

使用Waters™ SELECT SERIES™ Cyclic™离子淌度质谱仪和waters_connect™应用管理软件进行药物代谢物鉴定

Adam King, Billy J. Molloy, Russell J. Mortishire-Smith, Robert S. Plumb

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

本文介绍了使用基于离子淌度技术的高分辨率质谱法和强大的信息学工具来表征Fasiglifam的体内代谢转归，该药物因可能导致肝损伤而中断临床试验。在整个时程内共检测到15种药物相关代谢物，平均 m/z 误差为-0.77 ppm。在大多数情况下，母离子、子离子和碰撞截面数据能够定位生物转化位点。

优势

- 稳定的通用数据采集策略，能够实现快速分析
- 简单且可定制的工作流程，可量身定制以满足用户需求
- 通过工具加快可靠的代谢物鉴定

简介

代谢物鉴定及后续分析在药物发现和开发过程中至关重要。它为在研发早期选择先导候选药物的药代动力学优化、支持安全性评估研究和确保临床试验的安全性提供了关键信息。面临着对于及时获得结果的迫切需求，以及对于结果充分可信度和准确度的严苛要求，药物代谢科学家需要充分权衡以给出解决方案。在药物发现中，需要分析的新型化合物实体的数量多，因此需要一种具有更高通量和相对通用的方法，以通过精简的流程分析多种化合物类别，而无需为研究的每种化合物定制方法。在发现阶段，对分子的代谢转归知之甚少，因此必须通过所研究的化合物的质谱特征以及相关化学型的可能代谢途径进行检测/鉴定。

相比之下，在药物开发中，全面的代谢物检测/鉴定比通量更重要，因此需要采用支持强大的数据挖掘和结构表征工具的专业系统。既往的体外研究或早期动物研究可能已经提供了有关于化合物代谢的知识。在这些情况下，我们通过将靶向已知代谢物和表征新型代谢物相结合，全面表征分子转归以完善监管数据包。

因此，需要一种用于药物代谢物检测、挖掘和鉴定的集成、自动化采集和处理系统。本文介绍了基于离子淌度技术的高分离度液相色谱(LC-MS)与智能、数据驱动的结构分配工作流程的组合。

将使用Waters SELECT SERIES Cyclic IMS的离子淌度MS与ACQUITY™ UPLC™提供的快速高分离度色谱联用，并结合通过waters_connect中的UNIFI™所提供的代谢物鉴定应用解决方案，为发现和开发代谢物鉴定提供了一款强大、灵活的平台。本研究证明了该解决方案在鉴定Fasiglifam (TAK875) (如图1所示) 的体内代谢物方面的优势，该药物是一种GPR40激动剂，因观察到肝酶升高而中断III期试验¹。

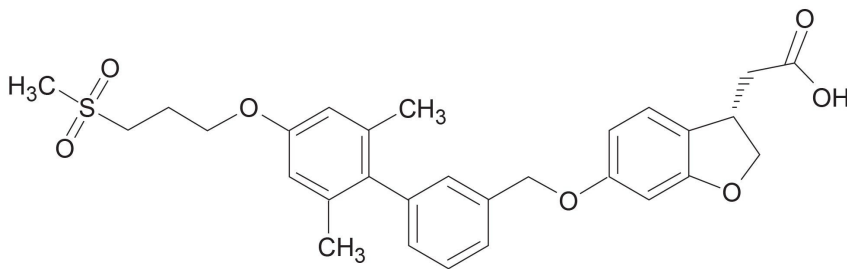


图1. Fasiglifam (TAK875) 的结构。

实验

样品描述

使用0.5%羧甲基纤维素水溶液制成的Fasiglifam混悬液，对雄性Sprague-Dawley大鼠经口给药50 mg/kg Fasiglifam。在临给药前从尾静脉采集血液，并在给药后的96小时内定期采血。将从血液样品中获得的血浆与乙腈以3:1（乙腈:样品）的比例混合，进行蛋白质沉淀处理。涡旋混合后，将样品在13,000 RCF下离心10 min，然后转移到自动进样器样品瓶中进行分析。将Fasiglifam的确证标准品溶于甲醇中，用50:50乙腈:水稀释，使最终药物浓度为100 ng/mL。利用该样品获得母体化合物的代表性保留时间、质谱(MS)、串联质谱(MS/MS)、碰撞截面(CCS)和中性丢失结果。

