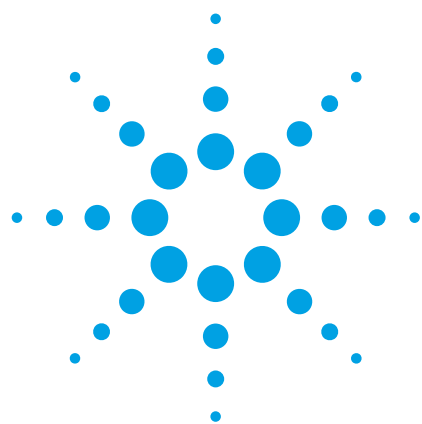




计算机辅助药物代谢物鉴定

第 1 部分：奈法唑酮预期代谢物的鉴定

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

应用简报

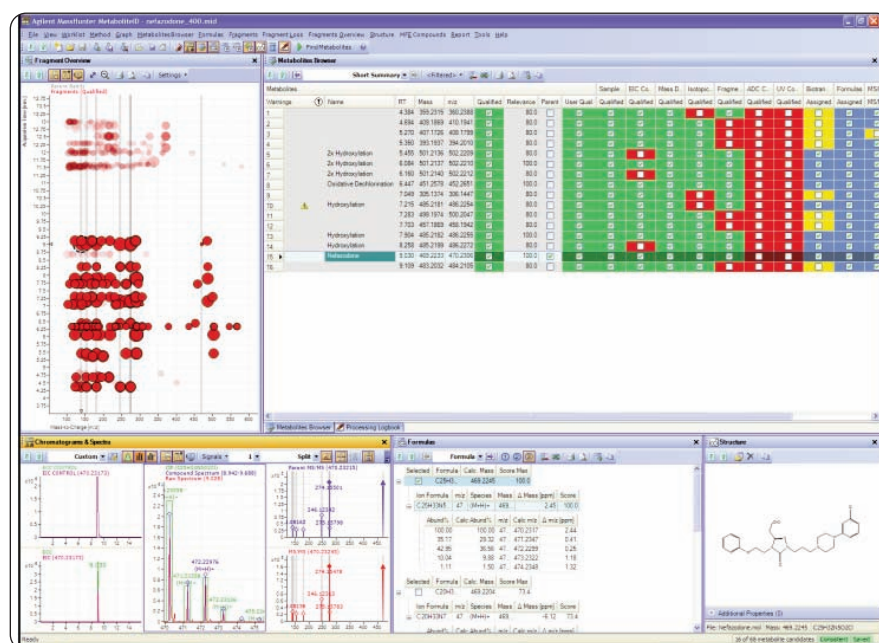
药物发现和药物研发过程中的代谢物鉴定

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预期代谢物
- 奈法唑酮药物预期代谢物的代谢物鉴定数据分析结果



Agilent Technologies

引言:

新候选药物代谢物的分析是药物发现和开发过程的重要步骤。要评价提高该重要领域分析效率的新技术,通常需要使用众所周知的化合物作为参照。药物奈法唑酮¹就是这样一种能产生大量已知代谢物的化合物,可用于这一评价研究。为了证明 MassHunter MetID 用于可能代谢产物鉴定的有效性,使用该特殊化合物进行了测试。MassHunter MetID 软件采用多协调算法对 QTOF MS 和 MS/MS 数据进行分析,该策略能够标准化单个算法的影响从而得到可信的总体结果²。本应用简报介绍了利用 Agilent 1200 RRLC 系统和 Agilent 6500 系列精确质量 QTOF 质谱仪进行代谢实验数据采集,并采用 MetID 软件进行计算机辅助数据分析。以奈法唑酮药物的预期代谢物和非预期的代谢物³为例,进行了详细的数据分析结果讨论。

实验部分

仪器设备

- Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统、带自动脱气机的二元泵 SL、带恒温器的高性能自动进样器 SL (ALS SL)、柱温箱 (TCC) 以及 Agilent 6500 系列精确质量 QTOF 质谱仪
- 色谱柱: 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 100mM, pH 7.4 (81.8mL 0.1M Na₂HPO₄ + 18.2mL 0.1M KH₂PO₄); 5mM MgCl₂
- 250µM 的奈法唑酮盐酸盐磷酸缓冲液溶液
- 10mg/mL 还原型辅酶 (NADPH) 磷酸盐缓冲液溶液
- 大鼠肝微粒体 S9, 蛋白浓度 20mg/mL

代谢物样品

在 1.5mL 的 Eppendorf 管里, 加入 180µL 的磷酸缓冲液和 25µL 奈法唑酮储备液。加 15µL 制备的肝微粒体 S9 和 30µL 的 NADPH 溶液。涡旋, 37°C 孵育 1 小时。加 750µL 冷乙醇终止反应, 14000rpm 离心 15 分钟。

将上清液移入一个新的 1.5mL Eppendorf 管, 在 speedvac 真空离心浓缩仪中蒸干, 用 250µL HPLC 流动相 A 复溶。

对照样品

在 1.5mL 的 Eppendorf 管里, 加入 210µL 的磷酸缓冲液和 25µL 奈法唑酮储备液。加入 15µL 的肝微粒体 S9。涡旋, 37°C 孵育 1 小时。加 750µL 冷乙醇终止反应, 14000 rpm 离心 15 分钟。

