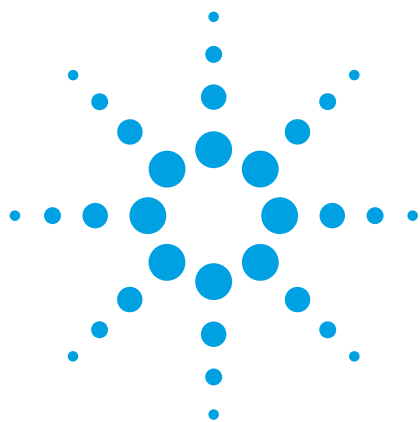




计算机辅助药物代谢物鉴定

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

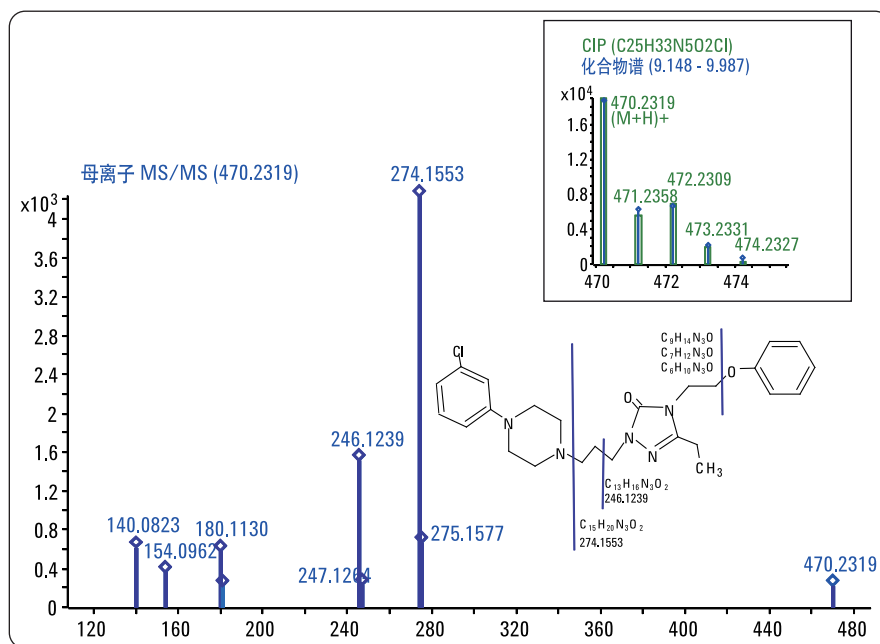
药物发现和药物研发过程中的代谢物鉴定

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



Agilent Technologies

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 插图中的蓝线）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)⁺ (C₂₅H₃₃N₅O₂Cl) 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 C₁₅H₂₀N₃O₂（图 1）。奈法唑酮 (C₂₅H₃₂N₅O₂Cl) 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

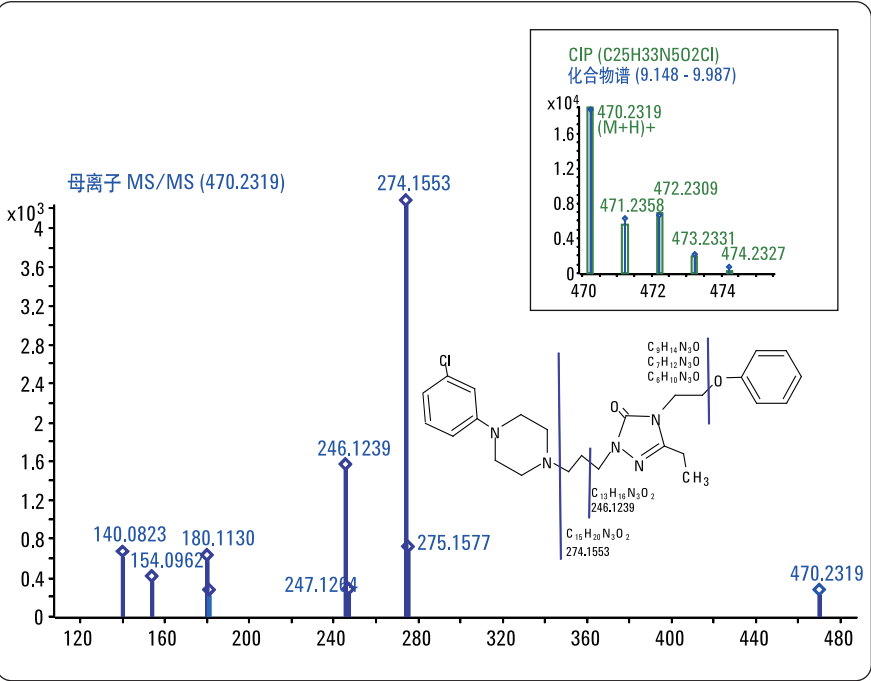


图 1. 奈法唑酮药物的质谱、同位素分析以及碎片离子的 MS/MS 谱归属。

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 ₃₂ N ₅ O ₂ Cl	469.2245	469.2246	-0.16	-0.35	12	470.2319	(M+H) ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₅ O ₂ Cl

