

计算机辅助药物代谢物鉴定

第2部分：奈法唑酮非预期代谢物的鉴定

采用 MassHunter 代谢物鉴定软件根据 RRLC – QTOF MS 数据鉴定代谢物

应用简报

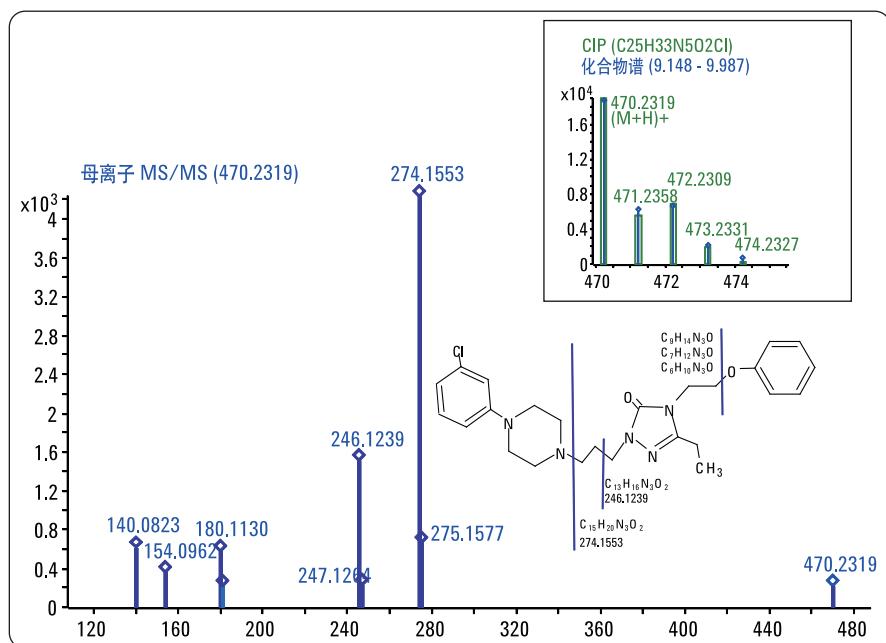
药物发现和药物研发过程中的代谢物鉴定

作者

Edgar Nägele

安捷伦科技公司

瓦尔德布龙, 德国



摘要

本应用简报介绍了：

- 利用 Agilent 1200 快速分离液相色谱 (RRLC) 系统高分离度分离体外代谢实验中得到的代谢物
 - 利用 Agilent 6520 QTOF 质谱仪采集用于计算机辅助代谢物鉴定的数据
 - 利用 Agilent MassHunter 代谢物鉴定软件高效鉴定非预期代谢物
 - 奈法唑酮药物非预期代谢物的代谢物鉴定数据分析结果

引言

本应用简报介绍了利用 Agilent 1200 RRLC 系统和 Agilent 6520 QTOF 质谱仪进行代谢实验的数据采集, 利用 MetID 软件进行计算机辅助的数据分析。以药物奈法唑酮非预期代谢物为例, 详细讨论了数据的分析结果。

采用 MetID 软件进行预期代谢物的鉴定在我们第一部分的工作中进行了讨论¹。

实验部分及方法

有关所采用的实验条件和方法的详细信息, 请参阅《计算机辅助的奈法唑酮预期代谢物鉴定》, 出版物编号 5990-3606CHCN。

结果与讨论

为了进行可能代谢物的鉴定, 可从对照样品得到相关的同位素分布、MS/MS 碎裂质量数分布和母体药物奈法唑酮的计算分子式等基本信息 (图 1 和图 2)。测得的

同位素分布 (图 1 插图中蓝线) 清楚地表明该化合物是一个典型的含氯化合物, 该同位素分布与 m/z 470.2319 的主离子 ($M+H$)⁺ ($C_{25}H_{33}N_5O_2Cl$) 的计算同位素分布 (CIP, 图 1 插图中的绿框) 一致。

MS/MS 谱显示 m/z 274.1553 的主要碎片 ($M+H$)⁺, 分子式为 $C_{15}H_{20}N_3O_2$ (图 1)。奈法唑酮 ($C_{25}H_{33}N_5O_2Cl$) 的 ($M+H$)⁺ 离子的计算质量与测得值具有较小的相对偏差 -0.35ppm (图 2), 并且

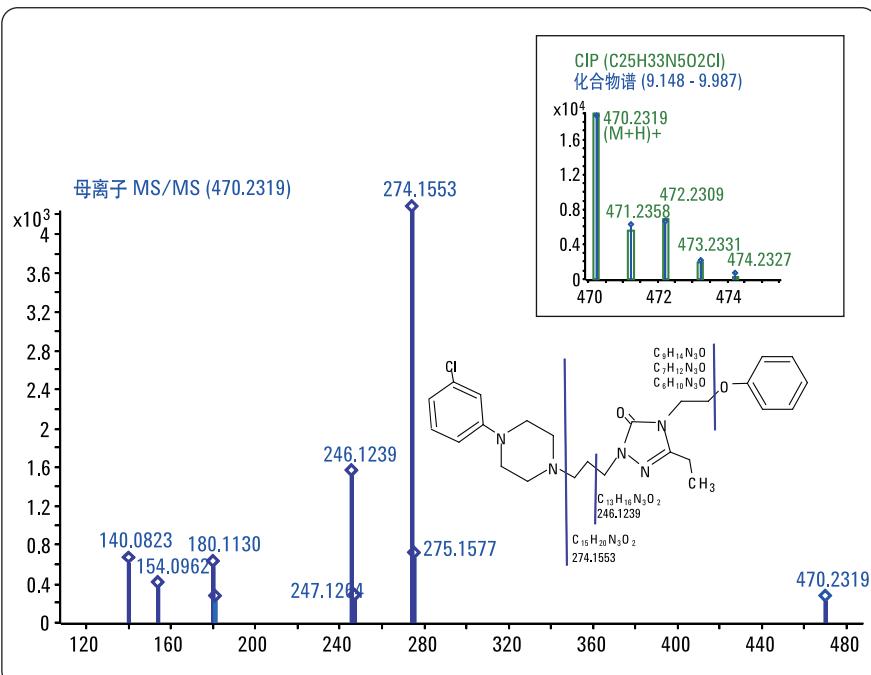


图 1.
奈法唑酮药物的质谱、同位素分析以及碎片离子的 MS/MS 谱归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式
$C_{25}H_{33}N_5O_2Cl$	469.2245	469.2246	-0.16	-0.35	12	470.2319	$(M+H)^+$	$C_{25}H_{33}N_5O_2Cl$

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
470.2319	470.2317	-0.35	100.00	100.00
471.2358	471.2347	-2.28	31.86	29.32
472.2309	472.2299	-2.24	33.67	36.56
473.2331	473.2322	-1.90	10.14	9.88
474.2327	474.2348	4.50	2.23	1.50