方法条件

使用反相液相色谱与负离子电喷雾离子淌度质谱检测联用系统，对确证标准品和大鼠血浆提取样品进行分析。简而言之，将样品的1 µL等分试样上样到2.1 × 100 mm ACQUITY™ HSS T3 1.8 µm C₁₈色谱柱上，该色谱柱保持在40 °C下，并使用在10 min内从40%增加到70%的0.1%甲酸水溶液:乙腈的线性溶剂梯度进行洗脱，流速为500 µL/min。在负离子模式下，使用20~40 eV的碰撞能量梯度和单圈离子淌度池采集50~1200 *m/z*范围内的质谱数据。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class
检测条件：	ESI- MS
样品瓶：	最大回收样品瓶
色谱柱：	ACQUITY HSS T3 2.1 × 100, 1.8 µm
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C

进样体积：1 μL

流速：500 $\mu\text{L}/\text{min}$

流动相A：0.1%甲酸水溶液

流动相B：含0.1%甲酸的乙腈

梯度：色谱梯度条件如下表所示

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.5	60	40	6
0.5	0.5	60	40	6
10	0.5	30	70	6
10.1	0.5	5	95	6
12	0.5	5	95	6
12.1	0.5	60	40	6

质谱条件

质谱系统：Waters SELECT SERIES Cyclic IMS

电离模式：电喷雾负离子模式

采集范围：60–1200 m/z , HDMS^E

毛细管电压：2 kV

碰撞能量：转移室梯度：20~40 eV

锥孔电压：30 V

数据管理

色谱软件：MassLynx™ 4.2

质谱软件：MassLynx 4.2

信息学软件：搭载UNIFI 1.9.13的waters_connect
2.0.0.9

结果与讨论

代谢物鉴定工作流程

药物代谢物鉴定的过程涉及数据采集方法的开发、数据采集、原始数据组分化、组分审查和最终报告。特别是对于药物发现应用，优先选择通用策略以便提高通量，为此，采用HDMS^F模式进行数据采集是理想选择，因为它以一种简单的方法提供了母离子、子离子和CCS结果。为简化数据采集和分析过程，我们开发出一种简单的工作流程，该工作流程将Waters SELECT SERIES Cyclic离子淌度质谱仪的分析物表征能力与waters_connect代谢物鉴定应用解决方案的数据分析能力相结合。工作流程如图2所示，分为4个简单的步骤：1)创建分析方法，2)为母体化合物和已知代谢物创建数据库条目，以及利用化学智能工具靶向查找未知代谢物，3)数据筛选和审查，4)数据可视化和报告。