将上清液移入一个新的 1.5mL Eppendorf 小瓶, 在 speedvac 真空离心浓缩仪中蒸干, 用 250µL HPLC 流动相 A 复溶。

所有化学品和生物试剂均购自

Sigma-Aldrich 公司; HPLC 溶剂

(乙醇) 购自默克 (德国), HPLC 用水购自 Mallinckrodt-Baker。

方法

高分离度 RRLC 方法

Agilent 1200 系列二元泵 SL 运行条件:

溶剂 A: 水 + 0.1% 甲酸 (FA)
溶剂 B: ACN + 0.1% 甲酸 (FA)
流速: 0.5mL/min
梯度: 0min 5% B,
15min 75% B
15.1min 95% B
16min 95% B

停止时间: 16 分钟

后运行时间: 10 分钟

Agilent 1200 自动进样器 SL 在 4°C 进样 1-10µL 样品, 用 50% 的甲醇溶液洗针 5 秒。柱温为 60°C。

Q-TOF MS 和 MS/MS 法

Agilent 6500 系列精确质量 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) 双喷雾的
正离子模式 ESI 源

干燥气流量: 10.0L/min

干燥气温度: 300°C

雾化器: 45psi

扫描范围: 100-1000

碎裂电压: 200V

锥孔电压: 60V

毛细管电压: 3500V

碰撞能: 30V

数据依赖

MS/MS: 2 化合物
3 MS/MS 谱图
0.1min 排除时间

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）的数据文件和仅含母体药物（对照样品）的数据文件的比较。利用分子特征提取（MFE）算法从一级质谱数据中提取出所有可检测质量数信号。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一个的分子特征，并去除化学背景噪音。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。相对于对照样品，代谢物样品中的所有的新化合物或响应提高至少两倍的化合物被认为是可能的代谢物，用另外的用户指定的算法作进一步的分析。这些算法既可以鉴定和确认新化合物，也可以对其他算法发现的代谢物进行简单确认。将所有代谢物鉴定算法的结果进行加权，并综合所有结果确定最终的鉴定相关性得分。得分高于定义的相关性阈值的化合物可定性为代谢物。所有算法的结果可总结在一个结果表里，便于快速检查²。

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 碎片离子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 的分子离子峰 $(M+H)^+$ ($C_{25}H_{33}N_5O_2Cl$) 的计算同位素分布（CIP，图 1 插图中的绿框）是相同的。MS/MS 谱图显示主要碎片 $(M+H)^+$

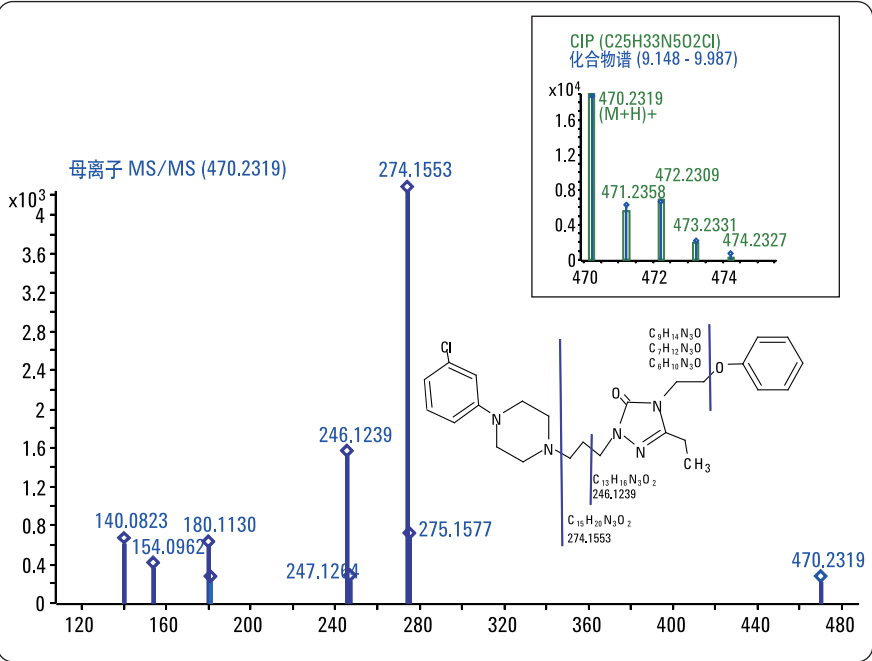


图 1. 母体药物奈法唑酮的质谱、同位素分布以及碎片离子的二级质谱归属。

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
C25H32N5O2Cl	469.2245	469.2246	-0.16	-0.35	12	470.2319	(M+H)+	C25H33N5O2Cl

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、质量数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	C6H9N3O	139.0746	-0.43	-3.12	330.1499	C19H23N2OCl	330.1482
154.0962	153.0890	C7H11N3O	153.0902	1.25	8.16	316.1342	C18H21N2OCl	316.1343
180.1130	179.1058	C9H13N3O	179.1059	0.11	0.62	290.1186	C16H19N2OCl	290.1175
246.1239	245.1167	C13H15N3O2	245.1164	-0.23	-0.94	224.1080	C12H17N2Cl	224.1066
274.1553	273.1481	C15H19N3O2	273.1477	-0.34	-1.26	196.0767	C10H13N2Cl	196.0751