图 2.
奈法唑酮的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	质量数	分子式	计算质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失
140.0823	139.0750	$C_6H_9N_3O$	139.0746	-0.43	-3.12	330.1499	$C_{19}H_{23}N_2OCl$	330.1482
154.0962	153.0890	$C_7H_{11}N_3O$	153.0902	1.25	8.16	316.1342	$C_{18}H_{21}N_2OCl$	316.1343
180.1130	179.1058	$C_9H_{13}N_3O$	179.1059	0.11	0.62	290.1186	$C_{16}H_{19}N_2OCl$	290.1175
246.1239	245.1167	$C_{13}H_{15}N_3O_2$	245.1164	-0.23	-0.94	224.1080	$C_{12}H_{17}N_2Cl$	224.1066
274.1553	273.1481	$C_{15}H_{19}N_3O_2$	273.1477	-0.34	-1.26	196.0767	$C_{10}H_{13}N_2Cl$	196.0751

图 3.
奈法唑酮碎裂的 MS/MS 碎片计算分子式和中性丢失计算分子式。

质量数为 273.1481 ($C_{15}H_{19}N_3O_2$) 的 MS/MS 碎片离子的相对偏差为 -1.26ppm (图 3)。该碎片的分子式，加上计算出的 MS/MS 碎片丢失分子式 $C_{10}H_{13}N_2Cl$ ，就与母体药物分子式 $C_{25}H_{32}N_5O_2Cl$ (图 3) 相符。其他 MS/MS 碎片也可归属到奈法唑酮结构式 (图 1)。

除了由已知的生物转化反应产生的药物代谢物，还存在未知代谢反应产生的代谢物，即非预期代谢物。这些非预期代谢物往往来源于原型药物分子，通过分裂去除原型药物分子结构中的某些部分，然后由剩余部分经代谢反应产生。对奈法唑酮药物来说，存在多种由这种反应途径产生的代谢物。

第一个例子是代谢物 7，该代谢物在约 7.8 分钟洗脱， m/z 458.1948。测定同位素分布清楚地显示该代谢物为典型的含氯化物 (图 4 插图中的蓝线)，且与分子式为 $C_{23}H_{29}N_5O_3Cl$ 的计算同位素分布一致 (CIP，图 4 插图中的绿框)，相对质量

偏差为 1.03ppm (图 5)。碎片分布匹配 (FMP) 清楚地显示了原型药物的 MS/MS 谱 (图 4，蓝色) 和代谢物的 MS/MS 谱 (红色) 之间的相似性。由于非预期的生物转化，分子离子质量由原型药物质量 m/z 470.2319 变化为 m/z 458.1948。该生物转化同时包括失去乙基和氧化成酮 (图 4 和图 6)。质量数变化还可从某些 MS/MS 碎片离子观察到。例如，分子式

为 $C_{13}H_{15}N_3O_3$ 的 m/z 262.1188 碎片离子的相对偏差为 -0.82ppm。该碎片离子是由奈法唑酮 MS/MS 碎片 m/z 274.1557 经总体生物转化 ($-C_2H_4+O$) 代谢生成的 (图 6)。所有 MS/MS 碎片的中性丢失计算分子式与母体药物分子式匹配。其它的一些 MS/MS 碎片的分子式信息在图 4 和图 6 中给出。

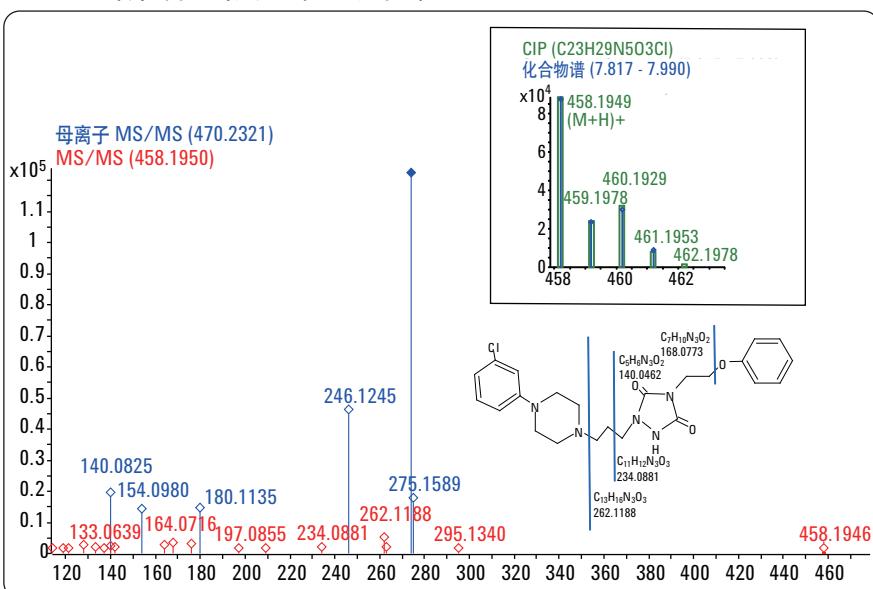


图 4
奈法唑酮代谢物 7 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	△质量数 [mDa]	△质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式	得分
C23H28N5O3Cl	457.18806	457.18759	0.47	1.03	12	458.19486	(M+H)+	C23H29N5O3Cl	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	△质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
458.1949	458.1953	1.04	100.00	100.00
459.1977	459.1983	1.27	25.45	27.15
460.1929	460.1934	1.12	32.69	36.16
461.1962	461.1958	-0.83	8.67	9.15

图 5
奈法唑酮代谢物 7 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	质量数	分子式	计算质量数	△质量数 [mDa]	△质量数 [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失	FPM m/z	差异 m/z	△差异 [mDa]	差异分子式
121.06431	120.05703	C8H8O	120.05751	0.48	4.02	337.13055	C15H20N5O2Cl	337.13065				
140.04622	139.03894	C5H5N3O2	139.03818	-0.76	-5.49	318.14989	C18H23N2OCl	318.14874				
168.07774	167.07047	C7H10N02	167.06951	-0.99	-5.93	290.11866	C16H19N2OCl	290.11722	180.11347	-12.0364	0.66	-C2-H4+O
234.08810	233.08082	C11H11N3O3	233.08004	-0.78	-3.36	224.10803	C12H17N2Cl	224.10686	246.12446	-12.0364	0.02	-C2-H4+O
262.11883	261.11156	C13H15N3O3	261.11134	-0.22	-0.82	196.07673	C10H13N2Cl	196.07613	274.15579	-12.0364	0.57	-C2-H4+O
458.19464									470.23212	-12.0364	1.10	-C2-H4+O

图 6
奈法唑酮代谢物 7 碎裂的 MS/MS 碎片计算分子式和中性丢失计算分子式。

代谢物 8 是另一个非预期的含氯代谢物，测得的同位素分布与含氯母体药物的计算同位素分布 (CIP) 高度一致 (图 7)。

代谢物 8 的测定质量数为 m/z 410.1962，计算分子式为 $C_{19}H_{28}N_5O_3Cl$ ，相对质量偏差为-2.06 ppm (图 8)。该分子式可能是母体药物羟基化后失去苯基形成的碎片。MS/MS 谱分析也支持该结论 (图 7)。

m/z 214.1182 的碎片计算分子式为 $C_9H_{16}N_3O_3$ ，相对质量偏差为 1.82ppm (图 9)。该碎片离子分子式是由 m/z 180.1124 的奈法唑酮 MS/MS 碎片加两个氢原子和两个氧原子形成的 (与第 1 页中的图 1 相比)。响应强度排第二的