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 ₆ H ₉ N ₃ O	139.0746	-0.43	-3.12	330.1499	C ₁₉ H ₂₃ N ₂ OCl	330.1482
154.0962	153.0890	C ₇ H ₁₁ N ₃ O	153.0902	1.25	8.16	316.1342	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ OCl	316.1343
180.1130	179.1058	C ₉ H ₁₃ N ₃ O	179.1059	0.11	0.62	290.1186	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ OCl	290.1175
246.1239	245.1167	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245.1164	-0.23	-0.94	224.1080	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ Cl	224.1066
274.1553	273.1481	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₂	273.1477	-0.34	-1.26	196.0767	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ Cl	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合物 (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。

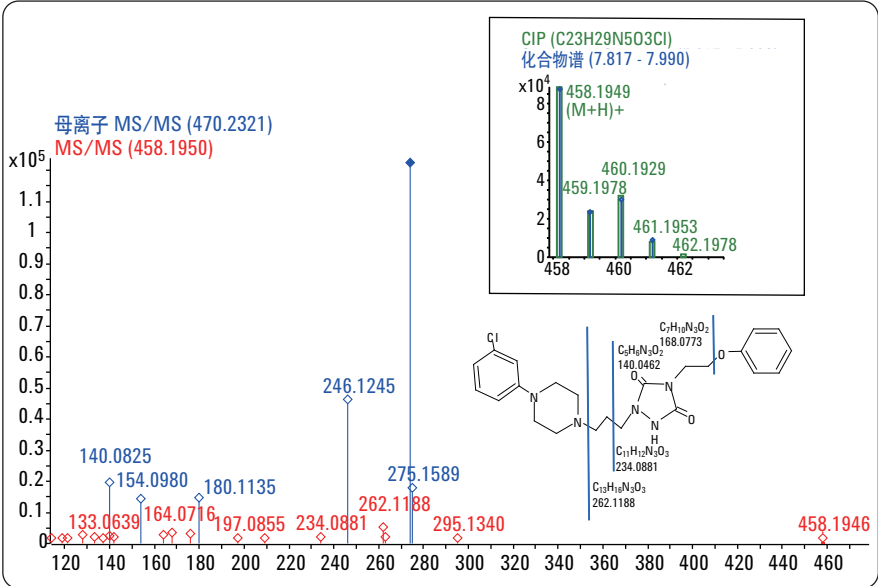


图 4
奈法唑酮代谢物 7 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	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 ₂₃ H ₂₈ N ₅ O ₃ Cl	457.18806	457.18759	0.47	1.03	12	458.19486	(M+H) ⁺	C ₂₃ H ₂₉ N ₅ O ₃ Cl	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 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	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
121.06431	120.05703	C ₈ H ₈ O	120.05751	0.48	4.02	337.13055	C ₁₅ H ₂₀ N ₅ O ₂ Cl	337.13065				
140.04622	139.03894	C ₅ H ₅ N ₃ O ₂	139.03818	-0.76	-5.49	318.14989	C ₁₈ H ₂₃ N ₂ OCl	318.14874				
168.07774	167.07047	C ₇ H ₁₀ N ₂ O	167.06951	-0.99	-5.93	290.11866	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ OCl	290.11722	180.11347	-12.0364	0.66	-C ₂ -H ₄ +O
234.08810	233.08082	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₃	233.08004	-0.78	-3.36	224.10803	C ₁₂ H ₁₇ N ₂ Cl	224.10686	246.12446	-12.0364	0.02	-C ₂ -H ₄ +O
262.11883	261.11156	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃	261.11134	-0.22	-0.82	196.07673	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ Cl	196.07613	274.15579	-12.0364	0.57	-C ₂ -H ₄ +O
458.19464									470.23212	-12.0364	1.10	-C ₂ -H ₄ +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。

