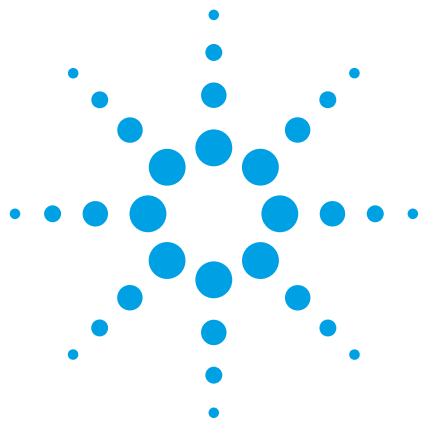




ソフトウェア支援による 薬剤主要代謝物質の ハイスループット同定

Agilent 1290 Infinity LC、TOF、Q-TOF による高速データ取り込み、
および Agilent MassHunter Metabolite Identification ソフトウェアによる
代謝物同定

アプリケーション

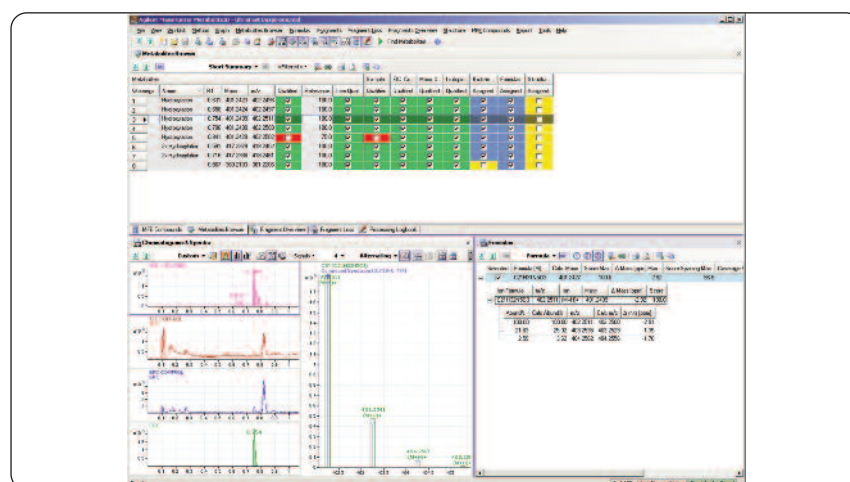
創薬および薬剤開発における代謝物同定

著者

Edgar Naegele

Agilent Technologies

Waldbronn, Germany



概要

本アプリケーションノートでは、以下のことを紹介しています：

- Agilent 1290 Infinity LC システムによる、in-vitro 実験由来の代謝物の高速分離
- Agilent 6530 Accurate-Mass 四重極飛行時間型 LC/MS システムによる、TOF 質量スペクトルの高速取り込み
- Agilent MassHunter Metabolite Identification ソフトウェアによる、in-vitro 実験由来の主要代謝物のソフトウェア支援による高速同定
- Agilent MassHunter ソフトウェアによる、同定された代謝物のレポート作成



Agilent Technologies

はじめに

現代の薬剤開発においては、特殊化合物開発へのさらなる投資の是非を判断するために、新たな薬剤候補の吸収、分布、代謝、排泄 (ADME) 特性をできる限り迅速に分析することがきわめて重要です。適切な特性を持つ化合物を見つけるためには、多くの化合物の ADME 特性をスクリーニングすることが不可欠ですが、そのためには、ハイスループット環境での分析が求められます。本アプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システム、Agilent 6530 Q-TOF MS システム、MassHunter Metabolite Identification ソフトウェアを用いて、新薬候補化合物の主要代謝物を高速かつハイスループットで同定する手法を説明します。

実験手法

使用機器

- デガッサ内蔵 1290 Infinity バイナリポンプ、サーモスタット搭載 1290 高性能オートサンブラ、1290 Infinity カラムコンパートメントで構成される Agilent 1290 Infinity LC システム
- Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システム
- Agilent MassHunter Metabolite Identification (MetID) ソフトウェア
- カラム：ZORBAX SB-C18、2.1 x 50 mm、1.8 µm

サンプル前処理

以下の原液を使用しました：

- 20 mg/mL ミクロソーム S9 調合液
- 0.1 mg/mL ブスピロン水
- 1.6 mg NADP を含む 1.6 mL 0.1 M リン酸バッファ、pH 7.4

