

***Métodos analíticos para el estudio
e identificación de metabolitos***

- ***Metabolitos?***

Como, porque y donde se producen...

- ***Separación y resolución de un metabolito de una matriz biológica***
- ***La técnica de elección. Espectrometría de masas***
- ***Otras Técnicas Espectroscópicas (UV, IR, RMN)***

The study of how the drug is:

- Absorbed
- Distributed
- **Metabolized**
- Eliminated

→ It is VITAL, however costly and time-consuming in the drug discovery process.

- The uptake of almost all organic compounds is followed by metabolism (**biotransformation**) reactions
- Among all compounds, **drugs and pesticides** are the most important as the biotransformation does not always lead to
 - inactivation (**detoxification**) of the agent
 - in some instances, may lead to more active (**bioactivation**)
 - or even more toxic compounds

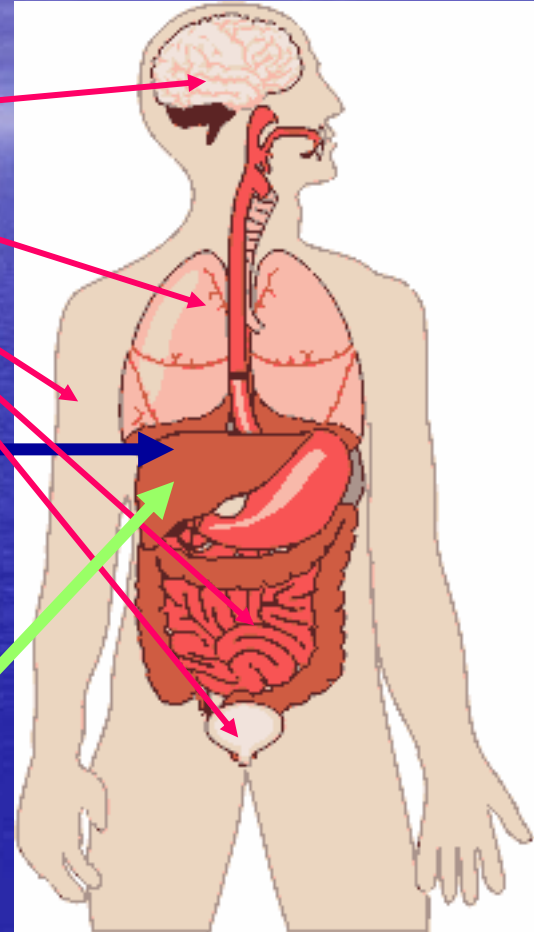
Pharmaceutical industries are mandated by regulatory agencies to **identify ALL metabolites**

Drug Metabolism

**Extrahepatic microsomal enzymes
(oxidation..)**

**Hepatic microsomal enzymes
(oxidation...)**

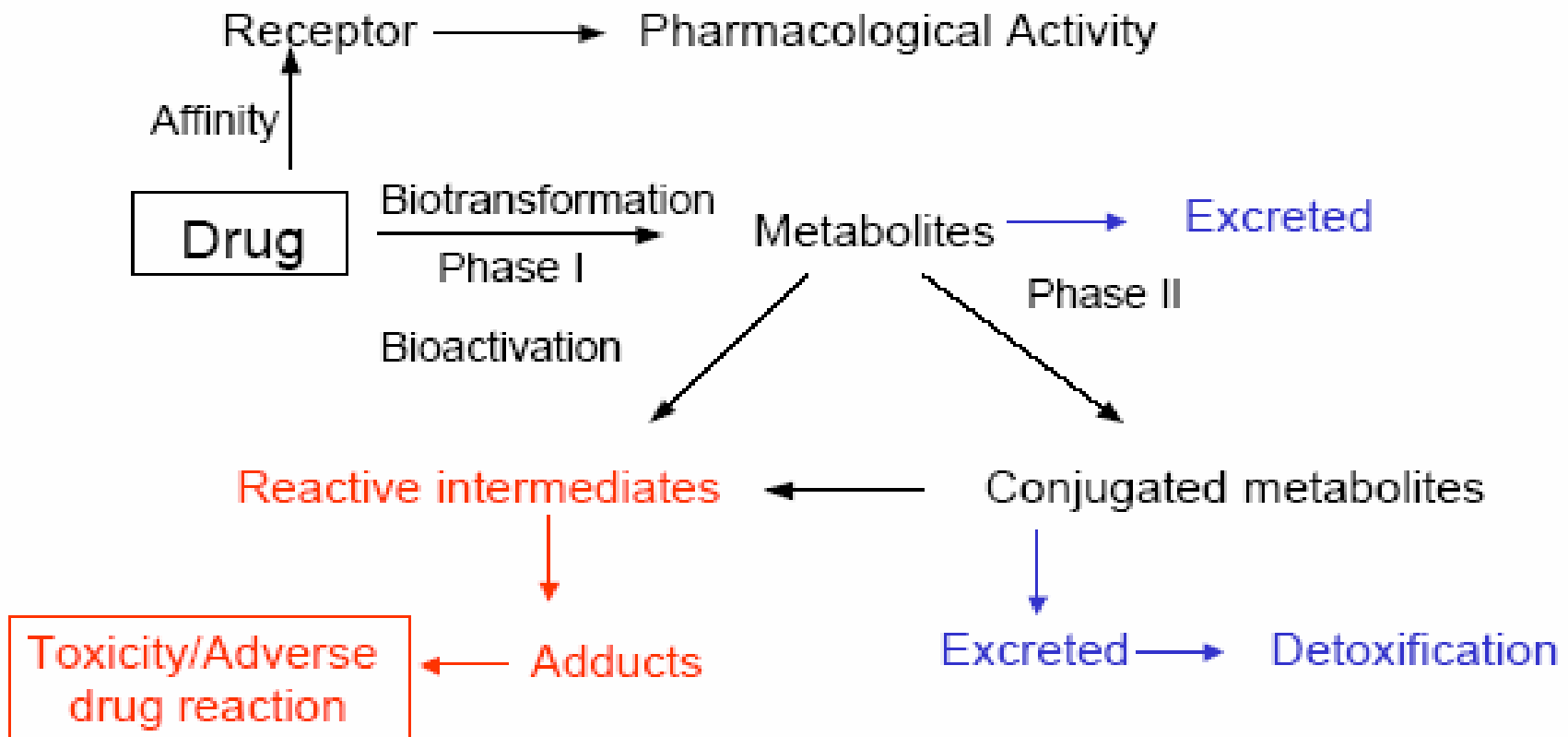
**Hepatic non-microsomal enzymes
(acetylation, sulfation, GSH,
alcohol/aldehyde dehydrogenase,
hydrolysis, ox/red)**



- Most of the drugs are eliminated from the body by metabolism: **Detoxification process.**
- The metabolites modulate the efficacy of drugs in the treatment of disease.
- The metabolites may possess pharmacological activity.
- The metabolites may be toxic: Bioactivation- *BAD*.
- Metabolites may provide leads to new and more sophisticated drugs.

- Until recently, **Metabolite identification** only took place once the compound had been chosen for drug development
- Due to the toxicity of drug metabolites,
 - Drug Metabolite identification is a lot more serious and closely monitored
 - Metabolite identification studies are done in the **early phases of drug selection**

Fate of Drugs in Living Organisms

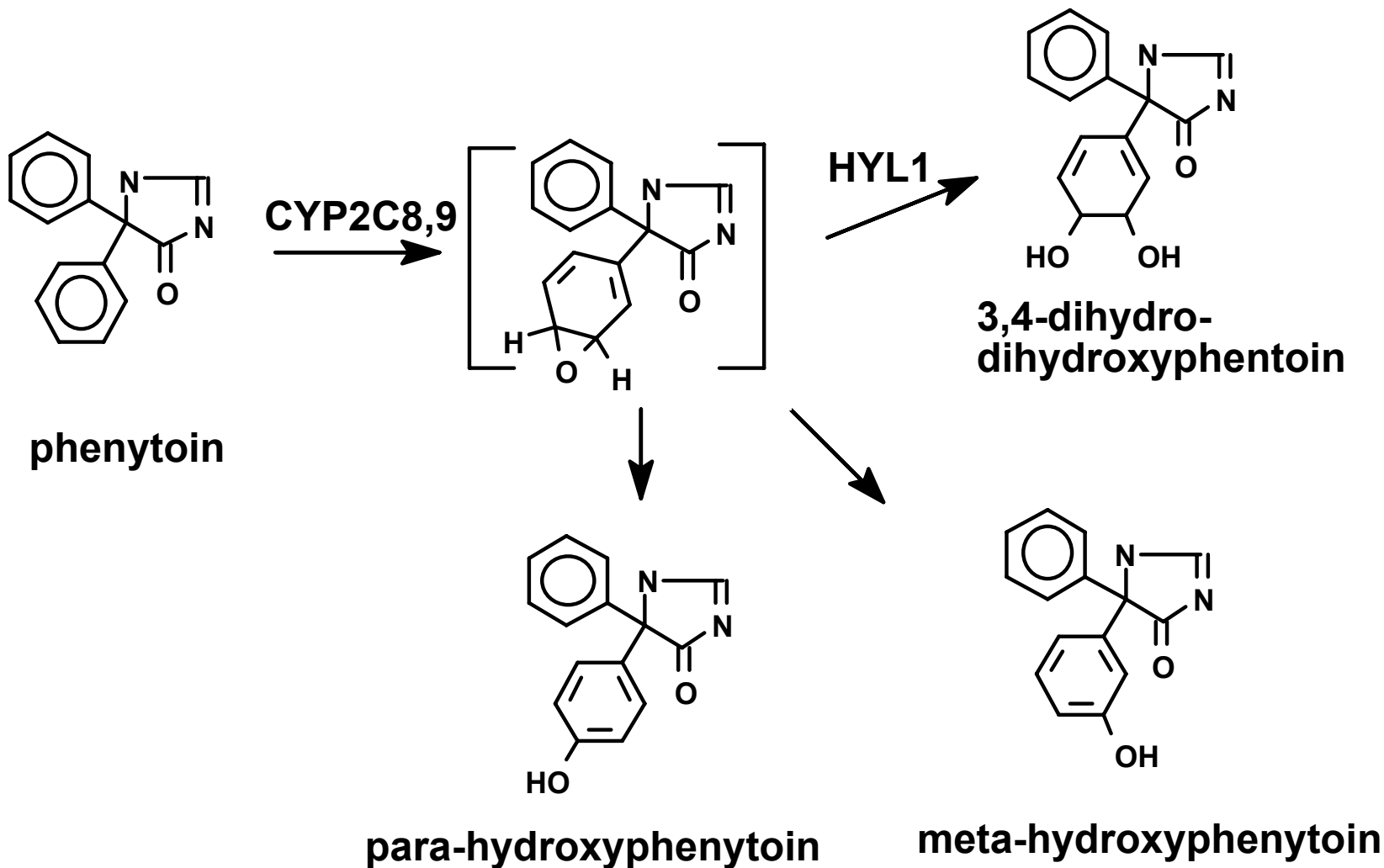


Metabolism (mainly liver)

Two phases:

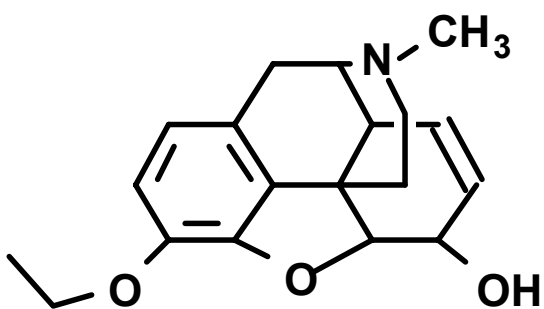
- **Phase I: (activation/detoxification)**
 - Biotransformation reactions: oxidation, reduction and hydrolysis
 - Polar groups introduced, more water soluble, less lipophilic
- **Phase II: (detoxification)**
 - Conjugation reactions
 - Reactions most often abolish biological activity and add more polarity
 - Very water soluble

phenytoin

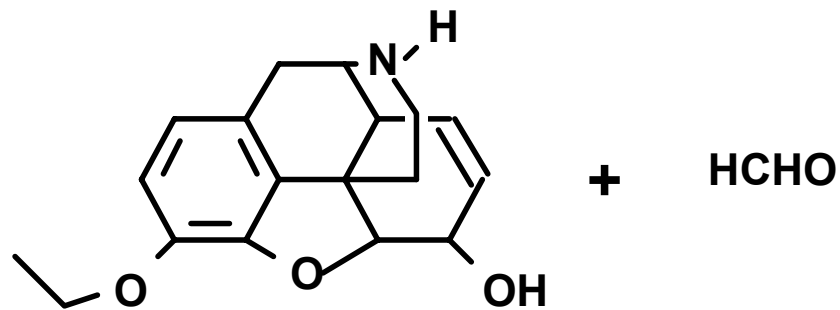


Arene epoxide intermediate produces multiple products

ethylmorphine



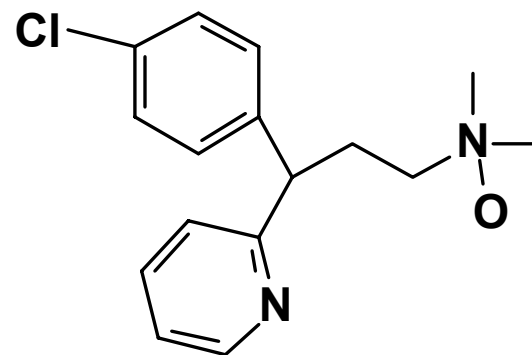
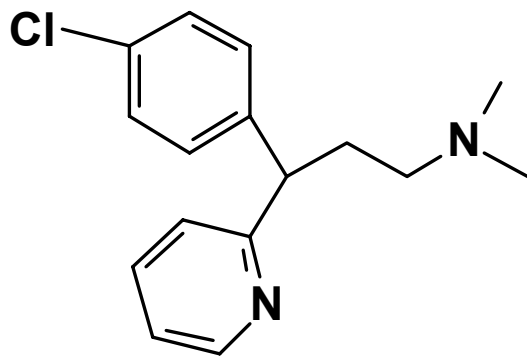
ethylmorphine



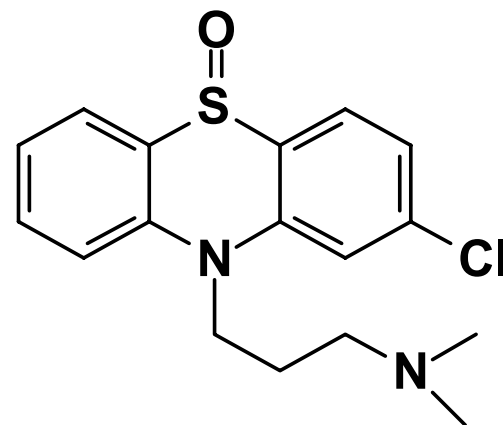
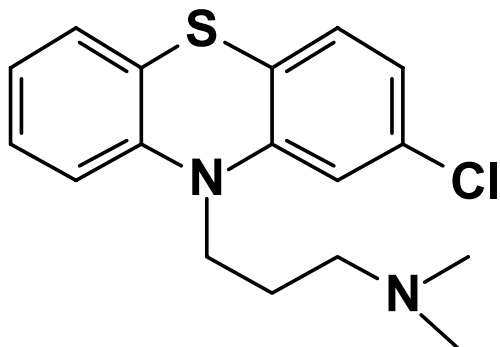
desmethyl-ethylmorphine

N-demethylation favored over O-dealkylation

chlorpheniramine

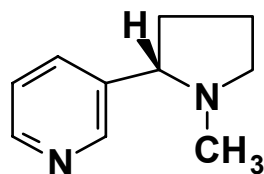


chlorpromazine

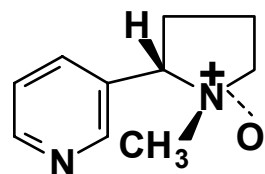
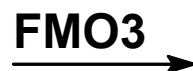


