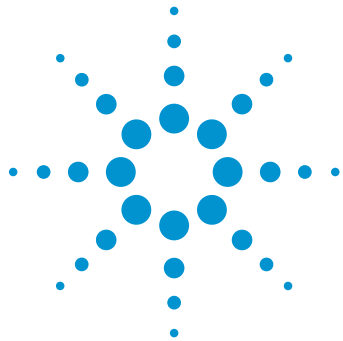




采用高分辨率 Q-TOF 数据和 Mass-MetaSite 软件加速代谢物 鉴定过程

应用简报

药物发现和开发：代谢物鉴定

作者

Yuqin Dai, Stephen Madden 和
Lester Taylor
安捷伦科技有限公司
圣克拉拉, 加利福尼亚州, 美国

Gabriele Cruciani 和 Ismael Zamora
Molecular Discovery 公司,
伦敦, 英国

摘要

本应用简报通过抗焦虑药丁螺环酮的体外代谢分析, 论证了使用 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 和 Mass-MetaSite 软件, 能够快速鉴定药物相关代谢物并高效匹配检出代谢物的化学结构。



Agilent Technologies

前言

LC/MS 在药物发现和开发过程的药物代谢物鉴定中发挥着关键作用。现代 Q-TOF 仪器能够提供前体化合物的准确质量信息，及其特征碎片离子信息。这使我们能够利用收集到的数据从大量内源性干扰物中分辨出药物代谢物，还可帮助我们确定代谢物母体及其碎片离子的元素组成。当前代谢物鉴定中的瓶颈包括测定分析通量小，数据解析困难，以及需要复杂数据处理软件工具来帮助转换大量的数据，使其变为可有效共享的有用信息。

本应用简报通过抗焦虑药丁螺环酮（图 1）的体外代谢分析，论证了使用 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 和 Mass-MetaSite 软件，能够快速鉴定药物相关代谢物并高效匹配检出代谢物的化学结构。

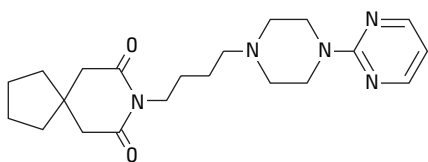


图 1. 丁螺环酮的结构 (C₂₁H₃₁N₅O₂)

实验部分

方法

Mass-MetaSite 方法包括两个步骤。第一步是使用由 Q-TOF MS 和 MS/MS 分析得到的数据鉴定药物相关物质，以便寻找与母体化合物相关的色谱峰。此步骤将鉴定两种类型的色谱峰：

- 对应于软件中一级或更多级代谢反应（I 期与 II 期），相对于底物有一定质量偏移的色谱峰
- 未知的代谢物，这些是观察到的色谱峰，但不与任何已知代谢转化列表相对应

第二步是匹配色谱峰的相应化学结构。为完成此操作，软件将生成一系列母体及其代谢物的理论碎片（结构和质量数）。然后，将该碎片列表中的质量数与 MS 和 MS/MS 谱中发现的实际碎片离子进行对比。通过对比预测的代谢物质量数和高分辨率精确质量数数据，软件可定位分子中发生代谢反应的区域。如果碎片分析无法确定母体中生成该代谢产物的单个原子，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^{1,2} 将不同的潜在结构方案按可能性大小进行优先级

排序。SoM 预测可用于鉴定代谢反应的区域选择性，仅适用于 I 期代谢，它基于对细胞色素 P450 腔内化合物的潜在相互作用以及针对氧化反应的化学反应性分析。

大鼠肝微粒体 (RLM) 中的体外代谢

底物	1 μM 丁螺环酮
孵育	在 RLM 中，37 °C 条件下分别孵育 0、5、10、20 和 30 min
反应	通过加入 NADPH-再生系统引发反应，通过加入 1:2 (v/v) 冰块冷却的乙腈终止反应

仪器

LC/MS 系统

Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统，由带集成脱气机的二元泵、带恒温器和柱温箱的高效自动进样器，以及配备有双安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 组成。

