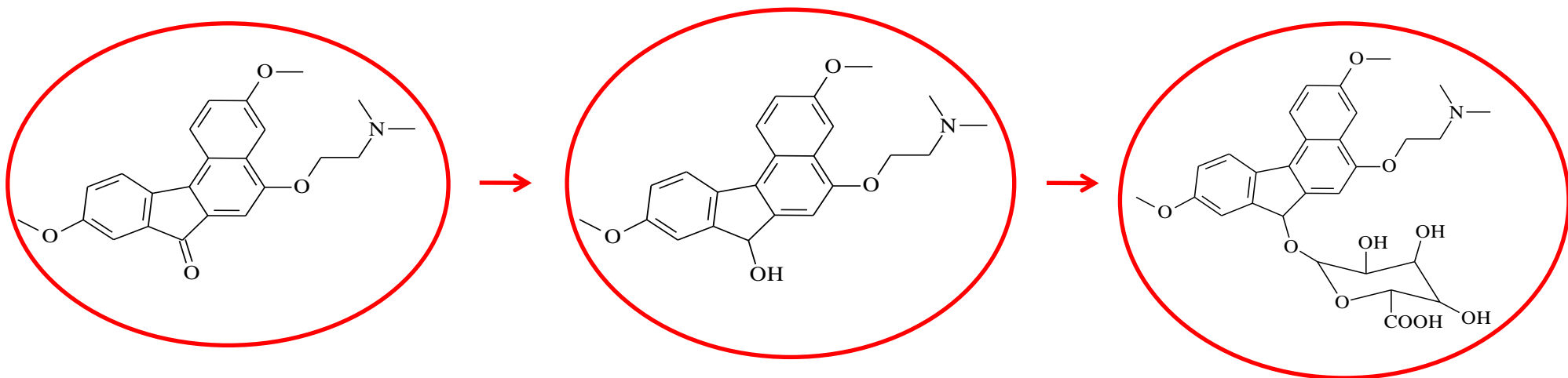


# Strukturní analýza metabolitů léčiv a dalších typů xenobiotik



Robert Jirásko

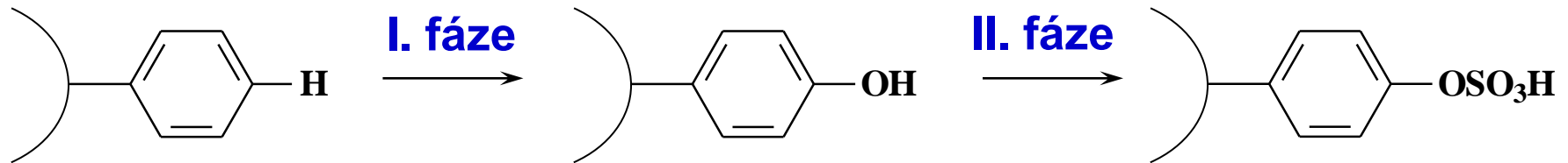
*Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice*



# Metabolismus xenobiotik

---

- Základní funkce metabolismu xenobiotik (látky cizí organismu – léčiva, drogy, pesticidy, konzervanty, kontaminanty, atd.) je transformace na derivát s vyšší rozpustností ve vodě, který může být snáze eliminován z organismu
- Metabolismus xenobiotik má dva základní kroky:
  - **I. fáze** změna účinku, změna toxicity látek – reakční změny funkčních skupin: oxidační (hydroxylace, epoxidace) a redukční (redukce karbonylu) reakce, dealkylace na heteroatomu, deaminace, hydrolýza esterů atd.
  - **II. fáze** – konjugační reakce (např. glukuronidace, sulfatace, acetylace, glukosylace, konjugace glycinu, glutathionem, metylace atd.)

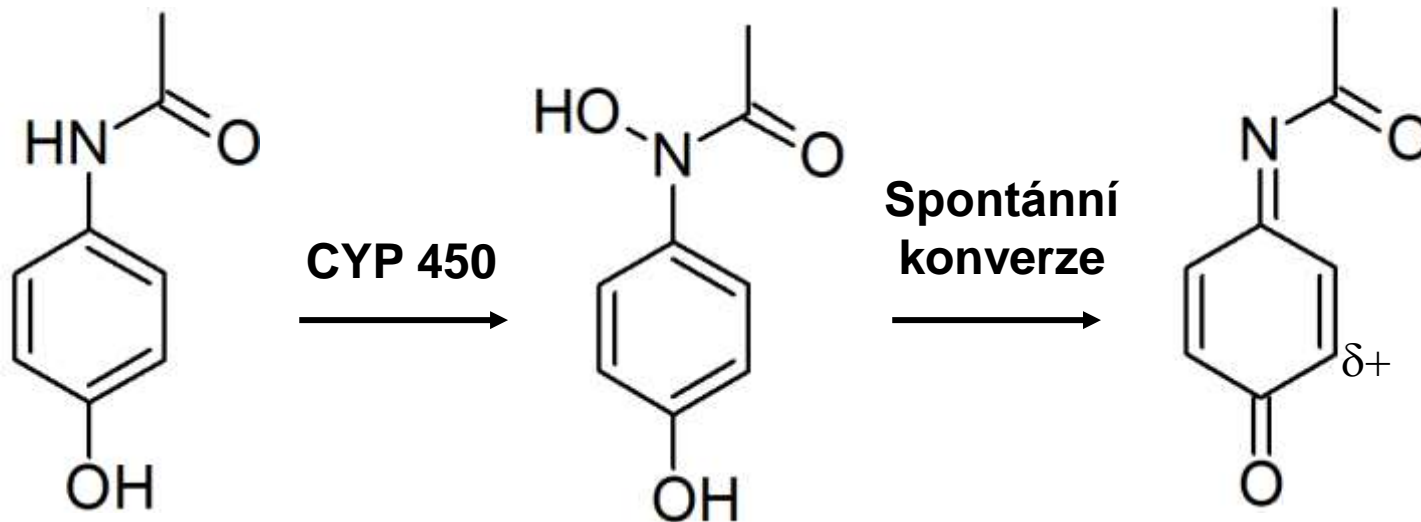


# Význam studií metabolismu léčiv

---

- informace, zda-li organismus léčivo metabolizuje (u parazitů bakterií to není žádoucí; u člověka, chovných zvířat, rostlin to žádoucí je)
  - identifikace a kvantifikace metabolitů
  - jak rychle je organismus schopen metabolity vyloučit
  - informace, kde probíhá metabolismus, kde se léčivo či metabolity v daném čase vyskytuje (MS zobrazování, extrakce z tkání)
- studium fragmentačních mechanismů
- objasnění nežádoucích účinků léčiv
- detekce potenciálně nebezpečných toxických metabolitů (reaktivní metabolity - kovalentní vazba na biomakromolekuly)

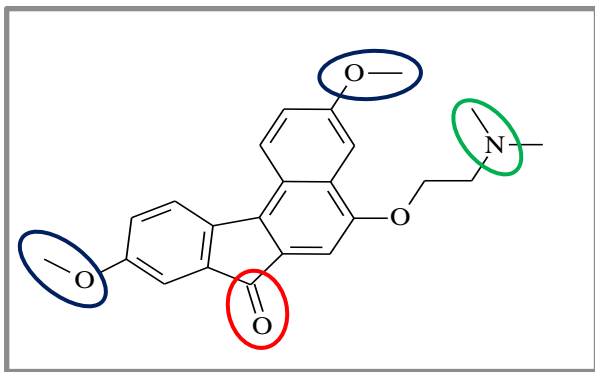
# Reaktivní metabolity



- Malá množství acetaminophenu (paracetamol) jsou konvertována na reaktivní metabolit (elektrofilní N-Acetylbenzoquinoneimine), který za určitých okolností reaguje s makromolekulami tkání a způsobuje nekrózu jater

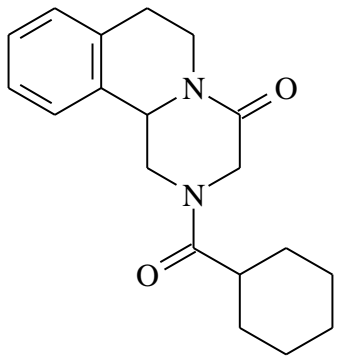
# Jaké metabolity lze očekávat

- softwarové algoritmy - predikce a detekce metabolitů (porovnání se slepým vzorkem)
- modelování metabolismu (reakční elektrochemické cely)
- *in vitro* inkubace např. na mikrozomech, hepatocytech (relativně čisté vzorky)
- na základě literatury
- na základě našich znalostí s ohledem na strukturu léčiva

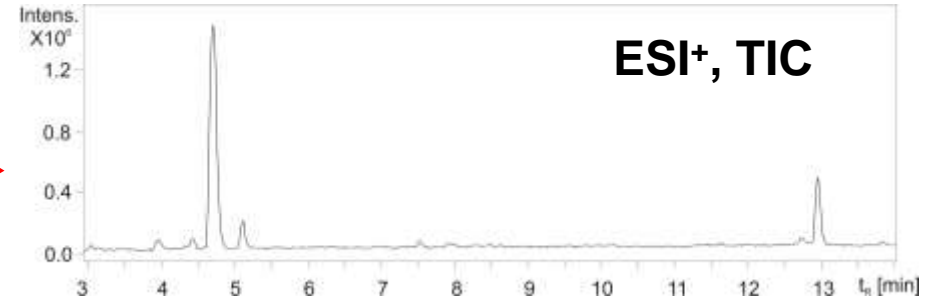


- **redukce karbonylu**
- **N-demethylace, O-demethylace**
- hydroxylace
- N-oxidace
- konjugační reakce (II. fáze)

# Rozdílná metabolizace – tasemnice a potkan (PZQ)

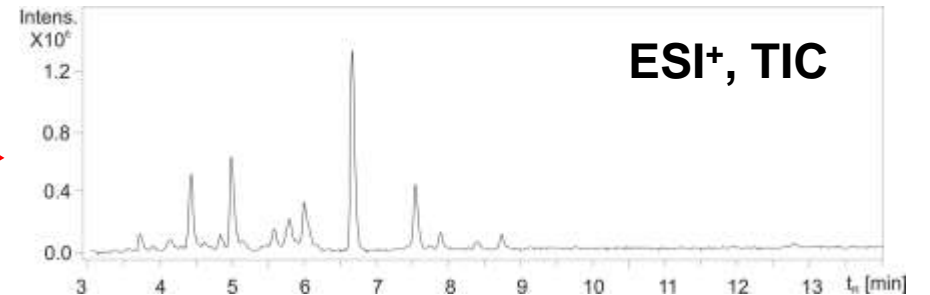


SPE - médium  
UHPLC/MS/MS



- žádné metabolity
- pouze parentní látka

SPE - moč  
UHPLC/MS/MS



- hydroxylace
- glukuronidace

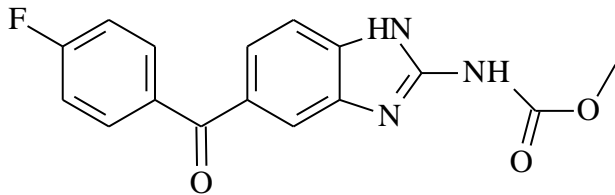
# Rozdílná metabolizace - vlasovky a ovce (FLU)



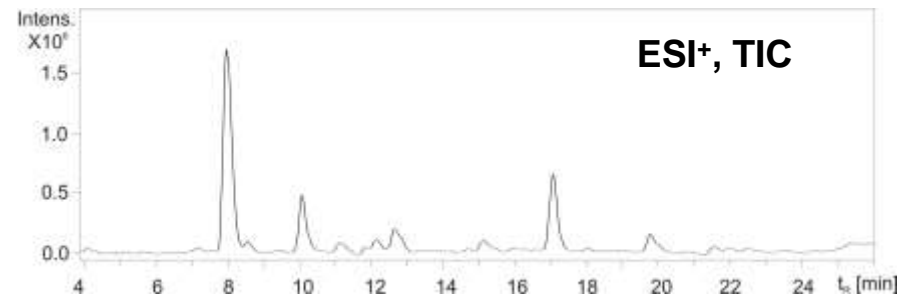
SPE - médium  
HPLC/MS/MS

V. Cvilink et al., Anal Bioanal Chem (2008) 391:337-343.

- redukce karbonylu
- glukosylace



moč  
HPLC/MS/MS



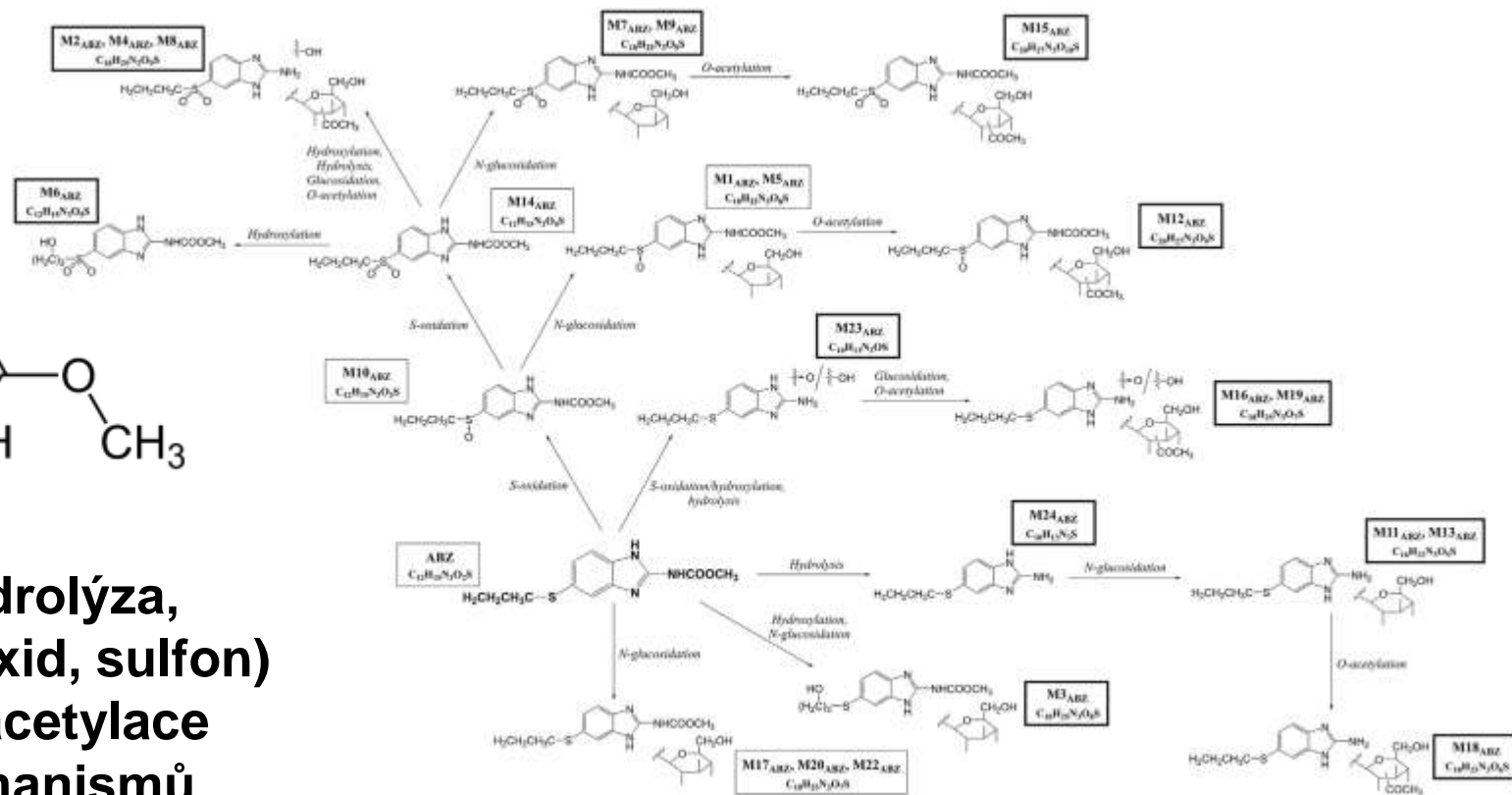
- redukce karbonylu
- hydrolýza, hydroxylace
- glukuronidace
- kombinace mechanismů

# Jaké metabolity lze očekávat



Campanula rotundifolia  
(zvonek okrouhlostý)

- anthelmintika vstupují do přírodního procesu přes trus a moč zvířat
- narušení rovnováhy ekosystému
- testování phytotoxicity a biotransformace anthelmintik
- deaktivace léčiv



- hydroxylace, hydrolýza,
- S-oxidace (sulfoxid, sulfon)
- glukosylace, O-acetylace
- kombinace mechanismů



# Studium metabolismu léčiv s využitím MS

Upravené biotransformační vzorky (plazma, moč, tkáně, kultivační médium, buňky, atd.)

