

使用ACQUITY Premier和有机杂化表面技术改善生物体液中的药物代谢物鉴定：提高灵敏度和重现性

Lauren Mullin, Adam King, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

摘要

液相色谱与电喷雾串联质谱联用系统是体内和体外药物代谢物鉴定的主要平台。成功完成代谢物鉴定的关键在于药物相关分析物的色谱分离度，包括不同分析物的分离度以及分析物与基质中内源性组分之间的分离度。色谱系统和色谱柱中存在的过渡金属可充当路易斯酸，与包含磷酸基团、不带电荷的胺、羟基和去质子化羧酸的分析物相互作用，导致色谱峰形变差，甚至造成严重的分析物损失。ACQUITY Premier色谱系统和色谱柱采用有机杂化表面技术，可消除此类非特异性结合。使用ACQUITY Premier色谱系统和色谱柱分析吉非替尼的体内代谢物能够改善峰形、增强信号响应并获得更清晰的MS/MS谱图。

优势

- 改善药物代谢物的色谱分离度
- 增加峰响应
- 提高重现性

简介

代谢物鉴定在药物研发过程中起到至关重要的作用，有助于鉴定代谢“软点”(soft spots)、检测反应性代谢物并确认候选药物在动物模型以及人体的体外、体内代谢归宿。LC-MS/MS（尤其是精确质谱(MS)）由于具有优异的专属性、灵敏度，并且能提供结构信息，已成为代谢物鉴定的优选技术。质谱技术的进步（例如精确质量数和离子淌度）提高了DMPK科学家“净化”和过滤MS信号的能力，有助于改善所采集数据的质量¹。

药物分子会经历各种代谢过程，产生多种代谢物，或者可能以低剂量给药，导致药物相关分子的循环浓度非常低。为全面了解药物的代谢归宿，需要检测并分离样品中存在的所有药物代谢物，以便获得清晰的MS和MS/MS谱图以供后续解析。色谱系统和色谱柱中使用的过渡金属可充当路易斯酸，与包含磷酸基团、不带电荷的胺、羟基和去质子化羧酸的分析物相互作用，导致色谱峰形变差，甚至造成严重的分析物损失²。ACQUITY Premier色谱系统和色谱柱采用有机杂化聚合物表面技术，可减少/消除这些相互作用。MaxPeak高性能表面(HPS)液相色谱技术能够提供非常有效的表面屏障来减少这些不必要的相互作用。这种MaxPeak HPS液相色谱表面由高度交联层组成，化学性质与亚乙基桥杂化(BEH)硅胶相似，能够在分析物与金属表面之间提供弹性屏障，但不参与分离。

吉非替尼是一种EGFR抑制剂，用于治疗某些乳腺癌、肺癌及其他癌症³。吉非替尼的经验分子式为 $C_{22}H_{24}ClFN_4O$ ，分子量为 $446.91\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，其通过CYP 3A4发生肝代谢，产生八种主要代谢物，其中的O-去甲基代谢物最为重要（图1）。该药物的主要消除途径是粪便，少量通过尿液排泄。以前的吉非替尼药代动力学研究表明，需要使用包含缓冲液（例如醋酸铵）的流动相以防止峰拖尾并在可接受的分析时间内完全分离目标峰^[3-5]。醋酸铵等缓冲液的存在会降低电离效率（尤其是在负离子模式下），导致分析物响应降低，并且更加难以检出低浓度代谢物。本应用纪要展示了使用ACQUITY Premier色谱系统分析小鼠尿样中吉非替尼代谢物的优势。