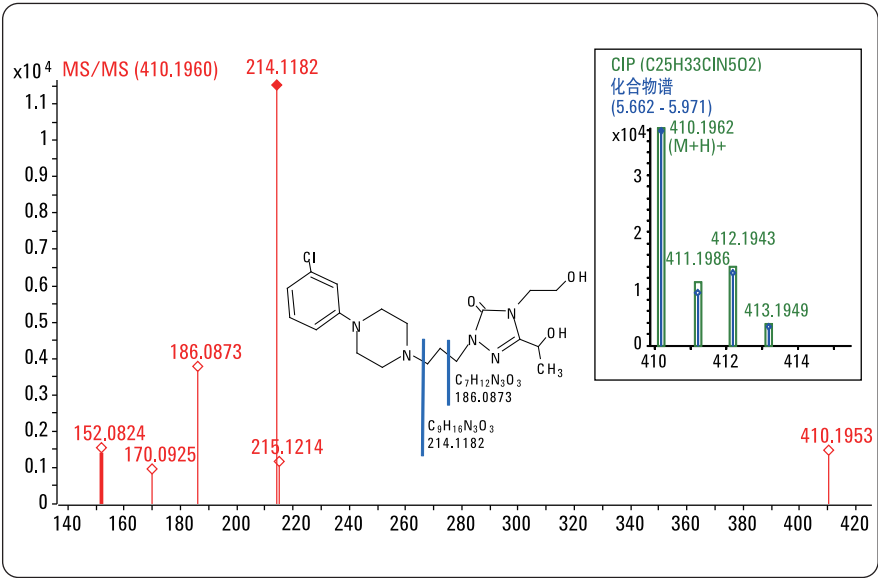


图 7 裂解奈法唑酮代谢物 8 的质谱、同位素分析和 MS/MS 碎片离子归属。

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
C19H28ClN5O3	409.1881	409.1889	-0.84	-2.06	8	410.1962	(M+H)+	C19H29ClN5O3

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	C7H10N3O	152.08184	-0.58	-3.84	258.11351	C12H19ClN2O2	258.11353				
170.09245	C7H12N3O2	170.09240	-0.05	-0.29	240.10294	C12H17ClN2O	240.10350				
186.08729	C7H12N3O3	186.08732	0.03	0.17	224.10803	C12H17ClN2	224.10867				
214.11823	C9H16N3O3	214.11862	0.39	1.82	196.07673	C10H13ClN2	196.07772	180.11243	34.0055	0.32	+H2+O2

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。

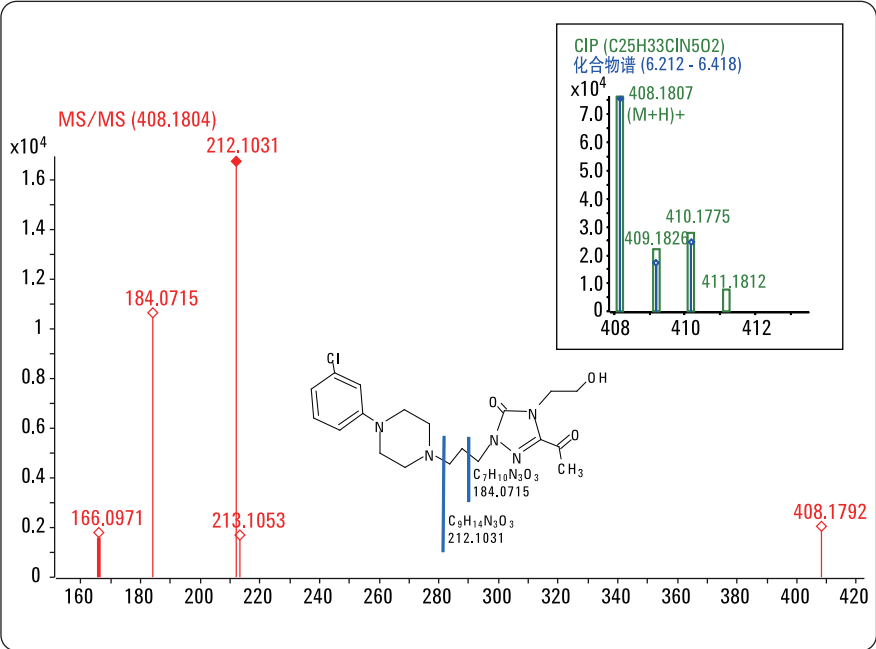


图 10
裂解奈法唑酮代谢物 9 的质谱、同位素分析和 MS/MS 碎片离子归属。

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
C19H26ClN5O3	407.1724	407.1734	-0.99	-2.43	9	408.1807	(M+H)+	C19H27ClN5O3