代谢物 8 的 MS/MS 碎片离子的质量数为 m/z 186.0873，分子式为 $C_7H_{12}N_3O_3$ (-0.17ppm) 是该碎片失去乙基形成的，这从另一方面提供了相应支持。

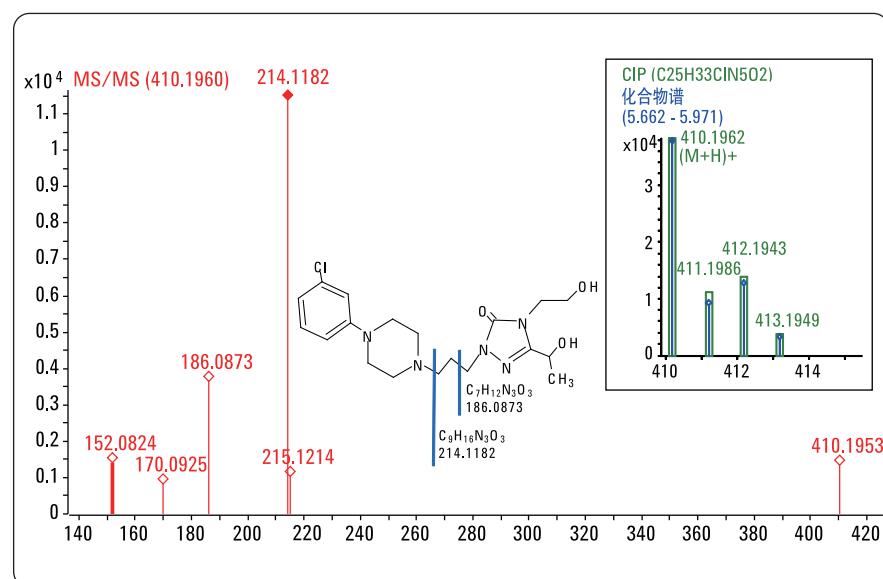


图 7
裂解奈法唑酮代谢物 8 的质谱、同位素分析和 MS/MS 碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式
$C_{19}H_{28}ClN_5O_3$	409.1881	409.1889	-0.84	-2.06	8	410.1962	$(M+H)^+$	$C_{19}H_{29}ClN_5O_3$

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
410.1962	410.1953	-2.06	100.00	100.00
411.1986	411.1982	-0.8	22.99	22.82
412.1943	412.1931	-2.73	32.26	35.1
413.1949	413.1956	1.78	7.21	7.62

图 8
裂解奈法唑酮代谢物 8 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	碎片分子式	计算 m/z	$\Delta m/z$ [mDa]	$\Delta m/z$ [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失	FPM m/z	差异 m/z	Δ 差异 [mDa]	差异分子式
152.08242	$C_7H_{10}N_3O$	152.08184	-0.58	-3.84	258.11351	$C_{12}H_{19}ClN_2O_2$	258.11353				
170.09245	$C_7H_{12}N_3O_2$	170.09240	-0.05	-0.29	240.10294	$C_{12}H_{17}ClN_2O$	240.10350				
186.08729	$C_7H_{12}N_3O_3$	186.08732	0.03	0.17	224.10803	$C_{12}H_{17}ClN_2$	224.10867				
214.11823	$C_9H_{16}N_3O_3$	214.11862	0.39	1.82	196.07673	$C_{10}H_{13}ClN_2$	196.07772	180.11243	34.0055	0.32	$+H_2+O_2$

图 9
裂解奈法唑酮代谢物 8 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

代谢物 8 进一步氧化形成了代谢物 9。该代谢物的质量数 m/z 408.1807, 显示了典型的含氯分子的同位素分布 (图 10)。

代谢物 9 的分子式为 $C_{19}H_{26}N_5O_3Cl$, 相对质量偏差为 -2.43ppm (图 11)。

MS/MS 谱分析显示响应最强的离子为 m/z 212.1031, 分子式为 $C_9H_{14}N_3O_3$ (-0.51ppm) (图 10 和图 12)。与代谢物 8 的 MS/MS 谱中 m/z 214.1182 处的碎片 ($C_9H_{16}N_3O_3$) 相比, 该分子式可解释为羟基氧化为酮的结果。响应排第二的离子 m/z 184.0715, 分子式为 $C_7H_{10}N_3O_3$, 也可这样解释。

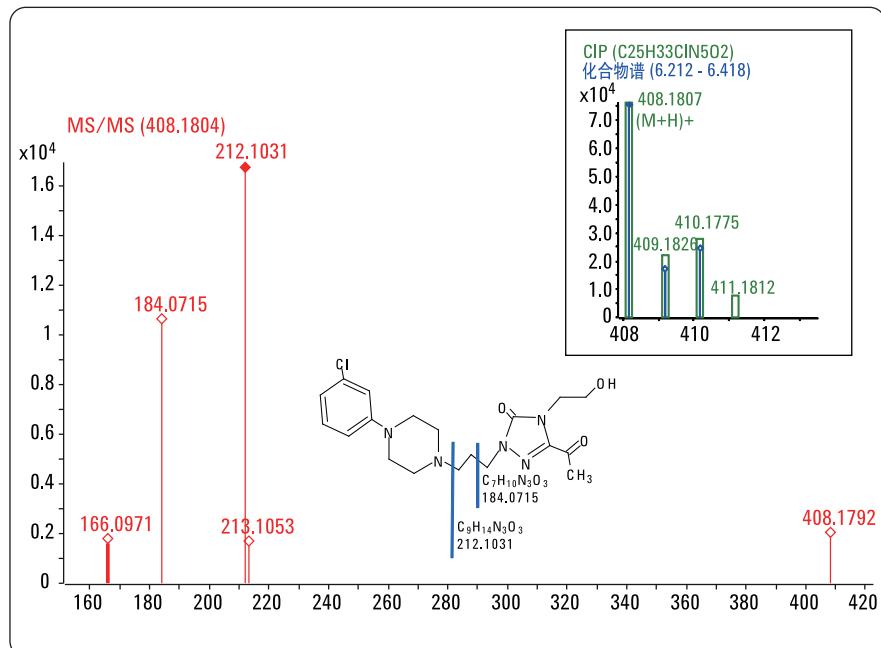


图 10
裂解奈法唑酮代谢物 9 的质谱、同位素分析和 MS/MS 碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式
$C_{19}H_{26}ClN_5O_3$	407.1724	407.1734	-0.99	-2.43	9	408.1807	$(M+H)^+$	$C_{19}H_{27}ClN_5O_3$

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
408.1807	408.1797	-2.43	100.00	100.00
409.1826	409.1826	-0.14	21.17	22.8
410.1775	410.1775	0.05	30.9	35.1

图 11
裂解奈法唑酮代谢物 9 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	离子分子式	计算 m/z	$\Delta m/z$ [mDa]	$\Delta m/z$ [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失
166.09707	$C_8H_{12}N_3O$	166.09749	0.42	2.54	242.08221	$C_{11}H_{15}ClN_2O_2$	242.08330
184.07152	$C_7H_{10}N_3O_3$	184.07167	0.15	0.82	224.10803	$C_{12}H_{17}ClN_2$	224.10885
212.10308	$C_9H_{14}N_3O_3$	212.10297	-0.11	-0.51	196.07673	$C_{10}H_{13}ClN_2$	196.07729

