

采用 Agilent RapidFire 高分辨质谱系统 进行超快速代谢稳定性分析

应用简报

药物发现

作者

Michelle V. Romm,
Nikunj Parikh 与
Vaughn P. Miller

安捷伦科技
韦克福尔德市,
马萨诸塞州

Yuqin Dai
安捷伦科技
圣克拉拉市,
加利福尼亚州

摘要

代谢稳定性等体外 ADME 分析往往是药物开发过程中的通量瓶颈。我们对采用 LC/MS/MS 与采用集成了高分辨精确质量 Q-TOF MS 的 Agilent RapidFire 360 高通量质谱系统分析得到的结果进行了比较。两个系统的分析结果一致，但 Agilent RapidFire 360 可提供更高效的工作流程和更高的通量。对于 LC/MS/MS，采用安捷伦 MassHunter Optimizer 软件对 39 种化合物分析专属的 MRM 方法进行了优化。采用 Agilent 1260 Infinity LC 联用 Agilent 6460 三重四极杆 MS 对体外样品进行分析，每个样品的分析周期约为 2.2 min。对于 RapidFire 360 MS，联用 Agilent 6530 Q-TOF 与 RapidFire 360，通过使用常规 MS 离子源参数和精确质量提取进行体外样品分析，每个样品的分析周期仅为 9.5 s。采用底物消除法，两种平台测定的化学性质迥异的 39 种化合物的代谢半衰期值基本相同 (R^2 大于 0.95)。这些结果表明，采用 RapidFire-MS 系统除了可以降低超过 13 倍的分析周期，还无需再进行代谢稳定性分析的 MRM 方法开发，从而进一步提高了工作流程效率。

前言

药物先导化合物的代谢半衰期或稳定性具有重要的药代动力学和临床意义，因为它影响化合物的口服生物利用度和血药浓度，并最终影响其药效。大型化合物库的出现和液体处理技术的发展对体外代谢稳定性分析的通量提出了更高要求。以前通常采用 LC/MS/MS 来进行检测样品的分析，但由于需要 MRM 方法开发且样品分析时间长，这一分析成为了整个流程的瓶颈。我们评价了联用 Agilent Q-TOF MS 和 Agilent RapidFire 高通量系统的分析能力，它可以得到与 LC/MS/MS 方法一致的结果，但能实现更高效的工作流程和更高的分析通量。

实验部分

系统

安捷伦 LC/MS/MS 系统包括如下模块：

- 软件：采用配备 Quantitative Analysis B.04.00 SP2 和 Qualitative Analysis B.04.00 以及 MassHunter Study Manager B.04.01 的 MassHunter Workstation 三重四极杆质谱数据采集软件 B.04.01 进行研究的提交、MRM 优化、数据采集、定量分析和最终报告的生成。
- Agilent 1260 Infinity Binary LC 系统，包括二元泵 (G1312B)、脱气机 (G1379B)、高效自动进样器 (G1367D) 和安捷伦柱温箱 (G1316B)
- Agilent 6460 三重四极杆质谱 (G6460A)

RapidFire 360-MS 包括如下模块：

- Agilent RapidFire 360 (G9214AA)
- Agilent 6530 Q-TOF 质谱 (G6530AA)



- 软件：配备 Qualitative Analysis B.03.01 和 RapidFire Integrator 的 MassHunter 数据采集软件 B.02.01

LC/MS/MS 条件

色谱柱：Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1x 30 mm, 3.5 μ m (部件号 873700-902)
流动相：A = 0.1% 甲酸水溶液，B = 0.1% 甲酸乙腈溶液
梯度程序 (%B)：0 - 0.2 min 保持 10%，1 - 1.6 min 保持 95%，1.7 min 时 10%，后运行时间：0.5 min
流速：0.6 mL/min
进样体积：6.0 μ L
离子化模式：正离子电喷雾，使用安捷伦喷射流技术
毛细管电压：3500 V
干燥气：300 $^{\circ}$ C, 5 L/min
鞘气：250 $^{\circ}$ C, 11 L/min
喷嘴电压：500 V
采集模式：MRM
驻留时间：100 ms
碎裂电压、MRM 离子对和碰撞能量：由 Optimizer 软件确定

