



(10) DE 10 2016 010 004 B3 2017.12.28

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2016 010 004.4

(22) Anmeldetag: 18.08.2016

(43) Offenlegungstag: –

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 28.12.2017

(51) Int Cl.: **G01N 27/62** (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 27/64 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Karlsruher Institut für Technologie, 76131
Karlsruhe, DE

(74) Vertreter:
Müller-Boré & Partner Patentanwälte PartG mbB,
80639 München, DE

(72) Erfinder:
Majewsky, Marius, 76327 Pfinztal, DE; Horn,
Harald, 34121 Kassel, DE

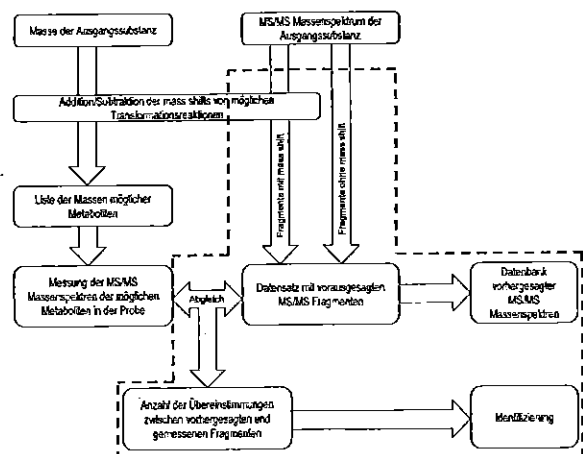
(56) Ermittelter Stand der Technik:

US	2015 / 0 160 231	A1
WO	2013/ 181 758	A1
JP	2006- 17 570	A

JP 2006 017 570 A: zugehöriger
Datenbankausdruck aus WPI / 2017 Clarivate
Analytics und EPODOC / EPO

(54) Bezeichnung: Identifizierung von unbekanntem Transformationsprodukten ohne Referenzstandards durch Vergleich von Massenspektren mit vorhergesagten Massenverschiebungen mittels MS/MS

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von unbekanntem Transformationsprodukten einer Ausgangssubstanz ohne Referenzstandards mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), welches in der organischen chemischen Analytik, insbesondere in der medizinischen und pharmazeutischen Analytik, in der Forensik sowie in der Doping-, Umwelt- und Lebensmittelanalytik angewendet werden kann.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von unbekanntem Transformationsprodukten einer Ausgangssubstanz (auch Metaboliten genannt) ohne Referenzstandards mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), insbesondere gekoppelter Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Das erfindungsgemäße Verfahren kann in der organischen chemischen Analytik angewendet werden und findet insbesondere in der medizinischen und pharmazeutischen Analytik, in der Forensik sowie in der Doping-, Umwelt- und Lebensmittelanalytik Anwendung.

[0002] Die qualitative Messung und Identifizierung von chemischen Verbindungen mit Tandem-Massenspektrometrie-Systemen (MS/MS) basiert auf Massenspektren. Zum Erhalt dieser charakteristischen Massenspektren muss die gesuchte Zielsubstanz als Reinsubstanz vorliegen. Im Tandem-Massenspektrometer wird das MS/MS Massenspektrum nach Fragmentierung aufgenommen, welches spezifisch für eine Verbindung ist. Dabei wird im ersten MS nur das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) der Zielsubstanz (Precursor) im positiven oder negativen Ionisationsmodus der Elektrosprayionisierung gefiltert und anschließend mit einer gegebenen Kollisionsenergie fragmentiert. Im zweiten MS werden die m/z der entstehenden und für diese Verbindung charakteristischen Produktionen, welche auch als Fragmente bezeichnet werden, gemessen. Dieses Fragmentenspektrum bzw. Produktionenspektrum dient als Referenzspektrum.

[0003] In einer Probe unbekannter Zusammensetzung und mit unbekanntem Inhaltsstoffen aus den oben genannten Anwendungsbereichen wird das m/z der Zielverbindung im ersten MS und das Massenspektrum im zweiten MS gemessen. Zeigt dieses Massenspektrum Übereinstimmung mit dem zuvor gemessenen Referenzspektrum, gilt die Substanz als sicher identifiziert. Die Intensität der Fragmente ist dabei für die qualitative Bestimmung sekundär. Entscheidend sind die übereinstimmenden m/z der Fragmentationen im Spektrum.

[0004] In der Praxis mit Triple-Quadropole Systemen wird üblicherweise ein Kriterium von zwei Fragment-Übereinstimmungen bei gegebener Massengenauigkeit von etwa 0,7 Da zu Grunde gelegt. Das bedeutet, dass in der gängigen Praxis, der sogenannten Target-Analytik, eine Substanz als identifiziert gilt, wenn zwei zuvor festgelegte charakteristische Fragmente gefunden werden.

[0005] Massenspektrometer, die die akkurate Masse bzw. das akkurate m/z messen können (z. B. LC-QToF Geräte), bieten zusätzliche Sicherheit. Durch die hohe Genauigkeit der Messung des m/z , welche nach derzeitigem Stand der Technik 1 bis 2 ppm beträgt, lassen sich die Übereinstimmung des gemessenen Massenspektrums bzw. der gewählten Fragmente mit dem Referenzspektrum mit sehr hoher Sicherheit bestimmen. Aus den sogenannten exakten (auch: akkuraten) Massen lässt sich die Elementzusammensetzung der Verbindung stark eingrenzen, da durch den natürlichen Massendefekt der Elemente bei kleinen Molekülen (ca. im Bereich < 1000 Da) nur noch wenige Kombinationen an Elementen diese exakte Masse ergeben. Datenbanken mit MS/MS Referenzmassenspektren stehen auch zum Teil kostenlos zur Verfügung.