图 12
裂解奈法唑酮代谢物 9 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

最后, 含氯的低丰度代谢物 10, 在 1.88 分钟洗脱, 具有较低分子量 m/z 213.0787, 分子式为 $C_{10}H_{13}N_2OCl$ (1.02ppm) 也得到了鉴定 (图 13 和图 14)。该代谢物来自于母体药物奈法唑酮代谢裂解, 其中右侧部分可得到代谢物 14, 左侧是氯化芳香基侧链 (与第 1 页的图 1 和第 10 页的图 25 比较)。MS/MS 谱图中有两个特征碎片 m/z 170.0362 和 m/z 135.0678, 这两个碎片足以鉴定该化合物 (图 15)。

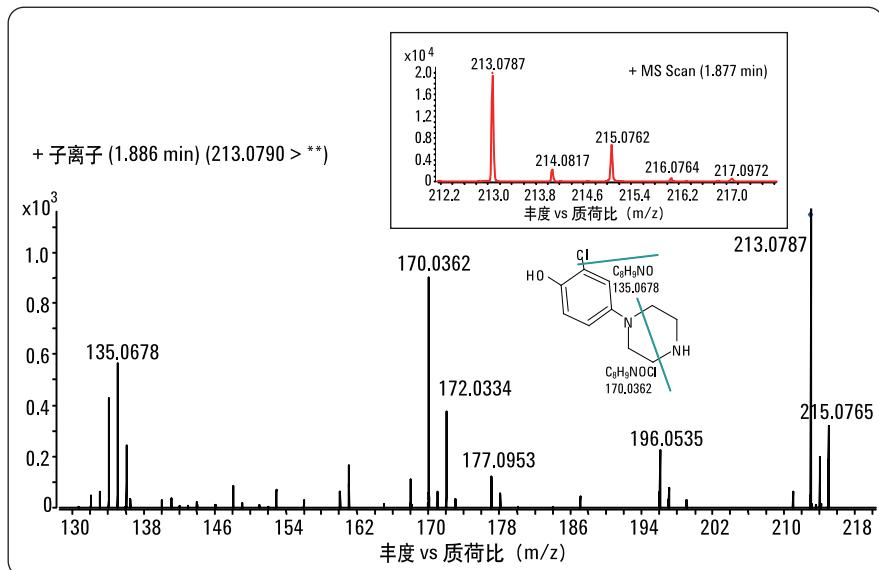


图 13
裂解奈法唑酮代谢物 10 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式
$C_{10}H_{13}N_2OCl$	212.0716	212.0714	0.22	1.02	5	213.0787	$(M+H)^+$	$C_{10}H_{14}N_2OCl$

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
213.0787	213.0789	1.02	100.00	100.00
214.0817	214.0819	0.85	12.32	29.32
215.0762	215.0762	-0.02	35.15	32.83

图 14
裂解奈法唑酮代谢物 10 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

测得质量数	分子式	计算质量数	质量偏差 [mDa]	质量偏差 [ppm]
213.0787	$C_{10}H_{14}N_2OCl$	213.0789	0.2	1.02
170.0362	C_8H_9NOCl	170.0367	0.50	3.05
135.0678	C_8H_9NO	135.0679	0.1	0.48

图 15
裂解奈法唑酮代谢物 10 的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

如果初始裂解反应是复杂的，且明显改变了同位素分布或 MS/MS 碎片分布，情况将变得更加复杂。对于代谢物 11 而言，同位素分布表明分子没有氯（图 16）。分子式为 $C_{19}H_{29}N_5O_2$ 的代谢物的相对质量偏差为 -1.35ppm（图 17）。相对于母体药物分子式 $C_{25}H_{32}N_5O_2Cl$ ，说明含氯苯基（ C_6H_4Cl ）在最初的代谢反应中被裂解去除。代谢物 11 的 MS/MS 碎片离子与母体药物的相同（图 16），但中性丢失碎片却不同（图 18）。例如， m/z 274.1558 处的碎片离子，分子式为 $C_{15}H_{19}N_3O_2$ ，与代谢物分子匹配的中性丢失分子式为

$C_4H_{10}N_2$ ，这是失去的哌嗪基团的分子式（图 18）。

进一步氧化反应。代谢物 12 是代谢物 11 的羟基化反应产物。

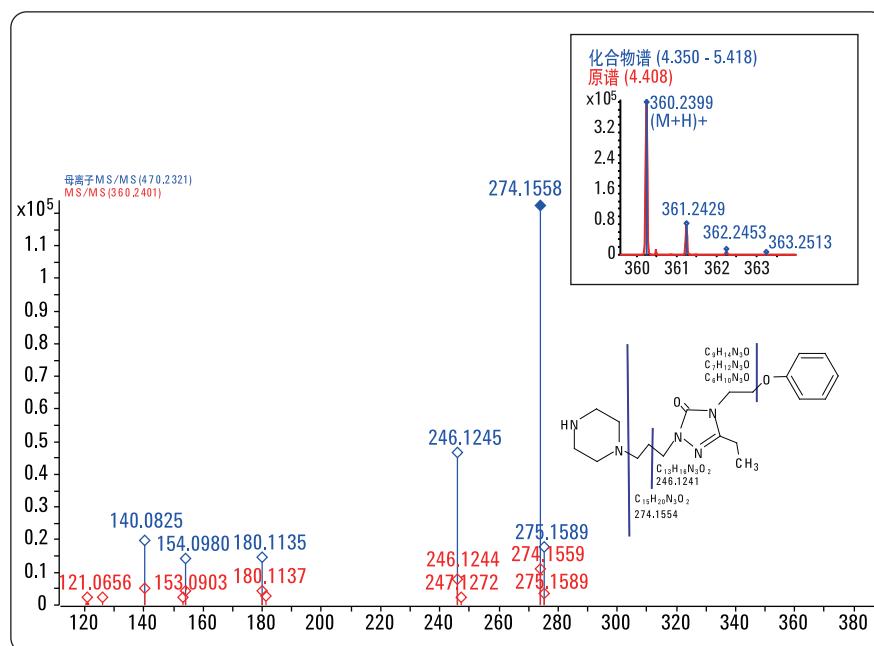


图 16
裂解奈法唑酮代谢物 11 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式	得分
$C_{19}H_{29}N_5O_2$	359.2321	359.2326	-0.48	-1.35	8	360.2398	$(M+H)^+$	$C_{19}H_{30}N_5O_2$	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
360.2399	360.2394	-1.35	100.00	100.00
361.2429	361.2423	-1.6	18.91	22.8
362.2453	362.245	-1.04	2.26	2.9

图 17
裂解奈法唑酮代谢物 11 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	质量数	分子式	计算质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失
121.06558	120.05830	C_8H_8O	120.05751	-0.79	-6.54	239.17461	$C_{11}H_{21}N_5O$	239.17453
140.08238	139.07511	$C_6H_9N_3O$	139.07456	-0.54	-3.91	220.15756	$C_{13}H_{20}N_2O$	220.15772
154.09782	153.09054	$C_7H_{11}N_3O$	153.09021	-0.33	-2.16	206.14191	$C_{12}H_{18}N_2O$	206.14229
180.11374	179.10646	$C_9H_{13}N_3O$	179.10586	-0.60	-3.35	180.12626	$C_{10}H_{16}N_2O$	180.12637
246.12437	245.11709	$C_{13}H_{15}N_3O_2$	245.11643	-0.66	-2.70	114.11570	$C_6H_{14}N_2$	114.11574
274.15588	273.14860	$C_{15}H_{19}N_3O_2$	273.14773	-0.88	-3.21	86.08440	$C_4H_{10}N_2$	86.08423