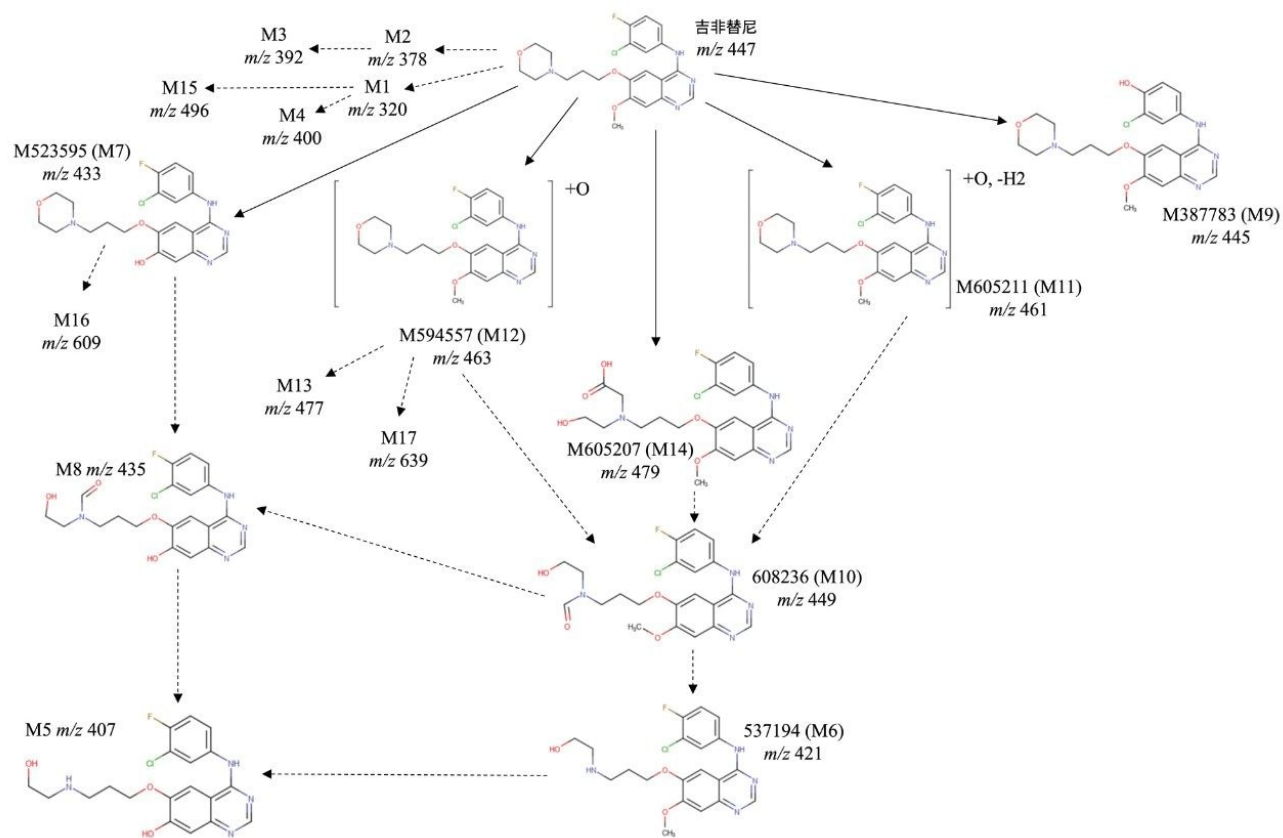


图1. 吉非替尼及其相关代谢物的图示²。

实验

对小鼠进行吉非替尼和单独溶媒的静脉注射(IV)和口服(PO)给药，剂量分别为10 mg/kg和50 mg/kg。在给药前以及给药后0~3 h、3~8 h和8~24 h采集尿样，置于冰上储存。将小鼠尿样用0.1% (v/v) 甲酸水溶液按1:5的比例进行稀释。将样品溶液涡旋混合，然后在25,000g下离心5 min。移取上清液，并转移至最大回收玻璃样品瓶(600000670CV <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/vials-containers--collection-plates/600000670cv-lcms-certified-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-max-recovery-vi.html>>)中进行分析。利用LC-MS^E将尿样重复分析三次。

液相色谱条件

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Premier或ACQUITY UPLC I-Class PLUS
样品瓶：	沃特世最大回收样品瓶
色谱柱：	ACQUITY Premier HSS T3 2.1 × 100, 1.8 μm或 ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 × 100, 1.8 μm
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	3 μL
流速：	600 μL/min
流动相A：	0.1%甲酸水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度：	见下文

