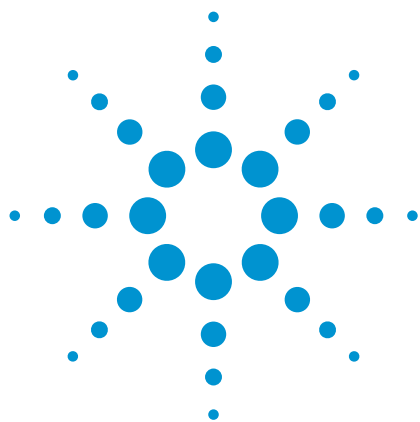




利用高分离度 Q-TOF 数据及 Mass-MetaSite 软件 简化代谢物鉴定工作流程

应用简报

作者

Ismael Zamora 和 Gabriele Cruciani
Molecular Discovery 公司
Pinner, UK

摘要

本应用简报概述了采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统及 Agilent 6530 精确质量数四极杆-飞行时间液质联用 (Q-TOF LC/MS) 系统对一种药物的代谢物进行分离和质谱分析。将 Agilent MassHunter 文件导入 Mass-MetaSite 后, 即可应用 Mass-MetaSite 进行代谢物鉴定。最后, WebMetabase 可用作自动化数据库和报告系统, 简化代谢物的鉴定过程。

前言

高分辨率精确质量数 Q-TOF 数据的出现颠覆了代谢物鉴定领域的传统思路。对于每个色谱峰, 专家们可生成大量的精确数据, 用以指定代谢物的化学结构。因此, 必须使用专业的数据处理软件将大量的数据转换为能够有效共享的信息。

本应用简报将通过示例阐述如何应用 Mass-MetaSite 结合 Agilent MassHunter 文件格式鉴定色谱图中药物相关物质的色谱峰、指定图中每个色谱峰的化学结构、建立碎裂分析数据库, 以及在药物开发过程中与其他团队成员共享分析结果。



Agilent Technologies

实验部分

设备

- Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，配有 Agilent 1290 Infinity 二元泵
- 安捷伦 1290 Infinity 自动进样器
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (TCC)
- Agilent 6530 精确质量数 Q-TOF LC/MS

色谱柱

- Agilent ZORBAX 快速分离色谱柱
- 高分离度 (RRHD) SB-C18 色谱柱， 2.1×100 mm，1.8 μ m

样品前处理

分析前配制以下的储备溶液：

- NADPH-GS 溶液（1 mL 溶液中含：15 mg NADPH，13.8 mg G-6-P，6 μ L G-6-P 脱氢酶，1 mL 的 48 mM MgCl_2 ）
- 人肝微粒体 (HLM) 制剂（UltraPool HLM 150 cod. 452117，购自 BD Bioscience 公司）
- 人 CYP3A4 + 还原酶 + b5 Supersomes—0.5 nmol（购自 BD Bioscience 公司）
- 人 CYP2C9 + 还原酶 + b5 Supersomes—0.5 nmol（购自 BD Bioscience 公司）
- 人 CYP2D6 + 还原酶 + b5 Supersomes—0.5 nmol（购自 BD Bioscience 公司）

代谢物样品

代谢物样品制备：首先加入 0.1 M pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液（对于 HLM，在 1.4 mL 试管中加入 234 μ L，对于重组酶，则加入 215 μ L）。然后，在试管中加入 6.3 μ L HLM 或 25 μ L 重组酶制剂。加入 5 μ L 的 0.25 mM 样品溶液（溶剂为乙腈:水）后，再加入 5 μ L 的 NADPH-GS 溶液。所得溶液经涡旋振荡后，在 37 °C 下分别孵育 0，3，7，12，20 及 30 分钟。加入 250 μ L 乙腈终止反应。之后，试管在 10000 rpm，4 °C 的条件下离心 10 分钟，取 200 μ L 上清液进行分析。

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
梯度程序	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
进样器体积	5 μ L
样品冷却器	4 °C
针头清洗	50 % 甲醇，5 秒
TCC 温度	60 °C

Q-TOF MS 与 MS/MS 方法	
Agilent 6530 Q-TOF 在 2 GHz 的扩展动态范围模式下运行，采用下列采集参数：	
鞘气	11 L/min, 400 °C
干燥气	7.0 L/min
干燥温度	300 °C
雾化器压力	45 psi
质量数范围	100–1000
碎裂电压	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

