

Zur Pharmakokinetik von Lipidsenkern, 5. Mitt.⁺⁾ Ist 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionsäure ein Metabolit des Lipidsenkers Ciprofibrat? ^{++) **)}

Herbert Oelschläger*, Dietrich Rothley, Karl-Heinz Hellwich und Wolfgang Schmidt

Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M., Georg-Voigt-Str. 14, D-6000 Frankfurt a.M.

Eingegangen am 12. August 1988

Nach oraler Gabe von Ciprofibrat (1) an Probanden (n = 5) findet sich im frisch gelassenen Harn nur dessen Glukuronid, kein 1 und nicht die 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionsäure (3), deren Bildung aus 1 auch biochemisch nicht interpretierbar wäre. Somit muß das von anderen Autoren⁶⁾ berichtete Auftreten von 3 im Harn von Probanden korrigiert werden.

Pharmacokinetics of Hypolipidemic Agents, V: Is 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionic Acid a Metabolite of the Hypolipidemic Agent Ciprofibrate (2-(4-(2,2-Dichlorocyclopropyl)-phenoxy)-2-methylpropionic Acid)?

After oral administration of Ciprofibrate (1) to volunteers (n=5) only its glucuronide, but no 1 and no 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionic acid (3) could be detected in the fresh urine. Its formation from 1 seems to be impossible on the basis of established biochemical reactions. Therefore, its presence in the urine of volunteers reported by other authors⁶⁾ is refuted.

Der Lipidsenker Ciprofibrat (1, Lipanor[®]) befindet sich in Frankreich seit dem Jahre 1985 im Handel. Im Vergleich zu Clofibrat ist 1 aufgrund von Versuchen mit hyperlipidämischen Ratten etwa 100mal wirksamer¹⁾. Außerdem inhibiert 1 nicht die hormonabhängige Lipase.

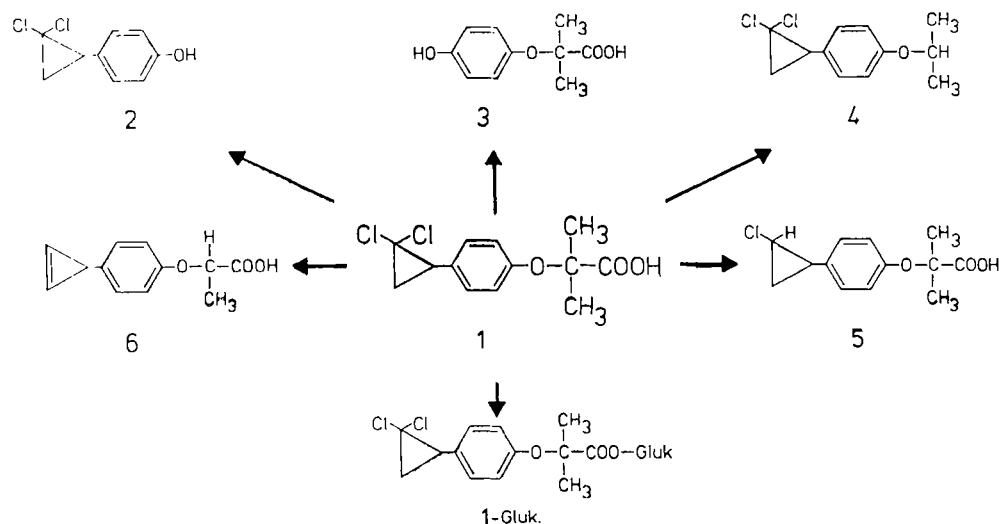
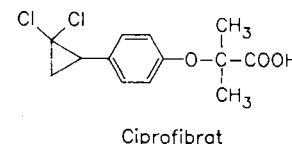
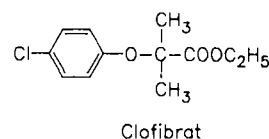


Abb. 1: Biotransformationsschema von Ciprofibrat nach⁶⁾

⁺⁾ 4. Mitt.: s. Lit.⁸⁾.

