

药物代谢物的纯化和鉴定

安捷伦分析型纯化系统、安捷伦自动纯化软件和
Agilent 6540 精确质量四极杆飞行时间 (Q-TOF)
液质联用系统

应用简报

药物发现

作者

Syed Salman Lateef、
M. Sundaram Palaniswamy 和
Smriti Khera
安捷伦科技有限公司

摘要

药物代谢和药代动力学 (DMPK) 研究通常需要通过质谱 (MS) 鉴定药物代谢物，并在药物开发的后期阶段，通过 NMR 确认代谢物结构。为此，可能需要对代谢物进行纯化。在本应用简报中，将安捷伦自动纯化软件与 Agilent 1260 分析型纯化系统相结合对安非他酮药物代谢物进行纯化。使用通过 Agilent 6540 精确质量四极杆飞行时间 (Q-TOF) 液质联用系统和 Mass-MetaSite 软件采集到的高分辨率精确质量 MS 和 MS/MS 数据对代谢物进行鉴定。



Agilent Technologies

前言

在药物发现中，可靠地鉴定代谢物的化学结构对于药物化合物评估至关重要。在药物发现阶段，通常将高分辨率精确质量数据与 MS/MS 碎裂模式相结合用于生成分子式，并且有助于了解推断的代谢物结构。使用代谢物结构预测软件有利于对代谢物进行结构鉴定。在药物发现的后期，可能需要使用核磁共振 (NMR) 进行结构确认。另外，需要对主要的药物代谢物开展毒理学研究。因此，需要将代谢物从复杂的生物样品中分离出来。安捷伦自动纯化软件与 Agilent 1260 Infinity 分析型纯化系统相结合，能够将分析柱放大至半制备柱。为了分离代谢物，利用基于时间或基于峰的 UV/MS 检测可有效完成馏分收集。基于时间的方法用于在指定的保留时间窗口定期收集馏分，不受检测器灵敏度影响，并且这种方法可能是最大程度减小由低于阈值的化合物浓度引起的样品损失的首选。基于峰的方法根据代谢物的 UV/MS 信号将其分离，是分离丰度最高的代谢物的首选¹。相比于 UV 信号触发式分馏，MS 触发式分馏使用单四极杆质谱仪在灵敏度更高的单离子监测检测模式下更适用于分离复杂样品中的痕量已知代谢物。

本应用简报介绍了对通过体外肝微粒体温育得到的安非他酮代谢物进行纯化和鉴定。本研究使用基于时间和基于峰的触发方法进行馏分收集。此外，还讨论了 Mass-MetaSite 软件中由精确质量 LC/MS/MS 数据得到的代谢物的可能的结构。

实验部分

工作流程

代谢物纯化和鉴定的一般工作流程如图 1 所示。在本研究中，通过在人类肝微粒体中温育安非他酮产生代谢物。在分析柱上，使用一般梯度运行方法对代谢物进行分析。由于所分析的代谢物具有不同的极性，因此一般采用梯度曲线。采用与 Agilent 6150 单四极杆质谱仪相连接的 Agilent 1260 Infinity 分析型纯化系统对代谢物进行纯化。同时，利用 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统和 Mass-MetaSite 软件 (Molecular Discovery) 对代谢物进行鉴定。通过安捷伦自动纯化软件全自动化完成从内径 4.6 mm 的色谱柱到内径 9.4 mm 的色谱柱的放大过程²。该过程可通过基于放大分析梯度曲线而生成的聚焦或线性梯度曲线实现。聚焦梯度表示专为纯化特定代谢物而设计的梯度曲线。