结果与讨论

计算代谢位点的概率

人 CYP 酶底物的代谢位点受到三种影响因素的控制。代谢位点可使用概率函数 P_{SM} 来描述：

$$P_{SM}^i = E_i * R_i * M_i \quad (\sim \text{自由能})$$

其中：

P_{SM}^i = 在 CYP 亚铁血红素基的催化作用下，原子 i 成为代谢位点的概率

E_i = 原子 i 接近 CYP 亚铁血红素的可能性

R_i = 原子 i 在实际反应机理中的反应性

M_i = 预期的反应机理发生的相对概率

丁螺环酮吸收很好，但有明显的首过效应。平均系统生物利用度约为 4%。丁螺环酮的消除主要通过氧化代谢，这会生成一些羟基化代谢物，包括 5-羟基-丁螺环酮和 1-嘧啶哌嗪。

图 2 展示了丁螺环酮（底物）和一些通过 Mass-MetaSite 的色谱峰查找算法确定的代谢物。表 1 列出了代谢物的保留时间 (RT)、观测到的 m/z 、相对于底物的 m/z 偏移、丰度和最匹配的离子式。实验通过 Mass-MetaSite 软件，从 10 min 的 RLM 孵育样品中快速鉴定出共 24 种 I 期代谢物。如图 2 和表 1 所示，从此孵育样品中鉴定出的主要代谢物是单羟基化代谢物（M10、M12 及 M23）和一种 N-脱烷基化代谢物 (M1)。

色谱条件

LC 条件		
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902)	
流动相	A = 0.1% 甲酸水溶液, B = 含 0.1% 甲酸的 95% 乙腈/水溶液	
进样体积	3 μL	
柱温	50 °C	
流速	0.4 mL/min	
梯度程序	时间 (min)	%B
	0.5	8.0
	2.5	50
	2.8	98
	3.2	98
	3.4	8.0
后运行时间	1 min	
MS 条件		
离子模式	正离子	
干燥气	250 °C, 12 L/min	
鞘气	400 °C, 12 L/min	
毛细管电压	3500 V	
喷嘴电压	300 V	
仪器模式	扩展动态范围 (2 GHz)	
扫描模式	全 MS (10 Hz) 扫描, 再进行三次数据依赖的自动 MS/MS (10 Hz) 扫描	
质量数范围	100–1000 <i>m/z</i>	
碰撞能量	32 V	
参比离子	118.086255 和 922.009798	

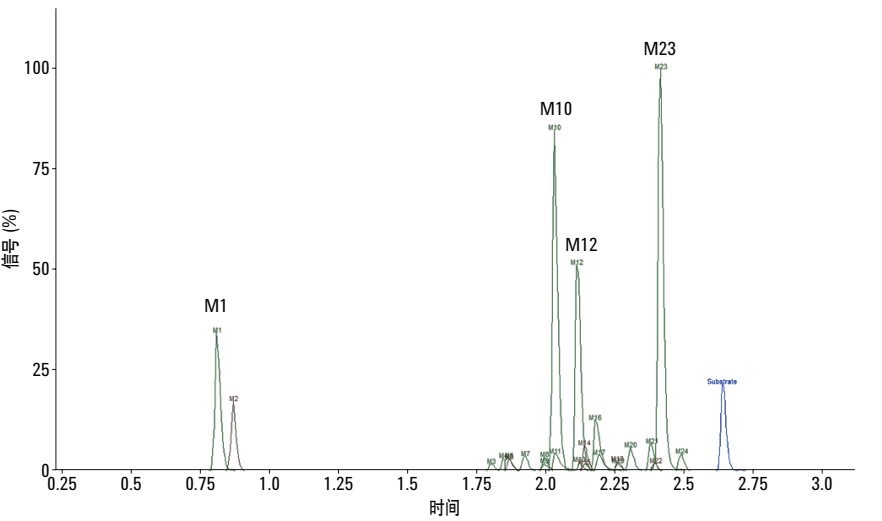


图 2. 使用 Mass-MetaSite 进行色谱峰鉴定

代谢位点 (SoM) 预测

Mass-MetaSite 根据底物的分子结构提供 SoM 预测，无需任何 MS 数据。图 3 为丁螺环酮的 SoM 预测结果。右侧窗格图中的原子和左侧窗格图中的直方条是一一对应的，并且它们的选择可同步显示。两个窗格中包含的信息与代谢位点的预测相对应。