**UHPLC** (RP fáze - C18 kolona, lineární gradient - vhodný pufr, ACN, MeOH), **informace o  $t_R$  metabolitů**

**Preparativní HPLC**  
(sbírání frakcí)

**Hmotnostní spektrometrie**  
výběr ionizace (ESI x APCI), oba módy polarity, vysoká správnost měření  $m/z$ , rozlišení, MS/MS, iontová mobilita

Syntéza standardů

Přímá infúze ( $MS^n$ )  
NMR (LC/NMR)  
Strukturní informace

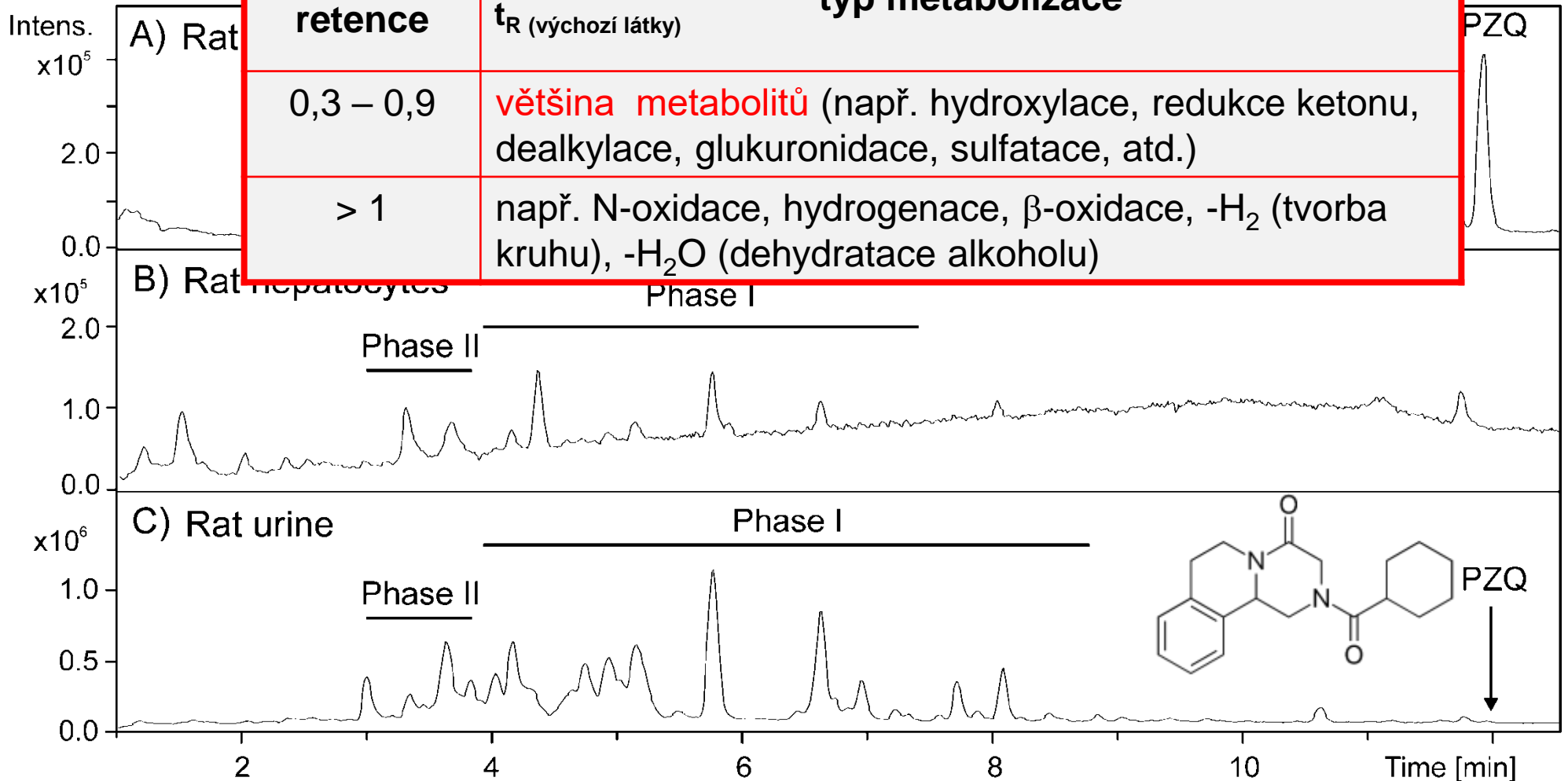
Kvantitativní informace  
ověřených metabolitů,  
ověření izomerů

rychlá kvalitativní informace

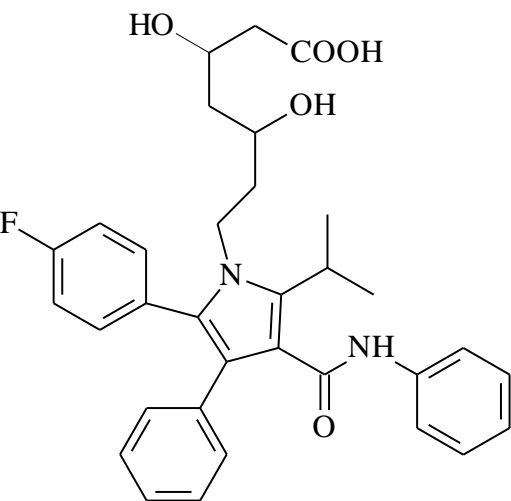
**Identifikace metabolitů je založena na stanovení elementárního složení metabolitů, interpretaci MS/MS spekter, retenčního chování, UV spekter z PDA detektoru, popř. informací z dalších spektrálních technik**

# Chromatografická retence v závislosti na polaritě

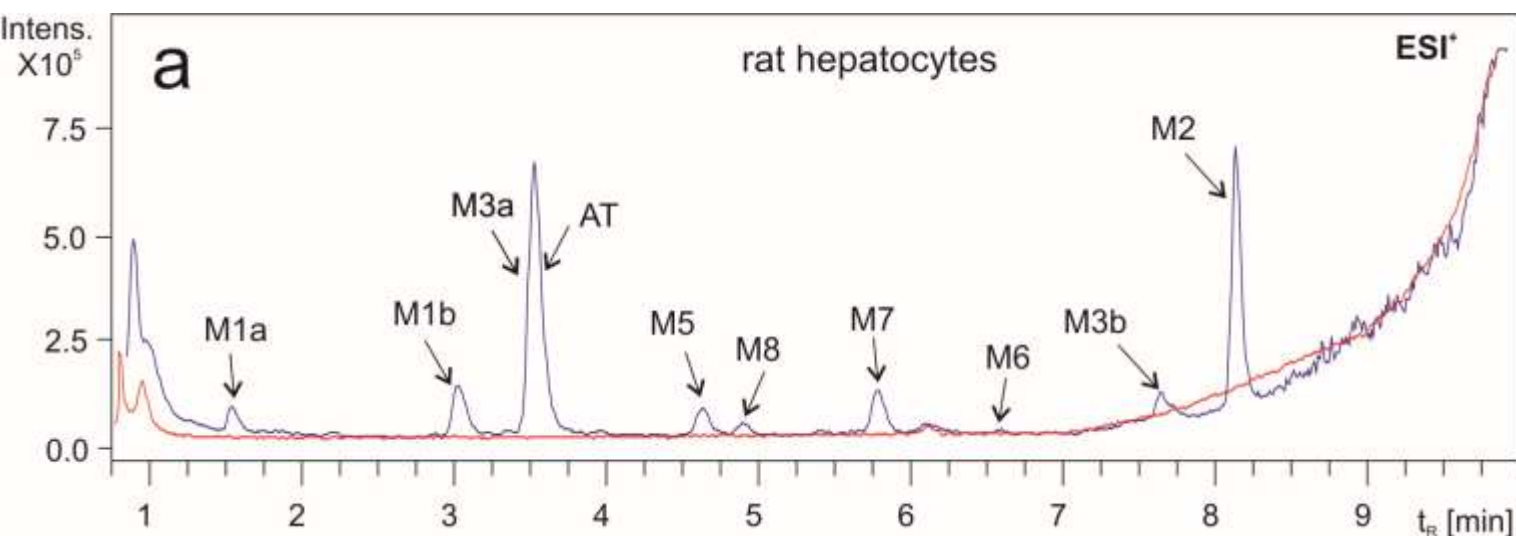
relativní retence	$\frac{t_R \text{ (metabolitu)}}{t_R \text{ (výchozí látky)}}$	typ metabolizace
0,3 – 0,9		<b>většina metabolitů</b> (např. hydroxylace, redukce ketonu, dealkylace, glukuronidace, sulfatace, atd.)
> 1		např. N-oxidace, hydrogenace, $\beta$ -oxidace, $-H_2$ (tvorba kruhu), $-H_2O$ (dehydratace alkoholu)



# Chromatografická retence v závislosti na polaritě

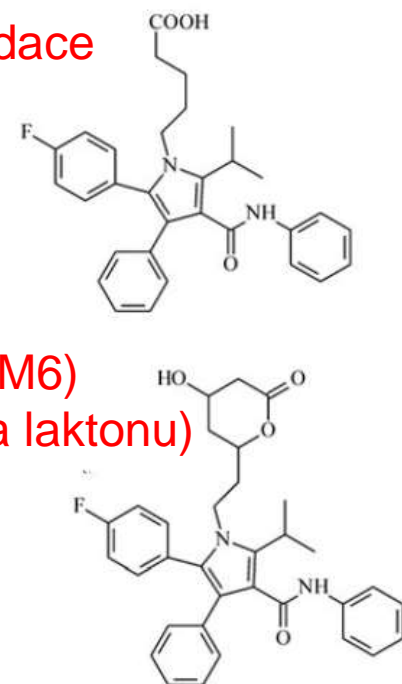


relativní retence	$\frac{t_R \text{ (metabolitu)}}{t_R \text{ (výchozí látky)}}$	typ metabolizace
0,3 – 0,9		většina metabolitů (např. hydroxylace, redukce ketonu, dealkylace, glukuronidace, sulfatace, atd.)
<b>&gt; 1</b>		např. N-oxidace, hydrogenace, <b><math>\beta</math>-oxidace</b> , $-H_2$ (tvorba kruhu), $-H_2O$ (dehydratace alkoholu)



$\beta$ -oxidace  
M2

$-H_2O$  (M6)  
(tvorba laktonu)



# Defekty atomových hmotností

Element	Nominal atomic mass [Da]	Mass defect [mDa]
H	1	+7.8
C	12	0
N	14	+3.1
O	16	-5.1
F	19	-1.6
Si	28	-23.1
P	31	-26.2
S	32	-27.9
Cl	35	-31.1
Br	79	-81.7
I	127	-95.5

## Nejběžnější metabolické reakce I. fáze

Nominal mass shift [ $\Delta$ Da]	Metabolic reaction (elemental composition change)	Exact mass shift [mDa]
-44	Decarboxylation (-CO <sub>2</sub> )	+10.2
-18	Alcohol dehydration (-H <sub>2</sub> O)	+10.6
-14	Demethylation (-CH <sub>2</sub> )	-15.7
-2	Ring formation (-H <sub>2</sub> )	-15.7
+2	Ring opening (+H <sub>2</sub> )	+15.7
+14	Hydroxylation and cyclization (+O-H <sub>2</sub> )	-20.7
+16	Hydroxylation (+O)	-5.1
	Epoxidation (+O)	-5.1
	Oxidation (+O)	-5.1
+34	Epoxidation and hydration (+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	+5.5

# Nejběžnější metabolické reakce II. fáze

Nominal mass shift [ $\Delta$ Da]	Conjugation reaction (elemental composition change)	Drug functional group	Exact mass shift [mDa]
+14	Methylation (+CH <sub>2</sub> )	NH <sub>2</sub> , OH, SH	+15.7
+42	Acetyl conjugation (+C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O)	NH <sub>2</sub> , NHNH <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> , OH	+10.6
+57	Glycine conjugation (+C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> ON)	COOH	+21.5
+79	Phosphorylation (+PO <sub>3</sub> )	OH	-41.5
+80	Sulfation (+SO <sub>3</sub> )	NH <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> , OH	-43.2
+162	Glucosylation (+C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	OH, COOH	+52.8
+176	Glucuronidation (+C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	OH	+32.1
+220	Indirect carbamate glucuronidation of amines (+C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub> )	NH <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	+21.9
+306-X	Glutathione conjugation – halide substitution (-X+C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub> S)	Halide (X)	+76.0
+305	Glutathione conjugation <i>via</i> epoxidation (+C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub> S)	Aromatic	+68.2

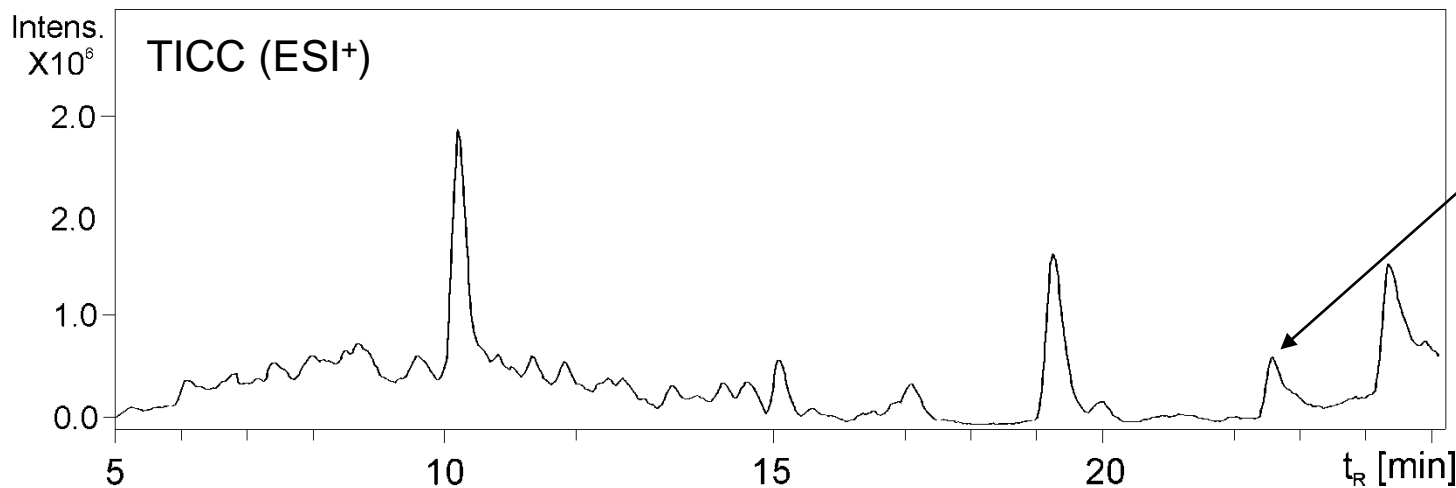
- V review celkem popsáno 54 metabolických reakcí I. fáze a 25 reakcí II. fáze

*M. Holčapek, L. Kolářová, M. Nobilis, Anal. Bioanal. Chem, 216 (2008) 1962*

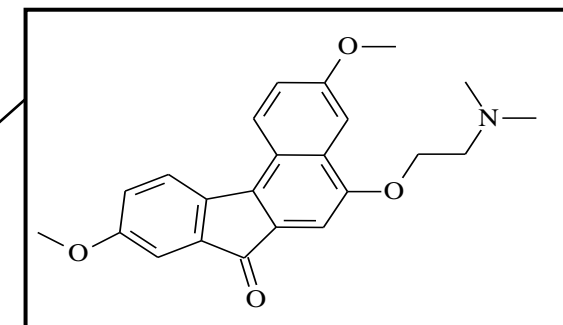
# Filtrování informací z LC/MS a LC/MS/MS dat

