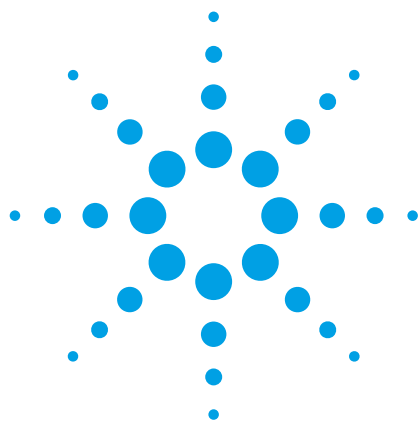




计算机辅助复杂药物及其代谢物的结构解析

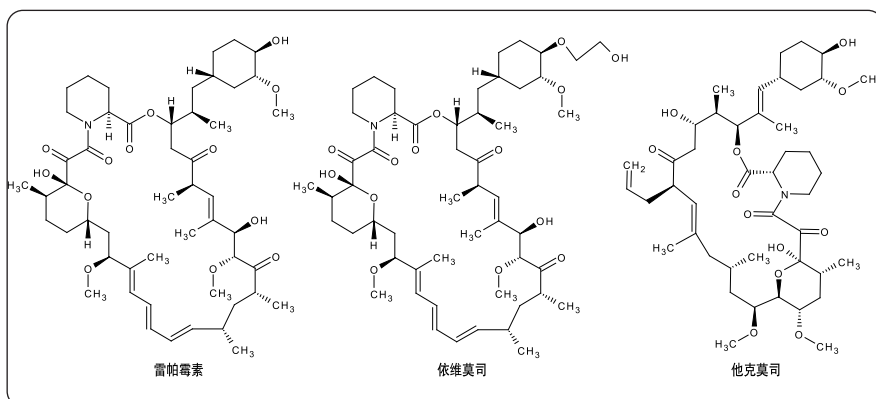
采用代谢物鉴定软件根据 Q-TOF MS 和 MS/MS 数据进行代谢物结构解析

应用简报

作者

Uwe Christians, Rene Kupfer
bioNovo, 12635 East Montview Blvd.,
Aurora, Colorado, CO, USA.

Edgar Naegele
安捷伦科技
德国 Waldbronn



摘要

本应用简报介绍了：

- 将 Agilent 1200 系列快速分离 LC 系统与 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF 联用进行药物代谢实验中的数据采集
- 利用代谢物鉴定软件进行复杂药物分子代谢物的鉴定
- 利用代谢物鉴定软件中提供的工具进行复杂代谢物分子的结构解析



Agilent Technologies

引言

免疫抑制类药物包含类似雷帕霉素（西罗莫司）、依维莫司和他克莫司（图 1）等具有高度复杂结构的大环化合物。确定它们的代谢物并分析其毒理学安全性对于这些药物的使用是至关重要的。对于主要体外代谢产物的快速鉴定，ESI LC/MS 与 MS/MS 联用是首选的工具。这一点已经通过雷帕霉素的羟基化和去甲基化代谢产物的鉴定得到了证明¹。更多有关该化合物的代谢研究揭示了来自水解开环反应² 和环氧化反应³ 的代谢产物。此外，在一项对比代谢研究中还描述了不同生物体内的代谢⁴。

鉴定出代谢产物后的下一步是解析其结构。串联质谱法可通过 MS/MS 实验鉴别分子结构的不同部分。采用 Q-TOF 质谱仪进行 MS 和 MS/MS 精确质量数测定，意味着可以计算得到 MS/MS 碎片的分子式以支持结构解析⁵。

本应用简报介绍了依据来自体外代谢实验的精确质量数 Q-TOF 数据，通过 MetID 软件辅助鉴定雷帕霉素的代谢物。采用 MetID 软件依据精确的 MS 和 MS/MS 数据计算出了离子碎片的化学式及生物转化修饰的信息，以用于结构解析。

实验部分

- Agilent 1200 系列快速高分离度液相色谱系统，配有 Agilent 1200 系列二元泵 SL 和 Agilent 1200 系列脱气机；带控温系统的 Agilent 1200 系列高性能自动进样器 SL (ALS SL)；Agilent 1200 系列柱温箱 (TCC)
- Agilent 6520 精确质量 QTOF 质谱仪
- 色谱柱：采用 Zorbax SB-C18 柱，2.1 x 150mm，1.8μm 粒径

样品制备

储备液：

磷酸盐缓冲液： 100 mM，pH 7.4；
5 mM MgCl₂

雷帕霉素： 1 mg/mL 的磷酸盐
缓冲液溶液

NADPH 溶液： 10 mg/mL 的磷酸盐
缓冲液溶液

大鼠肝微粒

体制备液： 20 mg 蛋白/mL

代谢物样品：

在 1.5 mL 离心管中加入 180 μL 磷酸盐缓冲液和 25 μL 雷帕霉素溶液。加入 15 μL 的肝微粒体制备液和 30 μL 的 NADPH 溶液。涡旋并在 37 °C 下孵育 1 小时。加 750 μL 冰乙腈终止反应，14000 rpm 离心 15 分钟。将上清液移入一个新的 1.5 mL 离心管，在 speedvac 真空离心浓缩仪中蒸干。将固体物质用 250 μL HPLC 流动相 A 复溶。

