

## Alternativen zum Tierversuch?

Kopplung von Elektrochemie (EC) und Massenspektrometrie (MS)  
für die Metabolismusforschung

Dr. Martin Vogel, Lars Büter, Helene Faber, Daniel Melles,  
Hannah Simon und Prof. Dr. Uwe Karst  
Institut für Anorganische und Analytische Chemie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster



**Die Aufklärung des Metabolismus potenzieller neuer Wirkstoffe ist eine der großen Herausforderungen in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Sie ist in der Regel sehr zeitaufwändig und kostenintensiv. Klassische Ansätze basieren dabei im Wesentlichen auf In-vivo-Experimenten mit Labortieren ebenso wie auf In-vitro-Untersuchungen mittels Leberzellen oder daraus gewonnenen Leberzellmikrosomen.**

Im Gegensatz zu diesen etablierten Verfahren wird im Folgenden eine Methode präsentiert, die auf einem vollständig instrumentellen Ansatz beruht. Hierbei wird in einer elektrochemischen Zelle der oxidative Metabolismus eines Wirkstoffes simuliert, und die erzeugten Produkte werden online in ein Massenspektrometer transferiert, mit dessen Hilfe die Identifizierung erfolgen kann.

### Hintergrund

Im menschlichen Körper besteht einer der Hauptwege des Abbaus und der Eliminierung von Xenobiotika wie z. B. pharmazeutischen Wirkstoffen, Nahrungsmittelzusätzen oder Kosmetikinhaltsstoffen in einem anfänglichen enzymatischen Oxidationsschritt (Phase-I-Metabolismus: Funktionalisierung). Dieser wird durch Enzyme der Cyto-

chrom-P450-Superfamilie (CYP) katalysiert. In einem zweiten Schritt folgt dann in der Regel eine Bindung der gebildeten – oftmals sehr reaktiven – Produkte an endogene nukleophile Abfangreagenzien wie z. B. an das Tripeptid Glutathion oder an Proteine (Phase-II-Metabolismus: Konjugation). Dieser Metabolismusschritt wird vor allem durch Transferasen katalysiert.

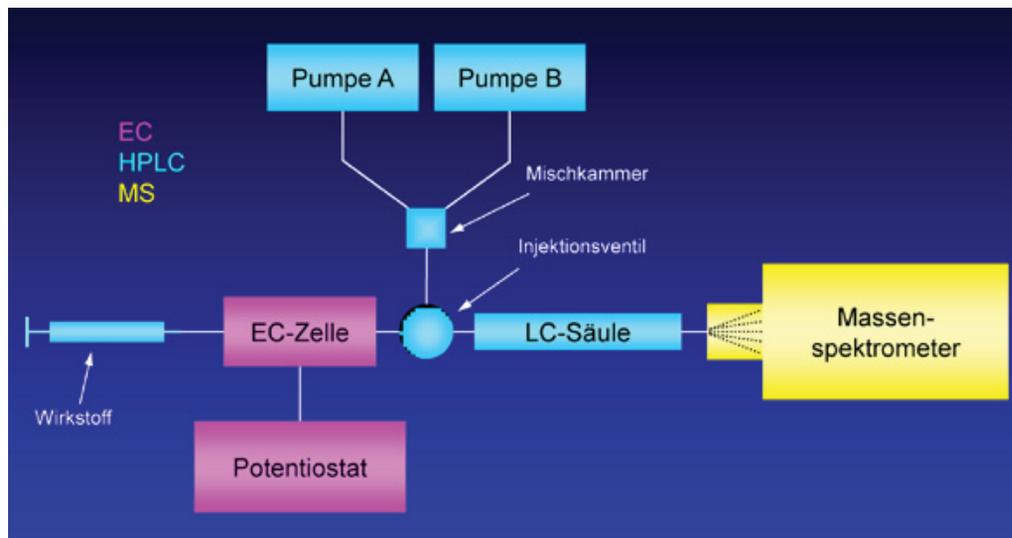
# Cleverere Lösungen für viele Laboraufgaben

Das Endziel dieser körpereigenen Reaktionskaskade ist schließlich die Ausscheidung der Xenobiotika, die zumeist über die Nieren erfolgt.