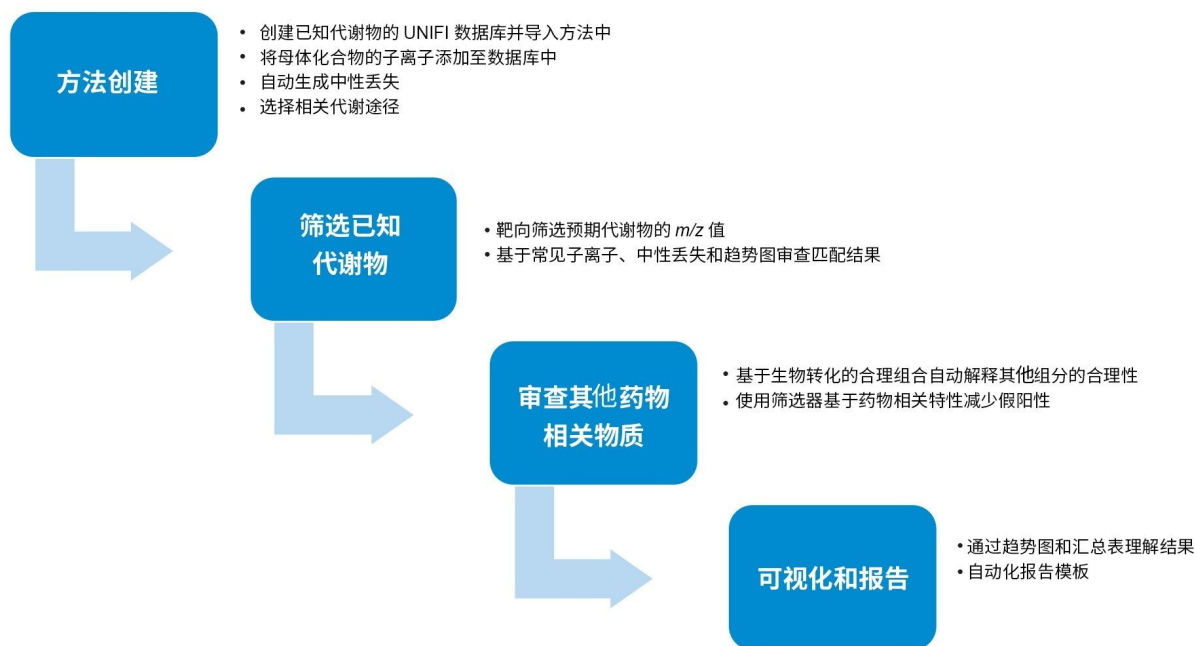


图2.waters_connect代谢物鉴定工作流程。

已知代谢物数据库和可能代谢物的产生

药物代谢研究贯穿了药物发现和开发过程的各个阶段，从对化合物的代谢转归知之甚少的初始阶段开始，到当化合物在体外和体内均得到广泛表征时较晚的临床开发阶段。waters_connect代谢物鉴定应用程序可通过构建数据库条目来靶向已知代谢物（图3）。本文将已知代谢物以及母体药物的结构添加至数据库中，然后利用该数据库解析LC-MS数据。如果可用，可以将先前确定的保留时间、子离子和CCS值添加至数据库中并纳入筛选方法中。例如，在实验中观察到的Fasiglifam的子离子已添加至该方法中，且相应的中性丢失也已添加至该方法中。除这些已知的药物代谢物以外，还可以结合使用母体化合物的结构以及常见的代谢功能化反应（包括1相和2相）来检查新型代谢物的数据（图4）。用户可通过“Generate Transformations”（生成转化）复选框确定哪些目标代谢物可以进一步功能化。一旦创建了适当的目标列表，即可处理采集到的LC-IM-MS原始数据以检测和鉴定药物相关物质。

Manage Components							
Create Import Paste Results Delete Edit Fragments... Edit Adducts... Add To Common Fragments Add To Neutral Losses							
	Component name	Expected n...	Expected fragment (m/z)	Adducts	Generate transformations	Formula	Expected RT (min)
1	tak875	524.1869	479.1898, 359.1653, 148.0530, 403.1551, 192.0428, 439.1585, -H, 463.1585, 385.1445, 147.0452, 133.0295	-H	☒	C29H32O7S	
2	tak875 M-I-G	538.1509			☐	C25H30O11S	
3	tak875-G	700.2190			☐	C35H40O13S	
4	tak875-tau	631.1910			☐	C31H37NO9S2	
5	tak875 M-I	362.1188			☐	C19H22O5S	
6	tak875 M-II	194.0579			☐	C10H10O4	
7	T-1676427	540.1818			☐	C29H32O8S	

图3.用于数据靶向分析的已知代谢物数据库。

Selected transformations					
	Name	Delta Mass (Da)	Formula	Classifier	Is combined
1	Desaturation	-2.0157	-H2	Phase I	☐
2	Oxidation + desaturation	13.9793	+O-H2	Phase I	☐
3	Hydration	18.0106	+H2O	Phase I	☐
4	2 x Oxidation + Desaturation	29.9742	-H2+O2	Phase I	☐
5	2 x Oxidation	31.9898	+O2	Phase I	☒
6	Dihydrodiol formation	34.0055	+H2O2	Phase I	☐
7	Sulfation	79.9568	+SO3	Phase II	☐
8	Carnitine conjugation	144.1025	+C7H14O2N	Phase II	☐
9	Glycine conjugation	57.0215	+C2H3NO	Phase II	☐

Maximum number of transformations:

Phase I:

Phase II:

☐ Filter transformation list based on functional groups that are present

☒ Run the cleavage tool

☒ Allow heterocyclic ring cleavages

Minimum mass cutoff: Da

图4.使用化学智能工具生成可能的药物代谢物。

药物相关物质的鉴定

代谢物表征的巨大挑战之一是在复杂的内源性基质干扰物质存在下鉴定药物相关物质。使用自定义筛选器是一种可帮助用户尽可能避免时间浪费的强大方法，将其应用于工作流程步骤时，筛选器可以只选择那些很可能具有重要意义的化合物。这些化合物可能是普遍的（响应值大于指定水平，在不包括进样前沿和高浓度有机溶液冲洗期的保留时间内），也可能针对特定的化合物（具有合理的解释，包含卤素，与母体化合物具有相同的子离子或中