图 18
裂解奈法唑酮代谢物 11 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

代谢产物 12 约 3.4 分钟洗脱, m/z 为 376.2355, 计算分子式为 $C_{19}H_{29}N_5O_3$, 相对质量偏差为 -1.19ppm (图 19 和图 20)。同位素分布可以清楚地看出这是一个不含氯的化合物 (图 19)。MS/MS 碎裂质量数分布表明, m/z 290.1499 处的主峰分子式为 $C_{15}H_{19}N_3O_3$, 相对质量偏差为 -0.19ppm。该代谢物由于羟基化, m/z 274.1553 处的 MS/MS 峰更高 (图 12, 与代谢产物 2 相比)。在 m/z 156.0768 处, 分子式为 $C_6H_{10}N_3O_2$ (相对质量偏差为 -0.69ppm, 图 21) 的

代谢物 12 的 MS/MS 碎片是从
m/z 140.0823 处, 分子式为 $C_6H_{10}N_3O$

(相对质量偏差为 -3.91 ppm, 图 21) 的代谢物 11 的 MS/MS 碎片离子氧化来的。

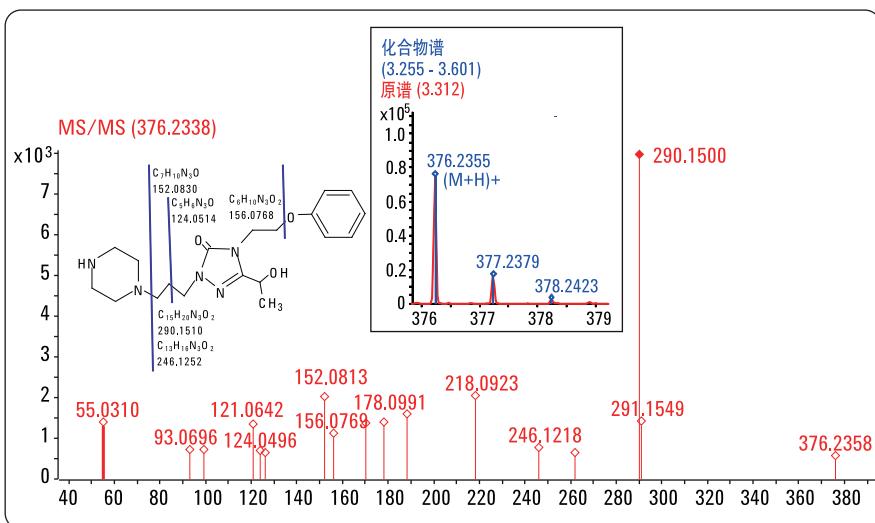


图 19
裂解奈法唑酮代谢物 12 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式
C19H29N5O3	375.227	375.2282	-1.19	-3.17	8	376.2355	(M+H)+	C19H30N5O3

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
376.2355	376.2343	-3.16	100.00	100.00
377.2379	377.2372	-1.94	18.95	22.84
378.2423	378.2398	-6.58	2.19	3.11

图 20 裂解奈法唑酮代谢物 12 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

图 21 裂解奈法唑酮代谢物 12 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

代谢物 13 是代谢物 12 的羟基进一步氧化为酮 (图 22 和图 23) 的代谢产物。代谢物 13 的离子在 m/z 374.2195 (图 22) 处的丰度最高, 同位素分布显示不含氯。代谢物 13 的分子式为 $C_{19}H_{27}N_5O_8$, 相对质量偏差为 -2.31ppm (图 23)。MS/MS 碎裂质量数分布显示 m/z 288.1353 处的碎片离子分子式为 $C_{15}H_{18}N_3O_3$, 相对质量偏差为 -3.43ppm。该碎片离子是由哌嗪部分被清除产生的, 由于氧化, 与母体药物的 MS/MS 碎片离子 m/z 274.1553 相比, 该碎片离子迁移到了更高的质量数 (图 24, 与代谢产物 2 相比)。代谢产物 13 的主要 MS/MS 碎片离子位于 m/z 168.0765 处, 相应的离子分子式为

$C_7H_{10}N_3O_3$, 相对质量偏差为 1.78ppm。该碎片是由于进一步失去乙基和苯基产生的。进一步的碎裂会形成 m/z 154.0611

和 m/z 140.0457 处的碎片离子, 相应的分子式为 $C_6H_8N_3O_2$ (0.10ppm) 和 $C_5H_6N_3O_2$ (-1.97ppm) (图 24 和图 22)。

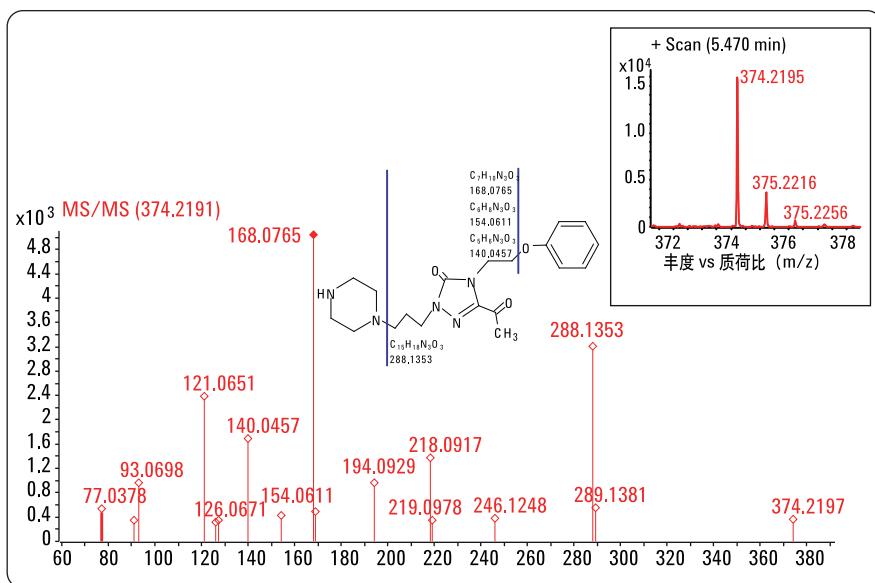


图 22
裂解奈法唑酮代谢物 13 的质谱、同位素分析和 MS/MS 碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式
$C_{19}H_{27}N_5O_3$	373.2114	373.2123	-0.86	-2.31	9	374.2195	$(M+H)^+$	$C_{19}H_{28}N_5O_3$

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
374.2195	374.2187	-2.31	100.00	100.00
375.2216	375.2216	-0.05	18.49	22.81
376.2256	376.2241	-4.01	2.43	3.1