代谢物生成

在 20:80 (乙腈:水) 溶液中配制 10 mM 的安非他酮 (Sigma-Aldrich) 储备液，并用磷酸盐缓冲液 (0.1 M, pH 7.4) 将其稀释至最终温育浓度 250 μ M。在磷酸盐缓冲液中，将人类肝微粒体 (HMMC-3A, Life Technologies) 和 NADPH (N5130, Sigma-Aldrich) 混合至最终温育浓度 (分别为 2 mg 和 2.4 mM)³。在 37.5 °C 和 150 rpm 的转速下温育反应 120 分钟。加入等体积 6% 甲酸的乙腈溶液使反应停止，并在 11000 rpm 的转速下离心 10 分钟。使用 LC/MS Q-TOF 系统分析上清液。将上清液真空蒸干并复溶至 300 μ L 用于 LC-UV/MS SQ 馏分收集实验。

试剂与材料

所有试剂和添加剂均为 LC/MS 级。纯水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore, 美国)。

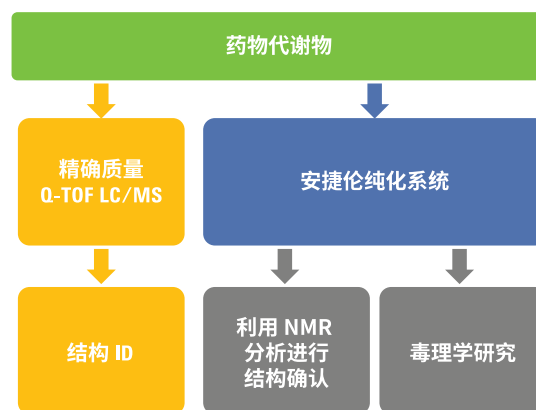


图 1. 代谢物纯化和鉴定工作流程

表 1. 安捷伦分析型纯化系统的仪器和方法参数

| Agilent 1200 系列分析型纯化系统 | |
|--|--|
| 参数 | 设定值 |
| Agilent 1260 Infinity 四元泵 (G1311B) | |
| 流动相 A | 含 0.1% 甲酸和 0.01% TFA 的水溶液 |
| 流动相 B | 含 0.1% 甲酸和 0.01% TFA 的 100% 乙腈溶液 |
| 流动相梯度 | 分析柱: 0–21 min: 5–90% B; 23–28 min: 5% B 制备柱: 基于自动纯化软件 |
| 流速 | 分析柱: 1.0 mL/min 制备柱: 3.0 mL/min |
| Agilent 1260 Infinity 自动进样器 (G1367B) | |
| 进样量 | 分析柱: 10 µL 制备柱: 90 µL |
| 配备 2 位/6 通阀的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C) | |
| 温度 | 25 °C |
| 色谱柱 | 分析柱: Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 75 mm, 3.5 µm (部件号 866953-902) 制备柱: Agilent ZORBAX SB-C18, 9.4 × 50 mm, 5.0 µm (部件号 846975-202) |
| Agilent 1260 Infinity 可变波长检测器, 高压流通池 (G1314-60082) | |
| 波长 | 252 nm |
| Agilent 1260 Infinity 分析型馏分收集器 (G1364C) | |
| 使用实验室顾问软件自动计算延迟体积 | |
| 基于质量的馏分收集系统的仪器 | |
| 参数 | 设定值 |
| 配备 AJS 的 Agilent 6150 单四极杆液质联用系统 (G6150B) | |
| 范围 | 100–700, 峰宽: 0.1 min |
| 模式 | 正离子 |
| 干燥气流速 | 10 L/min |
| 雾化器压力 | 30 psig |
| 干燥气温度 | 300 °C |
| 鞘气温度 | 350 °C |
| 鞘气流速 | 10 L/min |
| 毛细管电压 | 3500 V |
| 喷嘴电压 | 1000 V |
| 碎裂电压/峰宽 | 100/0.05 min |
| 尾吹泵: Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B) | |
| 流速 | 0.9 mL/min, 含 0.1% 甲酸的乙腈-水 (70–30) 溶液 |
| Agilent OpenLab CDS ChemStation 版 | |
| 用于数据采集和数据分析 | C.01.05 版 |
| Agilent Openlab CDS ChemStation 自动纯化软件 | |
| A.01.01 版 [066] | |