图 3 奈法唑酮碎片离子的计算 MS/MS 碎片分子式和中性丢失分子式。

的 m/z 值为 274.1553, 分子式为 $C_{15}H_{20}N_3O_2$ (图 1)。由测定的 $(M+H)^+$ 离子所计算的奈法唑酮 ($C_{25}H_{32}N_5O_2Cl$) 的质量具有 -0.35ppm (图 2) 的低相对质量数误差, 质量数为 273.1481 的 MS/MS 碎片离子 ($C_{15}H_{19}N_3O_2$) 的质量数误差为 -1.26ppm (图 3)。该碎片的分子式, 加上 MS/MS 中匹配丢失碎片的分子式 $C_{10}H_{13}N_2Cl$, 与原型化合物分子式 $C_{25}H_{32}N_5O_2Cl$ (图 3) 相符。其他 MS/MS 碎片也可归属到奈法唑酮结构式 (图 1)。

下面的几个代谢产物通过软件中的几种算法得到了明确的鉴定, 这些算法包括同位素分布匹配和 MS/MS 碎片分布匹配, 可鉴定与母体药物分布匹配的化合物。还确定了属于预期的第一阶段代谢反应的生物转化代谢反应。第一个例子为羟基化反应代谢物。奈法唑酮的单羟基代谢产物 1 (在约 7.5 分钟时洗脱, m/z 值为 486.2267)

显示出与计算同位素分布相似 (CIP, 图 4 插图中的绿框) 的氯化物同位素分布 (图 4 插图中的蓝线), 计算分子式的相对质量偏差为 -0.68 ppm (图 5)。MS/MS 碎片离子分布与母体药物一致, 而分子离子的差异是由一个氧原子差异引起的 (图 4)。这表明, 该羟基化反应位置在 MS/MS 碎裂过程 (图 6) 中丢失的中性碎片上。 m/z 值为 274.1545 的碎片离子与母体碎片的分

子式相同, 相对质量偏差为 1.70 ppm, 中性丢失的分子式为 $C_{10}H_{13}N_2OCl$, 这与单羟基代谢物 1 的母体分子式 ($C_{25}H_{32}N_5O_3Cl$) 相符。给出相同结果另一个 MS/MS 碎片离子其 m/z 值为 246.1233, 分子式为 $C_{13}H_{15}N_3O_2$, 相对质量偏差为 0.44ppm (图 4 和图 6 中的碎片离子)。

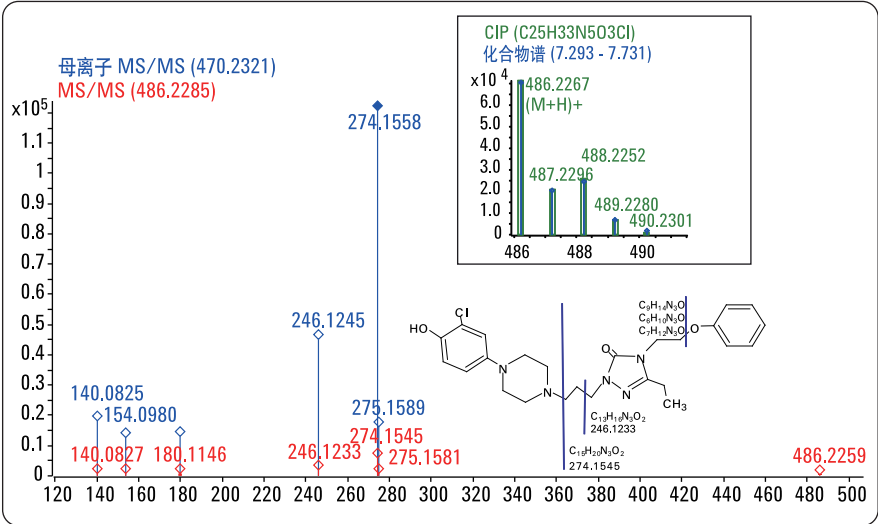


图 4
奈法唑酮单羟基代谢产物 1 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱中碎片离子的归属。

分子式	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	碎片分子式
C25H32N5O3Cl	485.2194	485.2197	-0.33	-0.68	12	486.2270	(M+H) ⁺	C25H33N5O3Cl

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
486.2267	486.2266	-0.09	100.00	100.00
487.2296	487.2296	0.01	26.32	29.36
488.2252	488.2248	-0.76	31.76	36.77
489.2280	489.2272	-1.64	8.80	9.95

图 5
奈法唑酮单羟基代谢产物 1 的计算分子式、质量准确度和同位素分析。

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
140.0827	139.0754	C6H9N3O	139.0746	-0.87	-6.27	346.1448	C19H23N2O2Cl	346.1458	140.0825		0.26	
154.0971	153.0899	C7H11N3O	153.0902	0.35	2.32	332.1292	C18H21N2O2Cl	332.1313	154.0980		0.82	
180.1146	179.1073	C9H13N3O	179.1077	0.36	2.00	306.1135	C16H19N2O2Cl	306.1139	180.1135		1.14	
246.1233	245.1160	C13H15N3O2	245.1164	0.44	1.79	240.1029	C12H17N2OCl	240.1052	246.1245		1.20	
274.1545	273.1473	C15H19N3O2	273.1477	0.46	1.70	212.0716	C10H13N2OCl	212.0739	274.1558		1.25	
486.2259									470.2321	15.9949	1.11	+O

