

使用安捷伦 LC/Q-TOF 和 Mass MetaSite 软件无缝鉴定代谢物

应用简报

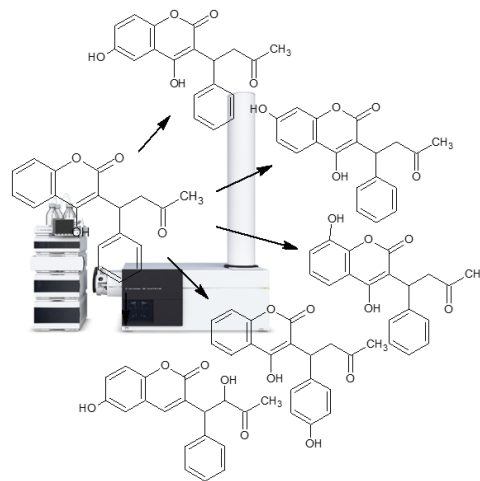
小分子药物

作者

Siji Joseph
应用科学家
安捷伦科技有限公司
Bangalore, India

摘要

代谢物的检测和鉴定是早期药物发现阶段的关键步骤。由于代谢物可能以痕量形式存在，所以从复杂生物样品中鉴定代谢物通常具有一定的难度。本应用简报介绍了将高灵敏度安捷伦 LC/Q-TOF 仪器同软件工具（Mass MetaSite 软件）无缝集成，用于鉴定药物代谢物的方法。Mass MetaSite 软件可预测代谢转化物、判断主要代谢位点，并通过精确质量 MS/MS 数据指定代谢物的结构。本实验的工作流程为：在将华法令的大鼠肝细胞温孵液孵育 24 小时之后，预测并鉴定其主要代谢产物。



Agilent Technologies

前言

药物代谢研究在药物研发过程中至关重要。监管机构要求在药物筛选初期完成对所有主要代谢物的鉴定。通常可用的代谢物参比标准品十分有限，这会影响到鉴定的可靠性。然而，随着高灵敏度精确质量数测量技术的不断发展，MS/MS 数据能够在代谢物鉴定中提供大量的结构信息。因此，高分辨率精确质量质谱是鉴定复杂生物基质代谢物的理想技术。本应用简报介绍了使用安捷伦 LC/Q-TOF 系统和 Mass-MetaSite 软件对华法令代谢物进行鉴定和结构解析的方法。

实验部分

化学品与试剂

甲醇为 LC/MS 级，甲酸为 LC/MS 洗脱液添加剂级 (Sigma-Aldrich, Bangalore, India)。所有实验均使用 Milli-Q 水 (Merck, Darmstadt, Germany)。本研究使用的其他化学品均购自 Sigma-Aldrich 公司 (Bangalore, India)。

肝细胞孵育样品

样品来自使用外消旋华法令孵育 24 小时的大鼠肝细胞，由外部合作方提供。将新鲜分离的大鼠肝细胞平铺在添加了胎牛血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 的 Williams E 培养基的胶原涂层 24 孔板中，接种浓度为 20 万个细胞/孔/0.5 mL。2 小时后加入平板缓冲液，再用无血清 Williams E 培养基清洗两次。随后，向每个孔中加入 0.5 mL 无血清 Williams E 培养基 (含 30 μ M 华法令)，将平板置于含 5% CO₂ 的 37 °C 孵育器中孵育 24 小时。之后刮除细胞，并用 2 体积的乙腈进行淬灭。将反应混合物在 12000 rpm 的转速

下离心 10 分钟，离心后的上清液用于 LC/Q-TOF 分析。

工作流程

使用 Agilent 1290 Infinity LC 系统对代谢物进行色谱分离，然后用 Agilent 6550 Q-TOF 系统收集精确质量 MS 和 MS/MS 谱图。数据采集文件经 Mass-MetaSite 软件处理后用于代谢物的鉴定。工作流程见图 1。

仪器和软件

采用 Agilent 1290 Infinity LC 系统进行反相色谱分析，该系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 G4220A
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 G4226A
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器温控器 G1330B
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 G1316C

使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl Hexyl, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m 色谱柱进行分离。Agilent 1290 Infinity 液相色谱方法参数见表 1。