本实验对两个化合物进行了分析，获得三张 MS/MS 谱图，排除时间为 0.25 分钟。

在正离子模式下应用安捷伦喷射流技术，并应用参比质量数溶液。质量数列表由 Mass-MetaSite 根据母体化合物的化学结构所得的潜在代谢物列表，以及 Mass-MetaSite 预测的微粒体反应和三级代谢物生成。

Mass-MetaSite 软件

为了整合 MassHunter 数据，每次 Mass-MetaSite 运行均输入了三个 MS/MS 文件（空白、底物和孵育文件）。Mass-MetaSite 批处理中总共导入六次运行，对应分析中的每个孵育时间点，具体参数设置如表 1 中所示。

表 1. Mass-MetaSite 批量处理

硬件设置	
应用程序版本	MetaSite CLI 3.1.4 Mass 1.3.0 alpha
计算模式	DD-MS/MS
质谱仪	Agilent Q-TOF
电离模式	[M+H] ⁺
预测设置	
CYP(s)	肝脏
导入条件	质子化策略中性； 质子化策略标准化 pH 7； 构象异构体的最大数量：20
代谢物级别设置	
最小质量数	50
允许忽略代谢物的立体化学性质	是
允许忽略多余代谢物	是
忽略多余代谢物碎片	30
允许反应机理	微粒体反应集
药物相关物质分析	
分裂计算所得的 DRM 峰	否
允许最大代谢物计数	是
最大代谢物限制	20
峰面积阈值	0.01
允许修复计算所得的 DRM 峰	是
相同峰的容差	10 mDa
色谱图自动过滤阈值	0.95
MS 自动过滤阈值	0.9
MS/MS 自动过滤阈值	0.9
碎裂分析	
键断裂限制	4
代谢级别数量	2
允许键断裂重组，N-氧化	是
允许键断裂重组，偶数电子	是
允许键断裂重组，奇数电子	是

结果与讨论

Mass-MetaSite 处理包括两个步骤。第一步是利用通过 Q-TOF MS 及 MS/MS 方法学获得的色谱图进行药物相关物质的鉴定，以便寻找与母体化合物相关的色谱峰（图 1）。此步骤将记录两种类型的色谱峰。一种类型为根据与母体间的质量偏移，对应一级（绿色峰）或更多级（棕色峰）代谢反应（I 期与 II 期）的色谱峰，这些反应可在计算前在软件中进行设置。第二种类型为观察到的未知代谢物峰（青色峰），此类代谢物不与任何已知代谢转化物列表相对应。

第二步是指定这些色谱峰的化学结构。为此，该软件将针对母体和代谢物生成一系列

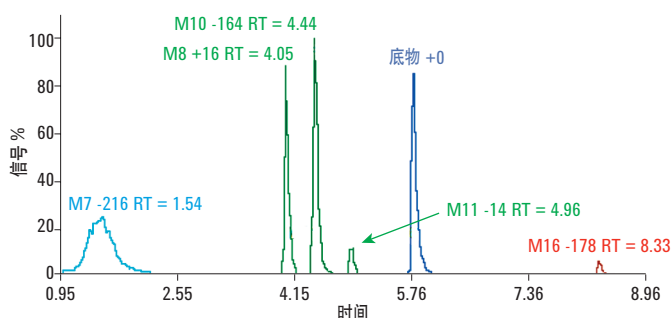


图 1. 20 分钟孵育后样品的提取色谱图。绿色峰 - 一级代谢物，棕色峰 - 二级代谢物，青色峰 - 未知化合物，以及蓝色峰 - 母体化合物

列理论碎片（结构和质量数）。然后，将所得碎片列表的质量数与 MS 和 MS/MS 谱图中真实碎片离子进行比对（图 2）。比对后，软件即可确定化合物结构中发生代谢反应的可能区域。如果碎片分析不能确定母体中发生代谢反应的单个原子，