图 6
奈法唑酮单羟基代谢产物 1 碎片的计算 MS/MS 碎片分子式及中性丢失分子式。

此外，奈法唑酮的第二个单羟基代谢物 2（在约 8.3 分钟时洗脱）与代谢物 1 的质量数和同位素分布相同，但保留行为不同，这说明化合物结构不同。这可以通过比较母体药物的 MS/MS 碎裂质量分布（图 7，蓝色）和代谢物 2 的 MS/MS 谱碎裂质量分布（红色）证明。代谢物 2 的 MS/MS 谱中显示母体药物 m/z 470.2319 增加了一个氧原子后的质量数变化 m/z 486.2279，这与计算分子式的相对偏差为 -2.55ppm（图 8）。碎片离子也观察

到了相似的变化，由 m/z 274.1582 变为 m/z 290.1508，与计算碎片分子式的相对偏差为 -2.91ppm（图 9）。该碎片的分子式为 C₁₅H₁₉N₃O₃，相应丢失分子式为

C₁₀H₁₃N₂Cl，这与原型药物的 MS/MS 谱（图 9）一致。其他 MS/MS 碎片离子可归属到代谢物 2 的结构式，并支持推测的结构（图 7）。

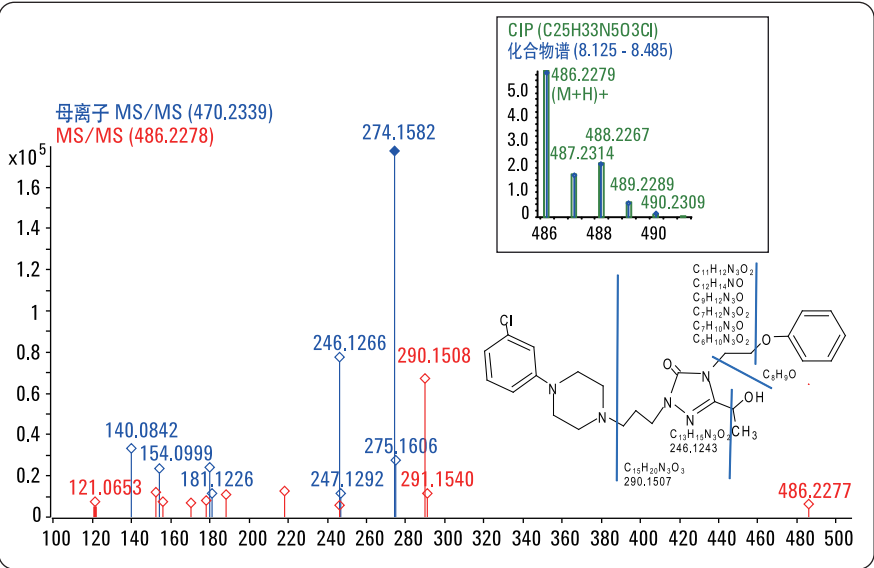


图 7 奈法唑酮片的单羟基代谢物 2 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱中碎片离子的归属。

分子式	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
C25H32N5O3Cl	485.2194	485.2206	-1.24	-2.55	12	486.2279	(M+H) ⁺	C25H33N5O3Cl

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
486.2279	486.2266	-2.55	100.00	100.00
487.2314	487.2296	-3.66	27.42	29.36
488.2267	488.2248	-3.81	34.81	36.77
489.2289	489.2272	-3.52	7.99	9.95
490.2309	490.2297	-2.35	1.24	1.58

图 8 奈法唑酮单羟基代谢物 2 的计算分子式、质量准确度和同位素分析。

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
121.0653	120.0580	C8H8O	120.0575	-0.48	-3.96	365.1619	C17H24N5O2Cl	365.1625				
152.0824	151.0751	C7H9N3O	151.0746	-0.56	-3.70	334.1448	C18H23N2O2Cl	334.1454	180.1154	-28.0313	1.72	-C2-H4
156.0776	155.0703	C6H9N3O2	155.0695	-0.83	-5.35	330.1499	C19H23N2OCl	330.1502	140.0842	15.9949	1.51	+O
170.0931	169.0859	C7H11N3O2	169.0851	-0.73	-4.33	316.1342	C18H21N2OCl	316.1347				
178.0982	177.0909	C9H11N3O	177.0902	-0.68	-3.83	308.1292	C16H21N2O2Cl	308.1296				
188.1077	187.1004	C12H13NO	187.0997	-0.71	-3.78	298.1197	C13H19N4O2Cl	298.1201				
218.0930	217.0857	C11H11N3O2	217.0851	-0.61	-2.83	268.1342	C14H21N2OCl	268.1348				
246.1243	245.1170	C13H15N3O2	245.1164	-0.55	-2.24	240.1029	C12H17N2OCl	240.1036				
290.1508	289.1435	C15H19N3O3	289.1426	-0.84	-2.91	196.0767	C10H13N2Cl	196.0770	274.1582	15.9949	2.33	+O
486.2277									470.2339	15.9949	1.18	+O

图 9 奈法唑酮单羟基代谢物 2 碎片的计算二级质谱碎片分子式及中性丢失分子式。

另外一个代谢反应是将羟基代谢物 2 氧化为氧代代谢物 3， m/z 值为 484.2111，与计算分子式的偏差为 -0.26ppm（图 10 和 11）。MS/MS 碎裂质量分布匹配（FPM）表明多个碎片离子发生羟基化反应后被氧化。 m/z 为 288.1350 的主要碎片分子式为 $C_{15}H_{17}N_3O_3$ ，与计算值的误差为 -2.72 ppm，也列出了其它碎片的变化（图 12，分子式在图 10 中）。