Non-CYP drug oxidations

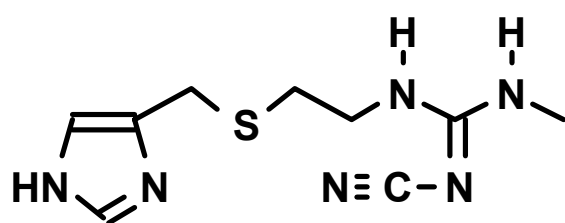
FMO Oxidations



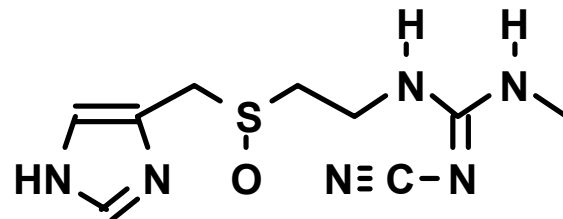
nicotine



nicotine-N-oxide



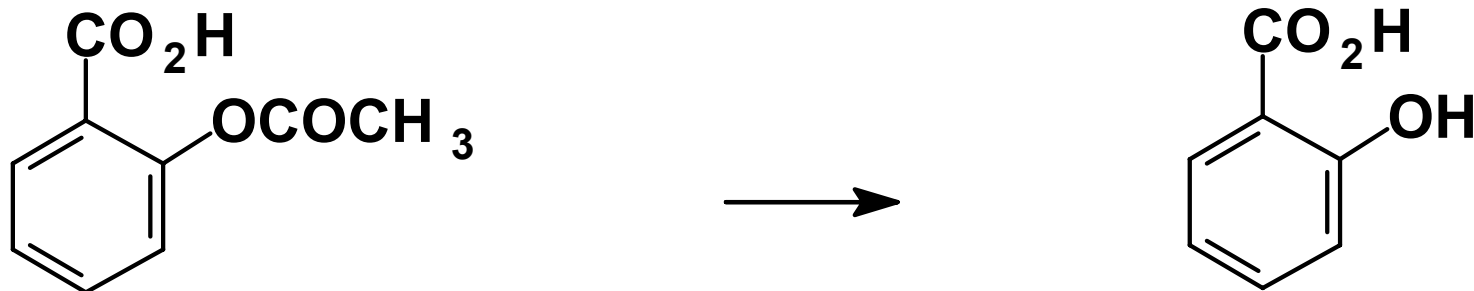
cimetidine



cimetidine S-oxide

Hydrolysis Reactions

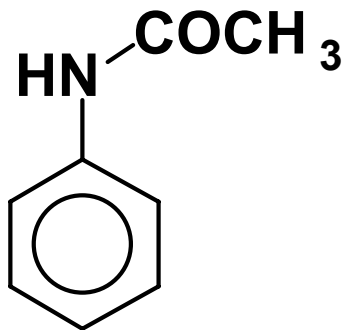
Example: aspirin (others include procaine, clofibrate)



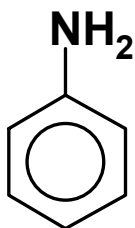
Acetaminophen (Paracetamol). p-aminophenols

- **Acetanilide** – 1886 – accidentally discovered antipyretic; excessively toxic (methemoglobinemia); para-aminophenol and derivatives were tested.
- **Phenacetin** introduced in 1887, and extensively used in analgesic mixtures until implicated in analgesic abuse **nephropathy**; 1946, Lester reported conjugated para-aminophenol as major metabolite of acetanilide
- 1948-49 Brodie and Axelrod recognized **acetaminophen** as the major active metabolite in **phenacetin**
- **CAR** modulates acetaminophen toxicity [*Science* (Oct 11) 298:422, 2002]

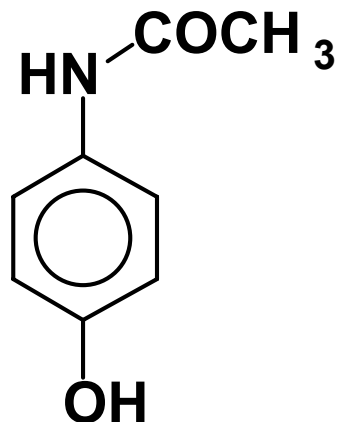
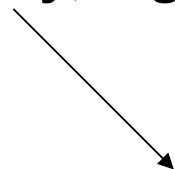
Acetaminophen and p-Aminophenols



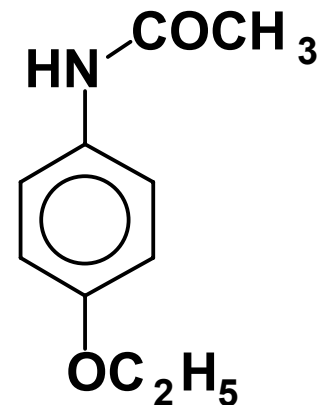
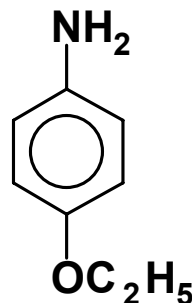
Acetanilide, 1886
(accidental discovery of antipyretic activity; high toxicity)



70-90%

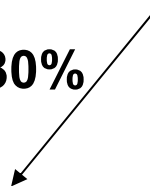


Acetaminophen, 1893



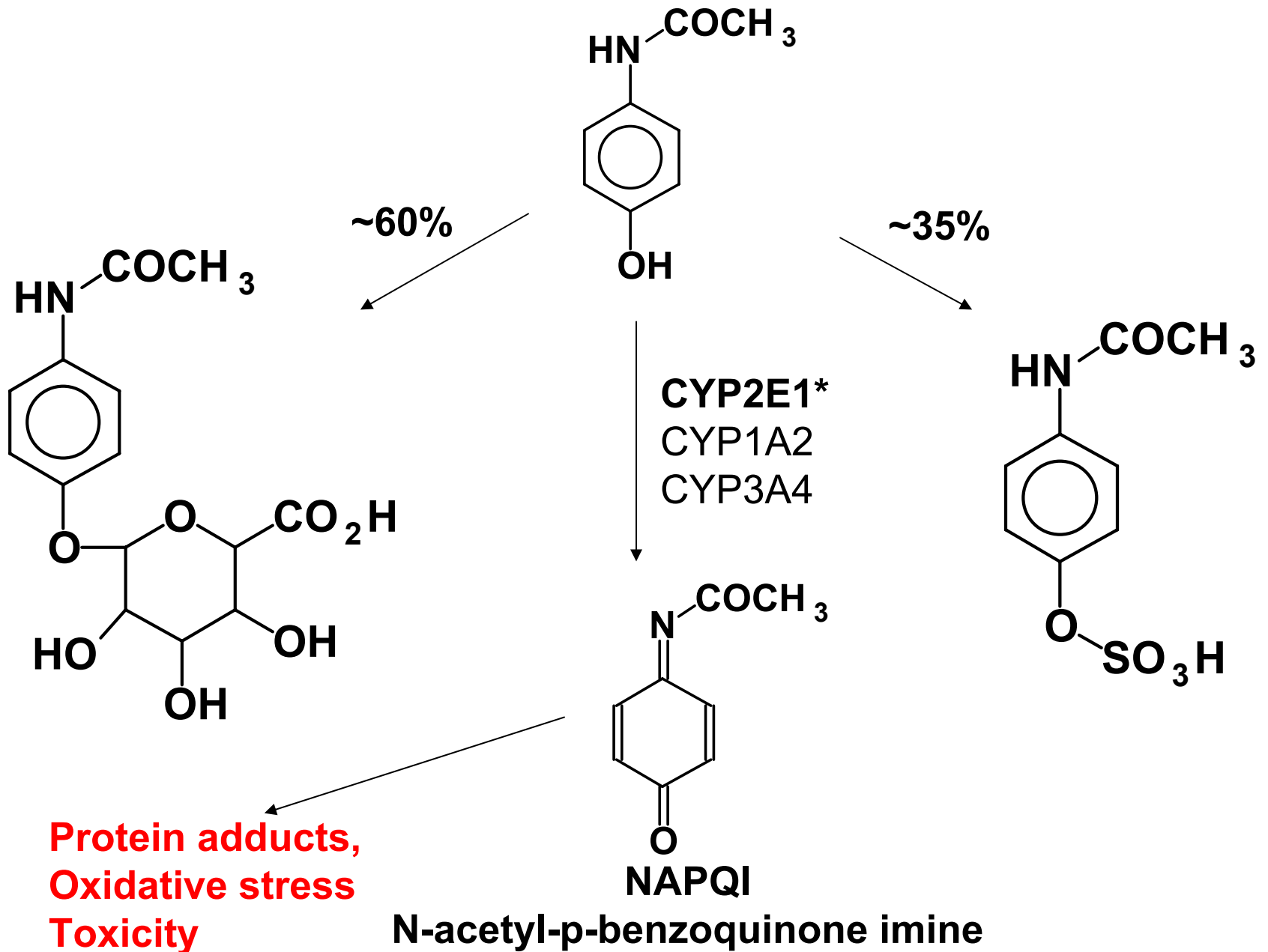
Phenacetin or acetophenetidin, 1887
(nephrotoxic, methemoglobinemia)

75-80%



Recognized as active metabolite of **acetanilide** and **phenacetin** in 1948 (Brodie & Axelrod); popular in US since 1955

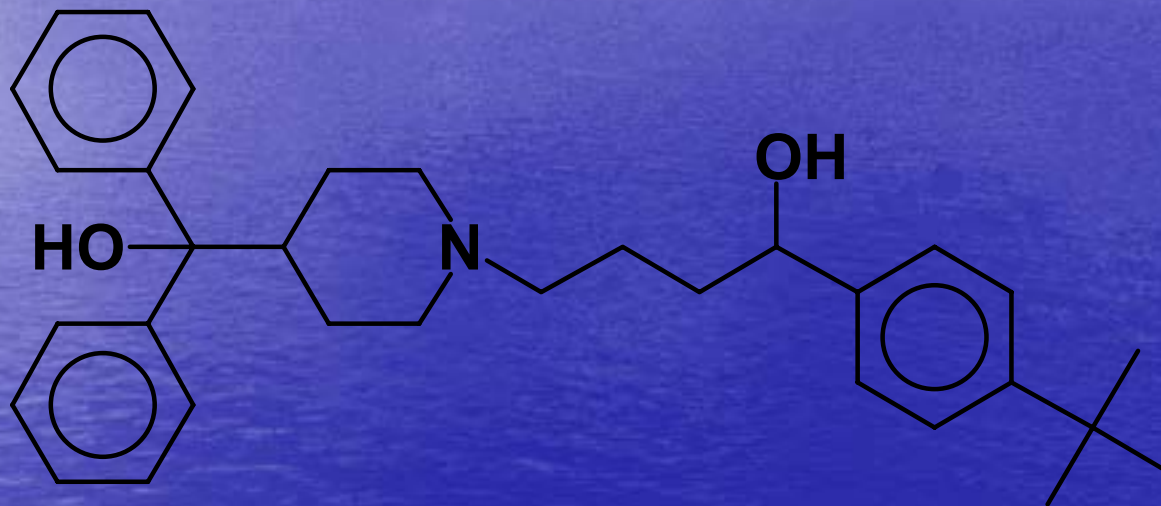
Acetaminophen Metabolism



Acetaminophen Toxicity

- Acetaminophen overdose results in more calls to poison control centers in the United States than overdose with any other pharmacologic substance.
- The American Liver Foundation reports that 35% of cases of severe liver failure are caused by acetaminophen poisoning which may require organ transplantation.
- *N*-acetyl cysteine is an effective antidote, especially if administered within 10 h of ingestion [NEJM 319:1557-1562, 1988]
- Addition of *N*-acetyl cysteine to acetaminophen tablets proposed to prevent liver toxicity. [British Medical Journal, Vol. 323, Sept. 15, 2001]

Terfenadine (Seldane[®])



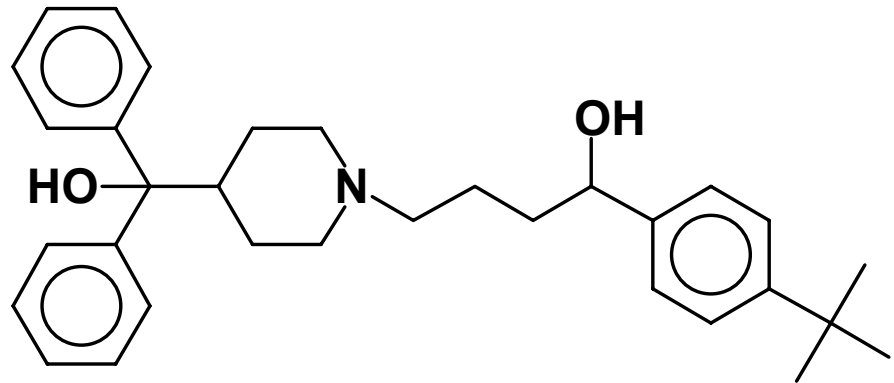
Terfenadine in the News

- **FDA: Terfenadine; Proposal to Withdraw Approval of Two New Drug Applications**
 - *Federal Register* 62, January 14, 1997
- **Hoechst Marion Roussel To Promote Switch From Seldane to Allegra**
 - *Independent News Service*, January 14, 1997
- **Citing Its Side Effects, F.D.A. Weighs Ban on Allergy Drug**
 - *The New York Times*, January 14, 1997
- **FDA Wants Drug Seldane Off Market**
 - *The Washington Post*, January 14, 1997
- **Hoechst's First Quarter Results Below Forecasts**
 - *Independent News Service*, May 7, 1997

Terfenadine

- Developed in 1980s as a **2nd generation** H1-antihistamine; from introduction in 1985, prescriptions > 16 million in 1991
- First generation antihistamines are lipophilic ethylamine derivatives that readily penetrate the CNS and placenta - **objective of 2nd generation is minimal CNS** effects (non-sedating), not crossing the blood brain barrier; longer acting
- **Cardiac side-effects** are serious - inhibition of potassium channels by **unmetabolized parent drug** causes prolongation of QT interval leading to life threatening arrhythmia (torsades de pointes); first recognized at USUHS in 1989 (Monahan BP et al, JAMA 1990; 264:2788-2790.)
- Drugs or substances inhibiting terfenadine metabolism (grapefruit juice, ketoconazole, itraconazole, antimicrobials) or liver dysfunction exacerbate the side effects

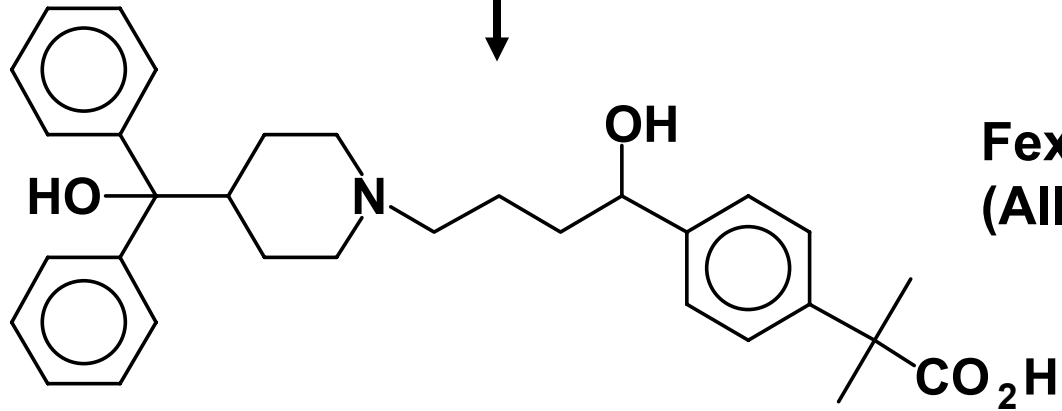
Terfenadine Metabolism



**Terfenadine
(Seldane)**



CYP3A4



**Fexofenadine
(Allegra)**

Análisis de mezclas metabolitos, fármaco

- **In Vitro / In Vivo (distinto tratamiento muestras)**
- **En ambos casos son mezclas complejas.**
- **Pre-tratamiento antes de análisis**
- **Resolución cromatográfica de los compuestos a analizar.**

Resolución por métodos cromatográficos

Elementos que participan en una cromatografía

- **Fase Estacionaria**
- **Fase Móvil**
- **Muestra**

Como **interaccionan**?

En general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (**muestra**) interaccione con un medio o matriz de soporte que se denomina **fase estacionaria**. Un segundo medio (**la fase móvil**) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para "lavar" (eluir) a las moléculas en la muestra.

Regla de interacción!!!!!!!