[0006] Allerdings können diese Referenzspektren nur für bekannte Substanzen aufgenommen werden, die als Reinsubstanz zu Verfügung stehen, beispielsweise käuflich erhältlich sind, selbst synthetisiert oder aus Mischungen mit hoher Reinheit isoliert wurden. Für bis dato unbekannte Substanzen stehen die MS/MS Referenzmassenspektren daher nicht zur Verfügung, was die eindeutige Identifizierung über Referenzspektren unbekannter Substanzen verhindert, bis diese als Reinstoff vorliegen und so das charakteristische MS/MS Massenspektrum aufgenommen werden kann.

[0007] In letzter Zeit gab es dennoch Bemühungen, unbekannte Metaboliten ohne Referenzstandards durch Vergleich von Massenspektren mit vorhergesagten Massenverschiebungen mittels LC-QTOF zu identifizieren. Wie beispielsweise in M. Majewsky et al., Anal. Bioanal. Chem., 407 (19), 5707–5714, beschrieben, sollen unbekannte Metaboliten von Sulfonamid-Antibiotika identifiziert werden, indem potentielle Transformationsprodukte von Sulfonamid-Antibiotika auf Basis gängiger Transformations- oder Spaltungsreaktionen vorhergesagt werden. Obwohl die Precursormassen sehr genau bestimmt werden können, besteht ein Nachteil dieser Methodik darin, dass auch eine exakte Masse eines Precursors keinen eindeutigen Rückschluss bzw. keine eindeutige Zuordnung zulässt, falls Referenzspektren nicht existieren, da immer noch eine Vielzahl von möglichen Substanzen, auch komplett fremde Elementzusammensetzungen, eine entsprechende Masse aufweisen können.

[0008] Auch JP 2006-017570 A beschreibt eine vergleichbare Methode, bei der die Struktur eines unbekanntem Metaboliten durch Vergleich von Massenspektren mit vorhergesagten Massenverschiebungen mittels Tandem-Massenspektrometrie bestimmt werden soll. In WO 2013/181758 A1 wird ebenfalls ein Verfahren zur

Identifizierung von kleinen Molekülverbindungen in Gemischen offenbart, bei welchem unter Verwendung einer Bibliothek von berechneten Strukturen und entsprechend berechneten Massenspektralfragmentierungsmuster bekannter und/oder hypothetischer Verbindungen die Massenspektren auf Übereinstimmung überprüft werden. US 2015/0160231 A1 offenbart eine Identifizierungsmethode von Metaboliten ausgehend von gemessenen MS/MS-Daten, die mit einer Datenbank abgeglichen werden.

[0009] Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, welches eine zuverlässige Identifizierung von unbekanntem Transformationsprodukten einer Ausgangssubstanz erlaubt, selbst wenn für diese Transformationsprodukte keine Referenzstandards existieren.

[0010] Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

[0011] Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von unbekanntem Transformationsprodukten einer Ausgangssubstanz mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bereit, wobei keine Referenzstandards für die unbekanntem Transformationsprodukte existieren, umfassend die folgenden Schritte:

- (i) das Bereitstellen eines tatsächlich gemessenen, akkuraten MS/MS Massenspektrums mit allen Produktionen der Ausgangssubstanz, um das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ausgangssubstanz m/z_A und die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} zu erhalten;
- (ii) das Vorhersagen von Masse-zu-Ladungsverhältnissen der Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes durch a) addieren oder subtrahieren der Massenverschiebungen möglicher Transformationsreaktionen zu bzw. von allen Masse-zu-Ladungsverhältnissen der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} und b) Berücksichtigung von Produktionen der Ausgangssubstanz ohne Massenveränderung, um einen Datensatz von vorhergesagten Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes zu erhalten;
- (iii) das experimentelle Erstellen eines akkuraten MS/MS Massenspektrums des unbekanntem Transformationsproduktes, um das Masse-zu-Ladungsverhältnis des unbekanntem Transformationsproduktes m/z_T und die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes m/z_{PT} zu erhalten; und
- (iv) das quantitative Vergleichen der vorhergesagten Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes sowie der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} mit den Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes m/z_{PT} auf Übereinstimmungen und Zählen derselbigen,

wobei 4 oder mehr Übereinstimmungen zwischen den vorhergesagten Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes einschließlich der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} und den Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes m/z_{PT} als Identifizierung gilt.

[0012] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, dass durch Vergleich vorhergesagter Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes sowie der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} mit den Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes m/z_{PT} eine systematische und zuverlässigere Identifizierung unbekannter Transformationsprodukte erzielt werden kann. Erfindungsgemäß kann somit eine Identifizierung unbekannter Metaboliten, von welchen keine Referenzstandards bzw. MS/MS Referenzmassenspektren vorliegen, mit hoher Sicherheit erfolgen. In der vorliegenden Erfindung werden als Referenzstandards experimentell gemessene MS/MS Massenspektren von bekannten Reinsubstanzen verstanden.