系统会显示一个与质谱数据相符的代谢物 Markush 结构，然后应用 MetaSite 代谢位点 (SoM) 算法¹ 将不同的潜在结构方案按可能性大小进行排序。

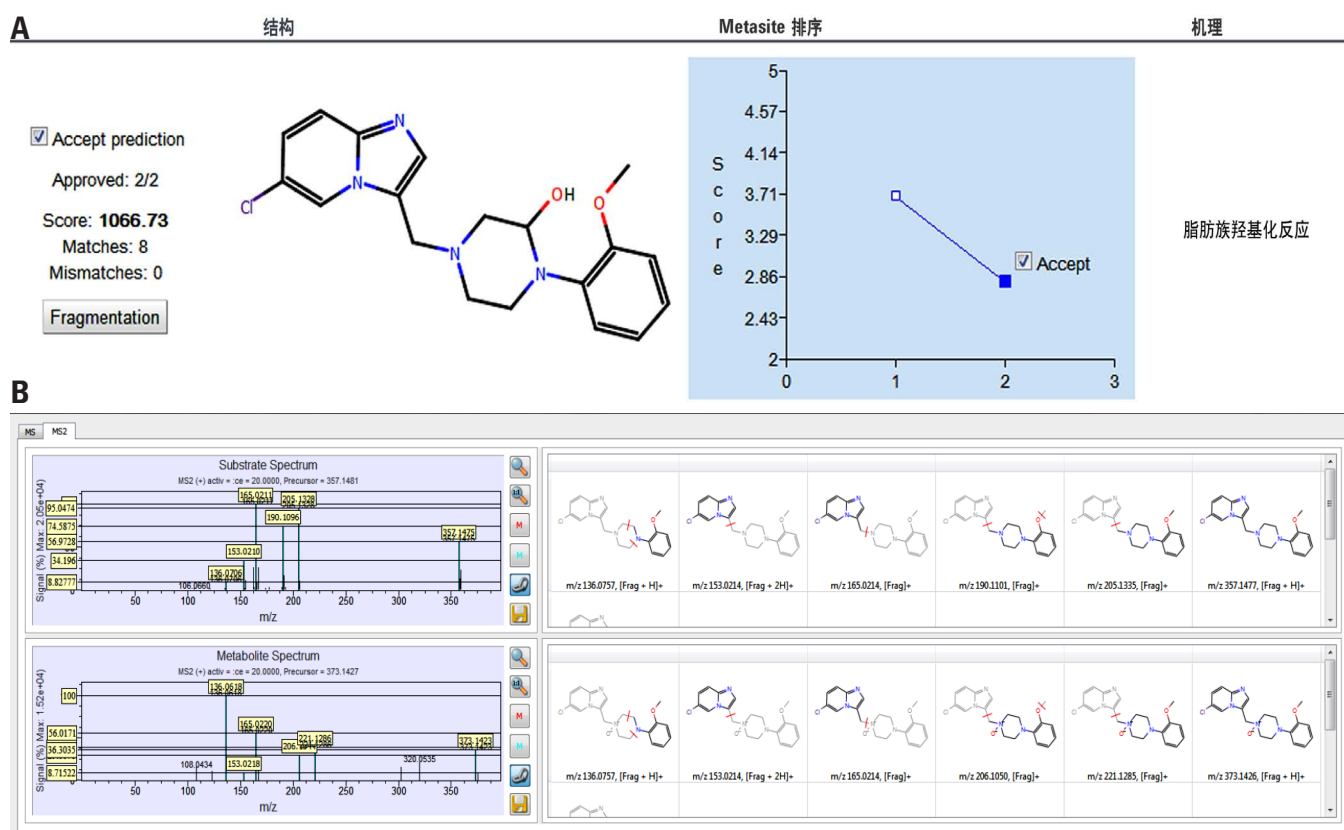


图 2. 代谢物结构被分配至色谱图中实测的 16+ 个代谢物。代谢物的 Mass-MetaSite 分值为 1066.73 (A)，具有两个潜在方案（图中仅显示其中一个）。MetaSite 排序显示的是最可能的预测 SoM。自动碎片分析显示了用于结构解析的碎片 (B)

SoM 预测可用于提示代谢反应中的区域选择性，只适用于 I 期代谢。它基于对细胞色素 P450 腔内化合物潜在相互作用的分析以及针对氧化反应的化学反应性分析。

LC/MS/MS 数据经过自动化分析后，系统会将其提交至网络服务器 (WebMetabase)。代谢物鉴定专家可通过诸如 Internet Explorer 之类的网络浏览器连接至该服务器，查看