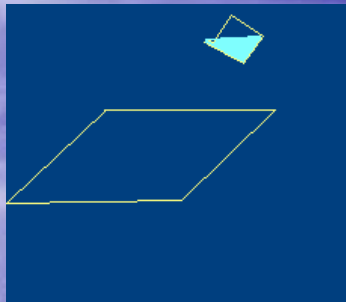
Tipos de cromatografías

Cromatografía en Capa Delgada (Thin Layer Chromatography)

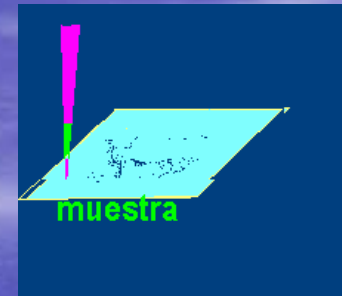
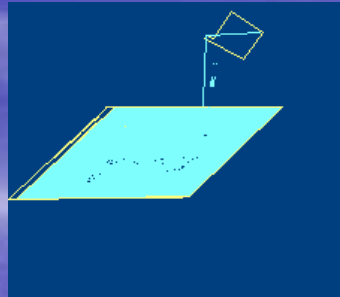
Cromatografía en columna

- Cromatografía de intercambio iónico
 - Cromatografía de filtración en gel
 - Cromatografía de afinidad y de inmunoafinidad
- } Proteínas
- **Cromatografía en fase reversa o fase normal (HPLC)**

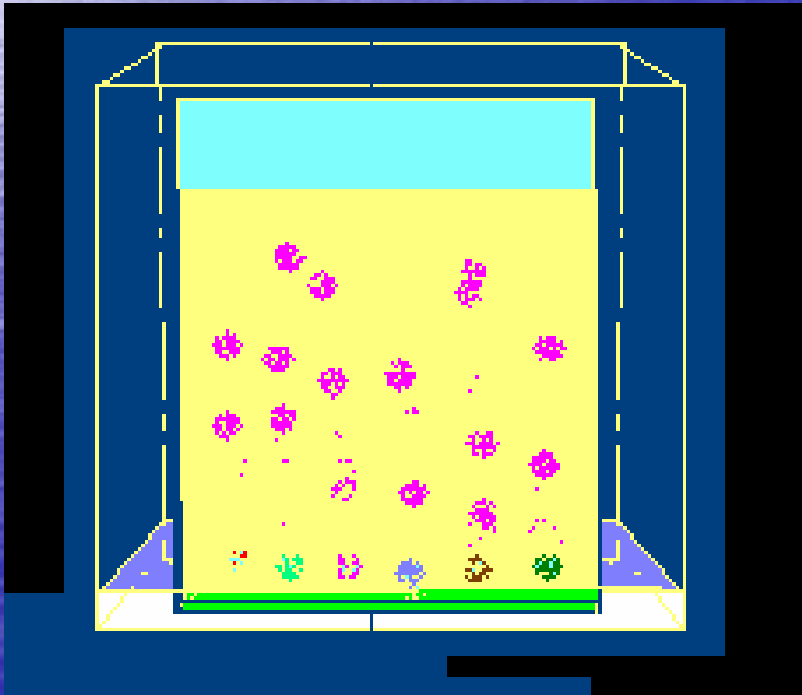
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Ó TLC



Cargado de la placa



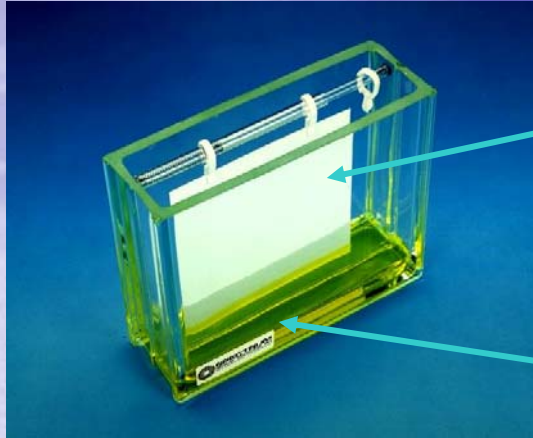
Siembra



Fase estacionaria

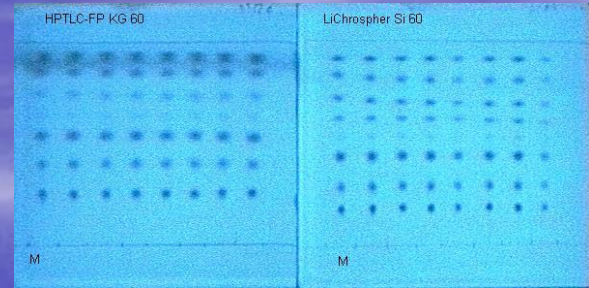
- Gel de sílica
- Alúmina

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Ó TLC



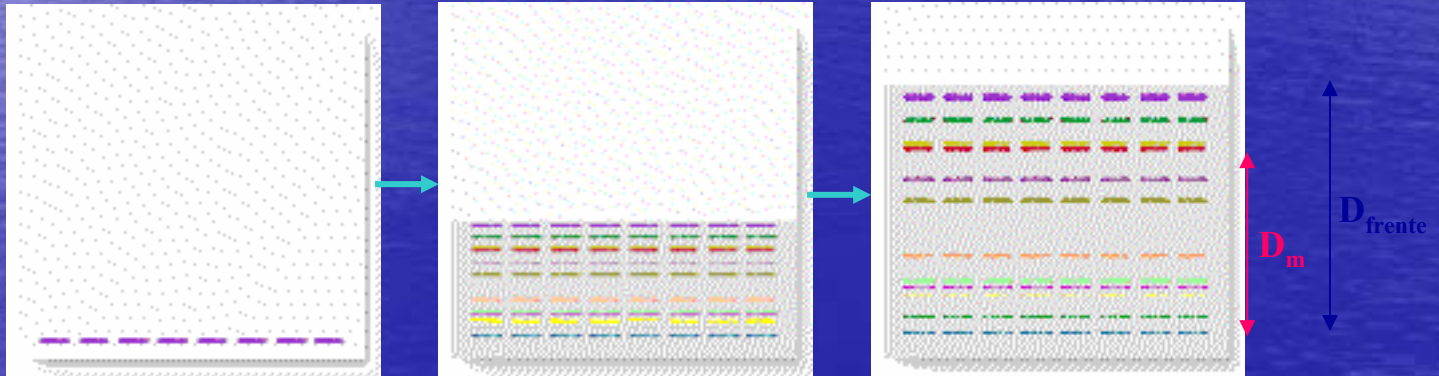
Fase Estacionaria
(placa de silicagel)

Fase movil

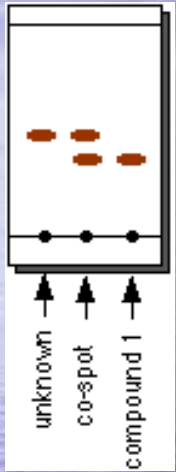


Cromatograma de 8 compuestos

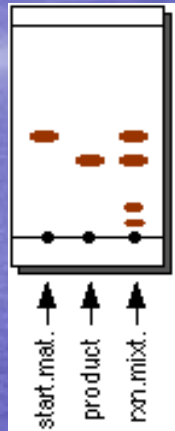
Desarrollo de la cromatografía:



Aplicaciones:



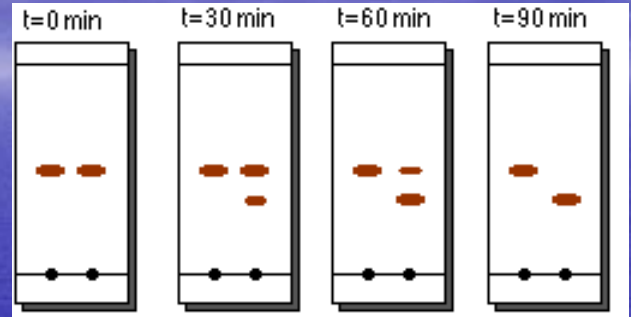
Identificar
compuestos



Analizar mezclas
de reacción

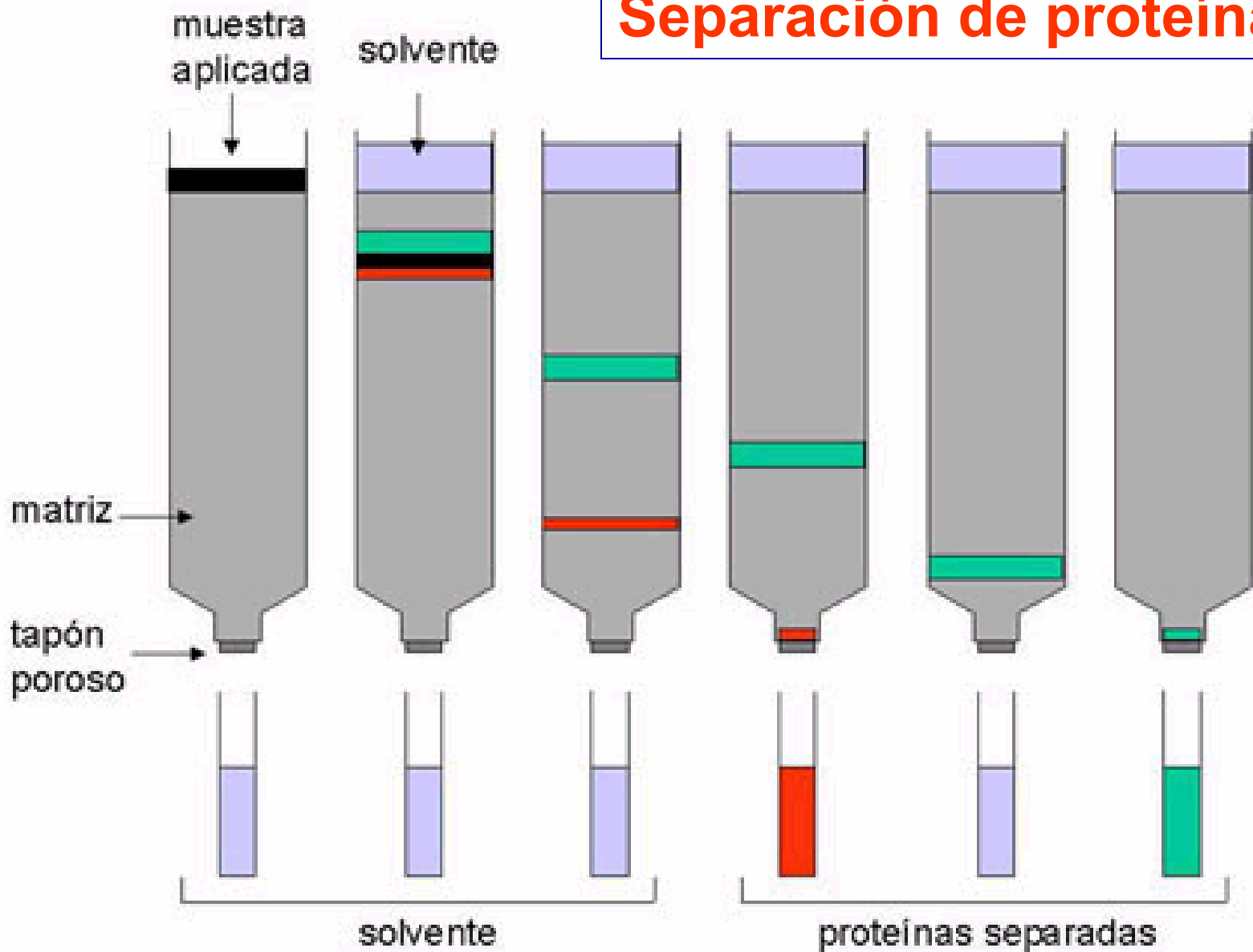


Determinar
grado de pureza

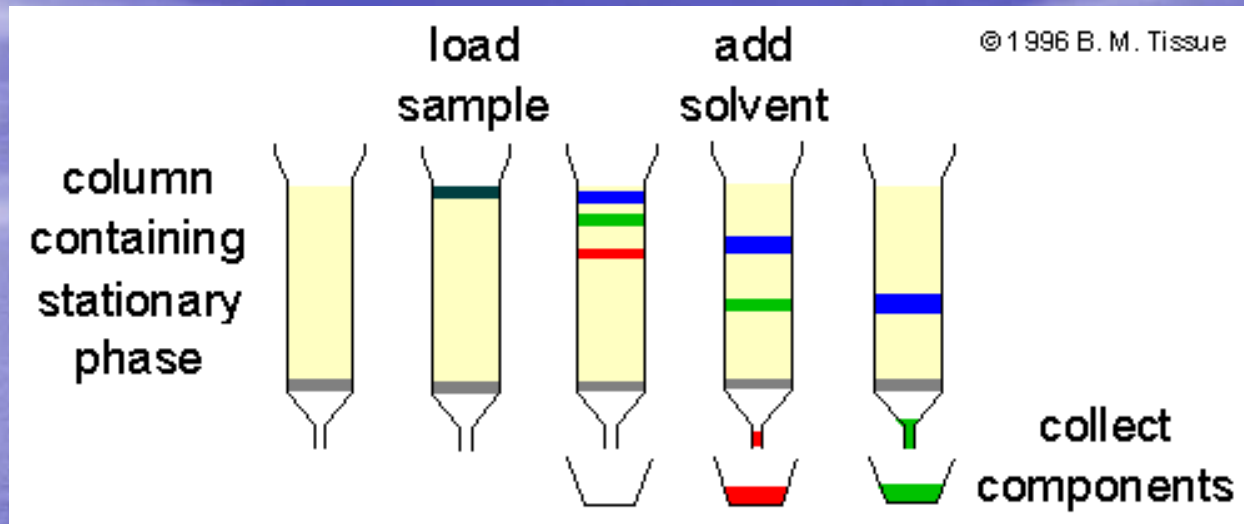


Seguimiento de una reacción

Separación de proteínas:



Separación de proteínas:



