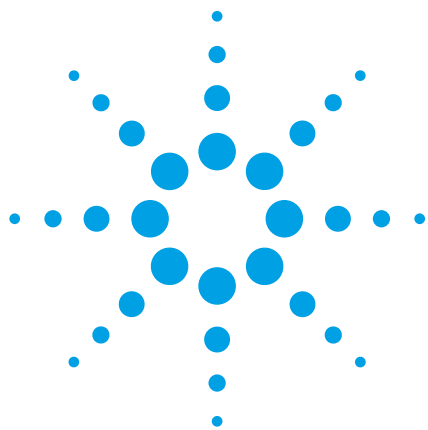




利用 Agilent 1290 Infinity LC / 6530 Q-TOF MS 液质联用系统和代谢物预测专家软件 Meteor 进行药物代谢物的鉴定

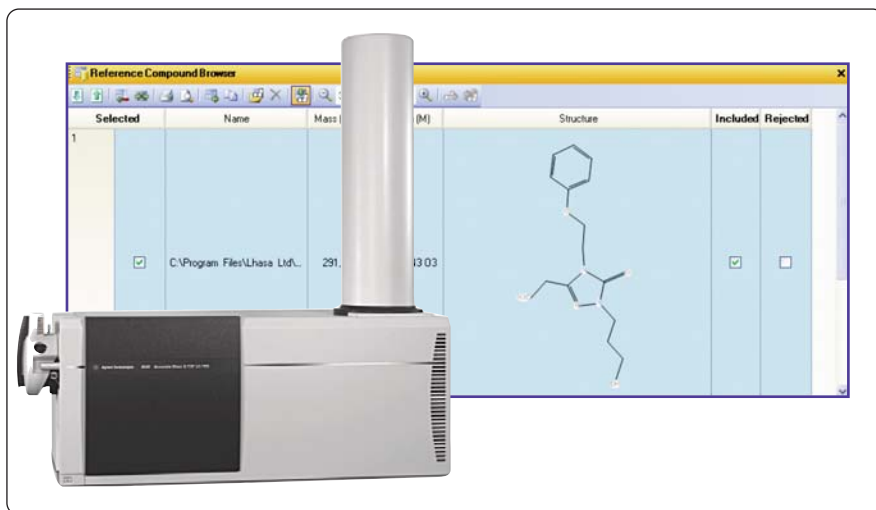
应用简报

医药，药物发现

作者

Edgar Naegele, Horst Lehmann
Agilent Technologies GmbH
Hewlett-Packard St. 8
76337 Waldbronn
Germany

Sian E. Ives, Kate Langton,
Lhasa Limited,
22-23 Blenheim Terrace
Woodhouse Lane
Leeds LS2 9HD United Kingdom
www.lhasalimited.org/meteor



摘要

本应用简报介绍了

- 利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱进行药物代谢物分离
- 利用 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF 液质联用系统生成质谱数据
- 将代谢物预测专家软件 Meteor 得到的结果(Lhasa Limited, Leeds, UK)导入到安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件
- 安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件辅助代谢物鉴定



Agilent Technologies

前言

在药物代谢过程中，可能生成大量的代谢物。其中一些代谢物来源于单一的轻微反应，因此比较容易预测和鉴定。然而，有些代谢反应能够将药物分子裂解为多个不同的片段并引发进一步反应，从而显著改变药物分子的特性。手动分析是很难预测和鉴定这类代谢物的。代谢物预测软件提供了这个问题的解决方案。

本应用简报介绍了使用代谢物预测软件包（Lhasa 有限公司，利兹，英国）及安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件预测和鉴定药物代谢物的方法。

实验

仪器

Agilent 1290 Infinity 液相系统，带内置脱气机的 1290 Infinity 泵

Agilent 1290 Infinity 温控自动进样器

Agilent 1290 Infinity 柱温箱

Agilent 6530 精确质量 Q-TOF 液质联用系统

色谱柱：安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度色谱柱 (RRHD) SB-C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm

样品制备

储备液

磷酸盐缓冲液 100 mM, pH 7.4; 5 mM MgCl₂

250 μM 的盐酸奈法唑酮磷酸盐缓冲液 (图 1)

