

Идентификация Метаболитов Декстрометорфана при помощи ACD/IntelliXtract

Маргарет Антлер¹, Марк Бэйлис¹ и Виталий Лашин²

¹Advanced Chemistry Development, Торонто, Канада

²Advanced Chemistry Development, Москва, Россия

www.acdlabs.com

телефон/факс в России: +7(499)503-1-035

e-mail: acdlabs@chemlabs.ru

Введение

Идентификация метаболитов лекарства является трудной задачей. Проблемой является присутствие анализируемых веществ зачастую в микроскопических количествах, а также потенциальная сложность образца. Технология LC/MS выбирается для изучения метаболизма за ее чувствительность и селективность, но интерпретации LC/MS данных может препятствовать присутствие шума и перекрытие компонентов.

Набор данных LC/MS содержит огромное количество информации и для полной интерпретации результатов может потребоваться серьезный профессиональный опыт. Основные трудностями являются обработка и интерпретация данных. Программное обеспечение может помочь на некоторых стадиях обработки данных, например, при выделении индивидуальных пиков массовых хроматограмм, или при маркировке пиков на основании разнообразных критериев. Обработка и просмотр данных вручную могут быть очень трудоемкими и времязатратными процедурами.

ACD/IntelliXtract – новое программное обеспечение для анализа LC/MS данных, которое выделяет все индивидуальные хроматографические компоненты из исходных данных с одновременным поиском молекулярных ионов для каждого из них. Данный пример выбран для демонстрации определения метаболитов декстрометорфана с помощью компьютерной программы. Данные были получены на приборе с UPLC и oa-ToF системой. Модуль ACD/IntelliXtract для ACD/MS Manager версии 9.0 был использован для нахождения всех компонентов в наборе LC/MS данных, установки для каждого из них молекулярного иона, и для идентификации возможных метаболитов исследуемого лекарственного препарата. Кроме того, ACD/MS Manager был использован для определения эмпирической формулы каждого метаболита.

Эксперимент

Исследование метаболизма было проведено для лекарственного препарата декстрометорфан (dextromethorphan). Препарат инкубировался на микросомах человека в следующих условиях:

Инкубация:

Human microsomes/S9

Перемешивание на водяной бане при 37°C

50 mM Tris буфер @ pH 7.4

NADPH-регенерирующая система (NRS) в 2%NaHCO₃ (Sigma S-5761) растворе содержащем:

0.5 mg/ml b-NADP (Sigma N-0505)

2.0 mg/ml Glucose-6-phosphate (Sigma G7879)

1.5 units/ml Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma G7877)

Равный объем MeCN

Концентрация препарата 100 µl 0.1 mg/ml (окончательный объем 2 ml)

Образцы анализировались с использованием хроматографа Waters Acquity SDS соединенного с Waters Micromass LCT Premier oa-Tof масс-спектрометром. Для разделения была использована колонка Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m particle size) со следующим градиентом:

Состав подвижной фазы:

Время (минуты)	A H ₂ O: 0.1% formic acid	B MeCN: 0.1% formic acid
0	95	5
15	5	95
18	5	95
18.1	95	5
21	95	5

Масс-спектры положительных ионов сняты в режиме ESI. В качестве калибровочного образца использовался лейцин энкефалин с массой ($[M+H]^+$ = 556.2771 amu). Дополнительные детали о настройках инструмента доступны из [стендового доклада компании Waters \[1\]](#).

Обработка данных и составление отчета (представление результатов) были выполнены с использованием ACD/IntelliXtract версии 9.0, и ACD/MS Manager версии 9.0.

Результаты

Хроматограмма по полному ионному току (TIC) для региона 0–6 минут показана на Рисунке 1. На кривой отчетливо видны несколько хроматографических пиков.