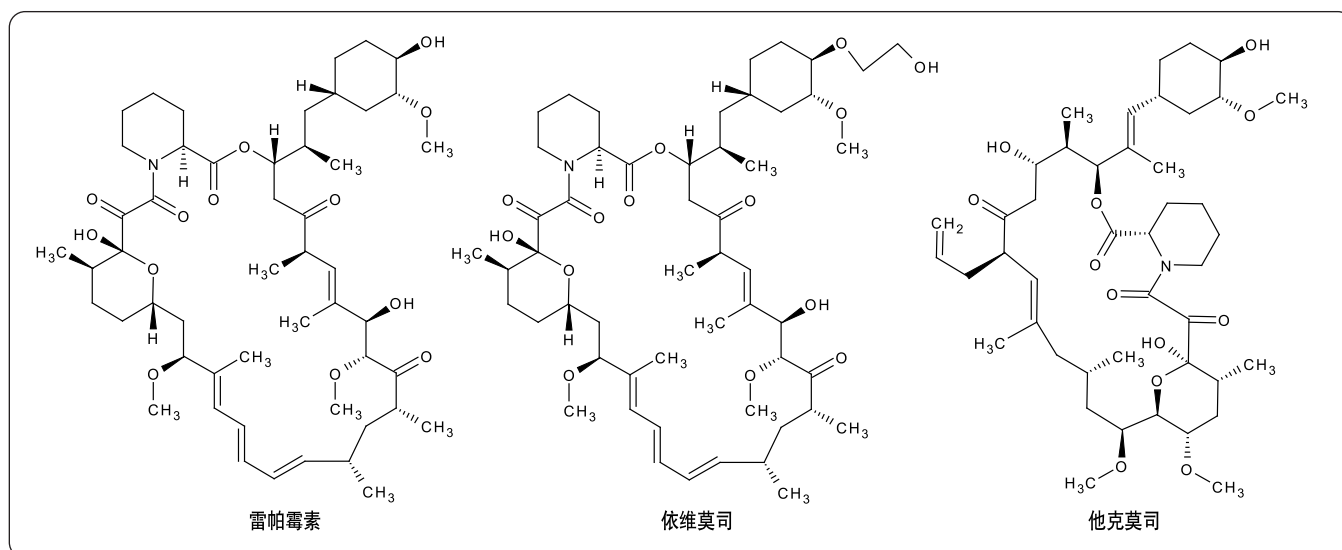


图 1
大环类免疫抑制剂雷帕霉素（西罗莫司）、依维莫司和他克莫司的结构。

对照样品

在 1.5 mL 离心管中加入 210 μ L 磷酸盐缓冲液和 25 μ L 雷帕霉素溶液。加入 15 μ L 的肝微粒体制备液。涡旋并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。加 750 μ L 冰乙腈终止反应，14000 rpm 离心 15 分钟。将上清液移入一个新的 1.5 mL 离心管，在 speedvac 真空离心浓缩仪中蒸干。将固体物质用 250 μ L HPLC 流动相 A 复溶。

实验方法：

高分离度快速液相色谱法

Agilent 1200 系列二元泵 SL 的运行条件：

溶剂 A： 水+ 0.1 % (v/v) 甲酸，

溶剂 B： 乙腈 + 0.1 % (v/v) 甲酸

流速： 0.5 mL/min

梯度： 0 min 5 % B，

0.5 min 5 % B，

20 min 95 % B，

22 min 95 % B

停止时间： 22 分钟

后运行时间： 10 分钟

使用 Agilent 1200 系列自动进样器 SL 进样 10 μ L。针头用 50% 的甲醇洗针 5 秒，样品冷却到 4 $^{\circ}$ C。柱温箱为 60 $^{\circ}$ C。