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.6	99	1	线性
1	0.6	99	1	线性
3	0.6	85	15	线性
6	0.6	50	50	线性
9	0.6	5	95	线性
10	0.6	5	95	线性
10.1	0.6	99	1	线性

质谱条件

质谱系统：	SYNAPT XS
电离模式：	电喷雾(ESI)正离子模式
采集范围：	m/z 50~1000
毛细管电压：	2.8 kV
碰撞能量：	线性CE梯度(19~45 eV)
锥孔电压：	30V

数据管理

色谱软件：	MassLynx v4.2
质谱软件：	MassLynx v4.2
信息学软件：	Progenesis Q1, Skyline

结果与讨论

生物体液本身是复杂的混合物，其中包含的分析物具有非常宽的极性范围，从高级性的小分子酸和碱、氨基酸到亲脂性更强的肽和脂质均有涉及。这些分析物的浓度也覆盖了较宽的动态范围，包括痕量的激素类固醇和类花生酸以及浓度为mMol级的马尿酸和牛磺酸。为准确检测、鉴定和定量药物相关代谢物，色谱系统必须具有出色的分离能力；使不同药物代谢物、药物代谢物与样品中的内源性组分实现分离。

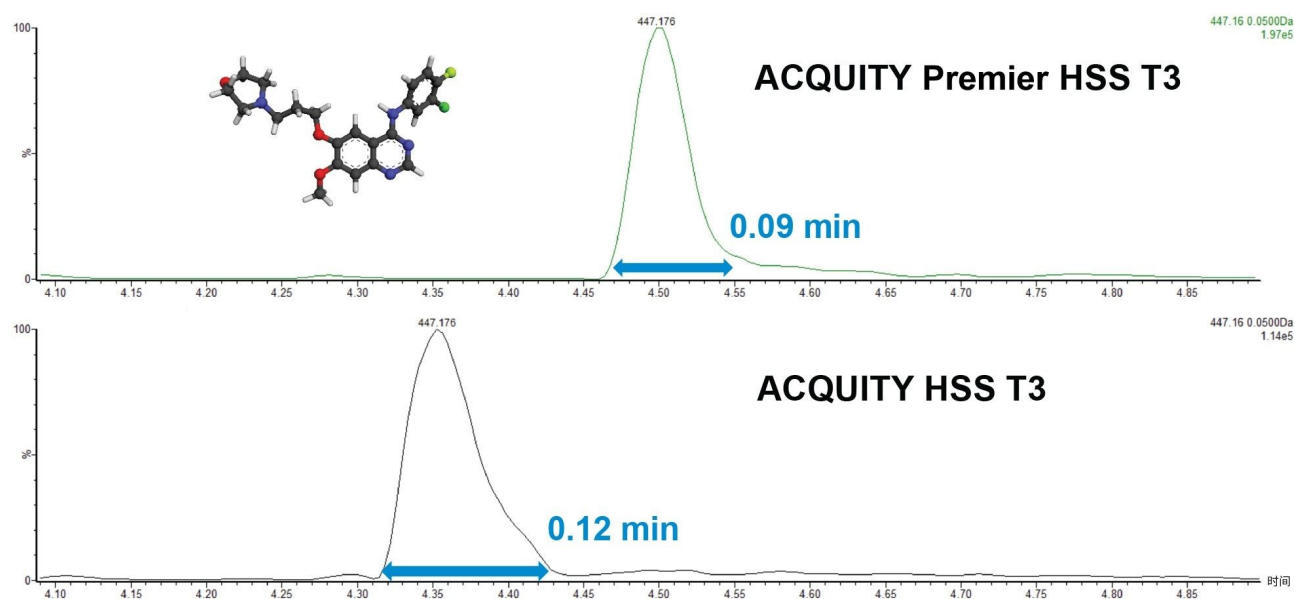


图2.ACQUITY Premier HSS T3和ACQUITY HSS T3色谱柱分析吉非替尼的比较色谱图。证明采用ACQUITY Premier HSS T3获得了更优异的基线峰宽(Wb)。