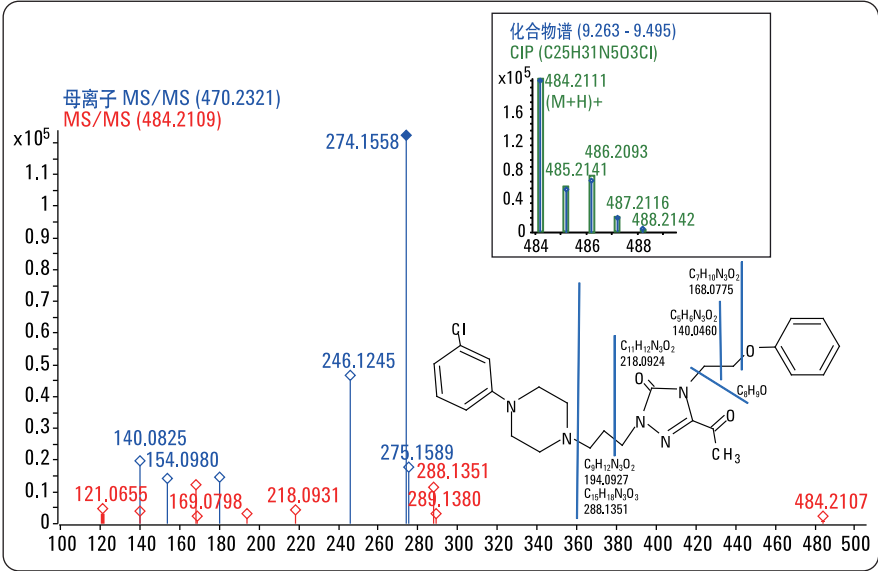


图 10
奈法唑酮单氧代谢物 3 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子的归属。

分子式	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
C25H30N5O3Cl	483.20371	483.20384	-0.125	-0.26	13	484.21112	(M+H)+	C25H31N5O3Cl	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
484.2111	484.2110	-0.26	100.00	100.00
485.2139	485.2140	0.22	26.66	29.34
486.2092	486.2092	0.01	32.31	36.77
487.2117	487.2115	-0.29	7.83	9.95
488.2169	488.2141	-5.73	1.4	1.58

图 11
奈法唑酮单氧代谢物 3 的计算分子式、质量准确度和同位素分析。

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
121.06550	120.05822	C8H8O	120.05751	-0.70	-5.86	363.14620	C17H22N5O2Cl	363.14537				
140.04608	139.03880	C5H5N3O2	139.03818	-0.63	-4.51	344.16554	C20H25N2OCl	344.16479				
168.07747	167.07019	C7H9N3O2	167.06948	-0.71	-4.27	316.13424	C18H21N2OCl	316.13340	154.09795	13.97926	0.25	-H2+O
194.09267	193.08539	C9H11N3O2	193.08513	-0.27	-1.38	290.11859	C16H19N2OCl	290.11820	180.11347	13.97926	0.07	-H2+O
218.09308	217.08580	C11H11N3O2	217.08513	-0.67	-3.11	266.11859	C14H19N2OCl	266.11779				
288.13505	287.12777	C15H17N3O3	287.12699	-0.78	-2.72	196.07673	C10H13N2Cl	196.07582	274.15579	13.97926	0.00	-H2+O
484.21073									470.23212	13.97926	0.65	-H2+O

图 12
奈法唑酮单氧代谢物 3 碎片的计算 MS/MS 碎片分子式及中性丢失分子式。

在保留时间 5.5 分钟附近洗脱的代谢物，存在发生两次羟基化反应产生的二羟基代谢物 4（图 13）。该碎片质量数分布匹配（FPM）显示与原型药物相比，该代谢产物增加了两个氧原子导致 m/z 470.2319 变为 m/z 502.2211，与计算分子式 $C_{25}H_{32}N_5O_4Cl$ 的相对偏差为 0.88ppm（图 14）。原型药物 MS/MS 碎片离子 m/z 274.1557 氧化后 m/z 为 290.1504，分子式为 $C_{15}H_{19}N_3O_3$ ，这说明二羟基代谢物 4 与单羟基代谢物 2 的结构修饰相同（图 15 和第 5 页的图 9）。相应的中性丢失分子式为 $C_{10}H_{13}N_2OCl$ ，说明第二次羟基化反应发生的位置与代谢物 1 相似（图 15 和第 4 页的图 6）。另一个 MS/MS 碎片离子 m/z 262.1188 也支持这一结论，同样