结果与讨论

使用 LC-UV/MS 检测安非他酮代谢物

在安捷伦分析型纯化系统上, 使用分析柱并在 252 nm 和正离子模式下对安非他酮代谢物进行检测 (表 1)。UV 分析表明形成了安非他酮代谢物。质谱分析采用已知代谢物的提取离子

色谱图 (EIC)⁴, 结果表明存在羟基安非他酮 (m/z 256) 和赤/苏-安非他酮 (m/z 242) 代谢物 (图 2)。还同时分析了在不含药物条件下进行微粒体温育所形成的对照样品, 从而可靠地鉴定由安非他酮温育形成的代谢物 (数据未示出)。同时, 还使用精确质量 Q-TOF 系统对痕量代谢物进行检测。

通过 Q-TOF 分析对 m/z 离子 256.7479 和 242.7644 进行检测。代谢物赤/苏-安非他酮为立体异构体, 紧随母体药物峰洗脱, 其适用于基于时间的馏分收集以获得最高的回收率。羟基安非他酮代谢物相比于其他代谢物表现出更高的 MS 和 UV 灵敏度, 因此非常适用于基于峰的馏分收集。

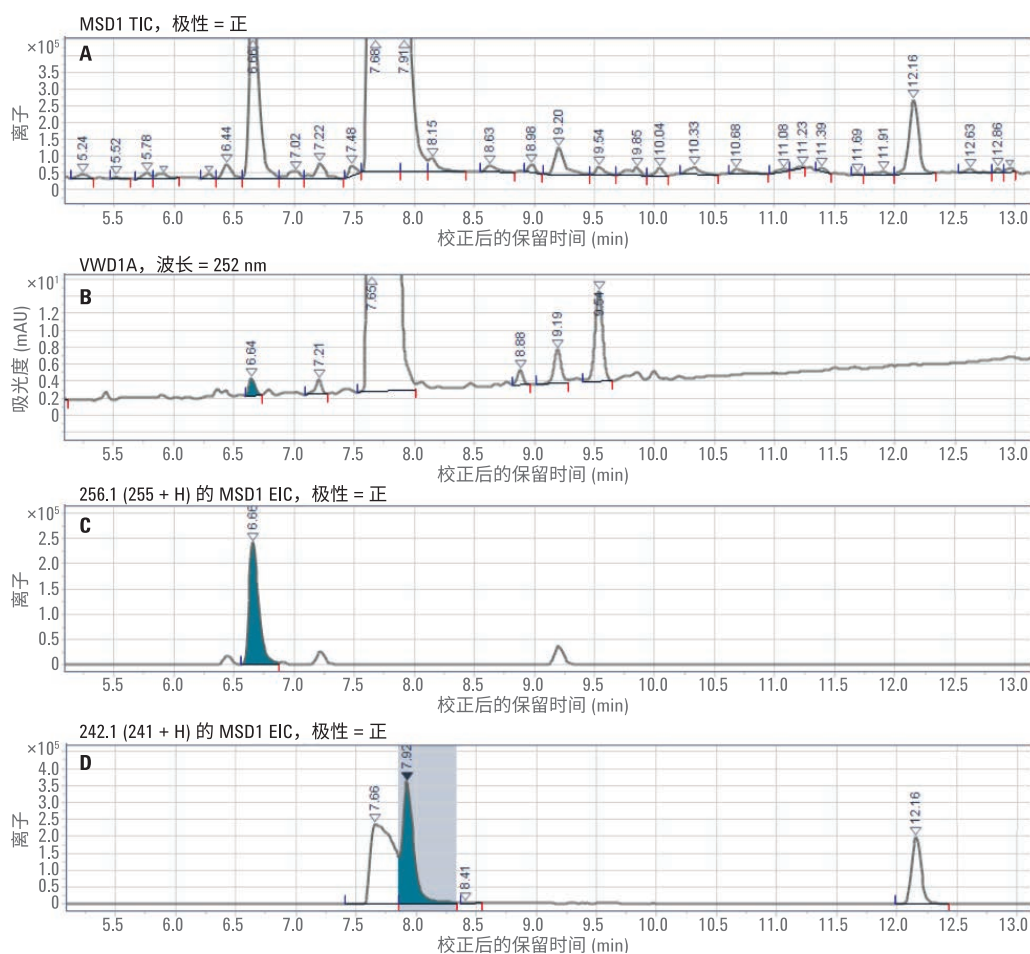


图 2. 安非他酮肝微粒体温育混合物的 UV 和 MS 图。A) 总离子流色谱图 (TIC), B) 252 nm 下的 UV, C) 表示羟基安非他酮的 m/z 256 处的 EIC, D) 表示赤羟基/苏羟基安非他酮的 m/z 242 处的 EIC