图2所示数据比较了ACQUITY Premier HSS T3 C₁₈色谱柱与标准ACQUITY色谱柱分析给药化合物吉非替尼的色谱性能。测得常规ACQUITY HSS T3 C₁₈色谱柱和ACQUITY Premier HSS T3 C₁₈色谱柱的基线峰宽分别为0.12 min (n=3)和0.09 min (n=3)。ACQUITY Premier和常规ACQUITY色谱柱的色谱峰容量分别为111和83。

ACQUITY Premier色谱柱能够发挥更高的色谱性能，使峰强度提高了72%，从1.14e⁵（常规色谱柱）提高至1.97e⁵（ACQUITY Premier色谱柱）。代谢物M523595也观察到这种改善，如图3所示，其峰强度提高了一倍：从30e³（常规色谱柱）提高至60e³（ACQUITY Premier色谱柱）。峰响应提高可能是由于ACQUITY Premier色谱柱获得的峰形更窄，或者分析物在色谱系统裸露金属表面的吸附减少。代谢物响应增加对于检测低浓度代谢物至关重要，在低剂量组中尤其如此。

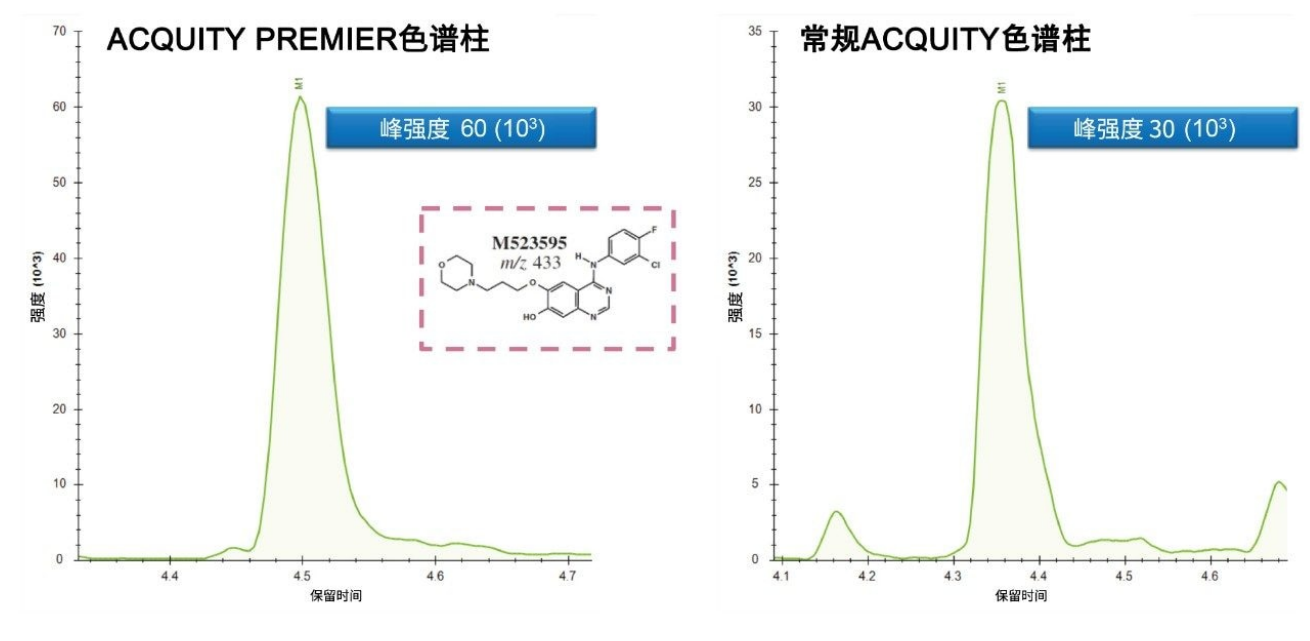