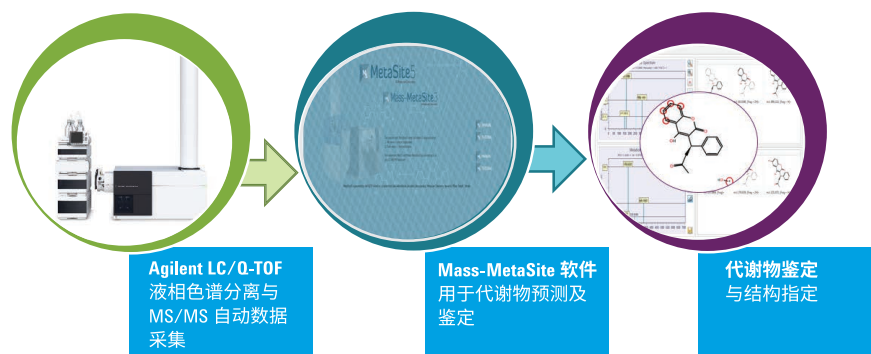


图 1. 使用安捷伦 LC/Q-TOF 仪器和 Mass MetaSite 软件的代谢物鉴定工作流程

表 1. 液相色谱方法参数

Agilent 1290 Infinity 液相色谱运行条件		
流动相	A) 0.05 % 甲酸水溶液 B) 0.05 % 甲酸的甲醇溶液	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl Hexyl, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m	
柱温	55 °C	
进样量	3 μ L, 冲洗进样口 10 秒	
进样针清洗	甲醇	
流速	0.24 mL/min	
梯度	时间 (min)	%B
	0	55
	12	98
	18	98
	21	55
	25	55

使用 Agilent 6550 Q-TOF 质谱仪检测经液相色谱分离的洗脱液。电喷雾离子源配备了安捷伦喷射流 (AJS) 热梯度聚焦技术, 显著提高了灵敏度, 并在正离子模式下运行。采用 Agilent MassHunter 工作站 (版本 B.05.01) 软件进行数据采集和分析。将 m/z 值为 121.0505 和 922.0098 的化合物用作内部参比质量, 在数据采集过程中通过软件进行参比质量校正, 进而实现同步精确质量校正。表 2 列出了 6550 Q-TOF 的方法参数。该仪器设置用于收集空白样品 (乙腈)、基质样品 (华法令的乙腈溶液) 和肝细胞样品 (用华法令孵育 24 小时) 的数据依赖型 MS/MS 谱图。使用 Mass MetaSite 软件 (版本: 3.2.0) 进行数据处理, 参数如表 3 所示。

表 2. Agilent 6550 Q-TOF 方法参数

Agilent 6550 Q-TOF 采集参数	
采集模式	自动 MS/MS
离子极性	正
气体温度	275 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器	25 psi
鞘气温度	325 °C
鞘气流速	10 L/min
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	150 V
锥孔电压	65 V
碰撞能量	公式, 电荷: 1, 斜率: 3.6, 偏移: -4.8
V Cap	3500
参比质量	121.0505 和 922.00979
MS 范围	100–1000 m/z , 采集速度: 6 幅谱图/s
MS/MS 范围	50–2000 m/z , 采集速度: 5 幅谱图/s

表 3. Mass MetaSite 参数

Mass-MetaSite 参数	
计算模式	DD-MS/MS
质谱仪	Agilent 6550 Q-TOF
电离模式	[M+H] ⁺
CYP	肝脏
代谢级别数量	2
基质键断裂极限	4
键断裂重组, 偶数电子	允许
键断裂重组, 奇数电子	允许
键断裂重组, N-氧化	允许
反应机理	微粒体反应集
相同峰的允许误差 (amu)	0.01
色谱图自动过滤阈值	0.97
MS 自动过滤阈值	0.97
MS/MS 自动过滤阈值	0.9
信号过滤	自动
扫描过滤	自动

结果与讨论

Mass MetaSite 软件的代谢位点和代谢物预测功能

使用 Mass MetaSite 软件的华法令结构 mol 文件预测最可能的药物代谢位点。选择肝酶代谢模型，软件预测的代谢物列表如图 2 所示。这些是第 1 阶段代谢物，主要包括羟基化代谢物。在预测代谢位点上形成特定代谢物的概率结果用条形图表示（图 3）。一同预测的还有单同位素精确质量和 RRT（基于每个代谢物的相关亲油性）。

