

Elektrochemie

EC-(LC)-MS zur Vorhersage metabolischer Prozesse

Die online-Kopplung von Elektrochemie (EC) und Massenspektrometrie (MS) stellt eine vielversprechende Methode für die Simulation und Vorhersage von metabolischen Prozessen wie z.B. dem oxidativen Metabolismus von Xenobiotika dar.

Die Nutzung von EC/Flüssigchromatographie(LC)/MS ermöglicht:

1. Eine gezielte und schnelle Synthese von Metaboliten (Stunden gegenüber Tagen oder Wochen bei der Anwendung von *in vivo*-Methoden).
2. Die Umgehung von Matrixeffekten und komplexen Isolierungsschritten.
3. Die Erkennung oxidativ labiler Stellen in Wirkstoffmolekülen.
4. Den Ausschluss von Adduktbildungen mit Zellmaterial.

Instrumentierung

Antec Leyden hat ein für die Simulation oxidativer Metabolismusreaktionen prädestiniertes System (Roxy EC/LC Analyzer) entwickelt, das auf zwei LC-Pumpen für die Gradientenelution, einem Autosampler für die automatische Probenbearbeitung sowie dem Roxy Potentiostaten mit Reaktorzelle für die elektrochemische Umsetzung der Analyten basiert. Abbildung 1 zeigt den Roxy EC/LC-Analyzer, welcher als „Frontend System“ für das MS verwendet wird; in Abbildung 2 ist zudem die Reaktorzelle im Detail dargestellt.



Abb.1: Roxy EC/LC-System

Schon Ende der 80er Jahre wurden elektrochemische Reaktionszellen online mit Massenspektrometern gekoppelt, um Redoxreaktionen von verschiedensten Substanzen, einschließlich Biomolekülen, zu studieren [1,2]. Es wurde bald deutlich, dass diese Technik interessante Möglichkeiten für die Simulation von oxidativen Metabolismusreaktionen eröffnet. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass der Phase I-Metabolismus, welcher im Körper normalerweise durch Enzyme der Cytochrom P450-Gruppe (CYP) katalysiert wird, hauptsächlich Oxidationsreaktionen („Funktionalisierung“) umfasst. In letzter Zeit haben verschiedene Studien die Nützlichkeit der EC für eine solche Simulation metabolischer Prozesse von Wirkstoffen gezeigt. EC/MS wurde beispielsweise für die Untersuchung von N,N-Dimethylanilin [1], Dopamin [3], dem Dopaminagonisten 2-(N-Propyl-N-2-thienylethylamino)5-hydroxytetralin [4], Paracetamol [5, 6], Zotepin [7], Amodiaquin [8], Clozapin [6], Troglitazon [9], Diclofenac [10], Tetrabezepam [11] und anderen Verbindungen verwendet. Diese Arbeiten wurden vor kurzem in Review-Veröffentlichungen zusammengefasst [12,13]. Besonders die Kombination der online-EC/LC/MS hat sich als nützliches Werkzeug für die Untersuchung des oxidativen Metabolismus in der Wirkstoffentwicklung erwiesen, da durch die Integration eines flüssigchromatographischen Trennsystems zusätzlich Aussagen über die Polarität der entstehenden Metabolite gemacht werden können, sodass die Möglichkeit ihrer Identifizierung gegeben ist. Im Folgenden wird eine geeignete Hardware für solche Studien beschrieben.



Abb. 2: Reaktorzelle mit Inlet und Outlet (links) sowie Elektrodenhalter mit verschiedenen Arbeitselektroden (rechts)

In Abbildung 3 werden zwei typische Hardware-Konfigurationen für eine Simulation des Phase I-Metabolismus vorgestellt. Abbildung 3a zeigt die EC/MS-Kopplung, die Anordnung der Wahl für eine Oxidation des relevanten Pharma-

zeitikums mit direkter massenspektrometrischer Detektion. Durch Verwendung einer Spritzenpumpe wird die Probenlösung in die Reaktorzelle und anschließend in das MS oder MS/MS geleitet. Der EC/MS-Ansatz eignet sich hervorragend zur Erzeugung und Detektion reaktiver, kurzlebiger Metabolite, die in *in-vitro*- oder *in-vivo*-Ansätzen meist durch z. B. Protein- oder DNA-Adduktbildungen unentdeckt bleiben.

