化合物检索和质量缺损过滤器结果等（图 3）。对于羟基代谢物，可能的分子式的计算不仅基于定义的质量误差窗口，而且还根据测量的同位素形态，从而提高了化合物分子式的质量，显著限制了命中的可能数量。这些结果还在代谢物结果详细报告中以化学形式显示（图 4）。

<u>Metabolite Information</u>							
Name	Hydroxylation	BioXF Name	Hydroxylation				
Formula	C21H31N5O3	Mass	401.2439				
m/z	402.2511	Species	(M+H)+				
RT	0.754	Sample Type	MetaboliteSample				
<u>MFE Compound Search</u>							
Mass	m/z	Species	RT	Start Time	End Time	Volume	Height
401.2439	402.2511	(M+H)+	0.754	0.739	0.774	192448	187344
<u>EIC Compound Search</u>							
Mass	m/z	Species	RT	Start Time	End Time	Area	Area %
401.2427	402.2500	(M+H)+	0.755	0.739	0.774	149323	100.00
<u>Sample Comparison Results</u>							
Qualified	Changed	Resp. Ratio	Corr. RT	Normalized Height			
☒	New						
<u>Isotopic Pattern Matching Results</u>							
Qualified	Score	Delta m/z					
☒	95.91	0.00					
<u>Mass Defect Filter Results</u>							
Qualified	Delta Mass [mDa]						
☒	-3.91						
<u>Formula Results</u>							
Assigned	Neutral Formula	Calc. Mass	Delta Mass [mDa]	Delta Mass [ppm]	Calculation Base		
☒	C21H31N5O3	401.2427	-1.17	-2.92	MfeCompoundMsSpectrum		
<u>Biotransformation Results</u>							
Assigned	Name	Phase	Offset Formula	Delta Mass [mDa]	Delta Mass [ppm]	Calc. Mass	
☒	Hydroxylation	I	+O	1.17	2.92	401.2427	

图 3
保留时间 0.75 分钟处的丁螺环酮羟基代谢物详细代谢物报告。报告的这部分给出了有关鉴定的代谢物和鉴定计算方法的详细信息。还有关于计算式（图 4）、色谱图和同位素分布（图 5）的其它详细信息

Metabolite Information

Name	Hydroxylation	BioXF Name	Hydroxylation
Formula	C21H31N5O3	Mass	401.2439
m/z	402.2511	RT	0.754

Formula Summary

Selected	Score	Formula	Ion Formula	Mass	Calc. Mass	Δ Mass [ppm]
TRUE	100.0	C21H31N5O3	C21H32N5O3	401.2439	401.2427	-2.92

Formula Details

Formula (M)	Selected
C21H31N5O3	TRUE
Species	m/z
(M+H)+	402.2511

Formula Results

Ion Formula	Score	Mass	Δ Mass [mDa]	Δ Mass [ppm]	DBE
C21H32N5O3	100.0	401.2439	-1.17	-2.92	9

Isotopic Peak Information

Abund %	Calc Abund%	m/z	Calc m/z	Δ m/z [ppm]
100.00	100.00	402.2511	402.2500	-2.91
21.83	25.02	403.2535	403.2529	-1.35
2.59	3.62	404.2562	404.2556	-1.70