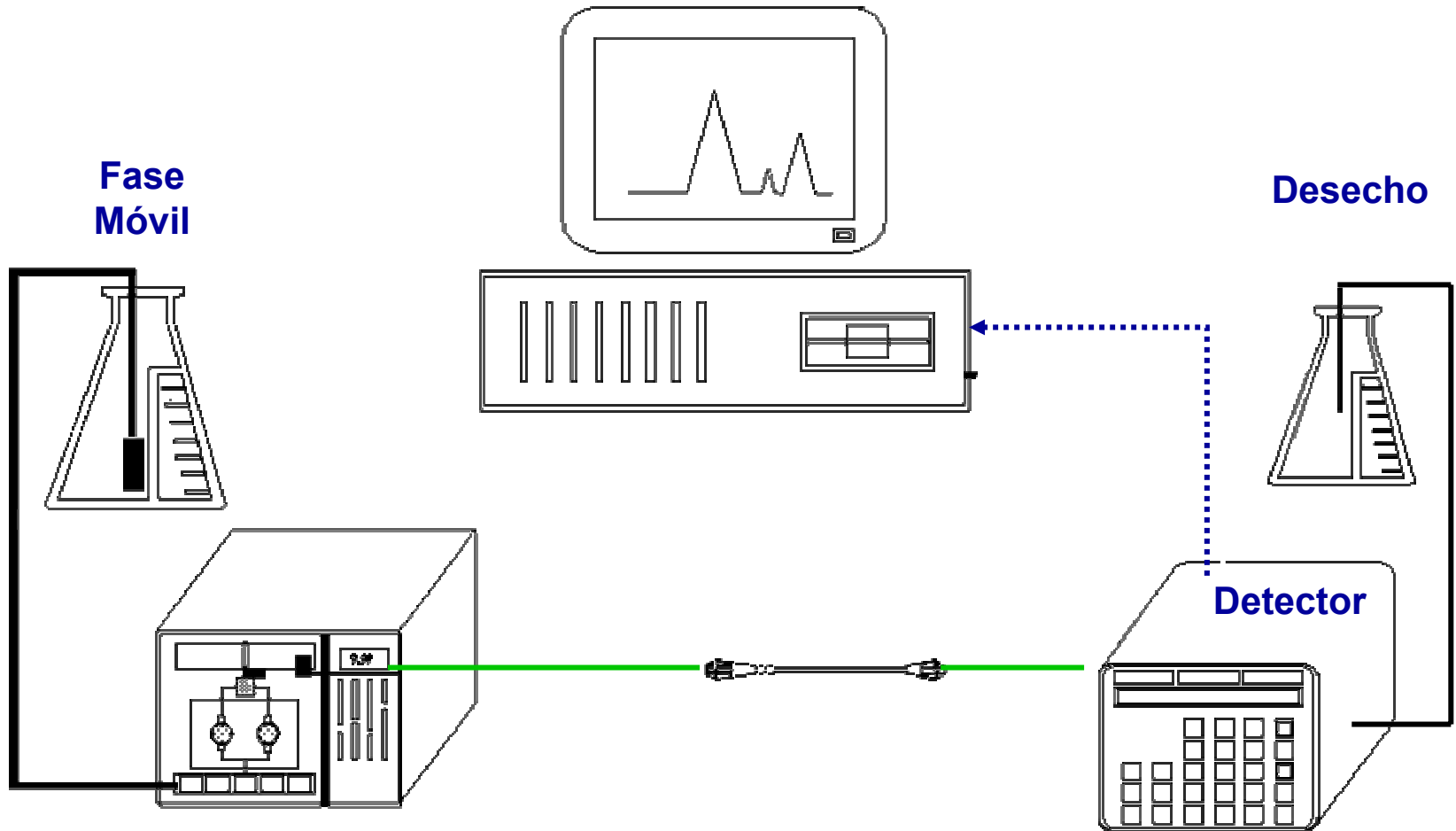
Detector



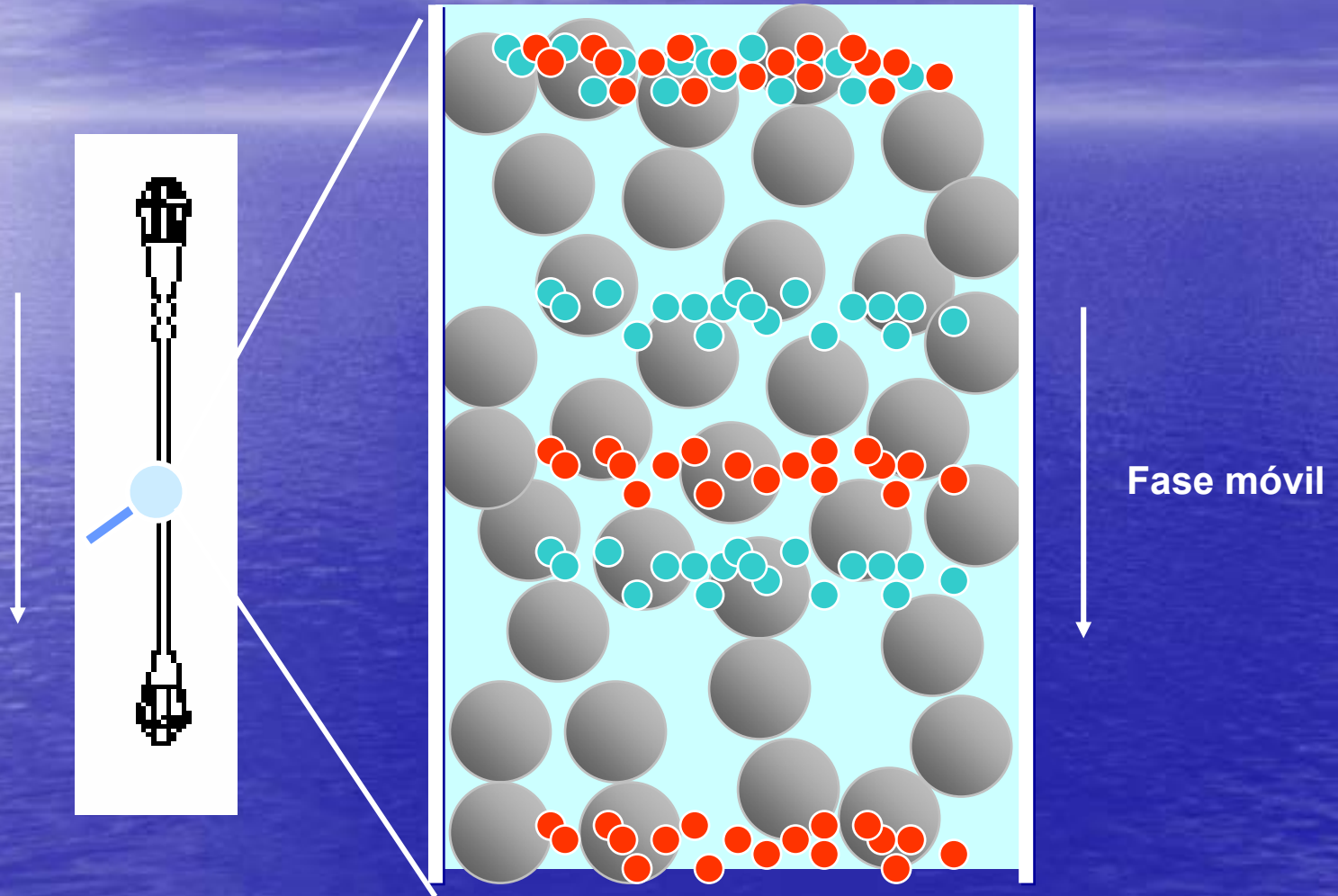
Colector de fracciones

HPLC

(High Performance Liquid Chromatography):

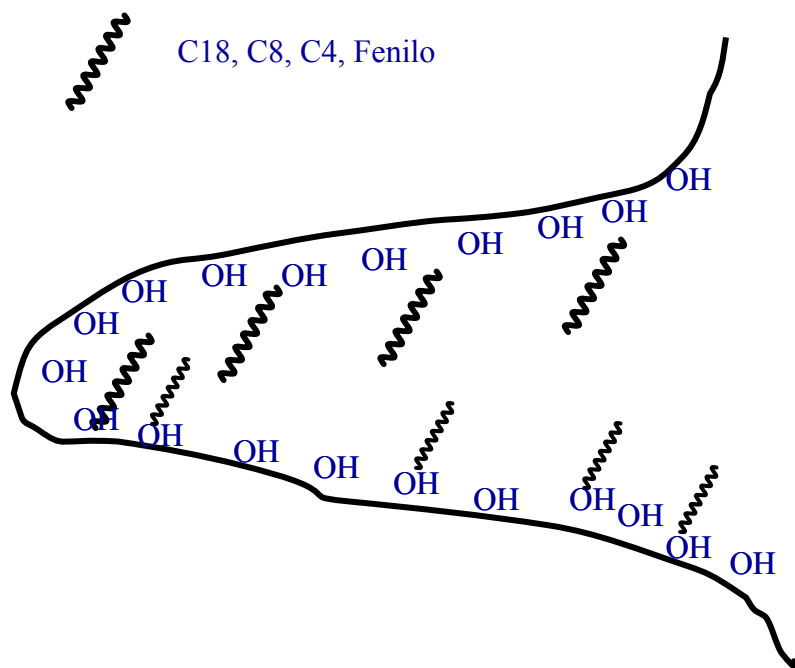


El proceso cromatográfico

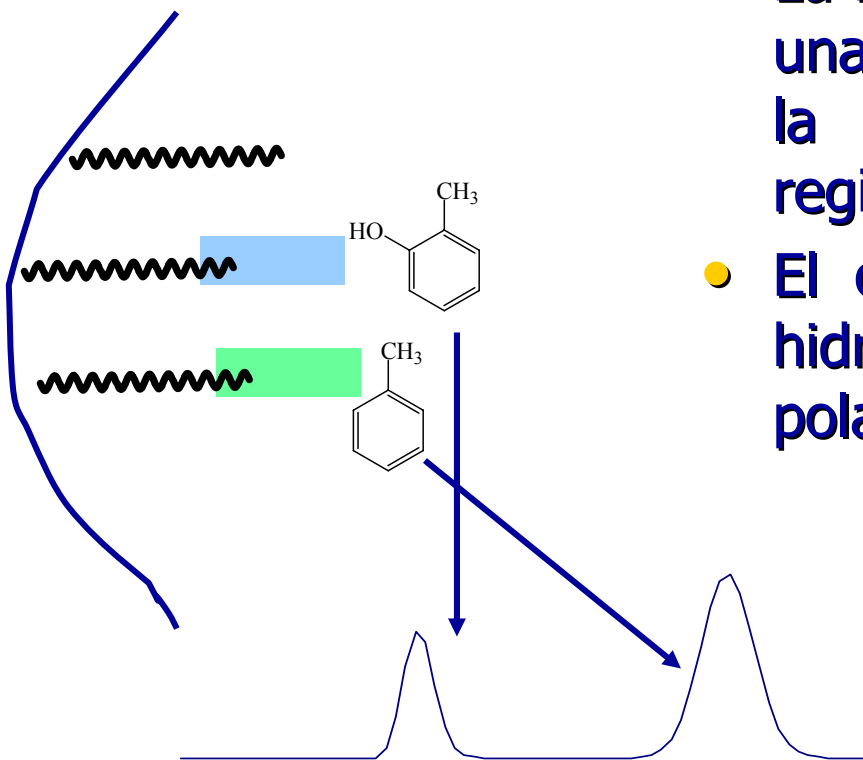


Fase reversa

Detectores????



Fase Reversa



- La retención está basada en una atracción primaria entre la fase estacionaria y la región no polar del analito
- El orden de elución es de hidrofílico a hidrofóbico, de polar a no polar

Techniques for Identification of Metabolites

- **LC –MS**

- Single Stage Quadrupole (SSQ) LC/MS
- Triple Stage Quadrupole (TSQ) LC/MS/MS
- Ion Traps (LCQ and LTQ)
- QTOF

What is Mass Spectrometry (MS)

- MS does not measure the mass of a compound
- Mass spectrometers use the difference in mass-to-charge ratio (m/z) of ionized compounds to separate them from each other.
- Compounds have distinctive fragmentation patterns that provide structural information to specifically detect each compound very precisely.

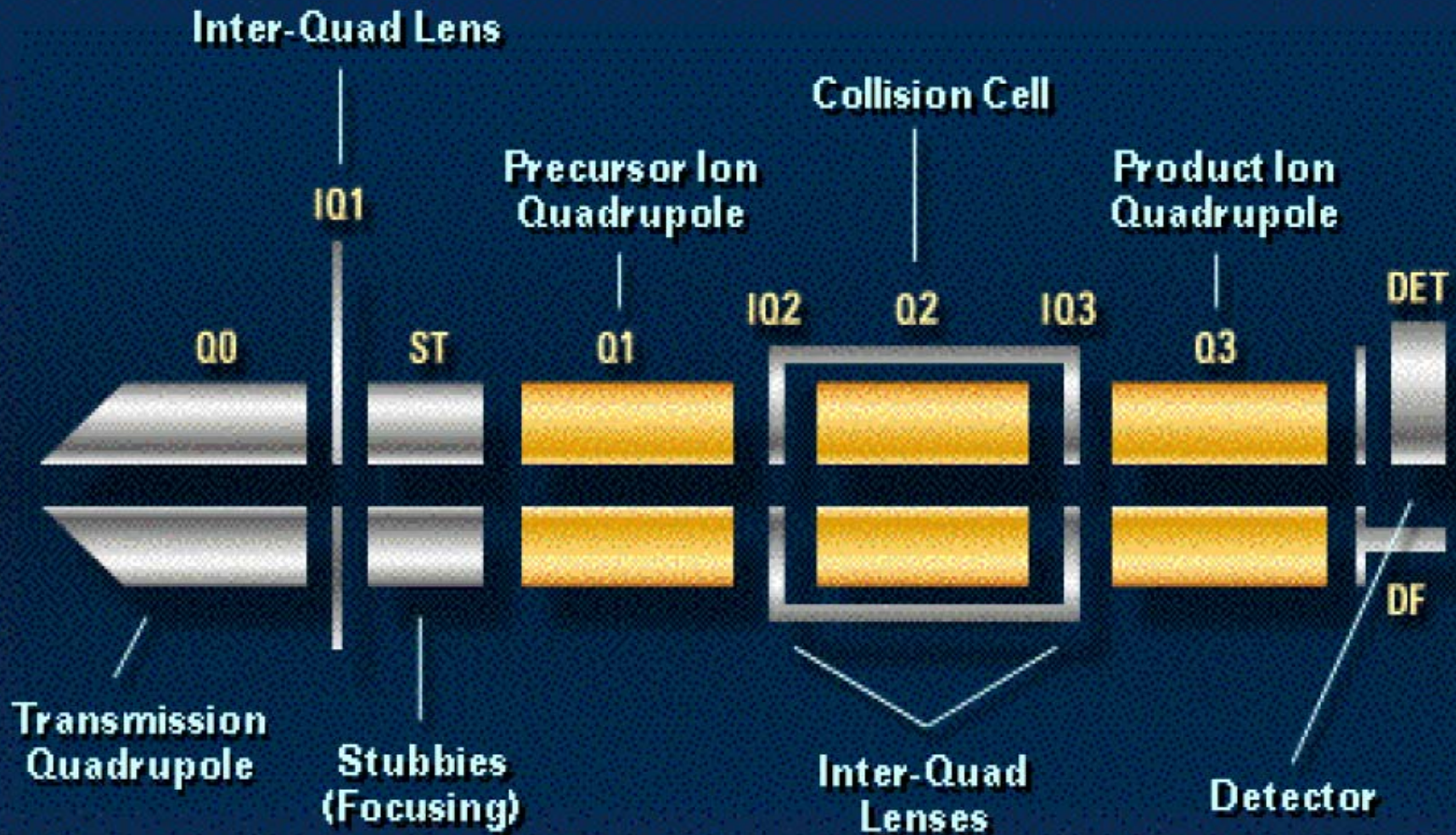
Continuing....

- MS – has emerged as an ideal technique for the identification of almost all structurally diverse metabolites.
- MS/MS data provides tremendous structural information for any drug metabolites
- Due to its superb speed, high selectivity and high sensitivity, MS has become the method of choice in drug discovery and development

Types of Mass Spec.

- **LC-MS** (Single quadrupole)
- **LC-MS/MS** (Triple quadrupoles)
- **LC-TOF-MS** (Time-of-flight)
- **Q-TOF-MS** (Quadrupole time-of-flight)
- **LC-Q** (Ion traps, linear ion traps)
- **LC-Q-TRAPS** (Quadrupole linear ion trap)
- **MALDI-TOF-MS**
- **FT-MS** (Fourier Transform)

LC-MS/MS (Triple quadrupoles)



Illustration

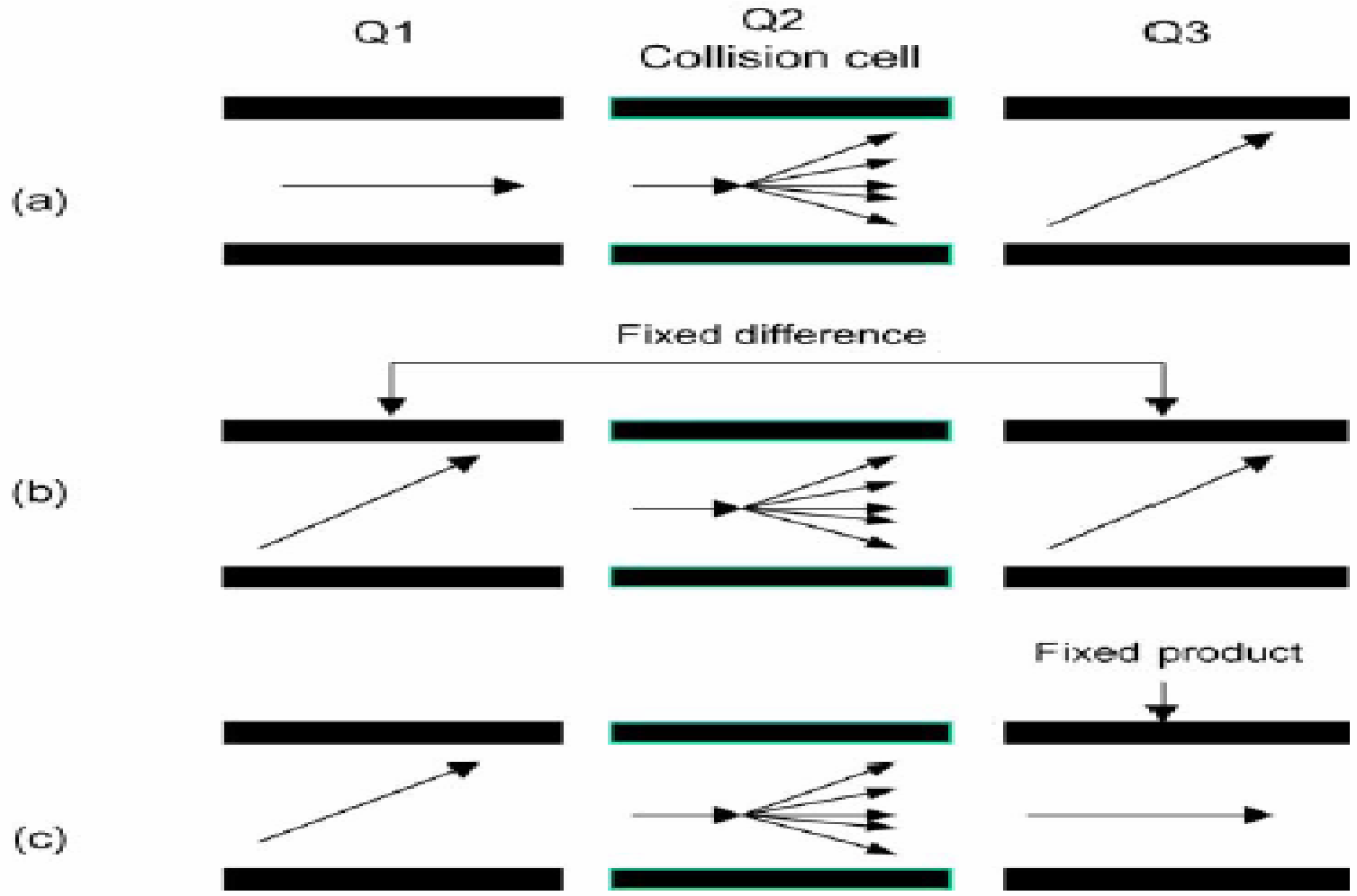
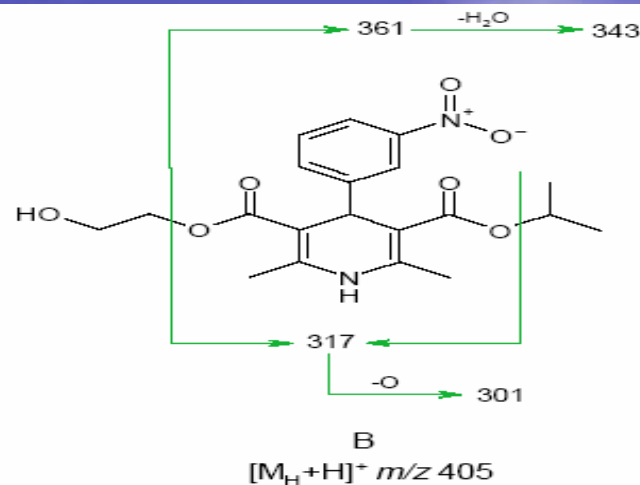
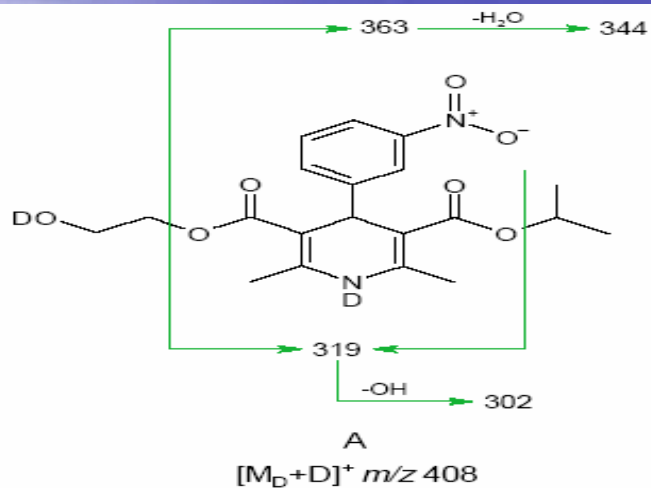


Fig. 1. Schematic illustrations of: (a) product ion scan; (b) neutral loss scan; and (c) precursor ion scan detection modes on a triple quadrupole mass spectrometer. Single ion transition (—→); CID of a selected ion (—→); Scanning from low to high masses (↗).