性丢失，或在允许的质量数亏损区域内）（图5）。

Enter the filter criteria

Match all of these expressions

- Identification status is Identified
- Observed RT (min) is between 2.0 : 8 min
- Response is greater than 400
- Within Mass Defect Region is Yes

Match any of these expressions

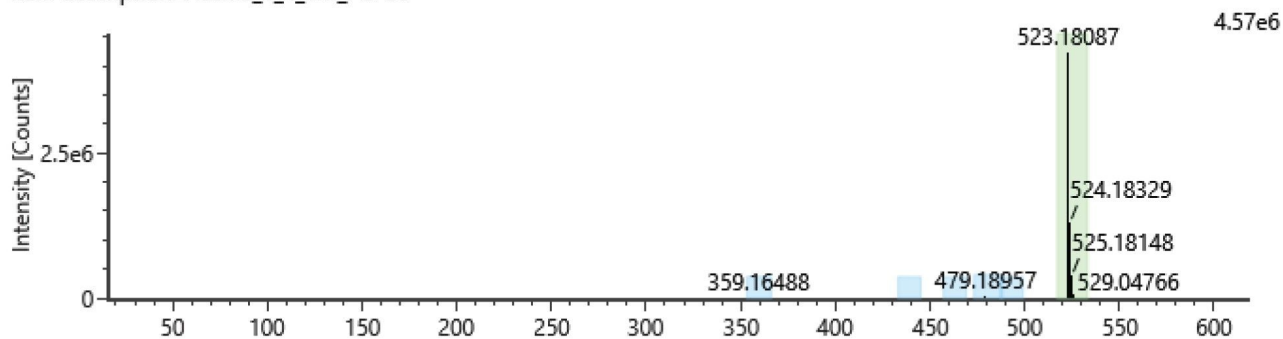
- Expected Fragments Found is greater than or equal 1
- Has Common Fragment Ions is Yes
- Has Common Neutral Losses is Yes
- Total Fragments Found is greater than or equal 1

图5. 药物相关特性筛选器。

实例

为说明Waters SELECT SERIES Cyclic离子淌度质谱仪结合waters_connect代谢物鉴定应用程序的强大功能，利用该平台对Sprague-Dawley大鼠经口给药50 mg/kg Fasiglifam后的血浆进行分析。利用反相UPLC-MS分析蛋白质沉淀血浆，在负离子ESI模式下进行检测。母体化合物的质谱图如图6所示。在上方迹线中（图6(i)），可以看到Fasiglifam的去质子化母离子 $m/z = 523.1809$ ；在下方迹线中，可以看到诊断MS/MS碎片离子 $m/z = 479.1899$ 、403.1549、359.1650、319.1340、192.0427和148.0527（图6(ii)）。子离子旁边的蓝色图标表明软件已根据结构的系统断裂为该子离子分配了合理的结构解释。

Item name: TAK875_RP_plasma_Neg_Oct21_0012 Channel name: Low energy : Time 6.9044 +/- 0.0159 minutes : Drift Ti...
Item description: Plasma_1_4_1hr_PO-50



Item name: TAK875_RP_plasma_Neg_Oct21_0012 Channel name: High energy : Time 6.9044 +/- 0.0159 minutes : Drift...
Item description: Plasma_1_4_1hr_PO-50