Abbildung 3b zeigt den Aufbau einer online-EC/LC/MS-Kopplung für das detaillierte und automatisierte Metabolismus-Screening. Mit Hilfe eines speziell modifizierten Autosamplers wird der zu untersuchende Wirkstoff dabei in die Reaktorzelle überführt; dessen Oxidationsprodukte werden dann flüssigchromatographisch getrennt und anschließend mit einem Massenspektrometer detektiert. So sind beispielsweise Aussagen bezüglich der Polarität und einer möglichen Isomerie der erzeugten Oxidationsprodukte möglich. Für weiterführende Konjugationsreaktionen (Phase II-Metabolismus) kann eine zusätzliche Spritzenpumpe verwendet werden, wodurch sich über eine Reaktionsschleife Glutathion (GSH) oder andere relevante Reagenzien zu den Phase I-Metaboliten mischen lassen.

Funktionen des Roxy EC/LC Systems

- 1. Kompatibilität mit jedem Massenspektrometer:** Diese ist durch einen „Contact Closure“ sowie durch die Clarity Software zur Datenverarbeitung gegeben.
- 2. Automatisches Screening:** Durch die Verwendung eines speziell modifizierten Autosamplers ist ein einfaches und automatisches Screening von Xenobiotika möglich.
- 3. System-Flexibilität:** Verschiedene Systemkonfigurationen sind möglich, z. B. für hohen oxidativen/reduktiven Umsatz, schnelles Screening von verschiedenen Proben, Phase I- und/oder Phase II-Metabolismus etc.
- 4. Roxy-Potentiostat:** Großer Bereich des Arbeitspotentials möglich: bis $\pm 5,0$ Volt, wobei zumeist der Bereich $\pm 2,5$ V ausreicht, System ist mit bis zu vier Reaktorzellen aufrüstbar (simultanes Nutzen verschiedener Arbeitselektroden und/oder Potentiale), Puls-Modus für optimale Reaktorzellaktivierung und Reinigung der Arbeitselektrode, Scan-Modus für schnelle Messung und optimales Umsatzpotential.
- 4. Reaktionszelle:** Patentierte Dünnschichtreaktorzelle, die minimale Probenadsorption gewährleistet, einfacher und schneller Arbeitselektrodenwechsel, große Vielzahl verschiedener Arbeitselektroden z. B. GC, Au, Pt, MD (Magic Diamond), mikro-präparative Zelle, Verwendung verschiedener Abstandshalter.