- Z chromatogramu celkového iontového proudu (TICC) v **LC/MS** a **LC/MS/MS** analýze (pokud očekáváme určité typy iontů např. metabolity léčiv, degradační produkty, deriváty, atd.)
  - extrakce pouze určitých iontových proudů (určitých  $m/z$ ), tzn. chromatogramy rekonstruovaných (extrahovaných) iontových proudů (RIC neboli EIC)
  - extrakce takových produktových spekter, ve kterých se vyskytuje určitá neutrální ztráta (charakteristická pro určité typy sloučenin), tzn. chromatogramy konstantních neutrálních ztrát (pouze u LC/MS/MS)

# Extrakce chromatogramu konstantní neutrální ztráty z LC/MS/MS záznamu

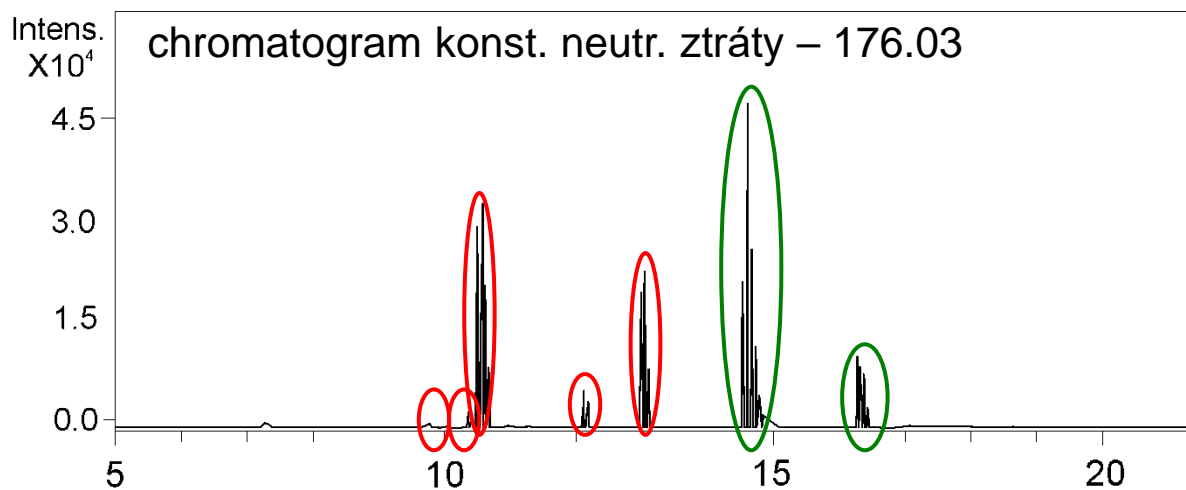


studované léčivo  
(dimefluron)



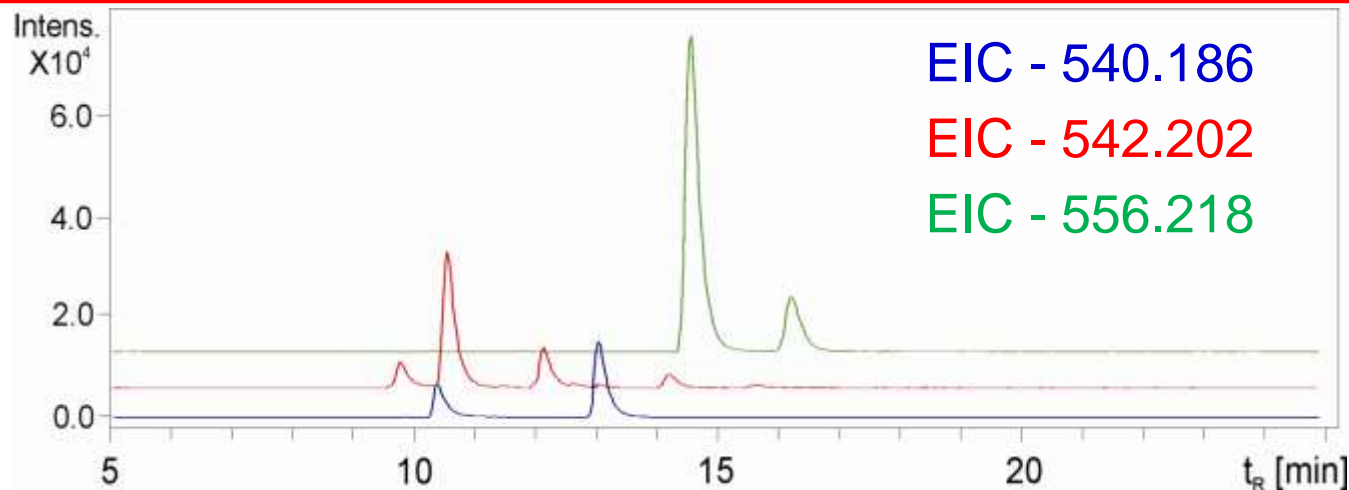
$\Delta m/z$  176.03 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) – typické pro glukuronidy

nalezené glukuronidy



t <sub>R</sub> [min]	[M+H] <sup>+</sup>	Elementární složení metabolitů	Chyba určení [ppm]
9.8	542,2026	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	0.9
10.4	540,1861	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>10</sub>	-0.6
10.6	542,2013	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	-1.5
12.2	542,2015	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	-1.1
13.1	540,1851	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	-2.4
14.6	556,2174	C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>10</sub>	-0.5
16.2	556,2181	C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>10</sub>	0.7

# EIC chromatogramy

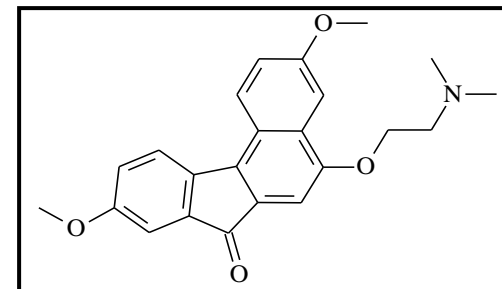


Fáze I

-CH<sub>2</sub> → demethylace  
+H<sub>2</sub> → redukce karbonylu

Fáze II

+C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> → glukuronidace

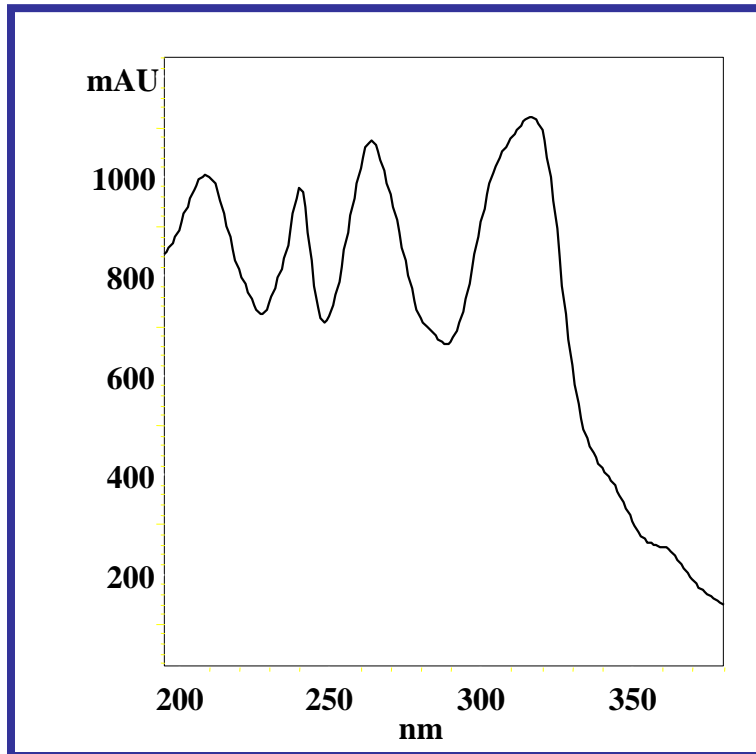
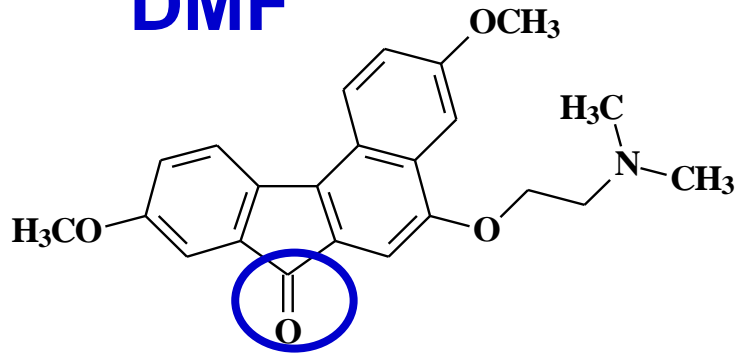


MW	Elementární složení				
	Glukuronid	Neutrální ztráta - 176	Metabolit I. fáze	Parentní sloučenina	Rozdíl
539	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>10</sub>	- C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	- C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	-CH <sub>2</sub>
541	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>		C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>		C (-CH <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> )
555	C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>10</sub>		C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>		+H <sub>2</sub>

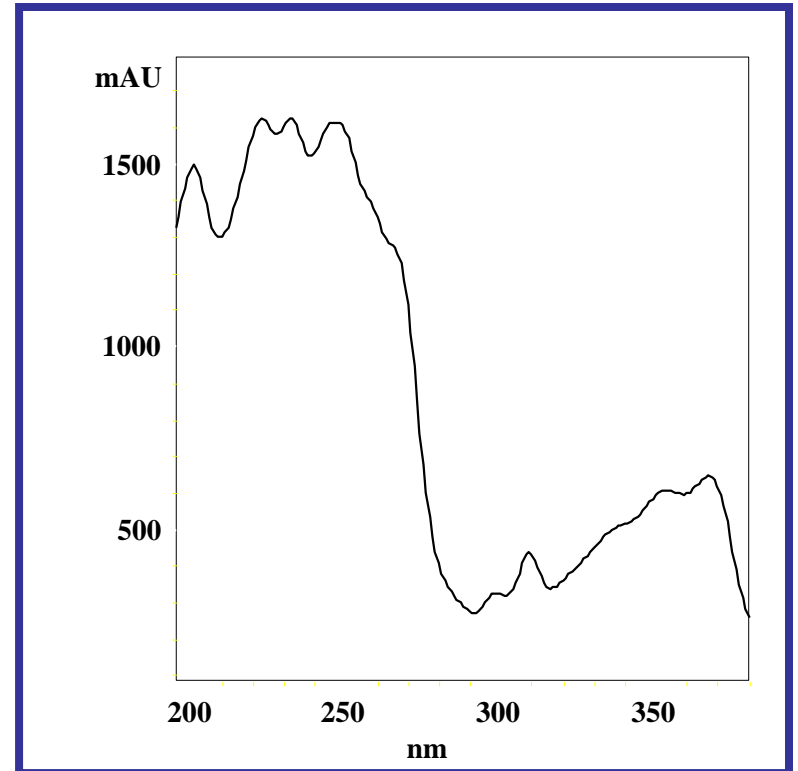
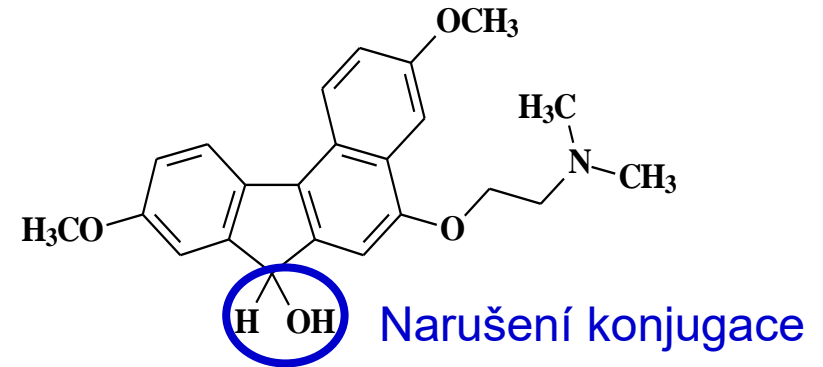