- 50 mM イソクエン酸/MgCl₂ (203 mg MgCl₂·6H₂O + 258.1 mg イソクエン酸を含む 20 mL H₂O)
- イソクエン酸脱水素酵素 0.33 unit/µL

NADPH 再生システム：1.6 mL NADP 溶液 + 1.6 mL イソクエン酸溶液 + 100 µL IDH 溶液

インキュベーション混合液：3.85 µL 基質 + 200 µL NADPH 再生システム + 746.15 µL リン酸バッファ + 50 µL S9

インキュベーションを 37 °C で 60 分間実施しました。開始時 (t=0) と t=60 分に、100 µL を採取しました。過塩素酸 6 µL とアセトニトリル 100 µL を添加して反応を止めたのち、14,000 rpm で 15 分間、遠心分離にかけました。SpeedVac コンセントレータを用いて上澄みを蒸発により乾燥させ、0.1 % ギ酸を含む水に再溶解し、LC/MS で分析しました。0 分で採取したインキュベーションサンプルを対照として使用しました。

LC メソッド

溶媒 A：水 + 0.1 % ギ酸
溶媒 B：ACN + 0.1 % ギ酸
流量：0.8 mL/min
グラジエント 0 分、5 % B；0.10 分、5 % B；1.10 分、75 % B；
停止時間：1.1.0 分
ポスト時間：1 分
注入：注入量 5 µL、サンプルクーラー 4 °C、50 % のメタノールで 5 秒間ニードル洗浄、0.1 分でバイパスする注入ループ、フラッシュアウトファクター 16
カラム：温度 60 °C

TOF MS メソッド

イオン源：ESI ポジティブ
キャピラリ：3500 V
乾燥ガス：12 L/min
ネブライザ：55 psi
ガス温度：350 °C

スキマ：65 V
フラグメンタ：200 V
質量範囲：100-1000 m/z
取り込み速度：5 spectra/s
参照質量：121.0508 および 922.0080

MetID ソフトウェアのデータ解析メソッド

解析の最初のステップは、代謝化合物 (代謝サンプル) を含むデータファイルと、親薬物のみ (対照サンプル) を含むデータファイルの比較です。分子特性抽出 (MFE) アルゴリズムを用いて、検出可能なすべての質量シグナルを MS レベルデータから抽出しました。関連化合物の同位体質量と付加質量を別個の分子構造に集め、化学ノイズを除去しました。その後、代謝サンプルと対照の化合物リストを比較しました。

代謝サンプルで新たに出現した化合物や 2 倍に増加した化合物は、すべて代謝物候補とみなし、別のアルゴリズムを用いたさらなる分析の対象としました。こうしたアルゴリズムを使えば、新たな代謝物の確認および同定や、別のアルゴリズムで検出された代謝物の同定が可能です。本ハイスループット分析では、すべてのアルゴリズムの分析結果を等しく加重し、最終的な同定関連スコアにまとめました。厳密に定義された関連閾値を各代謝物のスコアが上回った場合に、代謝物を同定しました。すべてのアルゴリズムで得られた結果を結果テーブルにまとめました。これにより、結果を一目で確認し、レポートを作成することが可能になります¹。

結果と考察

粒子径 1.8 μm の 50 mm カラムで代謝物を高速分離するために、Agilent 1290 Infinity LC システムを用いて 1 分のグラジエントを適用しました。in-vitro アッセイにより、製薬試験化合物ブスピロンから代謝物を生成しました。飛行時間型質量分析計で適度な検出能を得るために、データレートを 5 Hz としました。

生成後のデータを MetID ソフトウェアにロードし、一般的なメソッドを用いて解析しました。解析結果を、MetID ソフトウェアのテーブルに一覧表示しました。このテーブルでは、各代謝物をより詳しく調べることができます (図 1)。結果テーブルから、各代謝物に適用できる情報を示すサマリーレポートを作成しました (図 2)。このより詳細なレポートには、各代謝物の詳しい解析結果が含まれています。ここでは例として、ブスピロンのモノヒドロキシ代謝物 (図 3~5) とジヒドロキシ代謝物 (図 6~8) について説明します。