基于 MS 峰的馏分收集

使用最初分析实验所采集的分子量信息 (MH^+ 离子的 m/z) 分离目标代谢物。羟基安非他酮代谢物 (MH^+ m/z 256) 是丰度最高的安非他酮代谢物, 可通过 UV 和 MS 轻松检出, 因此使用峰触发模式进行收集。通过纯化软件确定聚焦梯度, 且聚焦梯度能够分离

m/z 256 处的峰 (图 3)。如图所示, 收集质量触发的馏分 (m/z 256)。馏分 A1/B6 的质谱图在 m/z 256 处出现了主峰。基于分析运行的 UV 响应, 羟基安非他酮代谢物为母体的 0.2%。通过半制备型液相色谱分析, 从 90 μ L 的单次进样中分离出约 0.05 μ g 羟基安非他酮。

基于时间的馏分收集

通过在离散的时间段内收集馏分, 实现丰度较低的代谢物的分离。图 4 显示了基于时间的馏分收集所用的方法。利用纯化软件基于分析设置确定放大计算。采用线性梯度而非聚焦梯度, 因为目标化合物表现出更宽的极性范围。在孔板位置 A3 处收集的馏分示出赤/苏-安非他酮代谢物 (m/z 242) 的质谱图。

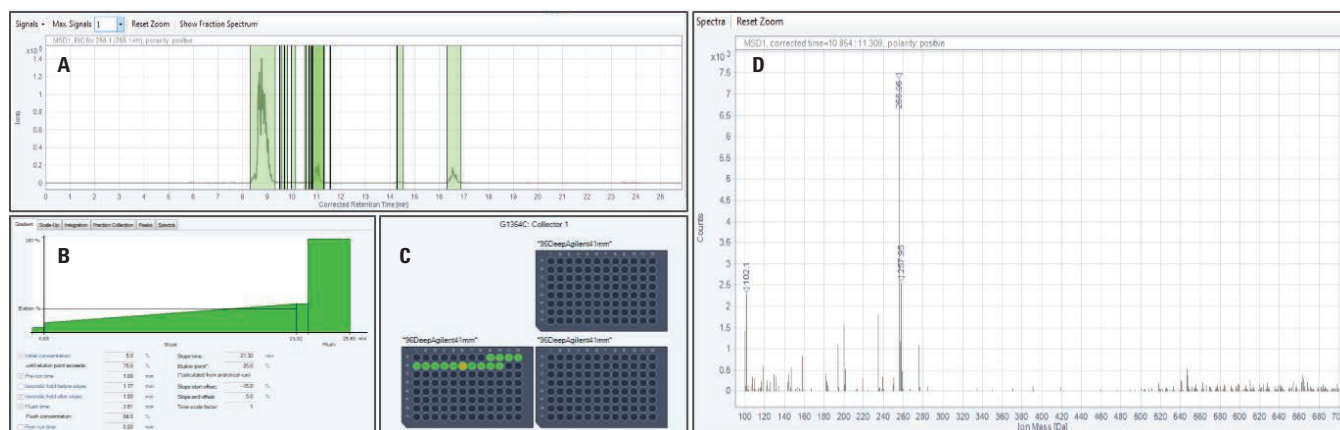


图 3. m/z 256 处的基于峰的质量触发馏分收集。A) TIC 指示基于阈值的收集, B) 所用的聚焦梯度, C) 馏分收集窗口指示所收集的馏分的位置, D) 所收集的馏分的质谱图