QTOF MS 和 MS/MS 方法

Agilent 6520 精确质量 QTOF 采用 2GHz 扩展动态范围模式，采集参数如下：

离子源： 带参比离子

(m/z 121.05087 和

m/z 922.00979) 溶液双喷

雾的正离子模式 ESI 源

干燥气流量： 10.0 L/min

干燥气温度： 300 $^{\circ}$ C

雾化器： 45 psi

扫描范围： 100-1000

碎裂电压： 200 V

锥孔电压： 60 V

毛细管电压： 3500 V

碰撞能： 50 V

数据依赖 MS/MS： 2 化合物，3 MS/MS 光谱，排除 0.1 分钟

MetID 软件中的数据分析方法

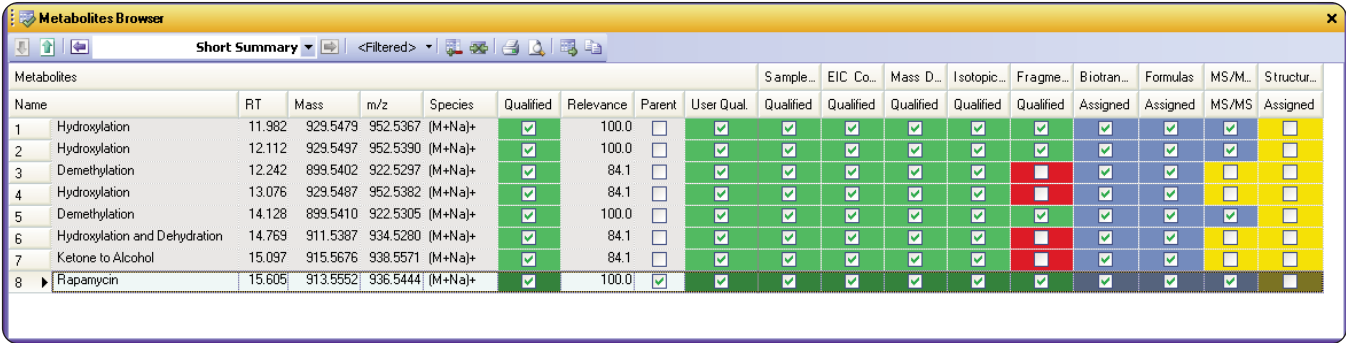
数据分析的第一步为含代谢物（代谢物样品）的 MS 谱图和仅含母体药物（对照样品）的 MS 谱图的比较。利用分子特征提取（MFE）算法从质谱级数据中提取出所有检测到的质量数信号。然后将相关的化合物同位素质量数和加合物质量数归类成一个个的分子特征，并去除化学背景噪音。

接下来将代谢物样品的化合物列表与对照

样品的化合物列表进行比较。将代谢物样品中新出现的或响应增加了至少两倍的化合物视作可能的代谢物，并由用户指定以不同算法对它们进行进一步分析。这些算法既可以鉴定和确认新化合物，也可以仅确认其他算法发现的代谢物。最后对所有代谢物鉴定算法的结果加权，并综合所有结果确定最终的鉴定相关性得分。当代代谢物的最终得分高于一个事先定义的相关性阈值时，该代谢物将被确认。所有算法的结果可总结在一个结果表里，便于快速查阅⁶。

结果与讨论

雷帕霉素体外代谢实验的 Q-TOF 数据经 MetID 软件处理并结合软件中各种算法的结果，共鉴定出了 7 个代谢产物（图 2）。典型的代谢物均来自羟基化和去甲基化反应，所有化合物的典型载荷子为钠原子。最终，代谢物的结构解析完成后便开始进行代谢物的鉴定工作。该工作是由 MetID 软件采用碎片离子图谱匹配算法辅助完成的。该结果可直接用于结构解析。



Name	RT	Mass	m/z	Species	Qualified	Relevance	Parent	User Qual.	Qualified	Qualified	Qualified	Qualified	Qualified	Assigned	Assigned	MS/MS	Assigned
1 Hydroxylation	11.982	929.5479	952.5367	(M+Na)+	✓	100.0	□	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2 Hydroxylation	12.112	929.5497	952.5390	(M+Na)+	✓	100.0	□	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3 Demethylation	12.242	899.5402	922.5297	(M+Na)+	✓	84.1	□	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4 Hydroxylation	13.076	929.5487	952.5382	(M+Na)+	✓	84.1	□	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5 Demethylation	14.128	899.5410	922.5305	(M+Na)+	✓	100.0	□	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6 Hydroxylation and Dehydration	14.769	911.5387	934.5280	(M+Na)+	✓	84.1	□	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7 Ketone to Alcohol	15.097	915.5676	938.5571	(M+Na)+	✓	84.1	□	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8 Rapamycin	15.605	913.5552	936.5444	(M+Na)+	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

图 2

雷帕霉素代谢物的鉴定结果表。代谢物的鉴定中采用了以下算法：样品-对照组比较、质量亏损过滤、同位素分布匹配和碎片离子图谱匹配。绿和红两种颜色分别表示阳性和阴性鉴定结果，并在总体鉴定得分中得以体现。

根据对应加钠峰 m/z 936.5430，可以在质谱图中提取出 15.60 分钟洗脱的母体化合物雷帕霉素 **1** 的峰（图3）。根据该加钠化合物离子的化学式 $C_{51}H_{79}NNaO_{13}$ ，可计算得到 m/z 913.5538 处的分子式为 $C_{51}H_{79}NO_{13}$ （相对质量偏差为 1.44 ppm）。该计算中不仅考虑了准确质量数，还将完整的同位素分布同计算的分布进行了匹配。（表 1）。

为进行代谢产物的详细结构解析，比较了母体药物雷帕霉素和代谢物的 MS/MS 谱。出于此目的，采集了雷帕霉素 **1** 的 MS/MS 谱（图 4）。在该 MS/MS 谱上可以看到母体药物雷帕霉素 **1** 丰富的碎片离子，分布在整个质量范围。所有的碎片

