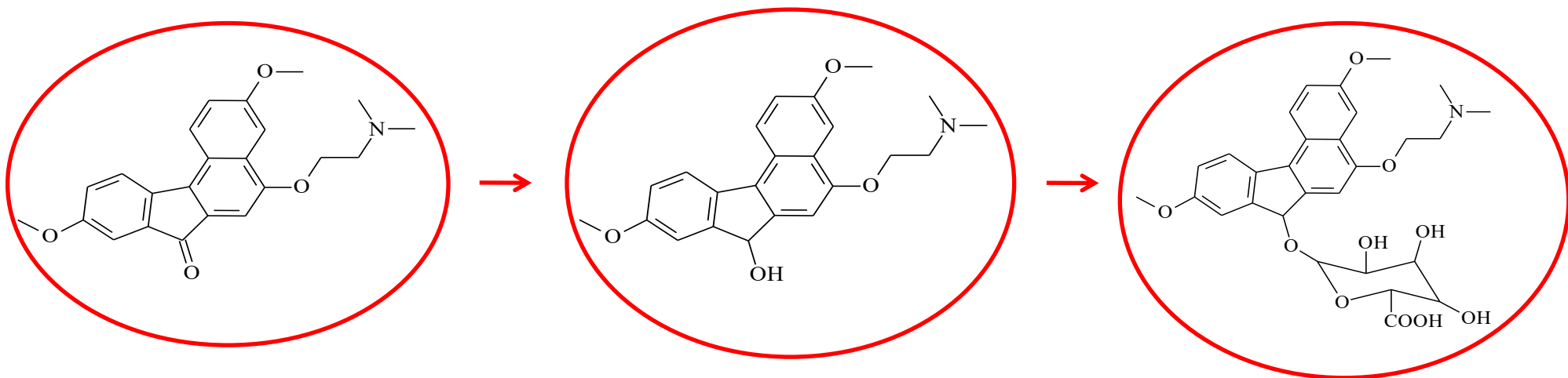


Strukturní analýza metabolitů léčiv a dalších typů xenobiotik



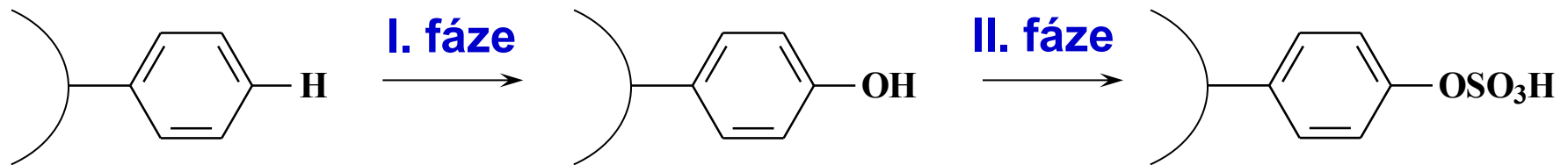
Robert Jirásko

Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice



Metabolismus xenobiotik

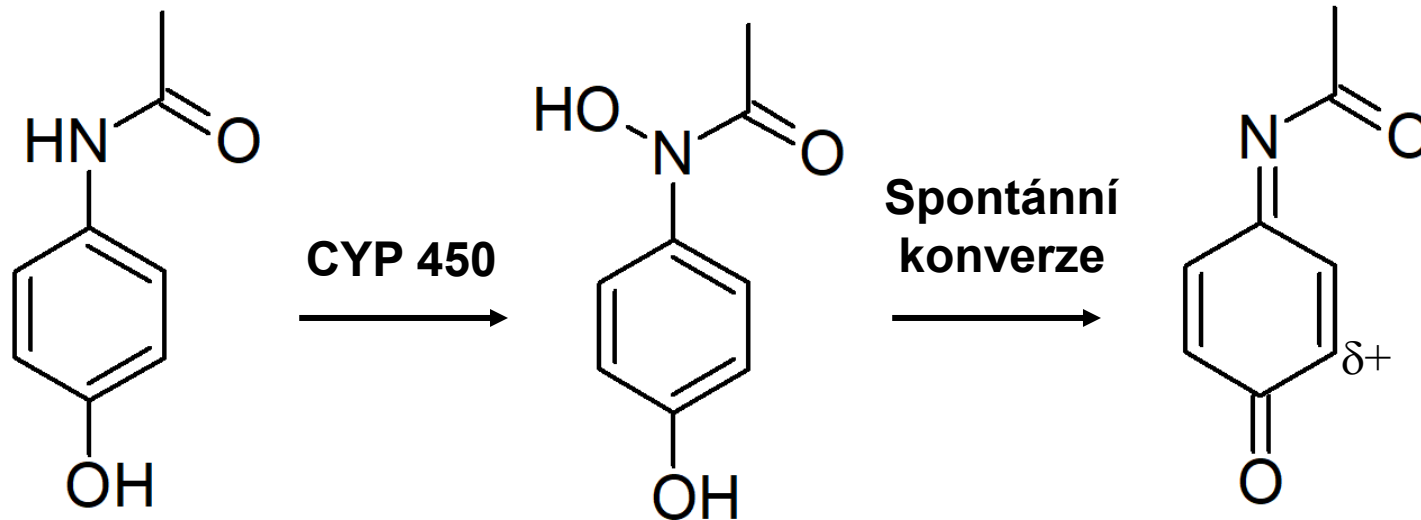
- Základní funkce metabolismu xenobiotik (látky cizí organismu – léčiva, drogy, pesticidy, konzervanty, kontaminanty, atd.) je transformace na derivát s vyšší rozpustností ve vodě, který může být snáze eliminován z organismu
- Metabolismus xenobiotik má dva základní kroky:
 - **I. fáze** změna účinku, 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)

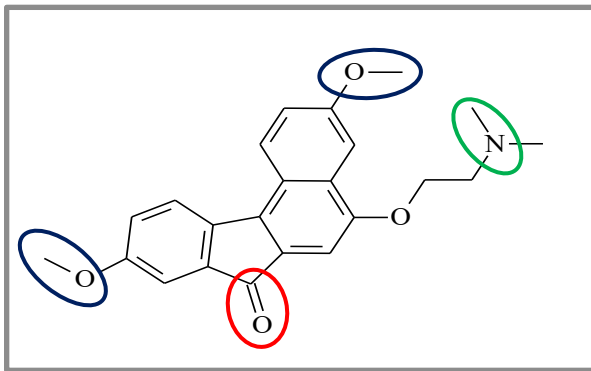
Reaktivní metabolity



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


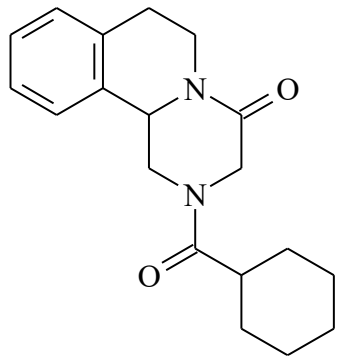
Jaké metabolity lze očekávat

- 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

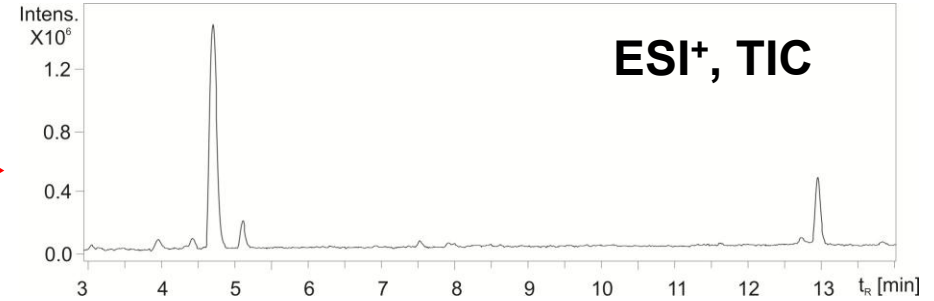


- **redukce karbonylu**
- **N-demethylace, O-demethylace**
- **hydroxylace**
- **N-oxidace**
- **konjugační reakce (II. fáze)**


Rozdílná metabolizace – tasemnice a potkan (PZQ)



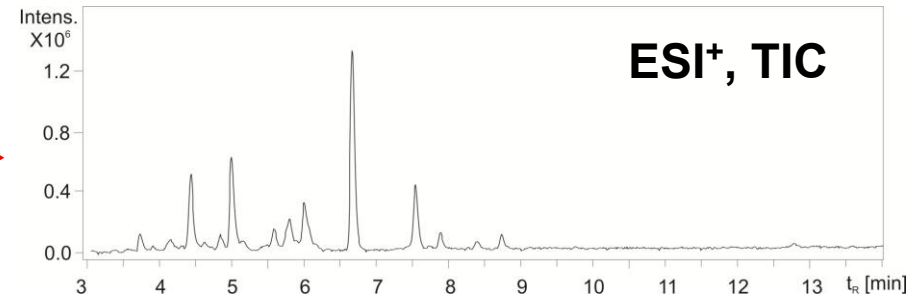
SPE - médium
UHPLC/MS/MS



- žádné metabolity
- pouze parentní látka



SPE - moč
UHPLC/MS/MS



- hydroxylace
- glukuronidace

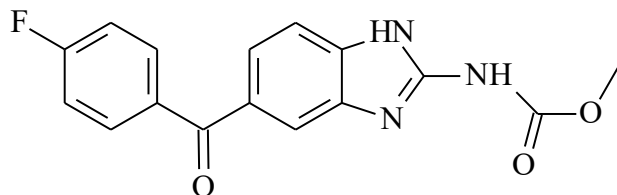
Rozdílná metabolizace - vlasovky a ovce (FLU)



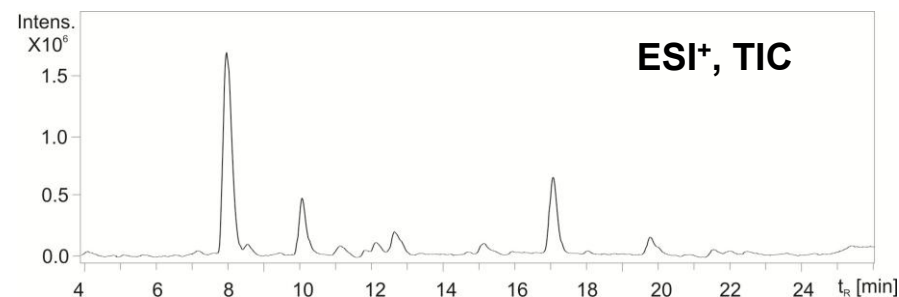
SPE - médium
HPLC/MS/MS

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

- redukce karbonylu
- glukosylace



moč
HPLC/MS/MS



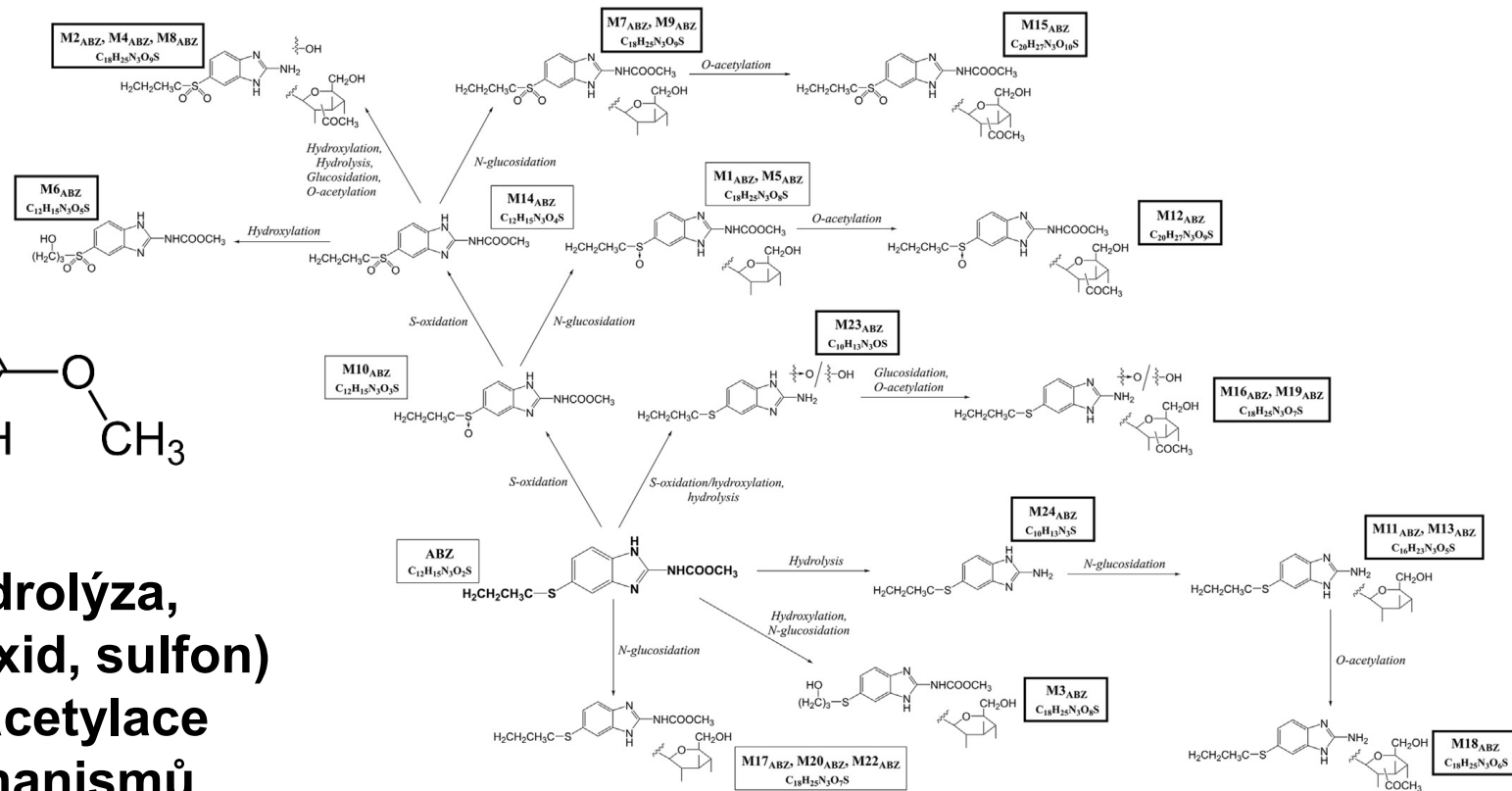
- redukce karbonylu
- hydrolýza, hydroxylace
- glukuronidace
- kombinace mechanismů