由于氧原子的变化，母体药物的 MS/MS 碎片离子 m/z 246.1244（图 15 和第 3 页的图 3）变为了 m/z 262.1188。该碎片离

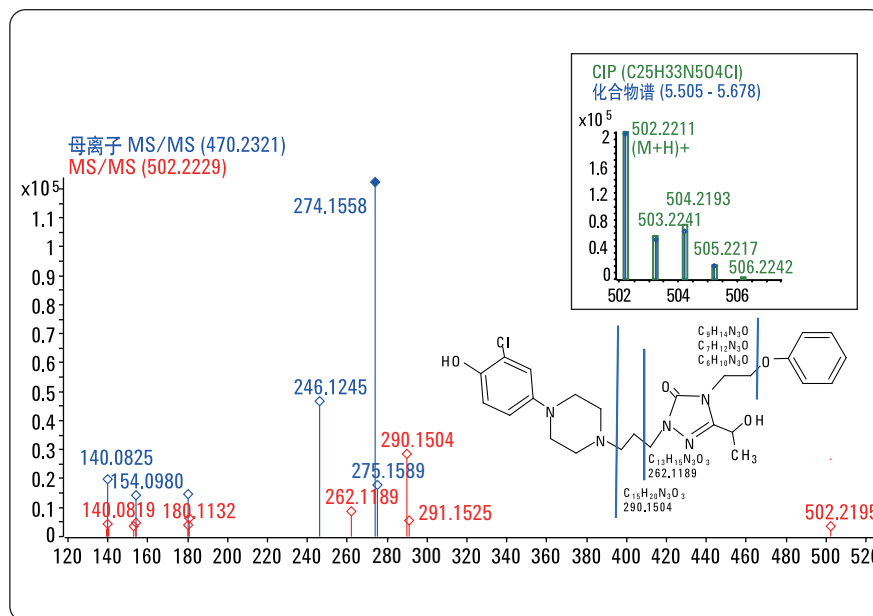


图 13
奈法唑酮二羟基代谢物 4 的质谱、同位素分析和 MS/MS 碎片离子归属。

分子式	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
C25H32N5O4Cl	501.21428	501.21383	0.44	0.88	12	502.22111	(M+H)+	C25H33N5O4Cl	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
502.2211	502.2216	0.89	100.00	100.00
503.2240	503.2246	1.08	25.72	29.40
504.2194	504.2198	0.77	31.64	36.99
505.2222	505.2221	-0.16	7.83	10.03

图 14
奈法唑酮二羟基代谢物 4 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
140.08188	139.07461	C6H9N3O	139.07456	-0.04	-0.31	362.13972	C19H23N2O3Cl	362.14100				
154.09701	153.08973	C7H11N3O	153.09021	0.48	3.15	348.12407	C18H21N2O3Cl	348.12588				
180.11324	179.10596	C9H13N3O	179.10586	-0.10	-0.54	322.10842	C16H19N2O3Cl	322.10965				
262.11887	261.11160	C13H15N3O3	261.11134	-0.26	-0.98	240.10294	C12H17N2OCl	240.10401	246.12446	15.99	0.50	+O
290.15040	289.14312	C15H19N3O3	289.14264	-0.48	-1.66	212.07164	C10H13N2OCl	212.07249	274.15579	15.99	0.31	+O
502.21955									470.23212	31.99	2.41	+O2

图 15
奈法唑酮二羟基代谢物 4 碎片的计算 MS/MS 碎片分子式和中性丢失分子式。

在接下来的代谢步骤中，二羟基代谢物 4 经历了一次氧化形成奈法唑酮的羟基氧代谢物 5。该代谢物 m/z 500.2058，分子式为 C₂₅H₃₁N₅O₄Cl，相对质量偏差为 0.13ppm（图 16 和 17）。

分子式为 C₂₅H₃₁N₅O₄Cl 的代谢物计算同位素分布（CIP）与测定同位素分布高度匹配（图 16）。碎片分布匹配（FPM）显示了与代谢物 3 类似的碎裂质量数分布，只有分子式为 C₁₅H₁₉N₃O₂ 的 m/z 274.1557 的原始碎片离子不仅发生羟基化反应，而且随后发生了氧化反应，变为 m/z 288.1344，分子式为 C₁₅H₁₇N₃O₃。

与计算值相比的相对质量偏差为 -0.7ppm（图 18）。

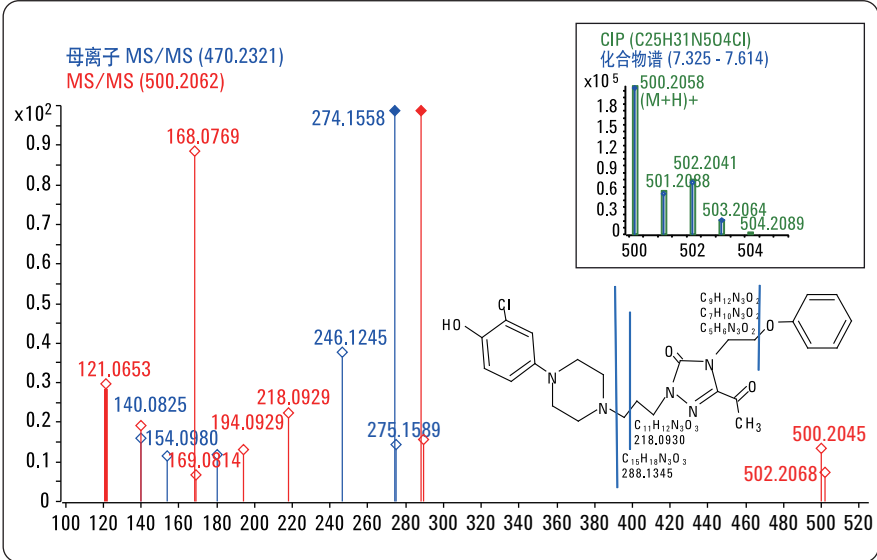


图 16
奈法唑酮羟基氧代谢物 5 的质谱、同位素分析和 MS/MS 谱碎片离子的归属。

分子式	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
C25H30N5O4Cl	499.19863	499.19856	0.06	0.13	13	500.20584	(M+H)+	C25H31N5O4Cl	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
502.2211	502.2216	0.89	100.00	100.00
503.2240	503.2246	1.08	25.72	29.40
504.2194	504.2198	0.77	31.64	36.99
505.2222	505.2221	-0.16	7.83	10.03