LC/Q-TOF 分析

使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl Hexyl 色谱柱进行的液相色谱法，能够很好地分离复杂孵育样品基质产生的谱峰。图 4 为洗脱曲线的 Q-TOF 总离子流色谱图 (TIC)。

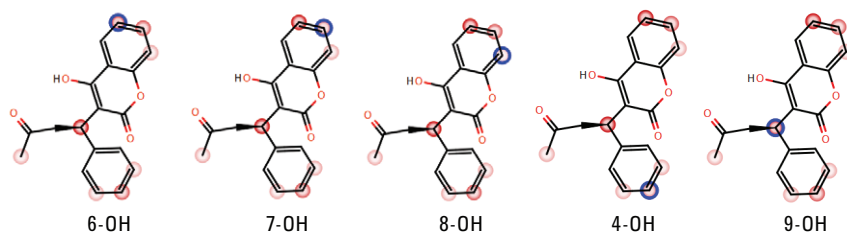


图 2. 预测的羟基华法令代谢物结构

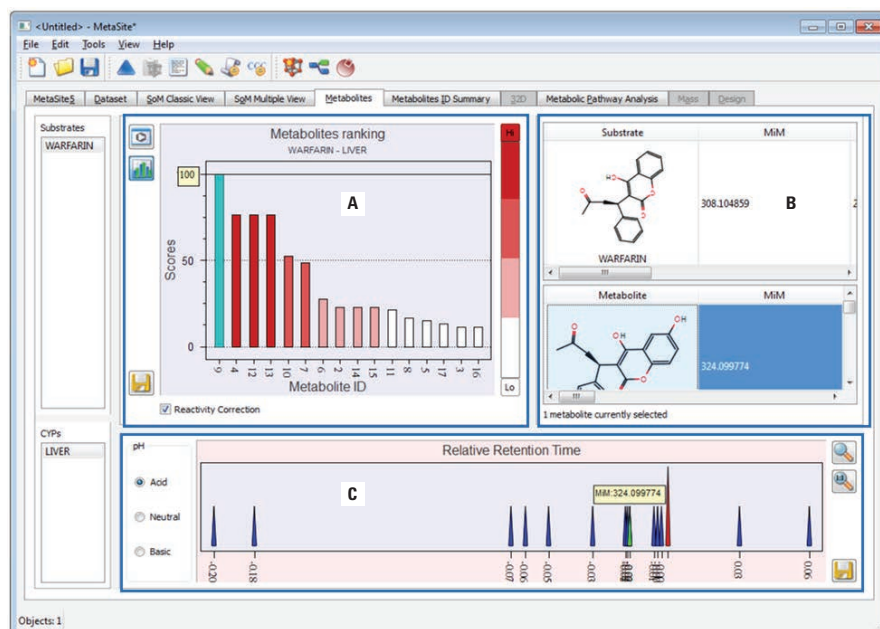


图 3. A) 以条形图表示所形成代谢物的概率结果。A 面板中的蓝条是最常见的代谢物。单击 A 面板中的各条带，每种预测代谢物的详细信息将会显示在 B 面板中。C) 面板显示了与酸性流动相条件下的基质作比对的相对保留时间以及各代谢物的精确质量数