结果（包括色谱峰检出及碎裂分析）以解析代谢物结构。此时，专家可接受、拒绝或编辑所提交的结果。此外，对于开发团队内其他成员正在进行的特定实验，专家还可以自定义数据视图（图 3）。实验经专家批准后，其状态将发生改变，且可允许开发团队的其他成员查看，从而通过数据解析直接获得代谢物鉴定报告。并且，WebMetabase 应用程序可追踪

不同样品中同一化合物的代谢物，例如分析母体化合物消失及代谢物出现的动力学数据。

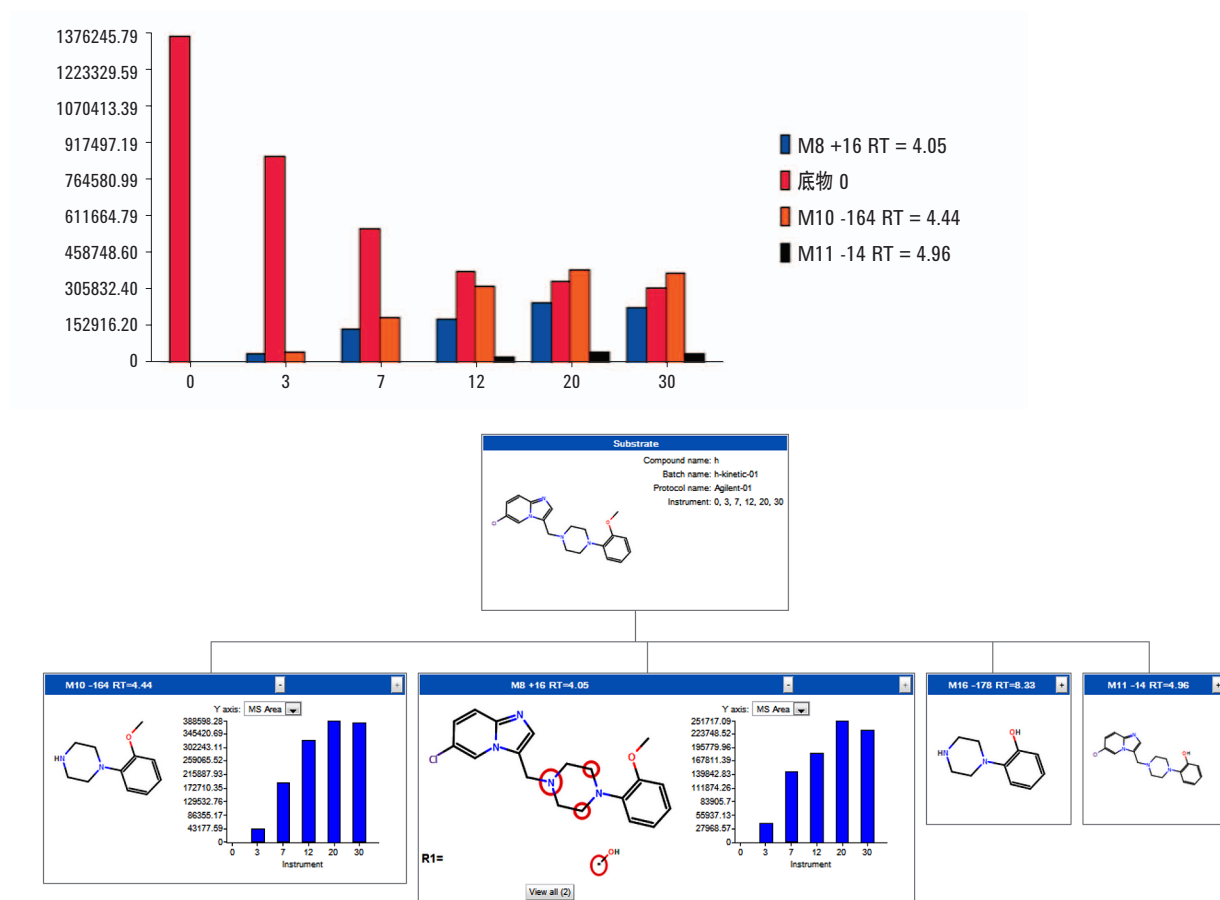


图 3. 母体或代谢物的消失或出现可绘制在同一张图中 (A)。自动化报告将展示代谢物鉴定专家提供给开发团队内其他成员的信息 (B)