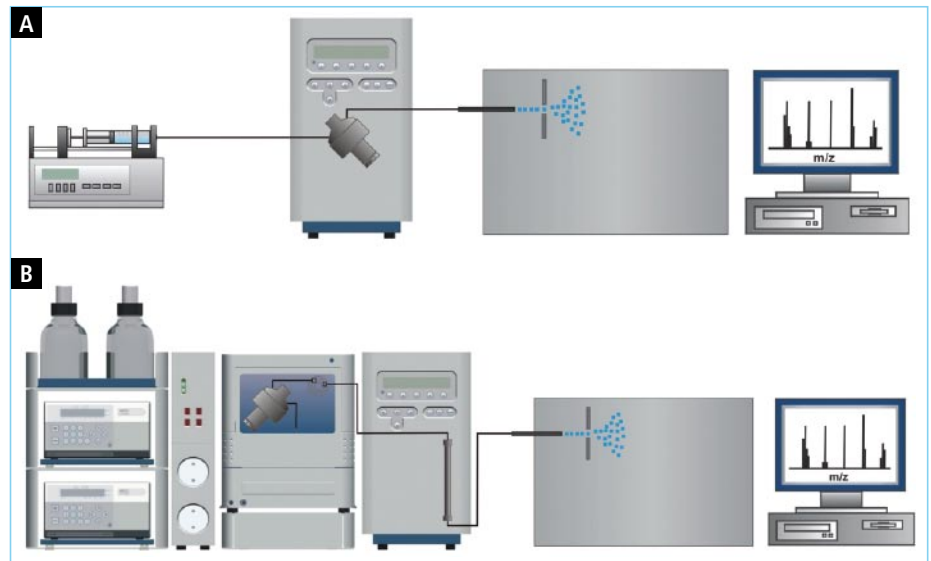


Abb. 3: Hardware-Schemata für die Simulation des oxidativen Phase I-Metabolismus.
a) EC/MS-Kopplung für erste Metabolismusstudien unter Verwendung des Roxy EC Systems
b) EC/LC/MS-Kopplung für detaillierte und automatisierte Analysen der Oxidationsprodukte.

Resultate

(Basierend auf den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Uwe Karst, Universität Münster wie in Literaturstelle [5] beschrieben.)

Die online Kopplung von EC/LC/MS wurde für die Simulation des oxidativen Phase I- und des konjugativen Phase II-Metabolismus von Paracetamol im menschlichen Körper ausgenutzt. Paracetamol (PC), auch bekannt unter den Markennamen Panadol, Tylenol etc., wurde in einer Reaktorzelle mit einer Arbeitselektrode aus Glas-

kohlenstoff (glassy carbon, GC) bei einem Potential von 600 mV zu dem reaktiven Chinonimin (Phase I-Metabolit) oxidiert. Dieses Chinonimin reagiert im Weiteren mit der Thiofunktion von GSH bzw. von N-Acetylcystein (NAC) zu isomeren Phase II-Addukten. Diese Addukte werden dann mittels LC/MS getrennt und charakterisiert. Die Reaktionen sind mit denen vergleichbar, die zwischen Paracetamol und GSH im menschlichen Körper unter der Katalyse von CYP (Phase I) bzw. von Glutathion-S-Transferasen (Phase II) stattfinden. In Abbildung 4 sind die

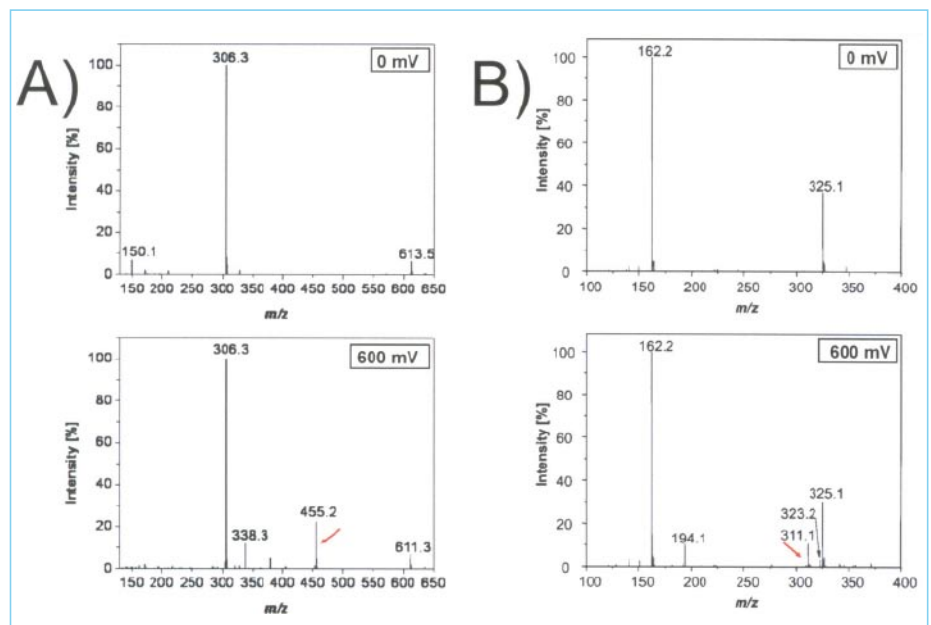


Abb. 4: Massenspektren von PC vor und nach der Oxidation bei 600 mV (negativer Ionisationsmodus)
a) In Anwesenheit des 5-fachen Überschusses von GSH (5 % MeOH, 95 % 20 mM aq. NH_4Ac Puffer, pH 7) bei 0 mV und bei 600 mV.
b) In Anwesenheit der 5-fachen Menge an NAC (5 % MeOH, 95 % 20 mM aq. NH_4Ac Puffer, pH 7) bei 0 mV und bei 600 mV.