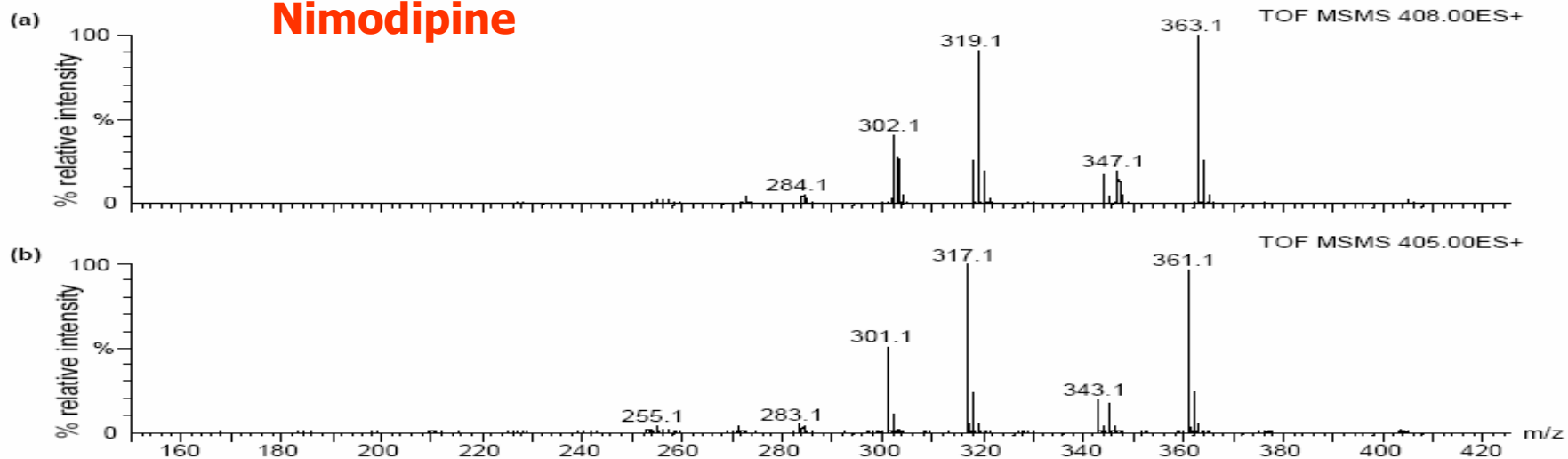
MS provides info about:

- The elemental composition of samples of matter
- The structures of organic, inorganic and biological molecules
- The qualitative and quantitative composition of complex mixtures
- Isotopic ratios of atoms and samples
- Structure and composition of solid surfaces

Example



Nimodipine



Drug Discovery Today

Figure 4. Representative TOF-MS-MS spectra of Nimodipine-metabolite in (a) D_2O m/z 408 and (b) H_2O m/z 405 following incubation of Nimodipine [Nimotop[®] (Bayer; <http://www.bayer-pharmaceuticals.com>)] with human liver microsomes. Each arrow indicates a possible site of fragmentation, with the corresponding ion. Abbreviation: TOF-MS-MS, time of flight-mass spectrometry-mass spectrometry.

Importance

- Every time a drug is administered metabolites will form
 - Sometimes toxic metabolites form
 - Toxic metabolites harmful to the body
 - Cause DNA damage => cancer
 - May damage different body organs such as
 - Liver, stomach, intestines,
 - Some even the nervous system
- Due to these potential risks it is VITAL to identify all drug metabolites*

Today's Research

- Formulate and develop drugs with least toxicity and high efficiency
- Use minimal amount of drug
- Identify all possible metabolites for a given drug in the early stages of drug formulation
- Be able to identify very small traces of metabolites, or identify the disease in its early stages (such as cancer)
- Develop faster, more accurate and more precise methods for drug metabolite identification

Conclusion

- Metabolite identification is very important in new drug formulation and development
- Different methods being used to identify drug metabolites
- Mass Spectrometry methods
 - Most commonly used
 - Most sophisticated and enhanced methods
 - Fairly fast and accurate

Research is focused in developing faster more accurate methods to identify and separate even smaller traces of metabolites

Otras técnicas espectroscópicas en Identificación de metabolitos

-Espectro UV-Visible

-Espectro de Infrarojos

**-Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN
1H, 13C)**

Identificación de metabolitos

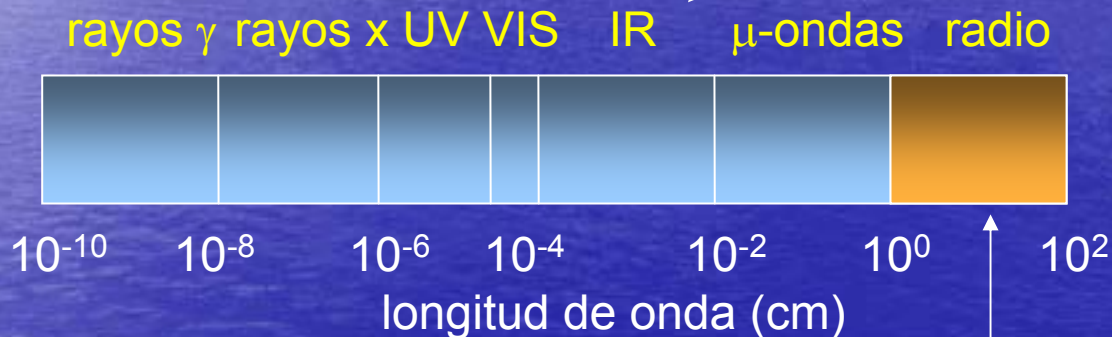
Espectro Electromagnético

$$\Delta E = h\nu$$

$$\nu = c/\lambda$$

Espectroscopía UV:
cromóforos

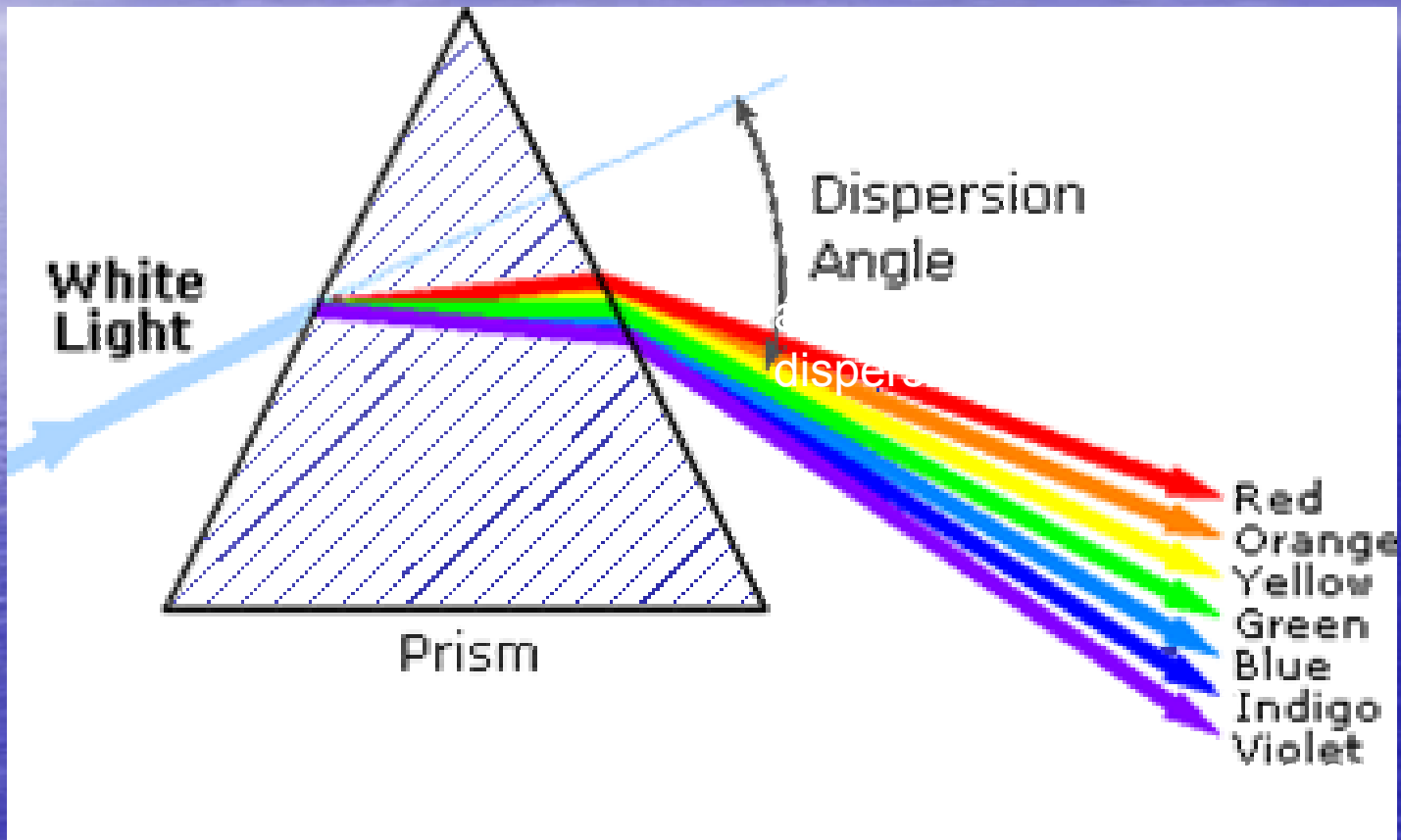
Espectroscopía IR:
grupos funcionales



La **espectrometría de masa** es una técnica diferente ya que por lo general no involucra interacción de la materia con energía electromagnética.

Espectroscopía RMN: átomos individuales y su entorno

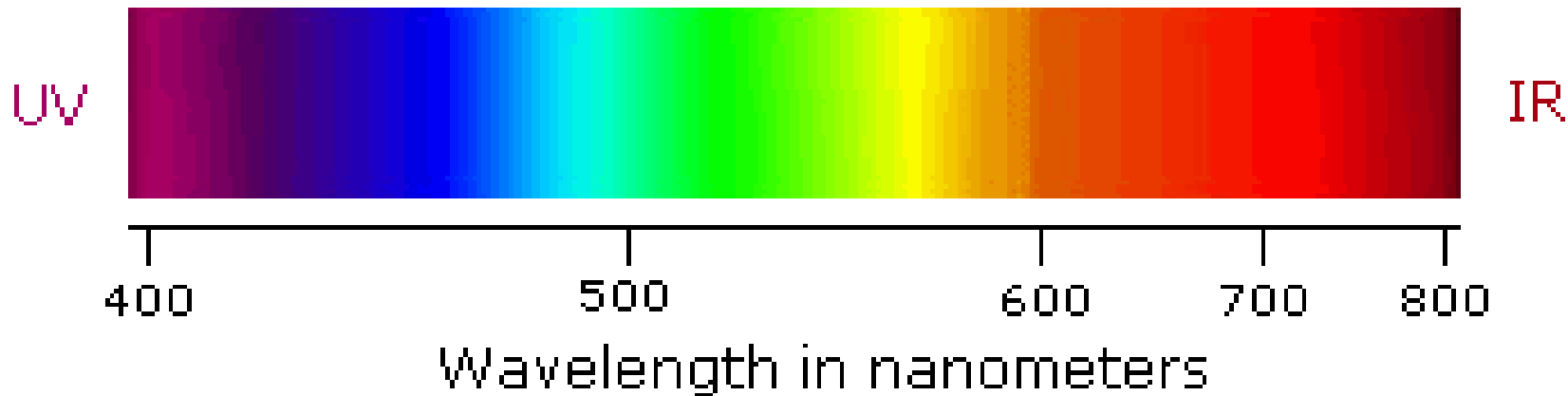
La luz del sol (blanca) está compuesta por una gama de radiación en las zonas del ultravioleta, visible e infrarrojo



Visible Spectrum

Higher
Frequency

Lower
Frequency



Violeta: 400-420 nm

Indigo: 420-440 nm

Azul: 440 -490 nm

Verde: 490-570 nm

Amarillo: 570-585 nm

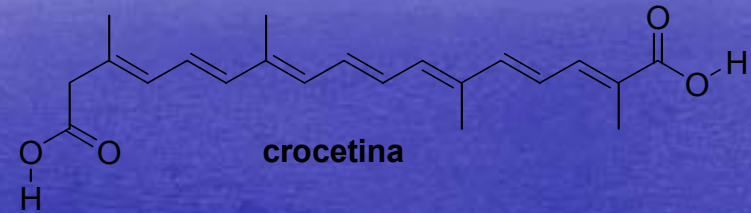
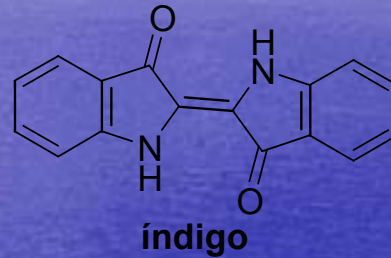
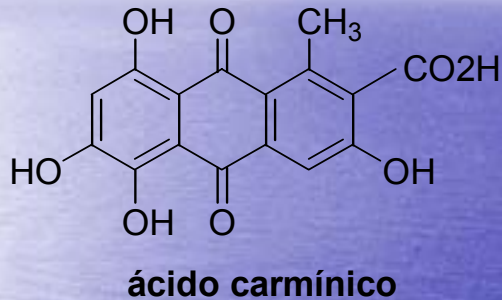
Naranja: 585-620 nm

Rojo: 620-780 nm:

¿Porqué algunas sustancias se ven coloreadas (eg: clorofila) y otras se ven blancas (aspirina)?

Parte del espectro visible es absorbido y otra parte reflejado (color complementario)

Todas las sustancias coloreadas tienen un sistema de enlaces π conjugados.