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, hydrolyzá,
- 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

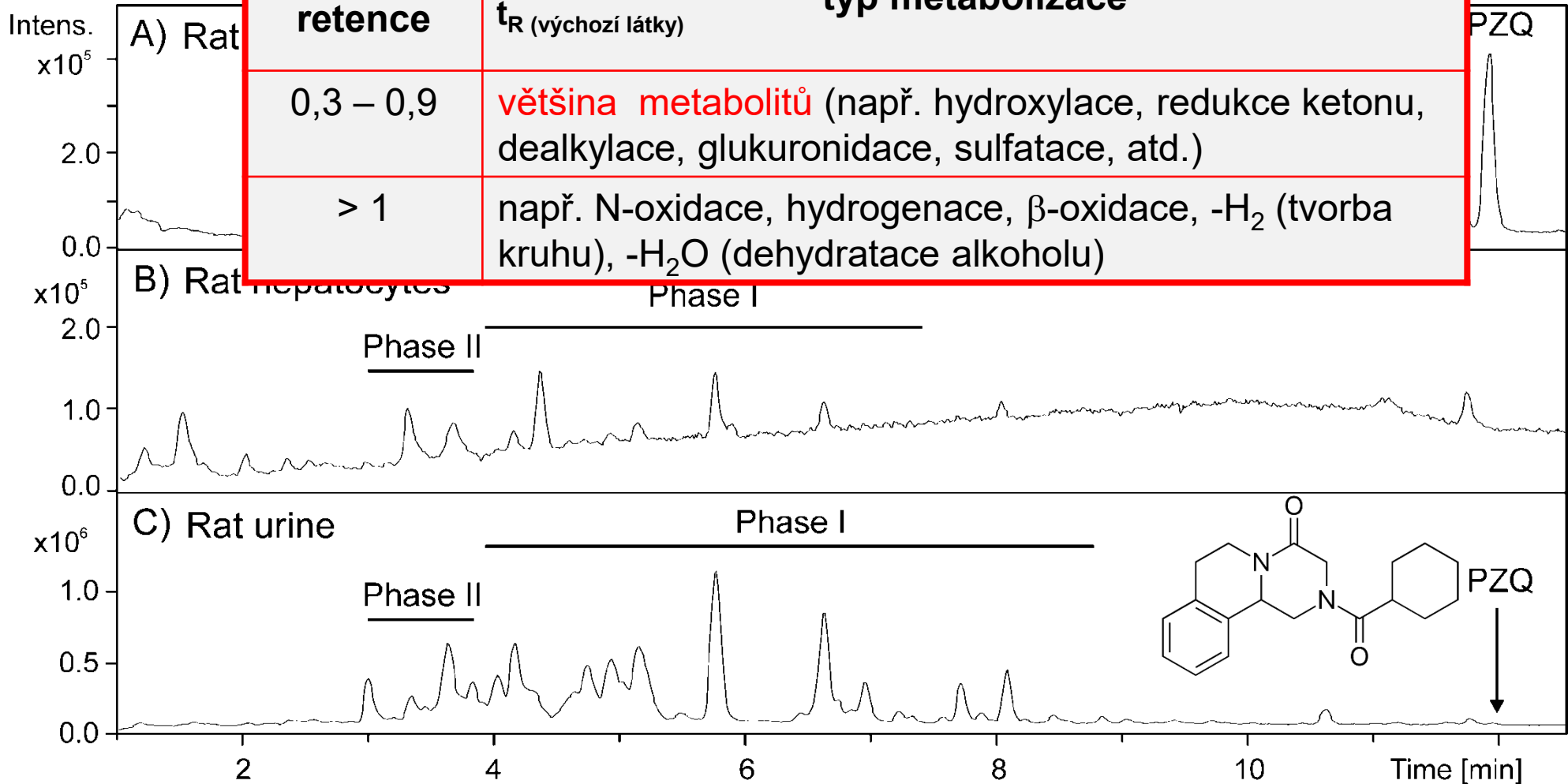
Kvantitativní informace
ověřených metabolitů,
ověření izomerů

rychlá kvalitativní informace

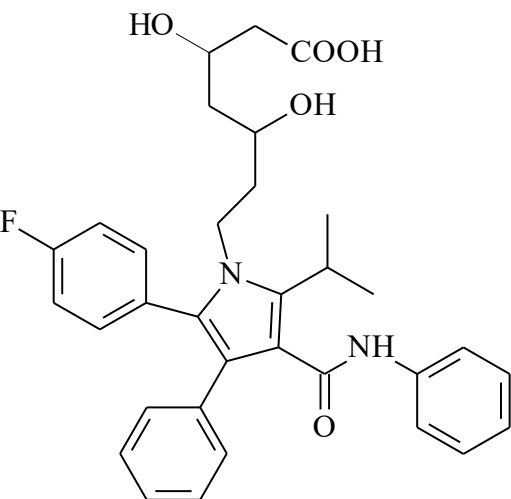
Identifikace metabolitů je založena na stanovení elementárního složení metabolitů, interpretaci MS/MS spekter, retenčního chování, UV spekter z PDA detektoru, popř. informací z dalších spektrálních technik

Chromatografická retence v závislosti na polaritě

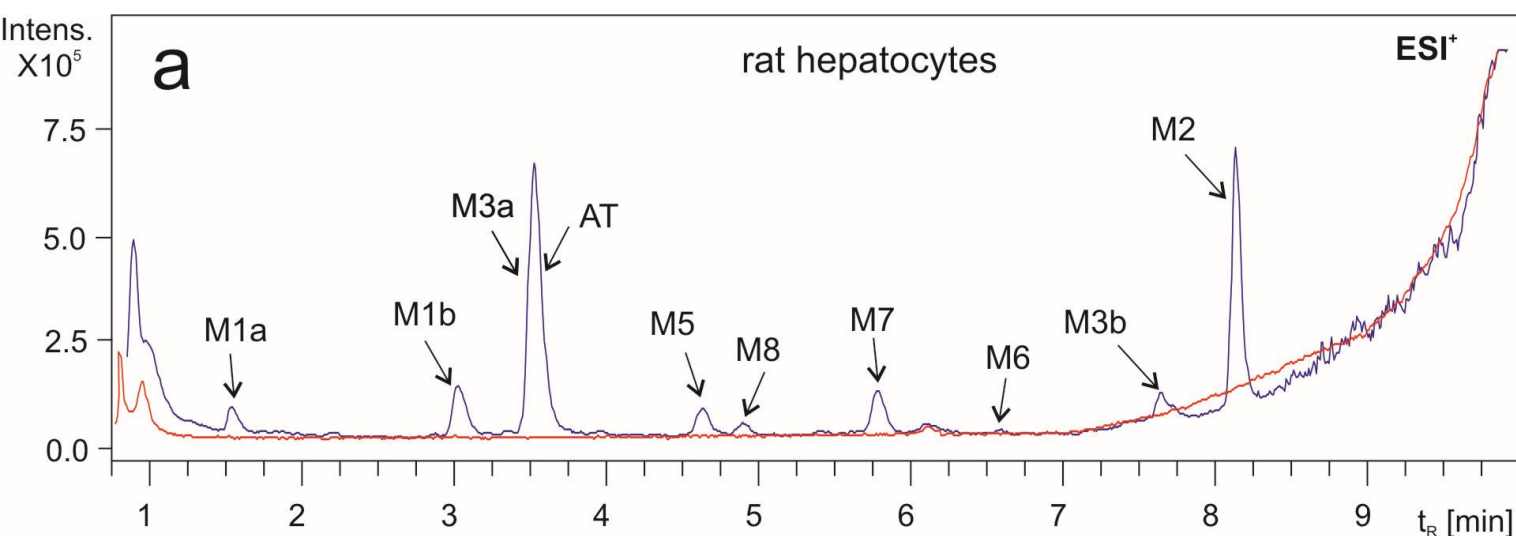
relativní retence	$\frac{t_R \text{ (metabolitu)}}{t_R \text{ (výchozí látky)}}$	typ metabolizace
0,3 – 0,9		většina metabolitů (např. hydroxylace, redukce ketonu, dealkylace, glukuronidace, sulfatace, atd.)
> 1		např. N-oxidace, hydrogenace, β -oxidace, $-H_2$ (tvorba kruhu), $-H_2O$ (dehydratace alkoholu)



Chromatografická retence v závislosti na polaritě

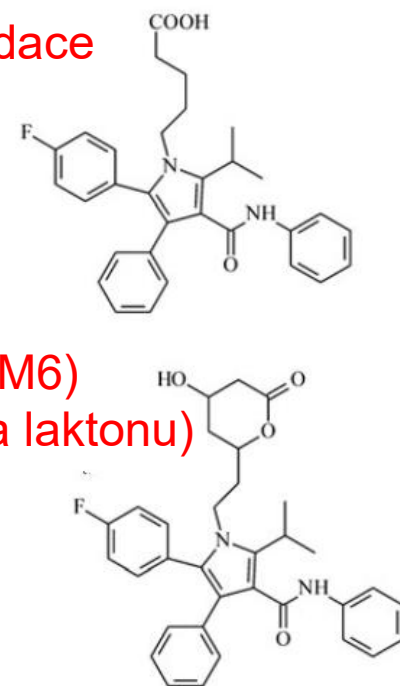


relativní retence	$\frac{t_R \text{ (metabolitu)}}{t_R \text{ (výchozí látky)}}$	typ metabolizace
0,3 – 0,9		většina metabolitů (např. hydroxylace, redukce ketonu, dealkylace, glukuronidace, sulfatace, atd.)
> 1		např. N-oxidace, hydrogenace, β-oxidace , $-H_2$ (tvorba kruhu), $-H_2O$ (dehydratace alkoholu)



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

Nejběžnější metabolické reakce II. fáze

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

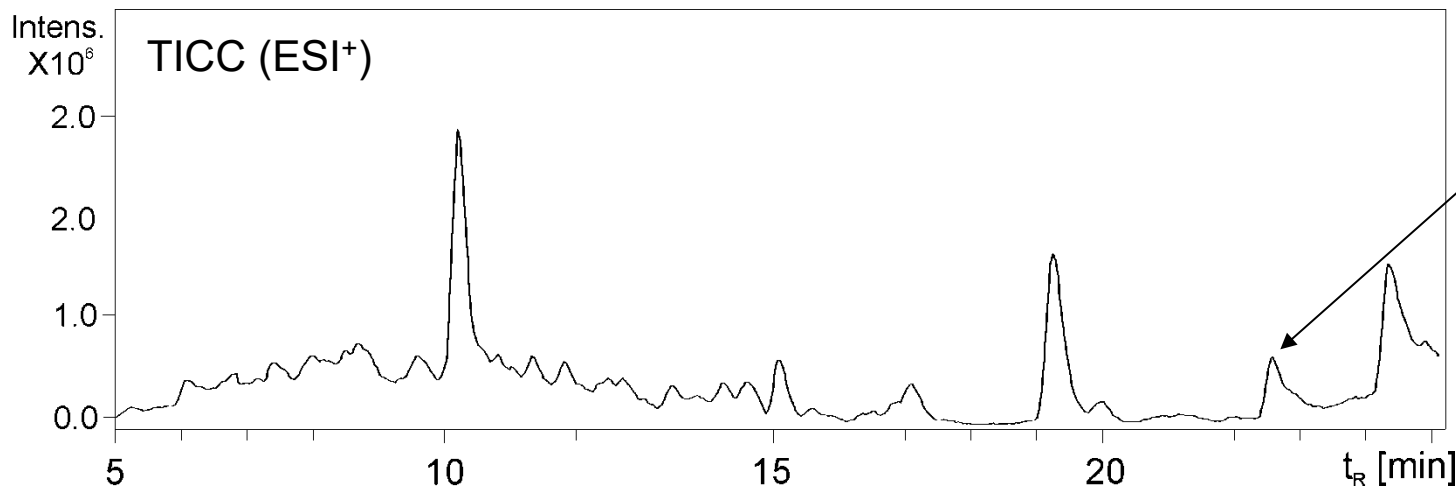
- V review celkem popsáno 54 metabolických reakcí I. fáze a 25 reakcí II. fáze

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

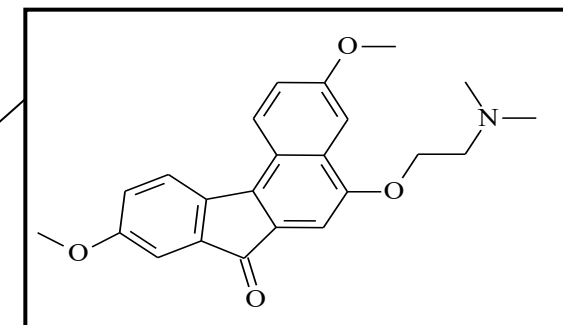
Filtrování informací z LC/MS a LC/MS/MS dat