⁺⁺⁾ Hersteller: Laboratories Winthrop, 92-98 Bal. Victor-Hugo, F-92115 Clichy

^{**)} Herrn Prof. Dr. L. Zaturecký, Dr. sc., Bratislava, dem Pionier der Biopharmazie, in herzlicher Verbundenheit zum 75. Geburtstag gewidmet.

Nach konservativer Schätzung sind bisher ca. 500000 Patienten erfolgreich mit dem Präparat behandelt worden ²⁾. Nebenwirkungen, wie Myalgien, Alopezien und Allergien wurden sehr selten gemeldet ³⁾. Klinische Studien über 2-7 Jahre zeigten, daß die Einmaldosierung mit 100 mg Ciprofibrat täglich bei guter Verträglichkeit zu einer anhaltenden Senkung des Cholesterols- und Triglyceridspiegels führt ⁴⁾. Die Senkung des Cholesterolspiegels betrug nach einem Jahr im Durchschnitt 25%, diejenige des Triglyceridspiegels 30-40% ⁴⁾.

Bei Versuchen zur Klärung der Biotransformation des Ciprofibrats hatten *Beyer und Städter* ⁵⁾ den Harn eines Patienten, dem täglich 100 mg Ciprofibrat als Kapsel verabfolgt worden waren, nach Extrelut^R-Separation durch GC/MS analysiert. Sie identifizierten unverändert ausgeschiedenes **1** und als einzigen Metaboliten 4-(2,2-Dichlorcyclopropyl)-phenol (**2**) (Abb. 1). Bei weiteren Versuchen erhielt ein anderer Proband 200 mg **1**, und im 3-Tage-Sammelharn wurde das Metabolitenspektrum über das Baker-Extraktions-System mit MS-Identifizierung bestimmt ⁶⁾. 57.6% der applizierten Dosis wurden als unverändertes **1** und 31.6% in konjugierter Form (Glukuronid/Sulfat) gefunden. Ferner wurde zu 8.8% als Metabolit 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionsäure (**3**) identifiziert (Abb. 1). In "äußerst geringen Konzentrationen" lagen ferner vor: 2-(4-(2,2-Dichlorcyclopropyl)-phenoxy)-propan (**4**), 2-(4-(2-Chlorcyclopropyl)-phenoxy)-2-methyl-propionsäure (**5**) und 2-(4-(2,3-Cyclopropenyl)-phenoxy)-propionsäure (**6**) (vgl. Abb. 1). **2** wurde als mögliches Artefakt charakterisiert. Referenzsubstanzen mit physikalischen Konstanten wurden von *Städter* ⁶⁾ nicht angegeben. Seine Strukturzuordnungen basieren lediglich auf spektroskopischen Befunden, meistens auf der MS von Derivaten, z.B. der Methylester. Abb. 1 orientiert über das von *Städter* ⁶⁾ im Harn gefundene vielfältige Metabolitenmuster. Im Blutserum konnte von ihm nach Gabe von 200 mg **1** nur Ciprofibrat detektiert werden.

Unsere Untersuchungen an 5 gesunden männlichen Probanden, die zwei Kapseln Ciprofibrat (100 mg) erhalten hatten, ergaben überraschender Weise ein ganz anderes Metabolitenspektrum im Harn. Die Trennung erfolgte durch HPLC und die Detektion mit einem UV-Detektor (230 nm). Im Harn aller Probanden fanden wir in Übereinstimmung mit *Edelson et al.* ⁷⁾ lediglich **1**-Glukuronid. Das ggf. nephrotoxisch wirkende **2** konnte auch mit Hilfe des hochempfindlichen amperometrischen Detektors (+ 1V, selbstgefertigte Kohlepasten-Elektrode) nicht nachgewiesen werden. Als Etherglukuronid lag **2** nicht im Harn vor. Auch **3** wurde schon bei Vorversuchen nicht beobachtet ⁸⁾. Die skizzierten erheblichen Widersprüche konnten z.T. bereits von uns geklärt werden. 4-(2,2-Dichlorcyclopropyl)-phenol (**2**) ist mit Sicherheit ein Artefakt ⁸⁾, entstanden bei der Analyse durch Säurespaltung bzw. Thermolyse, keinesfalls durch Enzymeinwirkung, für die auch aufgrund bisher gewonnener Erkenntnisse keine theoretisch begründete Möglichkeit besteht. Bekanntlich fordert die zuerst von *Mac Mahon* ⁹⁾ postulierte oxidative Entalkylierung, daß dem Sau-