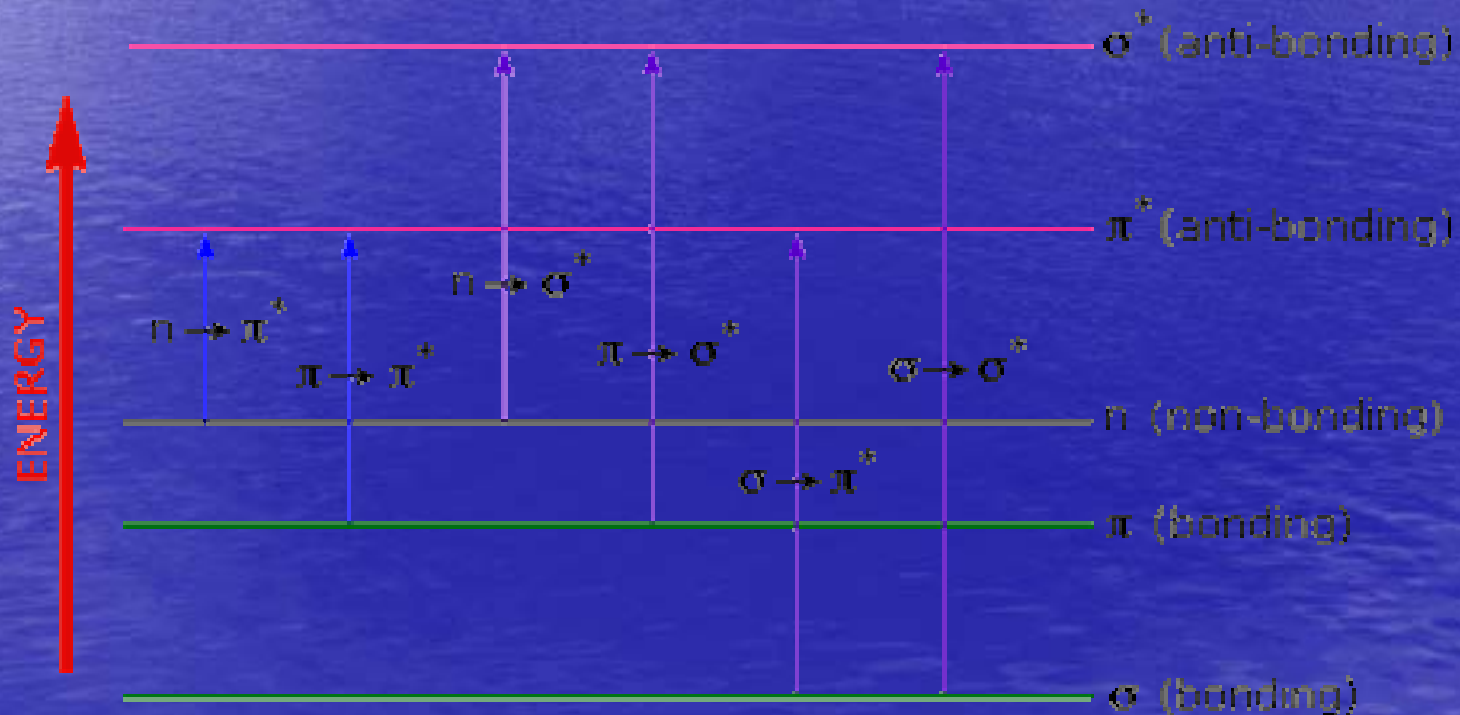
Enlaces sigma σ y enlaces π

En **espectroscopía UV-Vis** se irradia con luz de energía suficiente como para provocar **transiciones electrónicas**, es decir promover un electrón desde un orbital de baja energía a uno vacante de alta energía

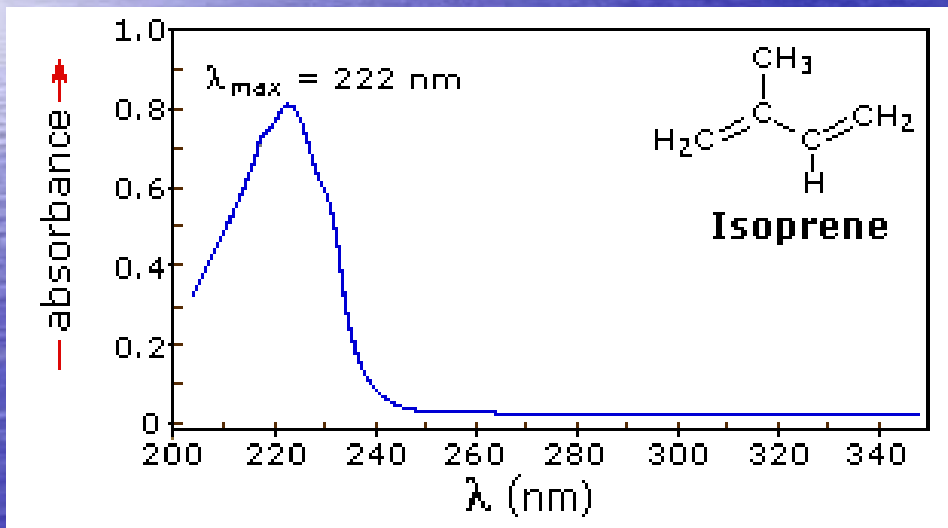
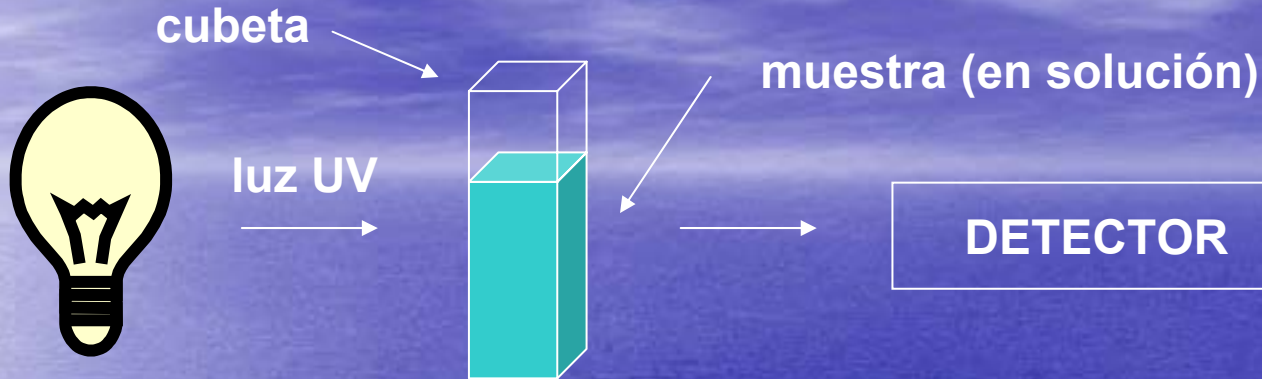
Transiciones electrónicas posibles entre orbitales

Orbital que contiene par de electrones no compartidos (ej en O, N, Cl)

En UV-Vis la energía solo alcanza para las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$



El **espectrómetro UV-Vis** registra las longitudes de onda donde se registra absorción y cuantifica la absorción



El espectro se registra como Absorbancia (A) vs. longitud de onda (λ)

Las bandas del espectro UV son anchas porque incluyen la estructura fina de transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía

Ley de Beer: $A = \epsilon c l$

Permite cuantificar la concentración de una muestra por UV

A: Absorbancia

ϵ : coeficiente de extinción (característico de cada sustancia)

l: largo del paso de la cuba (cm)

c: concentración (moles/l)

La zona de longitudes de onda que se registra en un espectro UV- Vis es entre 200 y 800 nm

En esta zona no absorben dobles ni triples enlaces aislados

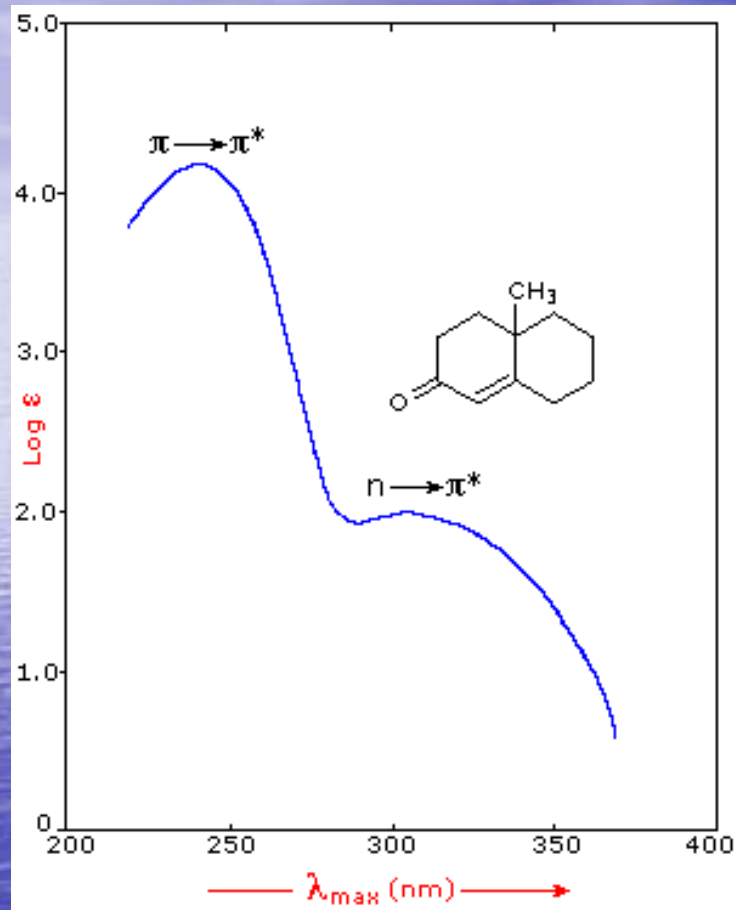
Solo van a absorber enlaces π conjugados y heteroátomos con pares de electrones no compartidos (O, N)



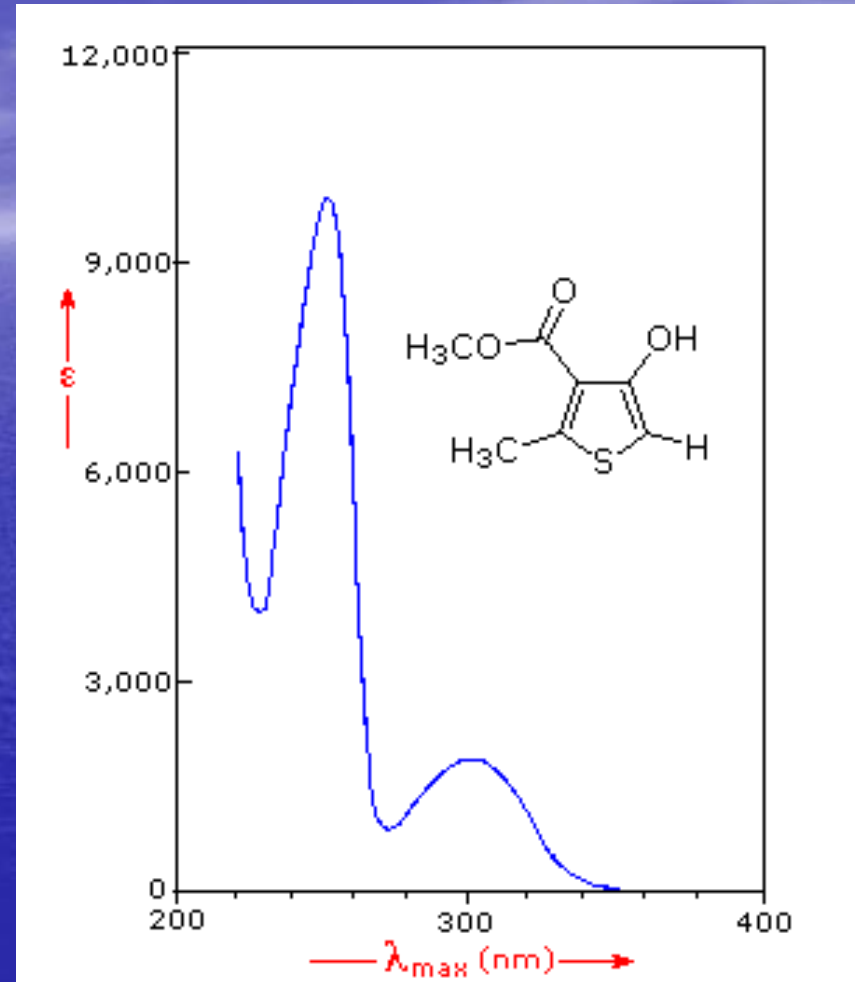
Grupos que absorben luz = CROMÓFOROS

Otros Cromóforos

Grupos carbonilo conjugados



Compuestos aromáticos y heteroaromáticos



Metabolismo UV-Vis: Seguir reacciones aparecen o desaparecen nuevos cromóforos.

La región que se utiliza del **espectro infrarrojo** es entre
2500 y 16000 nm

En esta zona se consiguen excitar transiciones vibracionales de la molécula: estiramientos y flexiones de los enlaces

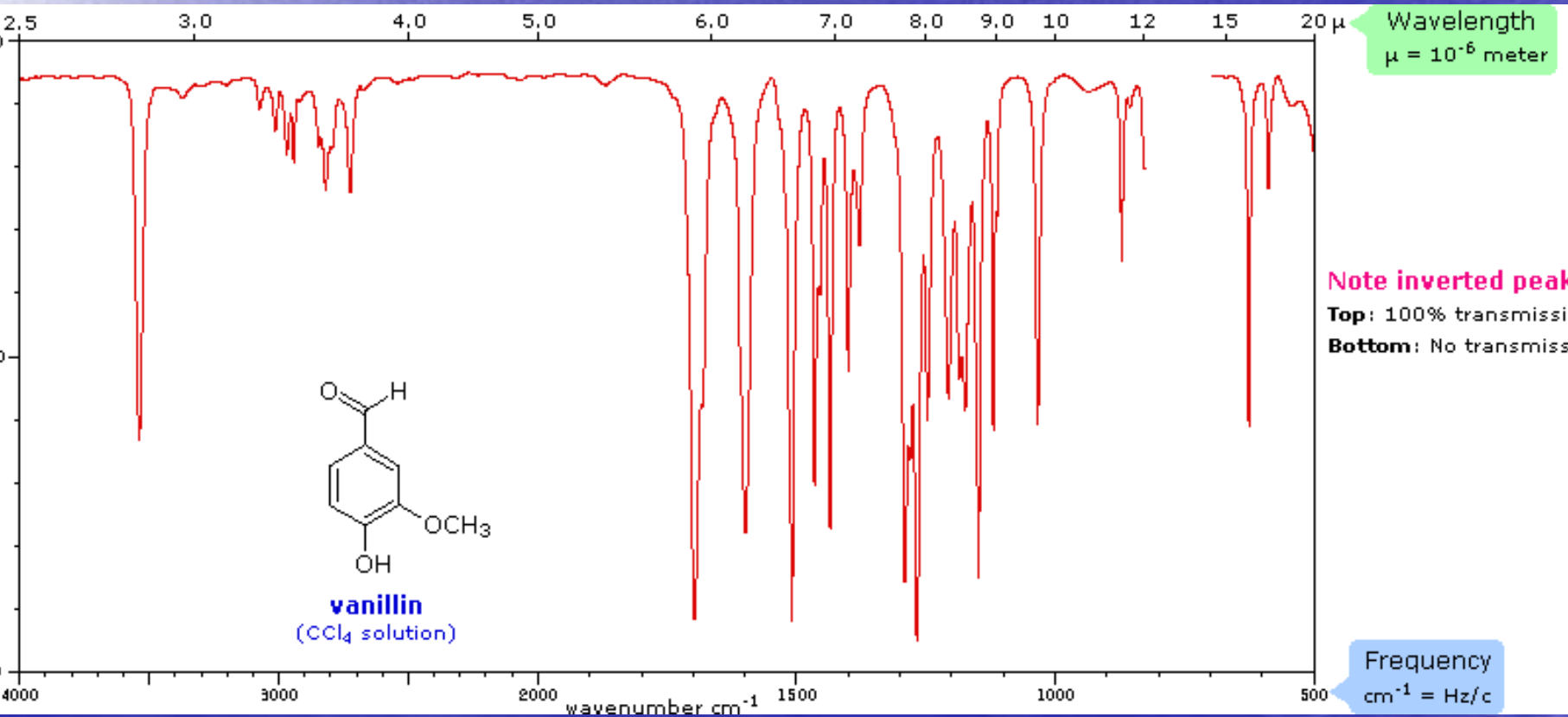


Los enlaces
covalentes se
asemejan a
“resortes”

- Al entregarles energía adecuada se pueden estirar y flexionar
- Momento dipolar (μ)

Todos los enlaces de una molécula van a sufrir **transiciones vibracionales**, cada una con una frecuencia determinada característica, y cada una de estas transiciones va a provocar una banda de absorción