# Kombinace s dalšími technikami např. UV spektra

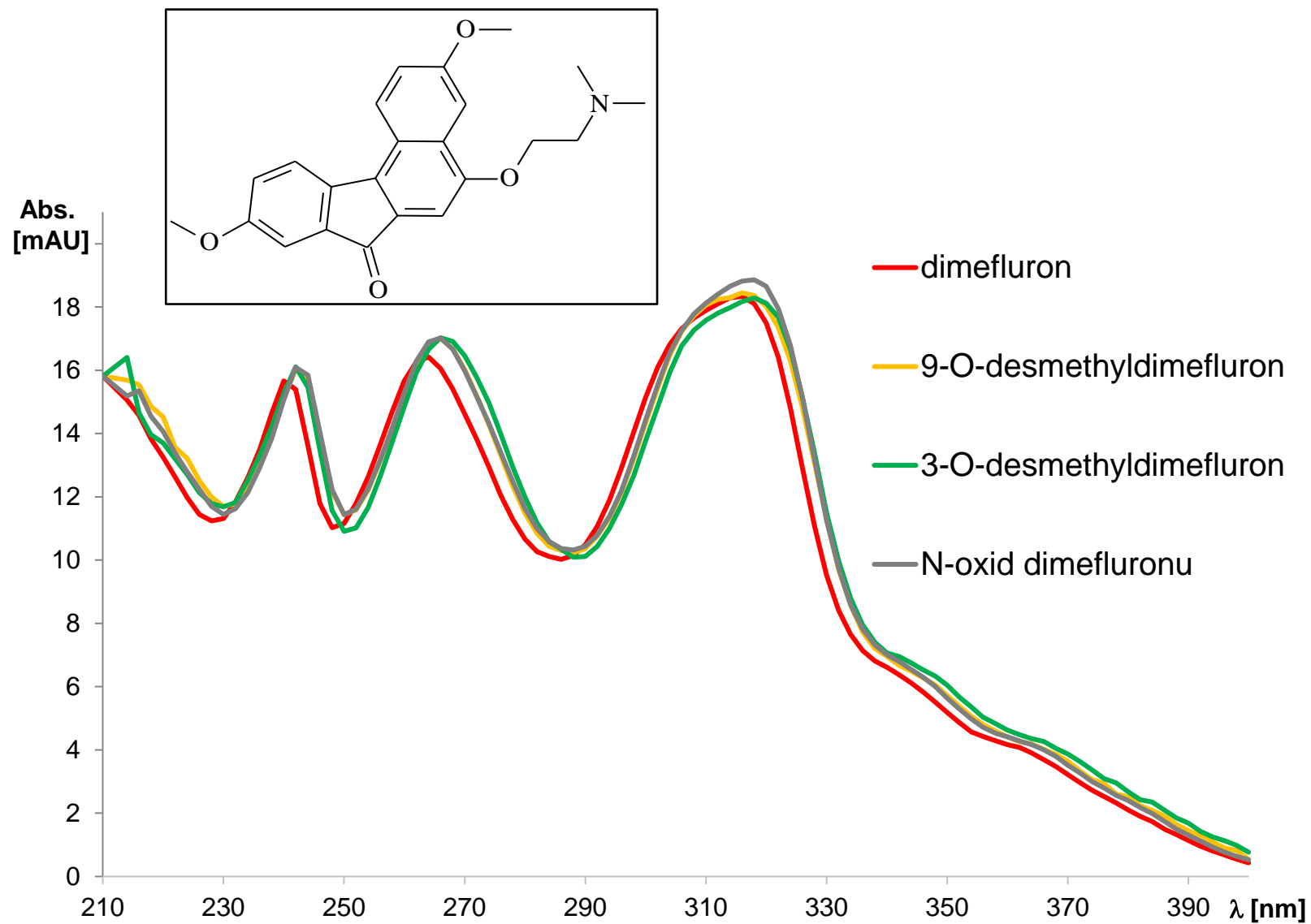
## DMF



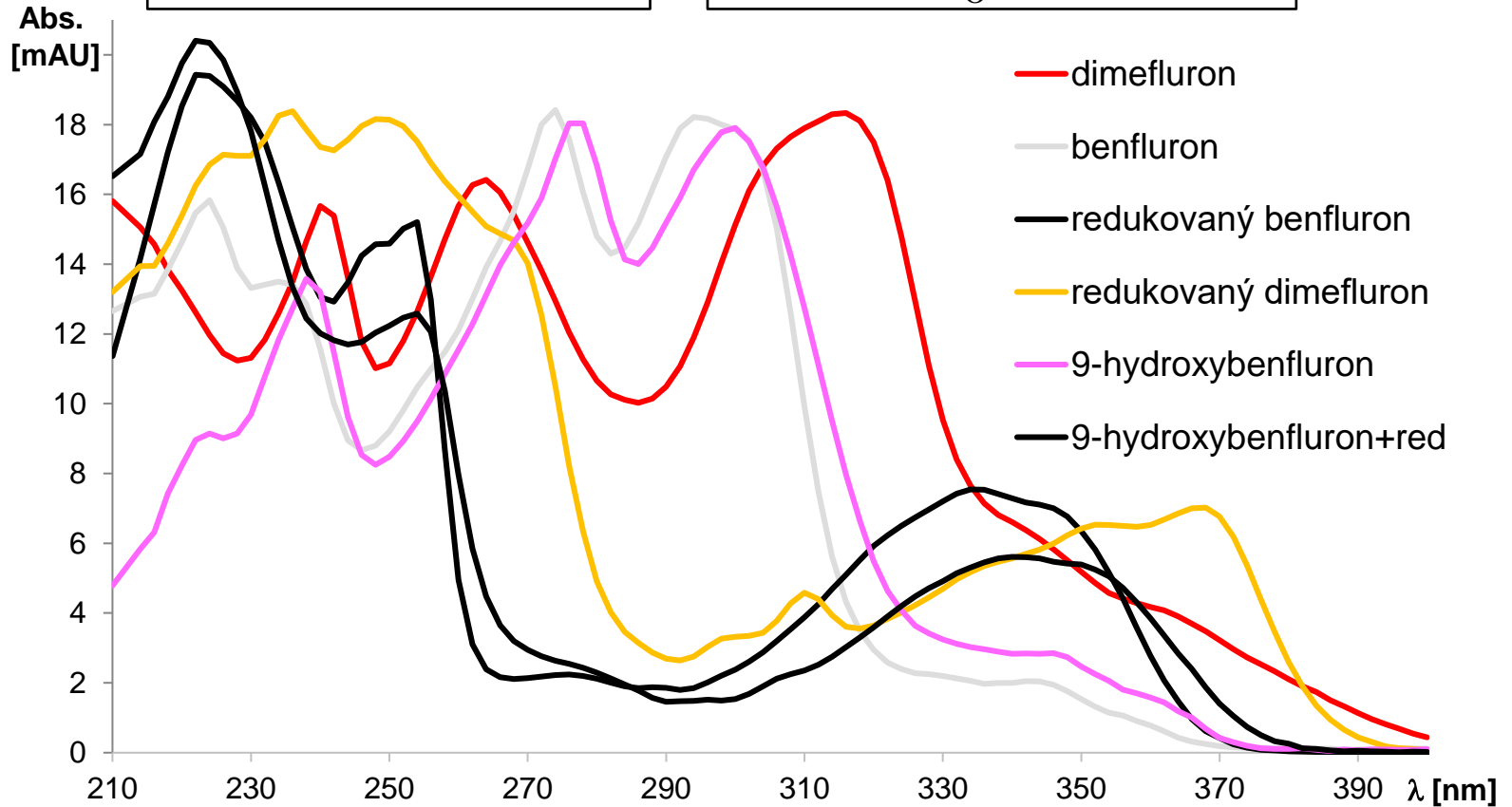
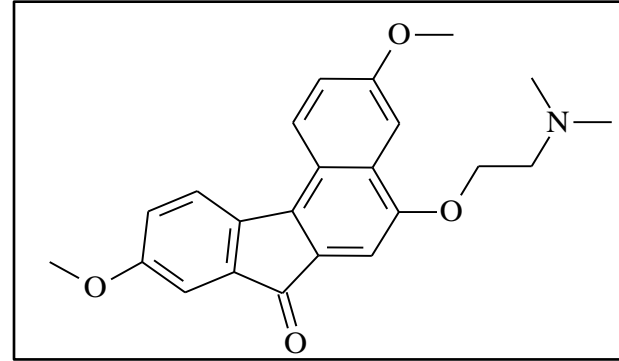
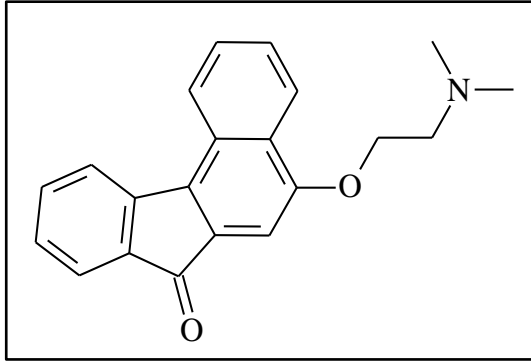
## Redukovaný DMF



# Vliv metabolizace na UV spektra

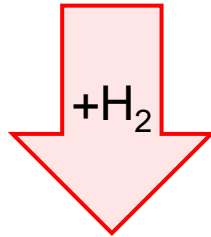
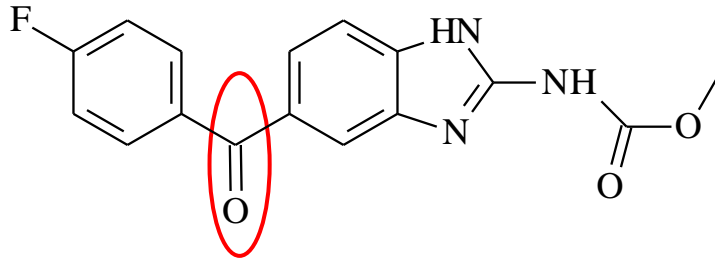


# Vliv metabolizace na UV spektra



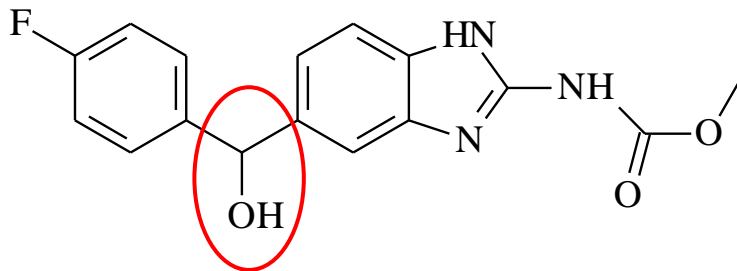
# Biotransformace – identifikace enantiomerů

flubendazol  
 $C_{16}H_{12}N_3O_3F$   
MW=313

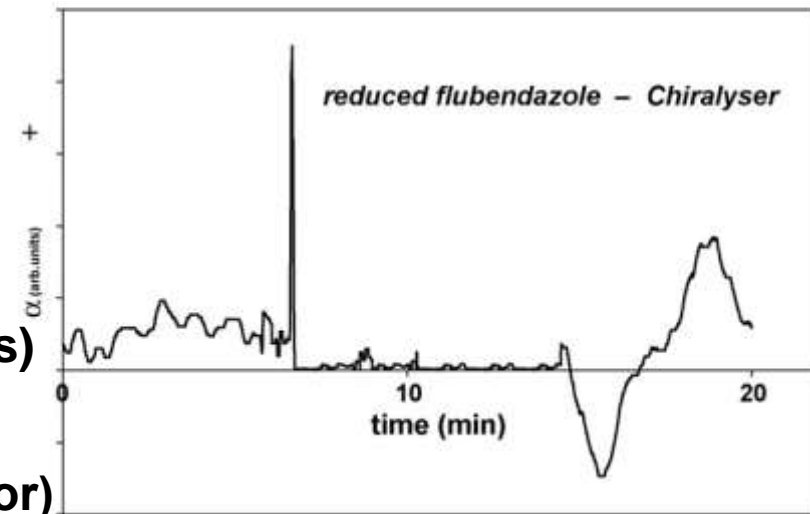
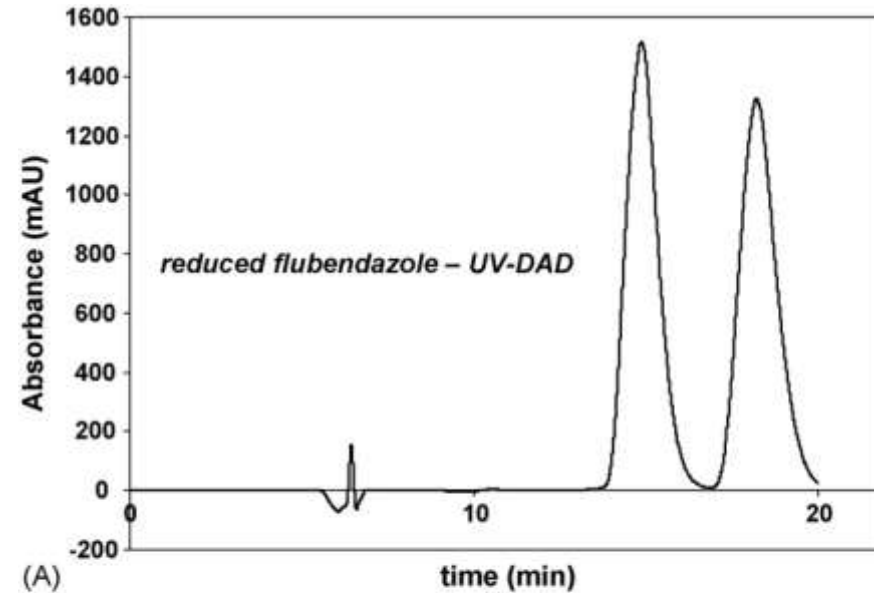


2 enantiomery

redukovaný  
flubendazol  
 $C_{16}H_{14}N_3O_3F$   
MW=315



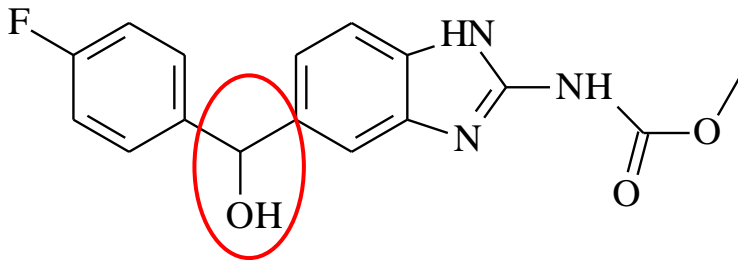
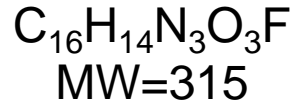
chirální separace



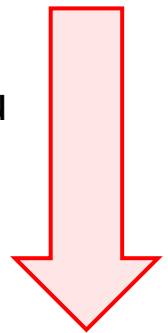
- reduktivní metabolismus
- MS nerozliší chirální izomery (kineticky – R.G Cooks)
- nutná chirální separace nebo iontová mobilita (standards enantiomerů nebo polarimetrický detektor)