图3.ACQUITY Premier HSS T3和ACQUITY HSS T3色谱柱分析M1吉非替尼代谢物(M523595)获得的峰强度比较

了解代谢物的暴露程度与测定其结构同样重要。因此，无论使用确证标准品、放射性同位素标记的内标还是通过比较代谢物响应与母体化合物响应（尤其是在浓度最低的药代动力学曲线末端），可靠地测定药物代谢物的浓度都很重要。峰响应增加和峰形改善不仅提高了峰强度，还获得了更出色的重现性，如图4的结果所示。数据显示了相对于吉非替尼峰响应归一化后的代谢物峰响应。从这些结果中可以看出，ACQUITY Premier色谱柱为各种代谢物提供了更高的峰响应，同时降低了低浓度代谢物重复进样分析间的峰响应偏差。如低浓度代谢物M2 (M605211)的结果所示，采用常规ACQUITY色谱柱和ACQUITY Premier色谱柱获得的峰响应范围分别为12~14 e³和17~19 e³。

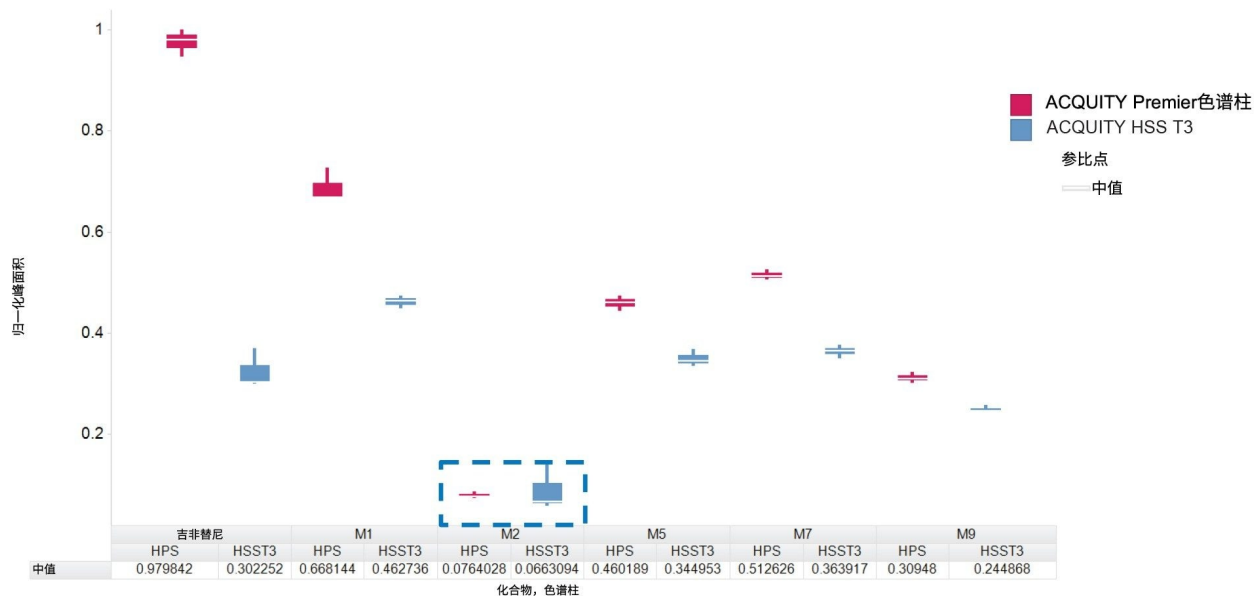
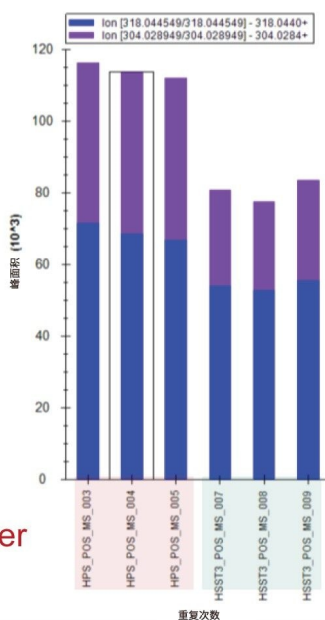
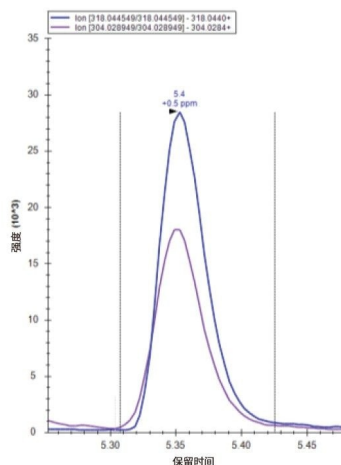