El espectro IR va a registrar todas estas bandas

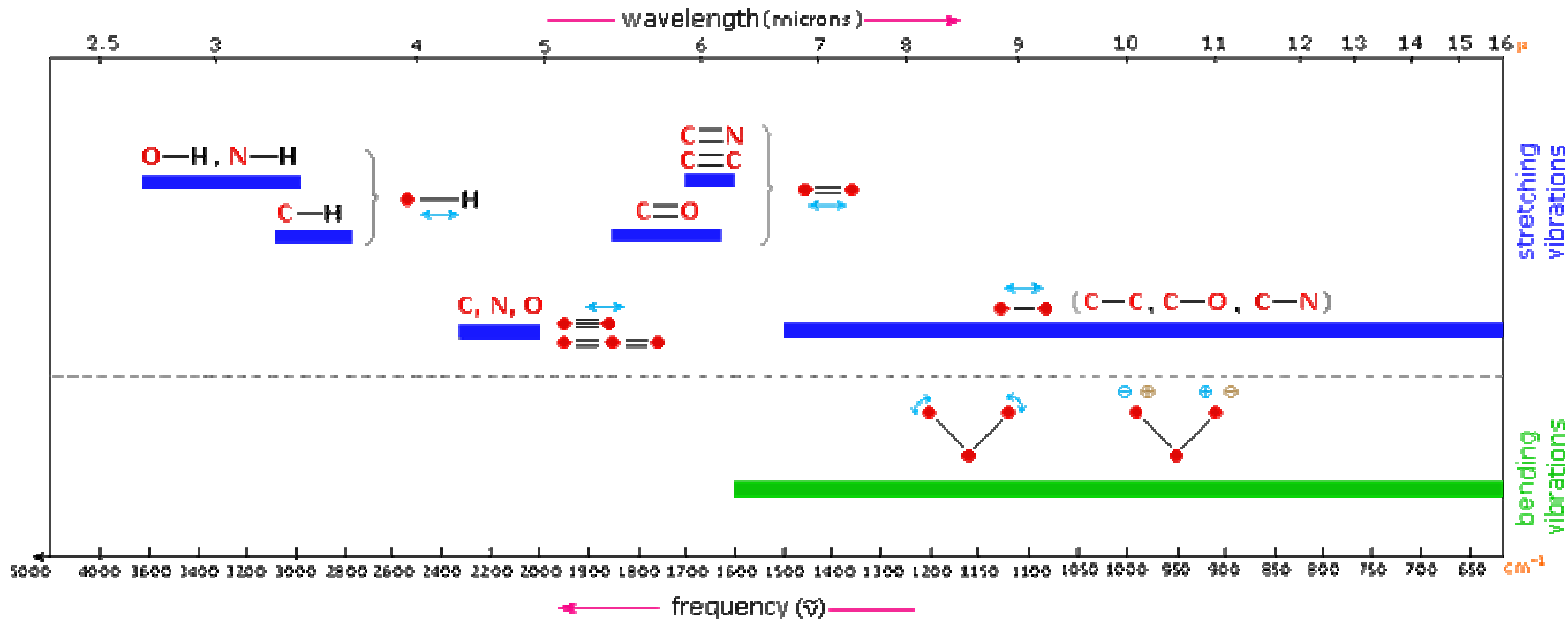


La complejidad de un espectro IR permite su uso para identificar sustancias ya que se transforma en una especie de “huella digital” del compuesto

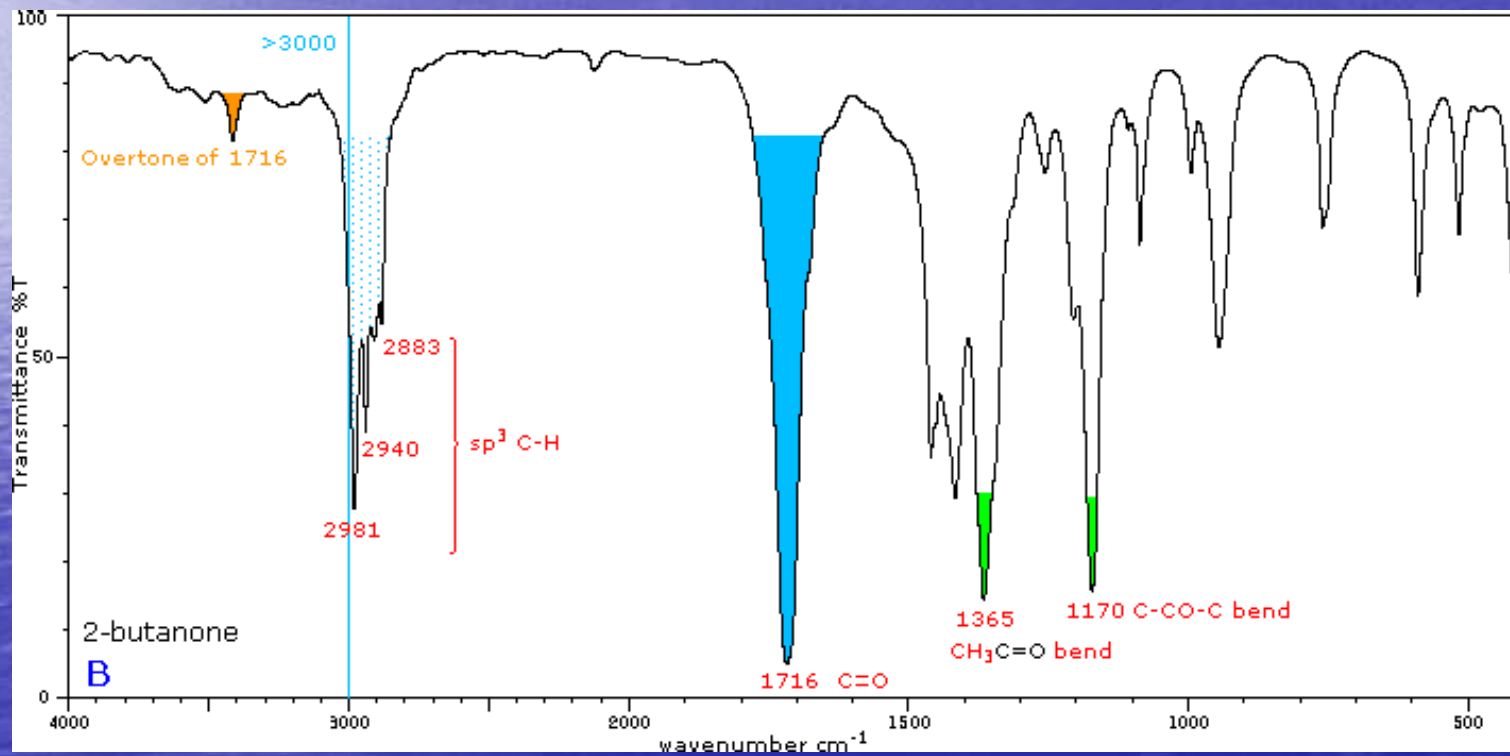
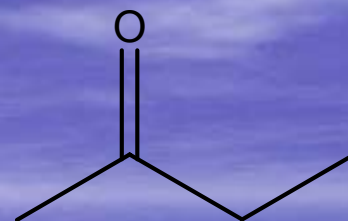
Por otra parte la identificación de ciertas bandas características brinda información sobre la presencia de **grupos funcionales**

La frecuencia exacta de una transición para un enlace determinado va a depender entre otras cosas de la fuerza del enlace y de la masa de los átomos en los extremos del enlace

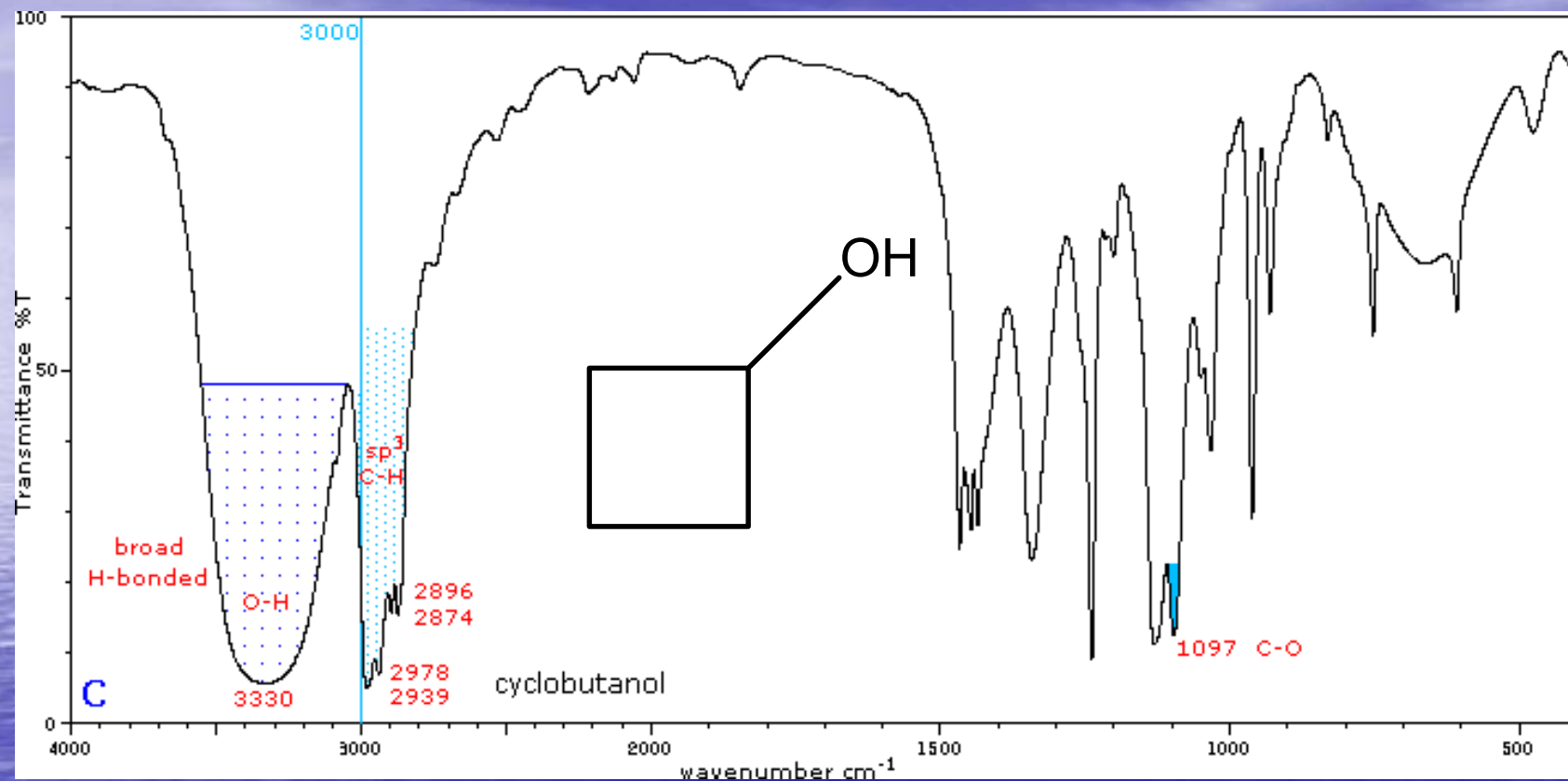
Regiones típicas de un espectro IR



Espectro IR de la butanona



Espectro IR del ciclobutanol



UV-Vis, IR

- **Permite detectar grupos funcionales con técnicas sencillas**
- **Utilizan como rutina, en el screening y desarrollo de nuevos fármacos**
- **Ambos sistemas espectroscópicos tienen sistemas informáticos que incluyen librerías que correlacionan espectros hallados con los de moléculas conocidas.**

RMN (resonancia magnética nuclear)

- Se desarrolla a finales de los años 50, con el fin de determinar la estructura de los compuestos orgánicos
- Esta técnica espectroscópica se utiliza para estudiar compuestos con un número impar de protones (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F)

Estos núcleos poseen una carga neta positiva y se pueden comportar como imanes, por lo que cuando se les aplica un campo magnético pueden orientarse en su misma dirección o en contra.

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA

RMNH¹

RMNH¹

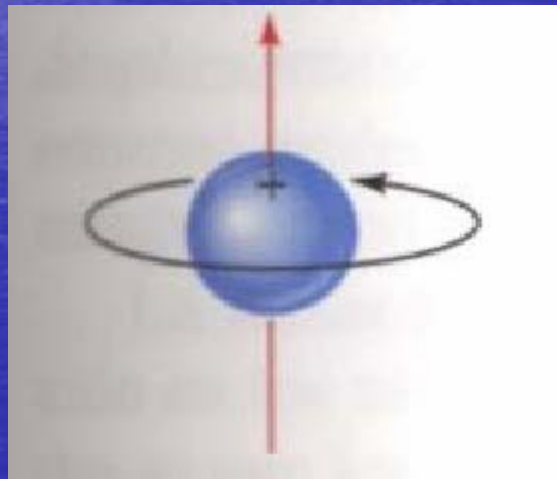
Proporciona información sobre la situación relativa de los átomos de hidrógeno en la molécula

ORIGEN DEL FENOMENO DE LA RMN

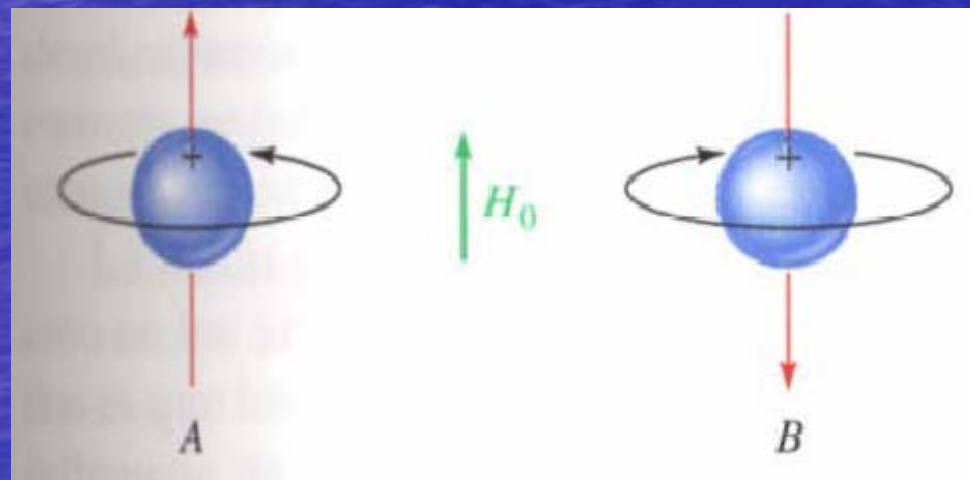
- Un protón, como un electrón, posee la propiedad del **espín**
- También como un electrón, un protón tiene dos **estados de espín** (nuclear) : $+1/2$ y $-1/2$
- No hay diferencia de energía entre estos dos estados de **espín nuclear**

- Es necesaria tener una idea de la estructura del compuesto
- Es una tecnología muy cara.