10 mg/mL 的还原型辅酶 II (NADPH) 磷酸盐缓冲液

小鼠肝脏微粒体酶 S9，蛋白浓度 20 mg 蛋白/mL

代谢物样品

1. 在 1.5 毫升的 Eppendorf 管中加入 180 μL 磷酸盐缓冲液和 25 μL 奈法唑酮储备液
2. 加入 15 μL 小鼠肝脏微粒体酶 S9 和 30 μL NADPH 储备液
3. 涡旋振荡并在 37 °C 下孵育 1 小时
4. 加入 750 μL 的冷乙腈中止反应，14000 rpm 离心 15 分钟
5. 将上清液移入至新的 1.5 mL Eppendorf 管中，在 SpeedVac 中蒸干
6. 用 250 μL 的流动相 A 复溶

对照样品

1. 在 1.5 毫升的 Eppendorf 管中加入 210 μL 磷酸盐缓冲液和 25 μL 奈法唑酮储备液
2. 加 15 μL 小鼠肝脏微粒体酶 S9 (不加 NADPH，所以不发生代谢反应，只可能发生酶的降解)
3. 涡旋振荡并在 37 °C 下孵育 1 小时
4. 加入 750 μL 的冷乙腈中止反应，14000 rpm 离心 15 分钟

5. 将上清液移入至新的 1.5 mL Eppendorf 管中，在 SpeedVac 中蒸干

6. 用 250 μL 的流动相 A 复溶

液相色谱方法

溶剂 A:	水 + 0.1% 甲酸	
溶剂 B:	乙腈 + 0.1 %甲酸	
流速:	0.5 mL/min	
梯度:	0 min	5% B
	15 min	75% B
	15.1 min	95% B
	16 min	95% B
停止时间:	16 min	
后运行时间:	10 min	
进样体积:	5 μL	
样品冷却温度:	4 °C	
洗针:	50% 甲醇，持续 5 秒	
柱温箱温度:	60 °C	

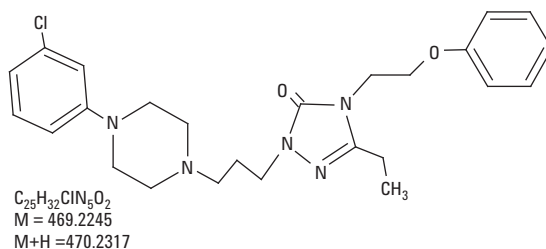


图 1
奈法唑酮的分子式

Q-TOF MS 和 MS/MS 方法

Agilent 6530 Q-TOF 采用 2 GHz 的扩展动态范围模式，采集参数如下：

鞘流气：400 °C, 11 L/min
干燥气：7.0 L/min
干燥气温度：300 °C
雾化器压力：45 psi
质量范围：100-1000
碰撞电压：200 V
锥孔电压：60 V
毛细管电压：3500 V
碰撞能量：30 V

数据相关 MS/MS：2 个化合物，3 个 MS/MS 谱图，排除时间 0.25 分钟

安捷伦喷射流离子聚焦技术，正模式，参比离子为 m/z 121.05087 和 m/z 922.00979

代谢物鉴定软件中的数据分析方法

将代谢物（代谢物样品）的数据文件与母药（对照样品）的数据文件进行比较分析。利用分子特征提取（MFE）功能从一级质谱数据中提取出所有可检测到的质量信号。

然后将相关的化合物同位素峰和加合离子被归类成一个个的分子特征组分，而化学背景噪音则被去除。将代谢物样品的组分峰列表与对照样品的组分峰列表进行比较。相对于对照样品，所有的新化合物或响应上调两倍的化合物被认为是可能的代谢物，并用另外的算法作进一步的分析。这些算法既可以识别和鉴定新化合物，也可以对其他算法发现的代谢物进行简单鉴定。