- 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

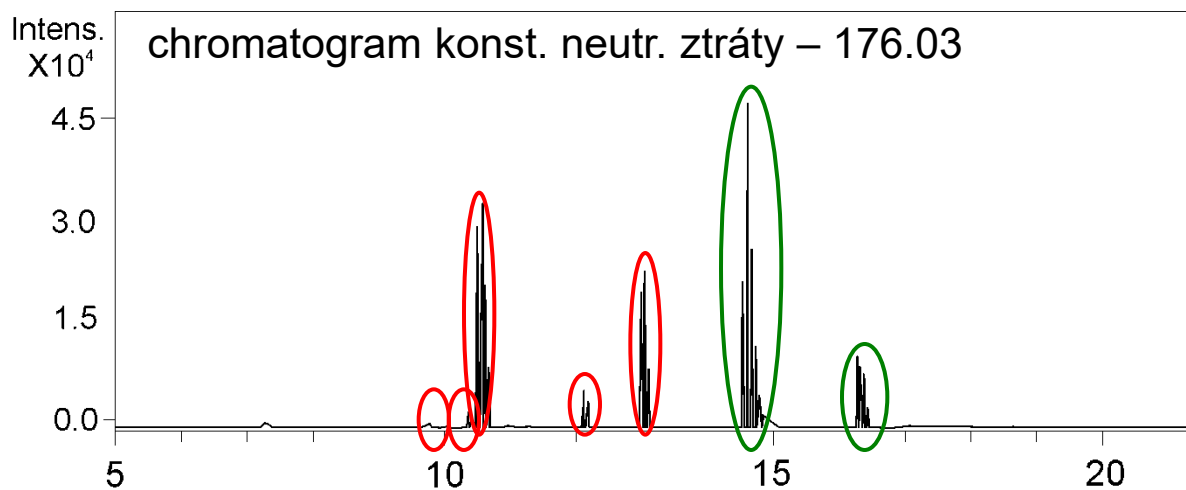


studované léčivo
(dimefluron)



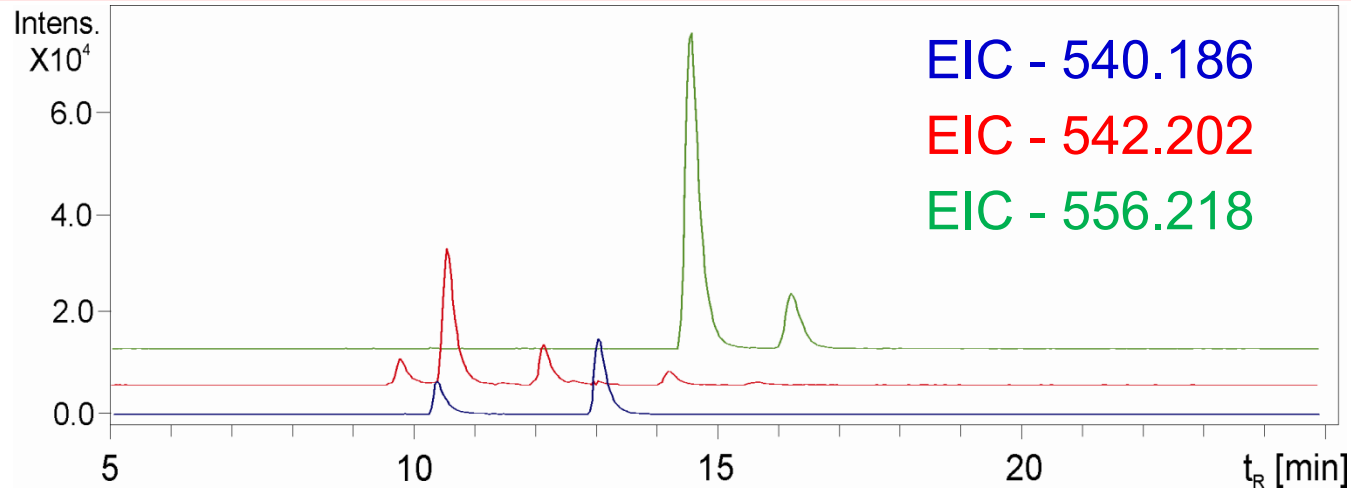
$\Delta m/z$ 176.03 (C₆H₈O₆) – typické pro glukuronidy

nalezené glukuronidy



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

EIC chromatogramy

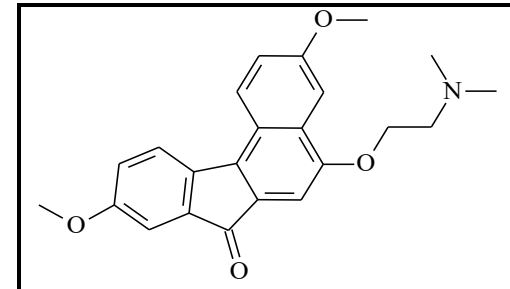


Fáze I

-CH₂ → demethylace
+H₂ → redukce karbonylu

Fáze II

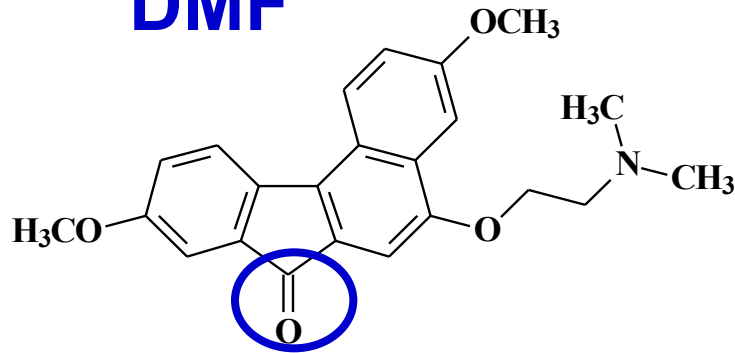
+C₆H₈O₆ → glukuronidace



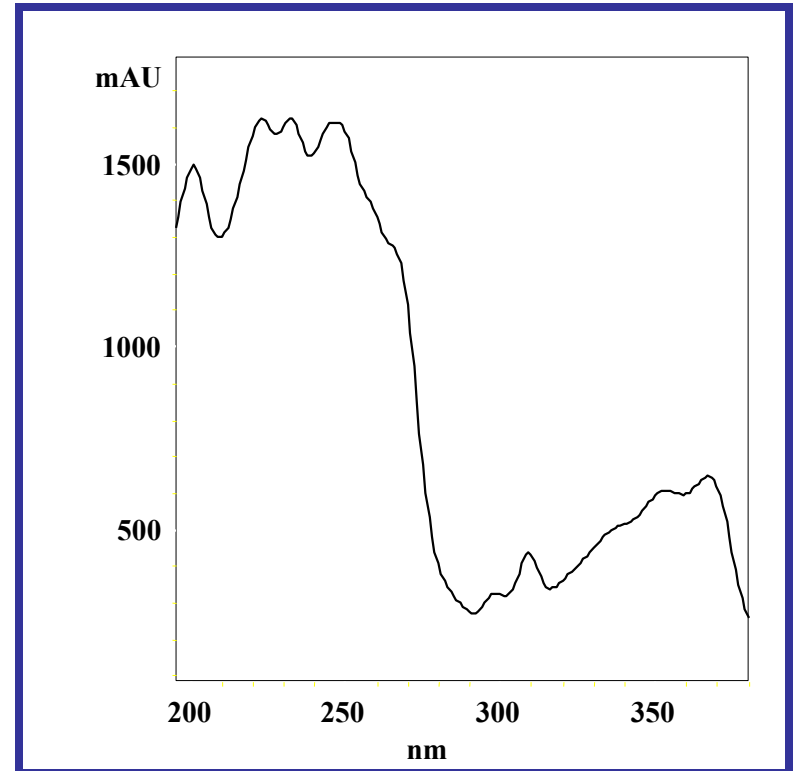
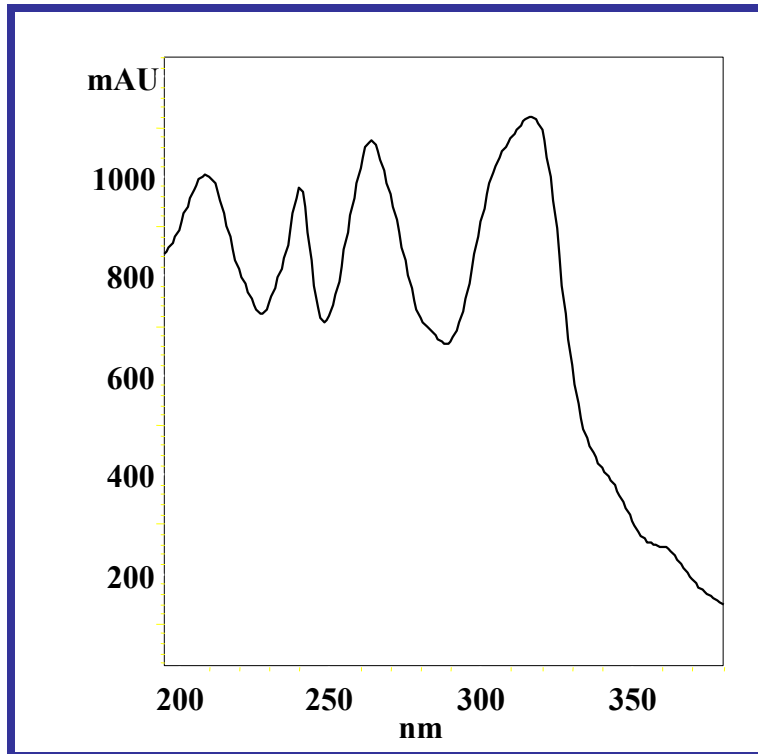
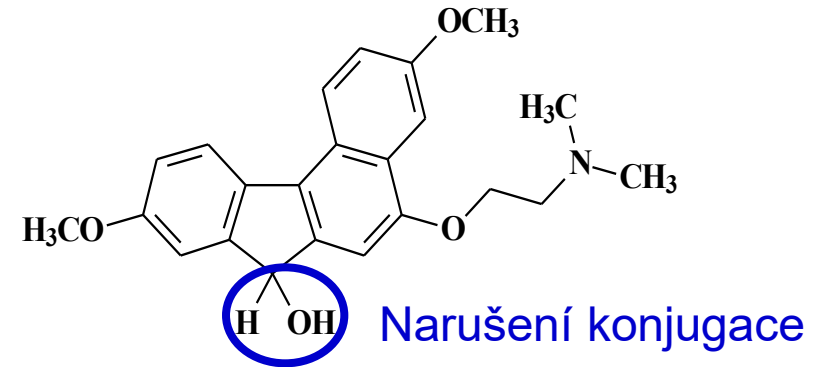
MW	Elementární složení				
	Glukuronid	Neutrální ztráta - 176	Metabolit I. fáze	Parentní sloučenina	Rozdíl
539	C ₂₈ H ₂₉ NO ₁₀	- C ₆ H ₈ O ₆	C ₂₂ H ₂₁ NO ₄	- C ₂₃ H ₂₃ NO ₄	-CH ₂
541	C ₂₈ H ₃₁ NO ₁₀		C ₂₂ H ₂₃ NO ₄		C (-CH ₂ +H ₂)
555	C ₂₉ H ₃₃ NO ₁₀		C ₂₃ H ₂₅ NO ₄		+H ₂