RapidFire 360-MS 条件

以每个样品 9.5 s 的速度进行样品分析。
缓冲液 A = 含 0.09% 甲酸和 0.01% 三氟乙酸的水溶液；流速 1.5 mL/min
缓冲液 B = 含 0.09% 甲酸和 0.01% 三氟乙酸的乙腈溶液；流速 1.25 mL/min
进样体积：10 μ L
SPE 小柱：Agilent RapidFire 柱 A (反相 C4 填料，G9203A)
在所有实验中同时监测每种化合物和内标 (布比卡因)。

化学品与试剂

人肝微粒体 (HLM) 购自 BD Biosciences 公司 (比尔里卡市, 马萨诸塞州)。其它所有的化学品、试剂和溶剂均购自 Sigma-Aldrich 公司 (圣路易斯市, 密苏里州)。

样品制备

代谢稳定性测定在 96 孔板上进行。实验重复测定三次。在可控的环境条件下, 使用一个平板摇床在 37 °C 下进行孵育。底物贮备液 (10 mM) 采用 DMSO 制备。包含 0.5 μM 内标 (布比卡因) 的 0.1% 甲酸淬灭溶液用乙腈制备。

每孔总体积 200 μL 的 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 中所含的孵育混合物包括底物 (1 μM)、HLM (0.5 mg/mL) 和氯化镁 (5 mM)。反应通过加入 NADPH (终浓度 1.3 mM) 启动并通过加入等量的淬灭溶液分别在 0、5、10、20、30 和 60 min 时终止。终止孵育后, 以 4000 rpm 的速度离心该多孔板 10 min, 将上清液转移到另一个新的 96 孔板上, 分析前在 -80 °C 下冷冻过夜。

数据分析

采用常规 MS 离子源和 SPE 条件, 在全扫描高分辨 MS 模式 (非 MS/MS) 下对样品的 RapidFire 360-MS 系统分析数据进行采集。数据采集后, 采用 RapidFire Integrator 软件进行精确质量提取和峰积分。

每种化合物的代谢稳定性通过测定其峰面积随时间的变化来确定。对每种化合物的三次重复测定值取平均。通过与其 t_0 值 ($t_0 = 100\%$) 比较计算残留值%。将残留值%的自然对数 (ln) 对时间作图, 并采用如

下公式: $t_{1/2} = -0.693/\text{斜率}$, 通过该曲线的线性回归计算出其 $t_{1/2}$ 值^{1,2}。

交叉污染

选择 39 种化合物中的一部分 (30 种) 进行代谢稳定性孵育, 对采用 Agilent RapidFire-MS 系统进行分析的交叉污染情况进行评估。采用 RapidFire-MS 从 t_0 开始对样品进行分析并监测其对随后空白进样的污染状况。以每种化合物最初进样浓度的相对百分比记录结果。

结果

为囊括广泛的理化性质, 选择了一组性质迥异的 39 种商品药物和药物样化合物。如表 1 所示, 这组化合物的分子量范围从 218 到 734, XlogP3 值从 0.4 到 7.1。XlogP3 值为计算机模拟计算值, 其大小取决于每个化合物的结构, 并与其水溶性和辛醇/水分配系数密切相关。XLogP3 值来自 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。这些数据库值采用 XLogP3 软件计算得到³。对于 LC/MS/MS 分析, 采用安捷伦 Optimizer 软件优化每种化合物专属的 MRM 方法。然后采用常规 LC 方法对样品进行分析, 每个样品分析周期时间 2.2 min。对于 RapidFire 360-MS 样品, 采用常规 SPE 和 MS 离子源参数进行分析, 联用 Agilent 6530 Q-TOF 与 RapidFire 360, 每个样品的分析周期只有 9.5 s。数据采集后, 采用 RapidFire Integrator 软件进行精确质量提取和峰积分。通过对这些化合物中的大部分进行分析, 对运行常规 RapidFire 360-MS 方法的交叉污染状况进行了评估。测试的任何一种化合物均未出现明显的交叉污染, 见表 1。所有交叉污染值小于 0.4%。这些化合物与人肝微粒体混合孵育, 时间 0 – 60 min, 然后采用 LC/MS/MS 和 RapidFire 360-MS 系统进行分