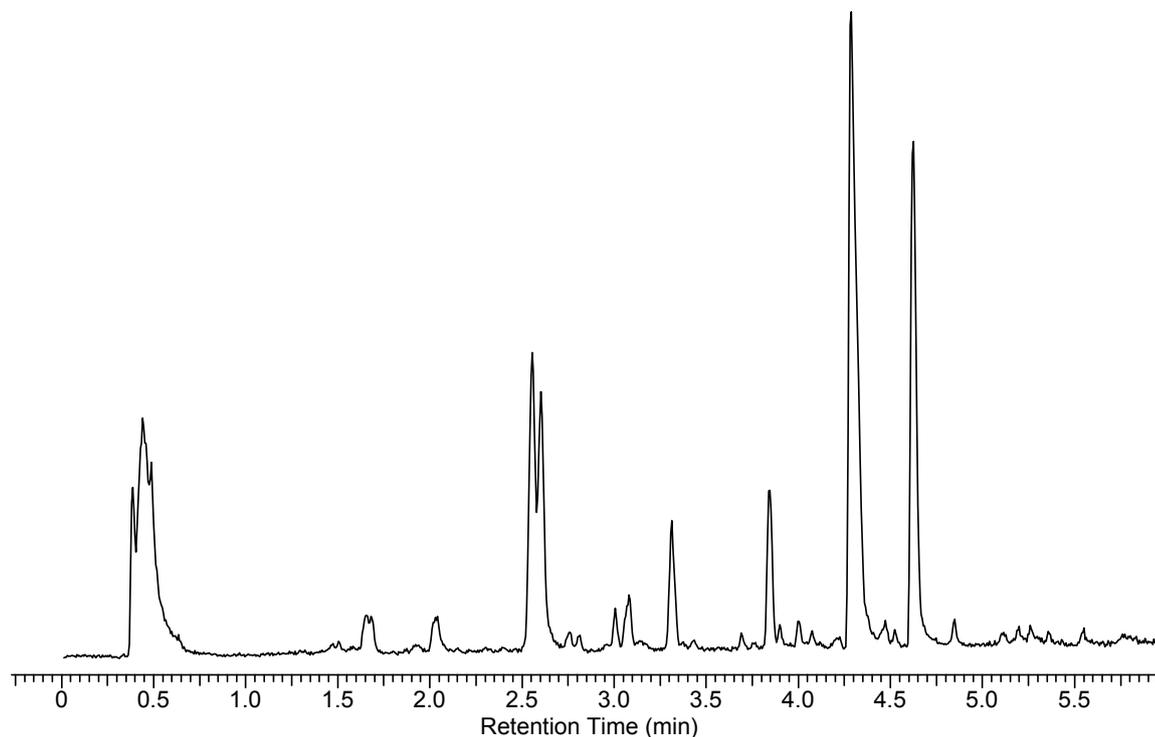


Рисунок 1: Хроматограмма полного ионного тока для эксперимента метаболизма декстрометорфана.

Программа ACD/IntelliXtract была использована для выделения хроматографических компонентов и идентификации их молекулярных ионов. Программа это делала в несколько шагов;

1. Выделение всех пиков массовых хроматограмм из исходных данных
2. Отделение реальных хроматографических пиков от сигналов шума
3. Формирование хроматографических компонентов из пиков массовых хроматограмм, точные времена удерживания
4. Выделение первичных ионных кластеров внутри каждого компонента
5. Поиск изотопных пиков, потерянных на шаге 2
6. Определение реперного иона (X) в каждом кластере компонента
7. Проверка корректности результатов
8. Определение молекулярного иона, мультимеров, аддуктов, и возможных фрагментов для каждого из компонентов
9. (Дополнительно) Осуществляется поиск и маркировка пиков по разнице масс от массы исходного вещества (поиск т.н. “нейтральных потерь”)

Общее время обработки данных заняло менее 5 минут. Некоторые технические детали, касающиеся алгоритма, описаны в [научном докладе](#) [2].

Note Вся информация, полученная на шагах 1–8 выводится в таблицу; вы можете сортировать ее по любому числу колонок для быстрого выделения и обзора важной информации.

Было выделено 63 хроматографических компонента с подтвержденными $[MH]^+$ ионами. Многие показаны на Рисунке 2 и указаны стрелками. Исходя из разниц масс между массой исходного препарата декстрометорфана и $[M+H]^+$ ионами компонентов был сгенерирован список потенциальных метаболитов...