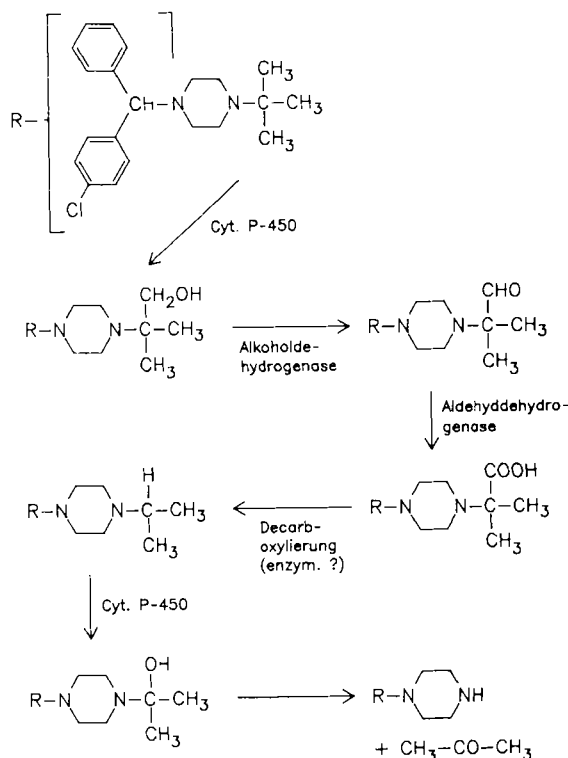
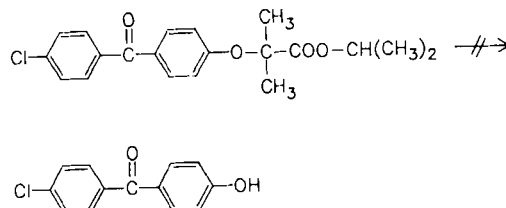


Abb. 2: Biotransformation eines Meclozinderivats nach ¹⁰⁾

erstoffatom eine Methin- oder Methylengruppe benachbart ist, eine wegen des quartären C-Atoms in **1** nicht erfüllte Voraussetzung. Es soll nicht verkannt werden, daß in seltenen Fällen auch bei Vorliegen eines quartären C-Atoms, so z.B. bei einem Meclozinderivat mit tert. Butylrest, die Abspaltung einer Methylgruppe gemäß Abb. 2 beobachtet worden ist ¹⁰⁾. Bei Übertragung dieses Mechanismus auf die Biotransformation von **1** wäre die Bildung von **2** grundsätzlich verständlich. Aber es entsteht aus dem Meclozinderivat als Folge der Cytochrom P-450-Oxidation ein Halbarninal, während beim Ciprofibrat ein Halbacetal gebildet werden müßte. Für die Halbacetalbildung nach Elimination der Methylgruppe vom quartären C-Atom gibt es jedoch in der Literatur keine Stütze. So fanden *Brodie et al.* ¹¹⁾ nach Gabe des Lipidsenkers Fenofibrat an Probanden nicht das Phenol als Spaltprodukt der -O-C-Bindung eines Halbacetals.



Das von *Beyer und Städter* ⁵⁾ im Sammelharn bestimmte freie Ciprofibrat ist, wie wir festgestellt haben ⁸⁾, durch das Stehen des Untersuchungsmaterials über 3 Tage infolge der Anwesenheit von β -Glukuronidasen im Sammelharn durch Spaltung des **1**-Glukuronids entstanden.