表 1. 采用 Mass-MetaSite 鉴定 10 min RLM 孵育样品中代谢物的结果

Selection	RT	m/z shift	m/z obs.	Area %	UV Area %	Area Abs	UV Area Abs	ion formula	m/z calc.
☒ Substrate	2.64	-0	386.2553	5.65		4e+05		[C21H31NSO2 + H] ⁺	386.2551
☒ M1	0.81	-221	165.1132	7.52		5.3e+05		[C8H12N4 + H] ⁺	165.1135
☒ M2	0.87	-214	172.0960	3.19		2.2e+05		[C8H13NO3 + H] ⁺	172.0968
☒ M3	1.80	+32	418.2438	0.62		4.4e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M4	1.85	+32	418.2435	0.77		5.4e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M5	1.87	+32	418.2442	1.10		7.7e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M6	1.87	-10	376.2330	0.65		4.6e+04		[C19H29NSO3 + H] ⁺	376.2343
☒ M7	1.93	+32	418.2439	0.78		5.5e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M8	2.00	+32	418.2443	1.03		7.2e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M9	2.00	+14	400.2329	0.52		3.6e+04		[C21H29NSO3 + H] ⁺	400.2343
☒ M10	2.03	+16	402.2494	17.19		1.2e+06		[C21H31NSO3 + H] ⁺	402.2500
☒ M11	2.03	+14	400.2329	1.36		9.5e+04		[C21H29NSO3 + H] ⁺	400.2343
☒ M12	2.11	+16	402.2491	16.73		1.2e+06		[C21H31NSO3 + H] ⁺	402.2500
☒ M13	2.12	+32	418.2440	0.62		4.4e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M14	2.14	-10	376.2336	1.46		1e+05		[C19H29NSO3 + H] ⁺	376.2343
☒ M15	2.14	+12	398.2145	0.43		3e+04		[C21H28NSO3 + H] ⁺	398.2187
☒ M16	2.18	+32	418.2447	2.97		2.1e+05		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M17	2.19	+14	400.2332	1.09		7.7e+04		[C21H29NSO3 + H] ⁺	400.2343
☒ M18	2.26	-10	376.2331	0.59		4.1e+04		[C19H29NSO3 + H] ⁺	376.2343
☒ M19	2.26	+32	418.2435	0.50		3.5e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M20	2.31	+32	418.2441	1.89		1.3e+05		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M21	2.38	+32	418.2442	2.11		1.5e+05		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449
☒ M22	2.40	-10	376.2332	0.57		4e+04		[C19H29NSO3 + H] ⁺	376.2343
☒ M23	2.42	+16	402.2492	29.51		2.1e+06		[C21H31NSO3 + H] ⁺	402.2500
☒ M24	2.49	+32	418.2435	1.10		7.7e+04		[C21H31NSO4 + H] ⁺	418.2449

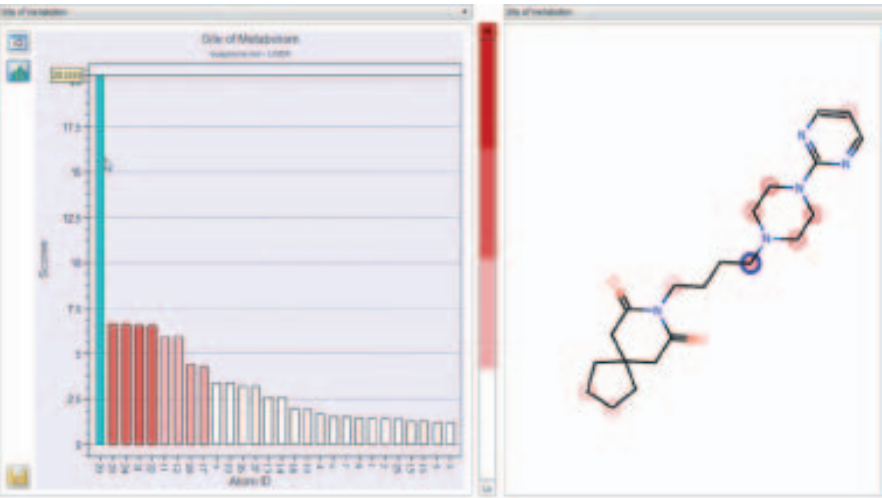


图 3. 代谢位点 (SoM) 预测结果

使用 Q-TOF MS 和 MS/MS 数据进行 代谢物鉴定和结构匹配

Mass-MetaSite 使用 Q-TOF 质谱数据进行
代谢物鉴定和结构匹配分两步进行：

1. 使用由 HRAM Q-TOF MS 和 MS/MS
方法得到的色谱图进行药物相关代谢物
鉴定（图 2）
2. 根据预测的代谢物，以及 HRAM Q-TOF
MS 和 MS/MS 数据将 Markush 结构
与相应的代谢物进行匹配（图 4 和 5）