图 17
奈法唑酮羟基氧代谢物 5 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
121.06526	120.05798	C8H8O	120.05751	-0.46	-3.87	379.14112	C17H22N5O3Cl	379.14091				
140.04633	139.03906	C5H5N3O2	139.03818	-0.88	-6.33	360.16046	C20H25N2O2Cl	360.15983				
168.07685	167.06958	C7H9N3O2	167.06948	-0.10	-0.60	332.12916	C18H21N2O2Cl	332.12931	154.09795	13.97926	0.36	-H2+O
194.09291	193.08564	C9H11N3O2	193.08513	-0.51	-2.65	306.11351	C16H19N2O2Cl	306.11325	180.11347	13.97926	0.18	-H2+O
218.09295	217.08567	C11H11N3O2	217.08513	-0.55	-2.52	282.11351	C14H19N2O2Cl	282.11321				
288.13447	287.12719	C15H17N3O3	287.12699	-0.20	-0.70	212.07164	C10H13N2OCl	212.07169	274.15579	13.97926	0.59	-H2+O
500.20445									470.23212	29.97418	1.85	-H2+O2

图 18
奈法唑酮羟基氧代谢物 5 的计算 MS/MS 碎片分子式和中性丢失分子式。

最后一个预期代谢物 6 的生物转化反应经鉴定为脱氯反应。检测同位素分布由于脱氯发生了很大变化（图 19 插图中的蓝线），但是，其与该生物转化的计算同位素分布（CIP）明显一致（图 19 插图中的绿框）。该代谢物 m/z 452.2617 的分子式计算为

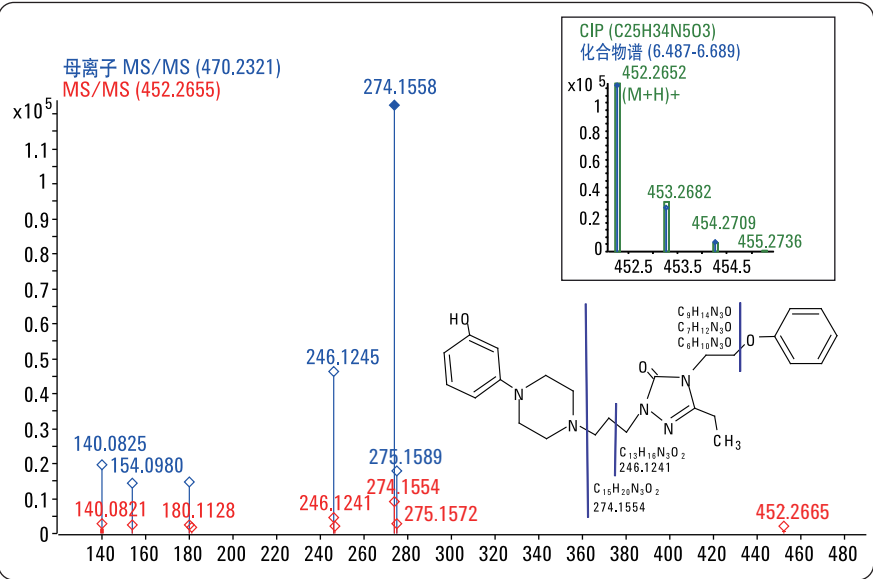


图 19 奈法唑酮氧化脱氯代谢物 6 的质谱、同位素分析和 MS/MS 的碎片离子归属。

分子式	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
C25H33N5O3	451.25833	451.25789	0.44	0.98	12	452.26517	(M+H) ⁺	C25H34N5O3	100

同位素分布				
m/z	计算 m/z	Δ 质量数 [ppm]	丰度 %	计算丰度 %
452.2652	452.2656	0.98	100.00	100.00
453.2682	453.2686	0.93	24.82	29.37
454.2694	454.2714	4.39	4.16	4.78

图 20 奈法唑酮氧化脱氯代谢物 6 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
140.08205	139.07478	C6H9N3O	139.07456	-0.22	-1.55	312.18378	C19H24N2O2	312.18348	140.08245	0	0.40	
154.09777	153.09049	C7H11N3O	153.09021	-0.28	-1.84	298.16813	C18H22N2O2	298.16776	154.09795	0	0.18	
180.11275	179.10548	C9H13N3O	179.10586	0.39	2.15	272.15248	C16H20N2O2	272.15278	180.11347	0	0.72	
246.12411	245.11684	C13H15N3O2	245.11643	-0.41	-1.68	206.14191	C12H18N2O	206.14142	246.12446	0	0.35	
274.15542	273.14815	C15H19N3O2	273.14773	-0.42	-1.54	178.11061	C10H14N2O	178.11011	274.15579	0	0.36	
452.26651								-0.00097	470.23212	-17.9661	0.50	+O+H-Cl