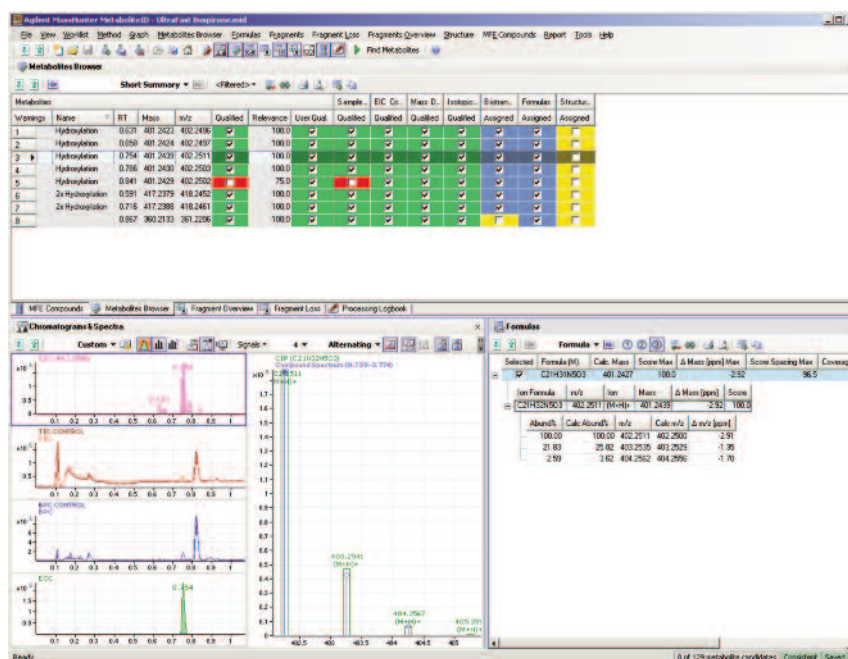


図 1
ブスピロン代謝物の一覧サマリーを示す結果テーブル。同定された全代謝物、抽出イオンクロマトグラム (EIC)、抽出化合物クロマトグラム (ECC)、同位体パターン分析、組成計算された化学式が表示されています。

化合物名	質量	RT	Rel.	Qual.	User	SC	IPM	EIC	MDF	Form.	BioXF
2x ヒドロキシ化物	417.2379	0.59	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ヒドロキシ化物	401.2423	0.63	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ヒドロキシ化物	401.2424	0.66	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2x ヒドロキシ化物	417.2388	0.72	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ヒドロキシ化物	401.2439	0.75	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ヒドロキシ化物	401.2430	0.79	100.00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ブスピロン	385.2478	0.82	—	—	—	—	✓	✓	✓	✓	—
ヒドロキシ化物	401.2429	0.84	75.00	×	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓

図 2
サマリー結果レポートには、保持時間でソートされた同定代謝物が含まれます。また、それらには、代謝物名と関連スコア、分子量、各アルゴリズム結果の合否フラグも表示されています。SC = サンプル・対照比較、IPM = 同位体パターンマッチング、EIC = 抽出イオンクロマトグラム、MDF = 質量欠損フィルタ、Form. = 組成計算された化学式、BioXF = 割り当てられた生体内変化、Qual. = スコアにより同定、User = ユーザーにより同定

m/z 402.2511 で 0.75 分後に溶出するモノヒドロキシ代謝物の詳細レポートには、測定した精密質量、組成計算された化学式、割り当てられた生体内変化、イオン種といった代謝物に関する詳細情報が表示されます。さらに、分子特性抽出 (MFE)、抽出イオンクロマトグラム (EIC) 化合物検索、質量欠損フィルタ結果といった各アルゴリズムの結果に関する詳細情報も表示されます (図 3)。ヒドロキシ代謝物の化学式候補は、設定した質量エラー幅だけでなく、測定された同位体パターンも用いて算出されています。これにより、組成計算される化学式の質が高まり、ヒット数が絞り込まれます。これらの結果は、化学式に関する代謝物解析結果レポートにも表示されます (図 4)。

代謝物情報							
化合物名	ヒドロキシル化物	BioXF 名	ヒドロキシル化物				
化学式	C21H31N5O3	質量	401.2439				
m/z	402.2511	イオン種	(M+H)+				
RT	0.754	サンプルタイプ	代謝物サンプル				
MFE 化合物検索							
質量	m/z	イオン種	RT	開始時間	終了時間	量	高さ
401.2439	402.2511	(M+H)+	0.754	0.739	0.774	192448	187344
EIC 化合物検索							
質量	m/z	イオン種	RT	開始時間	終了時間	面積	面積 %
401.2427	402.2500	(M+H)+	0.755	0.739	0.774	149323	100.00
サンプル比較結果							
同定	変化	レスポンス比	補正 RT	標準化した高さ			
☒	新規						
同位体パターンマッチング結果							
同定	スコア	デルタ m/z					
☒	95.91	0.00					
質量欠損フィルタ結果							
同定	デルタ質量 [mDa]						
☒	-3.91						
化学式結果							
割り当て	組成式	算出質量	デルタ質量 [mDa]	デルタ質量 [ppm]	算出根拠		
☒	C21H31N5O3	401.2427	-1.17	-2.92	Mfe 化合物 Ms スペクトル		
生体内変化結果							
割り当て	化合物名	フェーズ	オフセット化学式	デルタ質量 [mDa]	デルタ質量 [ppm]	算出質量	
☒	ヒドロキシル化物	+O		1.17	2.92	401.2427	