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	C8H12N3O	166.09749	0.42	2.54	242.08221	C11H15ClN2O2	242.08330
184.07152	C7H10N3O3	184.07167	0.15	0.82	224.10803	C12H17ClN2	224.10885
212.10308	C9H14N3O3	212.10297	-0.11	-0.51	196.07673	C10H13ClN2	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)。

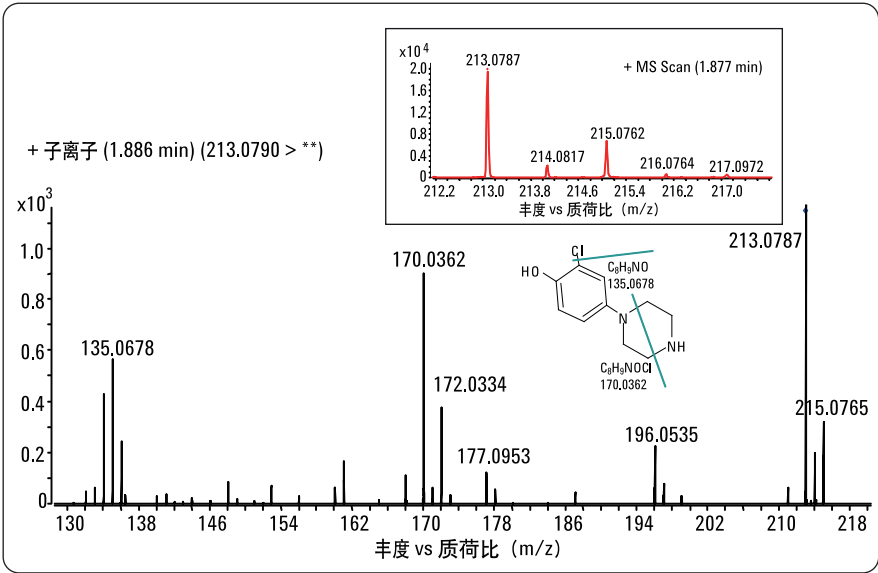


图 13
裂解奈法唑酮代谢物 10 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

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
C10H13N2OCl	212.0716	212.0714	0.22	1.02	5	213.0787	(M+H)+	C10H14N2OCl

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）。代谢消除是第一步，后续还有进一步氧化反应。代谢物 12 是代谢物 11 的羟基化反应产物。