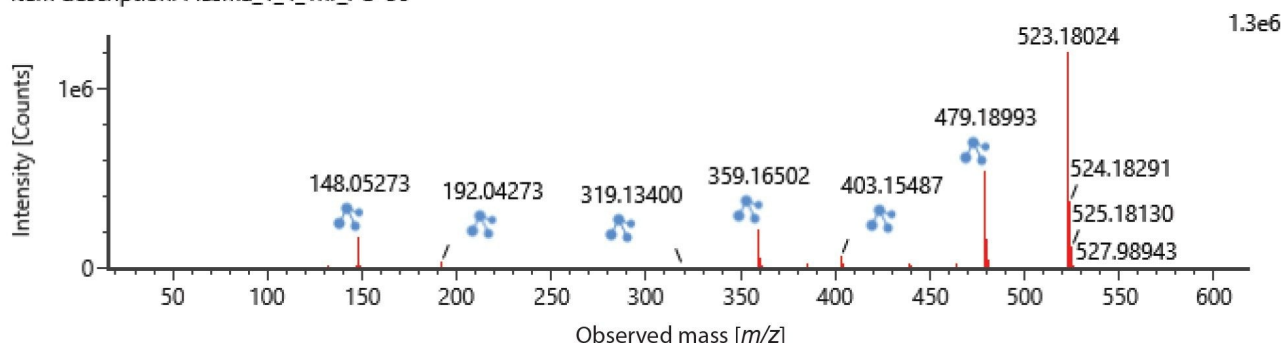


图6.Fasiglifam的母离子（上方迹线）和子离子（下方迹线）谱图。

使用数据库条目、诊断碎片离子、常见中性丢失以及确定的代谢裂解、功能化和缀合反应进行组合靶向筛选，鉴定出Fasiglifam的主要代谢物以及之前报道的代谢物。例如，Fasiglifam的葡萄糖苷酸代谢物在保留时间 $t_R = 6.26$ min处洗脱，去质子化分子离子 $m/z = 699.2113$ ，如图 7 所示，诊断碎片离子 $m/z = 523.1786$ ，对应于葡萄糖苷酸部分的中性丢失，以及作为子离子的葡萄糖苷酸本身。对这些样品进行完整分析，检测到之前报道的代谢物^{2,3}以及几种未曾报道的新代谢物，其中生物转化似乎会与二氢苯并咪喃部分进行取代相关。这些新代谢物的结构目前正在进一步研究中。

Item name: TAK875_RP_plasma_Neg_Oct21_0067
Item description: Plasma_1_13_12hr_PO-50

Channel name: High energy : Time 6.2609 +/- 0.0160 minutes : Drift Times: 12.57 +/- 0.36 ms