図 3
リテンションタイム 0.75 分におけるブスピロンのヒドロキシ代謝物に関する詳細な代謝物レポート。この部分には、同定された代謝物と同定アルゴリズムの詳細情報が表示されています。そのほか、化学式 (図 4)、クロマトグラム、同位体パターン (図 5) の詳細情報も表示されます。

代謝物情報						
化合物名	ヒドロキシル化物		BioXF 名	ヒドロキシル化物		
化学式	C21H31N5O3		Mass	401.2439		
m/z	402.2511		RT	0.754		
化学式サマリー						
選択	スコア化学式		イオン式	質量	算出質量	質量 [ppm]
TRUE	100.0 C21H31N5O3		C21H32N5O3	401.2439	401.2427	-2.92
化学式詳細						
化学式 (M)	選択					
C21H31N5O3	TRUE					
イオン種	m/z					
(M+H)+	402.2511					
化学式結果						
イオン式	スコア	質量	質量 [mDa]	質量 [ppm]	DBE	
C21H32N5O3	100.0	401.2439	-1.17	-2.92	9	
同位体ピーク情報						
アバundانس %	算出アバundانس %	m/z	算出 m/z	m/z [ppm]		
100.00	100.00	402.2511	402.2500	-2.91		
21.83	25.02	403.2535	403.2529	-1.35		
2.59	3.62	404.2562	404.2556	-1.70		

図 4
リテンションタイム 0.75 分のブスピロンのヒドロキシ代謝物について算出された同位体パターンなどの化学式に関する詳細な代謝物レポート。

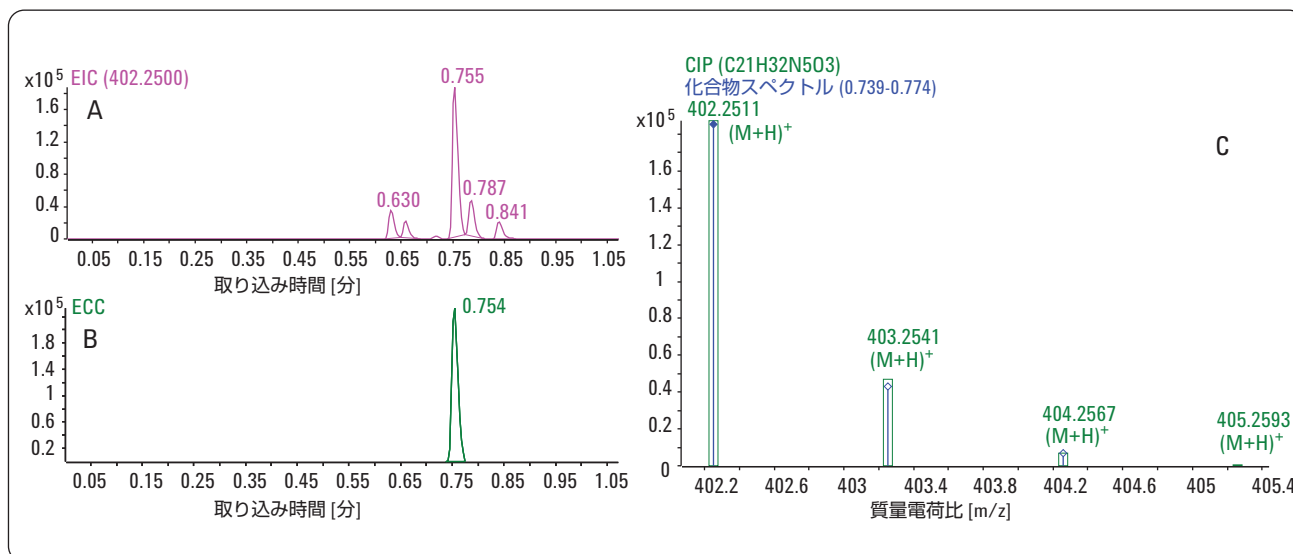


図 5
リテンションタイム 0.75 分におけるブスピロンのヒドロキシ代謝物に関する詳細な代謝物レポート：
A) 質量 402.25 の化合物の抽出イオンクロマトグラム (EIC)
B) リテンションタイム 0.75 分におけるブスピロンのヒドロキシ代謝物の抽出化合物クロマトグラム (ECC)
C) リテンションタイム 0.75 分におけるブスピロンのヒドロキシ代謝物の測定同位体パターン (青線) と算出同位体パターン (CIP、緑のボックス)。