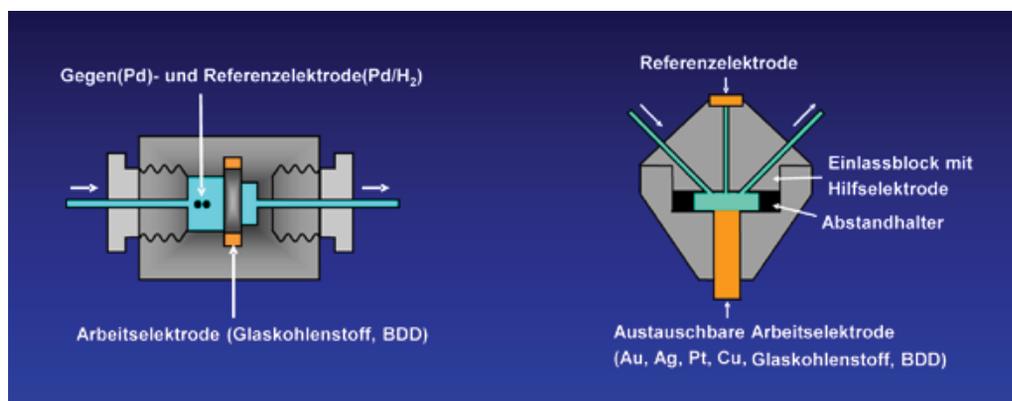
Heute basieren etablierte Methoden zur In-vitro-Simulation des oxidativen Phase-I-Metabolismus, um den es in diesem Artikel zuvorderst gehen soll, auf dem Einsatz von CYP-Enzymen der Leber. Diese werden entweder in Form einer perfundierten Tierleber, von Leberschnitten, von Leberzellen oder – dies ist am gebräuchlichsten – von Leberzellmikrosomen eingesetzt. Obschon diese Methoden die In-vivo-Bedingungen in guter Näherung abzubilden vermögen, sind doch die Nachteile hierbei, dass sie allesamt auf Tierversuchen basieren sowie mühsam und zeitaufwändig sind. Nachteilig ist zudem, dass viele Metabolite sehr reaktiv sind, und nicht in ihrer freien Form sondern

nur als Konjugate mit Bestandteilen z. B. des Mikrosomenansatzes detektiert werden können. Hinzu kommt, dass die Reproduzierbarkeit wie bei vielen biologischen Systemen nur eingeschränkt gegeben ist.

Vielen Synthesechemikern ist die Elektrochemie (EC) als etablierte Methode zur Durchführung von Oxidationsreaktionen ein Begriff. Es bietet sich daher an, die EC ebenfalls zur Simulation des oxidativen Phase-I-Metabolismus von Xenobiotika zu nutzen. Hierfür haben sich in den letzten Jahren insbesondere die folgenden beiden Ansätze etabliert: Zum einen kann eine elektrochemische Durchflusszelle direkt an ein Massenspektrometer gekoppelt werden (EC-MS) [1,2], zum anderen kann zwischen die elektrochemische Zelle und das Massenspektrometer noch eine flüssigchromatografische (LC) Trennung geschaltet werden



**Abb.1** Der Aufbau der Kopplung von elektrochemischer Durchflusszelle, flüssigchromatografischer Trennung und Massenspektrometrie [EC-LC-MS]. Im Falle der reinen Kopplung von EC und MS ist der Auslass der EC-Zelle direkt mit dem Ionisationsinterface des Massenspektrometers verbunden.



**Abb.2** Aufbau einer coulometrischen Durchflusszelle (links) und einer amperometrischen Zelle (rechts). Beide Zelltypen bestehen aus einer Dreielektrodenanordnung. Das Potenzial wird zwischen Gegen- und Arbeitselektrode angelegt. Polarisierungseffekte an der Gegenelektrode, die zu einem instabilen Arbeitspotenzial führen würden, werden durch die Verwendung einer Referenzelektrode, zumeist Palladium/Wasserstoff (Pd/H<sub>2</sub>), kompensiert.