析。代谢半衰期值 ($t_{1/2}$) 通过底物消除法确定^{1,2}。在药物开发早期, 半衰期值经常由于生物分析内在的变异性 (尤其是 $t_{1/2}$ 超过 60 min 时) 而被分成不同的组, 以方便实验数据的整理分析。按照 McNaney 等的描述³, 半衰期值被分为三组: 快速 (少于 20 min)、中等 (20–60 min) 和慢速 (超过 60 min), 结果见表 1。对比两个系统的分析结果, 所有化合物均以同样的方式分组, 除了四种 RapidFire 360-MS 值刚好低于 60 min 临界值的化合物。所有 RapidFire 360-MS 值小于 60 min 的化合物的 $t_{1/2}$ 值的相关性曲线见图 1。快速和中等半衰期化合物的相关系数 (R^2) 是 0.965, 表明两种分析系统可获得一致的结果。

这些结果表明, 采用 RapidFire 360-MS 系统进行代谢稳定性分析除了可使分析周期降低 13 倍以上, 还无需再进行 LC/MS/MS 分析所需的 MRM 方法开发, 从而进一步提高了工作流程效率。

表 1

化合物	RapidFire-Q-TOF	LC-MS/MS	分子式	分子量	XLogP3	交叉污染%
尼卡地平	<20	<20	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₆	479.5250	3.8	0
奈法唑酮	<20	<20	C ₂₆ H ₃₂ ClN ₅ O ₂	470.0069	4.3	0
咪达唑仑	<20	<20	C ₁₈ H ₁₃ ClFN ₃	325.7673	2.5	0.21
尼莫地平	<20	<20	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₇	418.4403	3.1	0.09
双氯芬酸	<20	<20	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296.1486	4.4	ND
美吡拉敏	<20	<20	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O	285.3840	3.3	ND
普罗帕酮	<20	<20	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	341.4440	3.3	0
噻氯匹定	20-60	20-60	C ₁₄ H ₁₄ CINS	263.7857	3.6	0
维拉帕米	20-60	20-60	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454.6016	3.8	0.06
特非那定	20-60	20-60	C ₃₂ H ₄₁ NO ₂	471.6734	6.6	0
丁螺环酮	20-60	20-60	C ₂₁ H ₃₁ N ₅ O ₂	385.5031	2.6	0.04
氯丙嗪	20-60	20-60	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S	318.8642	5.2	0.5
氟奋乃静	20-60	20-60	C ₂₂ H ₂₆ F ₃ N ₃ OS	437.5216	4.4	ND
丙嗪	20-60 (53)	>60	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	284.4191	4.5	0
硫利达嗪	20-60	20-60	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ S ₂	370.5745	5.9	0
异丙嗪	20-60 (56)	>60	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	284.4191	4.8	0
右美沙芬	20-60 (59)	>60	C ₁₈ H ₂₅ NO	271.3972	3.4	0
桂利嗪	>60	>60	C ₂₆ H ₂₈ N ₂	368.5139	5.8	0
氟康唑	20-60 (58)	>60	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	306.2708	0.4	ND
S-美芬妥英	>60	>60	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218.2518	1.5	ND
氟哌啶醇	>60	>60	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	375.8642	3.2	0
阿莫沙平	>60	>60	C ₁₇ H ₁₆ ClN ₃ O	313.7814	2.6	0
阿米替林	>60	>60	C ₂₀ H ₂₃ N	277.4033	5	0.02
他莫昔芬	>60	>60	C ₂₆ H ₂₉ NO	371.5146	7.1	0
心得安	>60	>60	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259.3434	3	0
丁哌洛尔	>60	>60	C ₁₆ H ₂₃ NO ₂	261.3593	3.5	ND
氟伏沙明	>60	>60	C ₁₅ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂	318.3347	2.6	0.02
氯氮平	>60	>60	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄	326.8233	3.2	0
丙米嗪	>60	>60	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	280.4073	4.8	0
曲普利啶	>60	>60	C ₁₉ H ₂₂ N ₂	278.3914	3.9	0
苯海拉明	>60	>60	C ₁₇ H ₂₁ NO	255.3547	3.3	0
地昔帕明	>60	>60	C ₁₈ H ₂₂ N ₂	266.3807	4.9	0
氯苯那敏	>60	>60	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂	274.7885	3.4	0
美托洛尔	>60	>60	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267.3639	1.9	0
S-华法林	>60	>60	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308.3279	2.7	ND
地尔硫卓	>60	>60	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	414.5178	3.1	0.01
红霉素	>60	>60	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733.9268	2.7	ND
氯米帕明	>60	>60	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂	314.8523	5.2	ND
甲苯磺丁脲	>60	>60	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	270.3479	2.3	0.36