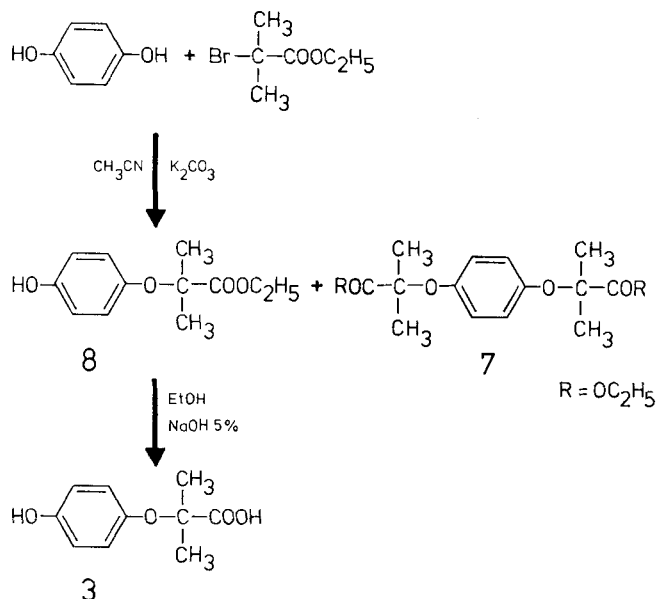


Abb. 3 : Synthese von 3

Die Biosynthese der 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methylpropionsäure (3) erfordert als Intermediat ein Arenoxid mit NIH-shift, damit die C-C-Bindung gelöst werden kann⁸⁾. Ein solcher shift ist bisher, außer für H, ³H und D, nur für Chlor- und Bromatome sowie für die Methylgruppe beobachtet worden, keinesfalls für den voluminösen α, α-Dichlorcyclopropylrest. Wir vermögen die Bildung von 3 aus 1 also weder biochemisch noch chemisch zu deuten. Die letztere Aussage stützt sich u.a. auf die Behandlung von 1 mit verd. Säuren und Laugen über 10-15 min bei 20°C, bei der wir dc zwar mehrere Zersetzungsprodukte, aber nicht 3 feststellten.

Zur Klärung dieser Problematik haben wir 3 als Referenzsubstanz auf folgendem Weg synthetisiert (Abb. 3). Die zweistufige Synthese wird trotz eines Eduktverhältnisses Hydrochinon:2-Brom-2-methyl-propion-

säure-ethylester = 1 : 0.7 durch die Bildung von Polymerisaten und Nebenprodukten erschwert. Vornehmlich tritt der 2,2'-(4-Phenylendioxi)-bis-(2-methyl-propionsäure-ethyl-ester) (7) vom Schmp. 79.5 - 80.5 °C auf (ca. 23%). Nach mehreren Vorversuchen gelang die Umsetzung in ca. 20stdg. Reaktion in CH₃CN/K₂CO₃. Nach Chromatographie erhielt man den reinen 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methylpropionsäure-ethylester (8) vom Schmp. 83.5 - 84.5 °C (35%), dessen alkalische Hydrolyse 92% 3 vom Schmp. 161.5 - 162.5 °C gab. Die von Newman und Cella¹²⁾ modifizierte Synthese des 3-Ethylesters durch Umsetzung in DMSO unter Zusatz von NaH ergab bei der Nacharbeitung nicht die mitgeteilte Ausbeute (38% statt 56%); 7 fiel zu 10% an.