[0013] Es ist davon auszugehen, dass im Stand der Technik bislang kein systematischer Ansatz vorliegt, der die Produktionen im MS/MS zur Identifizierung unbekannter Transformationsprodukte bzw. Metaboliten durch quantitative Erfassung der Übereinstimmung von vorhergesagten und experimentellen MS/MS Spektren heranzieht. Insbesondere werden im Stand der Technik nur die Precursor zur Identifizierung unbekannter Metaboliten berücksichtigt. Der Grund hierfür ist möglicherweise, dass die theoretische Vorhersage der Produktionen per se kaum umsetzbar ist, da das Fragmentieren der chemischen Bindungen eines Moleküls sich als sehr komplex darstellt. Das wird möglicherweise auch als Hürde für die Vorhersage von Metaboliten angesehen. Die vorliegende Erfindung sagt auch nicht die Produktionen der Metabolit-Massenspektren per se voraus, sondern berechnet vorhergesagte Metabolit-Massenspektren auf Grundlage der experimentell bestimmten Massenspektren der Ausgangssubstanz, wodurch das charakteristische Fragmentierungsmuster der Ausgangssubstanz somit experimentell miteinbezogen wird. Dadurch bietet das erfindungsgemäße Verfahren deutlich mehr Sicherheit bei der Identifizierung von Metaboliten.

[0014] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird vor dem Schritt (iii) des experimentellen Erstellens eines akkuraten MS/MS Massenspektrums des unbekanntes Transformationsproduktes (Metaboliten) ein chromatographisches Trennverfahren durchgeführt, um das unbekanntes Transformationsprodukt aus einer zu untersuchenden Probe zu isolieren. Das chromatographische Trennverfahren ist nicht besonders beschränkt und kann in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probe ausgewählt sein. Beispielsweise kann das MS/MS des unbekanntes Transformationsproduktes mit einer Flüssigchromatographie, Gaschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, superkritische Flüssigkeitschromatographie oder auch mit multidimensionalen Chromatographiemethoden der genannten Methoden gekoppelt sein.

[0015] Vorzugsweise ist das chromatographische Trennverfahren aus der Gruppe, bestehend aus Flüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie, ausgewählt. Insbesondere kann die zu untersuchende Probe mittels gekoppelter Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht werden.

[0016] Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst den Schritt des Berechnens des Masse-zu-Ladungsverhältnisses möglicher Transformationsprodukte m/z_{TP} durch addieren oder subtrahieren von Massenverschiebungen möglicher Transformationsreaktionen zu bzw. von dem Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ausgangssubstanz m/z_A . Ausgehend vom Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ausgangssubstanz m/z_A können somit entsprechende Werte für m/z_{TP} erhalten werden (auch vermutete Metabolit m/z genannt), die mit dem gemessenen Masse-zu-Ladungsverhältnis des unbekanntes Metaboliten verglichen werden können. Dabei kann eine erste Einschränkung der möglichen Metaboliten erfolgen, wodurch die Effizienz des Identifizierungsverfahrens erhöht wird.

[0017] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Identifizierungsverfahren einen weiteren Schritt des Speicherns der vorhergesagten Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes und der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} in einer Datenbank. D. h. die vorhergesagten Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes (Fragmente) werden vorzugsweise unabhängig experimenteller Arbeiten in einer Datenbank gespeichert, die zum Abgleich mit gemessenen Daten herangezogen werden kann. Dementsprechend können vermutete Metaboliten vom Anwender gegen die Datenbank auf Übereinstimmung geprüft werden, was zusätzlich die Verlässlichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens erhöht.

[0018] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Molekülmasse der Ausgangssubstanz weniger als 1000 Da. Bei größeren Molekülen besteht die Möglichkeit, dass sich das Fragmentierungsverhalten des möglichen Metaboliten im Vergleich zur Ausgangssubstanz verändert, wodurch der Vergleich zu den Fragmenten der Ausgangssubstanz erschwert wird. Allerdings ist das erfindungsgemäße Identifizierungsverfahren nicht auf kleine Moleküle beschränkt und kann ebenso zur Identifizierung von Molekülen größer 1000 Da angewendet werden.

[0019] Wie vorstehend beschrieben, werden erfindungsgemäß theoretische Fragmente (auch: vorhergesagte Produktionen) für den positiven und negativen Elektrospray-Ionisationsmodus für vermutete Metaboliten generiert, welche in einem weiteren Schritt mit den gemessenen Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes m/z_{PT} auf die Anzahl der Übereinstimmungen überprüft werden.

[0020] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann dies beispielsweise wie folgt durchgeführt werden. In einem ersten Schritt wird von der Ausgangssubstanz, deren Metaboliten aufgeklärt werden sollen, ein akkurates MS/MS Massenspektrum aufgenommen. Alternativ kann dieses auch aus einer bestehenden Datenbank bezogen werden. Die akkurate Masse und das m/z des Precursors (Vorläuferion) der Ausgangssubstanz sind durch die Elementzusammensetzung bekannt. Vorzugsweise wird ein akkurates MS/MS Massenspektrum der Ausgangssubstanz experimentell bestimmt, wodurch mögliche, den jeweiligen MS-Geräten anhaftende Merkmale ausgeschlossen werden können, die im Vergleichsschritt (iv) zu potentiellen Erschwernissen führen können. Vorteilhafterweise wird das akkurate MS/MS Massenspektrum der Ausgangssubstanz mit demselben Massenspektrometer aufgenommen, mit welchem das akkurate MS/MS Massenspektrum des unbekanntes Transformationsproduktes gemessen wird.

[0021] Zum Precursor der Ausgangssubstanz wird eine Massenverschiebung (mass shift) addiert bzw. subtrahiert. Diese mass shifts sind akkurate Massenunterschiede von molekularen Transformationsreaktionen, die zu möglichen Metaboliten der Ausgangssubstanz führen. Wird beispielsweise die Ausgangssubstanz hydroxiliert, d. h. ein Sauerstoffatom wird zur Gesamtelementzusammensetzung hinzugefügt, so beträgt der mass shift +15,99491 Da (exakte monoisotopische Molekülmasse des Sauerstoffs). Mit einem MS/MS Gerät, das

die Masse nicht akkurat bestimmen kann, entspräche dies einem mass shift von 16 Da. Dieser mass shift wird folglich entsprechend der Messgenauigkeit des verwendeten MS/MS Spektrometers angewendet. Die Messgenauigkeit der verwendeten Massenspektrometer ist nicht besonders beschränkt. Um jedoch eine möglichst exakte Identifizierung zu ermöglichen, ist es vorteilhaft, wenn die Genauigkeit des Massenspektrometers < 5 ppm (parts per million) beträgt.