结论

本应用简报描述了联用 Agilent Q-TOF 高分辨精确质量数测定技术与数据处理软件确定色谱峰，并通过自动化 Mass-MetaSite 批量处理和基于 WebMetabase 应用程序的报告系统将确定的峰传送给代谢物鉴定专家。该计算工具对碎裂进行了系统分析，通过键断裂解析代谢物结构并向专家报告建议的结构碎片。此外，当质谱数据

不足以确定代谢物的确切结构时，该软件会采用 MetaSite SoM 预测算法提供与谱图数据相符的潜在代谢物。

WebMetabase 工具将收集 Mass-MetaSite 自动化流程所得的数据，并向专家展示该数据以供批准，它可将所有碎片保存在一个数据库中，用户可执行批准、移除或编辑提交的结果。WebMetabase 还可对具有多个样品的实验进行分析，例如执行

动力学分析时，以及在一个系统中同时保存定性和定量数据时。完整的处理流程如图 4 所示。

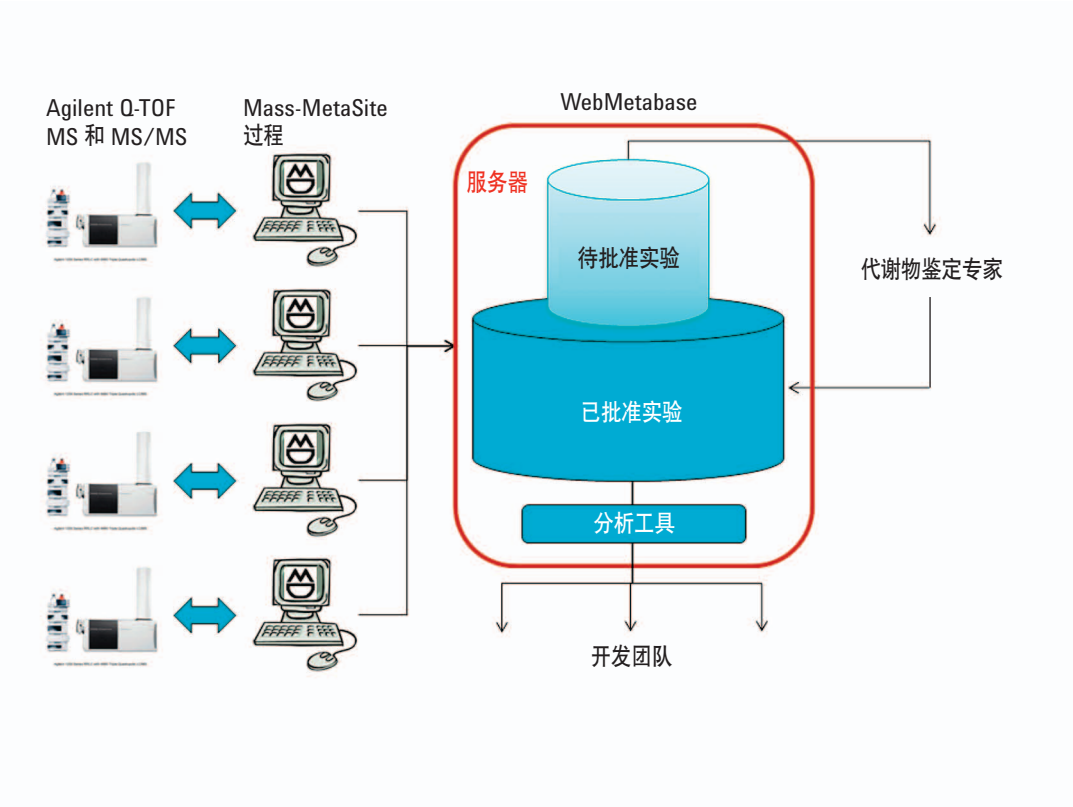


图 4. 整个工作流程可缩短代谢物鉴定的分析时间，提高处理效率

参考文献

1. Cruciani, G., *et al.* MetaSite: Understanding Metabolism in Human Cytochromes from the Perspective of the Chemist. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48:6970-6979.
2. Bonn B., Zamora, I., *et al.* Enhanced metabolite identification with MS E and a semi-automated software for structural elucidation. *Rapid Commun. Mass Spectr.*, **2010**, 24(21):3127–3138.

www.agilent.com/chem/QTOF

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 8 月 21 日，中国印制
5991-0935CHCN



Agilent Technologies