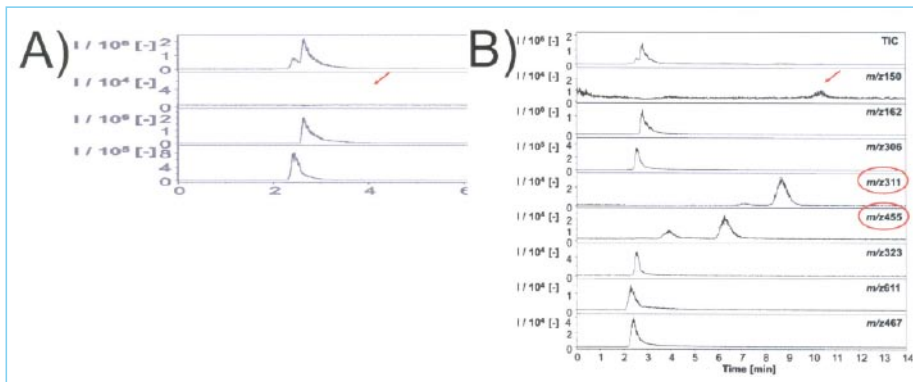


Abb. 5: EC/LC/MS-Chromatogramme einer Lösung, die folgende Verbindungen enthält: PC (10^{-4} M), GSH (10^{-4} M) und NAC (10^{-4} M).

a) Ohne EC (0 mV); gezeigt sind der TIC und die Massenspektren von PC (m/z 150), NAC (m/z 162) und GSH (m/z 306).

b) Mit EC (600 mV); gezeigt sind der TIC und die Massenspektren von PC (m/z 150), NAC (m/z 162) und GSH (m/z 306) sowie von dem NAC-PC-Addukt (m/z 311), dem GSH-PC-Addukt (m/z 455), dem NAC-Dimer (m/z 323), dem GSH-Dimer (m/z 611) und einem Komplex aus NAC und GSH (m/z 467)

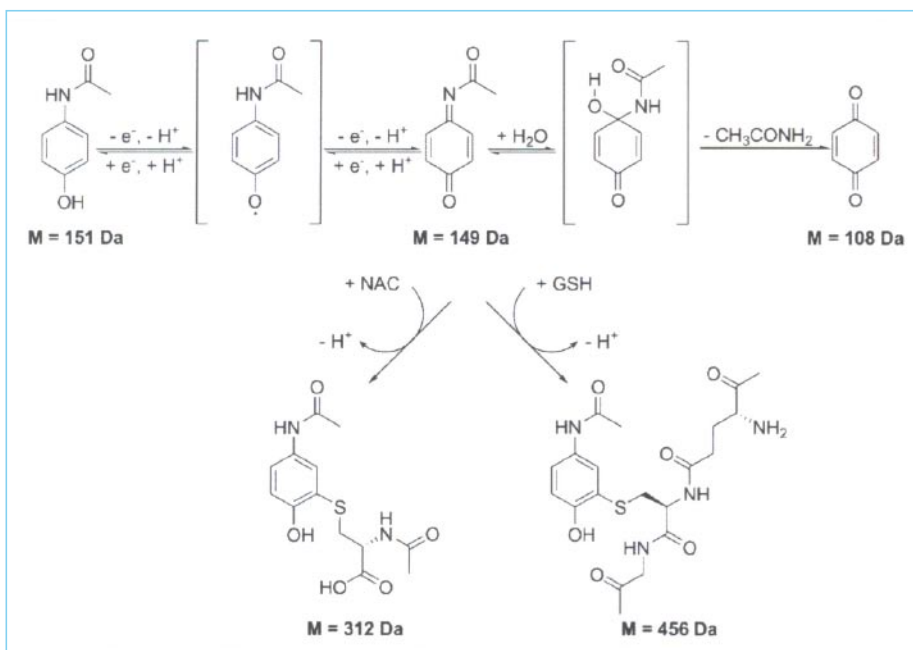


Abb. 6: Reaktionsschema für die elektrochemische Oxidation von PC in Anwesenheit von GSH und NAC

Massenspektren der EC/MS-Untersuchung von PC (m/z 150) unter Zugabe von GSH (m/z 306) bzw. NAC (m/z 162) vor sowie nach der Oxidation bei 600 mV dargestellt. Die aus der EC-Oxidation resultierenden Phase II-Konjugate werden mit m/z 455 (PC-GSH-Addukt) bzw. mit m/z 311 (PC-NAC-Addukt) detektiert.