Flexibler automatischer Liquid- und Pulverroboter



Viele Tools für spezielle Anwendungen



2 Arme und mehr für hohen Durchsatz und universelle Anwendungen



Schnelle automatische Abfüll- und Verschließsysteme



Akustischer Nano-Dispenser



Schnelle IR-Evaporatoren



Zellharvester



Probenfläschchen aus Kunststoff und Glas



Cocktails für die Szintillationsmessung



Röntgen-CT für Kleintiere

**ZINSSER ANALYTIC**

D-60489 Frankfurt, Eschborner Landstraße 135  
 Tel.: +49 69 789 106-0, Fax +49 69 789 106-80  
 GB-Maidenhead, Berks; Tel.: +44 1628 773202  
 USA-Northridge, CA; Tel.: +1 818 341-2906  
 Internet: www.zinsser-analytic.com  
 Email: info@zinsser-analytic.com

# ChromChat



**Martin Vogel**, geb. 1973, hat Chemie studiert und an der Universität Münster in analytischer Chemie promoviert. Nach seiner Promotion ging er für einige Jahre an die Universität Twente in Enschede (Niederlande). Seit 2006 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Münster in der Arbeitsgruppe von Prof. Uwe Karst. Dort beschäftigt er sich schwerpunktmäßig mit den analytischen Kopplungstechniken, insbesondere mit der Kopplung von Elektrochemie, Flüssigchromatografie und Massenspektrometrie. Er war in den Jahren 2011 und 2013 u.a. Mitausrichter zweier internationaler Workshops zu diesem Thema, die in Münster stattfanden. Ein weiterer Workshop ist für das Frühjahr 2015 in Vorbereitung. Seit 2004 ist er Mitglied im Vorstand der Fachgruppe Analytische Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker, deren Vorsitzender er seit 2012 ist.

(EC-LC-MS; Abb. 1) [3,4]. In der Durchflusszelle werden die Ausgangssubstanzen bei einem konstanten Potenzial, das zuvor experimentell ermittelt wurde (siehe unten), oxidiert. Anschließend erfolgt entweder direkt oder nach Trennung die Detektion der Oxidationsprodukte im Massenspektrometer. Mit den vielfältigen Experimenten und technischen Möglichkeiten der modernen Massenspektrometrie, z. B. Tandem-MS, Bestimmung der exakten Masse usw., kann die Identifizierung der Produkte erfolgen.

Während die direkte Kopplung von EC und MS insbesondere dann von Interesse ist, wenn sehr reaktive Metabolite, die z. B. in Mikrosomenansätzen mit ihren komplexen Matrices sofort weiteragieren würden, ohne signifikante Zeitverzögerung detektiert werden sollen, bietet sich die EC-LC-MS-Kopplung dann an, wenn komplexe Mischungen in der Durchflusszelle oxidiert werden. Somit wird – eine ideale LC-Trennung vorausgesetzt – zu einem gegebenen Zeitpunkt jeweils nur das Reaktionsprodukt einer

Einzelsubstanz detektiert. Zudem erlaubt die chromatografische Trennung – zumeist handelt es sich hierbei um Umkehrphasen (RP)-Trennungen – anhand der Elutionsreihenfolge Aussagen über die Polarität einzelner Produkte zu treffen und somit die Identifizierung zu erleichtern.

## Die elektrochemische Zelle

Heute werden die meisten Experimente zur elektrochemischen Simulation oxidativer Metabolismusvorgänge mit coulometrischen Durchflusszellen oder amperometrischen Dünnschichtzellen durchgeführt (Abb. 2). Beide Zelltypen bestehen aus einer Dreielektrodenanordnung aus Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode. Die gegenwärtig verwendete Arbeitselektrode der coulometrischen Zellen besteht typischerweise aus einer porösen Glaskohlenstoffelektrode oder Bor-dotiertem Diamant (BDD). Die amperometrische Dünnschichtzelle wird auch mit anderen Materialien für die Arbeits-