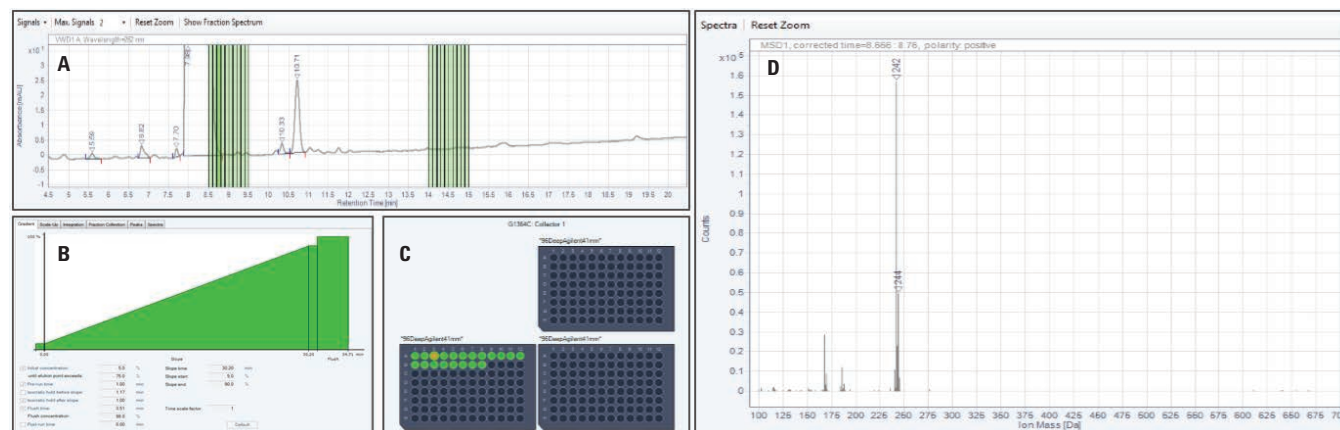


图 4. 基于时间的馏分收集能够收集赤/苏-安非他酮。A) TIC 指示两个以 0.1 min 时间间隔划分的时间段, B) 所用的线性梯度, C) 馏分收集窗口指示所收集的馏分的位置, D) 所收集的馏分的质谱图

羟基安非他酮代谢物的鉴定

使用高分辨率精确质量 MS/MS 信息对羟基安非他酮的结构进行确证。MS/MS 碎裂数据 (m/z 166 和 238) 的分析来自于 C-N 键和羟基基团的裂解, 如图 5 所示。利用 Mass-MetaSite 软件

基于预测的代谢和精确质量 MS/MS 数据确认这些结构归属。使用肝微粒体模型得到的羟基安非他酮的可能的结构表明羟基基团位于氮原子或甲基基团或叔丁基基团上 (参见图 6 中的结构 A、B 和 C) ^{4,5}。