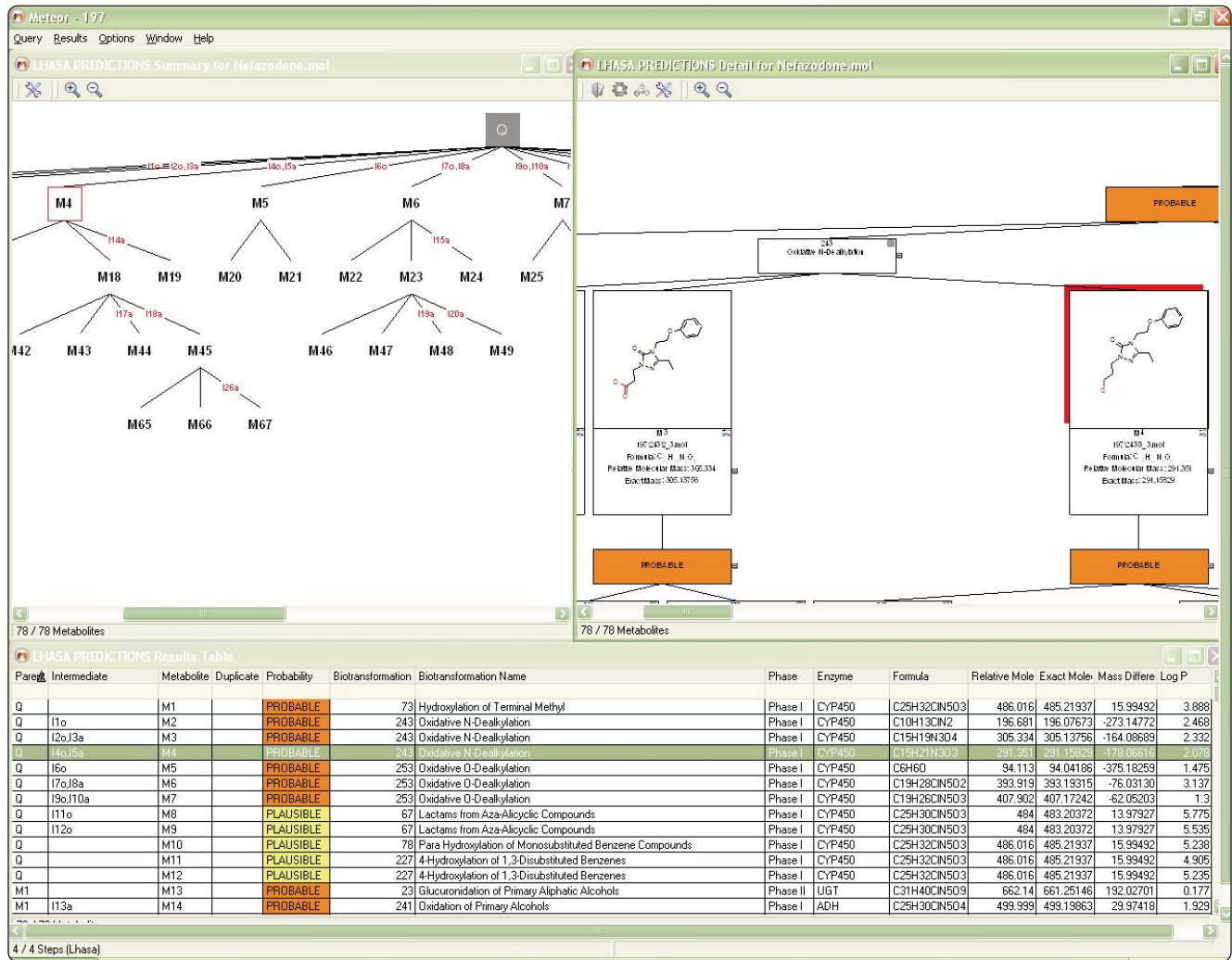


图 2
流星分析软件（Meteor）结果显示

同时，利用流星分析软件（Meteor，第 11 版）在下列限制条件下处理了奈法唑酮数据：

- “不对第二级产物继续预测”
- 绝对推理 '可信'
- 相对推理 'n = 2'