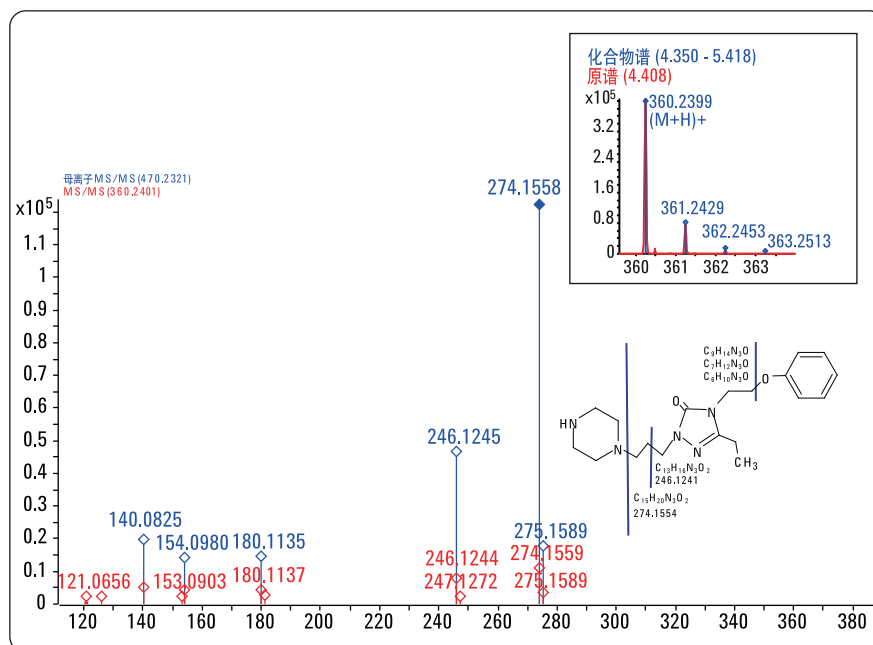


图 16
裂解奈法唑酮代谢物 11 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

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
C19H29N5O2	359.2321	359.2326	-0.48	-1.35	8	360.2398	(M+H) ⁺	C19H30N5O2	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
121.0658	120.05830	C8H8O	120.05751	-0.79	-6.54	239.17461	C11H21N5O	239.17453
140.08238	139.07511	C6H9N3O	139.07456	-0.54	-3.91	220.15756	C13H20N2O	220.15772
154.09782	153.09054	C7H11N3O	153.09021	-0.33	-2.16	206.14191	C12H18N2O	206.14229
180.11374	179.10646	C9H13N3O	179.10586	-0.60	-3.35	180.12626	C10H16N2O	180.12637
246.12437	245.11709	C13H15N3O2	245.11643	-0.66	-2.70	114.11570	C6H14N2	114.11574
274.15588	273.14860	C15H19N3O2	273.14773	-0.88	-3.21	86.08440	C4H10N2	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 (相对质量偏差为 -3.91ppm, 图 21) 的代谢物 11 的 MS/MS 碎片离子氧化来的。

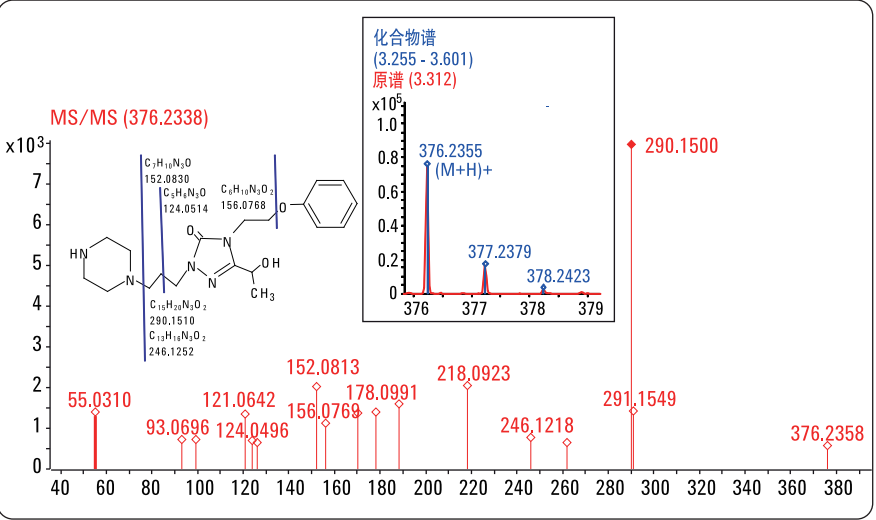


图 19 裂解奈法唑酮代谢物 12 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

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。

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
121.06419	120.05691	C8H8O	120.05751	0.61	5.04	255.16963	C11H21N5O2	255.16952				
124.04965	123.04237	C5H5N3O	123.04326	0.89	7.24	252.18417	C14H24N2O2	252.18378				
126.06591	125.05864	C5H7N3O	125.05891	0.27	2.19	250.16790	C14H22N2O2	250.16813				
152.08126	151.07398	C7H9N3O	151.07456	0.58	3.85	224.15256	C12H20N2O2	224.15248				
156.07686	155.06958	C6H9N3O2	155.06948	-0.11	-0.69	220.15696	C13H20N2O	220.15756				
170.09180	169.08452	C7H11N3O2	169.08513	0.60	3.57	206.14202	C12H18N2O	206.14191				
178.09908	177.09181	C9H11N3O	177.09021	-1.59	-9.00	198.13474	C10H18N2O2	198.13683				
188.10734	187.10007	C12H13NO	187.09971	-0.35	-1.89	188.12647	C7H16N4O2	188.12733				
218.09232	217.08505	C11H11N3O2	217.08513	0.08	0.38	158.14150	C8H18N2O	158.14191				
246.12179	245.11451	C13H15N3O2	245.11643	1.92	7.82	130.11203	C6H14N2O	130.11061				
262.11900	261.11173	C13H15N3O3	261.11134	-0.39	-1.48	114.11481	C6H14N2	114.11570				
290.14997	289.14270	C15H19N3O3	289.14264	-0.05	-0.19	86.08385	C4H10N2	86.08440	274.1553	15.9949	0.29+0	
376.23579												