图 4
关于包含同位素分布的分子式的详细代谢物报告，包括同位素分布、对保留时间为 0.75 分钟处丁螺环酮羟基代谢物的计算

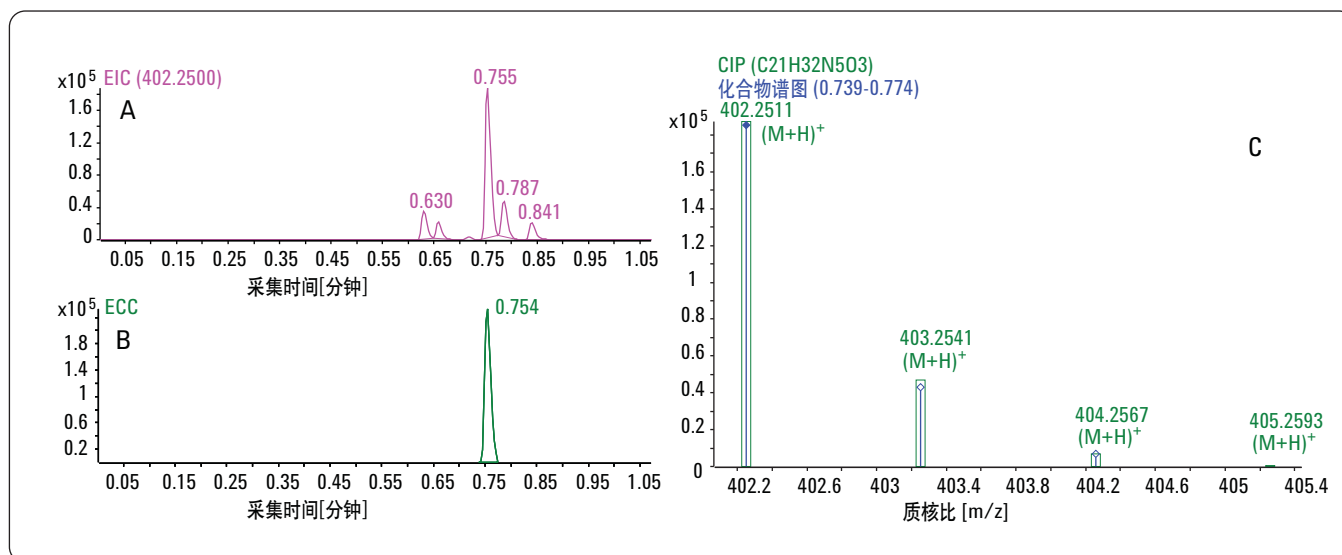


图 5

保留时间 0.75 分钟处丁螺环酮羟基代谢物的详细报告：

A) 质量 402.25 的化合物的提取离子色谱图 (EIC)

B) 保留时间 0.75 分钟丁螺环酮羟基代谢物的提取化合物色谱图 (ECC)

C) 保留时间 0.75 分钟丁螺环酮羟基代谢物测量的同位素形态 (蓝线) 和计算的同位素形态 (CIP, 绿框)

最后，显示了 EIC、ECC 和同位素形态 (图 5)。m/z 质核比为 402.25 的 EIC 显示丁螺环酮可能的羟基代谢物有 5 个峰，从中选择了保留时间为 0.75 分钟的一个组分 (图 5A)。保留时间 0.75 分钟分子质量为 401.2439 的提取 MFE 化合物的 ECC，与 TIC 相同 (图 5B)。该化合物测定的同位素形态与基于分子式计算的同位素形态完全符合 (图 5C)。

在同一数据分析中，还鉴定出了比单羟基代谢物低两个数量级的二羟基代谢物。详细报告显示了二羟基代谢物的具体信息，该组分于 0.71 分钟洗脱，m/z 为 418.2461，图 6 中还显示了每种计算的详细信息 (图 6)。

Metabolite Information							
Name	2x Hydroxylation	BioXF Name	2x Hydroxylation				
Formula	C21H31N5O4	Mass	417.2388				
m/z	418.2461	Species	(M+H)+				
RT	0.716	Sample Type	MetaboliteSample				
MFE Compound Search							
Mass	m/z	Species	RT	Start Time	End Time	Volume	Height
417.2388	418.2461	(M+H)+	0.716	0.700	0.726	3865	3889
EIC Compound Search							
Mass	m/z	Species	RT	Start Time	End Time	Area	Area %
417.2376	418.2449	(M+H)+	0.713	0.703	0.739	3483	100.00
Sample Comparison Results							
Qualified	Changed	Resp. Ratio	Corr. RT	Normalized Height			
☒	New						
Isotopic Pattern Matching Results							
Qualified	Score	Delta	m/z				
☒	91.50		0.00				
Mass Defect Filter Results							
Qualified	Delta Mass [mDa]						
☒	-8.97						
Formula Results							
Assigned	Neutral Formula	Calc. Mass	Delta Mass [mDa]	Delta Mass [ppm]	Calculation Base		
☒	C21H31N5O4	417.2376	-1.20	-2.87	MfeCompoundMsSpectrum		
Biotransformation Results							
Assigned	Name	Phase	Offset Formula	Delta Mass [mDa]	Delta Mass [ppm]	Calc. Mass	
☒	2x Hydroxylation	I	+O2	1.20	2.87	417.2376	

图 6

保留时间 0.71 分钟的丁螺环酮二羟基代谢物的详细代谢物报告。报告的这部分给出了有关鉴定的代谢物和鉴定计算方法的详细信息。还有关于分子式 (见图 7)、色谱图和同位素类型 (见图 8) 的其它详细信息

分子式的计算列于详细的分子式报告中 (图 7)。

m/z418.24 的 EIC 显示丁螺环酮可能的二羟基代谢物有 5 个峰, 选择了保留时间 0.71 分钟的一个组分 (图 7A)。保留时间为 0.71 分钟分子质量为 417.2388 的提取 MFE 化合物的 ECC 与 TIC 一致 (图 7B)。该化合物测定和计算的同位素类型见图 7C。

Metabolite Information

Name	2x Hydroxylation	BioXF Name	2x Hydroxylation
Formula	C21H31N5O4	Mass	417.2388
m/z	418.2461	RT	0.716