Kombinace s dalšími technikami např. UV spektra

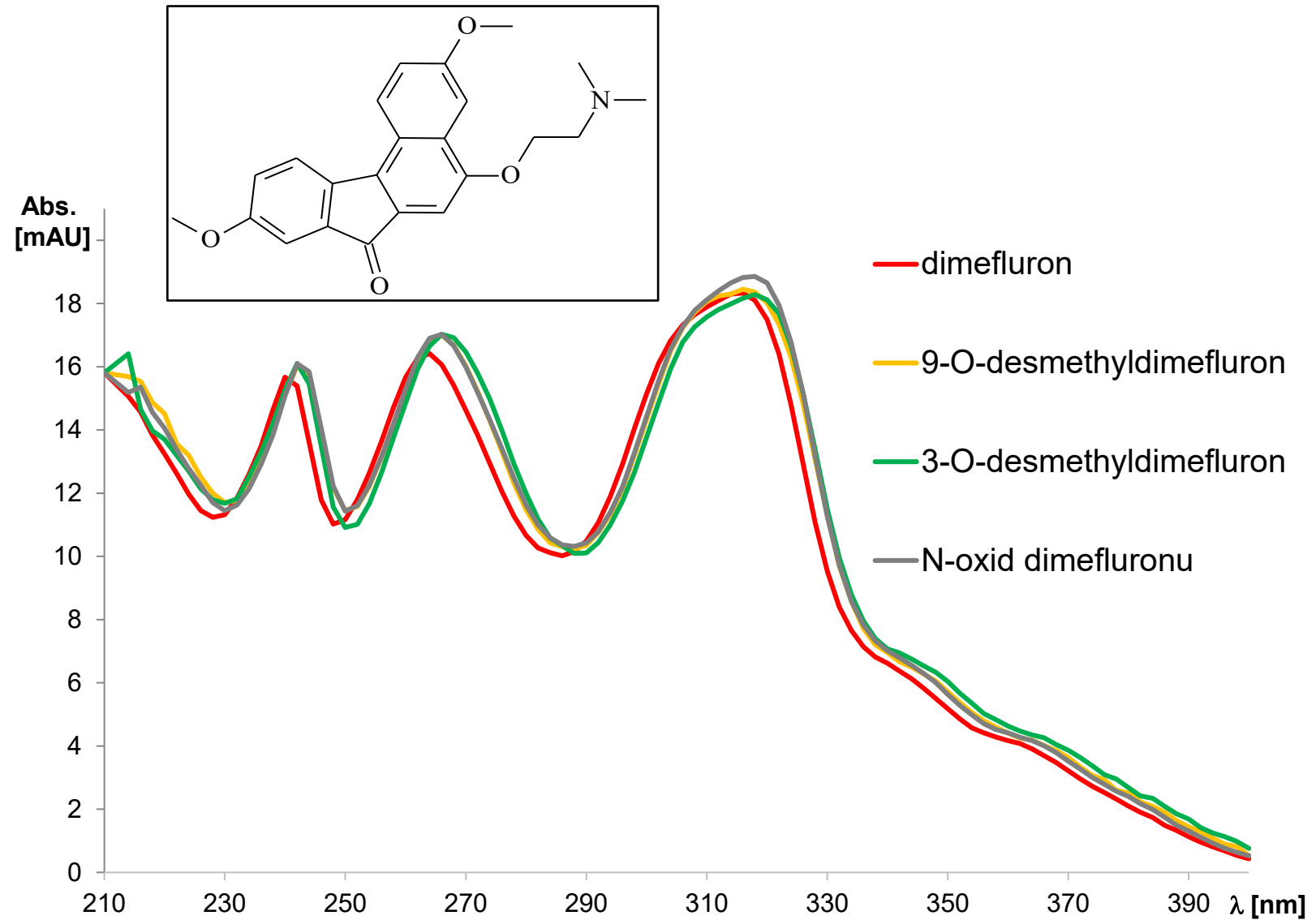
DMF



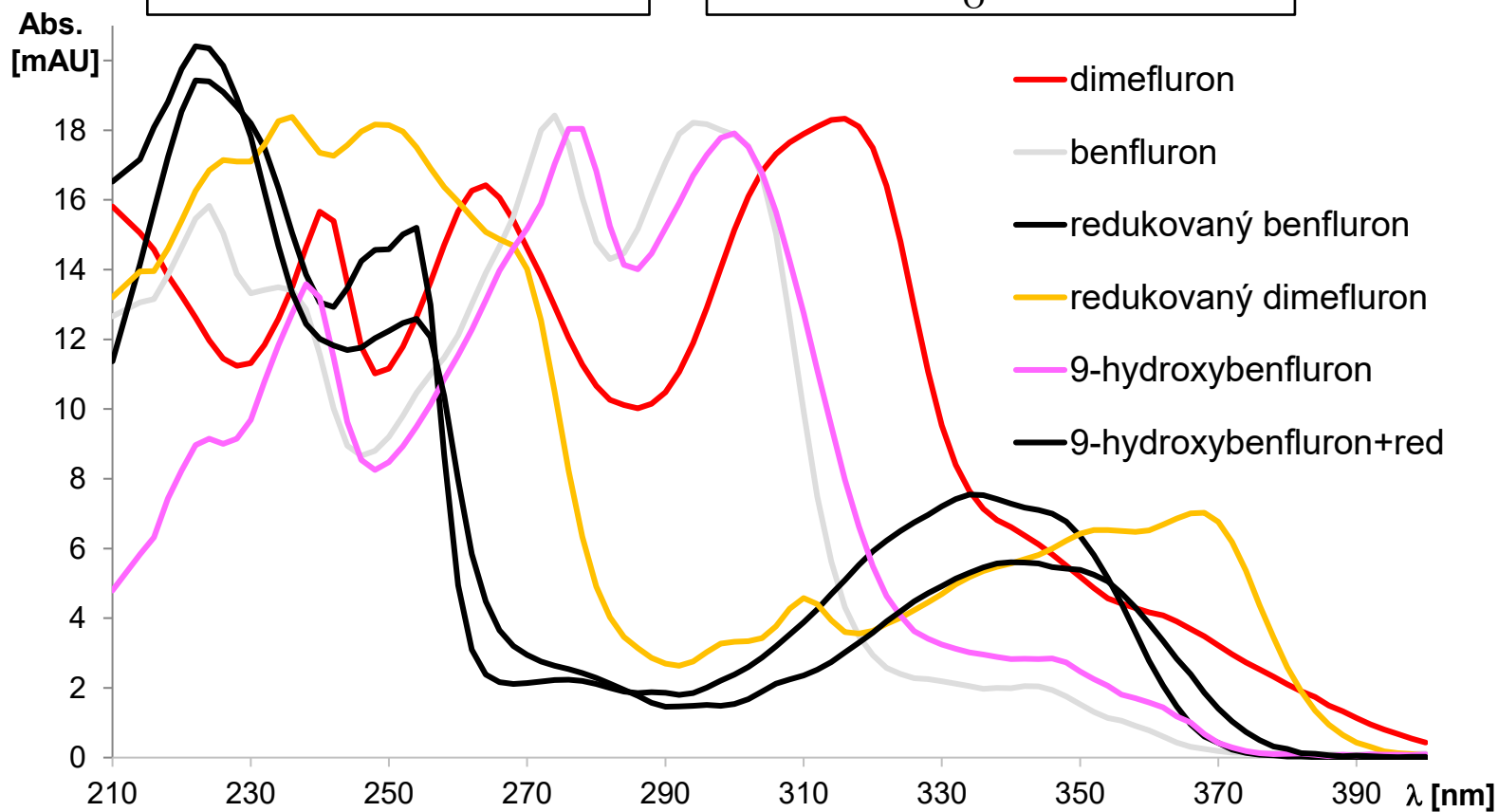
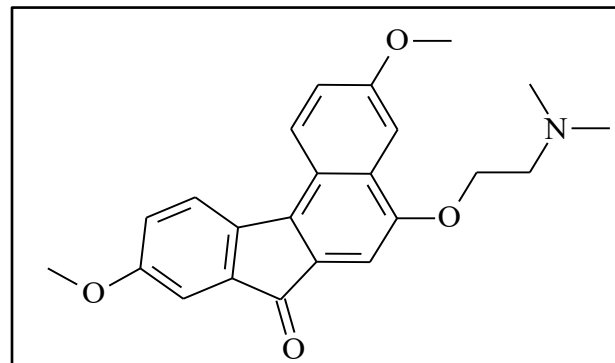
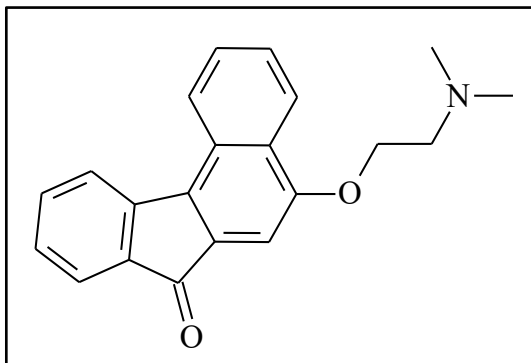
Redukovaný DMF



Vliv metabolizace na UV spektra

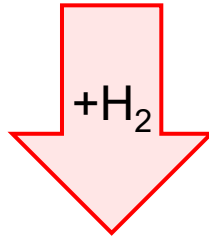
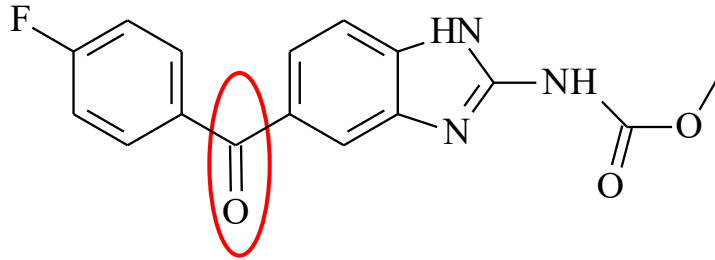


Vliv metabolizace na UV spektra



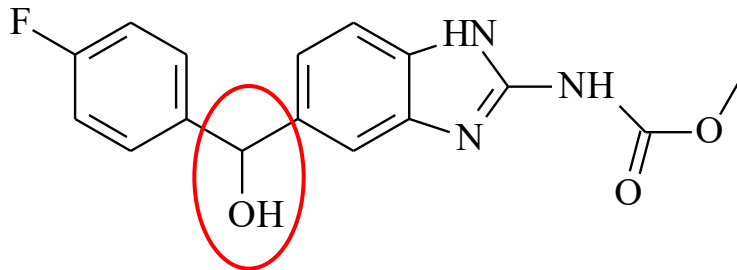
Biotransformace – identifikace enantiomerů

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

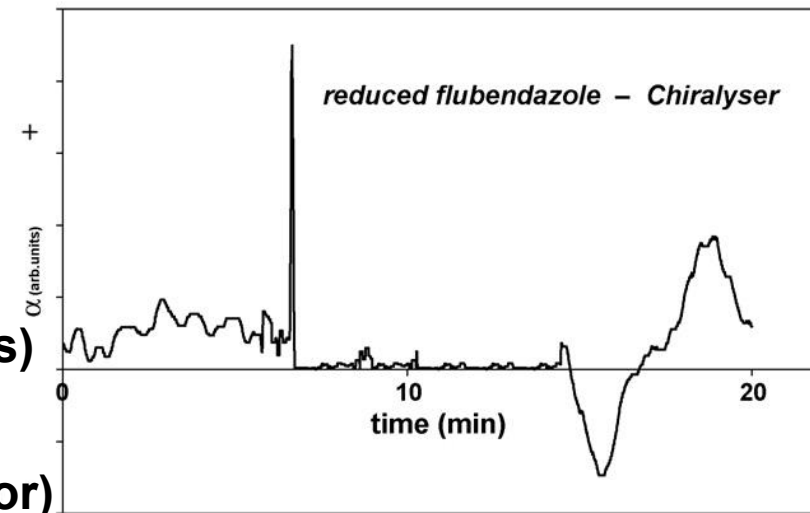
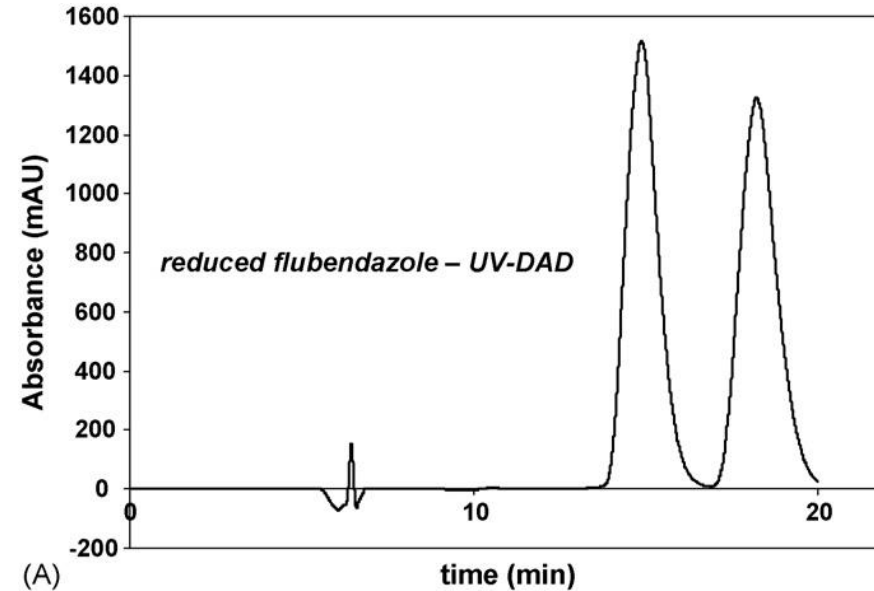


2 enantiomery

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



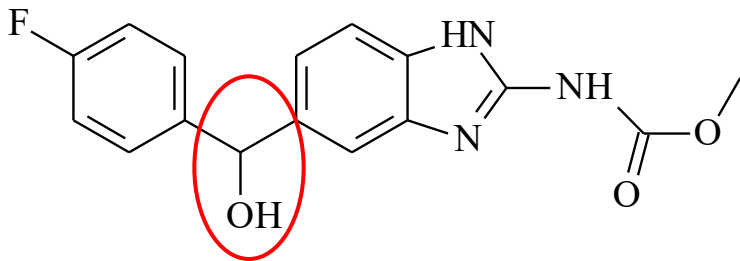
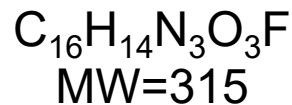
chirální separace