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)。

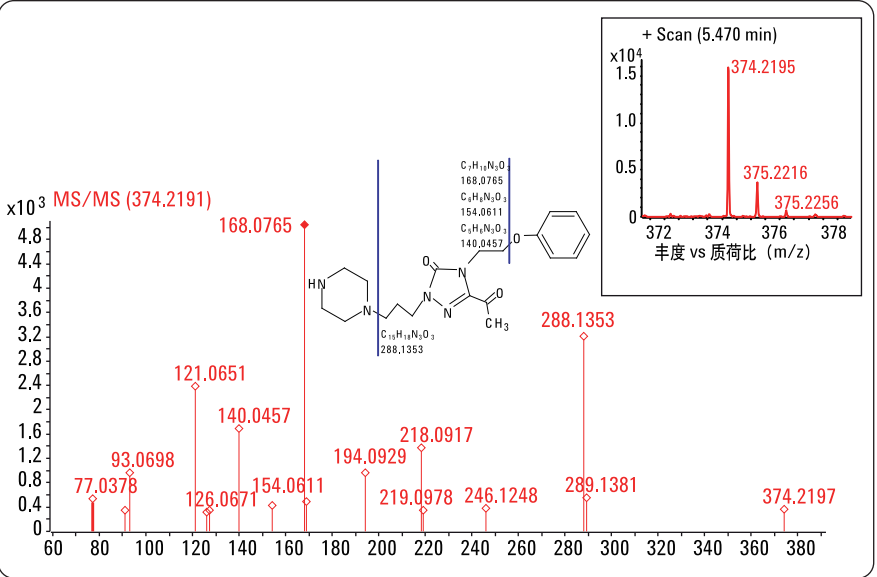


图 22
裂解奈法唑酮代谢物 13 的质谱、同位素分析和 MS/MS 碎片离子归属。

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
C19H27N5O3	373.2114	373.2123	-0.86	-2.31	9	374.2195	(M+H)+	C19H28N5O3

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	C8H8O	120.05751	-0.27	-2.27	253.15402	C11H19N5O2	253.15387				
126.06707	125.05980	C5H7N3O	125.05891	-0.89	-7.08	248.15201	C14H20N2O2	248.15248				
127.12332	126.11604	C7H14N2	126.11570	-0.34	-2.70	247.09577	C12H13N3O3	247.09569				
140.04573	139.03845	C5H5N3O2	139.03818	-0.27	-1.97	234.17336	C14H22N2O	234.17321				
154.06109	153.05381	C6H7N3O2	153.05383	0.01	0.10	220.15800	C13H20N2O	220.15756				
168.07646	167.06918	C7H9N3O2	167.06948	0.30	1.78	206.14263	C12H18N2O	206.14191				
194.09287	193.08559	C9H11N3O2	193.08513	-0.47	-2.42	180.12622	C10H16N2O	180.12626				
218.09172	217.08444	C11H11N3O2	217.08513	0.68	3.14	156.12737	C8H16N2O	156.12626				
246.12485	245.11757	C13H15N3O2	245.11643	-1.14	-4.67	128.09424	C6H12N2O	128.09496				
288.13525	287.12798	C15H17N3O3	287.12699	-0.99	-3.43	86.08383	C4H10N2	86.08440	274.1553	13.9793	0.64	-H2+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 $-C_4H_8N_2+O$ ，为失去嘧啶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）。

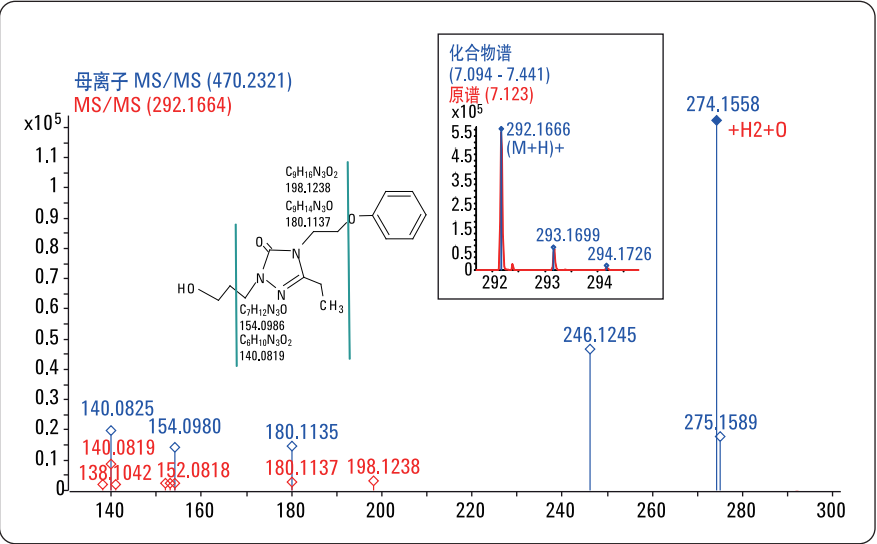


图 25
裂解奈法唑酮代谢物 14 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

公式	计算质量数	质量数	Δ 质量数 [mDa]	Δ 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				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
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	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
140.08191	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 的推测结构由另一