图 23
裂解奈法唑酮代谢物 13 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	质量数	分子式	计算质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	中性丢失	丢失分子式	丢失质量数	FPM m/z	差异 m/z	Δ 差异 [mDa]	差异分子式
121.06506	120.05779	C_8H_8O	120.05751	-0.27	-2.27	253.15402	$C_{11}H_{19}N_5O_2$	253.15387				
126.06707	125.05980	$C_5H_7N_3O$	125.05891	-0.89	-7.08	248.15201	$C_{14}H_{20}N_2O_2$	248.15248				
127.12332	126.11604	$C_7H_{14}N_2$	126.11570	-0.34	-2.70	247.09577	$C_{12}H_{13}N_3O_3$	247.09569				
140.04573	139.03845	$C_5H_5N_3O_2$	139.03818	-0.27	-1.97	234.17336	$C_{14}H_{22}N_2O$	234.17321				
154.06109	153.05381	$C_6H_7N_3O_2$	153.05383	0.01	0.10	220.15800	$C_{13}H_{20}N_2O$	220.15756				
168.07646	167.06918	$C_7H_9N_3O_2$	167.06948	0.30	1.78	206.14263	$C_{12}H_{18}N_2O$	206.14191				
194.09287	193.08559	$C_9H_{11}N_3O_2$	193.08513	-0.47	-2.42	180.12622	$C_{10}H_{16}N_2O$	180.12626				
218.09172	217.08444	$C_{11}H_{11}N_3O_2$	217.08513	0.68	3.14	156.12737	$C_8H_{16}N_2O$	156.12626				
246.12485	245.11757	$C_{13}H_{15}N_3O_2$	245.11643	-1.14	-4.67	128.09424	$C_6H_{12}N_2O$	128.09496				
288.13525	287.12798	$C_{15}H_{17}N_3O_3$	287.12699	-0.99	-3.43	86.08383	$C_4H_{10}N_2$	86.08440	274.1553	13.9793	0.64	$-H_2+O$

图 24
裂解奈法唑酮代谢物 13 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

不含氯的代谢产物 14, 约 7.2 分钟洗脱, m/z 292.1666, 分子式为 $C_{15}H_{21}N_3O_3$, 相对质量偏差为 -3.65ppm (图 25 和图 26)。该分子式与分子式为 $C_{19}H_{29}N_5O_2$ 的代谢产物 11 (第 7 页的图 16 和图 17) 相比, 区别在于 $-C_4H_8N_2+O$, 为失去哌嗪部分的羟基化反应提供了证明。MS/MS 碎片离子分布匹配 (FPM) 显示了代谢产物 14 与奈法唑酮 (图 25) 的相似性。代谢产物 14 可理解为奈法唑酮的 MS/MS 碎片离子 m/z 274.1558 ($C_{15}H_{20}N_3O_2$) 增加一个氧原子和两个氢原子得到的。羟基化反应发生的位置可由 m/z 198.1238 处的新 MS/MS 碎片离子 ($C_9H_{16}N_3O_2$, 相对质量偏差 -0.67ppm) (图 27) 解释。

与 m/z 180.1135 处的奈法唑酮 MS/MS 碎片离子 ($C_9H_{14}N_3O$) (第 2 页的图 3) 相比, 该碎片离子增加了 H_2O 。这一推测得到了 m/z 154.0986 ($C_7H_{12}N_3O$) 和

m/z 140.0819 ($C_6H_{10}N_3O$) 的两个碎片离子的支持, 这两个碎片离子与奈法唑酮的 MS/MS 碎片离子相同 (图 27 和第 2 页的图 3 相比)。

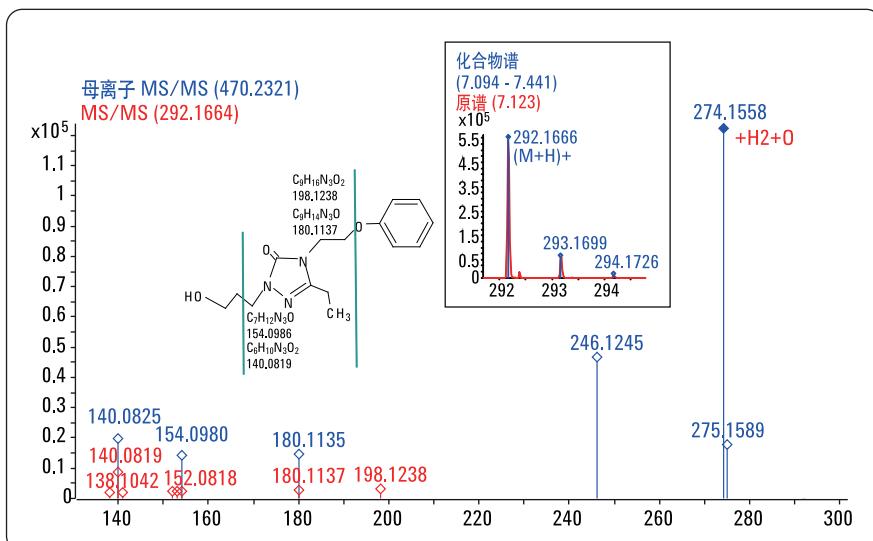


图 25 裂解奈法唑酮代谢物 14 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	△质量数 [mDa]	△质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式	得分
C15H21N3O3	291.15829	291.15935	-1.06	-3.65	7	292.16663	(M+H)+	C15H22N3O3	100

同位素分布	计算 m/z	△ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
m/z				
292.1666	292.1656	-3.64	100.00	100.00
293.1699	293.1686	-4.35	14.7	17.69
294.1726	294.171	-5.39	1.69	2.09

图 26
裂解奈法唑酮代谢物 14 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	质量数	分子式	计算质量数	△质量数 [mDa]	△质量数 [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失	FPM m/z	差异 m/z	△差异 [mDa]	差异 分子式
140.08191	139.07464	C6H9N3O	139.07456	-0.07	-0.53	152.08373	C9H12O2	152.08450				
154.09862	153.09134	C7H11N3O	153.09021	-1.13	-7.37	138.06808	C8H10O2	138.06780				
180.11373	179.10645	C9H13N3O	179.10586	-0.59	-3.30	112.05243	C6H8O2	112.05269				
198.12384	197.11656	C9H15N3O2	197.11643	-0.13	-0.67	94.04186	C6H6O	94.04258				
292.16641									274.15579	18.01	0.06	+H2+O

图 27
裂解奈法唑酮代谢物 14 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

代谢物 14 后续的氧化反应产生了代谢物 15 和 16 两个同分异构体。代谢物 15 和 16 的计算分子量均为 305.1375， 并且具有典型不含氯化合物的同位素分布 (图 28 和第 12 页的图 31)。代谢物 15 在约 7.1 分钟洗脱, m/z 为 306.1459, 分子式为 $C_{15}H_{19}N_3O_4$, 相对质量偏差为 -3.53ppm (图 28 和图 29)。碎片分布匹配 (FPM) 表明这种代谢产物分子是由母体药物在 m/z 274.1557 处的碎片增加两个氧原子形成 (图 30)。MS/MS 谱在 m/z 234.1239 处显示的碎片分子式为 $C_{12}H_{16}N_3O_2$, 相对质量偏差为 -0.68ppm。该碎片与母体药物右侧部分的原子组成相同。中性丢失

的分子式为 $C_3H_4O_2$, 这说明与代谢物 14 (第 10 页图 25) 相比, 代谢物 15 在左侧发生了进一步的氧化形成了羧酸 (图 28 和图 30)。代谢物 15 的推測结构由另一