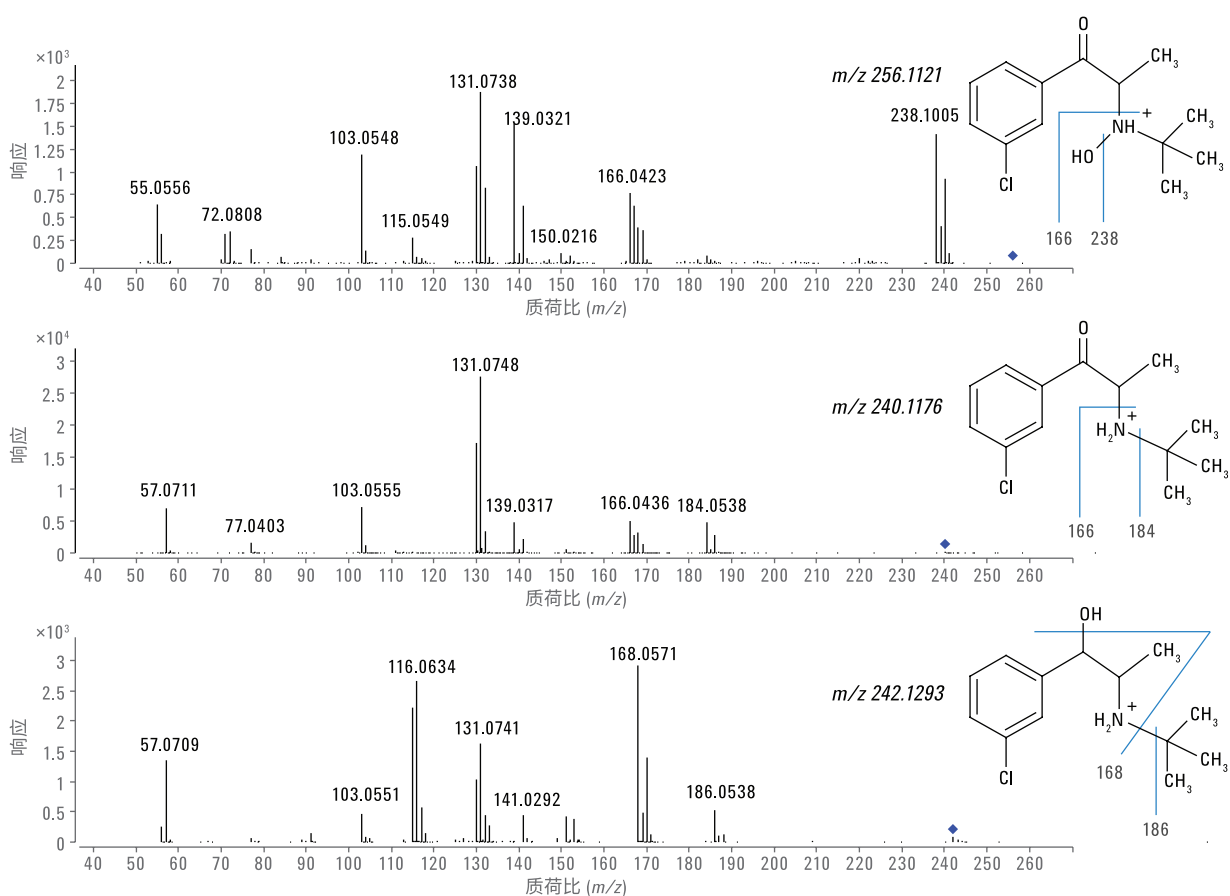


图 5. 羟基安非他酮 (MH^+ m/z 256.1121)、安非他酮 (MH^+ m/z 240.1176) 和赤/苏-安非他酮 (MH^+ m/z 242.1293) 的 LC/MS/MS 碎裂模式。将代谢物的碎裂模式与安非他酮母体的碎片模式进行比较