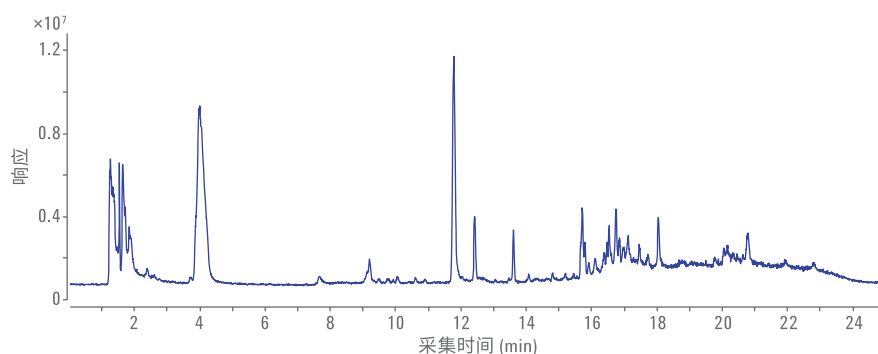


图 4. 使用华法令孵育的大鼠肝细胞样品的 TIC 扫描结果。从上述 TIC 扫描图上谱峰的数量即可看出样品的复杂程度

Mass MetaSite 软件的代谢物鉴定功能

通常，使用 Mass-MetaSite 软件对 Q-TOF 数据进行分析具体包含两步：

- 依据复杂的 TIC 色谱图中的色谱峰鉴定药物和相关代谢物
- 指定每个待鉴定代谢物的化学结构

指定化学结构的同时，该软件预测母体药物及其代谢物的理论碎片，并将此碎片的谱图与实际实验获得的 MS 和 MS/MS 结果进行比对。本实验中，Mass MetaSite 软件通过 Q-TOF 数据鉴定出三种羟基华法令代谢物（图 5）。绿色谱峰表示该代谢物来源于第 1 阶段的代谢反应。所鉴定代谢物的质量数与预测值相匹配。

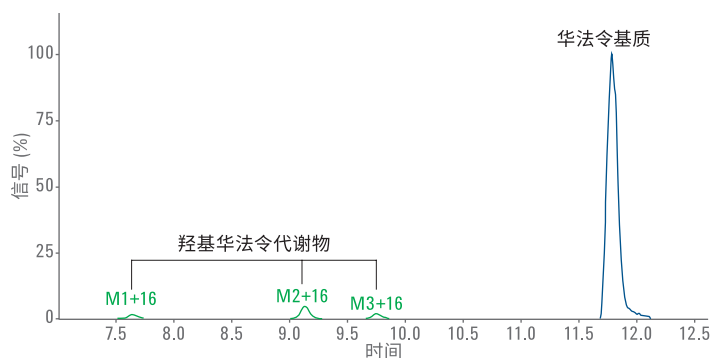


图 5. 华法令及其羟基代谢物（由肝细胞孵育而来）的洗脱曲线。标记为 M1+16、M2+16、M3+16 的三种羟基代谢物和基质华法令的谱峰

基于碎片谱图的羟基华法令位置异构体的结构鉴定

华法令的氧化代谢可生成五种主要的羟基代谢物位置异构体¹。4'-羟基华法令和 10-羟基华法令具有 MS/MS 特

征片段，其他三种华法令羟基代谢物（即 6-羟基华法令、7-羟基华法令和 8-羟基华法令）在 m/z 179 处产生的特征片段具有极其相似的碎片谱图，且无法通过 MS/MS 谱图^{2,3}进行区分。