代谢树状图见图 2。代谢物以 SDfile 文件格式存档 (结构数据文件，它包一个或多个化合物的结构信息以及相关的数据)，导入至代谢物鉴定软件中。

在代谢物鉴定软件的化合物库中搜索流星软件生成的 SD 文件，质量匹配的化合物

可以给出相应的化学结构。当最后的分值大于严格定义的相关性阈值时，代谢物将被用户手动鉴定或由软件自动鉴定出来。分析结果以列表的形式总结，便于快速浏览和报告生成。

结果和讨论

代谢物鉴定软件中的生成的结果列表一目了然地显示了所有相关代谢物。

表中左侧显示了代谢物的保留时间信息，分子量及离子的质量数，以及代谢反应和每个不同代谢物的总体接受水平。

表中间的绿色/红色标记部分是不同比较算法的结果。这些算法将可能的代谢物与母体药物进行了比较。如果计算值高于阈值，则用绿色标注为“相关”，并被认为是可能的代谢物。

表的右侧部分，其它的信息用黄/蓝颜色标注。如果存在像 MS/MS 谱图或者参考结构等特殊信息，那么就以蓝色标注（例如，最右侧一栏表示是否有从流星软件得到的结构信息）。

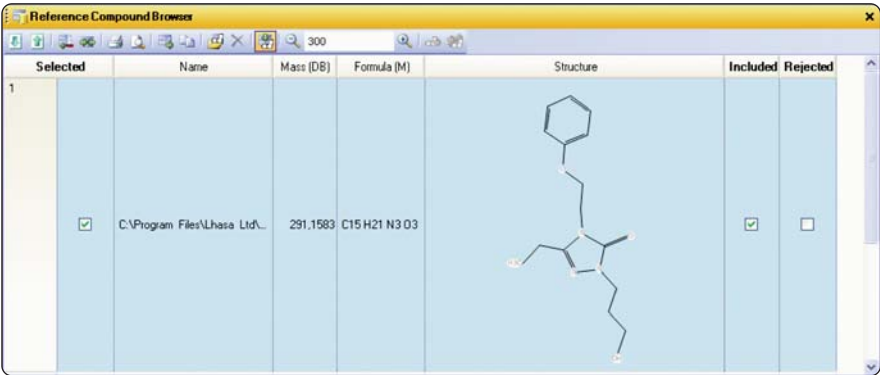
Metabolites Browser														
Short Summary								Sample...	EIC Co...	Isotopic...	Frage...	Formulas	MS/M...	Referen...
Warnings	Name	RT	Mass	m/z	Relevance	User Qual.	Parent	Qualified	Qualified	Qualified	Qualified	Assigned	MS/MS	Assigned
1	3x Hydroxylation	4,242	375,2274	376,2346	62,5	✓	□	✓	✓	□	□	✓	✓	✓
2		4,250	423,1665	424,1737	100,0	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
3		4,356	409,1887	410,1959	79,2	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
4		5,421	517,2092	518,2165	83,3	✓	□	✓	✓	□	✓	✓	□	✓
5		5,627	373,2119	374,2192	62,5	✓	□	✓	✓	□	□	✓	□	✓
6		5,696	423,1677	424,1750	100,0	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
7		5,741	409,1889	410,1962	79,2	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
8		5,800	307,1532	308,1605	62,5	✓	□	✓	✓	□	□	✓	□	✓
9		6,348	407,1734	408,1807	79,2	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
10		6,432	421,1516	422,1588	79,2	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
11	2x Hydroxylation	6,522	321,1324	322,1397	41,7	✓	□	✓	✓	□	□	✓	□	✓
12		6,557	289,1428	290,1501	52,6	✓	□	✓	✓	□	□	✓	□	✓
13		6,582	501,2150	502,2223	79,2	✓	□	✓	□	✓	✓	✓	□	✓
14		6,589	407,1727	408,1799	79,2	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
15	Methylene to Ketone	7,245	483,2059	242,6102	52,6	✓	□	✓	□	□	□	✓	□	✓
16	2x Hydroxylation	7,251	501,2154	502,2226	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓
17	Oxidative Dechlorination	7,611	451,2588	452,2661	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓
18	Demethylation and Hydroxylation	7,657	471,2036	472,2109	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓
19		8,036	305,1371	306,1444	41,7	✓	□	✓	✓	□	□	✓	□	✓
20	Hydroxylation	8,131	291,1590	292,1663	62,5	✓	□	✓	✓	□	□	✓	□	✓
21		8,347	305,1376	306,1448	20,8	✓	□	✓	□	□	□	✓	□	✓
22		8,440	485,2202	486,2275	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓
23		8,442	507,2007	508,2080	100,0	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
24	Hydroxylation and Ketone Formation	8,447	391,1769	196,5957	52,6	✓	□	✓	□	□	□	✓	□	✓
25		8,514	499,1996	500,2069	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓
26	Ethyl to alcohol	8,909	457,1889	458,1961	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓
27	Hydroxylation	9,146	485,2200	486,2273	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓
28		9,146	507,2002	508,2075	100,0	✓	□	✓	✓	✓	□	✓	□	✓
29	Nefazodone	10,262	469,2251	470,2324	79,2	✓	✓	□	✓	✓	✓	✓	□	✓
30	Nefazodone	10,330	469,2247	470,2320	79,2	✓	✓	□	✓	✓	✓	✓	□	✓
31	Methylene to Ketone	10,408	483,2040	484,2113	100,0	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓