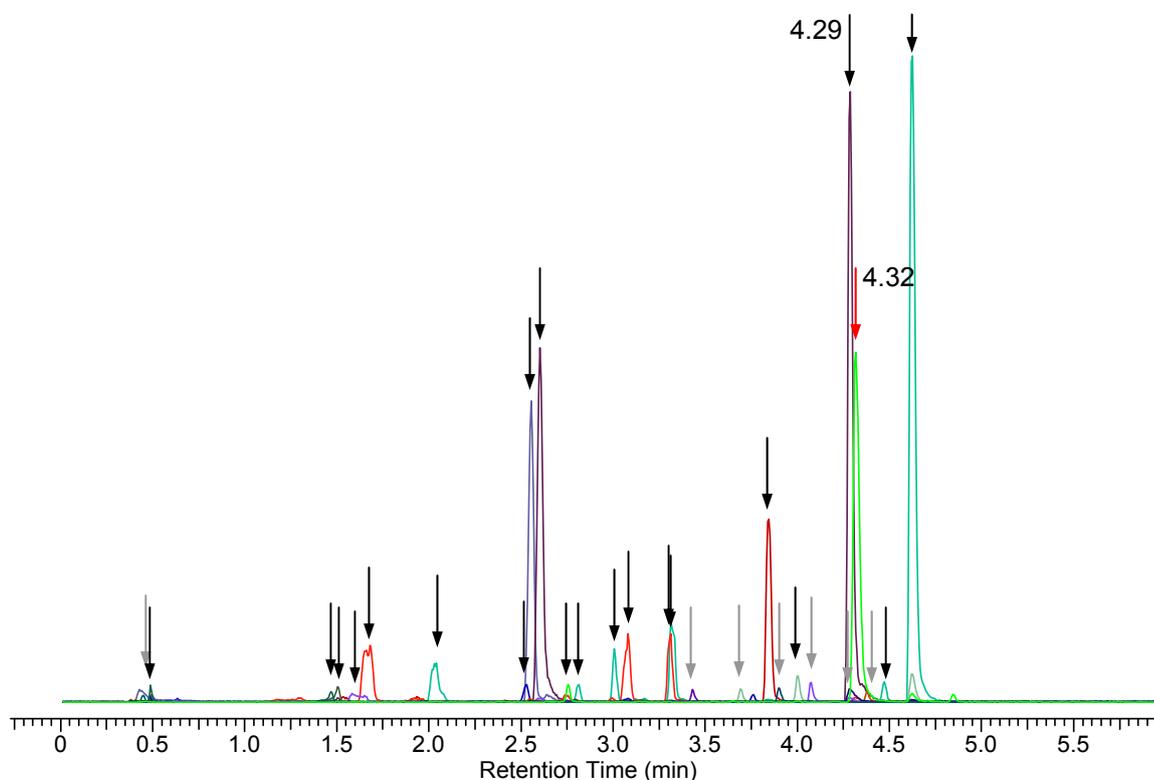


Рисунок 2: Массовые хроматограммы, выделенные при помощи IntelliXtract. Массовые хроматограммы для подтвержденных хроматографических компонентов указаны черными стрелками, и пик родительского препарата обозначен красной стрелкой. Серые стрелки указывают на оставшиеся компоненты, не являющиеся метаболитами изучаемого препарата (примеси и др.).

После того, как для каждого компонента был найден ион ^{12}C , с помощью программы ACD/MS Manager были сгенерированы эмпирические формулы для каждого возможного метаболита, исходя из масс молекулярных ионов, рассчитанных по масс-спектрам в вершине хроматографического пика (Peak Top Mass). Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1: Список Потенциальных Метаболитов и их Эмпирическая Формула

Масса (Peak Top Mass)	t_R (минуты)	Потенциальная Модификация Основного Препарата	Эмпирическая Формула
434.2200	0.45	glycosylation, desmethylation + glucuronidation	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_7$
420.2074	1.47	didesmethylation + glucuronidation	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_7$
434.2207	1.50	glycosylation, desmethylation + glucuronidation	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_7$
260.1595	1.59	hydroxylation + didesmethylation	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NO}_2$
274.1805	1.67	oxidation + desmethylation (+O-CH ₂)	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_2$
288.1968	2.03	hydroxylation/n-oxide	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_2$
244.1695	2.55	didesmethylation (-2C ₄ H)	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NO}$
258.1846	2.60	demethylation	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}$
288.1976	2.81	hydroxylation/n-oxide	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_2$
288.1961	3.01	hydroxylation/n-oxide	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_2$
274.1809	3.08	oxidation + desmethylation (+O-CH ₂)	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_2$
274.1806	3.31	oxidation + desmethylation (+O-CH ₂)	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_2$
288.1968	3.32	hydroxylation/n-oxide	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_2$
304.1911	3.85	di-hydroxylation	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_3$
270.1869	4.00	dehydrogenation	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}$
258.1860	4.29	demethylation	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}$
272.2011	4.32	Parent Drug	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}$
288.1985	4.47	hydroxylation/n-oxide	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_2$
288.1946	4.63	hydroxylation/n-oxide	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_2$

Обсуждение результатов

Выделение Компонентов и Определение Молекулярного Иона

При анализе образца методом LC/MS, слова 'пик' и 'компонент' часто используют взаимозаменяемо, что может вводить в заблуждение. Существует множество алгоритмов, для которых утверждается, что они выделяют компоненты, но на самом деле они выделяют только пики массовых хроматограмм (например, алгоритм CODA внутри ACD/MS Manager [3], MEND от Karger *et al.* [4]).