[0022] Mit diesem Verfahren wird nun eine beliebig lange Liste möglicher Precursor durch Addition/Subtraktion der mass shifts vorher definierter typischer Transformationsreaktionen und der Ausgangsmolekülmasse erstellt. Diese mass shifts sind dem Fachmann bekannt. Diese Transformationsreaktionen unterscheiden sich für die verschiedenen Anwendungsfelder, beispielsweise Umwelt, Humanmedizin oder chemische Industrieanlagen. Ein Beispiel von 90 möglichen Transformationsreaktionen für ausgewählte Umwelt- und Humanmetaboliten ist im beigefügten Ausführungsbeispiel aufgezeigt, ohne auf diese beschränkt zu sein.

[0023] In einer Probe, in welcher Metaboliten einer Ausgangssubstanz identifiziert werden sollen, werden von diesen so berechneten m/z_{TP} , d. h. vermutete Metabolit m/z , MS/MS Massenspektren aufgenommen, sofern sie in der Probe vorhanden sind.

[0024] Diese Massenverschiebung von der Ausgangssubstanz zum Metaboliten sollte nicht nur bei den Precursoren beobachtbar sein, sondern auch bei verschiedenen Produktionen im MS/MS Spektrum. Allerdings verschiebt sich nicht jedes Produktion um den mass shift der jeweiligen vermuteten Transformationsreaktion, da diese meistens nur an einem Teil des Moleküls stattfindet, der Rest aber unverändert bleibt. Da der Ort der Transformation in der Regel anfangs unbekannt ist, kann nicht vorausgesagt werden, an welchen Fragmenten der mass shift stattfindet. Daher wendet die Erfindung zum Auffinden der Produktionen folgende Screeningmethode an:

Alle gemessenen Fragmente des MS/MS Massenspektrums der Ausgangssubstanz werden jeweils um den angenommenen exakten mass shift der möglichen Liste der Transformationen addiert bzw. subtrahiert. Diese werden als vorhergesagte Fragmente bzw. als vorhergesagte Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes bezeichnet. Jedes der auf diese Weise vorhergesagten Fragmente wird mit allen im gemessenen MS/MS Massenspektrum des möglichen Metaboliten abgeglichen. Die Übereinstimmungen werden bei gegebener Massengenauigkeit gezählt.

[0025] Da, wie oben erwähnt, sich nicht alle Fragmente verschieben, wird der Vorgang wiederholt, indem jedes der Fragmente der Ausgangssubstanz mit allen Fragmenten im gemessenen MS/MS Massenspektrum des möglichen Metaboliten abgeglichen wird. Die Übereinstimmungen werden bei gegebener Massengenauigkeit gezählt und stellen die Fragmente ohne Massenverschiebung dar. Eine Auswerterroutine vergleicht anschließend vorhergesagte und gemessene MS/MS Spektren, um die Anzahl der Übereinstimmung festzustellen. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die Auswerterroutine nicht besonders beschränkt und kann beispielsweise durch Software unterstützt erfolgen.

[0026] Der Indikator für eine Identifizierung des Metaboliten ist die Anzahl der gefundenen Übereinstimmungen beider Suchvorgänge. Die Wahrscheinlichkeit, den gesuchten Metaboliten bei kleinen Molekülen mit einer Molekülmasse von weniger als 1000 Da zu identifizieren, ist ab 4 exakt übereinstimmenden Produktionen (bedeutet bei einer hohen Massengenauigkeit) sehr hoch. Erfindungsgemäß wird davon ausgegangen, dass eine Übereinstimmung bei Massengenauigkeiten von < 5 ppm (parts per million) vorliegt.

[0027] Die vorstehend beschriebenen Verfahrensschritte sind schematisch auch in Fig. 1 dargestellt. Erfindungsgemäß gilt das unbekanntes Transformationsprodukt als identifiziert, wenn 4 oder mehr Übereinstimmungen zwischen den vorhergesagten Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes einschließlich der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} und den Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes m/z_{PT} vorliegen.

[0028] Vorzugsweise können die vorhergesagten Fragmente unabhängig experimenteller Arbeiten in einer Datenbank gespeichert werden, die zum Abgleich mit gemessenen Daten herangezogen werden kann. Die vorhergesagten MS/MS Massenspektren für die Datenbank beinhalten nach dem oben beschriebenen Verfahren i) die durch Addition/Subtraktion der mass shifts vorhergesagten Produktionen sowie ii) die Produktionen der Ausgangssubstanz als mögliche Produktionen ohne Massenverschiebung. Vermutete Metaboliten können dann vom Anwender gegen die Datenbank auf Übereinstimmung geprüft werden.

[0029] Wie vorstehend beschrieben werden erfindungsgemäß vorhergesagte MS/MS Massenspektren mit gemessenen MS/MS Spektren für vorher vom Anwender definierte vermutete Metaboliten verglichen. Im Ver-

gleich zu den im Stand der Technik bekannten Ansätzen zur Identifizierung unbekannter Metaboliten über die Elementzusammensetzung der Precursor mit akkurater Massenspektrometrie, welche immer noch Raum für mehrere Substanzen lässt, zielt die vorgestellte Erfindung auf die systematische Identifizierung mittels vorhergesagter Produktionen ab. Bei einer hohen Anzahl von Übereinstimmungen bietet diese Methode deutlich mehr Sicherheit bei der Identifizierung im Vergleich zu bekannten Methoden, wenn keine Referenzsubstanzen vorhanden sind.