图 3
被鉴定代谢物的快速浏览表

正如您看到的，存在一些属于已知代谢反应的代谢物。这些代谢物被称为“预期代谢物”。而另外的一些代谢物，并不是所有的鉴定算法分值都高于设定阈值，被称为“非预期代谢物”。其中一个例子是图 3 中选中的第 20 号化合物，其保留时间为 8.13 min，质荷比为 292.1663。对于这个化合物，其同位素分布算法和 MS/MS 碎裂指纹识别算法的分值都没有高于设定阈值。流星 (Meteor) 软件检索发现一个分子量为 291.1583 的预测代谢物；因此其结构和分子式 (见图 4) 可以被指定到这个非预期代谢物。这个化合物的提取离子流图 (EIC) 和提取化合物图 (ECC) 分别在图 5A 和 5B 中给出。

代谢物的同位素分布和母体药物的同位素分布的比较显示了明显的差异 (图 5C)，代谢物同位素分布的测量值用蓝色表示，母体药物同位素分布的计算值用绿色表示。造成这种变化的原因是含有氯代苯环基团的母体药物 (奈法唑酮) 的某些基团断裂了 (图 1，图 4)。

图 6 为用准确质量数 (误差 2.54 ppm) 确定的代谢物的分子式，即 $C_{15}H_{21}N_3O_3$ 。代谢物的同位素分布也通过准确质量数结果得到确认 (图 6)。



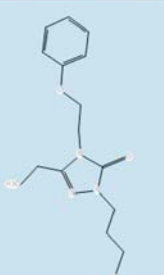
Selected	Name	Mass (DB)	Formula (M)	Structure	Included	Rejected
☒	C:\Program Files\Lhasa Ltd\...	291.1583	C15H21N3O3		☒	☐

图 4
流星 (Meteor) 代谢物预测结果文件的搜索结果，给出了非预期代谢物的结构

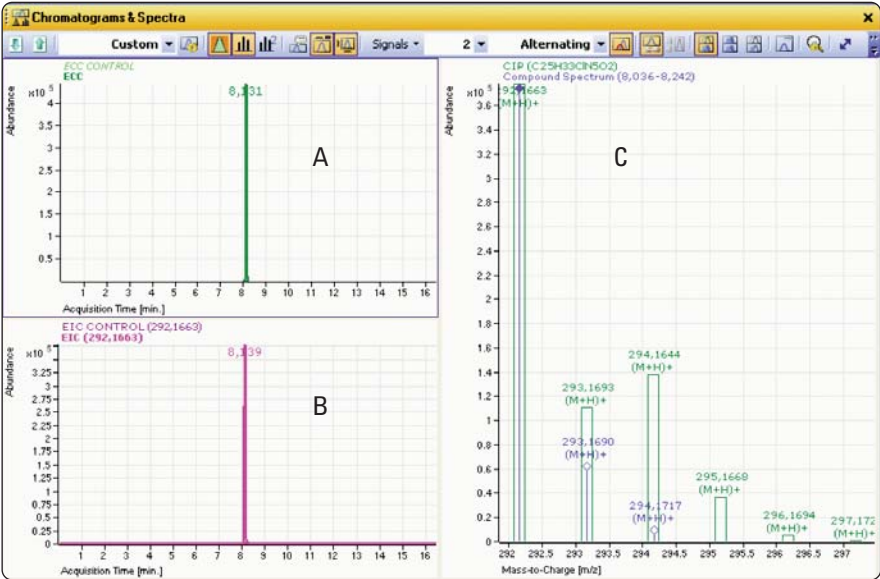
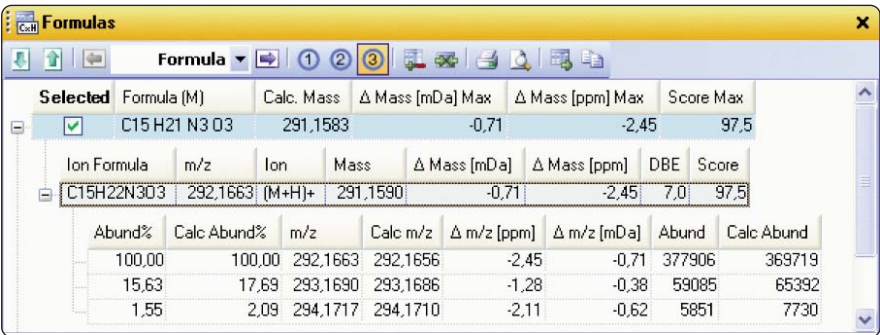