图 21 奈法唑酮氧化脱氯代谢物 6 的计算 MS/MS 碎片分子式和中性丢失分子式。

$C_{25}H_{33}N_5O_3$ ，相对质量偏差为 0.98ppm（图 20）。碎片分布模式匹配（FPM）结果表明母体碎裂质量数分布和代谢物碎裂质量数分布一致。只有母体可发生 +O+H-Cl 改变（图 19）。这意味着脱氯反应发生在 MS/MS 碎裂过程中失去的中性丢失分子碎片中。与碎片 m/z 274.1554 和分子离子 m/z 452.2651 不同的中性丢失分子式为 $C_{10}H_{14}N_2O$ ，相对于母体药物（第 5 页图 3），不含氯，但包含一个额外的氧和氢原子（图 21）。

奈法唑酮的预期代谢途径

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，也产生了通过剪切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出的代谢物列于图 22 中，简化了预期代谢物的可能代谢途径。

如图 22 所列，有少数几个代谢反应不会

改变分子的骨架，仅通过简单修饰得到了预期的代谢产物。奈法唑酮的单羟基化既可以发生在氯代苯环，形成单羟基化代谢物 1，也可发生在与中央三唑-3-酮环连接的乙基，形成单羟基化代谢物 2。进一步的氧化代谢反应，将代谢物 2 中的羟基氧化为酮，形成氧代代谢产物 3。羟基化代谢反应可以同时发生在两个位置，形成二羟基化代谢物 4。二羟基化反应之后的氧化代谢反应可生成氧羟基代谢物 5。氧化脱氯代谢反应导致奈法唑酮中的氯原子丢失，由羟基取代，形成脱氯代谢物 6。

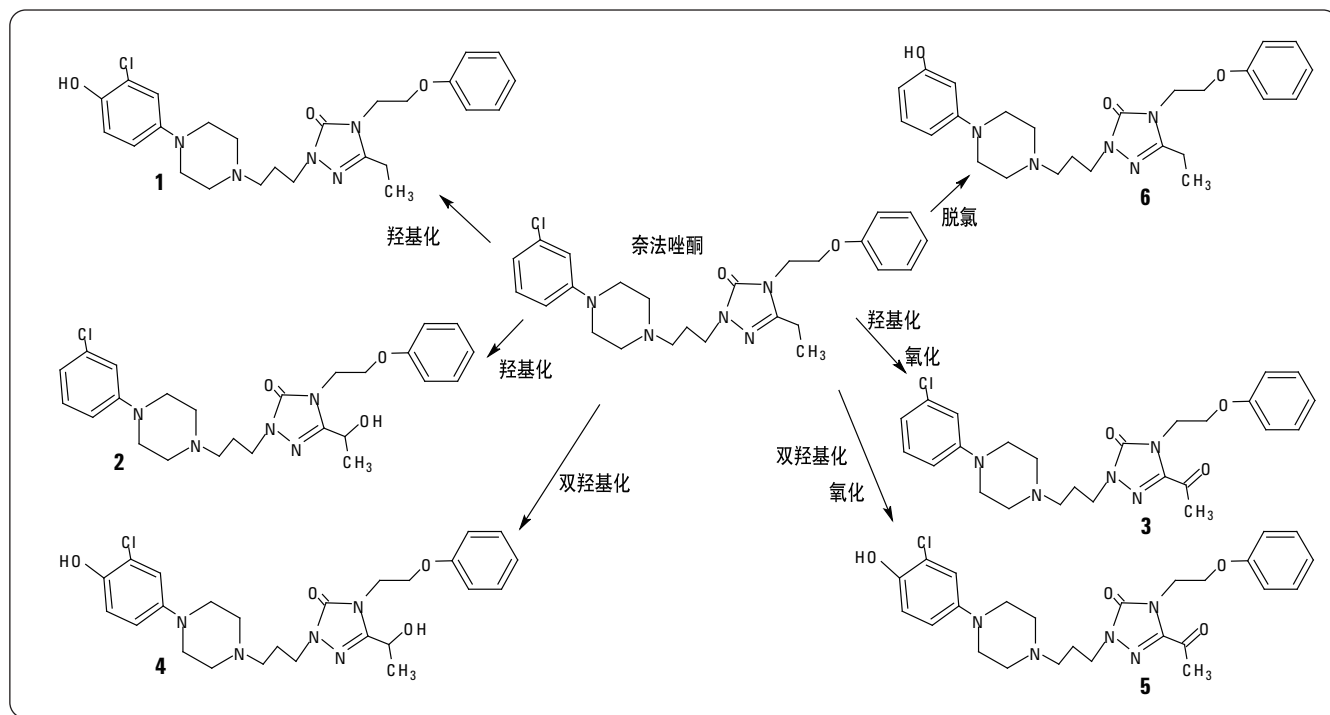


图 22
奈法唑酮预期代谢物的可能代谢途径。

结论

本应用简报阐释了 MassHunter 代谢物鉴定 (MetID) 软件鉴定由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) 所获得的信息进行解释, 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. Amit S. Kalgutkar, Mary E. Lame, John R. Soglia, Scott M. Peterman, Nicholas Duczak, Jr., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 17, 363-375, **2006**.
2. Edgar Naegele, Agilent Application Note "An interwoven, multi-algorithm approach for computer-assisted identification of drug metabolites", *Publication number 5989-7375EN*, **2007**.
3. Edgar Naegele, "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", 出版号 5990-3607CHCN, **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
5990-3606CHCN



Agilent Technologies