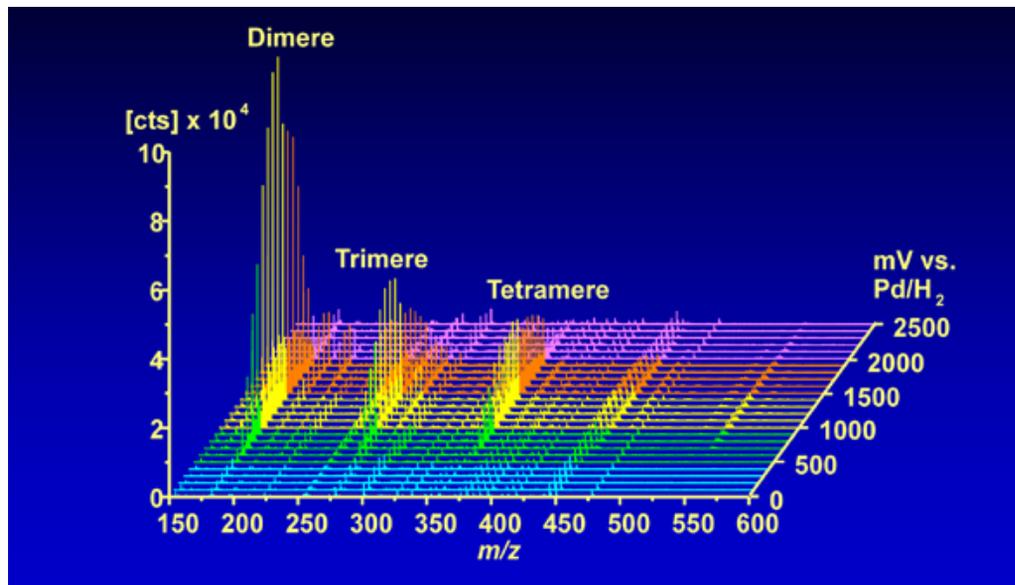
elektrode wie z. B. Au, Ag, Pt, Cu eingesetzt. In Abhängigkeit vom Elektrodenmaterial können dabei unterschiedliche Oxidationsprodukte erzielt werden, was u. a. auf Überspannungseffekte und die unterschiedliche chemische Reaktivität der Elektrodenmaterialien in verschiedenen Puffersystemen zurückzuführen ist.

Die Bedingungen der elektrochemischen Oxidation müssen für jeden Zelltyp und jede Applikation hinsichtlich des Oxidationspotenzials, des verwendeten Puffers und der Flussrate optimiert werden. Für die meisten Anwendungen wird ein physiologischer pH-Wert von 7,4 eingestellt. Für die Optimierung des Oxidationspotenzials ist es am einfachsten, ein so genanntes Massenvoltammogramm aufzunehmen. Hierbei wird der Auslass der EC-Zelle direkt mit dem Ionisationsinterface des Massenspektrometers verbunden. Die zu untersuchende Substanz wird dann kontinuierlich durch die Zelle gepumpt, wobei an diese eine Potenzialrampe angelegt wird und das Massenspektrometer zeichnet fortlaufend Spektren auf. Die dreidimensionale Auftragung der Massenspektren gegen das angelegte Potenzial (Massenvoltammogramm, Abb. 3) erlaubt dann Aussagen über das Potenzial, bei dem unter den gegebenen Bedingungen wie Flussrate und Pufferzusammensetzung die meisten Oxidationsprodukte zu erwarten sind.

## Validierung und Anwendungen

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass CYP450-katalysierte Oxidationsreaktionen und die elektrochemische Simulation dieser Reaktionen – obschon auf unterschiedlichen Mechanismen beruhend – in weiten Teilen eine gute Übereinstimmung zeigen. Hierfür wurde eine Vielzahl von Wirkstoffen wie das Muskelrelaxans Tetrazepam, das Schmerzmittel Paracetamol, das Neuroleptikum Clozapin oder der Beta-blocker Metoprolol, um nur einige Beispiele zu nennen, jeweils mittels EC und isolierten Human- bzw. Rattenlebermikrosomen untersucht. Mit Ausnahme von Expoxidierungen sowie der Alkohol/Aldehyd-Oxidation konnten beim Vergleich zwischen EC und Mikrosomen die folgenden Reaktionen erfolgreich elektrochemisch simuliert werden:

- ▶ aliphatische, allylische, aromatische und benzyllische Hydroxylierungen,



**Abb.3** Massenvoltammogramm von Anilin, das sensibilisierend auf die Haut wirkt und aus Azofarbstoffen in Kosmetika freigesetzt werden kann. Die Intensität des MS-Signals ist aufgetragen gegen das Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ , auf der x-Achse) und die angelegte Potenzialrampe (in mV, auf der z-Achse). Man erkennt, dass in diesem Fall bei steigendem Potenzial Oligomere des Anilins gebildet werden [6].