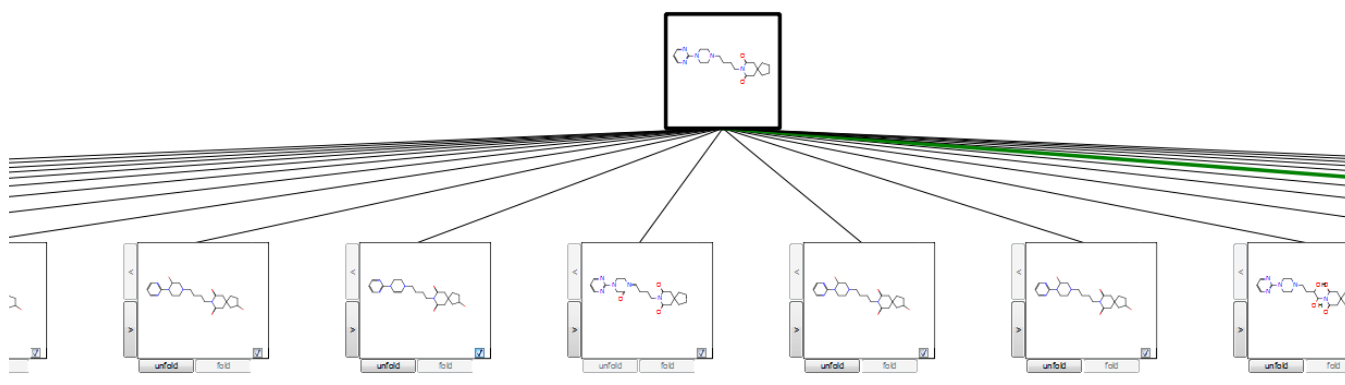


图 4. 采用 Mass-MetaSite，根据母体药物分析所得部分代谢物结构展示；此窗口可交互查看所有代谢物，各结构选中后均可获得更多信息

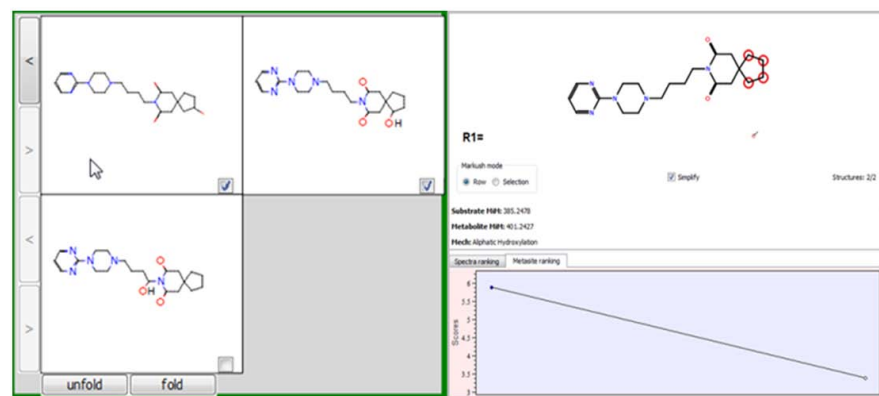


图 5. 采用谱图排序评分和碎片离子匹配得到的代谢物 M10 的推荐结构

图 6 展示了母体（底物）和代谢物 M10 的 MS/MS 谱图；右侧为推荐的碎片离子结构。该软件可通过自动碎片分析和 MS/MS 谱图的相关性定位分子中的代谢位点，通过 MS 选项卡上的 MS 谱图也可以查看到分子离子的质量偏移。