# Biotransformace – identifikace diastereoizomerů

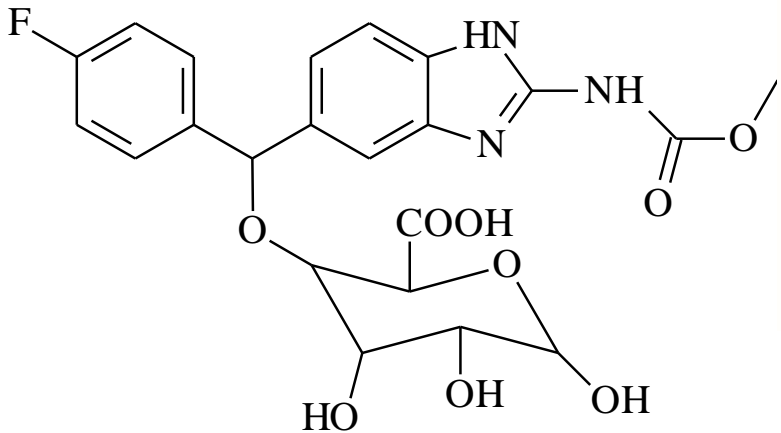
redukovaný flubendazol



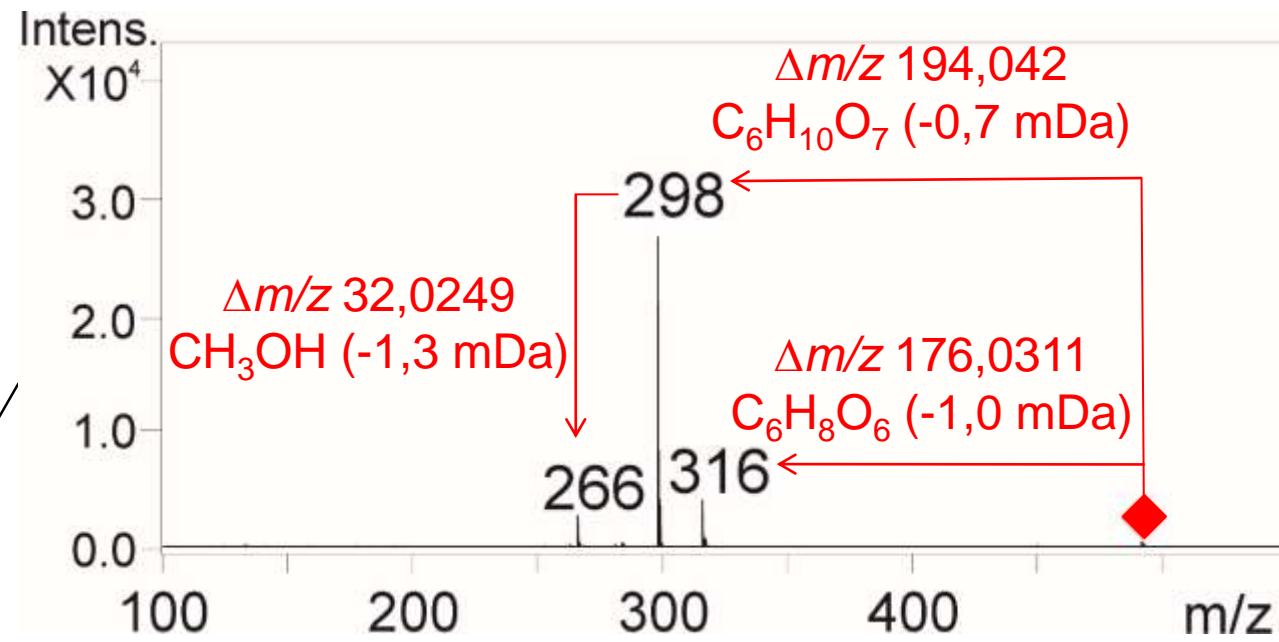
konjugace s kyselinou glukuronovou



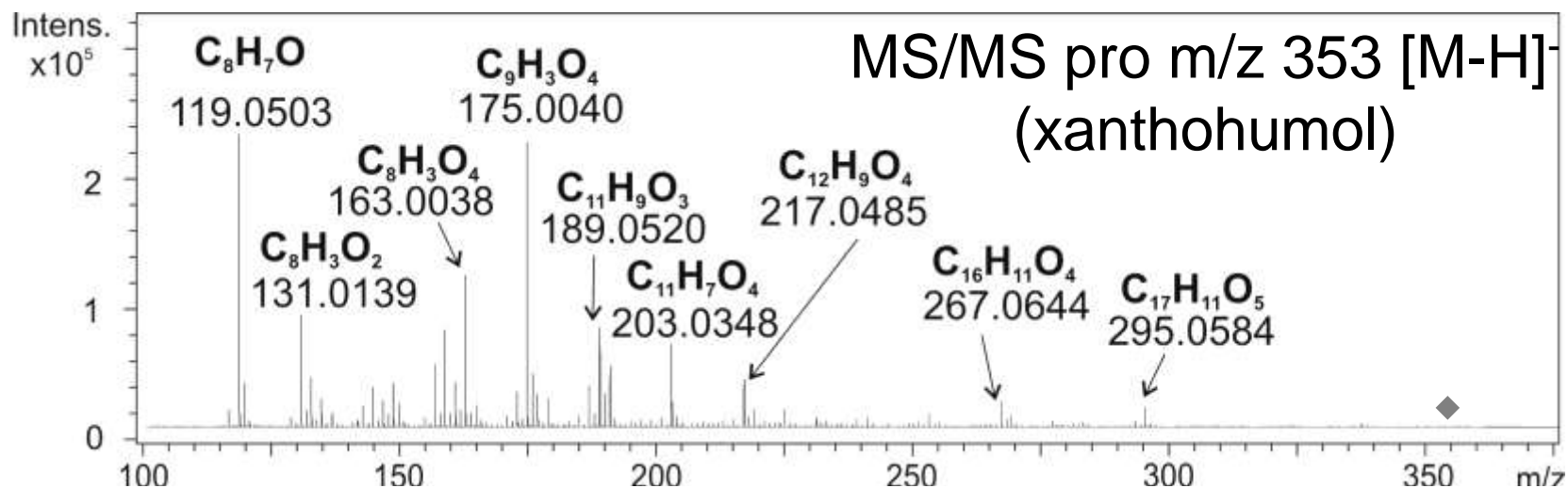
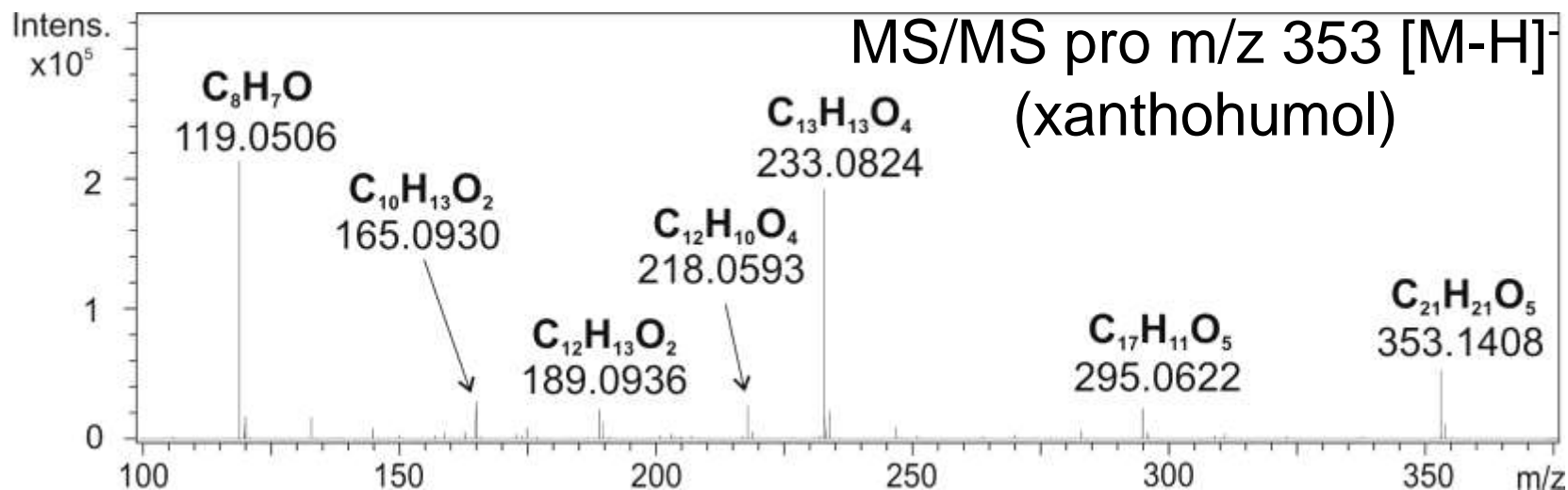
(+  $C_6H_{10}O_7 - H_2O$ )  
2 diastereoizomery



- $FLU + H_2 + C_6H_8O_6$
- Jeden chromatografický pík pro metabolity I. fáze
- Dva píky pro metabolity II. fáze
- diastereoizomery lze rozdělit v RP systémech
- Poměr intenzity určitých fragmentových iontů v MS/MS může být pro diastereoizomery rozdílný

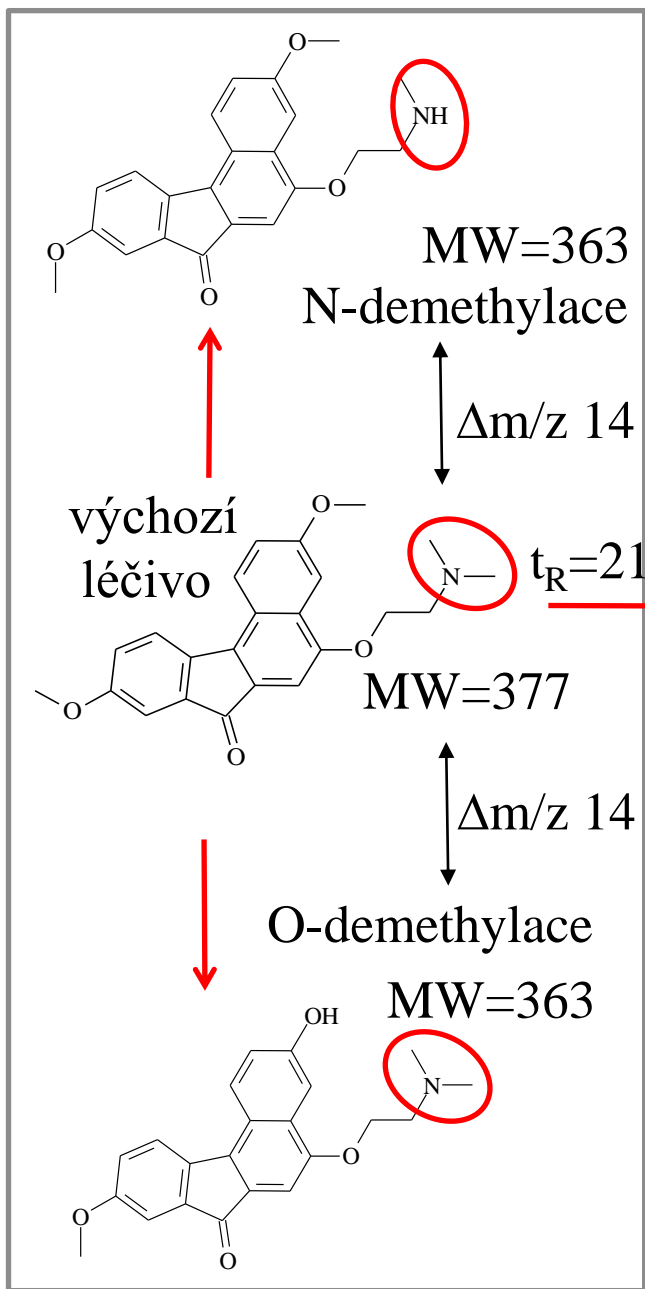


# Měření tandemových hmotnostních spekter



!!! kolizní energii při fragmentaci - spektra se mohou výrazně lišit

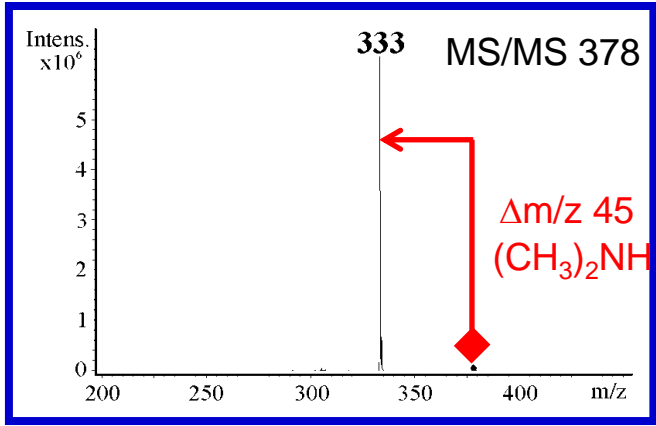
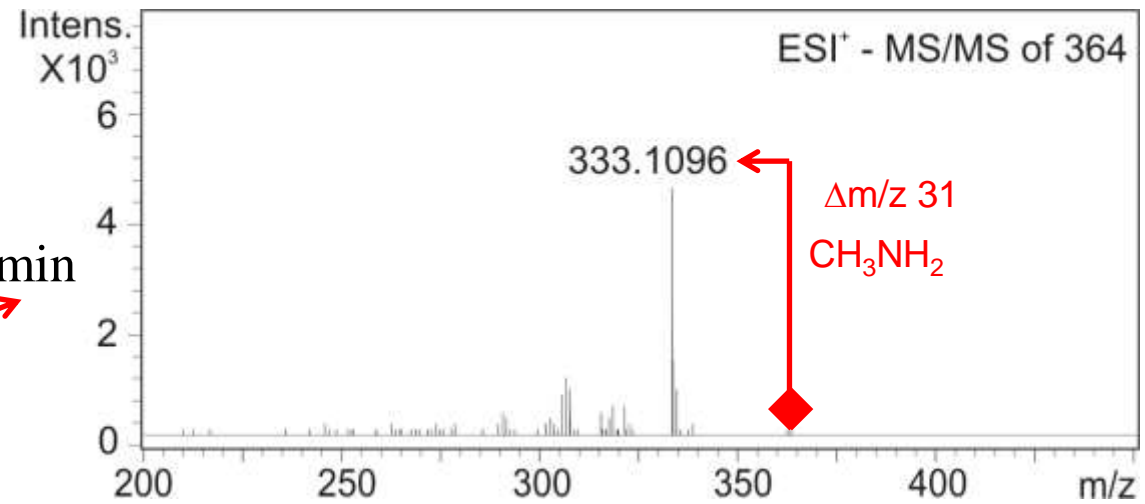
# O jaké metabolity se jedná?



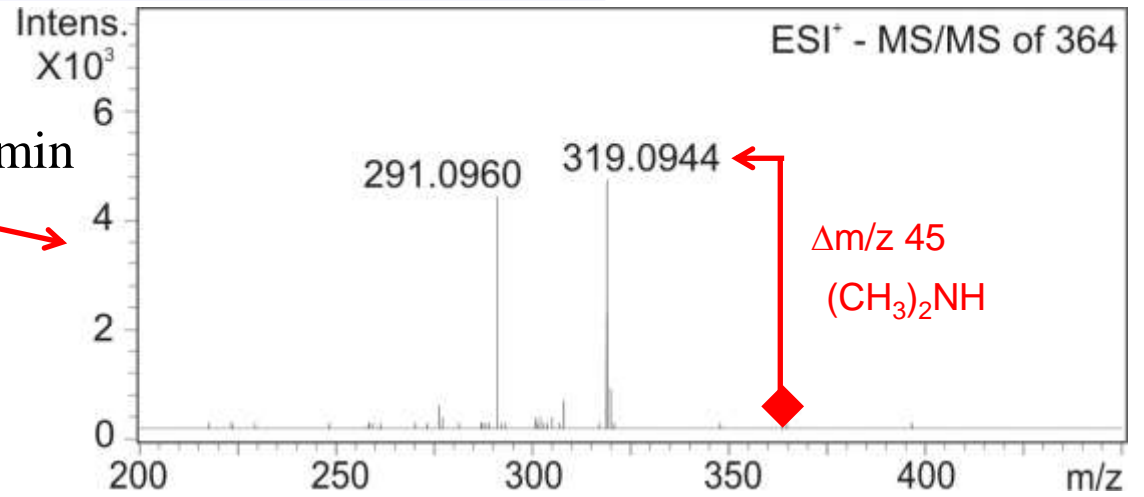
$t_R = 21,1$  min

$t_R = 21,7$  min

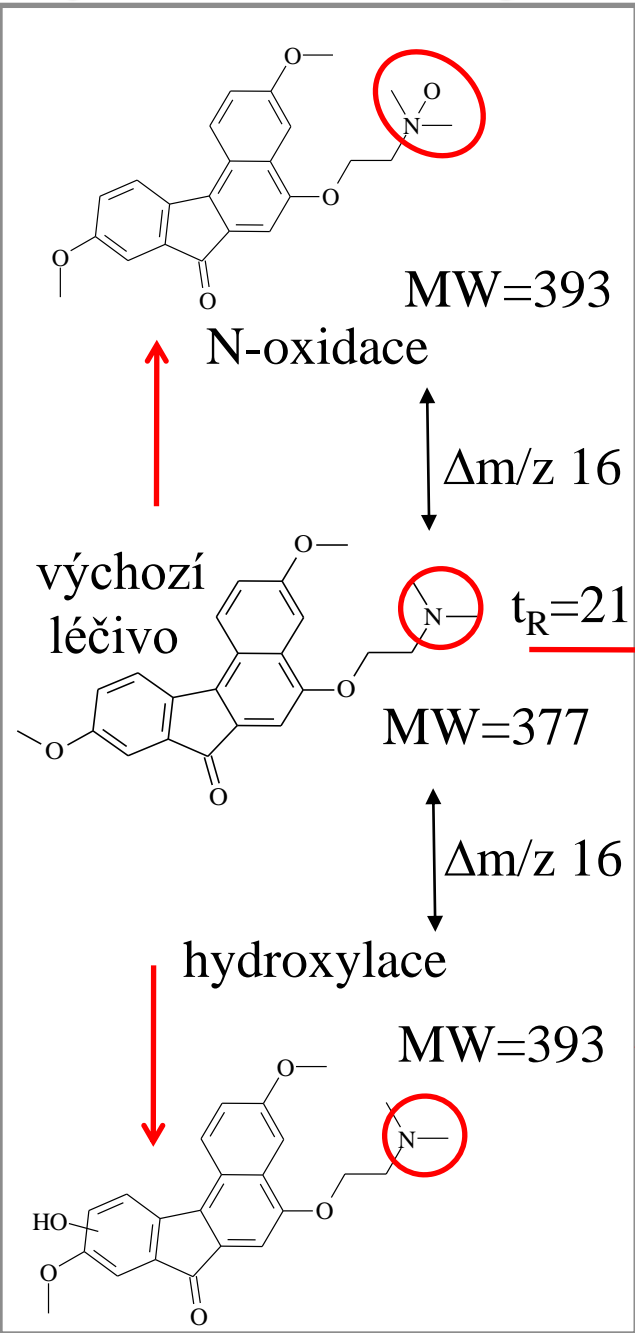
$t_R = 13,8$  min



Oba metabolity mají stejné elementární složení - jejich rozlišení na základě retence (standards) nebo MS/MS



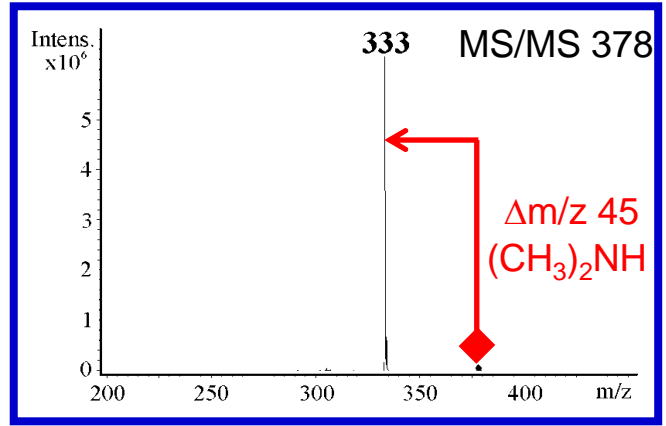
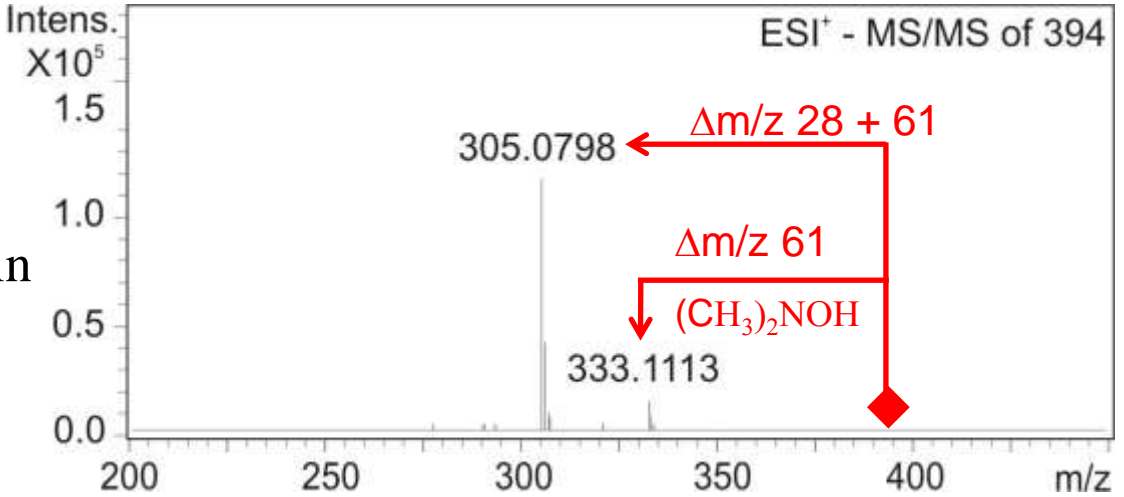
# O jaké metabolity se jedná?