- ▶ N-, O- und S-Dealkylierungen,
- ▶ N- und S-Oxidbildungen und
- ▶ Dehydrogenierungen.

Auch die Umsatzraten von Mikrosomen- bzw. EC-Ansatz sind in den vergangenen Jahren genauer untersucht und verglichen worden. Hierbei hat sich gezeigt, dass diese von Substanz zu Substanz stark variieren. Während die elektrochemische Oxidation, wie oben erwähnt, signifikant von den experimentellen Bedingungen wie Flussrate oder Pufferzusammensetzung abhängt, zeigen Mikrosomenexperimente eine starke Abhängigkeit von der Expression der unterschiedlichen Isoformen von CYP450-Enzymen. Daher ist ein quantitativer Vergleich beider Methoden bislang nur eingeschränkt möglich.

Insbesondere bei der Detektion reaktiver Metabolite hat sich die EC-LC-MS-Kopplung bereits als schnelles und einfaches Werkzeug erwiesen. In konventionellen Ansätzen können reaktive Metabolite nicht direkt detektiert werden, da sie rasch an Proteine binden. Diese kovalente Proteinbindung ist mit ein Grund dafür, dass toxische Effekte beobachtet werden. Die reaktiven Spezies werden daher indirekt detektiert. Hierzu wird ein Abfangreagenz – z. B. Glutathion – hinzugegeben. Erst anschließend ist der Metabolit einer Detektion und eventuellen Identifizierung zugänglich. Am Beispiel des Antimalariamittels Amodiaquin konnte gezeigt werden, dass der EC-LC-MS-Ansatz eine gute Alternative zum indirekten Detektionsansatz darstellt.

Darüber hinaus kann die elektrochemische Oxidation genutzt werden, um auch die Bindung reaktiver Metabolite an

Proteine gezielt zu untersuchen. Hierbei wird die zu untersuchende Substanz wie gewohnt in der EC-Zelle oxidiert. Nach der Zelle wird über eine Spritzenpumpe die Lösung des Proteins in eine Reaktionsschleife gegeben, sodass die potenziell gebildeten reaktiven Metabolite die Möglichkeit zur Konjugation erhalten. Die gebildeten Konjugate können dann im MS detektiert und die Bindungsstellen im Protein durch weitere Experimente bestimmt werden [5].

Die Online-Kopplung von Elektrochemie und Massenspektrometrie, in Abhängigkeit von der jeweiligen Applikation ergänzt durch eine flüssig chromatografische Trennung, hat sich, wie die Beispiele gezeigt haben, in den vergangenen Jahren zunehmend als eine wertvolle Ergänzung zu herkömmlichen Untersuchungen von Metabolismvorgängen erwiesen. Sie wird klassische Mikrosomenexperimente und andere etablierte Methoden auch in Zukunft nicht ersetzen können. Dennoch ist die EC-MS eine Methode, die ohne Tierversuche in der Lage ist, die wesentlichen Grundzüge des Phase-I-Metabolismus in schneller und unkomplizierter Weise vorherzusagen.

→ [martin.vogel@uni-muenster.de](mailto:martin.vogel@uni-muenster.de)

#### Literatur

- [1] Hambitzer, G. & Heilbaum, J. (1986) *Anal. Chem.* 58, 1067–1070
- [2] Zhou, F. & van Berkel, G.J. (1996) *Anal. Chem.* 67, 3643–3649
- [3] Lohmann, W. & Karst, U. (2007) *Anal. Chem.* 79, 6831–6839.
- [4] Baumann, A. & Karst, U. (2010) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6, 715–731
- [5] Faber, H. et al. (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 345–354
- [6] Melles, D. et al. (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 377–384

Foto: © istockphoto.com | ma-k,  
© panthermedia.net | Emilia Stasiak

## DAS BESTE FÜR INSTRUMENTELLE DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE

### TLC VISUALIZER

PROFESSIONELLES DOKUMENTATIONS- UND AUSWERTUNGSSYSTEM FÜR HPTLC- UND DC-PLATTEN



■ SCHNELL ■ AUTOMATISCH ■ REPRODUZIERBAR

# CAMMAG

WELTWEIT FÜHREND IN DER PLANAR-CHROMATOGRAPHIE



WWW.CAMMAG.COM

SWISS MADE