5.58e3

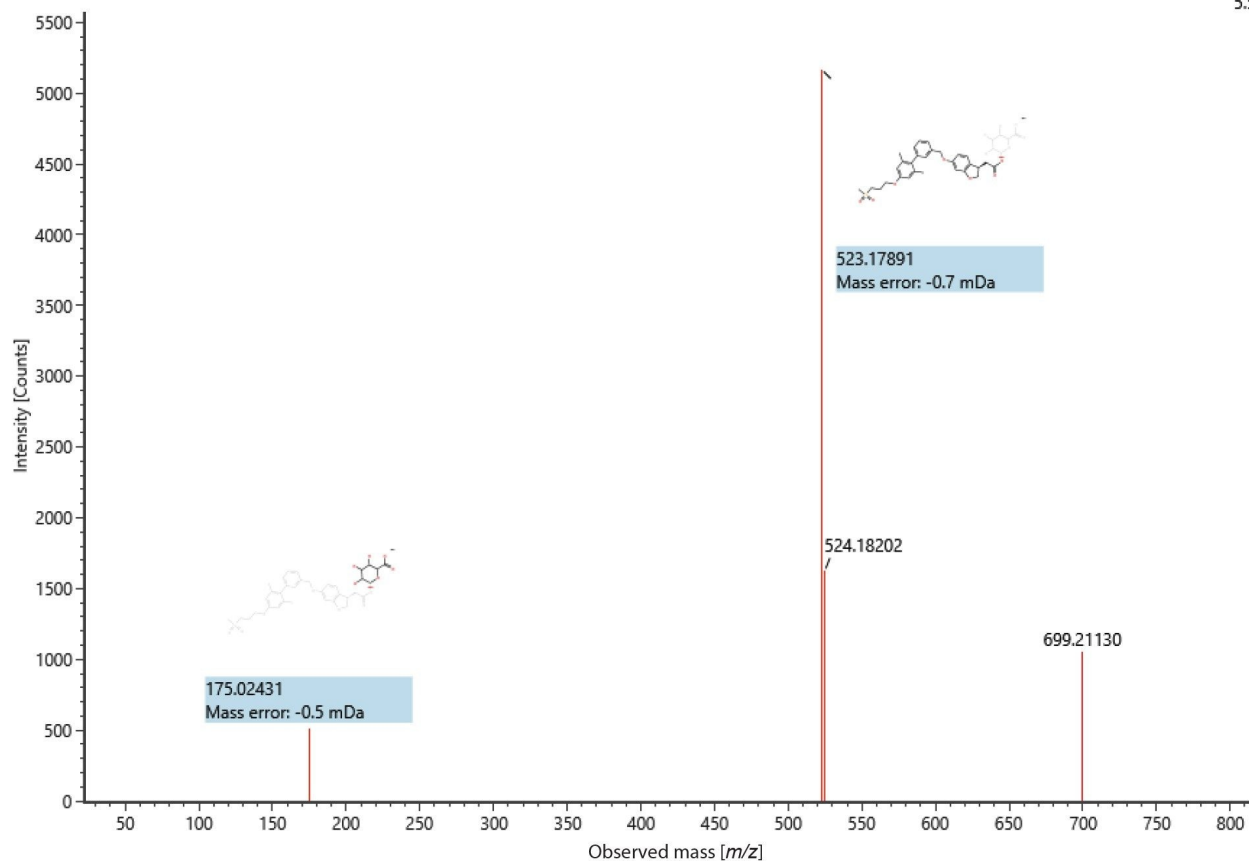


图7. Fasiglifam 葡糖苷酸主要代谢物的子离子谱图。

代谢位点的定位

药物代谢物鉴定中富有挑战性但至关重要的任务之一是定位分子的代谢位点。这可能是一项耗时的任务，并且需要由拥有结构分析和代谢转化经验的科学家来完成。waters_connect 代谢物鉴定应用程序为该过程提供支持，该程序使用系统键断裂和化学智能工具以提示药物代谢位点，并在某些情况下确认这些位点。例如，图8展示了该软件如何帮助药物代谢科学家定位之前未报道的 Fasiglifam 的 M-2H+O 代谢物的代谢位点。该软件基于与母体药物的子离子谱图相比的一致或改变的子离子数量，突出显示了潜在的代谢转化位点，绿色表示可能性高的代谢位点，橙色表示可能性低的代谢位点。