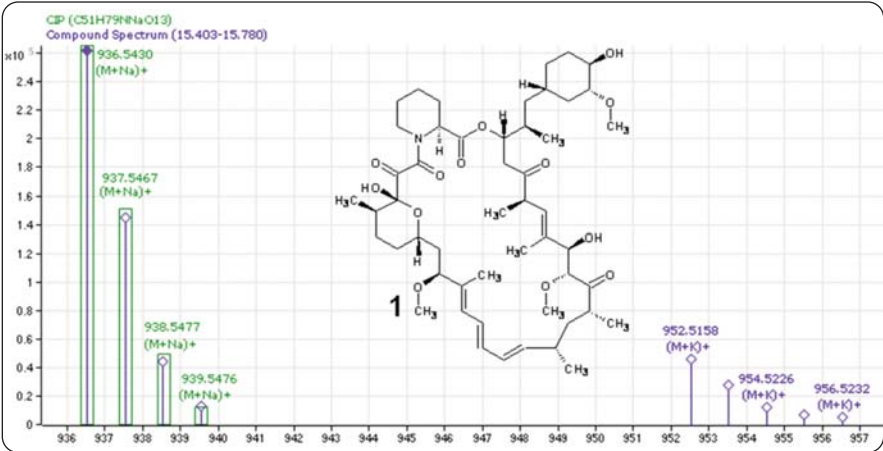


图 3 雷帕霉素 **1** 的质谱、加钠峰和加钾峰的同位素分布。加钠峰的计算同位素分布（CIP）为绿色，化合物谱为蓝色（计算分子式和质量精度列于表 1 中）。

离子均测定了准确质量数，可计算得到相应的分子式（表 2）。每个雷帕霉素 **1** 的碎片离子均有一个钠原子作为载荷子。如果计算得到的碎片分子式不止一种，则选择同母体药物的中性丢失基团匹配的分子式。通过计算出的分子式和母体药物的已

分子式 (M)	计算质量数	△ 质量数 [mDa]	△ 质量数 [ppm]	DBE
C51H79NO13	913.55514	1.31	1.44	13

碎片分子式	m/z	碎片	质量数
C51H79NNaO13	936.5430	(M+Na)+	913.5538

丰度	计算丰度 %	m/z	计算 m/z	△ 质量数 [mDa]	△ 质量数 [ppm]
100.00	100.00	936.5430	936.54440	1.31	1.40
53.19	56.93	937.5467	937.54770	1.04	1.11
15.35	18.58	938.5477	938.55070	3.03	3.23
3.67	4.43	939.5476	939.55360	6.03	6.42