注：括号内的数值表示两种分析方法中没有分入同组的化合物的 RapidFire-Q-TOF 半衰期的真实值。ND = 未检测

结论

对化学性质迥异的 39 种药物化合物与人肝微粒体混合孵育的代谢稳定性进行分析，对比了 Agilent RapidFire 360-MS 系统和安捷伦 LC/MS/MS 系统的分析结果。结果表明，采用 Agilent RapidFire 360-MS 系统进行该类测定可以提高分析通量 13 倍以上，并可以获得与 LC/MS/MS 分析一致的结果。采用 Agilent RapidFire 系统进行代谢稳定性测定除了可以缩短分析周期，还无需再进行 MRM 方法开发，从而进一步提高了工作流程效率。该超快速系统还可用于其他类似的体外 ADME 分析。

参考文献

1. C. A. McNaney, D. M. Drexler, S. Y. Hnatyshyn, T. A. Zvyaga, J. O. Knipe, J. V. Belcastro, M. Sanders, "An Automated Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Process to Determine Metabolic Stability Half-Life and Intrinsic Clearance of Drug Candidates by Substrate Depletion," *Assay and Drug Development Technologies*, 2008, 6(1):121-129.
2. R. S. Obach, "Prediction of Human Clearance of Twenty-Nine Drugs From Hepatic Microsomal Intrinsic Clearance Data: An Examination of In Vitro Half-Life Approach and Nonspecific Binding to Microsomes," *Drug Metab Dispos* 1999, 27(11):1350-1359.
3. T. Cheng, Y. Zhao, X. Li, F. Lin, Y. Xu, X. Zhang, Y. Li, R. Wang, L. Lai, "Computation of Octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge," *J. Chem. Inf. Model.* 2007, 47:2140-2148.

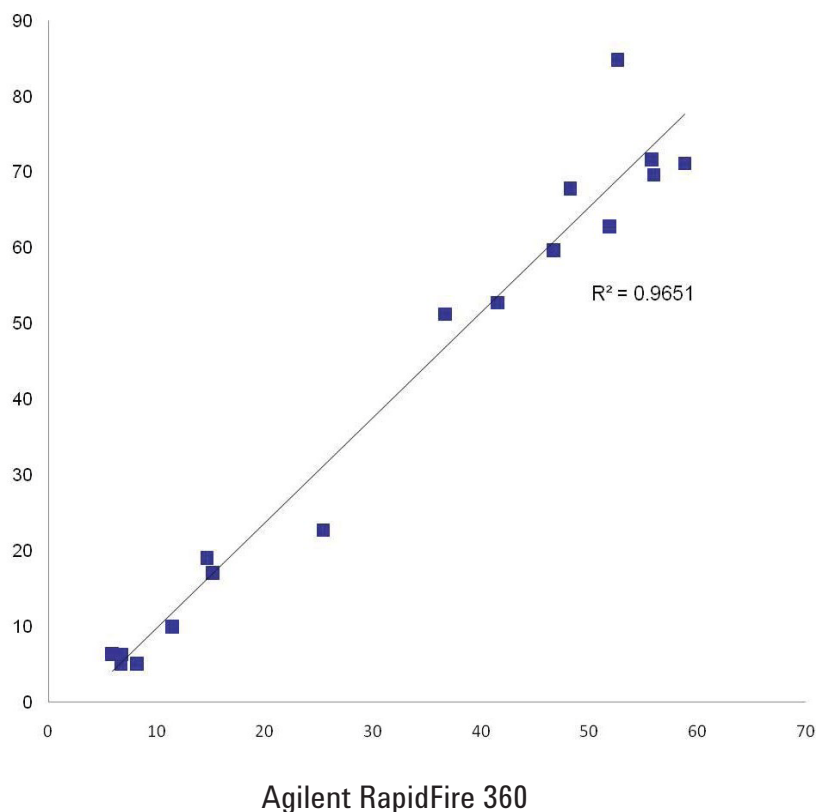


图 1. 快速和中等半衰期结果的相关性

www.agilent.com/cn

本信息如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2011
中国印刷，2011年5月20日
5990-8344CHCN



Agilent Technologies