最後に、EIC、ECC、同位体パターンを表示しました (図 5)。m/z 402.25 の EIC では、ブスピロンのヒドロキシ代謝物候補として、選択されたリテンションタイム 0.75 分のピークを含む 5 つの主要ピークが示されています (図 5A)。ECC では、EIC と同じくリテンションタイム 0.75 分において、分子量 401.2439 で抽出された MFE 化合物が示されています (図 5B)。この化合物の測定同位体パターンは、化学式算出の根拠となる算出同位体パターンと良好に一致しています (図 5C)。

同じデータ解析において、モノヒドロキシ代謝物よりも存在量が 2 桁少ないジヒドロキシ代謝物も同定しました。詳細レポートには、m/z 418.2461 で 0.71 分後に溶出するジヒドロキシ代謝物の詳細情報と、各アルゴリズムの詳細情報が表示されています (図 6)。

代謝物情報

化合物名

2x ヒドロキシ化物質

化学式

C₂₁H₃₁N₅O₄

m/z

418.2461

RT

0.716

BioXF 名

2x ヒドロキシ化物質

質量

417.2388

イオン種

(M+H)⁺

サンプルタイプ

代謝物サンプル

MFE 化合物検索

質量	m/z	イオン種	RT	開始時間	終了時間	量	高さ
417.2388	418.2461	(M+H) ⁺	0.716	0.700	0.726	3865	3889

EIC 化合物検索

質量	m/z	イオン種	RT	開始時間	終了時間	面積	面積 %
417.2376	418.2449	(M+H) ⁺	0.713	0.703	0.739	3483	100.00

サンプル比較結果

同定	変化	レスポンス比	補正 RT	標準化した高さ
☒	新規			

同位体パターンマッチング結果

同定	スコア	デルタ m/z
☒	91.50	0.00

質量欠損フィルタ結果

同定	デルタ質量 [mDa]
☒	-8.97

化学式結果

割り当て	組成式	算出質量	デルタ質量 [mDa]	デルタ質量 [ppm]	算出根拠
☒	C ₂₁ H ₃₁ N ₅ O ₄	417.2376	-1.20	-2.87	Mfe 化合物 Ms スペクトル

生体内変化結果

割り当て	化合物名	フェーズ	オフセット化学式	デルタ質量 [mDa]	デルタ質量 [ppm]	算出質量
☒	2x ヒドロキシ化	I	-O ₂	1.20	2.87	417.2376

図 6
リテンションタイム 0.71 分におけるブスピロンのジヒドロキシ代謝物に関する詳細な代謝物レポート。この部分には、同定された代謝物と同定アルゴリズムの詳細情報が表示されています。そのほか、化学式 (図 7)、クロマトグラム、同位体パターン (図 8) の詳細情報も表示されます。

化学式詳細レポートでは、化学式算出の概要が示されています (図 7)。

m/z 418.24 の EIC では、ブスピロンのジヒドロキシ代謝物候補として、選択されたリテンションタイム 0.71 分のピークを含む 5 つの主要ピークが示されています (図 8A)。ECC では、EIC と同じくリテンションタイム 0.71 分において、分子量 417.2388 で抽出された MFE 化合物が示されています (図 8B)。この化合物の測定同位体パターンと算出同位体パターンが、図 8C に示されています。

代謝物情報					
化合物名	ヒドロキシル化物	BioXF 名	2x ヒドロキシル化物		
化学式	C21H31N5O4	質量	417.2388		
m/z	418.2461	RT	0.716		
化学式サマリー					
選択	スコア	化学式	イオン式	質量	算出質量
TRUE	100.0	C21H31N5O4	C21H32N5O4	417.2388	417.2376
				△ 質量 [ppm]	
				-2.87	
化学式詳細					
化学式 (M)	選択				
C21H31N5O4	TRUE				
イオン種	m/z				
(M+H)+	418.2461				
化学式結果					
イオン式	スコア	質量	△ 質量 [mDa]	△ 質量 [ppm]	DBE
C21H32N5O4	100.0	417.2388	-1.20	-2.87	9
同位体ピークパターン					
アバンダンス %	算出アバンダンス %	m/z	算出 m/z	Δ m/z [ppm]	
100.00	100.00	418.2461	418.2449	-2.86	
23.90	25.06	419.2488	419.2478	-2.35	