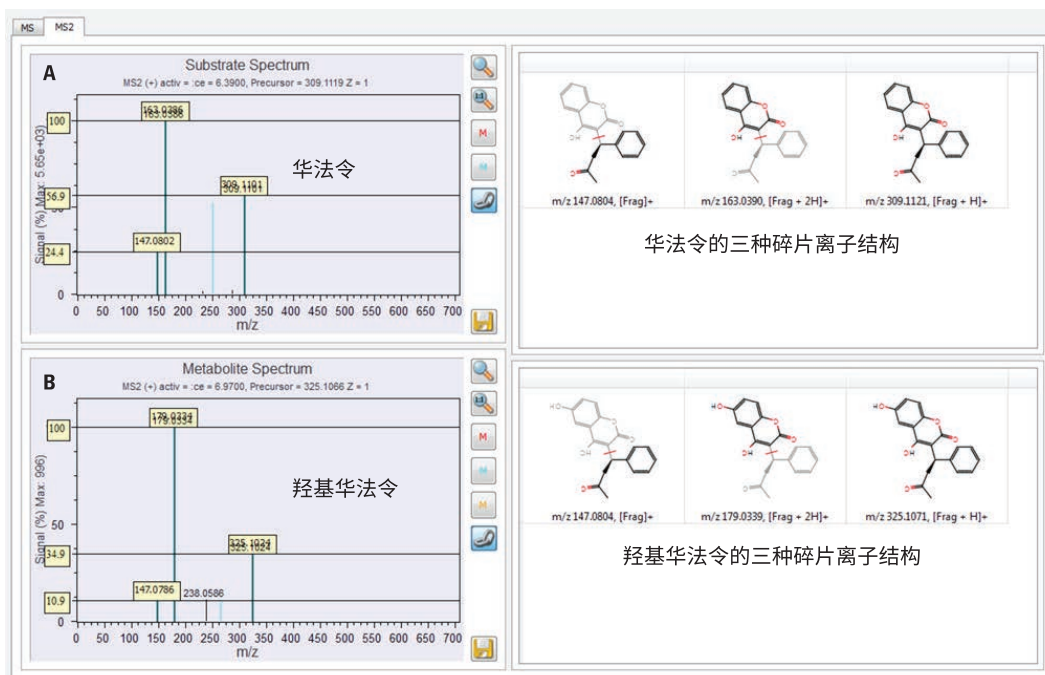


图 6. 6-羟基华法令代谢物 (M+16) 指定的结构。自动碎片分析显示了用于结构解析的亚结构。A 和 B 分别显示了基质（华法令）和 M+16 代谢物的碎片谱图和结构解析。所预测的 m/z 179 处的特征片段的结构理论上对应的代谢物可能为 6-羟基华法令、7-羟基华法令或 8-羟基华法令

通过 Mass MetaSite 软件处理肝细胞孵育样品 Q-TOF MS/MS 数据，为羟基华法令的位置异构体指定化学结构。该软件根据独特的 MS/MS 碎片谱图鉴定出其中的一个代谢物谱峰为 4-羟基华法令。但其他两种代谢物谱峰在 m/z 179 处特征片段的碎片谱图极其相似。显然，其他两个代谢物谱峰可能是 6-羟基华法令、7-羟基华法令或 8-羟基华法令。作为示例，图 6 显示了第三种羟基华法令 (M+16) 代谢物谱峰（在 9.7 min 洗脱）的结构指定结果。本示例中，Mass-MetaSite 软件将此谱峰鉴定为 6-羟基华法令。使用 MassHunter Qual 软件进一步观察质量准确度值，如图 7 所示。

结论

本研究介绍了一种鉴定生物样品中药物代谢物的简便、稳定的方法。Agilent 1290 Infinity LC 系统可实现优异的色谱分离，Agilent 6550 Q-TOF 提供了高分辨率精确质量 MS/MS 数据。此外，Mass MetaSite 软件非常有助于系统、可靠地鉴定代谢物结构。此实验工作流程能够有效地鉴定出由华法令和大鼠肝细胞孵育 24 小时获得的羟基华法令代谢物的三种位置异构体。对来自母体药物化合物的代谢物进行结构研究，显著提高了代谢物鉴定的可靠性并有助于药物设计和研发。

Height (Calc)	Height Sum% (Calc)	Height % (Calc)	m/z (Calc)	Diff (mDa)	Height	Height %	Height Sum %	m/z	Diff (ppm)
52716	80.4	100	325.1071	0.2	53740.8	100	82	325.1069	0.56
11036.5	16.8	20.9	326.1104	0.8	10128.3	18.8	15.4	326.1097	2.41
1638.3	2.5	3.1	327.113	-0.7	1529	2.8	2.3	327.1137	-2.24
182	0.3	0.3	328.1156	1.1	174.8	0.3	0.3	328.1145	3.49

图 7. Agilent MassHunter 定性分析软件截图显示了羟基华法令代谢物 [(M+H)⁺, C₁₉H₁₇O₅, m/z 325.1069] 的质量准确度值。安捷伦 Q-TOF 的独特设计可提供高质量准确度值，这有助于确认元素组成，进而实现代谢物的可靠鉴定。图中突出显示了质量误差值 (< 3.5 ppm) 较低的同位素

致谢

感谢印度班加罗尔 Syngene 公司
BMS-Biocon 研究中心的 Murali
Subramanian 博士友情提供肝细胞
孵育样品。

参考文献

1. Miller, G.P; Jones, D. R; Sullivan, S. Z;
et al. Assessing cytochrome P450
and UDP-glucuronosyltransferase
contributions to warfarin metabolism
in humans. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**,
22, p 1239
2. Zhi-Yi Zhang. LC/MS/MS warfarin
assay – An emerging tool for the
early detection of cytochrome
P450-associated drug–drug
interactions in drug discovery,
Spectroscopy 17 **2003**, pp 491-502
3. Regalado, E. L; *et al.* Chromatographic
resolution of closely related
species: separation of warfarin and
hydroxylated isomers, *J. of Chromatog.*
A **2013**, 1314, pp 266- 275

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9月1日，中国出版
5991-6129CHCN



Agilent Technologies