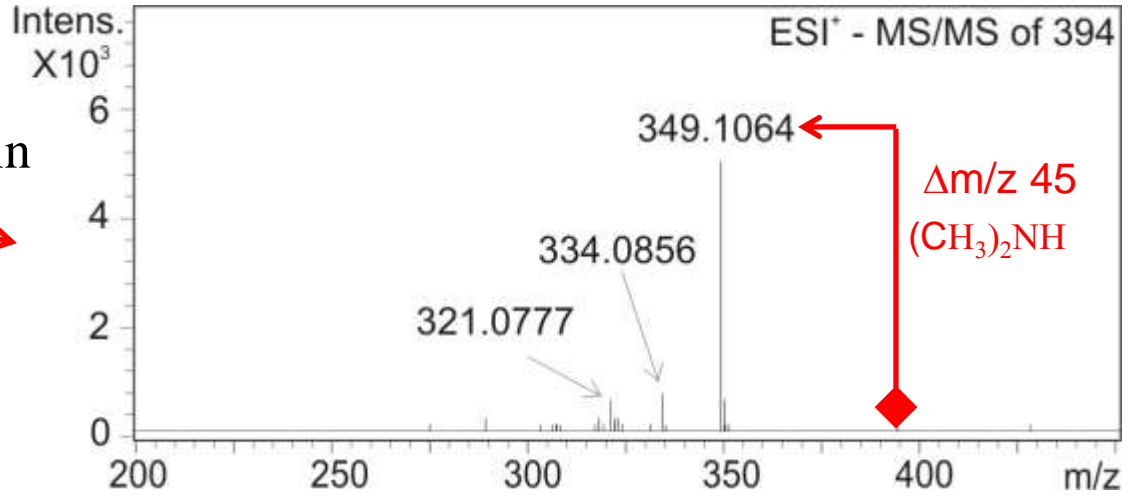
$t_R = 23,4$  min

$t_R = 21,7$  min

$t_R = 13,7$  min

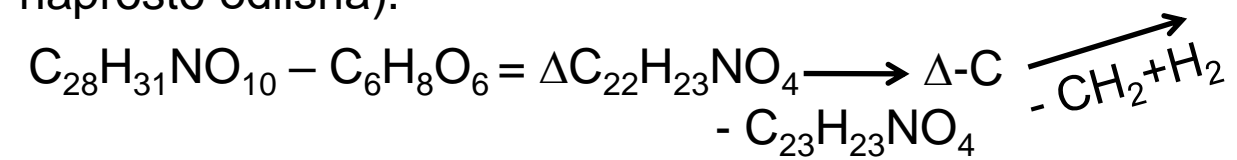


Oba metabolity mají stejné elementární složení - jejich rozlišení na základě retence (standarty) nebo MS/MS



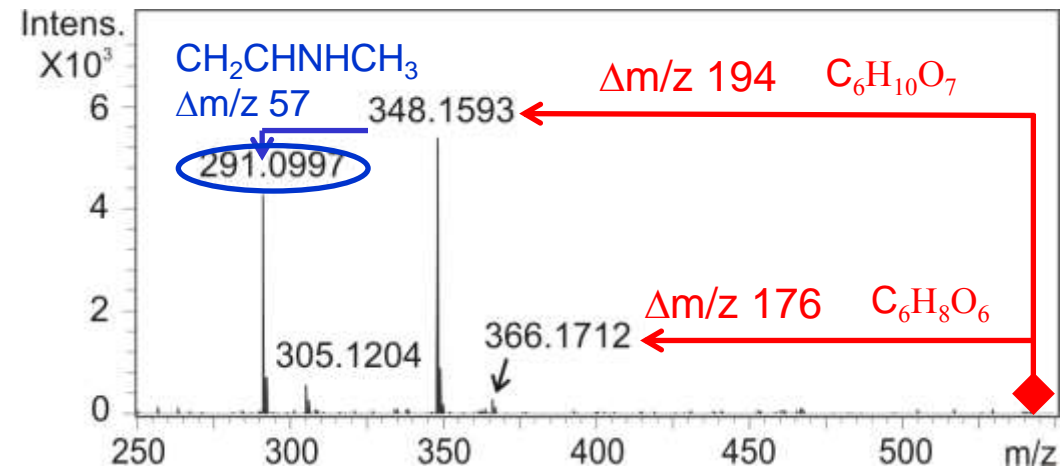
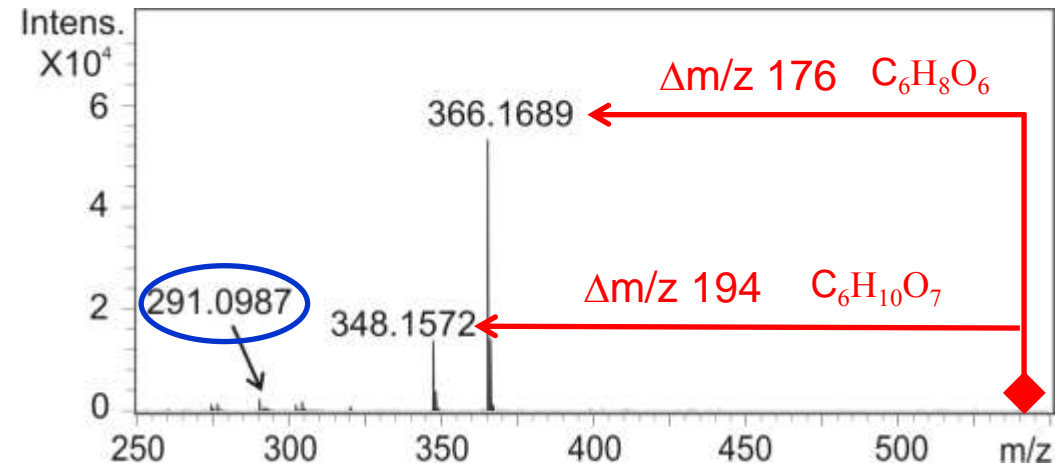
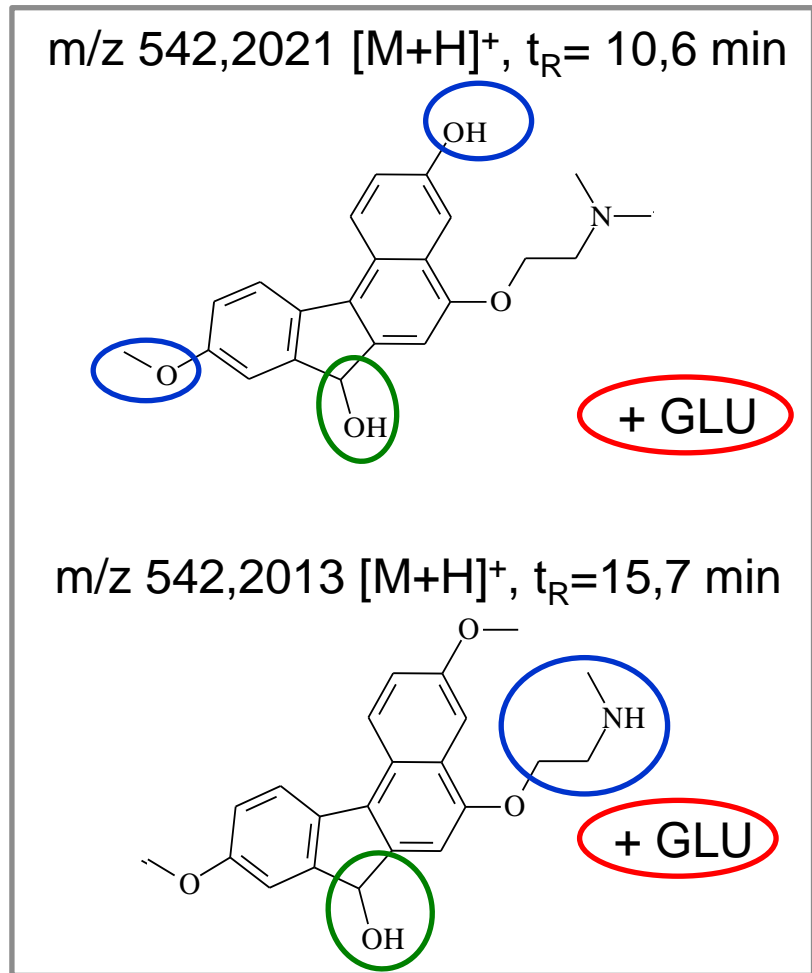


**Zadání:** V LC/HR-MS záznamu vzorku plasmy potkana, kterému bylo perorálně podáno léčivo dimefluron ( $C_{23}H_{23}NO_4$ ,  $t_R=21,7$  min) byly nalezeny dva metabolity o stejném elementárním složení  $C_{28}H_{31}NO_{10}$ . O jaké metabolity se jedná? (UV spektra výchozí látky a metabolitů jsou naprosto odlišná).

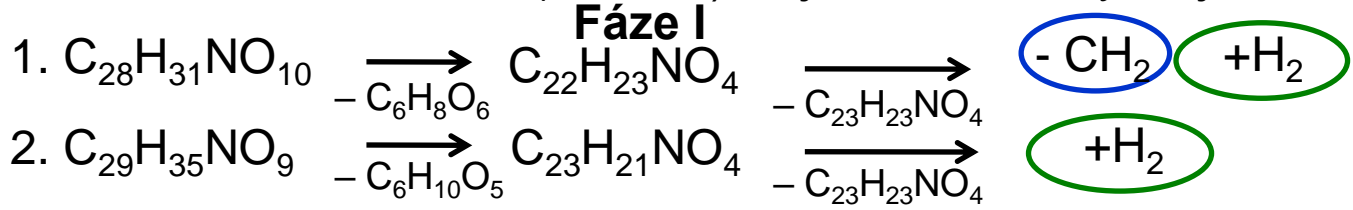


Fáze I: **redukce karbonylu**  
**demethylace**

Fáze II: **glukuronidace**

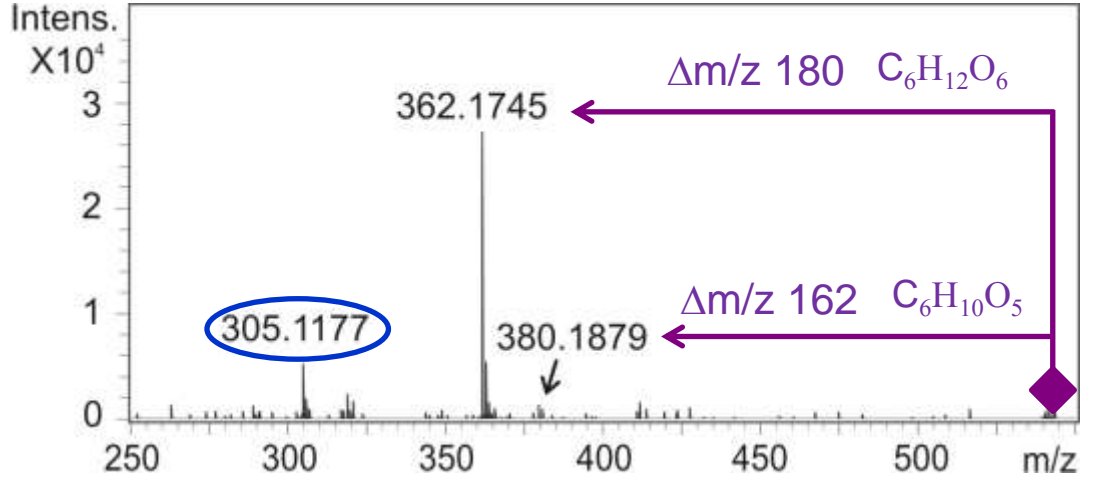
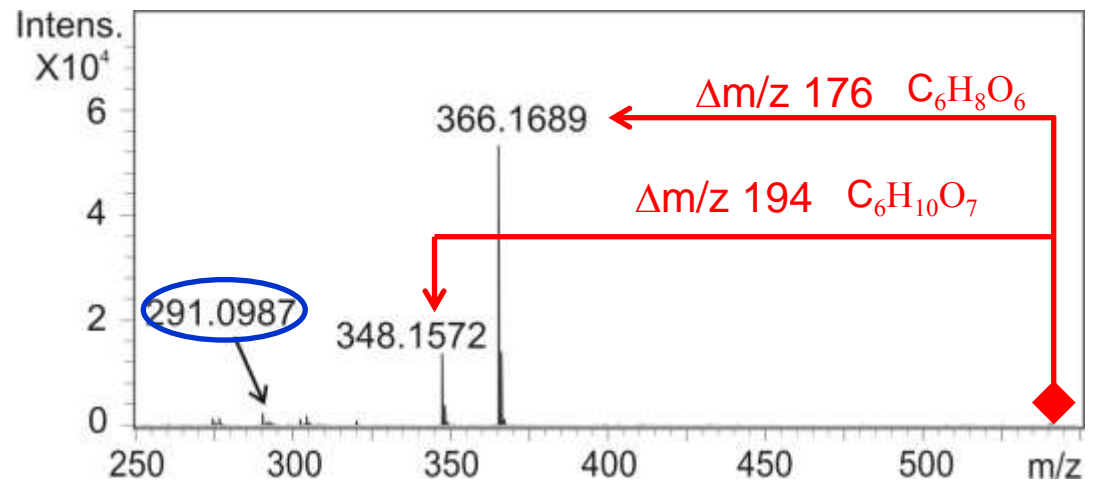
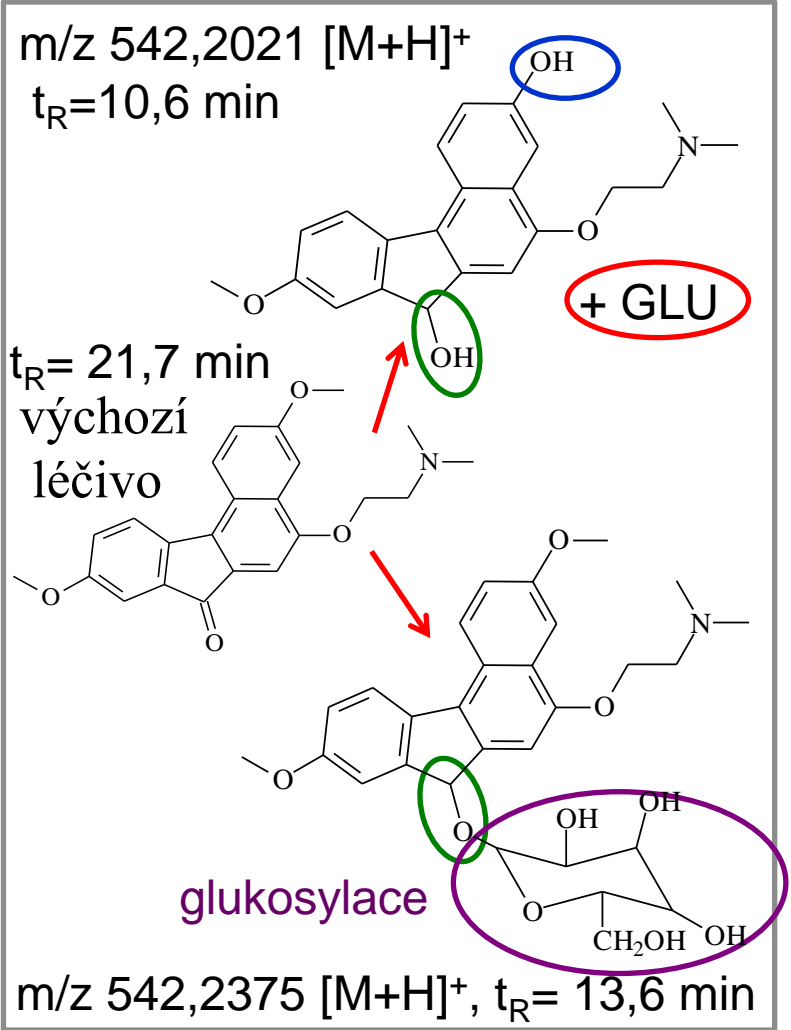


**Zadání:** V LC/HR-MS záznamu vzorku plasmy potkana, kterému bylo perorálně podáno léčivo dimefluron ( $C_{23}H_{23}NO_4$ ) byly nalezeny dva metabolity (MW=541). Na základě HR-MS měření různé elementární složení (viz níže). O jaké metabolity se jedná?