In Abbildung 5 werden die nach EC/LC/MS-Analyse erhaltenen Chromatogramme von PC gezeigt. Mit abgeschalteter Reaktorzelle (0 mV) können nur drei Signale detektiert werden (Abb. 5A). In Abbildung 5B sind zum Vergleich die Chromatogramme bei der Oxidation mit einer Spannung von 600 mV dargestellt. Der starke Intensitätsverlust der Massenspur mit m/z 150 (PC) bei 600 mV Arbeitselektroden-Spannung zeigt, dass PC fast vollständig in verschiedene Oxidati-

onsprodukte umgesetzt wurde. Die Massenspektren mit m/z 311 und m/z 455 repräsentieren jeweils das GSH- bzw. das NAC-Addukt von PC.

Die elektrochemischen Reaktionen, die in der Reaktionszelle stattfinden, werden in Abbildung 6 zusammengefasst. Die Oxidation von PC startet mit dem Verlust eines Elektrons und eines Protons, was in der Bildung eines intermediären Radikals resultiert. In der folgenden Reaktion geschieht ein zweiter Elektronen- und Protonentransfer, welches dann zur Bildung des toxischen Metaboliten N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI) führt. Durch die Anwesenheit von endogenen, polaren und meist nukleophilen Molekülen wie GSH oder NAC wird NAPQI durch Adduktbildung vom Körper ausgeschieden. Diese Addukte konnten sehr einfach durch den EC/

LC/MS-Ansatz erzeugt und nachgewiesen werden und sind ein wichtiger Bestandteil des bekannten Entgiftungsweges von NAPQI in der menschlichen Leber (Phase II-Metabolismus).

Zusammenfassung

Paracetamol wurde mit Hilfe von EC/MS- und EC/LC/MS-Experimenten erfolgreich als Modellsubstanz für die Simulation des oxidativen Metabolismus eingesetzt. Phase I- und Phase II-Metabolite, welche schon als Stoffwechselprodukte *in vivo* bekannt waren, wurden in der elektrochemischen Reaktorzelle generiert sowie online mittels LC/MS aufgetrennt und identifiziert. Hierzu wurde entweder ausschließlich PC analysiert, oder dieses mit Glutathion bzw. N-Acetylcystein umgesetzt. Diese Resultate belegen eindeutig das große Potential der EC/LC/MS-Kopplung als wertvolles Werkzeug zur instrumentellen Vorhersage metabolischer Prozesse.

Referenzen

- [1] Hambitzer G. und Heitbaum J.: anal Chem, 58 1067(1986)
- [2] Volk K. J. et al.: Anal Chem, 60, 720 (1988)
- [3] Deng H. und van Berkel G. J.: Electroanalysis, 11, 857(1999)
- [4] Jurva U. et al.: Rapid Commun Mass Spectrom, 14, 529 (2000)
- [5] W. Lohmann and U. Karst, Anal Bioanal. Chem, 386, 1701 (2006)
- [6] Madsen K.G. et al.: Chem res Toxicol, 20, 9, 821(2007)
- [7] Nozaki K. et al.: Mass Spectrom, 41, 606 (2006)
- [8] Lohmann W. und Karst U.: Anal Chem, 79, 6831 (2007)
- [9] Madsen K.G. et al.: Chem Res Toxicol, 21, 1107 (2008)

Weitere Literatur direkt bei den Autoren

KONTAKT

Jean-Pierre Chervet
Antec Leyden B.V.

Ralf Becker
Axel Semrau GmbH & Co. KG
Sprockhövel
Tel.: 02339-12090
ralf.becker@axel-semrau.de
www.axel-semrau