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。

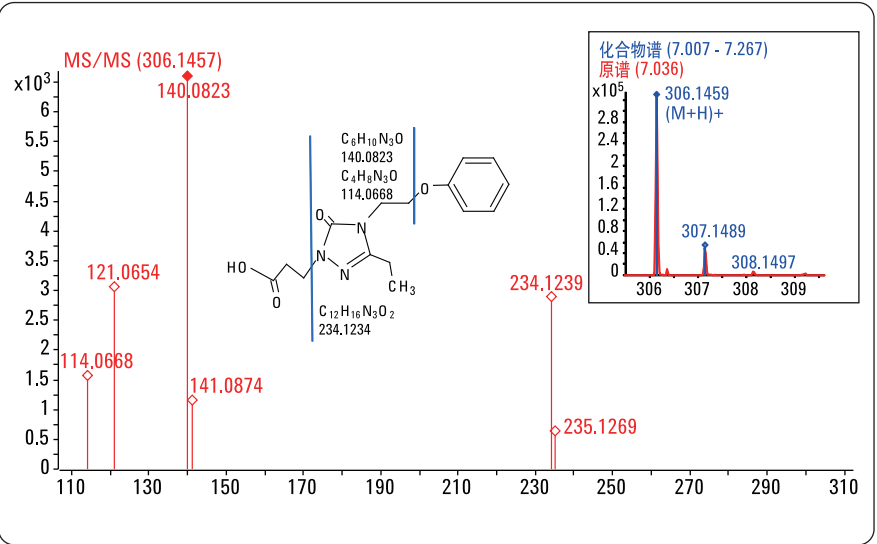


图 28
裂解奈法唑酮代谢物 15 的质谱、同位素分析和二级质谱碎片离子归属。

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
C15H19N3O4	305.13755	305.13863	-1.07	-3.53	8	306.14591	(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 %
306.1459	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	C4H7N3O	113.05891	-0.62	-5.51	192.07864	C11H12O3	192.07890				
121.06542	120.05815	C8H8O	120.05751	-0.63	-5.27	185.08004	C7H11N3O3	185.08028				
140.08231	139.07503	C6H9N3O	139.07456	-0.47	-3.38	166.06299	C9H10O3	166.06340				
234.12386	233.11659	C12H15N3O2	233.11643	-0.16	-0.68	72.02113	C3H4O2	72.02185				
306.14571									274.15579	31.98983	0.09	+O2

图 30
裂解奈法唑酮代谢物 15 碎片的 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，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。