个碎片离子给出了证据, 该离子的 m/z 为 140.0823, 分子式为 $C_6H_{10}N_3O$ (相对质量偏差为 -3.38ppm), 这与原型药物奈法唑酮 (第 1 页图 1) 的碎片离子相同。

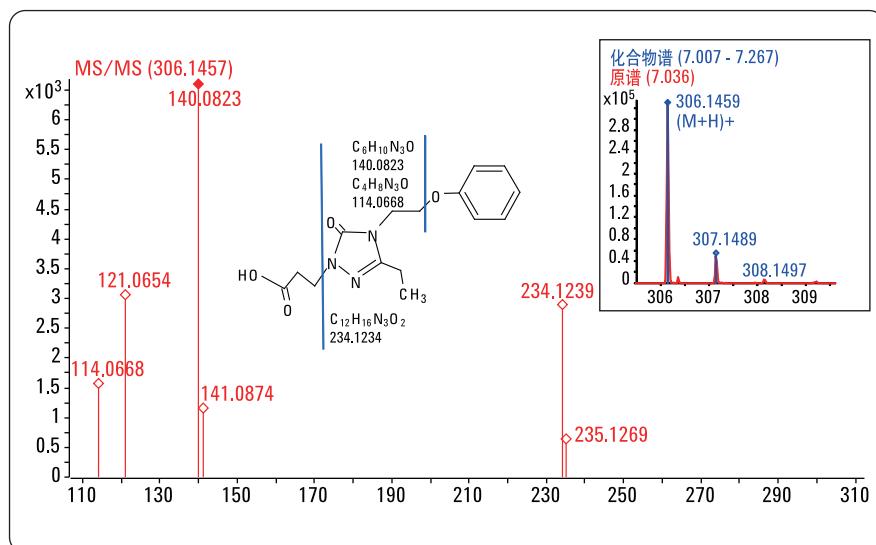


图 28
裂解奈法唑酮代谢物 15 的质谱、同位素分析和二级质谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式	得分
$C_{15}H_{19}N_3O_4$	305.13755	305.13863	-1.07	-3.53	8	306.14591	$(M+H)^+$	$C_{15}H_{20}N_3O_4$	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
306.1459	306.1448	-3.52	100.00	100.00
307.1489	307.1478	-3.51	15.22	17.70
308.1497	308.1486	-3.52	1.70	2.10

图 29
裂解奈法唑酮代谢物 15 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	质量数	分子式	计算质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失	FPM m/z	差异 m/z	Δ 差异 [mDa]	差异分子式
114.06681	113.05953	$C_4H_7N_3O$	113.05891	-0.62	-5.51	192.07864	$C_{11}H_{12}O_3$	192.07890				
121.06542	120.05815	C_8H_8O	120.05751	-0.63	-5.27	185.08004	$C_{7}H_{11}N_3O_3$	185.08028				
140.08231	139.07503	$C_6H_9N_3O$	139.07456	-0.47	-3.38	166.06299	$C_9H_{10}O_3$	166.06340				
234.12386	233.11659	$C_{12}H_{15}N_3O_2$	233.11643	-0.16	-0.68	72.02113	$C_3H_4O_2$	72.02185				
306.14571									274.15579	31.98983	0.09	+02

图 30
裂解奈法唑酮代谢物 15 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

同分异构代谢物 16 约 7.3 分钟洗脱, 分子式相对质量偏差为 1.77ppm (图 31 和图 32)。代谢物 16 的碎片分布匹配 (FPM) 表明此代谢产物分子也是由 m/z 274.1557 处的母体药物碎片增加两个氧原子得到的 (图 33), 但其 MS/MS 谱与代谢物 15 不同, 说明它与代谢物 15 的结构不同。

m/z 212.1039 处, 分子式为 $C_9H_{14}N_3O_3$ 的碎片离子表明分子左侧加入了两个氧原子, 在苯基 (C_6H_6O) 裂解后仍保留在左侧。 m/z 194.0932 处, 分子式为 $C_9H_{12}N_3O_2$ 的碎片离子说明失去了一个水分子。这说明其中的一个氧原子存在于羟基中 (图 31 和图 33)。与代谢产物 15 和奈法唑酮分别在 m/z 140.0823 和 m/z 140.0827 处分子式为 $C_6H_{10}N_3O$ 的碎

片离子 (图 33 和第 2 页的图 3) 相比, m/z 140.0460 处分子式为 $C_5H_6N_3O_2$ (相

对偏差 4.51ppm) 的碎片离子说明代谢产物 16 中发生了氧化成酮的氧化反应。

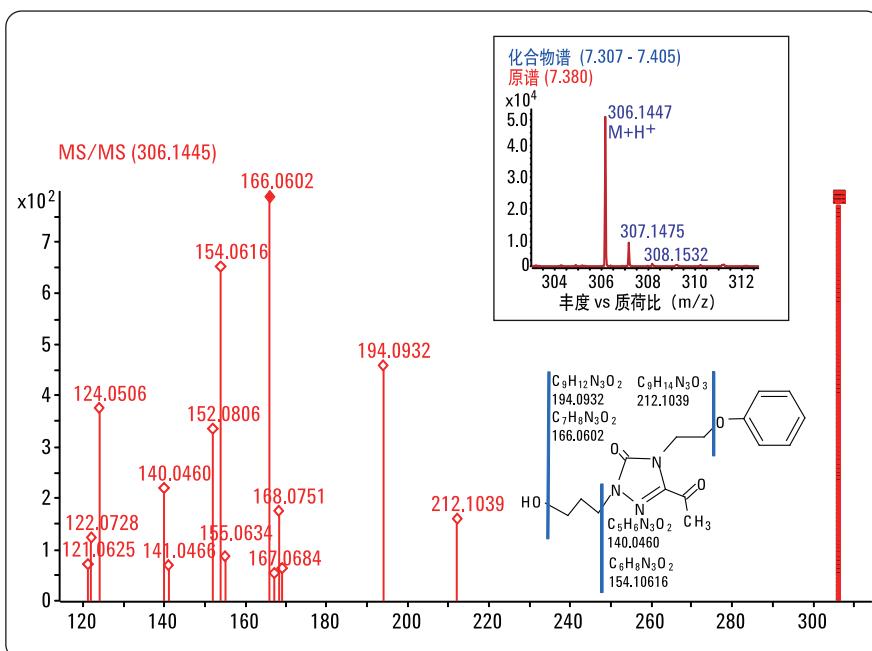


图 31
裂解奈法唑酮代谢物 16 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	DBE	m/z	离子类型	离子分子式	得分
C15H19N3O4	305.13755	305.13701	0.54	1.77	8	306.14429	(M+H)+	C15H20N3O4	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
306.1461	306.1448	-4.10	100.00	100.00
307.1494	307.1478	-5.07	18.16	17.70
308.1523	308.1512	-5.50	2.70	2.25