结论

本应用简报论证了联合应用高分辨率精确质量数 Q-TOF 数据和 Mass-MetaSite 代谢物鉴定软件，可轻松鉴定和匹配来自体外 RLM 孵育的丁螺环酮代谢物结构。Mass-MetaSite 可根据在 CYP 亚铁血红素基处发生催化反应的概率给出预测的代谢物。结合来自 Q-TOF 分析的高分辨率精确质量数

据，使系统得到的代谢物结构具有高度可靠性。系统可针对 LC 色谱图中检出的每个色谱峰推荐候选的代谢物候选结构，这些结构可根据在代谢位点发生反应的概率进行排序。该集成解决方案最大程度降低了数据分析和解析的难度，从而提高了代谢物鉴定的效率。

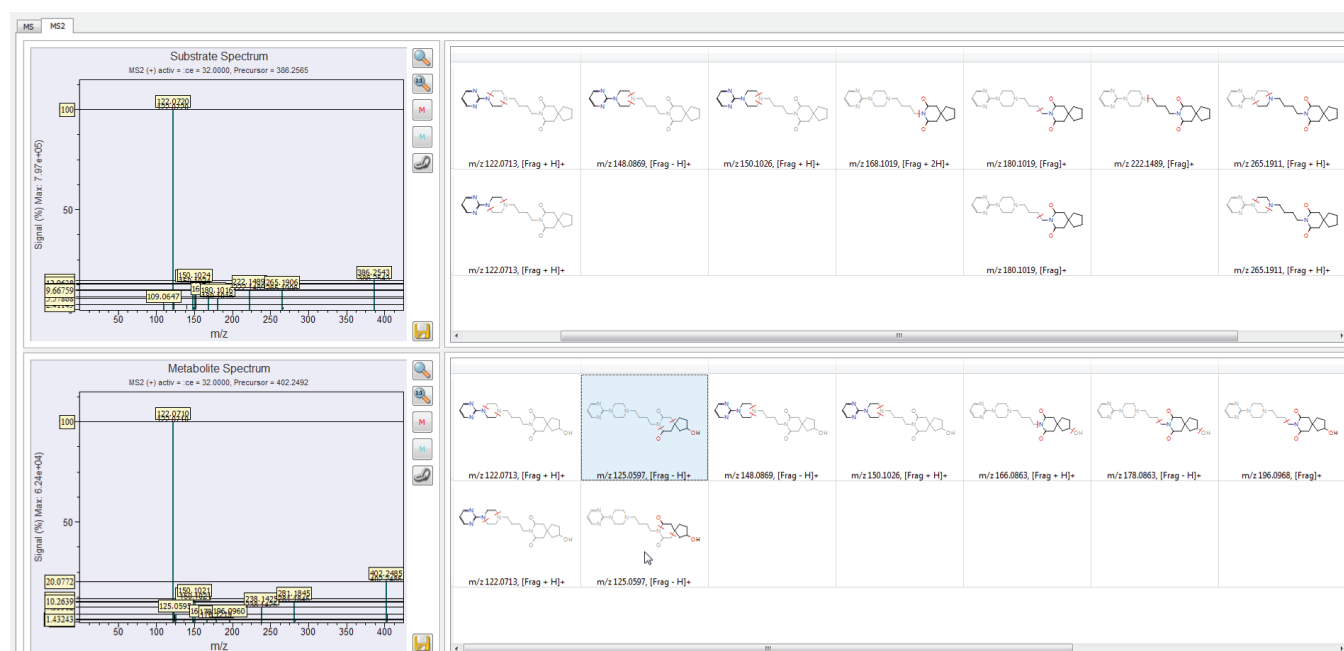


图 6. 自动碎片分析展示了用于 M10 结构确证的碎片离子

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. B. Bonn, C. *et al.* "Enhanced metabolite identification with MS(E) and a semi-automated software for structural elucidation", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010** Nov 15; 24 (21):3127-38.
3. R.E. Gammans, R.F. Mayol, and J.A. LaBudde, *Am. J. Med.*, **1986** Mar 31;80 (3B):41-51.

www.agilent.com/chem/QQQ

本文仅供研究使用，不可用于诊断程序。

安捷伦科技对本资料可能存在的错误，或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
中国印刷，2013 年 7 月 17 日
5991-2710CHCN



Agilent Technologies