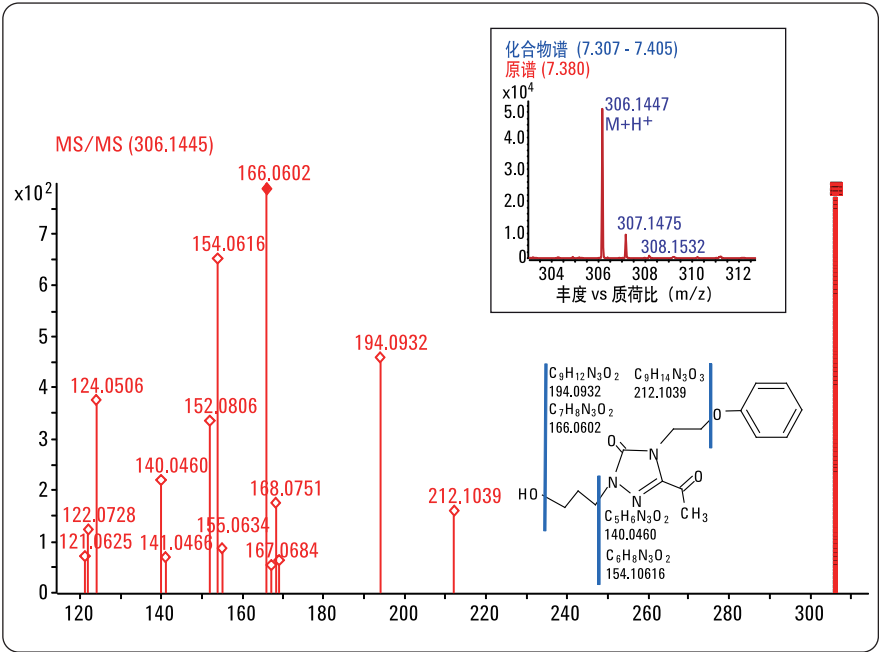


图 31
裂解奈法唑酮代谢物 16 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子归属。

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氧化为羧

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-酮的乙基侧链氧化为甲基酮得到的。

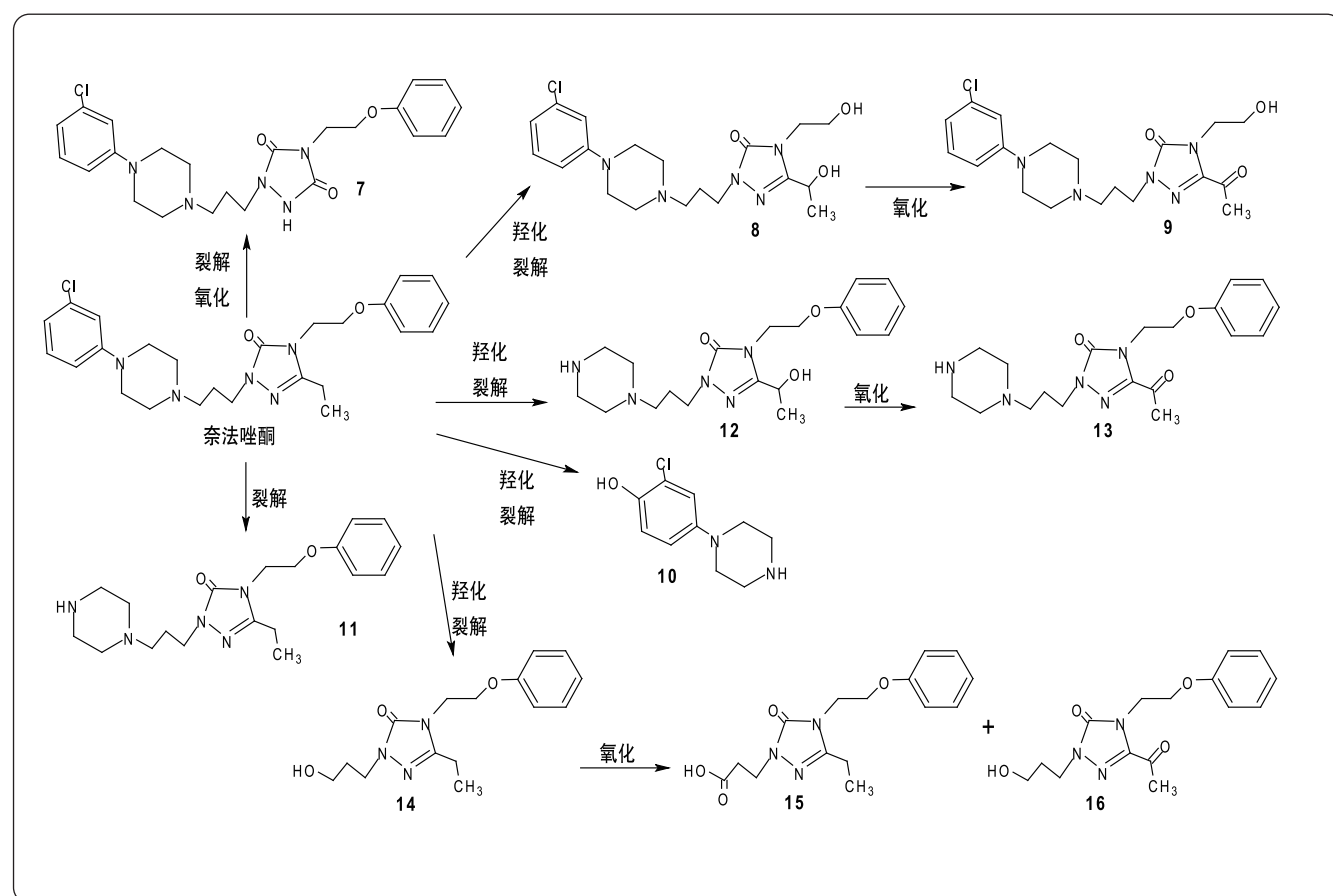


图 34
非预期奈法唑酮代谢产物的可能代谢途径。

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