图 32
裂解奈法唑酮代谢物 16 的计算分子式、质量准确度以及同位素分析。

m/z	质量数	分子式	计算质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 质量数 [ppm]	丢失质量数	丢失分子式	中性丢失	FPM m/z	差异 m/z	Δ 差异 [mDa]	差异分子式
140.04608	139.03880	C5H5N3O2	139.03818	-0.63	-4.51	166.09938	C10H14O2	166.09875				
154.06158	153.05430	C6H7N3O2	153.05383	-0.48	-3.12	152.08373	C9H12O2	152.08289				
166.06021	165.05294	C7H7N3O2	165.05383	0.89	5.40	140.08373	C8H12O2	140.08426				
194.09318	193.08590	C9H11N3O2	193.08513	-0.78	-4.03	112.05243	C6H8O2	112.05129				
212.10394	211.09667	C9H13N3O3	211.09569	-0.98	-4.62	94.04186	C6H6O	94.04053				
306.14447									274.15501	31.99	0.37	+02

图 33
裂解奈法唑酮代谢物 16 碎裂的 MS/MS 碎片离子计算分子式和中性丢失计算分子式。

奈法唑酮的非预期代谢途径

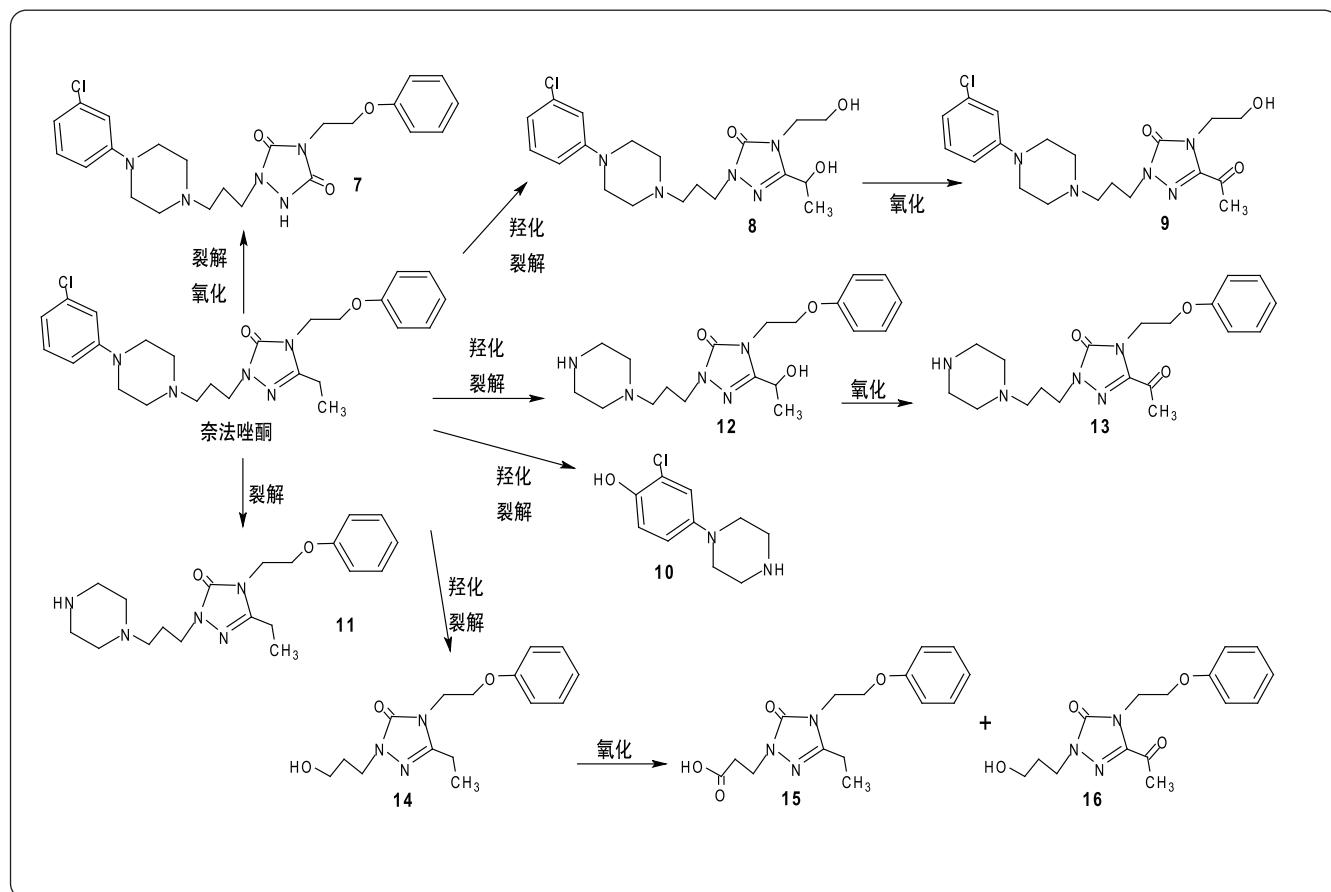
药物奈法唑酮在人体中经历了广泛代谢，不仅产生了典型的预期代谢物，也产生了通过清除原始药物分子带来的非预期代谢物。

本文前面所讨论的鉴定到的代谢物列于图34中，简化了非预期代谢产物的可能代谢途径。

在生成非预期代谢物的代谢反应中，有可能奈法唑酮分子的骨架首先发生了裂解，然后在进一步的代谢反应中发生修饰，也可能第一步生成的预期代谢物发生了裂解

反应。氧化裂解代谢反应可使奈法唑酮分子的噻唑-3-酮部分失去一个乙基，直接生成非预期代谢物 7。单羟基代谢产物 2 失去苯环可形成代谢物 8。分子中乙基上的羟基进一步氧化代谢形成氧代谢物 9。另一种代谢途径可能从羟基代谢物 2 开始，通过消除氯苯基形成代谢物 12。进一步的氧化产生氧代谢物 13。从单羟基代谢物 2 到代谢物 12 的裂解反应同样适合未改变的奈法唑酮，可直接产生裂解的代谢物 11。从单羟基代谢物 1 开始，哌嗪环的裂解形成了羟基氯代谢物 10。该裂解反应也可能产生羟基代谢物 14。非预期代谢产物 14 的进一步氧化代谢反应产生了氧化产物 15。该代谢物是由伯羟基氯化为羧基。

酸得到的，这一步氧化代谢反应也可以生成代谢物 16，该化合物是由于三唑-3-酮的乙基侧链氯化为甲基酮得到的。



34

非预期奈法唑酮代谢产物的可能代谢途径。

结论

本应用简报解释了 MassHunter 代谢产物鉴定 (MetID) 软件鉴定由非预期生物转化产生的代谢物的结果。通过对 QTOF 质谱数据经各种算法 (如同位素分布匹配、MS/MS 碎片分布匹配以及基于精确质量 MS 和 MS/MS 测定的分子式计算) 所获得的信息进行分析，确定了代谢物结构。本应用简报是通过采用 MetID 软件解释代谢物鉴定实验中得到的 QTOF 数据来提高分析效率的一个实例。

参考文献

1. Edgar Naegele, 应用简报“计算机辅助药物代谢物鉴定——第 1 部分：奈法唑酮预期代谢物的鉴定”，出版号 5990-3606CHCN, 2009

www.agilent.com/chem/metid:cn

©安捷伦科技（中国）有限公司, 2009
2009年3月1日, 中国印刷
5990-3607CHCN



Agilent Technologies