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

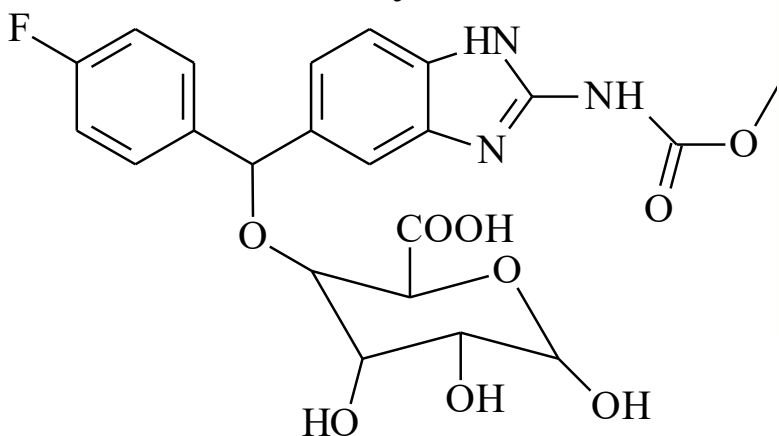
Biotransformace – identifikace diastereoizomerů

redukovaný flubendazol

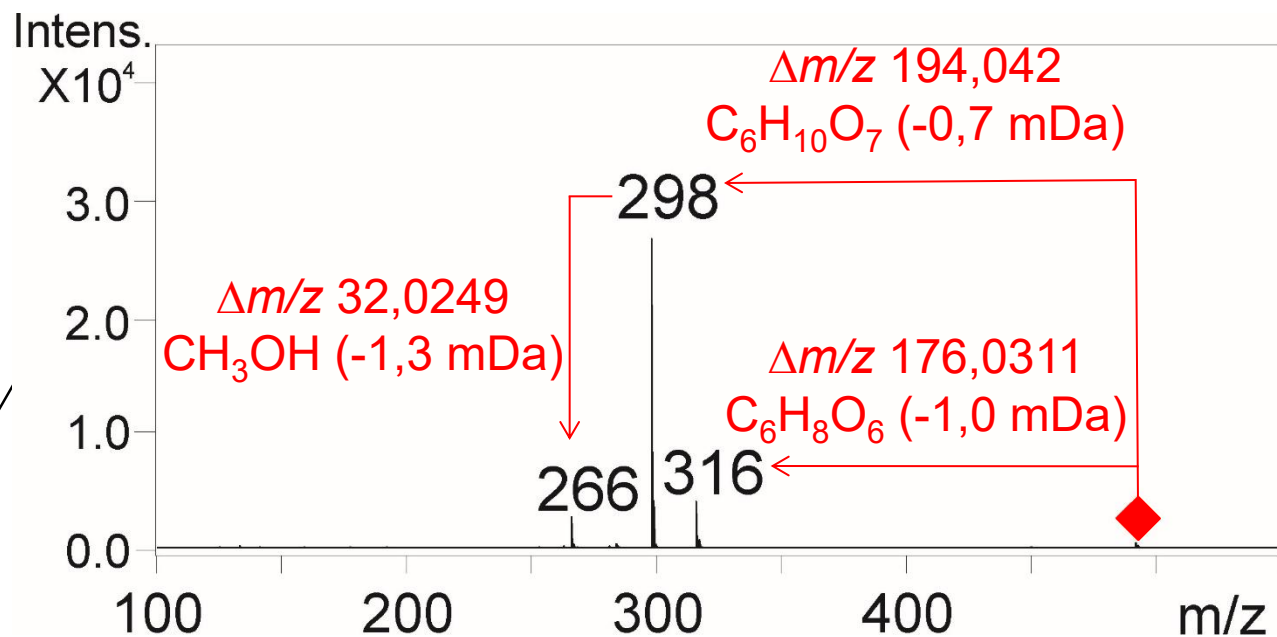


konjugace s kyselinou
glukuronovou

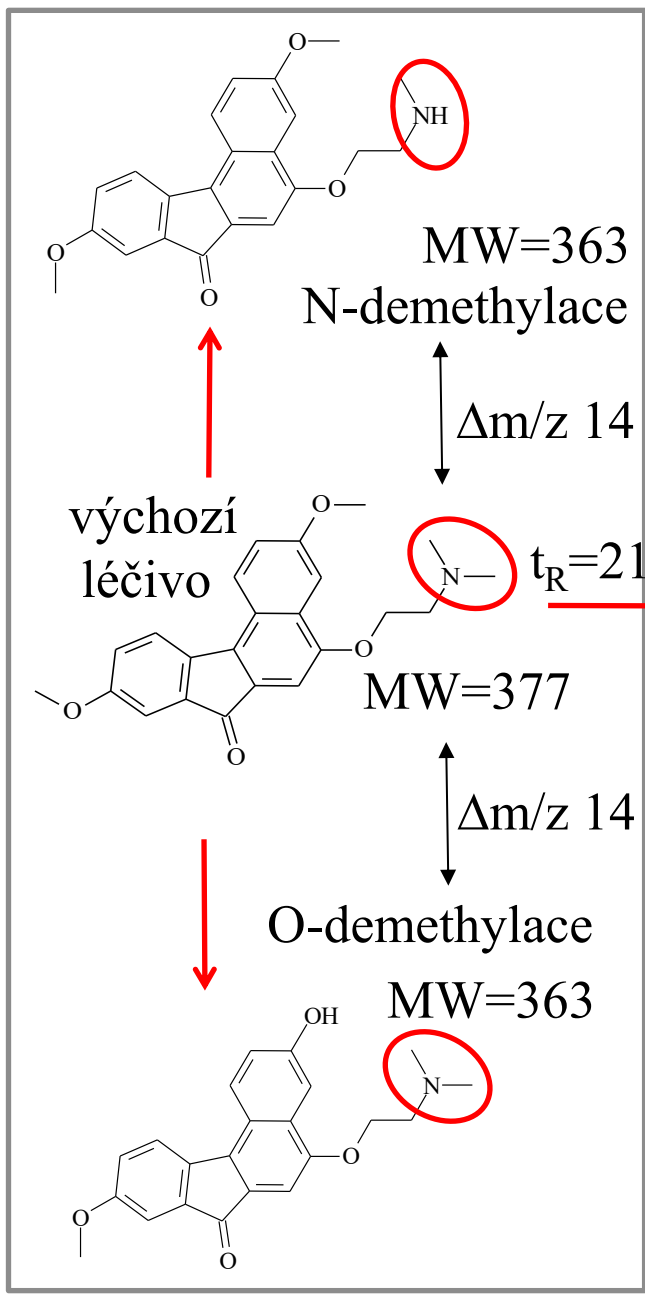
(+ $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7 - \text{H}_2\text{O}$)
2 diastereoizomery



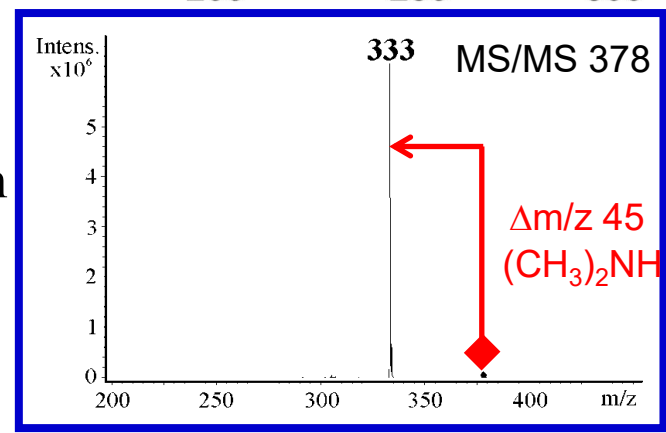
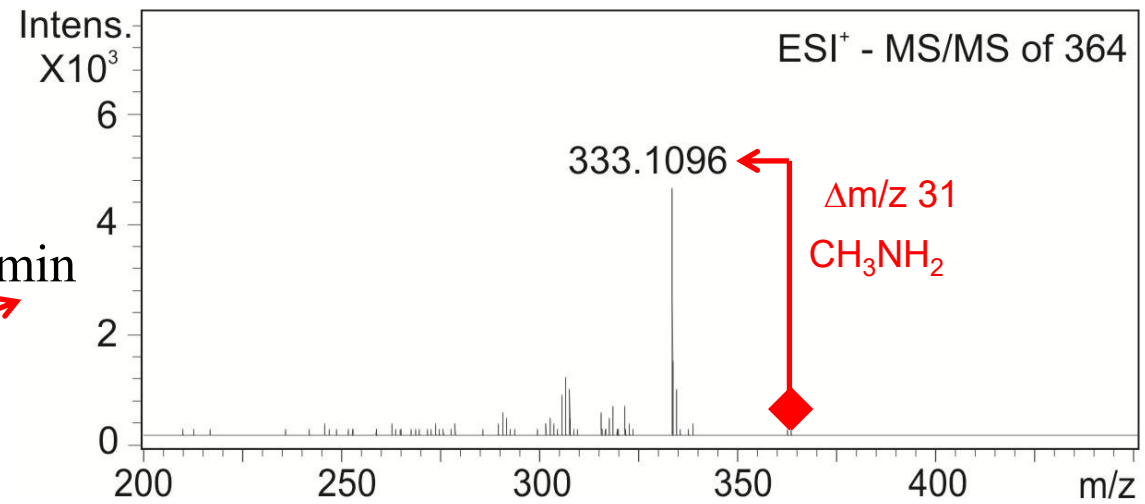
- $\text{FLU} + \text{H}_2 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$
- Jeden chromatografický pík pro metabolity I. fáze
- Dva píky pro metabolity II. fáze
- diastereoizomery lze rozdělit v RP systémech
- Poměr intenzity určitých fragmentových iontů v MS/MS může být pro diastereoizomery rozdílný



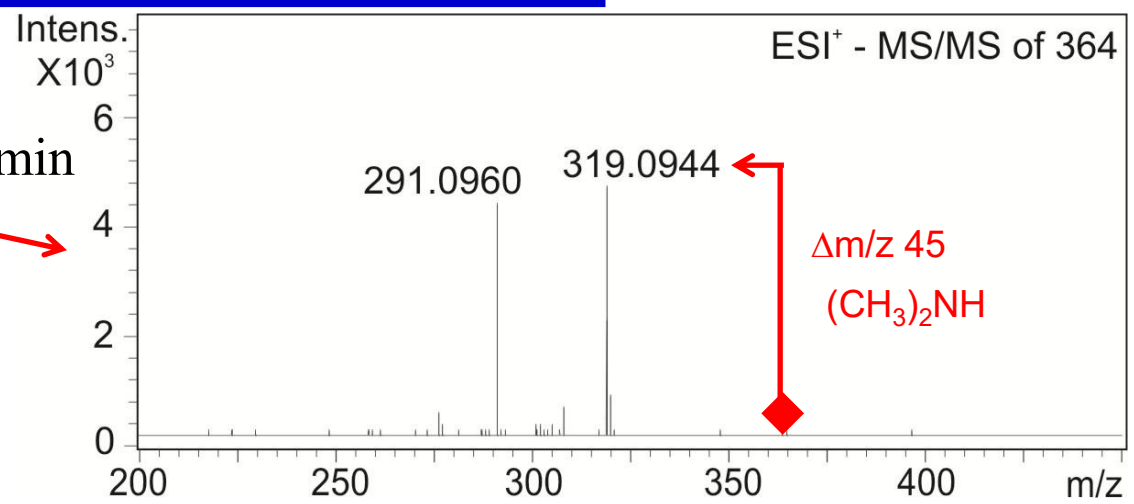
O jaké metabolity se jedná?



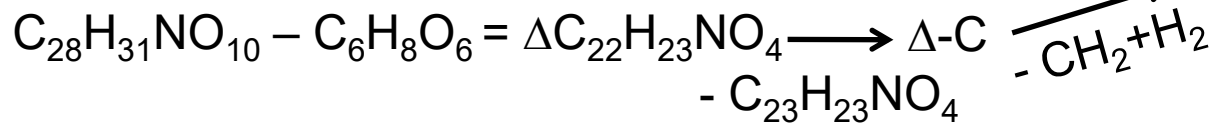
$t_R = 21,1$ min



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



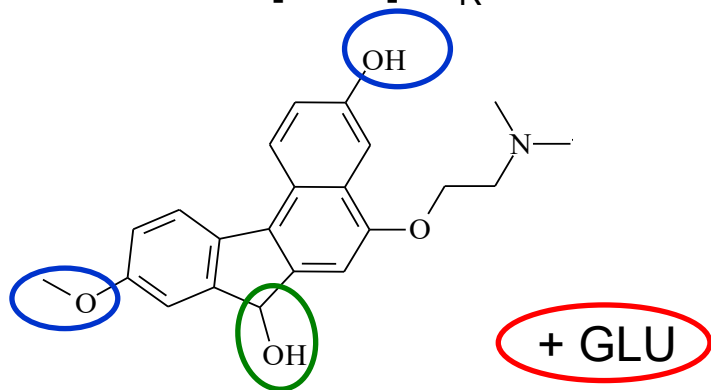
Zadání: V LC/HR-MS záznamu vzorku plasmy potkana, kterému bylo perorálně podáno léčivo dimefluron ($C_{23}H_{23}NO_4$, $t_R=21,7$ min) byly nalezeny dva metabolity o stejném elementárním složení $C_{28}H_{31}NO_{10}$. O jaké metabolity se jedná? (UV spektra výchozí látky a metabolitů jsou naprosto odlišná).