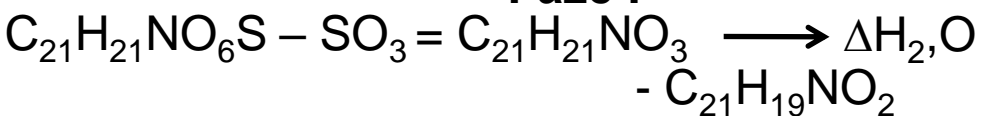
**Fáze II:** glukuronidace

**Fáze II:** glukosylace



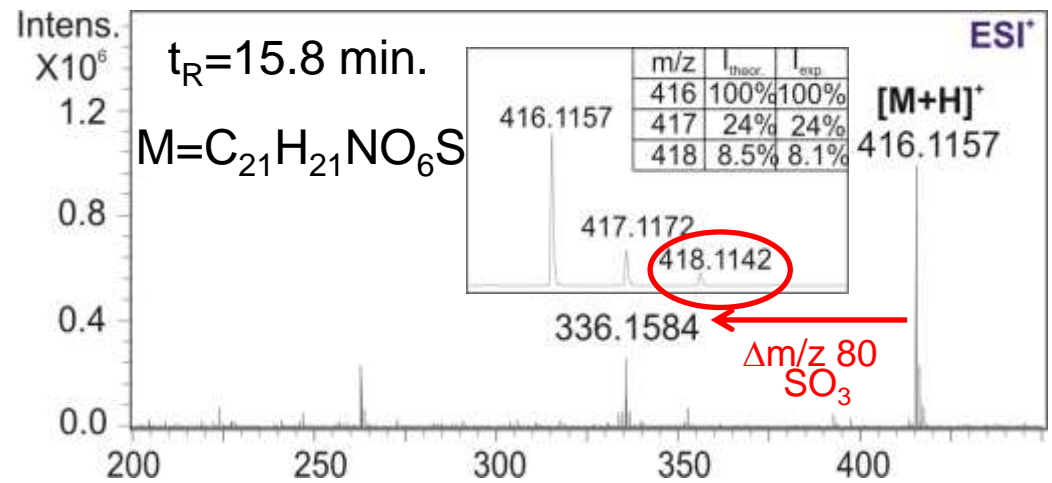
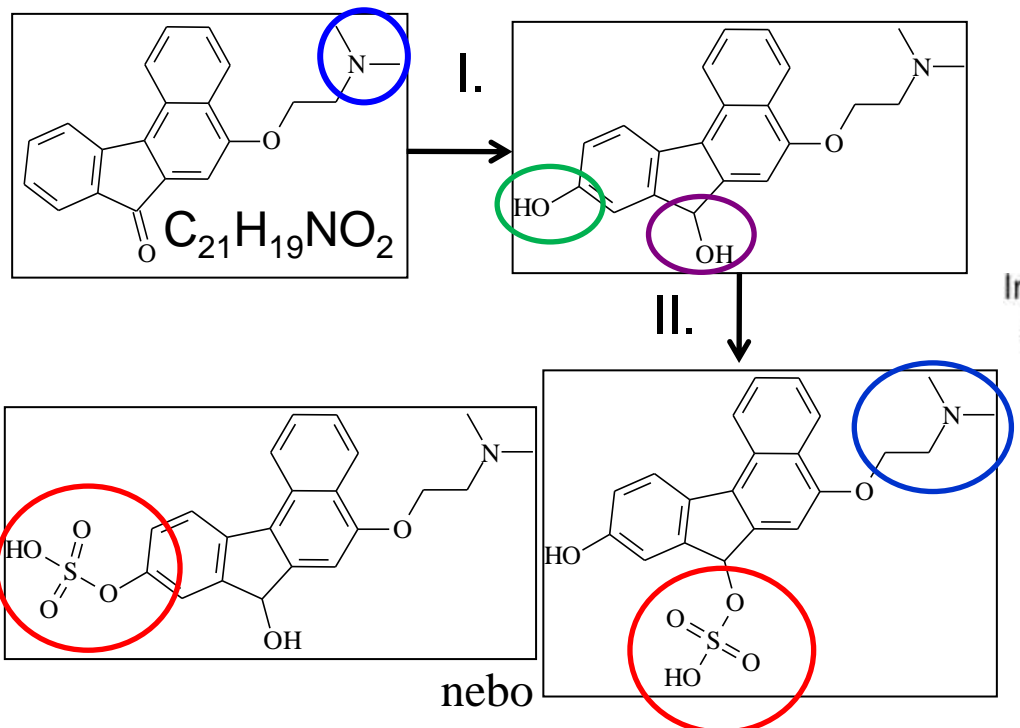
**Výchozí zadání:** V LC/HR-MS záznamu vzorku plasmy potkana, kterému bylo perorálně podáno léčivo benfluron ( $C_{21}H_{19}NO_2$ ,  $t_R=23,7$  min) byl nalezen metabolit o elementárním složení  $C_{21}H_{21}NO_6S$ . O jaký metabolit se jedná?

**Fáze I**

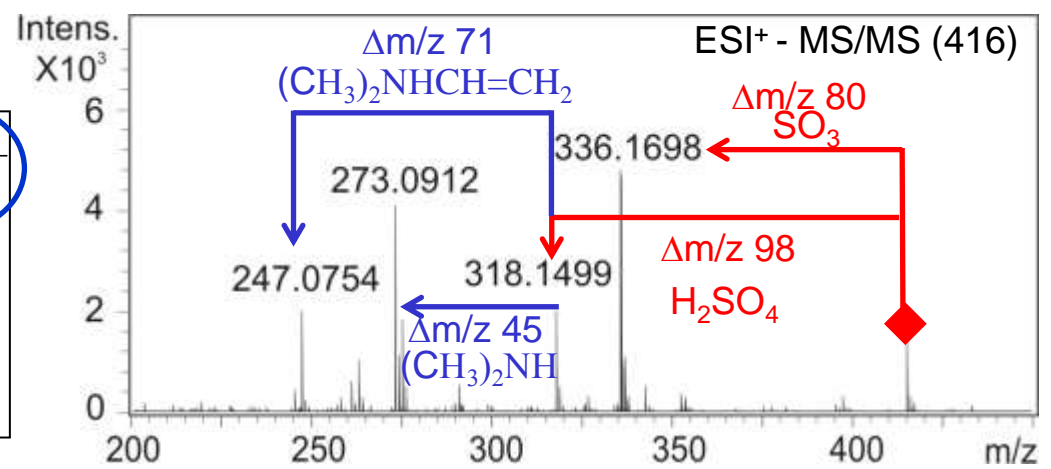


Fáze I: hydroxylace, redukce karbonylu

Fáze II: sulfatace



Kdyby byly 2\*O místo S, M+2 izotop by měl 4.3%

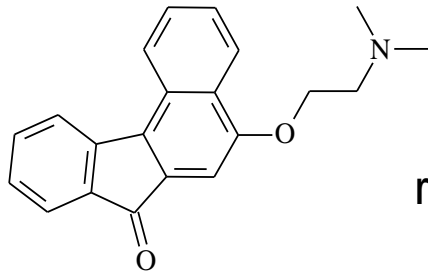


# Vícenásobná glukuronidace

$m/z$  674  $[M+H]^+$ ,  $t_R=8,5$  min.  $\longrightarrow$   $C_{32}H_{35}NO_{15}$

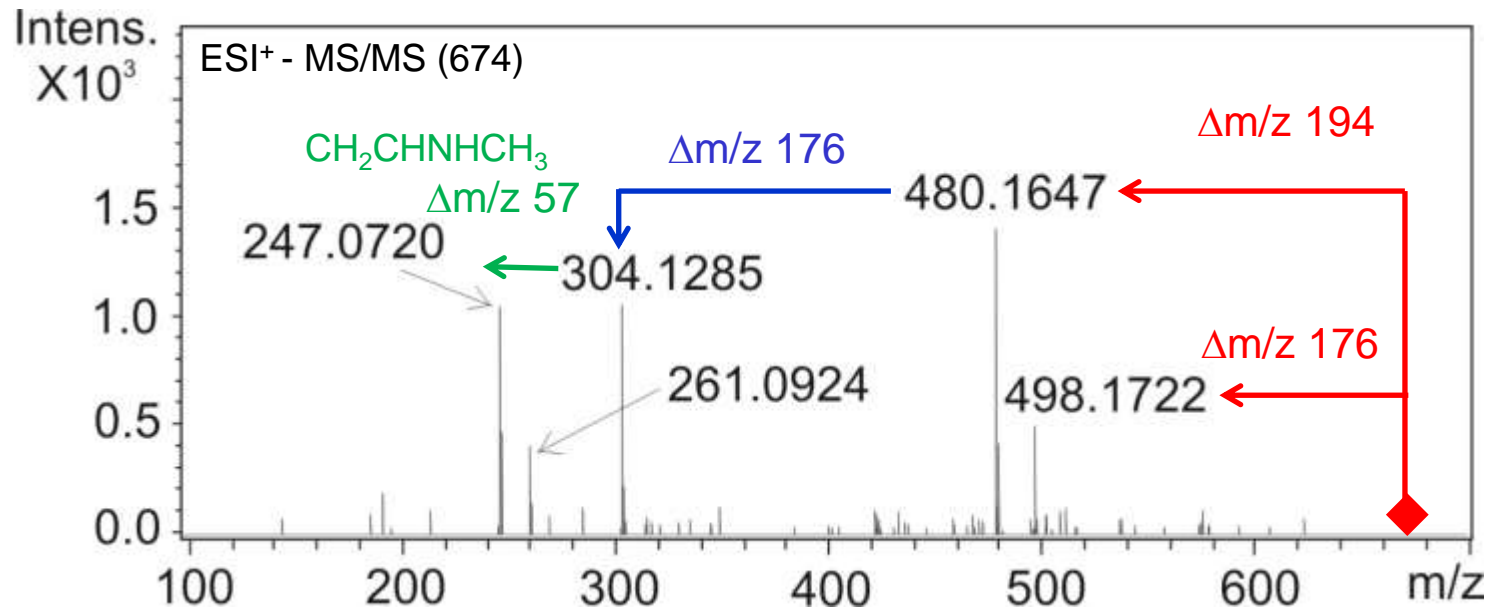
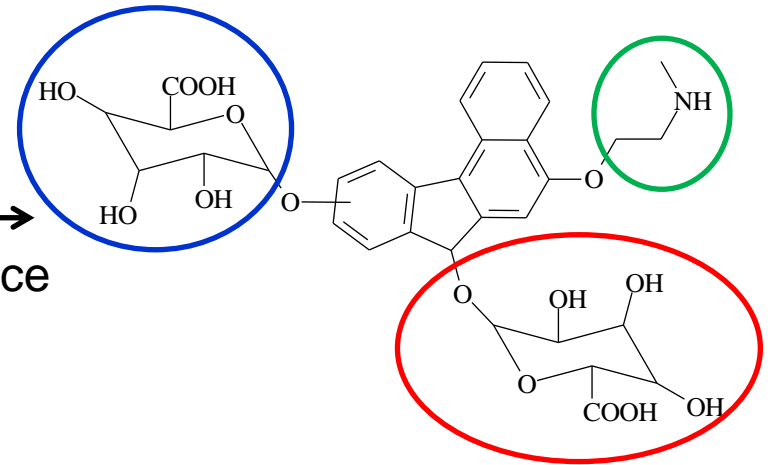
Nízký retenční (0,36)

benfluron



2\*glukuronidace

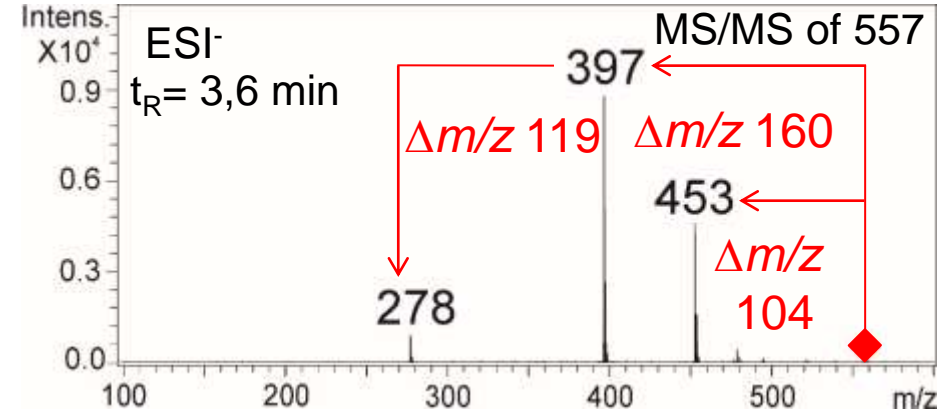
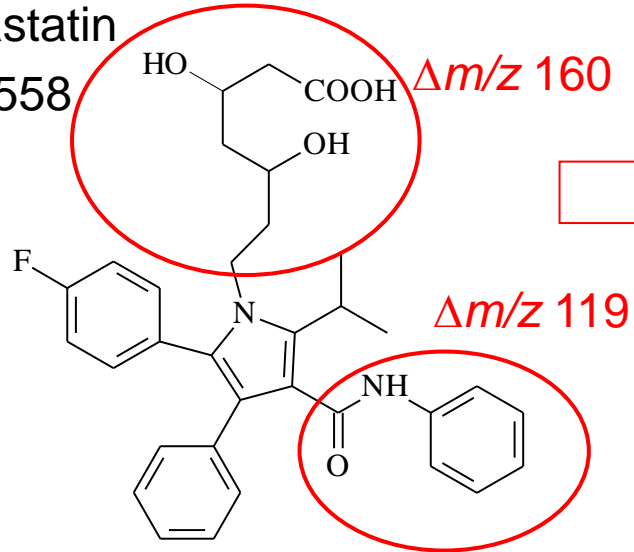
redukce karbonylu, hydroxylace  
demethylace