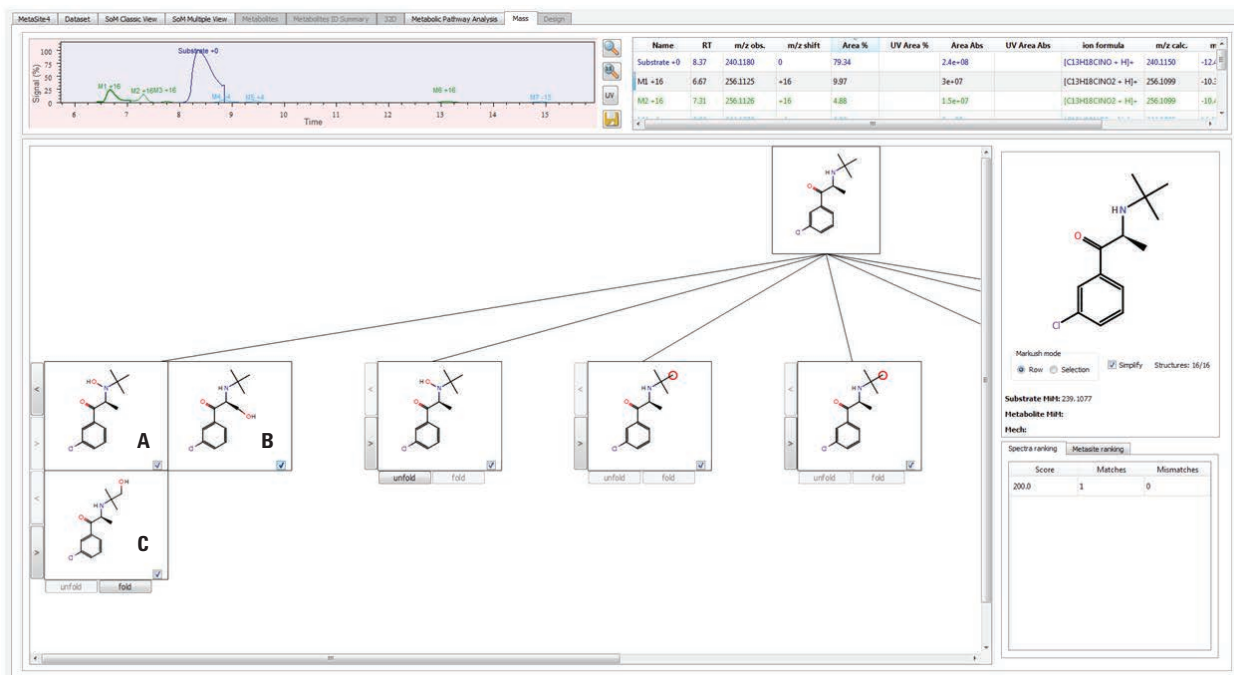


图 6. 利用 Mass-MetaSite 分析羟基安非他酮的可能的结构。A) 氮原子上的羟基基团, B) 甲基基团上的羟基基团, C) 叔丁基基团上的羟基基团

结论

本文介绍了一种使用数个安捷伦平台纯化和鉴定安非他酮代谢物的实用方法。本研究还表明用于纯化安非他酮代谢物的 HPLC 方法可通过安捷伦自动纯化软件从分析柱放大至半制备柱。该方法能够在基于时间和基于峰的馏分收集模式下以较大的规模分离代谢物。使用由 MS 和 MS/MS 分析得到的高分辨率精确质量数据通过 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统示出代谢物结构。同时 Mass-MetaSite 软件无缝衔接, 对这些结构归属进行确认。纯化的灵活性和通用性使代谢物的制备型收集能够轻松扩展, 支持通过 NMR 进行结构解析或药物毒性研究等其他实验。

参考文献

1. Peak-based fraction collection with the Agilent 1100 Series purification system AS – Influence of delay volumes on recovery (利用 Agilent 1100 系列分析型纯化系统进行基于峰的馏分收集 — 延迟体积对回收率的影响), 安捷伦科技公司技术简报, 出版号 5988-5746EN
2. Analytical to Preparative HPLC Method Transfer (从分析型到前处理型 HPLC 的方法转换), 安捷伦科技公司技术简报, 出版号 5991-2013EN
3. Barros Jr., A; *et.al.* Development and evaluation of a multiple-plate fraction collection for sample processing: Application to radioprofiling in drug metabolism studies. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **2011**, 54, pp 979-986
4. Faucette, S. R; *et.al.* Evaluation of the contribution of cytochrome P450 3A4 to Human Liver Microsomal Bupropion hydroxylation. *Drug Metabolism and Disposition* **2001**, 29, pp 1123-1129
5. Wang, X; *et.al.* Simultaneous quantitative determination of bupropion and its three major metabolites in human umbilical cord plasma and placental tissue using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **2012**, 70, pp 320-329

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、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, 2015
2015年8月25日, 中国出版
5991-5276CHCN

仅限研究使用。不可用于诊断目的。



Agilent Technologies