表 1 雷帕霉素 **1** 的质谱图、同位素分布、计算分子式和质量精度。

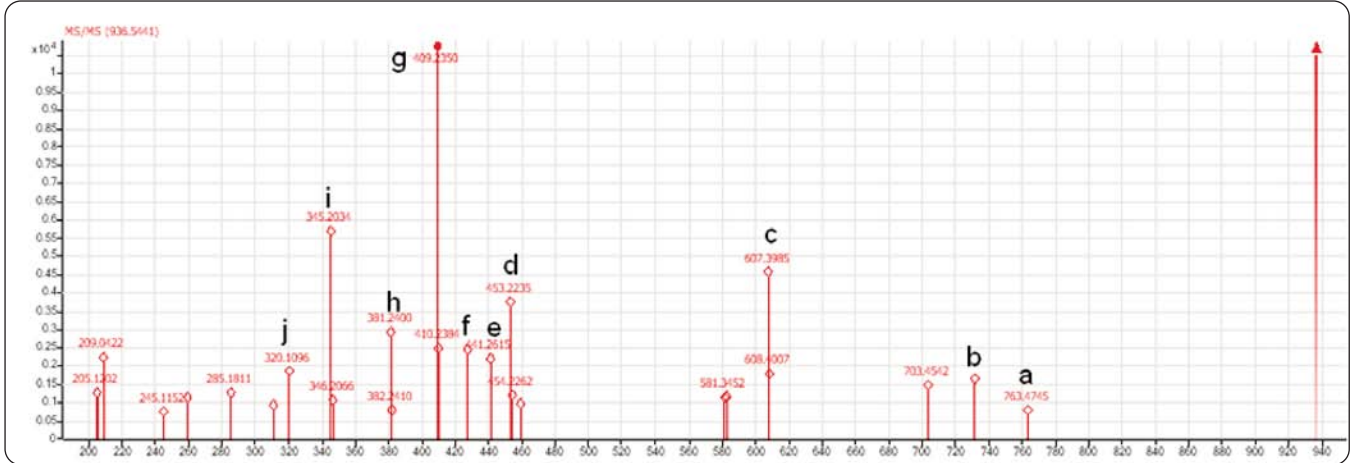


图 4 雷帕霉素 **1** 的 MS/MS 谱（计算出的碎片分子式列于表 2，相应的碎片结构如图 5 所示）。

碎片离子	m/z	碎片分子式	计算 m/z	△ 质量数 [mDa]	△ 质量数 [ppm]	中性丢失基团	丢失基团分子式	丢失基团质量数
a	763.47452	C ₄₄ H ₆₈ NaO ₉	763.47555	1.03	1.35	173.06961	C ₇ H ₁₁ N ₄ O	173.06881
b	731.44881	C ₄₃ H ₆₄ NaO ₈	731.44934	0.53	0.73	205.09533	C ₈ H ₁₅ N ₅ O	205.09502
c	607.39851	C ₃₆ H ₅₆ NaO ₆	607.39691	-1.60	-2.64	329.14562	C ₁₅ H ₂₃ N ₇ O	329.14745
d	453.22349	C ₂₅ H ₃₄ NaO ₆	453.22476	1.27	2.81	483.32065	C ₂₆ H ₄₅ N ₇ O	483.31960
e	441.26150	C ₂₅ H ₃₈ NaO ₅	441.26115	-0.35	-0.79	495.28264	C ₂₆ H ₄₁ N ₈ O	495.28322
f	427.24640	C ₂₄ H ₃₆ NaO ₅	427.24550	-0.91	-2.12	509.29770	C ₂₇ H ₄₃ N ₈ O	509.29890
g	409.23501	C ₂₄ H ₃₄ NaO ₄	409.23493	-0.08	-0.19	527.30913	C ₂₇ H ₄₅ N ₉ O	527.30943
h	381.24004	C ₂₃ H ₃₄ NaO ₃	381.24002	-0.02	-0.06	555.30410	C ₂₈ H ₄₅ N ₁₀ O	555.30435
i	345.20344	C ₁₉ H ₃₀ NaO ₄	345.20363	0.19	0.56	591.34070	C ₃₂ H ₄₉ N ₉ O	591.34073
j	320.10961	C ₁₄ H ₁₉ NNaO ₆	320.11046	0.85	2.66	616.43453	C ₃₇ H ₆₀ O ₇	616.43390