图 5
非预期代谢物 (m/z 292.1663) 的色谱图和质谱图。A) 提取化合物图 (ECC)。B) 提取离子流图 (EIC)。C) 同位素分布测量值 (蓝色) 与母体药物的同位素分布计算值 (绿色) 的比较



Selected	Formula (M)	Calc. Mass	Δ Mass [mDa] Max	Δ Mass [ppm] Max	Score Max
☒	C15H21N3O3	291.1583	-0.71	-2.45	97.5

Ion Formula	m/z	Ion	Mass	Δ Mass [mDa]	Δ Mass [ppm]	DBE	Score
C15H22N3O3	292.1663	(M+H)+	291.1590	-0.71	-2.45	7.0	97.5

Abund%	Calc Abund%	m/z	Calc m/z	Δ m/z [ppm]	Δ m/z [mDa]	Abund	Calc Abund
100.00	100.00	292.1663	292.1656	-2.45	-0.71	377906	369719
15.63	17.69	293.1690	293.1686	-1.28	-0.38	59085	65392
1.55	2.09	294.1717	294.1710	-2.11	-0.62	5851	7730

图 6
通过计算的质量准确度和同位素分布计算出的非预期代谢物的分子式

利用二级质谱图的解析确认了流星 (Meteor) 推断的代谢物结构 (图 7)。对于二级质谱图中的所有离子, 其分子式可被计算得到 (表 1), 并推断出其结构 (表 7 的插图)。代谢物的质谱图 (图 7, 红