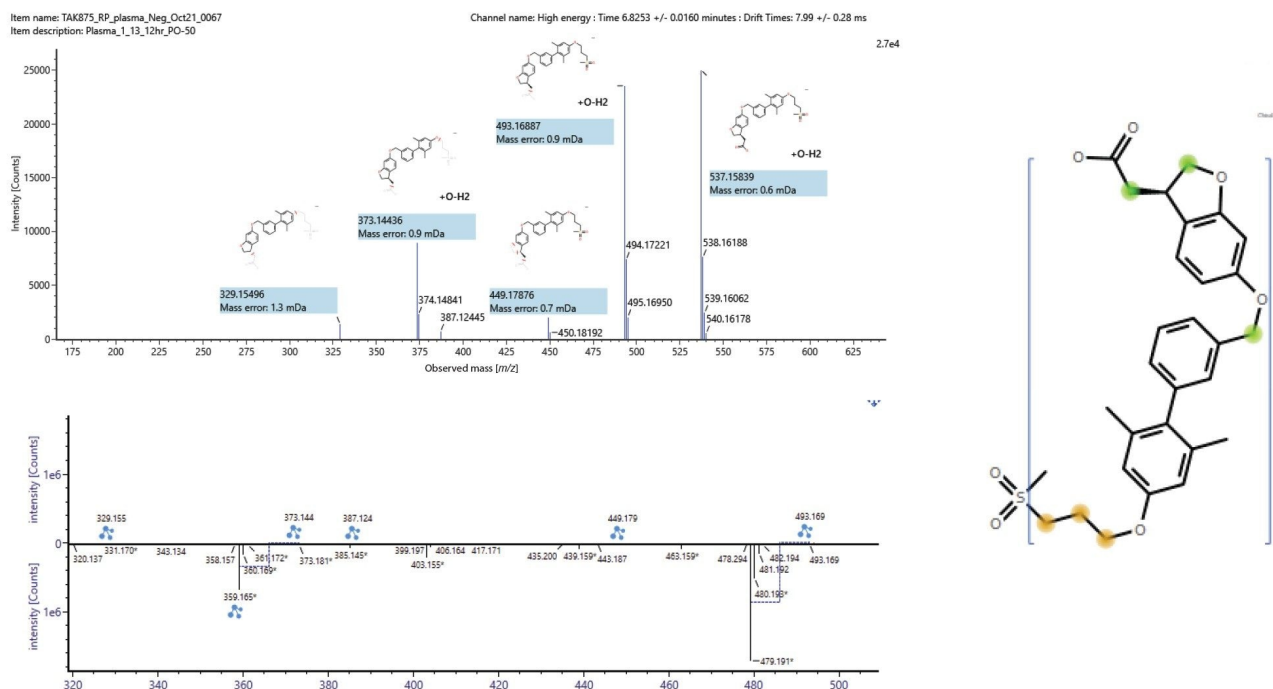


图8.代谢位点的定位。

汇总图和可视化

waters_connect代谢物鉴定应用程序有利于在分析完成后根据经过审查的数据生成图表和报告。其中最有用的就是汇总图，如图9所示，显示了Fasiglifam及其主要代谢物的浓度在给药后随时间的变化。如图所示，Fasiglifam和主要代谢物遵循相似的消除特征，在9 h时观察到最大浓度，并且代谢物浓度在接下来的96 h逐渐降低。但是，显而易见，即使在96 h后，母体药物和代谢物仍未从体循环中完全消除。

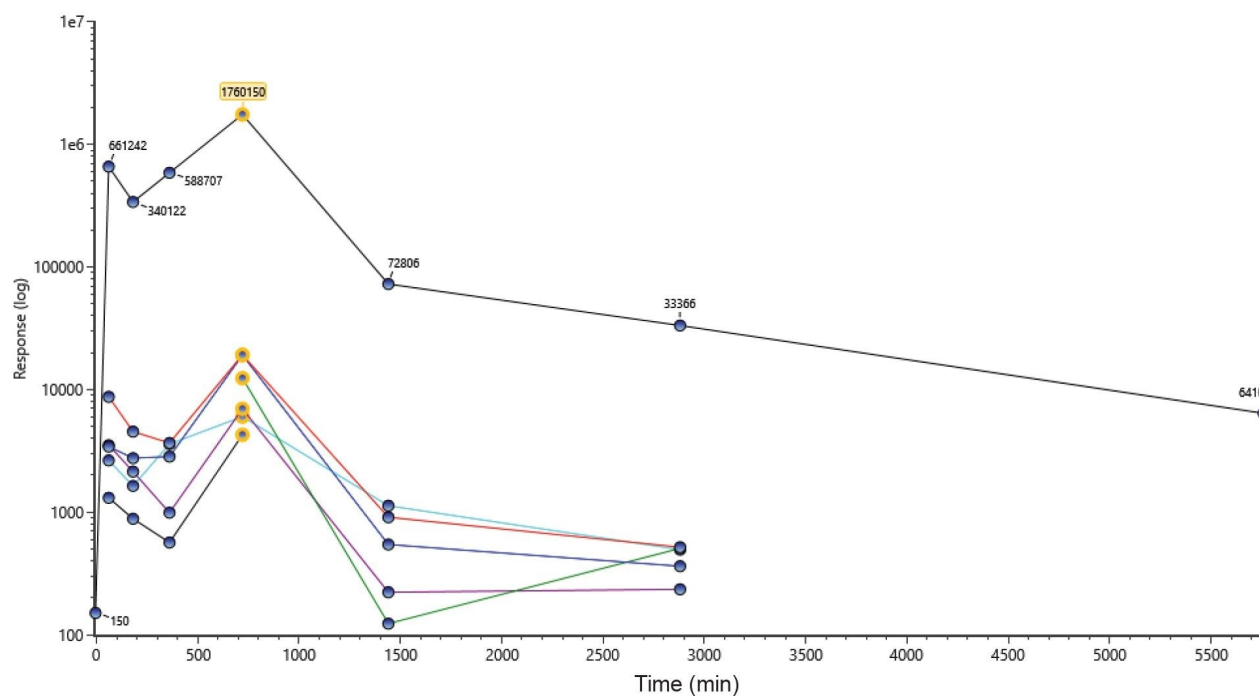


图9.药物和代谢物浓度随采样时间变化的汇总图。

图9.母体药物和观察到的各代谢物的log(响应)-给药后时间(h)曲线的汇总图。报告waters_connect具有强大且灵活的报告功能，可根据客户需求完全定制输出。例如，图10显示了给药后9 h在样品中观察到的代谢物汇总表，这些代谢物自动按照保留时间呈升序排列。