表 2

雷帕霉素 1 的 MS/MS 碎片离子、碎片质量数、碎片分子式、计算出的质量精度和中性丢失基团。

知结构，碎片 a - j 在 MS/MS 碎片分布中都得到了匹配（图 5）。

下面将以 11.98 分钟洗脱的羟基化代谢物 2 为例进行详细介绍。提取的质谱峰显示带

钠的离子 C₅₁H₇₉NNaO₁₄ 对应 m/z 952.5387（图 6）。

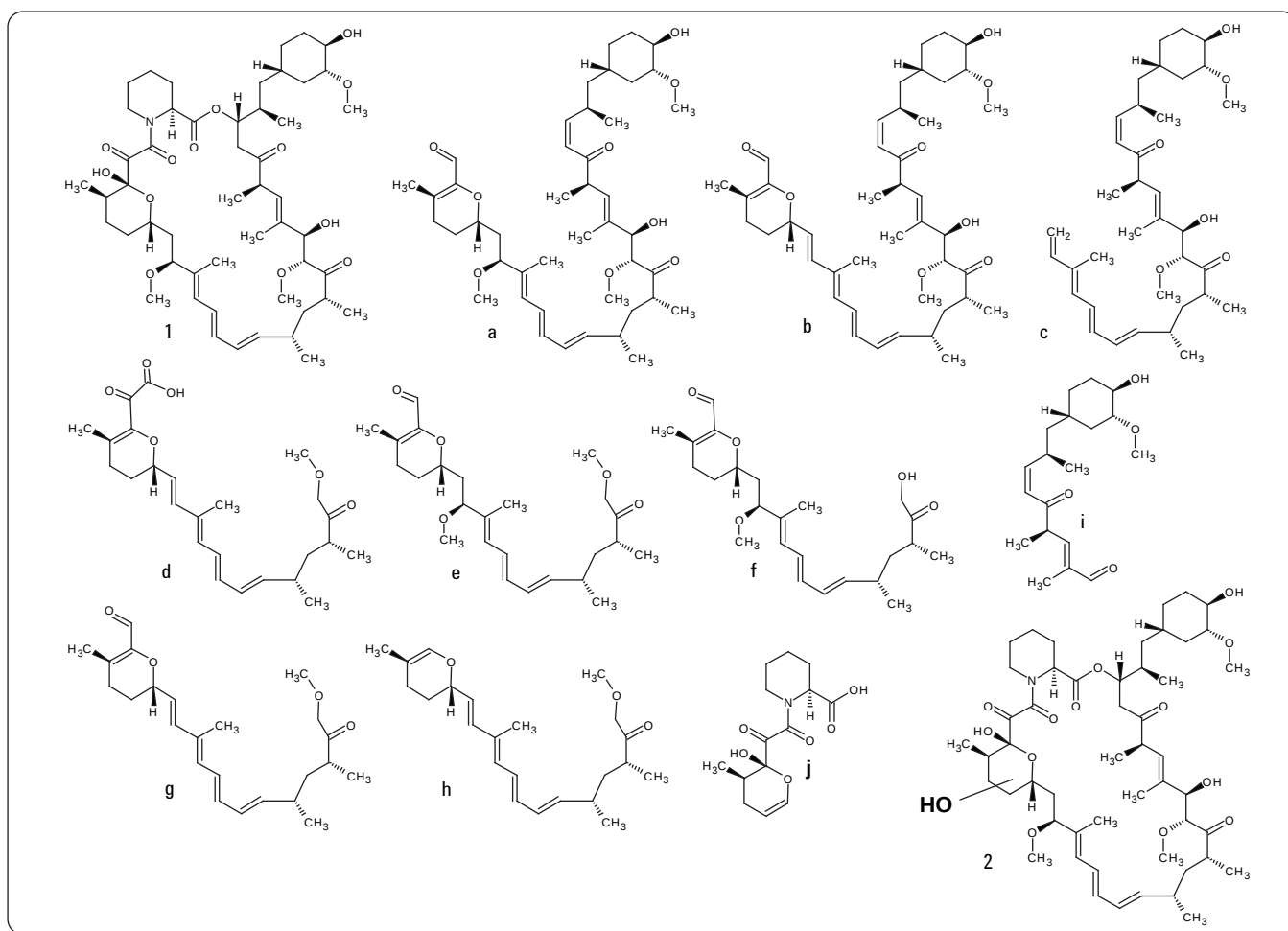


图 5

雷帕霉素 1、其鉴定出的 MS/MS 碎片 a - j 及其羟基化代谢物 2 的结构式。

分子式 (M)	计算质量数	△ 质量数 [mDa]	△ 质量数 [ppm]	DBE
C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₄	929.55010	0.57	0.61	13

碎片分子式	m/z	碎片	质量数
C ₅₁ H ₇₉ NNaO ₁₄	952.5387	(M+Na)+	929.5495

丰度	计算丰度 %	m/z	计算 m/z	△ 质量数 [mDa]	△ 质量数 [ppm]
100.00	100.00	952.5387	952.5393	0.57	0.60
49.41	56.97	953.5418	953.5426	0.84	0.88
21.03	18.80	954.5418	954.5456	3.83	4.01
6.10	4.55	955.5406	955.5485	7.93	8.30
2.40	0.89	956.5441	956.5513	7.19	7.52

表 3

羟基化雷帕霉素 2 的质谱图、同位素分布、计算分子式和质量精度。

可计算得到 m/z 929.5495 对应的分子式为 $C_{51}H_{79}NO_{14}$ ，相对质量偏差为 0.61 ppm (表 3)。羟基化代谢物 2 的 MS/MS 谱中的碎片离子也很丰富，非常有助于该代谢化合物的结构解析 (图 7A)。为进行羟基化代谢物 2 的结构解析，通过已实现的算法将该化合物的 MS/MS 谱与雷帕霉素 1 的 MS/MS 谱进行比较

(图 7B)。通过这种比较不仅可检测到重叠的峰，还可观察到在原来的雷帕霉素 MS/MS 碎片与羟基化代谢物的 MS/MS 碎片之间由于生物转化发生漂移的碎片。这些碎片已被标明，并确定了对应的生物转化漂移 (图 7C)。

MS/MS 谱表明羟基化代谢物 2 在 m/z 952.5387 处的加钠峰来源于一个氧原子导致的母体药物的质量变化。在此 MS/MS 谱中，原母体药物的碎片离子 a 和 b 均不存在，且也不存在由生物转化产生的质量变化。 m/z 分别为 607.3927 和 345.2040 的碎片离子 c 和 i 在代谢物的 MS/MS 中保持不变。这些证据表明，羟基化并没有发生在药物分子 1 的这个部分。代谢产物 2 的 MS/MS 谱中的三个碎片离子 h'、f' 和 d' 可以认为是原来的碎片离子 h、f 和 d 增加一个氧原子得到的 (图 5 和 7C)。例如，d' 碎片离子的 m/z 为

469.2187，计算得到分子式为 $C_{25}H_{34}NaO_7$ ，相对质量偏差为 1.90ppm，表明它是母体药物谱中 m/z 为 453.2234 的碎片离子 d $C_{25}H_{34}NaO_6$ 增加一个氧原子形成的 (表 4)。最后，我们假定羟基化代谢物 2 的结构是由于雷帕霉素的四氢吡喃基发生了羟基化产生的。