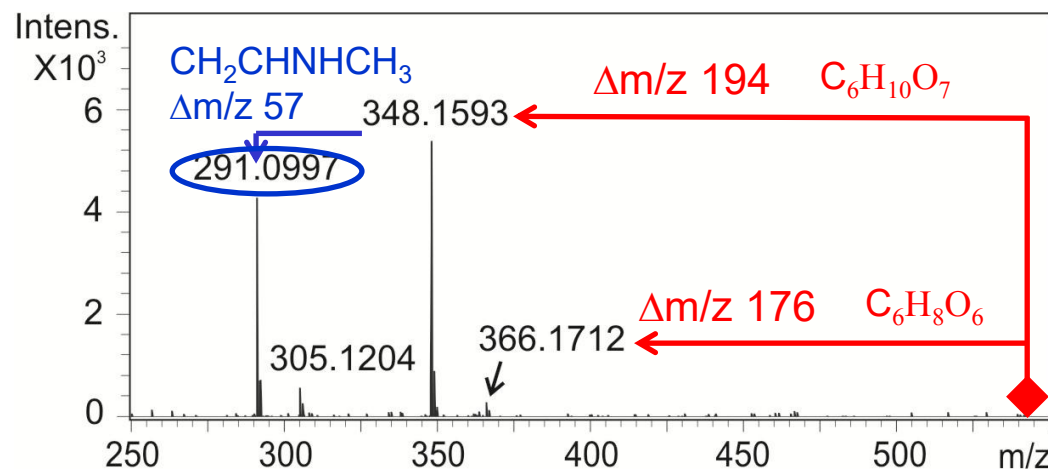
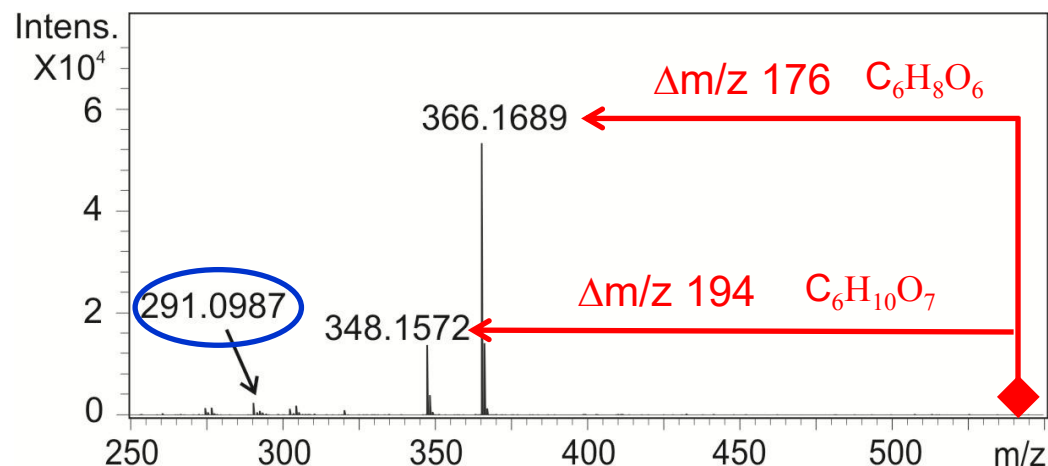
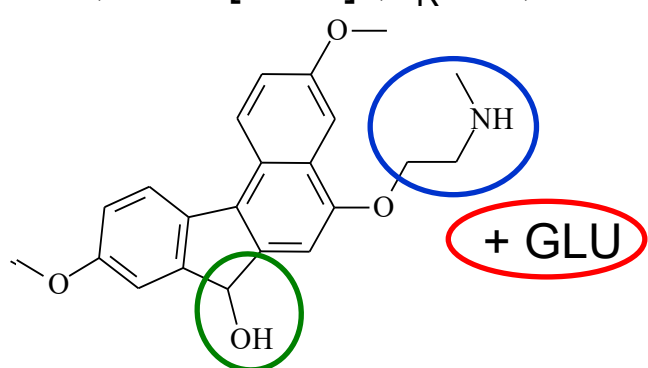
Fáze I: **redukce karbonylu**
demethylace

Fáze II: **glukuronidace**

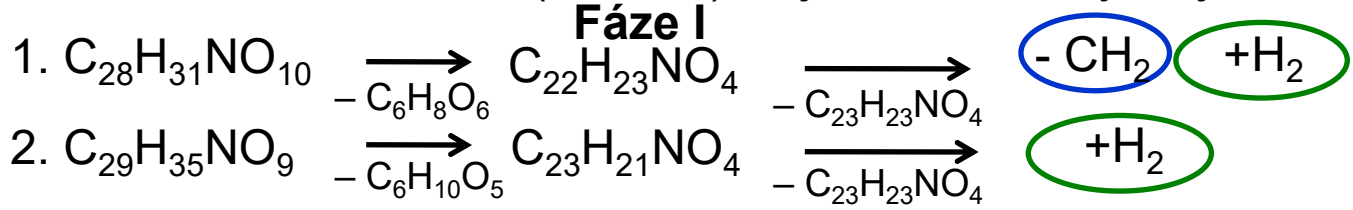
m/z 542,2021 $[M+H]^+$, $t_R=10,6$ min



m/z 542,2013 $[M+H]^+$, $t_R=15,7$ min

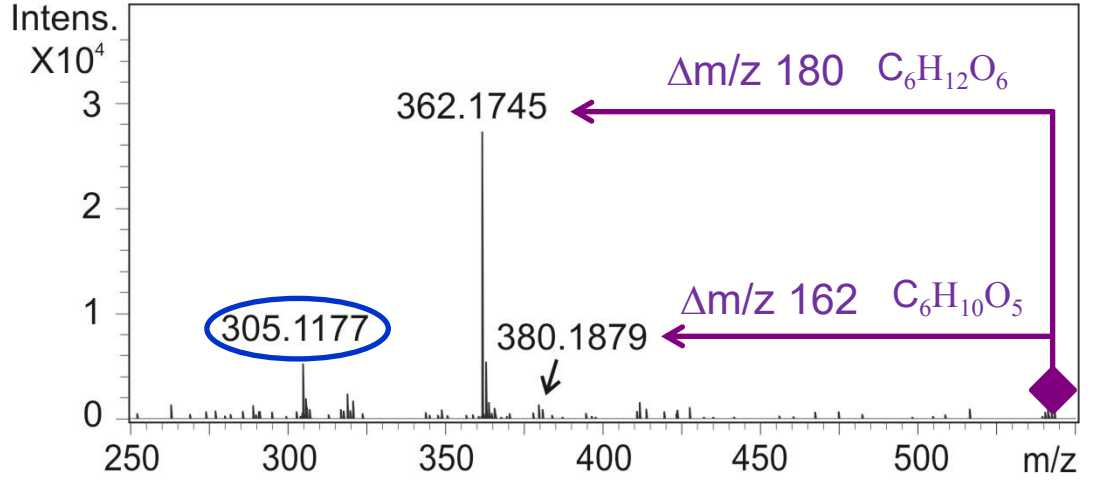
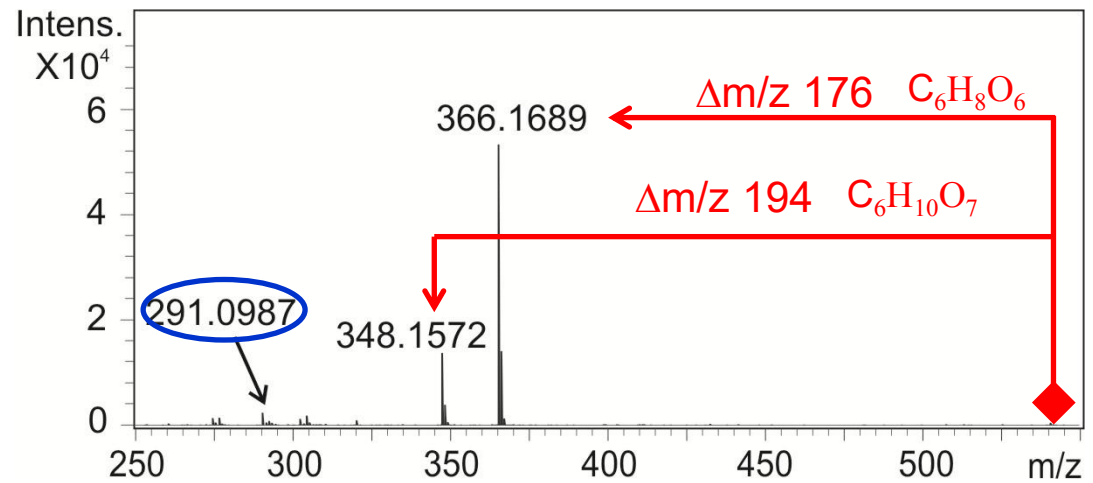
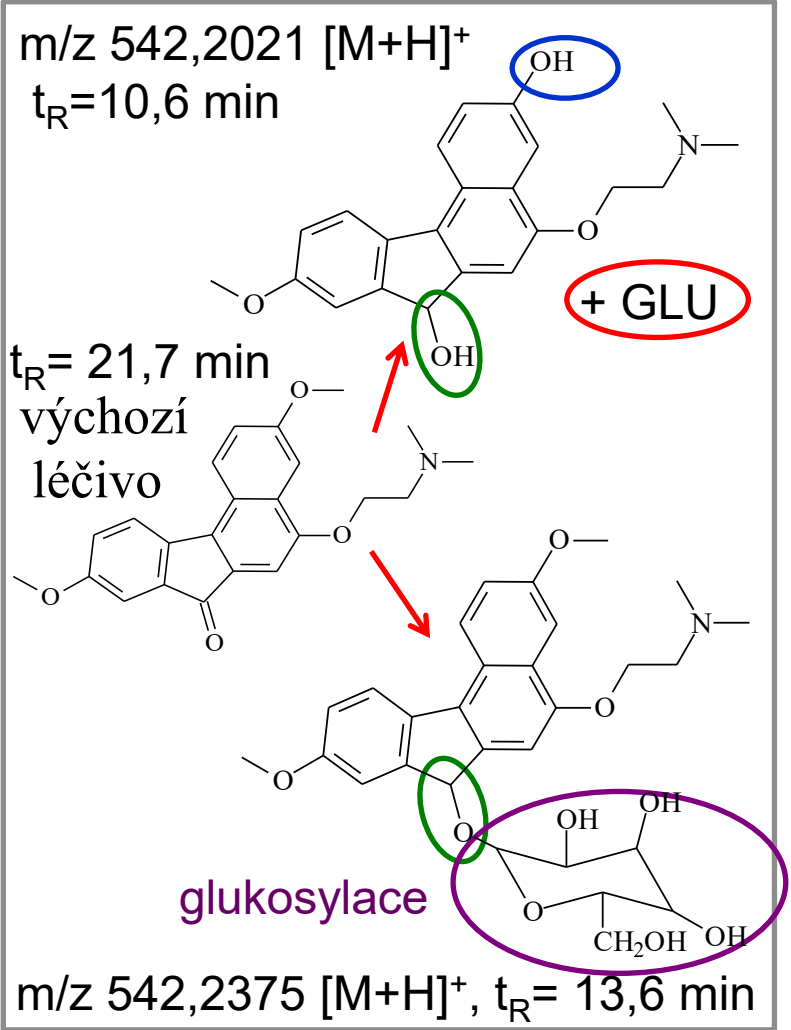


Zadání: V LC/HR-MS záznamu vzorku plasmy potkana, kterému bylo perorálně podáno léčivo dimefluron ($C_{23}H_{23}NO_4$) byly nalezeny dva metabolity (MW=541). Na základě HR-MS měření různé elementární složení (viz níže). O jaké metabolity se jedná?



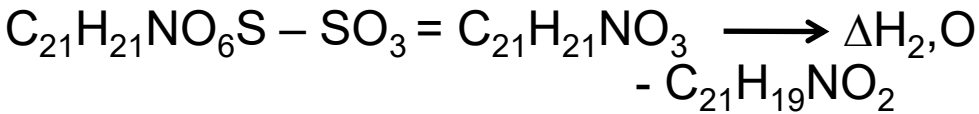
Fáze II: glukuronidace

Fáze II: glukosylace



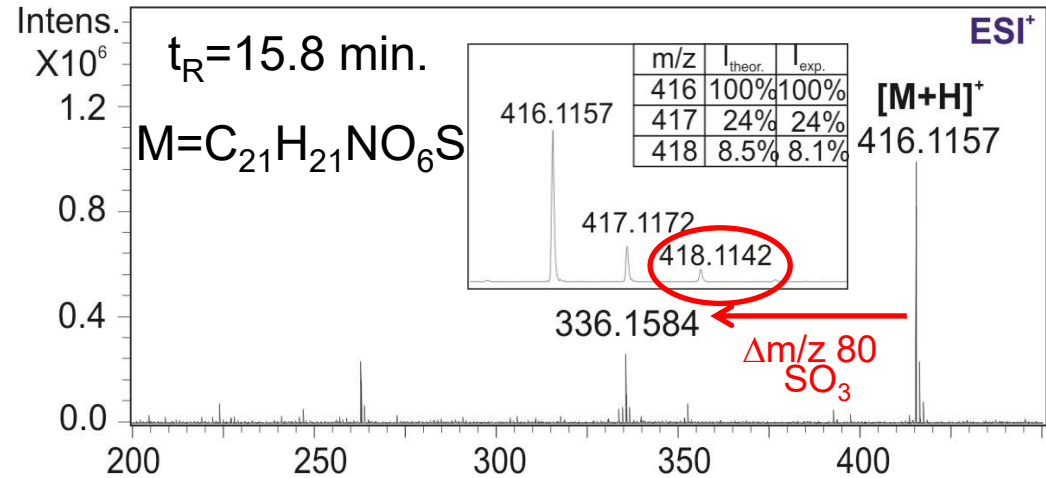
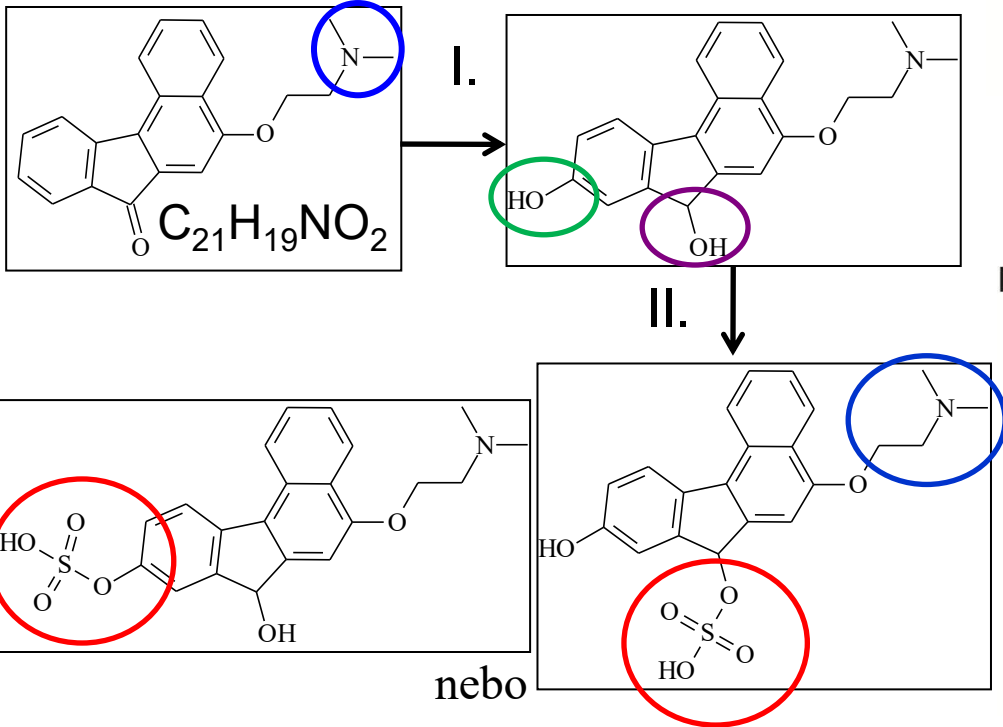
Výchozí zadání: V LC/HR-MS záznamu vzorku plasmy potkana, kterému bylo perorálně podáno léčivo benfluron ($C_{21}H_{19}NO_2$, $t_R=23,7$ min) byl nalezen metabolit o elementárním složení $C_{21}H_{21}NO_6S$. O jaký metabolit se jedná?