图4.重复测定($n=3$)吉非替尼及相关代谢物得到的峰面积响应。所示数据分别对应ACQUITY Premier HSS T3 (红色) 和ACQUITY HSS T3 (蓝色) 色谱柱。

采集高质量MS和MS/MS谱图对于快速、可靠的代谢物鉴定和结构解析尤为重要。代谢物检测和鉴定的基础是使分析物与样品中的其他药物相关组分以及干扰/共流出内源性组分实现色谱分离。ACQUITY Premier系统提供了更高的色谱性能、更窄的峰形和更小的峰拖尾，能够实现更高的峰强度和分离度，从而简化代谢物表征。如图5中代谢物M7 (吉非替尼的羟基化代谢物) 的分析数据所示，使用ACQUITY Premier系统得到的峰强度显著提高。

ACQUITY Premier



Premier

HSS T3

ACQUITY HSS T3

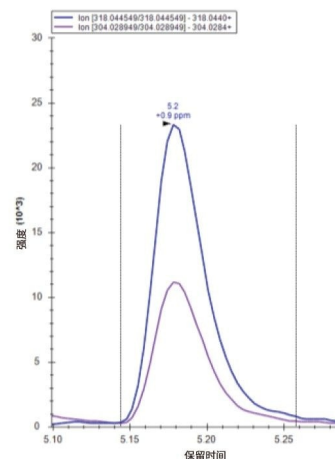


图5.吉非替尼代谢物M7 (MQZP, m/z 378.1021)获得了更高的碎片离子强度，这一结果表明，采用ACQUITY Premier HSS T3色谱柱时，与离子通道 m/z 318.0440和304.0284相关的离子强度有所提高。

结论

采用有机杂化聚合物表面技术的ACQUITY Premier系统可大幅减少/减弱许多分析物分子（例如磷酸盐、不带电荷的胺、羟基和去质子化羧酸）与色谱系统金属表面上过渡金属离子的结合作用。因此，在吉非替尼及其代谢物等分析物的分析中，与标准HSS T3不锈钢色谱柱相比，采用ACQUITY Premier色谱柱得到了更优异的峰形、更高的灵敏度和更出色的重现性，且峰强度平均提高了50%。这对于分析系统浓度低的药物代谢物尤其重要，例如当候选药物以低剂量给药或在药代动力学曲线的消除阶段结束时。这种检测低水平代谢物的能力对于支持早期FTHM临床研究、微量给药和微量采样至关重要，有助于支持3R计划以减少、替代和完善动物在此类研究中的使用。

参考资料

1. <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/ion-mobility-for-metabolite-characterization-improving-spectral-clarity-of-data-independent-acquisitions.html>
2. Wakamatsu, A.; Morimoto, K.; Shimizu, M.; Kudoh, S. “A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction with Stainless Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry” , *J. Sep. Sci.* 28, 2005, 1823-1830.
3. McKillop D. *et al.* (2005) Metabolic Disposition of Gefitinib, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Rat, Dog and Man. *Xenobiotica* 4(4), 914–934.
4. Liu X. *et al.* (2015) Metabolomics Reveals the Formation of Aldehydes and Iminium in Gefitinib Metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 97(1), 111–121.
5. Zhang Q. *et al.* (2017) Effect of Weekly or Daily Dosing Regimen of Gefitinib in Mouse Models of Lung Cancer. *Oncotarget*. 8(42), 72447–72456.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

720007048ZH, 2020年11月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2 [京公网安备 31011502007476号](#)