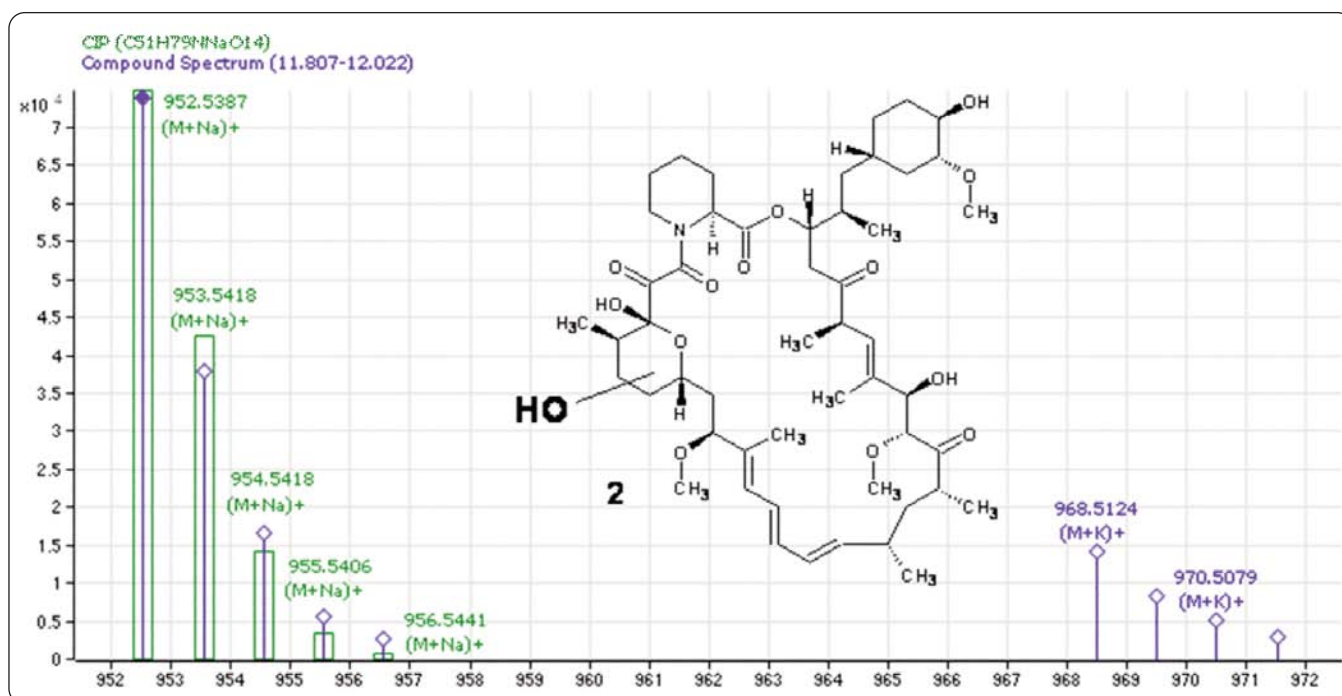


图 6

羟基化雷帕霉素代谢物 2 的质谱图、加钠峰和加钾峰的同位素分布。加钠峰的计算同位素分布 (CIP) 为绿色，化合物谱为蓝色 (计算分子式和质量精度列于表 3)。

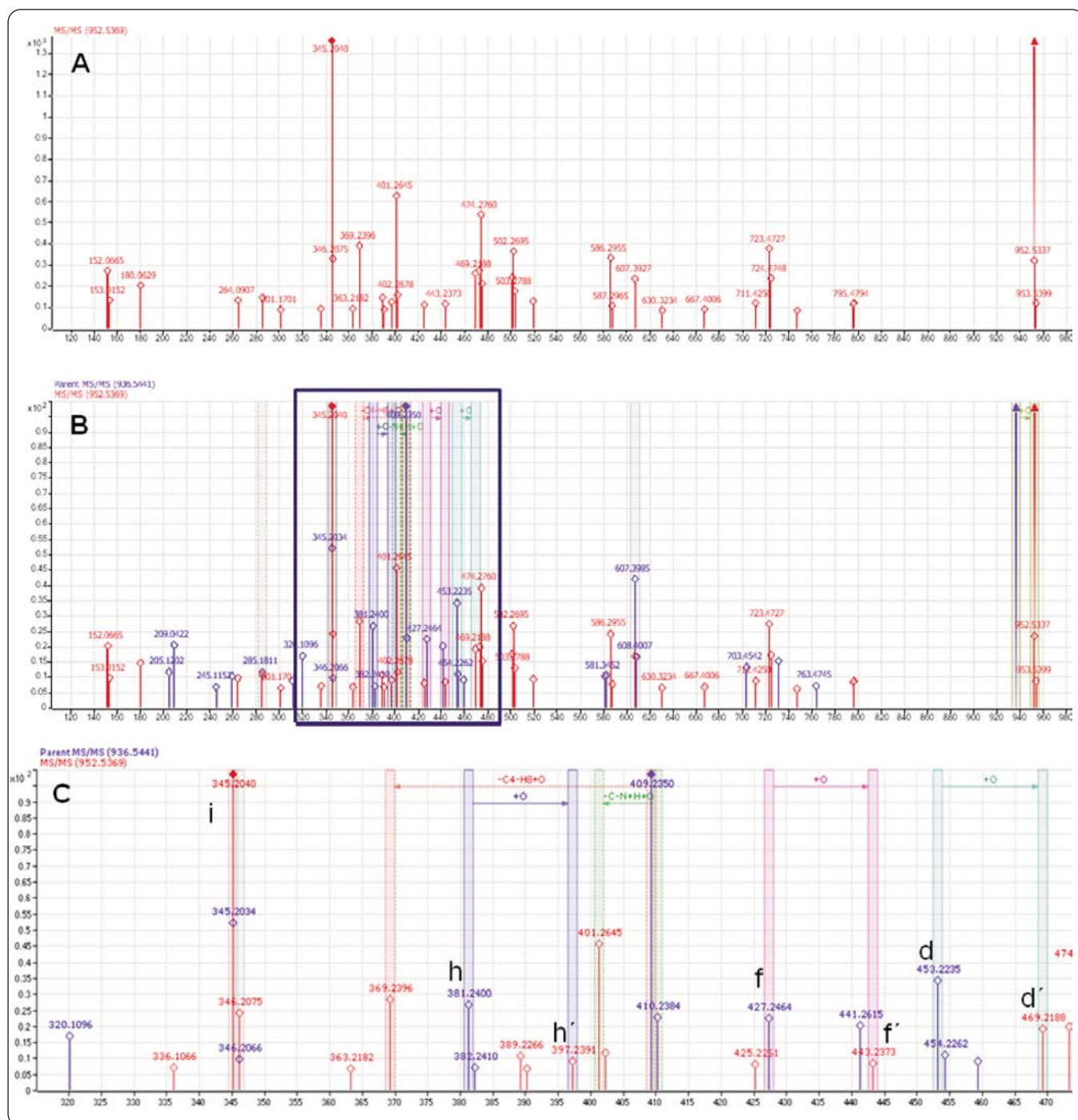


图 7

1) 羟基化雷帕霉素代谢物 2 的 MS/MS 谱。2) 雷帕霉素 1 和生物转化得到的羟基化雷帕霉素 2 的重叠 MS/MS 谱，标出了质量数漂移归属。3) 放大的雷帕霉素 1 和生物转化得到的羟基化雷帕霉素 2 的重叠 MS/MS 谱。

碎片离子	m/z	碎片分子式	计算 m/z	△ 质量数 [mDa]	△ 质量数 [ppm]	中性丢失基团	丢失基团分子式	丢失基团质量数	FPM m/z	分子式差异	误差差异 [mDa]	m/z 差异
	952.53870	C51H79NNaO14	952.53928	0.57	0.61				936.54414	+O	5.32	15.99491
c	607.39275	C36H56NaO6	607.39691	4.16	6.86	345.14417	C15H23NO8	345.14237	607.39851		5.77	0.00000
d'	469.21878	C25H34NaO7	469.21967	0.89	1.90	483.31814	C26H45NO7	483.31960	453.22349	+O	0.38	15.99491
i	345.20404	C19H30NaO4	345.20363	-0.41	-1.19	607.33288	C32H49NO10	607.33565	345.20344		0.61	0.00000

表 4

羟基化雷帕霉素 2 的特征 MS/MS 碎片、碎片质量数、计算出的碎片分子式、质量精度及生物转化产生的质量变化的归属。

结论

本应用简报介绍了使用代谢产物鉴定软件对具有复杂化学结构的化合物雷帕霉素进行代谢物鉴定。

代谢物鉴定软件所提供的工具对于代谢物鉴定和代谢物结构解析都非常有用。例如，从采集的 Q-TOF 质谱数据，可按照预定义的质量精度范围计算出提取的化合物的分子式，并将同位素分布考虑在内。根据针对各个母离子计算的数据，可计算得到 MS/MS 碎片分子式。采用碎片离子图谱匹配算法，可对母体药物和代谢产物就相似性以及生物转化带来的质量变化进行比较。

参考文献

1. K. Hallensleben, "The in-vitro metabolism of immunosuppressiva, especially rapamycin – characterization and identification of metabolites" *Dissertation, University of Hannover, Germany, 1999.*