Fáze I

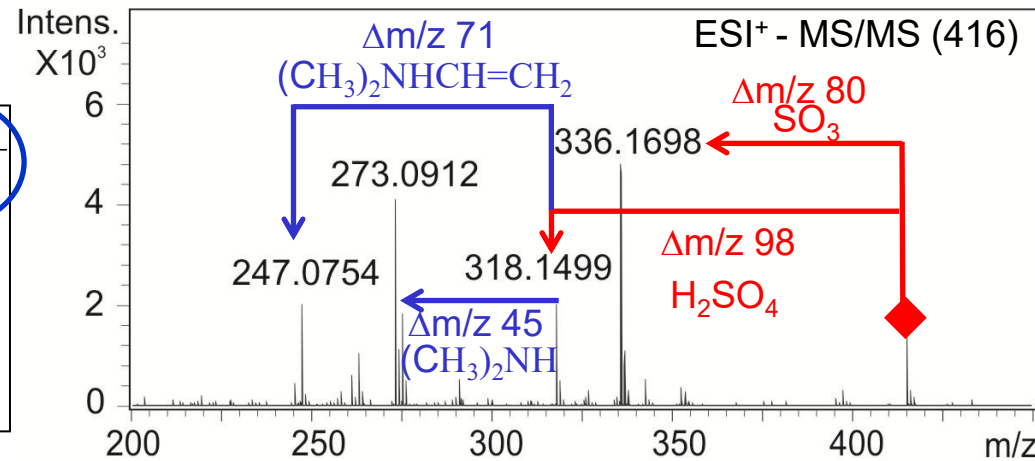


Fáze I: hydroxylace, redukce karbonylu

Fáze II: sulfatace



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

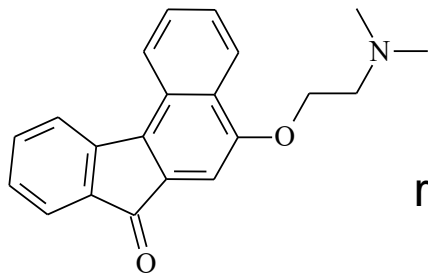


Vícenásobná glukuronidace

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

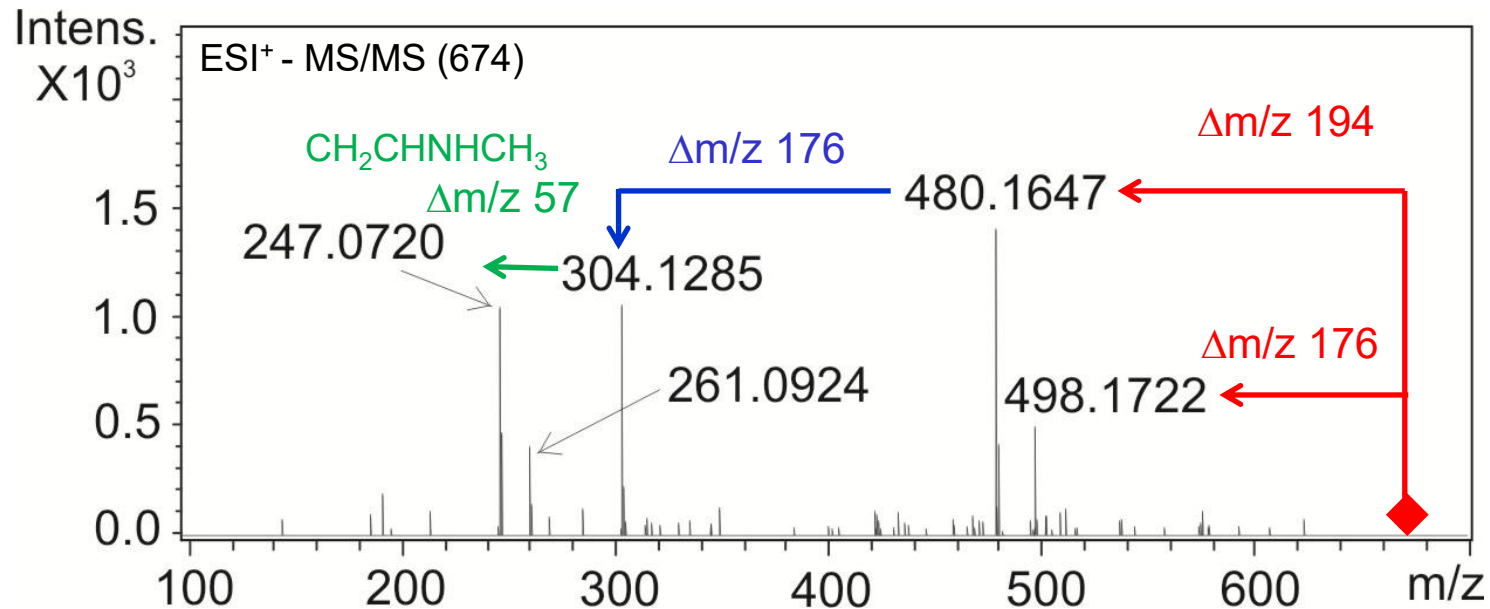
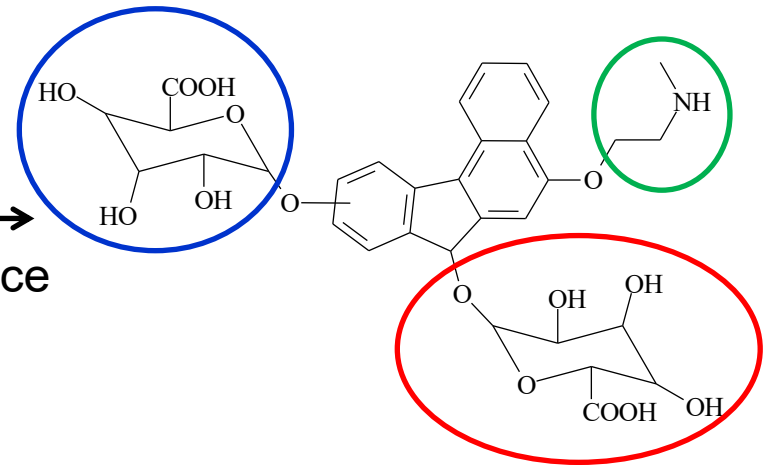
Nízký retenční (0,36)

benfluron



2*glukuronidace

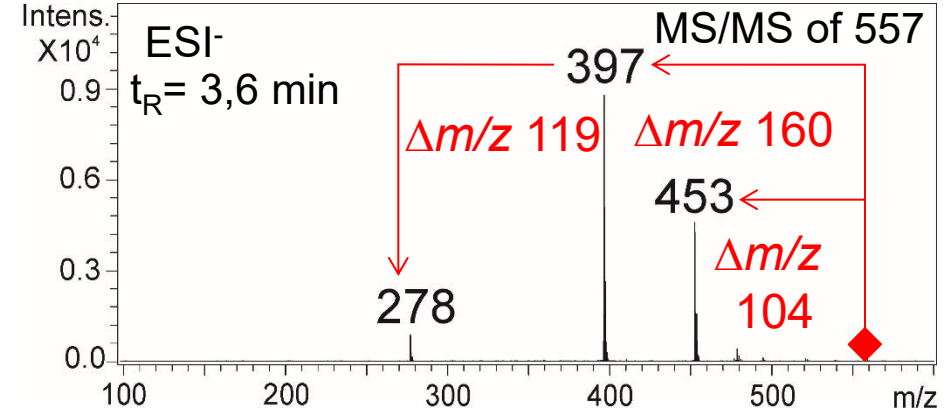
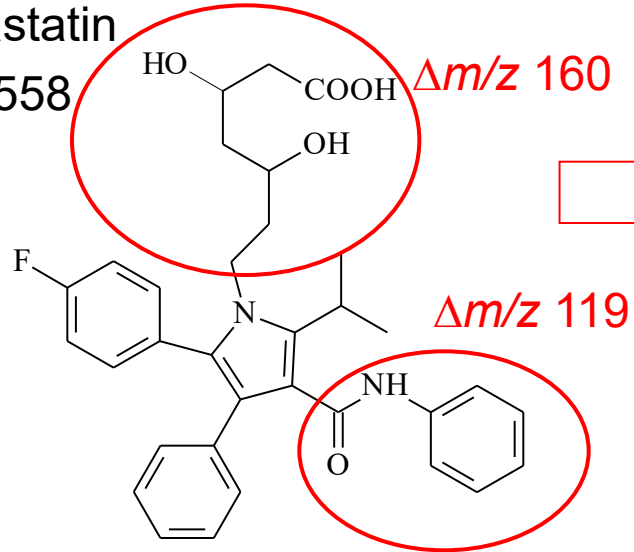
redukce karbonylu, hydroxylace
demethylace



V jaké části molekuly došlo ke změně?