Formula Summary

Selected	Score	Formula	Ion Formula	Mass	Calc. Mass	Δ Mass [ppm]
TRUE	100.0	C21H31N5O4	C21H32N5O4	417.2388	417.2376	-2.87

Formula Details

Formula (M)	Selected
C21H31N5O4	TRUE
Species	m/z
(M+H)+	418.2461

Formula Results

Ion Formula	Score	Mass	Δ Mass [mDa]	Δ Mass [ppm]	DBE
C21H32N5O4	100.0	417.2388	-1.20	-2.87	9

Isotopic Peak Information

Abund %	Calc	Abund%	m/z	Calc m/z	Δ m/z [ppm]
100.00		100.00	418.2461	418.2449	-2.86
23.90		25.06	419.2488	419.2478	-2.35

图 7
关于分子式的详细代谢物报告, 包括同位素分布、对保留时间 0.71 分钟处丁螺环酮羟基代谢物的计算

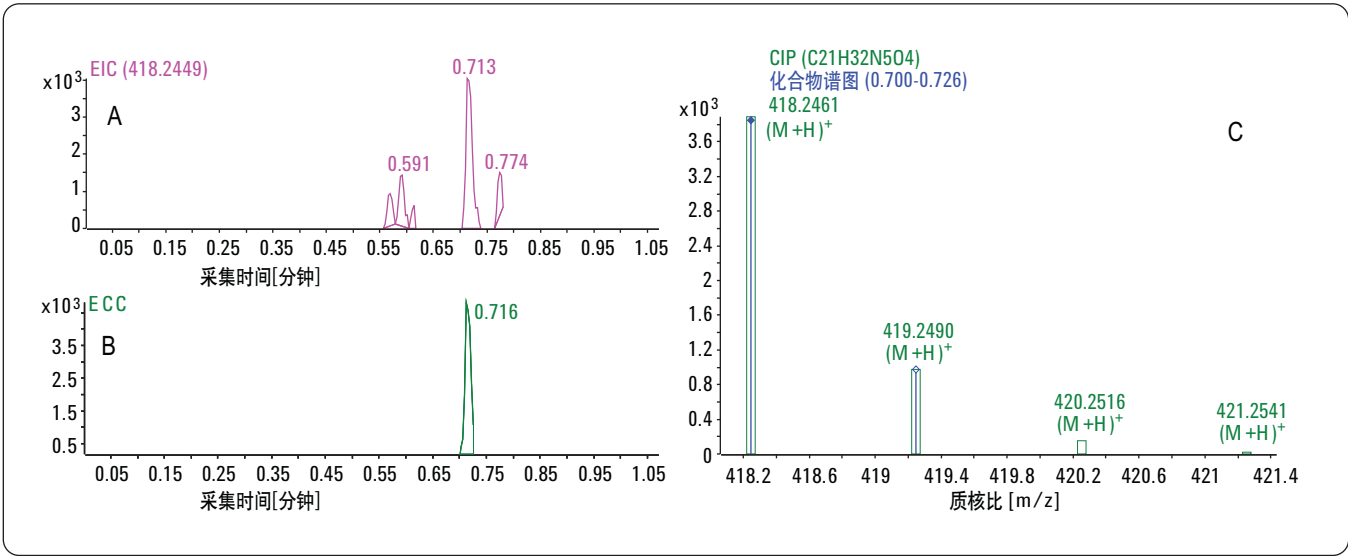


图 8
保留时间 0.71 分钟处丁螺环酮二羟基代谢物的详细报告：
A) 质量为 418.24 的化合物提取离子色谱图 (EIC)
B) 保留时间 0.71 分钟处丁螺环酮二羟基代谢物的提取化合物色谱图 (ECC)
C) 测量的保留时间 0.71 分钟处丁螺环酮羟基代谢物测量与计算的同位素分布

结论

本应用报告介绍了用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 四极杆-飞行时间液质联用系统，在高通量条件下，对体外代谢物样品的快速分离和精确质量进行测定。代谢物化合物在 1 分钟之内实现分离，代谢物鉴定软件提取的峰宽不到 1 秒 (FWHH)。用安捷伦代谢物鉴定软件快速鉴定了主要代谢物，并生成了总报告及每个代谢物的详细报告。

参考文献

1.

E. Naegele, F. Wolf, U. Nassal, R. Jäger, H. Lehmann, F. Kuhlmann, K. Subramanian, "An interwoven, multi-algorithm approach for computerassisted identification of drug metabolites", *Agilent Technologies Application Note, publication number 5989-7375EN*, **2007**.

www.agilent.com/chem/metid

© 安捷伦科技公司，2009
2009 年 5 月 1 日中国印刷
发行号 5989-9924CHCN



Agilent Technologies