2. K. Hallensleben, M. Raida, G. Habermehl, „Identification of a new metabolite of macrolide immunosuppressant, like rapamycin and SDZ RAD, using high performance liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry" *J. Am. Soc. Mass Spectrom, 11, 516-525, 2000.*
3. G. Lhoest, T. Zey, R. K. Verbeeck, P. Wallemacq, N. Maton, J. P. De Houx, D. Latinne, „Isolation from pig liver microsomes, identification by electrospray tandem mass spectrometry and in-vitro immunosuppressive activity of a rapamycin tris-epoxide metabolite" *J. Mass Spectrom. 34, 28-32, 1999.*
4. H. L. Gallant-Haidner, D. J. Trepanier, D. G. Freitag, R. W. Yatscoff, „Pharmacokinetic and Metabolism of Sirolimus" *Therapeutic Drug Monitoring, 22, 31-35, 2000.*
5. K. O. Boernsen, W. Egge-Jacobsen, B. Inverardi, T. Strom, F. Streit, H.-M. Schiebel, L. Z. Benet, U. Christians, „Assessment and validation of the MS/MS fragmentation pattern of the macrolide immunosuppressant everolimus" *JMS, 42, 793-802, 2007.*
6. Edgar Nägele, Frank Wolf, Uwe Nassal, Rainer Jäger, Horst Lehmann, Frank Kuhlmann, Karina Subramanian "An interwoven, multi-algorithm approach for computer –assisted identification of drug metabolites" *Application Note: Agilent Publication number 5989-7375EN, 2007.*

www.agilent.com/chem/qtof

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2008
2008 年 10 月 1 日 中国印刷
5989-9814CHCN



Agilent Technologies