Для удобства данного обсуждения, мы предположим, что компонент представляет отдельное химическое вещество, элюируемое в условиях хроматографического разделения образца. Отдельный пик массовой хроматограммы может быть отнесен к компоненту, но его одного недостаточно для подтверждения присутствия реального компонента. Для подтверждения хроматографического компонента необходимо присутствие минимум 2-х пиков массовых хроматограмм с одним временем удерживания t_R ; молекулярный ион ^{12}C , и изотоп ^{13}C с m/z равному $[\text{Mn}]^+ + 1$ для однозарядных ионов. Кроме того могут присутствовать пики других массовых хроматограмм, входящих в данный компонент. Это ионы фрагментов, аддуктов, и мультимеров, а также изотопные пики..

Первым шагом при выявлении компонентов является выделение пиков массовых хроматограмм. ACD/IntelliXtract использует для этих целей модифицированный алгоритм CODA. После того, как шум отфильтрованⁱ, пики массовых хроматограмм группируются на основе точных времен удерживания t_R и IntelliXtract производит анализ ионных кластеров для соотнесения кластеров внутри компонента.

Кластерный анализ используется и для оценки качества данных (например, для оценки соотношения интенсивности пиков $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ⁱⁱ). Затем вся полученная информация соединяется воедино как для подтверждения присутствия компонента, так и для определения молекулярного иона. В случае отсутствия необходимой для принятия решения информации на каком-либо шаге, IntelliXtract возвращается к исходным данным заново. Это гарантирует получение высококачественных результатов при минимальном вовлечении пользователя в процесс обработки данных.

ⁱ Способность различать хроматографические пики от шума является ключевой частью IntelliXtract. Для ознакомления с технической информацией об этом шаге, см. Ссылку 2.

ⁱⁱ Тест на соотношение изотопов $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ является мощным инструментом для различения шума от реальных сигналов анализируемых веществ. Так как мы работаем на пределе обнаружения, пики анализируемых веществ могут выглядеть как шум. Однако, выход двух пиков шума внутри узкого региона, отличающихся по массе примерно на 1Da, включая неточности в расчете массы, является крайне маловероятным.

Используя табличные (природные) значения соотношения интенсивностей изотопов ^{12}C и ^{13}C , можно устранить сигналы шума при низких концентрациях образца.

Разделение и Интерпретация неразделенных (co-eluting) Компонентов

На Рисунке 2 видно, что многие из выявленных компонентов неразделены хроматографически. Например, исходное вещество имеет время выхода 4.32 минуты и перекрывается с другим компонентом, выходящим чуть раньше – при 4.29 минуты. Масс-спектры этих двух компонентов показаны на рисунке 3а и 3б, соответственно.

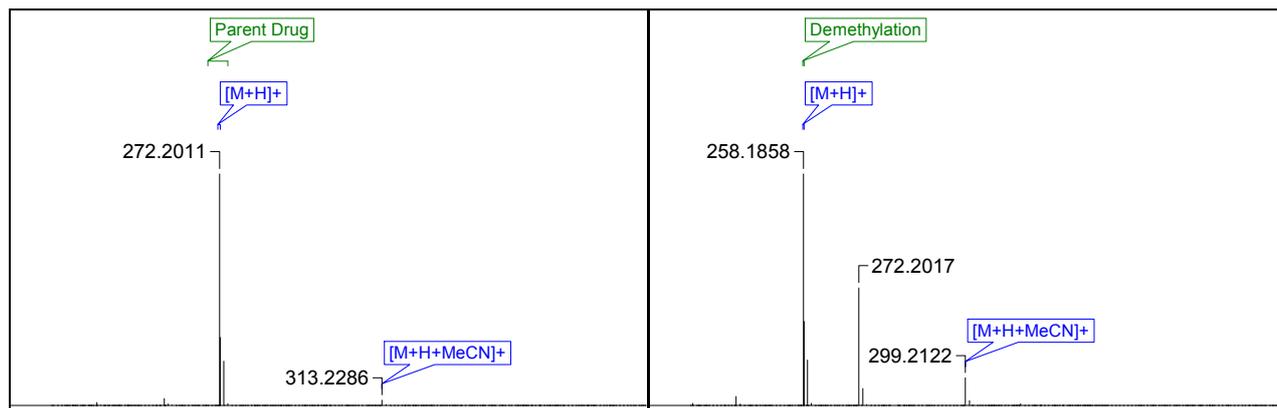


Рисунок 3а,б. Масс-спектры двух перекрывающихся хроматографических компонентов (а) основной препарат декстрометорфан, $t_R=4.32$, и (б) деметилованный метаболит, декстрофан, $t_R = 4.29$.