Item name: TAK875_RP_plasma_Neg_Oct21_0067, Sample position: , Replicate number: 1

Label	Component name	Formula	Observed m/z	Mass error (ppm)	Observed RT (min)	Observed CCS (Å²)	Has Common Neutral Losses	Has Common Fragment Ions	Total Fragments Found	Expected Fragments Found	Response
M1	tak875 M-I	C19H22O5S	361.1111	-1.2	6.03	199.70	Yes	No	1	0	1908
M2	tak875+O	C29H32O8S	539.1739	-1.1	6.22	219.80	Yes	Yes	6	1	6020
M3	tak875-G	C35H40O13S	699.2113	-0.5	6.26	246.26	No	No	1	0	2523
M4	tak875+O2	C29H32O9S	555.1687	-1.2	6.32	222.93	No	Yes	4	2	4281
M5	tak875+O-H2	C29H30O8S	537.1585	-0.7	6.34	220.17	Yes	No	3	0	1036
M6	tak875+O2	C29H32O9S	555.1688	-1.1	6.41	224.27	Yes	No	1	0	787
M7	tak875-tau	C31H37NO9S2	630.1836	-0.2	6.44	238.40	Yes	No	1	0	3834
M8	tak875+O	C29H32O8S	539.1743	-0.3	6.46	220.79	Yes	No	5	0	3812
M9	tak875+O2	C29H32O9S	555.1690	-0.7	6.53	221.09	No	No	12	0	19155
M10	tak875+O	C29H32O8S	539.1738	-1.2	6.54	220.25	No	No	7	0	1162
M11	tak875+O-H2	C29H30O8S	537.1586	-0.5	6.60	219.97	Yes	No	5	0	3173
M12	tak875+O-H2	C29H30O8S	537.1583	-1.1	6.83	218.96	Yes	No	5	0	12403
M13	tak875-CH2(cleavage)	C28H30O7S	509.1636	-0.8	6.83	214.82	Yes	No	4	0	2277
M14	tak875-H2	C29H30O7S	521.1636	-0.6	6.98	217.82	Yes	Yes	8	2	19205
M15	tak875-H2	C29H30O7S	521.1638	-0.3	7.06	218.05	Yes	Yes	7	1	6973

图10.自动生成报告对象，记录在9 h样品中发现的代谢物。

结论

将这种数据丰富、通用且稳定的数据采集方法与强大的分析工具相结合，可以将高度复杂的数据集简化为一组易处理的结果，从而使得药物代谢科学家可以在相对较短的时间内对其进行审查。可以将已知代谢物纳入分析方法中，并可利用使用强大的筛选器（基于组分的类药特性对其进行排序）促进系统搜索其他可能的代谢物。基于离子淌度技术的质谱无需创建复杂的数据依赖型采集方案即可生成清晰的子离子谱图，并进一步提供了针对特定化合物的CCS值，这些CCS值可用于区分同量异位代谢物 and 在不同色谱方法中追踪代谢物。

参考资料

1. Li X, Zhong K, Guo Z, Zhong D, Chen X. Fasiglifam (TAK-875) Inhibits Hepatobiliary Transporters: A Possible Factor Contributing to Fasiglifam-Induced Liver Injury.*Drug Metab Dispos* .2015;43(11):1751-9.
2. Otieno MA, Snoeys J, Lam W, Ghosh A, Player MR, Pocai A, Salter R, Simic D, Skaggs H, Singh B, Lim HK.Fasiglifam (TAK-875): Mechanistic Investigation and Retrospective Identification of Hazards for

Drug Induced Liver Injury. *Toxicol Sci.* 2018;163(2):374–384.

3. Kogame A, Lee R, Pan L, Sudo M, Nonaka M, Moriya Y, Higuchi T, Tagawa Y. Disposition and Metabolism of the G Protein-Coupled Receptor 40 Agonist TAK-875 (Fasiglifam) In Rats, Dogs, and Humans. *Xenobiotica*. 2019;49(4):433–445.

特色产品

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

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>>

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

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

UNIFI代谢物鉴定应用解决方案 <<https://www.waters.com/134682897>>

720007579ZH, 2022年4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