[0030] Die vorliegende Erfindung wird anhand der Fig. 1 bis Fig. 3 und des folgenden, nicht einschränkenden Beispiels näher erläutert.

[0031] Fig. 1 zeigt eine schematische Zusammenfassung einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung,

[0032] Fig. 2 zeigt ein MS/MS Massenspektrum der im Ausführungsbeispiel verwendeten bekannten Ausgangssubstanz, und

[0033] Fig. 3 zeigt ein MS/MS Massenspektrum des vermuteten Metaboliten (Transformation: Acetylierung).

Beispiel

[0034] Als Ausführungsbeispiel sollen Metaboliten eines Medikaments mit der molekularen Masse $M = 250,052444$ Da gesucht werden. Im positiven Ionisationsmodus entsteht der Precursor dieses Medikaments mit dem Masse/Ladung-Verhältnis $m/z = 251,060269037$.

[0035] Es wurden 90 mögliche Umweltreaktionen und deren mass shifts definiert. Damit werden die Precursor von 90 möglichen Metaboliten berechnet wie dies in Tabelle 1 zusammengestellt ist.

Tabelle 1:

Transformationsreaktion	Elementänderung	mass shift	berechneter Precursor des Metaboliten
Debenzylierung	-CH ₂ C ₆ H ₄	-90,04695	161,01332
Reduktive Debromierung	-Br	-78,91833	172,14194
Trifluormethyl-Abspaltung	-CF ₃ +H	-67,98738	183,07289
2 × reduktive Dechlorierung	-Cl ₂ +2H	-67,92205	183,13822
Desulfonierung	-SO ₂	-63,96189	187,09838
Oxidative Debromierung	-Br+OH	-61,9156	189,14467
Tert-butyl-Dealkylierung	-C ₄ H ₈	-56,0626	194,99767
Hydrolyse von Nitratester (Abspaltung der NO ₂ Gruppe)	-NO ₂ +H	-44,98508	206,07519
Decarboxylierung	-COO	-43,98982	207,07045
Isopropyl-Dealkylierung	-C ₃ H ₆	-42,04695	209,01332
Tert-butyl zu Alkohol	-C ₄ H ₈ +O	-40,06769	210,99258
Propylketon zu Säure	-C ₄ H ₈ +O	-40,06768	210,99259
2 × reduktive Defluorierung	-F ₂ +H ₂	-35,98115	215,07912
Reduktive Dechlorierung	-Cl+H	-33,96103	217,09924
Hydroxymethylenabspaltung	-CH ₂ O	-30,01056	221,04971
Nitroreduktion	-O ₂ +H ₂	-29,97417	221,0861
Propylether zu Säure	-C ₃ H ₈ +O	-28,06769	222,99258
Deethylierung	-C ₂ H ₄	-28,0313	223,02897
Decarboxylierung	-CO	-27,99491	223,06536

Ethylketon zu Säure	-C ₃ H ₆ +O	-26,05204	225,00823
Isopropyl zu Alkohol	-C ₃ H ₆ +O	-26,05204	225,00823
Alkoholdehydrierung	-H ₂ O	-18,01056	233,04971
Dehydrierung von Oxime	-H ₂ O	-18,01056	233,04971
Reduktive Defluorierung	-F+H	-17,99058	233,06969
Oxidative Dechlorierung	-Cl+OH	-17,96612	233,09415
Sulfoxid zu Thioether	-O	-15,99491	235,06536
Thioharnstoff zu Harnstoff	-S+O	-15,97716	235,08311
Deaminierung	-NH	-15,0109	236,04937
Ethylether zu Säure	-C ₂ H ₆ +O	-14,05204	237,00823
Demethylierung	-CH ₂	-14,01565	237,04462
Tert-butyl zu Säure	-C ₃ H ₈ +2O	-12,07278	238,98749
Methylketon zu Säure	-C ₂ H ₄ +O	-12,03639	239,02388
Ethyl zu Alkohol	-C ₂ H ₄ +O	-12,03639	239,02388
2 sequentielle Desaturierungen	-H ₄	-4,0313	247,02897
Hydroxylierung und Dehydrierung	-H ₂	-2,01565	249,04462
primärer oder sekundärer Alkohol zu Aldehyd oder Keton	-H ₂	-2,01565	249,04462
Desaturierung	-H ₂	-2,01565	249,04462
1,4 Dihydro-Pyridin zu Pyridin	-H ₂	-2,01565	249,04462
Oxidative Fluorierung	-F+OH	-1,99567	249,0646
Oxidative Deaminierung zu Keton	-H ₃ N+O	-1,03163	250,02864
Demethylierung und Methylen zu Keton	-CH ₄ +O	-0,0365	251,02377
2-Ethoxyl zu Säure	-CH ₄ +O	-0,03639	251,02388
ipso-Hydroxylierung	+OH-NH ₂	0,98402	252,04429
Isopropyl zu Säure	-C ₂ H ₆ +O ₂	1,94287	253,00314
Demethylierung und Hydroxylierung	-CH ₂ +O	1,97926	253,03953
Keton zu Alkohol	+H ₂	2,01565	253,07592
Nitrosierung	+O-H ₂	13,97926	265,03953
Methylen zu Keton	-H ₂ +O	13,97926	265,03953
Hydroxylierung und Desaturierung	-H ₂ +O	13,97926	265,03953
Alken zu Epoxid	-H ₂ +O	13,97926	265,03953
(O, N, S) Methylierung	+CH ₂	14,01565	265,07592
Ethyl zu Carboxylsäure	-CH ₄ +O ₂	15,95852	267,01879
Hydroxylierung	+O	15,99491	267,05518
Sekundäres oder tertiäres Amin zu Hydroxylamin/N-oxid	+O	15,99491	267,05518
Thioether zu Sulfoxid, Sulfoxid zu Sulfon	+O	15,99491	267,05518
Aromatischer Ring zu Arenoxid	+O	15,99491	267,05518