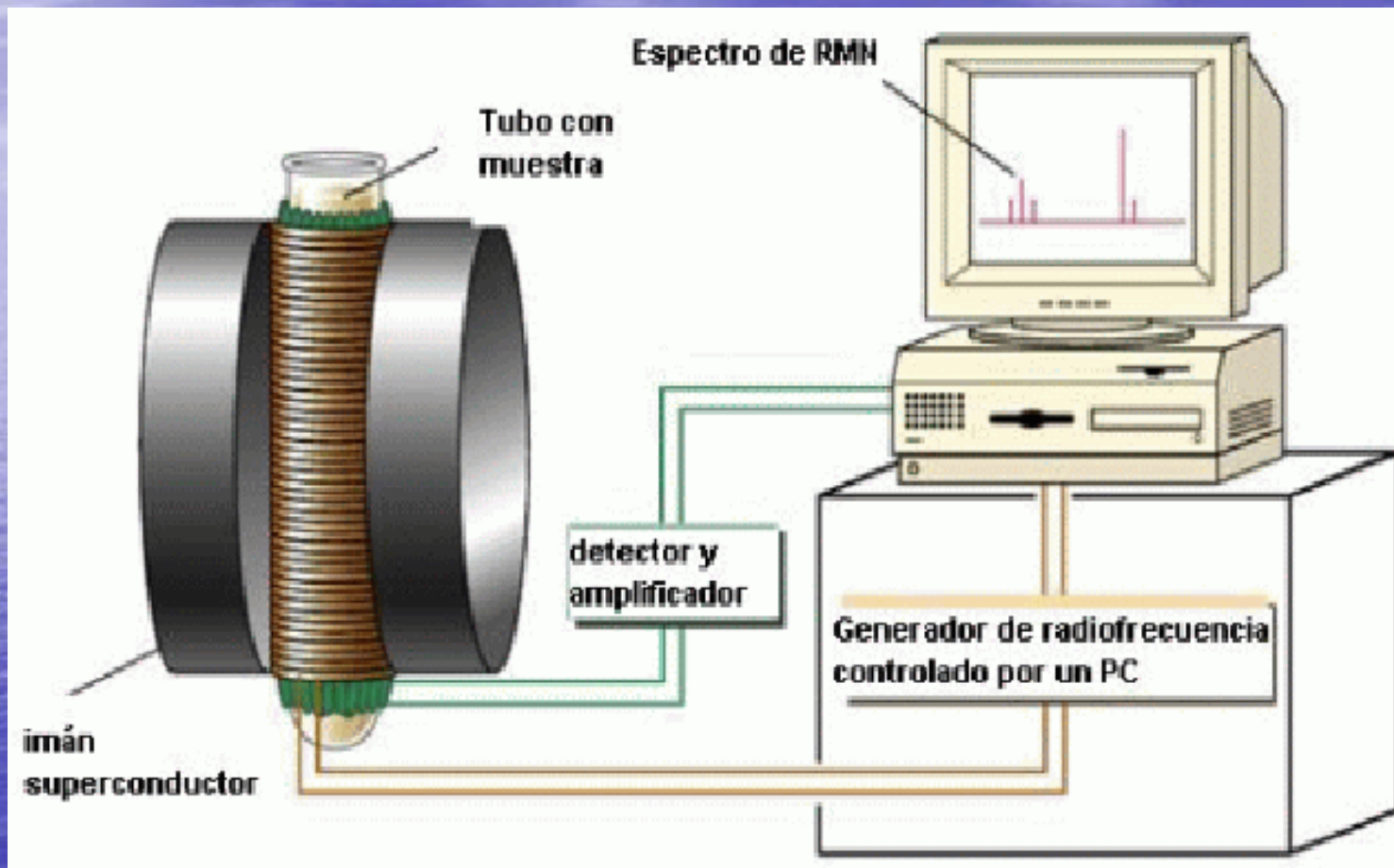
- Un núcleo con espín, da lugar a un pequeno campo magnético, que se representa por un vector denominado **Momento Magnético Nuclear**



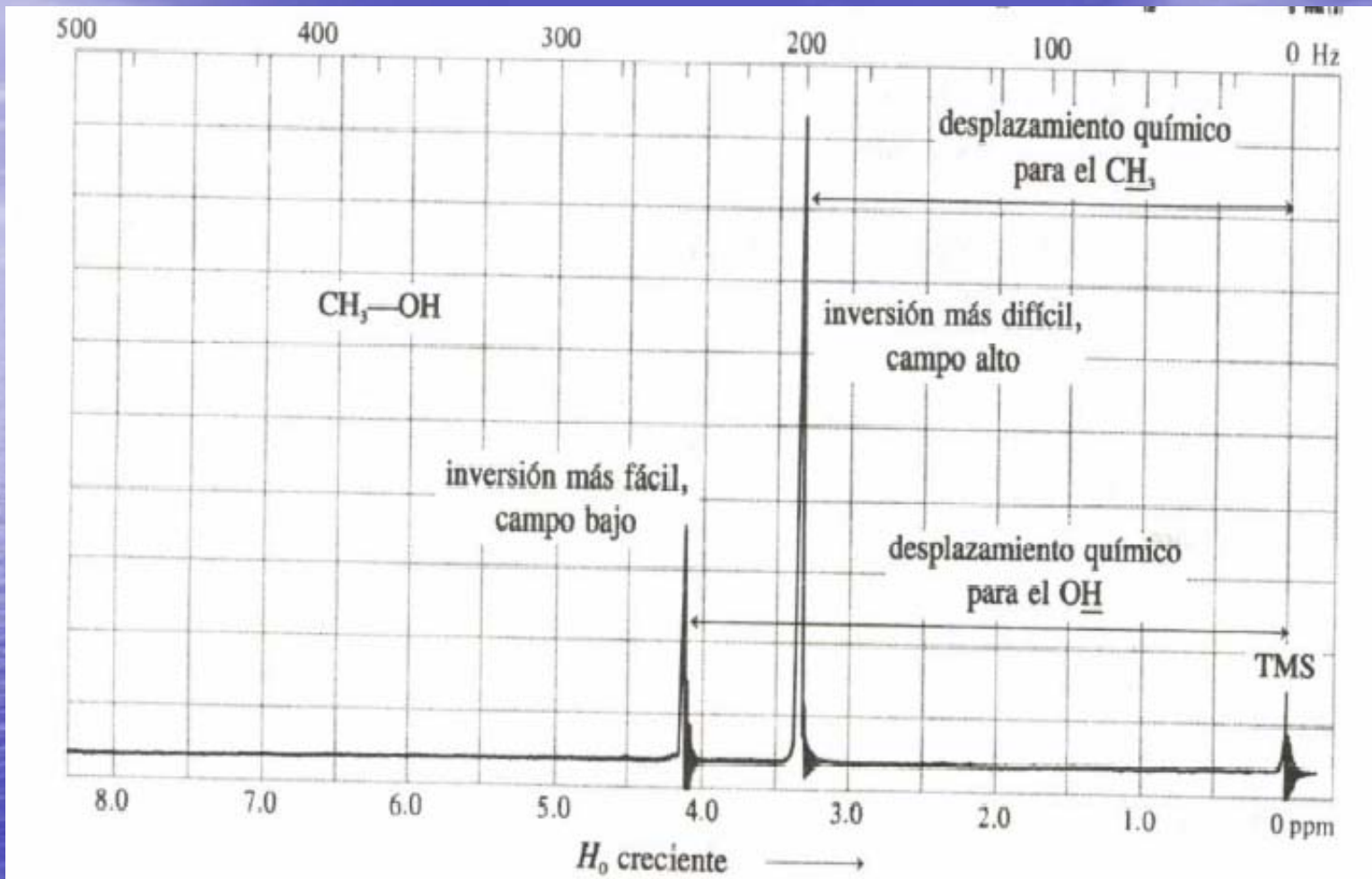
- En presencia de un Campo Magnético externo H_0 , los dos estados de espín nuclear dejan de tener la misma energía
- El estado en el que el Momento Magnético Nuclear se alinea con el campo externo es menor en energía que el estado en el que se opone al campo aplicado



- Al ser irradiado con ondas de radio de frecuencia apropiada, un protón con momento magnético paralelo al campo absorbe energía y experimenta una **inversión de espín**, pasando al estado antiparalelo de mayor energía.
- La absorción de energía es detectada y se genera un pico en el espectro de RMN

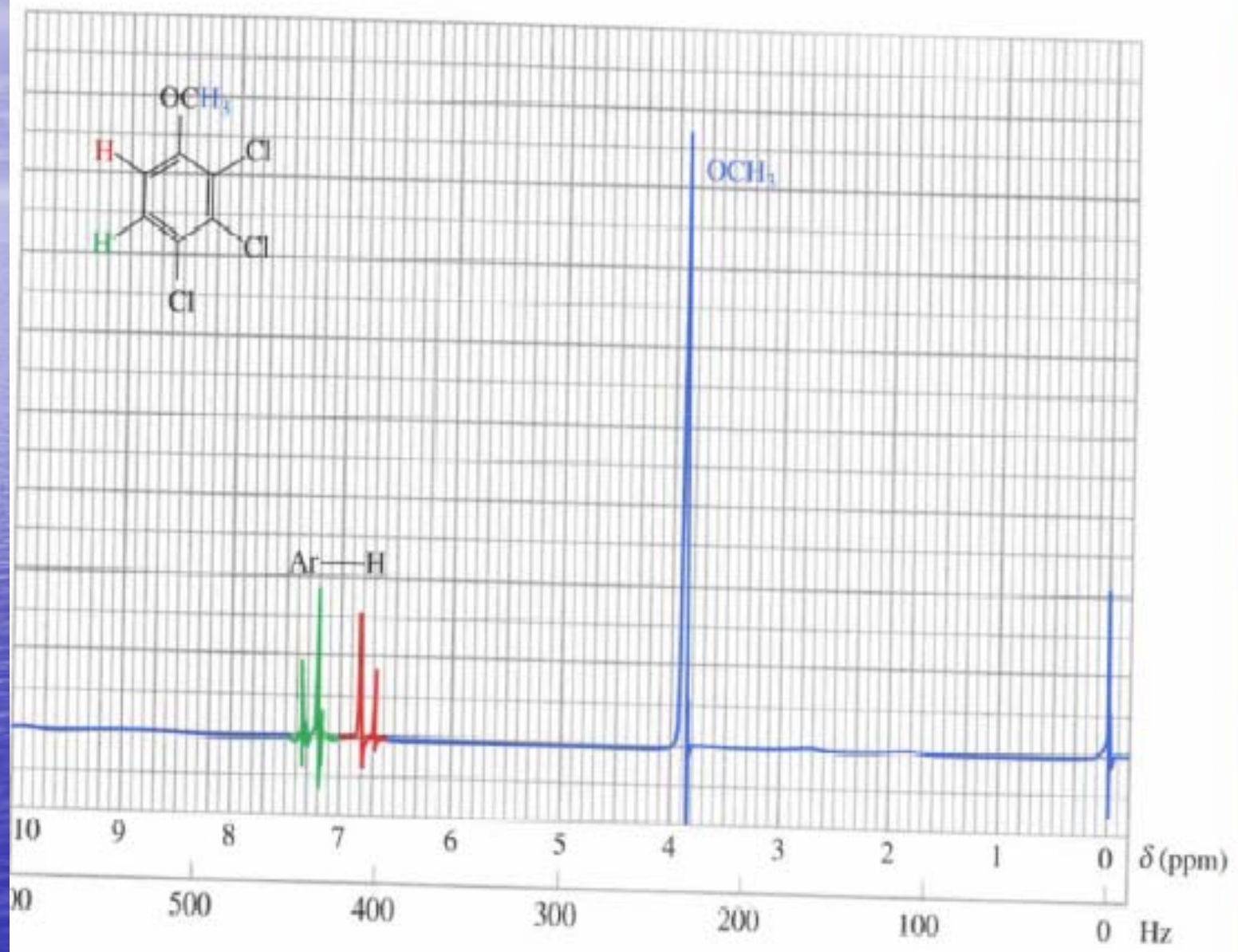
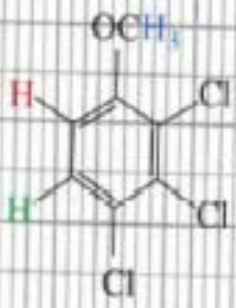


- **Absorción a Campo Bajo** : Los protones que dan señales hacia la parte izquierda del espectro
- **Absorción a Campo Alto**: Los que dan señales en la parte derecha del espectro



TMS, tetrametil silano

Tipo de protón	Desplazamiento químico (δ), ppm*	Tipo de protón	Desplazamiento químico (δ), ppm*
$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{R} \\ \end{array}$	0,9-1,8	$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{NR} \\ \end{array}$	2,2-2,9
$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}=\text{C} \\ \end{array}$	1,6-2,6	$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{Cl} \\ \end{array}$	3,1-4,1
$\begin{array}{c} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \\ \end{array}$	2,1-2,5	$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{Br} \\ \end{array}$	2,7-4,1
$\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-$	2,5	$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{O} \\ \end{array}$	3,3-3,7
$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{Ar} \\ \end{array}$	2,3-2,8	$\text{H}-\text{NR}$	1-3†
$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}=\text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	4,5-6,5	$\text{H}-\text{OR}$	0,5-5†
$\text{H}-\text{Ar}$	6,5-8,5	$\text{H}-\text{OAr}$	6-8†
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}- \end{array}$	9-10	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}-\text{OC}- \end{array}$	10-13†



Estos tres protones equivalentes son vecinos de dos protones no equivalentes, su señal en el espectro de RMN se desdobra en $2+1$ o sea, 3 picos.



Estos dos protones equivalentes son vecinos de tres protones no equivalentes. Su señal en el espectro de RMN se desdobra en $3+1$ o sea, 4 picos.

Resonancia Magnética de Carbono

RMN Heteronuclear: ^{13}C

Stable Isotopes in Biological NMR

TABLE 1.1: Properties of Nuclei Most Useful for Biological Studies *

Nucleus	Spin Quantum Number (I)	Natural Abundance (%)	Gyromagnetic Ratio γ (10^{-7} rad/T sec)	Sensitivity [†] (% vs. ^1H)	Electric Quadrupole Moment (Q) ($e \cdot 10^{24}$ cm ²)
^1H	1/2	99.9844	26.7520	100.0	_____
^2H	1	0.0156	4.1067	0.965	0.00277
^{13}C	1/2	1.108	6.7265	1.59	_____
^{15}N	1/2	0.365	-2.7108	0.104	_____
^{19}F	1/2	100	25.167	83.3	_____
^{31}P	1/2	100	10.829	6.63	_____

Se utiliza para elucidar la estructura carbonada del esqueleto de una molécula

Es complementaria a la de protón

99% del C es ^{12}C (isótopo con número par de protones)

Técnica menos sensible que H-RMN, debido a la poca abundancia isotópica

Los desplazamientos químicos son 15-20 veces mayores

(mayor apantallamiento)

No se producen desdoblamientos (las señales son líneas), ya que es difícil

que exista acoplamiento con un ^{13}C vecino

RMN Heteronuclear: ^{13}C

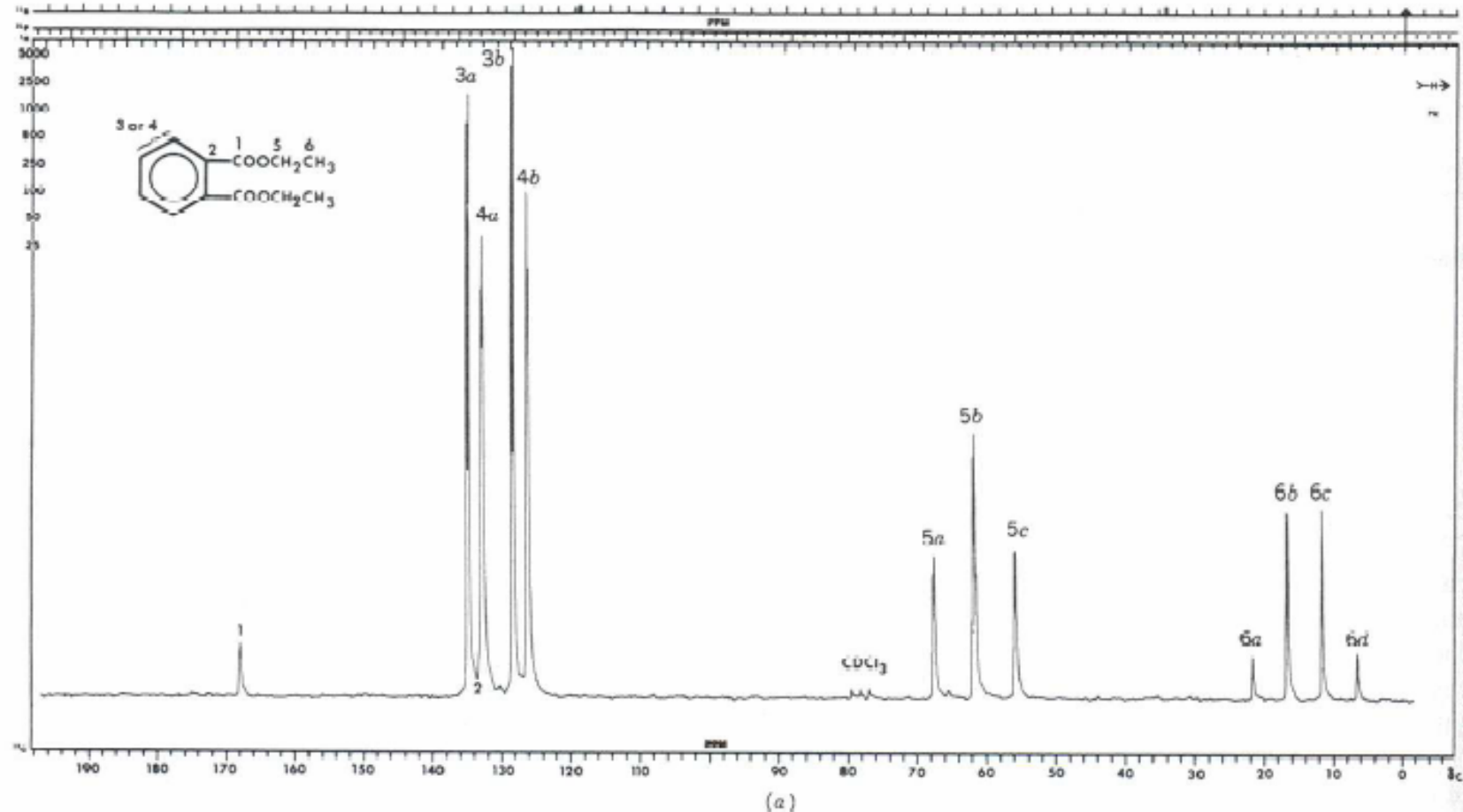


FIGURE 5.1(a). The ^{13}C -NMR spectrum of diethyl phthalate with the protons completely coupled. The solvent used was CDCl_3 at 25.2 MHz.

Resonancia Magnética Nuclear

RMN Heteronuclear: ^{13}C