Analog den Untersuchungen von Städter⁶⁾ verabfolgten wir dann 5 männlichen Probanden morgens 2 x 100 mg 1 in Kapseln. Die Untersuchung des 2-Tage-Sammelharns aller 5 Probanden auf 3 gestaltete sich äußerst schwierig, weil 3 im verwendeten System nur eine relativ kurze Retentionszeit von ca. 23 min hat und, wie Abb. 4a und 4b ausweisen, damit im Bereich der Retentionszeiten vieler unbekannter physiologischer Komponenten des Harns auftritt. Ein brauchbares "analytisches Fenster" konnte schließlich dadurch geschaffen werden, daß mittels einer speziellen Probenvorbereitung (C₁₈-Kartusche) der polare Anteil des Eluats weitgehend beseitigt und der lipophile Anteil durch Variation des Eluens auf der Kartusche zurückgehalten wurde (Abb. 4b). Durch Vergleichsversuche mit der Referenzsubstanz 3, die jener Fraktion des Kartuscheneluats zugesetzt wurde, in der nach Vorversuchen 3 auftritt, konnten wir sicherstellen, daß, wenn überhaupt, 3 bestenfalls in Mengen <0.5% gebildet wird. Abb. 4c veranschaulicht einen solchen Zusatzversuch mit jener Menge 3, die sich aufgrund einer hypothetischen Umwandlung von ca. 10% 1 in 3 ergeben würde. Der Peak nach 23.17 min ist unübersehbar. Es muß ausdrücklich festgehalten werden, daß unsere Untersuchungen keinen Anhalt dafür bieten, daß 3 entsteht. Aufgrund der Elutionsbedingungen erscheint in dieser Fraktion Ciprofibrat (1) nicht.

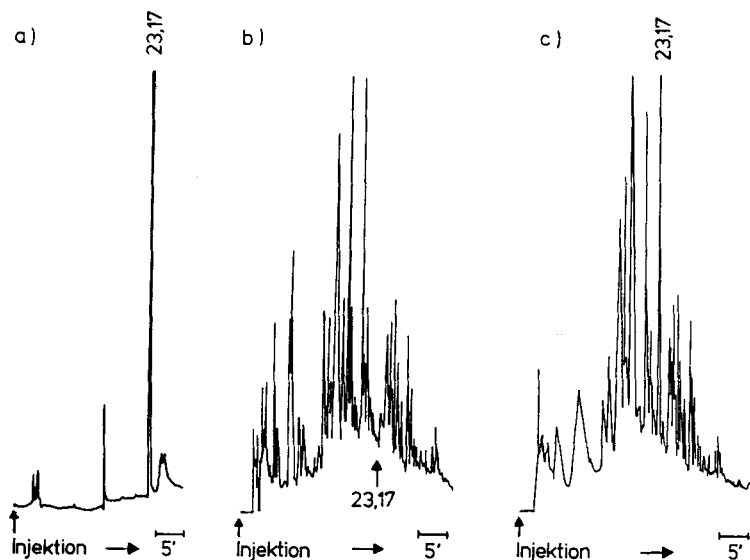


Abb. 4a: Chromatogramm einer Lösung von 3. b: Chromatogramm eines Harns nach Gabe von 1 und Glusulase-Behandlung (pH 6.8). c: Chromatogramm eines Harns nach Gabe von 1, Glusulase-Behandlung (pH 6.8) und Zugabe einer berechneten Menge 3

Durch Spaltungsversuche mit β -Glukuronidase (EC 3.2.1.31) verschiedener Herkunft und variiertem pH, nämlich aus *E. coli* (Sigma G 1758) bei pH 6.8 und aus *Helix pomatia* (Sigma G 1512) bei pH 5.0, konnte **3** nicht nachgewiesen werden. Von den zwei β -Glukuronidasen besitzt G 1512 auch Sulfataseaktivität. Die Empfindlichkeit des Nachweises von **3** beträgt ca. 0.25%, bezogen auf die im gleichen Zeitraum ausgeschiedene Menge **1**.

Die weitere Untersuchung der 5 Probandenharne ergab als einziges Ausscheidungsprodukt von Ciprofibrat (**1**) im Harn in Übereinstimmung mit unseren früheren Untersuchungen⁸⁾ und den Befunden von Edelson⁷⁾ 1-Glukuronid. **3** entsteht also nicht als Metabolit des Ciprofibrat (**1**).