# V jaké části molekuly došlo ke změně?

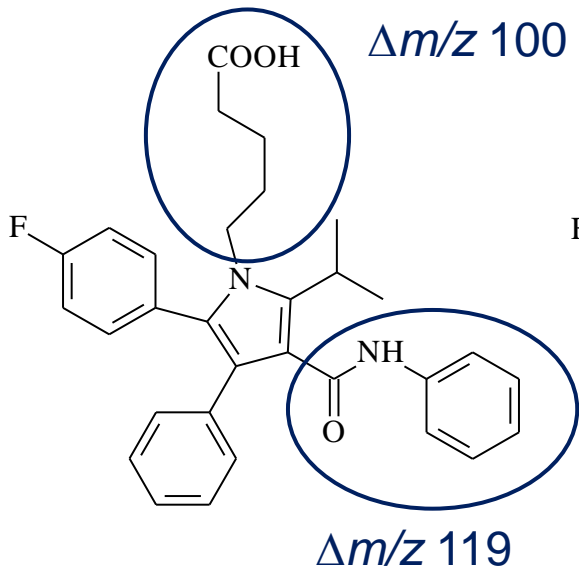
atorvastatin

M=558



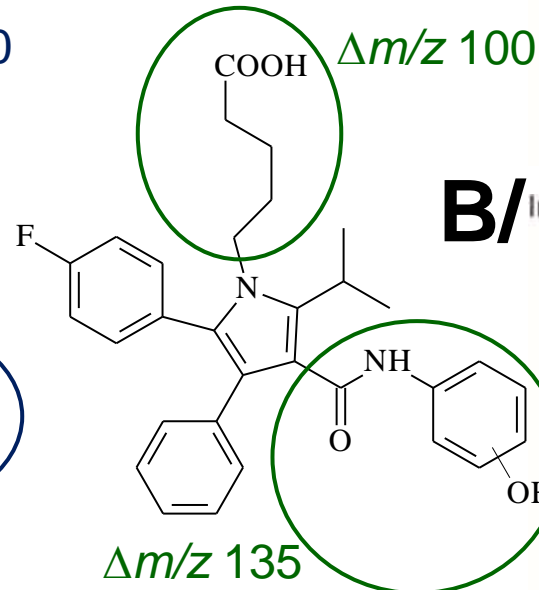
$\beta$ -oxidace

M=498

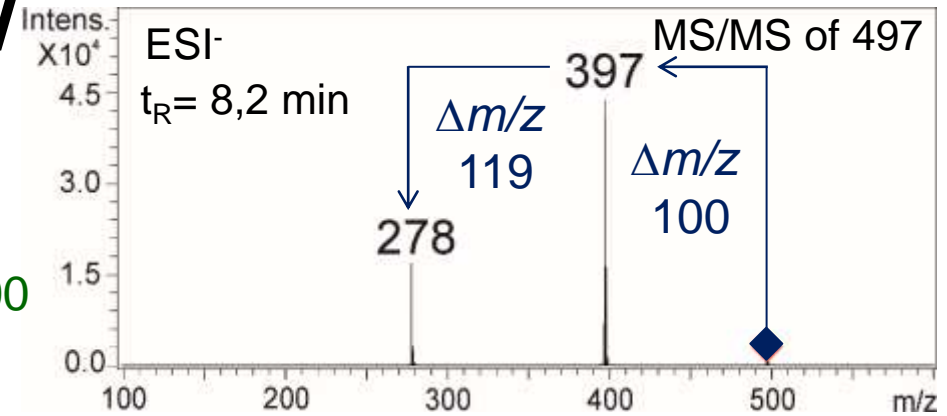


$\beta$ -oxidace + hydroxylace

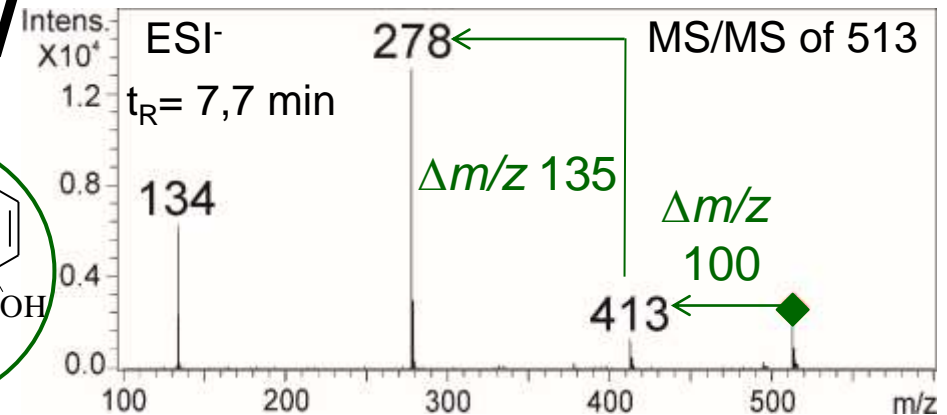
M=514



**A/**

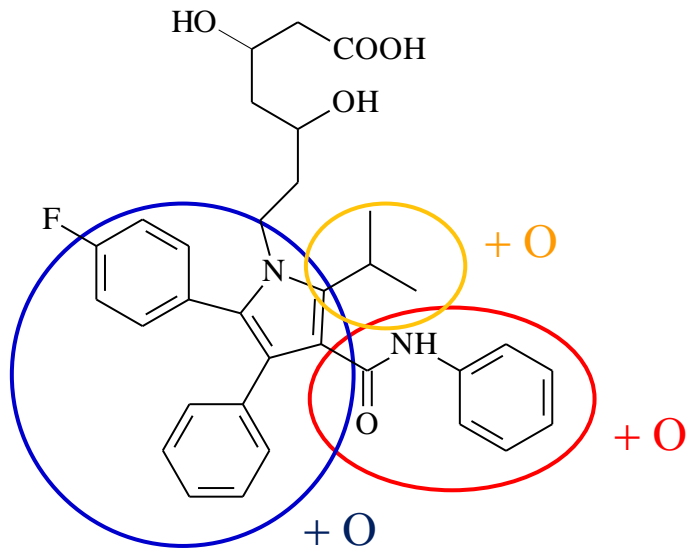


**B/**

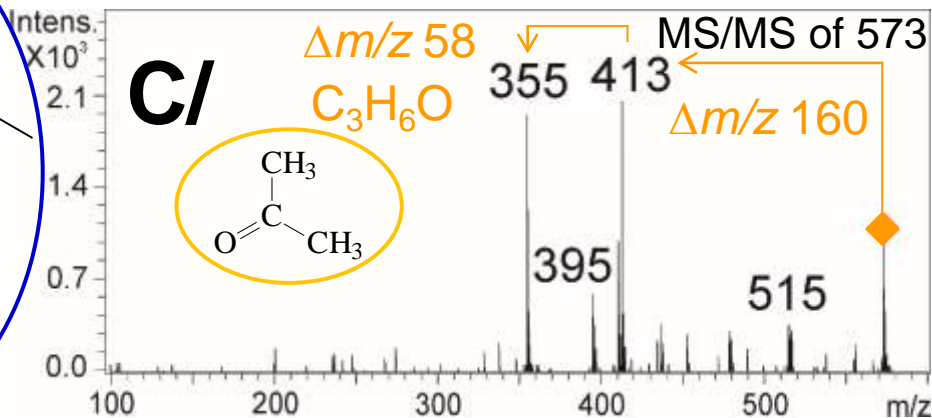
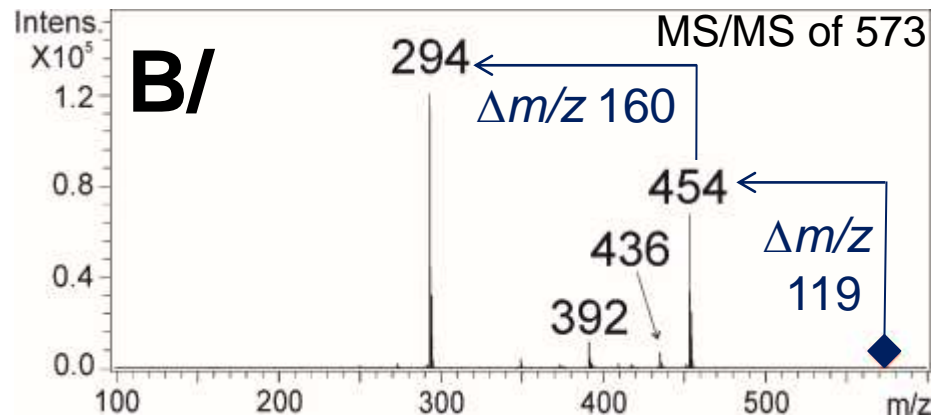
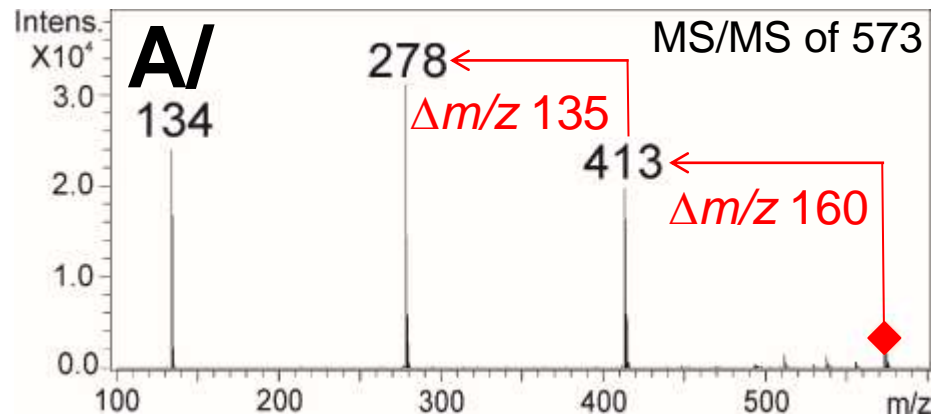
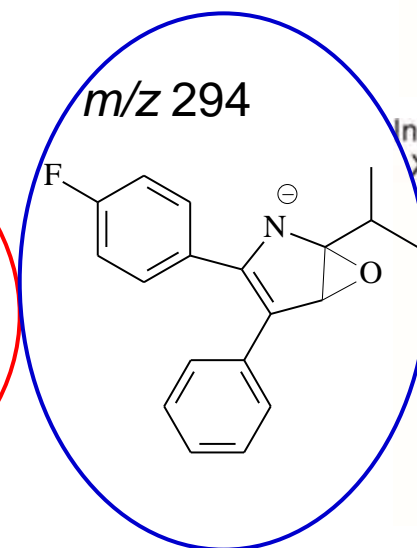
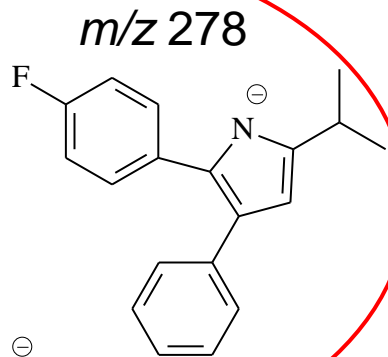
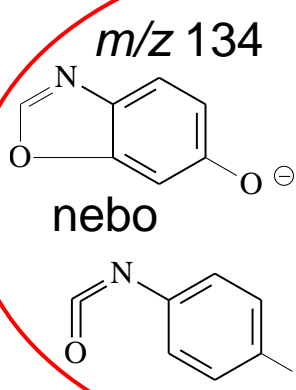


# V jaké části molekuly došlo k oxidaci?

M=574,  $C_{33}H_{35}N_2O_6F$  = atorvastatin + O  
(Kde proběhla oxidace?)



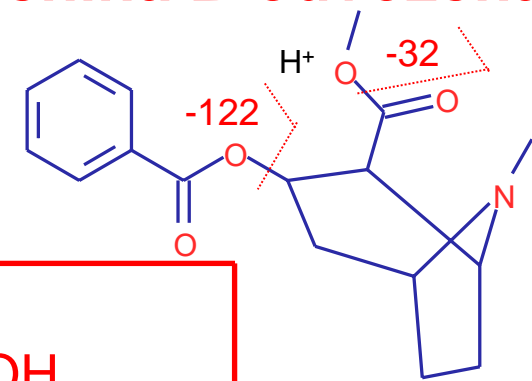
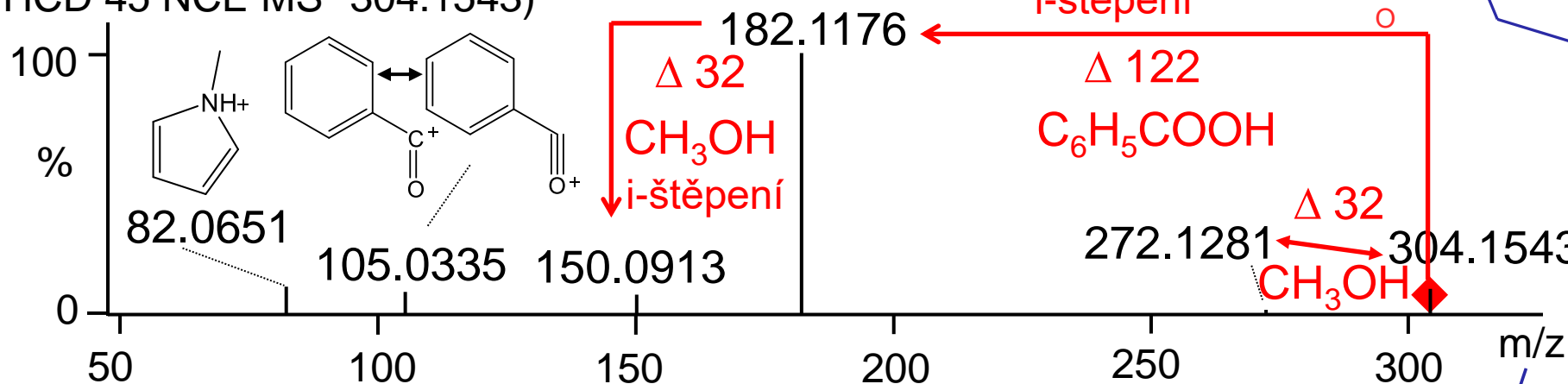
Struktury produktových iontů



# #16/ Vysvětlete ionty a rozhodněte, zda-li je sloučenina B odvozená od sloučeniny A (kokainu)

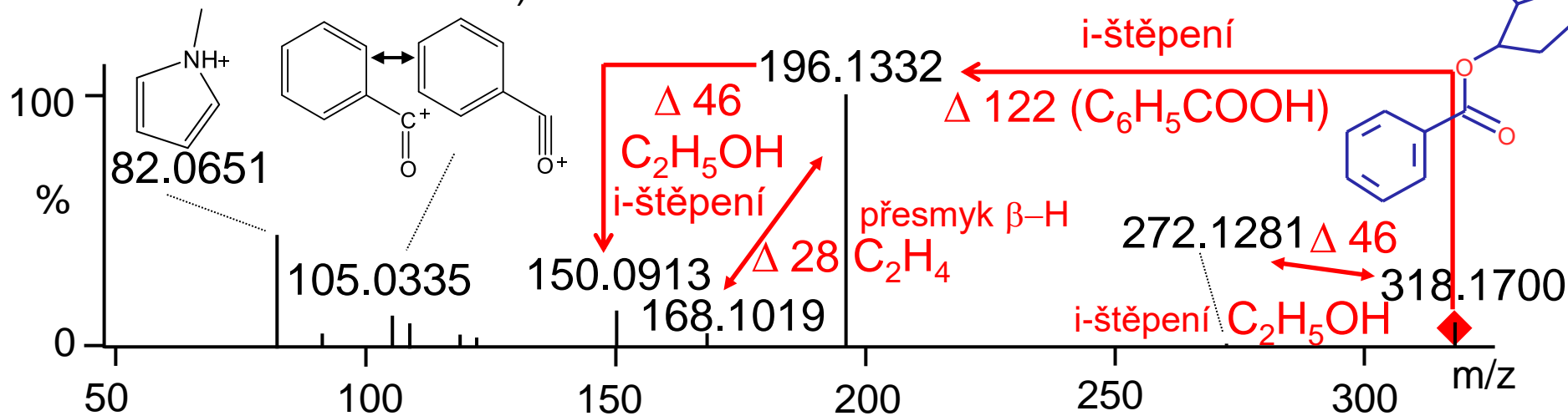
## Sloučenina A: ESI<sup>+</sup>, MS/MS iontu [M+H]<sup>+</sup>

(FT HCD 45 NCE MS<sup>2</sup> 304.1543)



## Sloučenina B: ESI<sup>+</sup>, MS/MS iontu [M+H]<sup>+</sup>

(FT HCD 40 NCE MS<sup>2</sup> 318.1700)



## Kocaethylen