色) 与母体药物 (奈法唑酮) 的二级质谱图的比较 (图 7, 蓝色), 结果的匹配率很低, 说明自动检测用处不大。

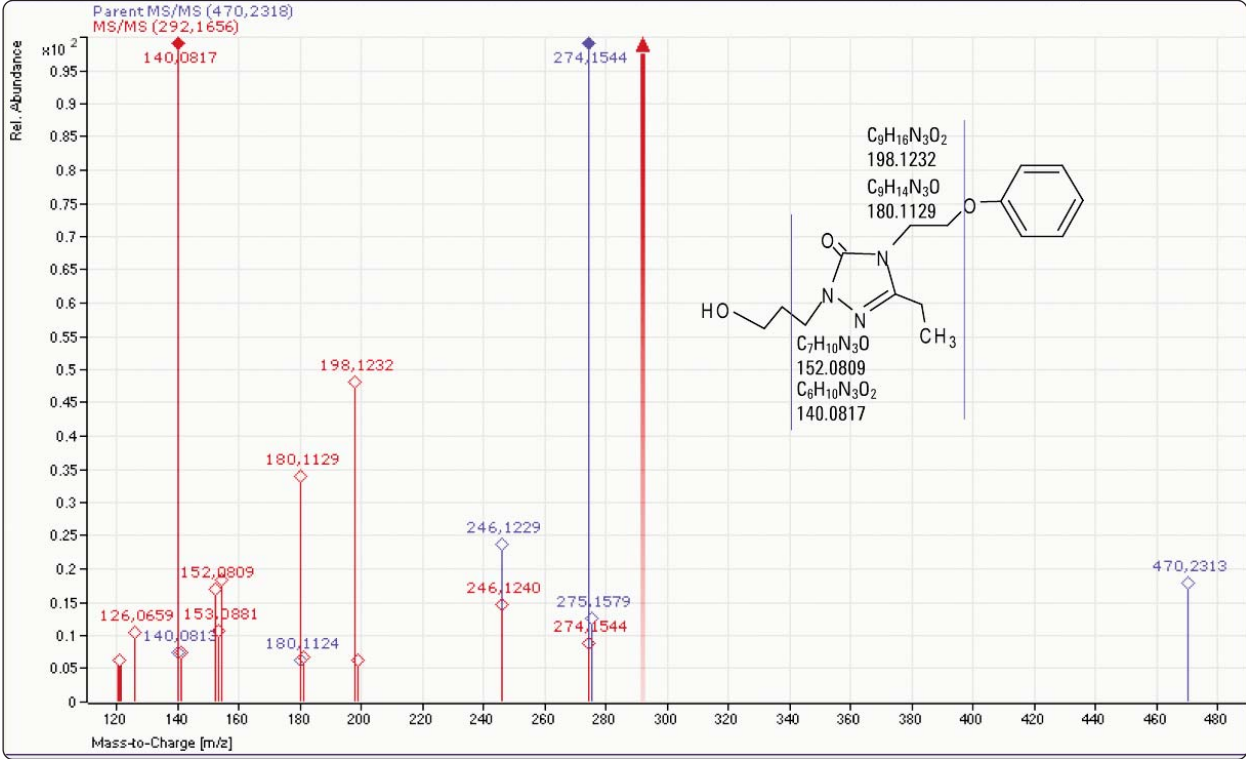


图 7
流星软件 (Meteor) 鉴定出的奈法唑酮的非预期代谢物的二级质谱图

<i>m/z</i>	离子的化学式	计算值 <i>m/z</i>	$\Delta m/z$ [mDa]	$\Delta m/z$ [ppm]	丢失的中性基团	丢失基团的化学式	丢失基团的质量数
121.0647	C ₆ H ₉ O	121.0648	0.09	0.71	171.1009	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₂	171.1008
126.0659	C ₅ H ₈ N ₃ O	126.0662	0.31	2.46	166.0998	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166.0994
140.0817	C ₆ H ₁₀ N ₃ O	140.0818	0.16	1.15	152.0840	C ₉ H ₁₂ O ₂	152.0837
152.0809	C ₇ H ₁₀ N ₃ O	152.0818	0.89	5.86	140.0847	C ₈ H ₁₂ O ₂	140.0837
180.1129	C ₉ H ₁₄ N ₃ O	180.1131	0.25	1.36	112.0528	C ₆ H ₈ O ₂	112.0524
198.1232	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₂	198.1237	0.48	2.45	94.0424	C ₆ H ₆ O	94.0419
246.1240	C ₁₃ H ₁₆ ON ₃ O ₂	246.1237	-0.26	-1.06	46.0417	C ₂ H ₆ O	46.0419
274.1544	C ₁₅ H ₂₀ N ₃ O ₂	274.1550	0.64	2.32	18.0113	H ₂ O	18.0106

表 1
计算出的 MS/MS 碎片的化学式和丢失基团的化学式, 代表了奈法唑酮非预期代谢物的裂解模式

结论

本应用简报演示了基于规则设定的代谢物预测软件包（Meteor，Lhasa 有限公司，利兹，英国）如何辅助安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件得到代谢物的结构。本应用简报介绍了当无法鉴定结构或者用已知代谢反应无法定性时，可以根据质量数和分子式的信息，利用代谢物预测软件包（Meteor）推断非预期代谢物的结构。然后再用准确质量数测量进行进一步的确认。

www.agilent.com/chem/metid:cn

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2010
2010 年 2 月 1 日
出版号 5990-4583CHCN



Agilent Technologies