Die bisher von uns mitgeteilten Biotransformationsbefunde lassen mit Sicherheit den Schluß zu, daß Ciprofibrat (**1**) nicht zuletzt aufgrund des für die Arzneistoffchemie neuartigen α , α -Dichlorcyclopropylrestes metabolisch äußerst stabil ist. Dafür sprechen auch die folgenden in-vitro-Versuche: In Sörensen Phosphatpuffer pH 7.4 mit Cofaktoren wurden der 10.000 x g Überstand des Rattenleberhomogenats und Ciprofibrat (**1**) inkubiert und 1 h bei 37 °C gehalten. Das Cytochrom P-450-System der Ratte war vorher durch Zugabe von 0.1% Phenobarbital zum Trinkwasser induziert worden. Im übrigen wurde in der bekannten Versuchsanordnung gearbeitet¹³⁾. Nach 0 min, 15 min und 30 min wurde eine Probe gezogen und der HPLC-Analytik (UV-Detektor 230 nm) zugeführt. Es resultierte kein Hinweis auf eine metabolische Veränderung von **1**, da nur der Edukt-Peak in gleichbleibender Höhe beobachtet wurde. Auch 1-Glukuronid wurde nicht weiter biotransformiert. Entspr. Versuche mit dem 10.000 x g Überstand unter Zusatz von Glutathion und Glutathion-S-Transferase (EC 2.5.1.18) ergaben keine Bildung des Glutathionkonjugats, wohl aber trat nach Zugabe von UDP-Glukuronsäure und Glukonyltransferase (EC 2.4.1.17) die Bildung des 1-Acylglukuronids ein.

Laufende Untersuchungen gelten der Frage, ob die in Abb. 1 aufgrund von Massenspektren postulierten Metabolite **4**, **5** und **6** sich gegen die von uns erstmals synthetisierten Referenzsubstanzen als Realität erweisen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, und dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt a. M., für finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

1. Synthese der 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionsäure (**3**)

1.1 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionsäure-ethylester (**8**)

In einem 100 ml-Dreihalskolben werden nach Spülung mit N₂ unter N₂-Zuleitung 4.9 g (= 44.5 mmol) Hydrochinon in 50 ml Acetonitril gelöst. Die Auflösung kann durch Erwärmen auf 50 °C beschleunigt werden. Dann erfolgt unter kräftigem Rühren die Zugabe von 6.2 g (44.9 mmol) wasserfreiem K₂CO₃ und 4.6 ml (= 31.3 mmol) 2-Brom-2-methyl-propionsäure-ethylester. Man rührt 20 h unter Rückfluß, filtriert nach dem Abkühlen und engt das Filtrat i. Wasserstrahlvak. ein. Der Rückstand wird in CH₂Cl₂/Ethylacetat (9 + 1) aufgenommen. Der sich dabei abscheidende braune Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat an 70 g Kieselgel 60 (Füllhöhe 55 cm, Ø 2 cm) mit CH₂Cl₂/Ethylacetat (9 + 1) chromatographiert. Im Vorlauf wird der Hydrochinondiether **7** abgetrennt, Schmp. 79.5 –

80.5 °C, Ausbeute 23 %.-MS (90 eV): m/z = 338 (10%, M⁺), 265 (11), 224 (9), 110 (100). Es folgt der Monoether in 35proz. Ausbeute, Schmp. 83.5 – 84.5 °C. Aus CH₂Cl₂ farblose Kristalle, Schmp. 83.5 – 84.5 °C; Lit.¹²⁾: Schmp. 85 – 86 °C.

1.2 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionsäure (**3**)

In einem 50 ml-Rundkolben werden 1008 mg (4.49 mmol) 2-(4-Hydroxyphenoxy)-2-methyl-propionsäure-ethylester in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 7.5proz. NaOH versetzt und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Man säuert mit 38proz. HCl auf pH 3 an und extrahiert dreimal mit je 15 ml CH₂Cl₂. Die vereinigten Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt: 504 mg farbloser Kristalle, Schmp. 161 – 162 °C. Die Nachextraktion der sauren Lösung mit 2 x 20 ml Ethylacetat ergibt weitere 311 mg schwach gelblicher Kristalle vom gleichen Schmp., Gesamtausbeute 815 mg (92%). Durch Umkristallisieren aus Ethylacetat erhält man den Schmp. 161.5 – 162.5 °C, Lit.¹⁴⁾: Schmp. 161.5 – 162.5 °C.-MS (90 eV): m/z = 196 (9%, M⁺), 151 (5), 110 (100).