На Рисунке 3а показан масс-спектр исходного вещества. IntelliXtract автоматически поместил молекулярный ион ^{12}C с m/z 272.2011, а также ацетонитрильный аддукт иона ^{12}C с m/z 313.2286. На Рисунке 3б показан масс-спектр компонента, выходящего чуть раньше, но перекрывающегося с исходным веществом. Молекулярный ион определен как m/z 258.1858. Обратите внимание, что ион m/z 272 имеет заметную интенсивность в спектре, но, так как он отнесен к другому компоненту, он игнорируется при определении молекулярного иона данного компонентаⁱⁱⁱ.

Определение (Идентификация) Метаболитов

Дополнительно, перед началом анализа, в программу может быть введена молекулярная масса (или формула) исходного вещества. Она будет использоваться для идентификации потенциальных метаболитов на основании разницы масс $[M+H]^+$ исходного вещества и других найденных компонентов. Соответствующие метки видны на рисунках 3а и 3б.

В данном этом эксперименте были произведены измерения точных масс. Затем была сгенерирована эмпирическая формула для каждого возможного метаболита. На основании полученных данных в некоторых случаях можно определить структуру неизвестного вещества в смеси. Например, метаболит, выходящий при 4.29 минуты, может иметь структуру декстрометорфана, деметилованного по одному из двух возможных положений (см. Ниже). Метаболит, имеет фрагментный ион со значением m/z 241, что означает, что, вероятнее всего, деметилирование произошло у атома кислорода.

ⁱⁱⁱ После обработки данных, ACD/IntelliXtract показывает цветной масс спектр чистого компонента поверх экспериментального спектра для более удобного просмотра данных.



Декстрометорфан (основное вещество)

Декстрофан (деметилованный метаболит)

Надо отметить, что в данном примере были определены все метаболиты, которые возможны на основе предварительно заданных (известных) превращений. Более того, были найдены новые компоненты. В общем случае, новые метаболиты могут быть идентифицированы на основании списка подтвержденных молекулярных ионов ^{12}C .

Выводы

Программа ACD/IntelliXtract способна эффективно выделять полезную информацию из LC/MS данных. Очень важно, что полученная информация является очень сжатой:

- Количество пиков массовых хроматограмм: 802
- Количество идентифицированных ионов ^{12}C : 150
- Количество идентифицированных молекулярных ионов: 58
- Количество молекулярных ионов, прошедших через тест $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$: 49
- Количество компонентов, оставшихся после применения фильтра дефекта масс: 36
- Количество компонентов с соотношением сигнала к шуму (S/N) больше пяти: 21
- Количество компонентов идентифицированных как возможные метаболиты после ручной проверки: 19

Заключение

Программа ACD/IntelliXtract способна быстро выделять все хроматографические компоненты содержащиеся в LC/MS данных, и определять молекулярный ион для каждого компонента. Кроме того, программа эффективно определяет ионы аддуктов, мультимеров, а также фрагментные ионы. Хроматографически неразделенные компоненты могут быть разделены математически, даже в случае очень низких концентраций.

Метаболиты основного препарата могут быть найдены программой на основе разниц масс исходного вещества и продуктов превращения. После этого они будут промаркированы, что, в свою очередь, может помочь исследователю быстро идентифицировать интересующие его хроматографические компоненты.

Хотя IntelliXtract не требует данных высокого разрешения (HRMS), но если они имеются, то IntelliXtract способна их эффективно обработать и сгенерировать точные эмпирические формулы для каждого компонента смеси.

Ссылки

1. M. McCullagh, J. Castro-Perez, L. Calton, *Enhanced Determination of the Metabolic Fate of Drugs using UPLC/ao-TOF MS*. Waters Corporation, 2005. Доступно на <http://www.waters.com/WATERSDIVISION/SiteSearch/AppLibDetails.ASP?LIBNUM=720001419EN>
2. M. A. Bayliss, V. Lashin, *Why is Automating the Determination of Molecular Ions Using Automated Approaches so Hard and How Might it be Used?* Представлено на ASMS 2006. Доступно на http://www.acdlabs.com/download/publ/2006/asms06_automating.pdf
3. W. Windig, J. M. Phalp, A. W. Payne, *A Noise and Background Reduction Method for Component Detection in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry 1996, 68, 3602-3606.
4. V.P. Andreev, T. Rejtar, H.S. Chen, E.V. Moskovets, A. R. Ivanov, B. L. Karger, *A Universal Denoising and Peak Picking Algorithm for LC-MS Based on Matched Filtration in the Chromatographic Time Domain*, Analytical Chemistry 2003, 75, 6314–6326.