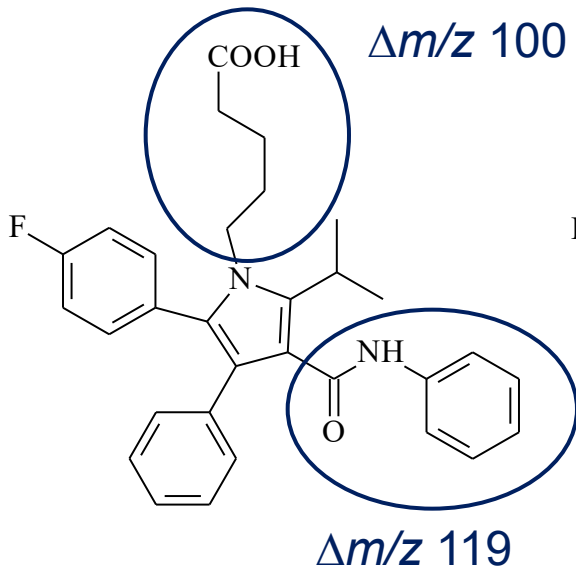
atorvastatin

M=558

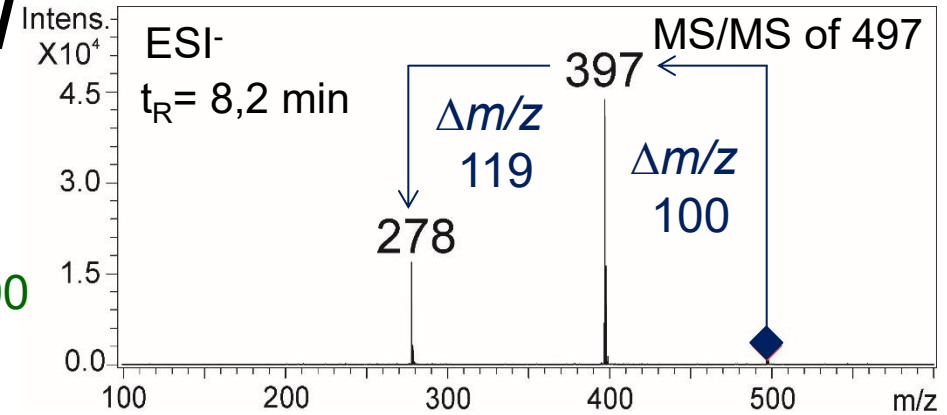


β -oxidace

M=498

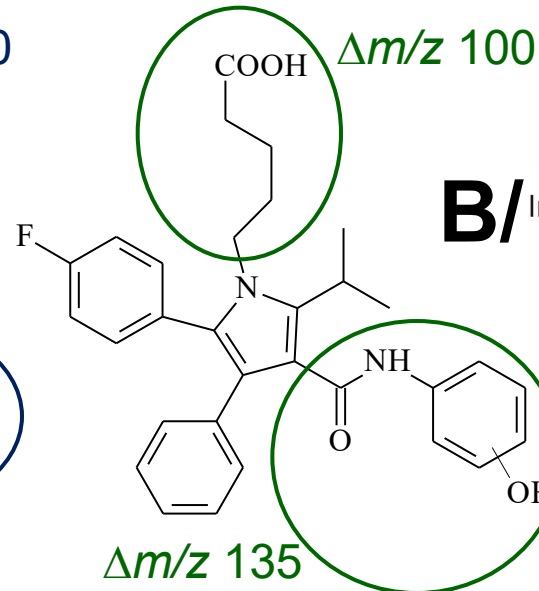


A/

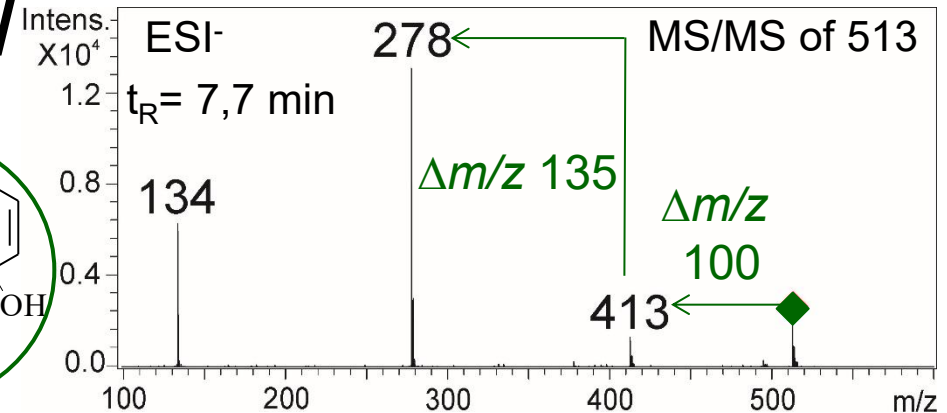


β -oxidace + hydroxylace

M=514

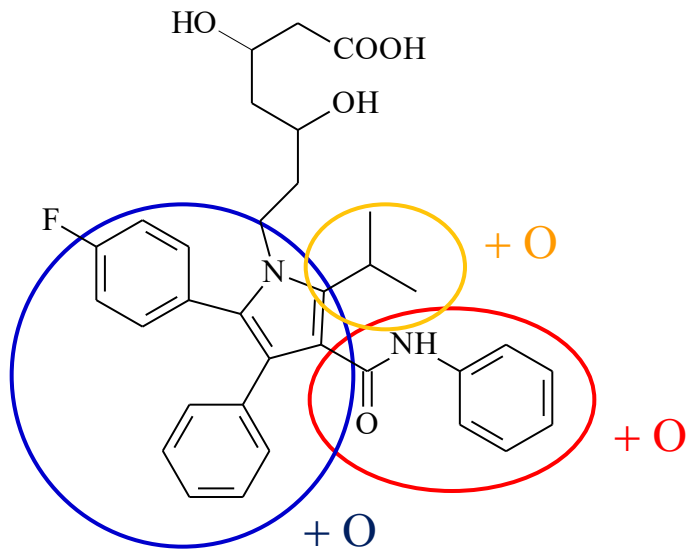


B/

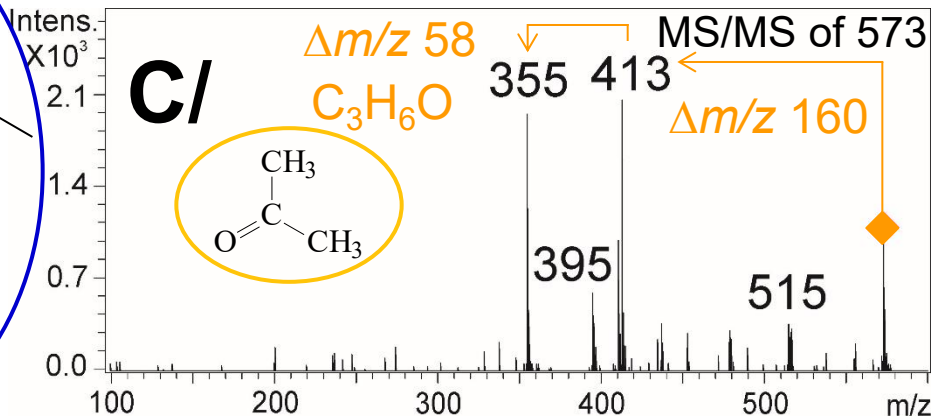
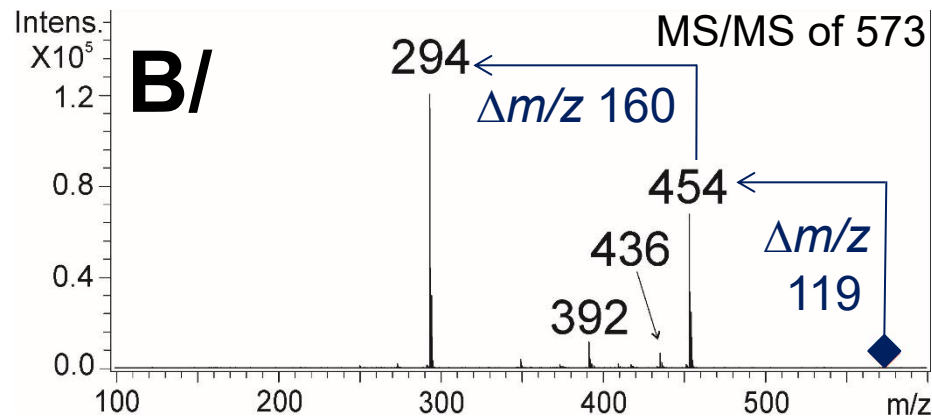
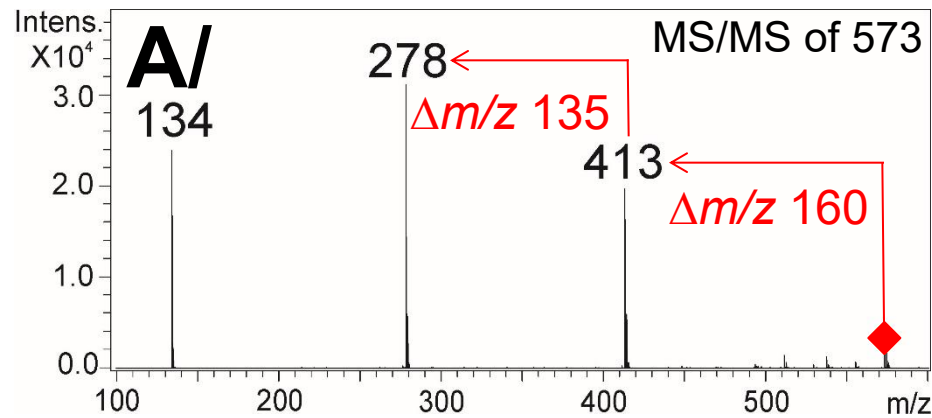
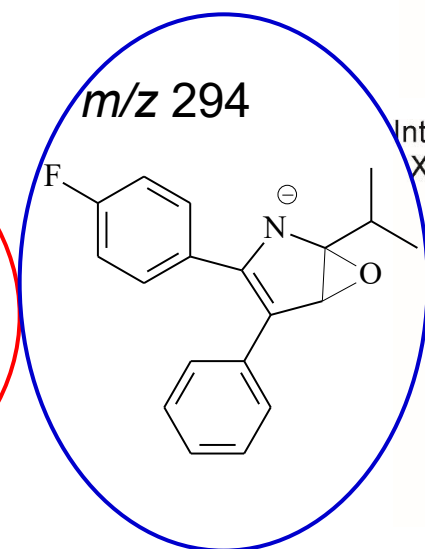
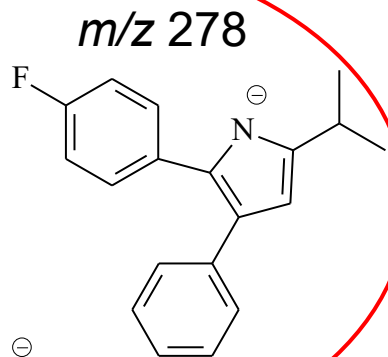
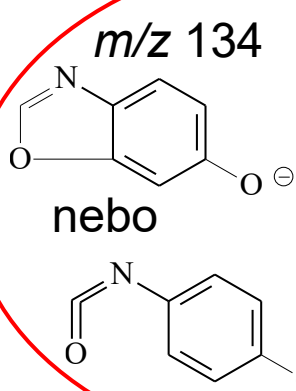


V jaké části molekuly došlo k oxidaci?

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



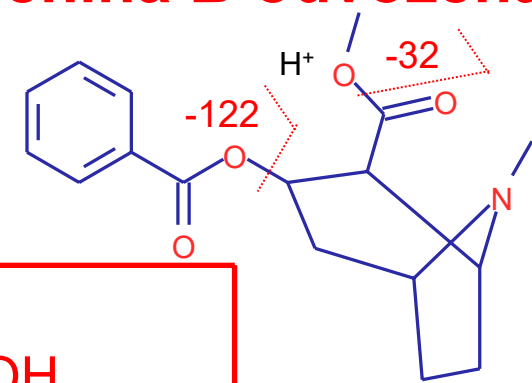
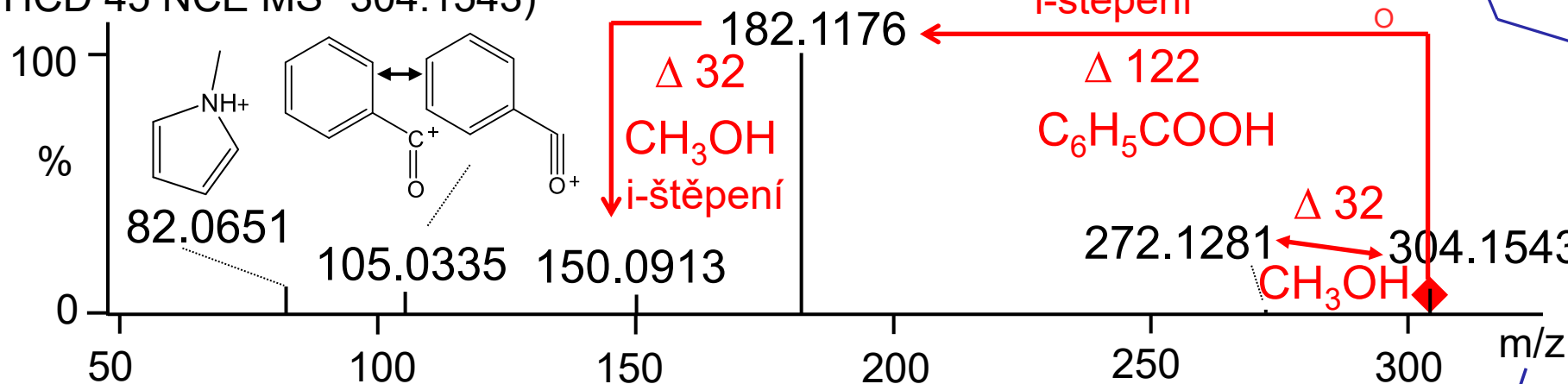
Struktury produktových iontů



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

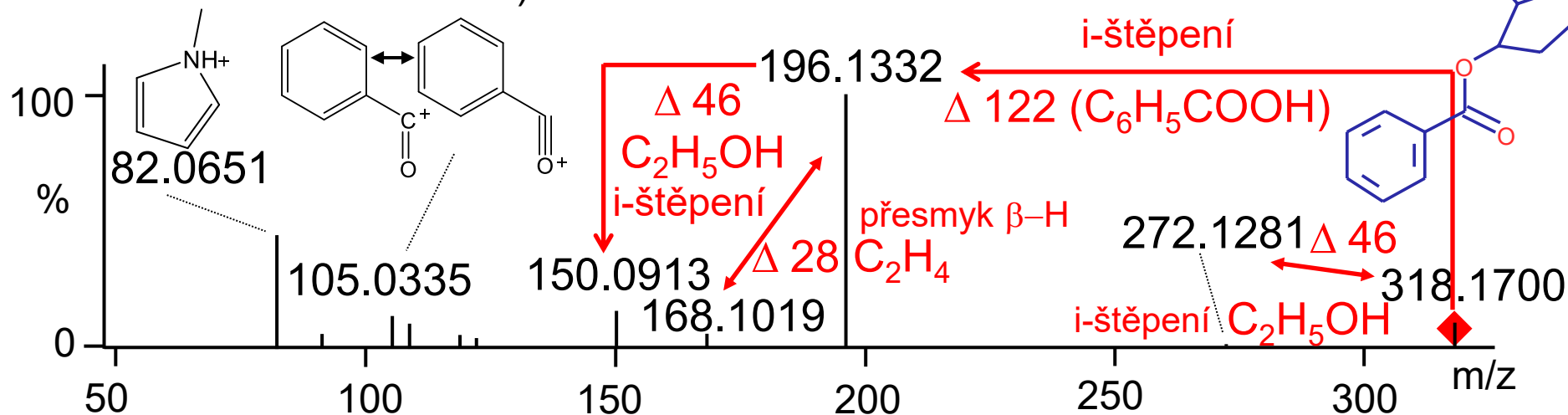
Sloučenina A: ESI⁺, MS/MS iontu [M+H]⁺

(FT HCD 45 NCE MS² 304.1543)



Sloučenina B: ESI⁺, MS/MS iontu [M+H]⁺

(FT HCD 40 NCE MS² 318.1700)



Kokaethylen