Ipsso-Hydroxylierung, x-Dihydroxylierung	+O2H2-NH2	16,97893	268,0392
Demethylierung und 2 × Hydroxylierung	-CH2+O2	17,97417	269,03444
Hydratation, (interne) Hydrolyse	+OH2	18,01056	269,07083
Hydrolyse aromatischer Nitrile	+OH2	18,01056	269,07083
Formylierung	+CO	27,99491	279,05518
Hydroxylierung und Ketonbildung	+O2-H2	29,97417	281,03444
Quinonbildung	+O2-H2	29,97417	281,03444
Demethylierung zu Carboxylsäure	+O2-H2	29,97417	281,03444
Nitrierung	+O2-H2	29,97418	281,03445
Hydroxylierung und Methylierung	+COH2	30,01056	281,07083
Dihydroxylierung	+O2	31,98982	283,05009
Thioether zu Sulfon	+O2	31,98982	283,05009
Alken zu Dihydrodiol	+O2H2	34,00547	285,06574
Acetylierung	+C2H2O	42,01056	293,07083
3 × Hydroxylierung	+O3	47,98474	299,04501
Aromatisches Thiol zu Sulfonsäure	+O3	47,98474	299,04501
Glycin-Konjugation	+C2H3ON	57,02146	308,08173
Acetylierung und Hydroxylierung	+C2H2O2	58,00548	309,06575
Sulfat-Konjugation	+SO3	79,95681	331,01708
Hydroxylierung und Sulfatierung	+SO4	95,95172	347,01199
Cystein-Konjugation	+C3H5ONS	103,00918	354,06945
Taurin-Konjugation	+C2H5O2NS	107,00409	358,06436
S-Cystein-Konjugation	+SH5C3O2N	119,00409	370,06436
Decarboxylierung und Glucuronidierung	-CO+C6H8O6	148,03717	399,09744
N-Acetylcysteine-Konjugation	+SC5H7O3N	161,01466	412,07493
Glycosidierung	+C6H10O5	162,0582	413,11847
Glucuronidierung	+C6H8O6	176,03208	427,09235
2 × Sulfat-Konjugation	+2(SO3)	191,90345	442,96372
Hydroxylierung und Glucuronid	+C6H8O7	192,027	443,08727
GSH-Konjugation	+C10H15N3O6S	289,07324	540,13351
Desaturierung und S-GSH-Konjugation	-H2+C10H15N3O6S	303,0525	554,11277
S-GSH-Konjugation	+C10H15N3O6S	305,06815	556,12842
Epoxidierung und S-GSH-Konjugation	+C10H15N3O7S	321,06307	572,12334
2 × Glucuronid-Konjugation	+2(C6H8O6)	325,06417	576,12444

[0036] Anschließend wird das MS/MS Spektrum der Ausgangssubstanz ($m/z = 251,060269037$), welche im vorliegenden Fall käuflich als Reinsubstanz erhältlich ist, aufgenommen. Das erhaltene MS/MS Massenspektrum dieser Ausgangssubstanz ist in Fig. 2 dargestellt.

[0037] Dafür wurde in LC-QTOF der Firma Agilent verwendet (LC-QTOF 6550 in Kombination mit einer 1290 Infinity HPLC). Eluenten waren Acetonitril und Reinstwasser. Als Testsubstanz wurde Sulfadiazine verwendet (CAS 68-35-9), gekauft bei Dr. Ehrentstorfer, Augsburg.

[0038] Im nächsten Schritt wird ein Massenscan ohne Fragmentierung der zu untersuchenden Probe durchgeführt. Dann werden die vermuteten Metabolit m/z aus Tabelle 1, Spalte 4, mit den Ergebnissen des Massenscans der Probe auf Übereinstimmung bei gegebener Massengenauigkeit abgeglichen. Von den Übereinstimmungen werden anschließend MS/MS Spektren aufgenommen. Ein (!) Beispiel dafür ist in Fig. 3 dargestellt für den Precursor (m/z = 293,07083).

[0039] Vorausgesetzt das Fragmentierungsverhalten des Metaboliten ändert sich nicht im Vergleich zur Ausgangssubstanz, so sollten sich die Massen bzw. m/z der einzelnen Produktionen entweder a) um den mass shift der Transformation verschoben haben oder b) gleich geblieben sein wie bei der Ausgangssubstanz, wenn die Transformation nicht an diesem Moleküteil stattgefunden hat. Daraus folgend werden die möglichen Produktionen nach folgenden zwei Schemata für alle definierten Reaktionen vorhergesagt. Das Beispiel der einen (!) ausgewählten Reaktion ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Generelle Berechnung der vorhergesagten Produktionen und vorhergesagte Produktionen für den vermuteten acetylierten Metaboliten