図 7
リテンションタイム 0.71 分のブスピロンのジヒドロキシ代謝物について算出された同位体パターンなどの化学式に関する詳細な代謝物レポート。

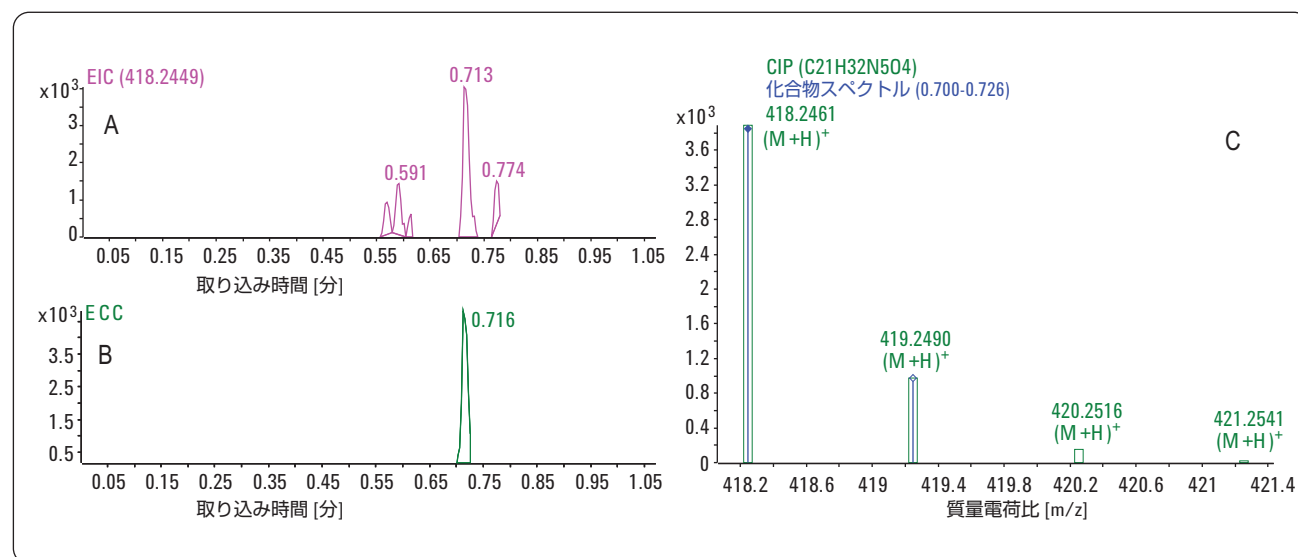


図 8
リテンションタイム 0.71 分におけるブスピロンのジヒドロキシ代謝物に関する詳細な代謝物レポート：
A) 質量 418.24 の化合物の抽出イオンクロマトグラム (EIC)
B) リテンションタイム 0.71 分におけるブスピロンのジヒドロキシ代謝物の抽出化合物クロマトグラム (ECC)
C) 0.71 分におけるブスピロンのジヒドロキシ代謝物の測定同位体パターンと算出同位体パターン

結論

本アプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent Q-TOF LC/MS システムを用いて、ハイスループット条件下で、in-vitro 代謝物サンプルに含まれる化合物の高速分離と精密質量分析を実施しました。代謝物化合物は 1 分以内に分離され、Metabolite ID ソフトウェアにより抽出されたピーク幅は 1 秒を下回りました (FWHH)。Agilent Metabolite Identification ソフトウェアにより、主要代謝物が迅速に同定されました。各代謝物のサマリーレポートと詳細レポートも作成しました。

参考文献

1. E. Naegele, F. Wolf, U. Nassal, R. Jäger, H. Lehmann, F. Kuhlmann, K. Subramanian, "An interwoven, multi-algorithm approach for computerassisted identification of drug metabolites", Agilent Technologies Application Note, publication number 5989-7375EN, **2007**.

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っていません。

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published May 1, 2009
Publication Number 5989-9924JAJP



Agilent Technologies