Produktionen der Ausgangssubstanz	mass shift	vorhergesagte Produktionen des vermuteten Metaboliten
65,0385 92,0497 94,0644 96,0554 108,0443 156,0111 158,0011 185,0817	+ 42,0106 (a)	107,0491 134,0603 136,0750 138,0660 150,0549 198,0217 200,0117 227,0923
65,0385 92,0497 94,0644 96,0554 108,0443 156,0111 158,0011 185,0817	+ 0 (b)	65,0385 92,0497 94,0644 96,0554 108,0443 156,0111 158,0011 185,0817

[0040] Die in Spalte 3 vorhergesagten Produktionen werden in eine Datenbank gespeichert. Da es generell unbekannt ist, an welcher Stelle am Molekül die Transformation stattfindet, kann nicht gesagt werden, welche der Produktionen gleich bleiben und welche eine Massenverschiebung aufzeigen. Daher wird jedes der Produktionen der gemessenen MS/MS Spektren der vermuteten Metaboliten (wie eines dargestellt in Fig. 3) der Reihe nach mit jedem der vorhergesagten Produktionen (Tabelle 2, 3. Spalte) bei einer vom Anwender bestimmten Massengenauigkeit, die vom Gerät abhängt, abgeglichen. Jede Übereinstimmung wird gezählt und als Kriterium zur Identifizierung genutzt. Eine Übereinstimmung von mindestens 4 Produktionen ist ein eindeutiger Hinweis, dass es sich um den vermuteten Metaboliten handelt.

[0041] Im vorliegenden Beispiel des vermuteten acetylierten Metaboliten ergaben sich folgende Übereinstimmungen:

a) Prüfung gegen die Produktionen, die eine Massenverschiebung aufweisen bei einer Massengenauigkeit von m/z = 0.001 (die hochgestellten Zahlen zeigen die Übereinstimmungen)

Gemessen	Vorhergesagt	Treffer
65,0384	107,0491	
93,0330	134,0603 ¹	x

96,0553	136,0750 ²	x
108,0439	138,0660	
134,0599 ¹	150,0549 ³	x
136,0754 ²	198,0217 ⁴	x
150,0541 ³	200,0117	
156,0104	227,0923 ⁵	x
158,0013		
185,0817		
198,0217 ⁴		
227,09205		
293,0697		
	Summe der Treffer:	5

b) Prüfung gegen die Produktionen, die keine Massenverschiebung aufweisen bei einer Massengenauigkeit von in diesem Fall $m/z = 0,001$ (die hochgestellten Zahlen zeigen die Übereinstimmungen)

Gemessen	Vorhergesagt	Treffer
65,0384 ¹	65,0385 ¹	x
93,0330	92,0497	
96,0553	94,0644	
108,0439 ²	96,0554	
134,0599	108,0443 ²	x
136,0754	156,0111 ³	x
150,0541	158,0011 ⁴	x
156,0104 ³	185,0817 ⁵	x
158,0013 ⁴		
185,0817 ⁵		
198,0217		
227,0920		
293,0697		
	Summe der Treffer:	5

[0042] Insgesamt konnten 10 Übereinstimmungen zwischen vorhergesagten und gemessenen Produktionen gefunden werden, was de facto eine Identifizierung des Metaboliten ohne Referenzstandard darstellt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung von unbekanntem Transformationsprodukten einer Ausgangssubstanz mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), wobei keine Referenzstandards für die unbekanntem Transformationsprodukte existieren, umfassend die folgenden Schritte:

(i) das Bereitstellen eines tatsächlich gemessenen, akkuraten MS/MS Massenspektrums mit allen Produktionen der Ausgangssubstanz, um das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ausgangssubstanz m/z_A und die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} zu erhalten;

(ii) das Vorhersagen von Masse-zu-Ladungsverhältnissen der Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes durch a) addieren oder subtrahieren der Massenverschiebungen möglicher Transformationsreaktionen zu bzw. von allen Masse-zu-Ladungsverhältnissen der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} und b) Berücksichtigung von Produktionen der Ausgangssubstanz ohne Massenveränderung, um einen Datensatz von vorhergesagten Produktionen des unbekanntem Transformationsproduktes zu erhalten;

(iii) das experimentelle Erstellen eines akkuraten MS/MS Massenspektrums des unbekanntes Transformationsproduktes, um das Masse-zu-Ladungsverhältnis des unbekanntes Transformationsproduktes m/z_T und die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes m/z_{PT} zu erhalten; und

(iv) das quantitative Vergleichen der vorhergesagten Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes sowie der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} mit den Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes m/z_{PT} auf Übereinstimmungen und Zählen derselbigen, wobei 4 oder mehr Übereinstimmungen zwischen den vorhergesagten Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes einschließlich der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} und den Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes m/z_{PT} als Identifizierung gilt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei vor dem Schritt (iii) des experimentellen Erstellens eines akkuraten MS/MS Massenspektrums des unbekanntes Transformationsproduktes ein chromatographisches Trennverfahren durchgeführt wird, um das unbekanntes Transformationsprodukt aus einer zu untersuchenden Probe zu isolieren.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das chromatographische Trennverfahren aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Flüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, ferner umfassend den Schritt des Speicherns der vorhergesagten Produktionen des unbekanntes Transformationsproduktes und der bekannten Produktionen der Ausgangssubstanz m/z_{PA} in einer Datenbank.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Molekülmasse der Ausgangssubstanz weniger als 1000 Da beträgt.

6. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 in der organischen chemischen Analytik.

7. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 in der medizinischen oder pharmazeutischen Analytik, in der Forensik oder in der Doping-, Umwelt- oder Lebensmittelanalytik.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

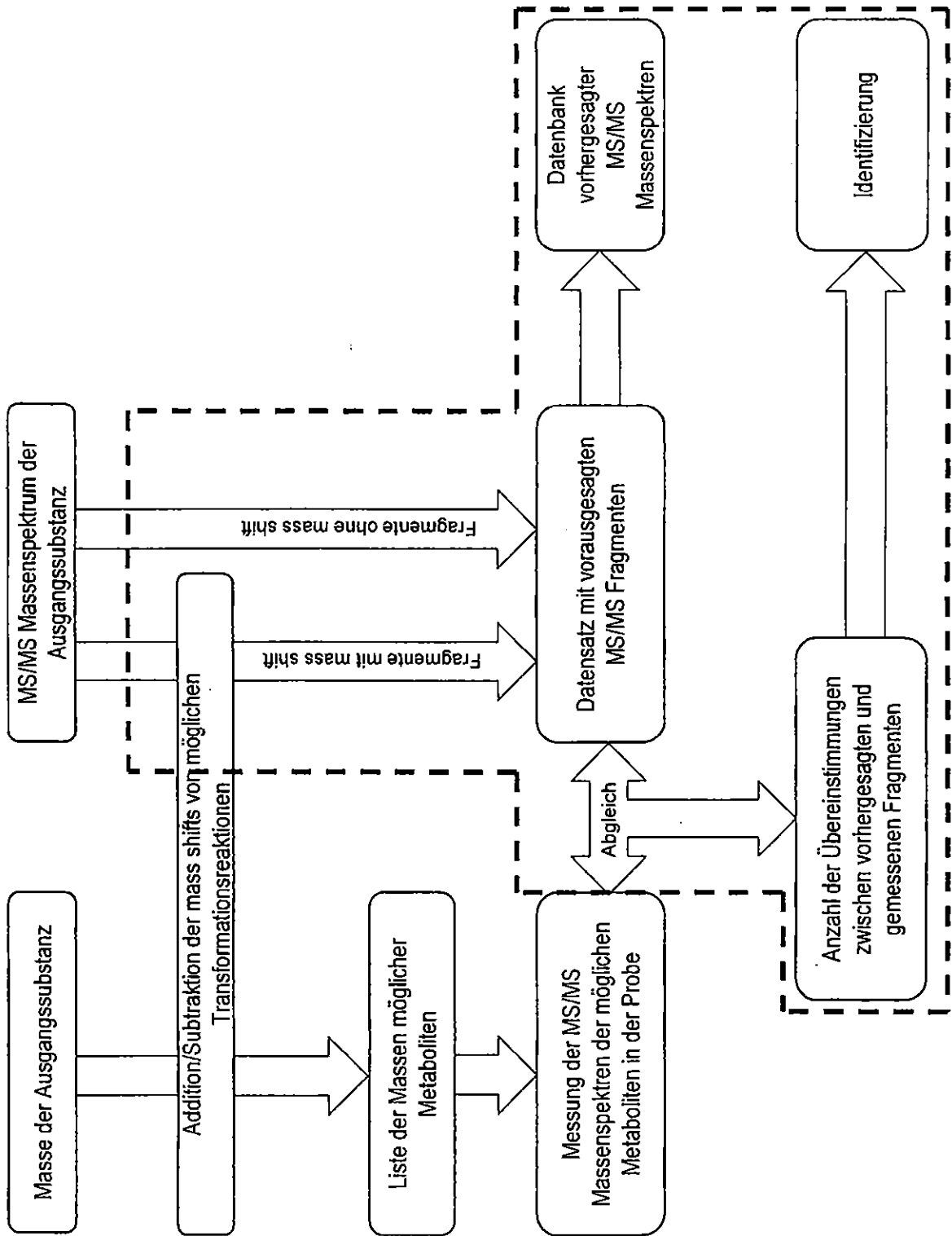


Fig. 1

Fig. 2

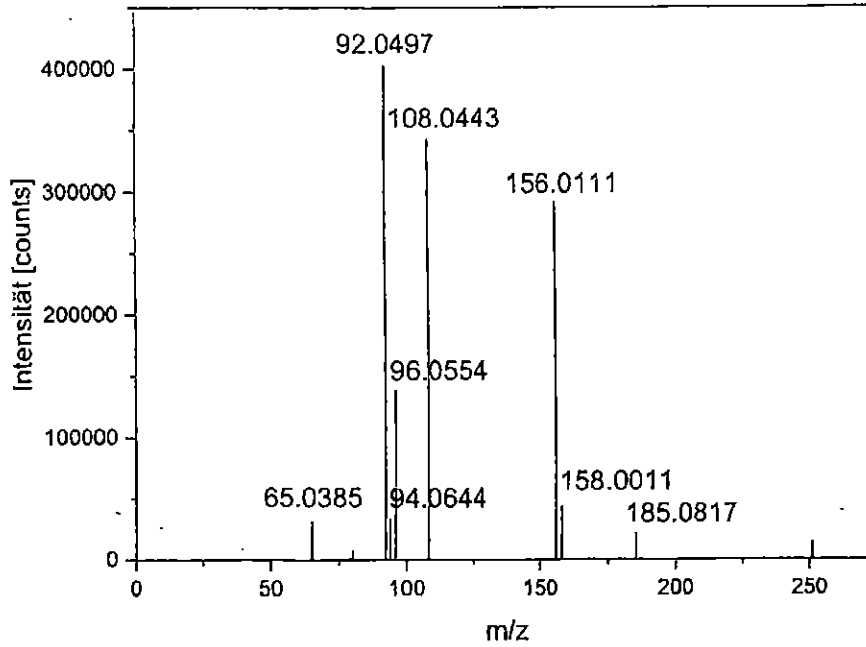


Fig.3