2. Untersuchung des Harns

2.1 Probenvorbereitung

5 Probanden erhielten am Morgen 2 Kapseln Ciprofibrat (100 mg). Zur Analyse gelangte ein 48 h-Harn, der mit Essigsäure auf pH 3.5 eingestellt wurde, wodurch während des Stehens der nicht-enzymatischen Spaltung des O-Acylglukuronids vorgebeugt wird. 2 ml dieses Harns wurden mit 3 ml Phosphatpuffer (pH 6.8) bzw. 3 ml Acetatpuffer (pH 5.0), der die betr. β -Glukuronidasen (s. 3.1) enthält, versetzt und 2 h bei 40 °C belassen. Nach Abkühlen zentrifugiert man von ausgefallenen Partikeln ab, füllt mit gereinigtem Wasser auf ca. 9.0 ml auf und ergänzt mit 10proz. H₃PO₄ auf 10 ml. Die so erhaltene Probe (pH 3.3) wird über C₁₈-Kartuschen einer Reinigung unterzogen. Dazu ist eine Säulenvorbereitung unverzichtbar.

2.2 Säulenvorbereitung:

Baker C₁₈ Octadecyl (Säulenvolumen 6 ml). – 2 Vol MeOH; 2 Vol H₃PO₄ 0.01%; 2 Vol Aceton; 2 Vol CH₃CN; 2 Vol H₃PO₄ 0.01%.

2.3 Meßvorgang

Auf die so vorbereitete Baker C₁₈-Säule wurde die Probe (10 ml) gegeben und zunächst mit 2 Vol H₃PO₄ 0.01% und nachfolgend mit 2 Vol MeOH 10% gespült. Anschließend erfolgte die Fraktionierung mit 50proz. Methanol. Die ersten 600 µl wurden nach Prüfung verworfen. Die nächsten 700 µl bildeten die 1. Fraktion, die nachfolgenden 100 µl die 2. Fraktion. 20 µl der 1. Fraktion wurden analysiert (UV-Detektor 230 nm). Das Ergebnis der UV-Detektion zeigt Abb. 4 b.

Das Chromatogramm 4 c wurde in der Weise gewonnen, daß der ersten Fraktion soviel Referenzsubstanz **3** zugesetzt wurde, als 10% der im Harn ausgeschiedenen Menge Ciprofibrat als Glukuronid im gleichen Zeitraum entsprachen.

2.4 HPLC-Parameter

Hewlett Packard 1084 B, UV-Detektor 230/540 nm. – Säule: Nucleosil-120-C₁₈-5µ: 250 x 4.6 mm (Knauer/Berlin). – Eluenten: A: PicA low UV pH 3.3; B: Acetonitril (Merck/Darmstadt). – Gradient: 0–6 min %B = 10, 6–60 min %B = 70 (lin). – Attenuation 5.

3. Biopharmazeutische Untersuchungen

3.1 Materialien

Ciprofibrat wurde von der Fa. Winthrop zur Verfügung gestellt und war chromatographisch rein (DC, HPLC). Methanol und Acetonitril waren

HPLC-qualifiziert (Merck/Darmstadt). Das gereinigte Wasser (DAB 9) wurde durch einen 0.2 µm-Filter filtriert und zur CO₂-Entfernung kurz vor der Pufferherstellung zum Sieden erhitzt und abgekühlt. NADP, NADH, Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Uridindiphosphoglukuronsäure (UDPGA) wurden von Fa. Boehringer/Mannheim, Glutathion-S-Transferase (EC 2.5.1.18), reduziertes Glutathion (als freie Säure) und die beiden β-Glukuronidasen (EC 3.2.1.31) von Fa. Sigma Chemical/St. Louis, USA, bezogen. Die übrigen Substanzen besaßen den Reinheitsgrad p.a. (Merck/Darmstadt). Versuchstier war eine männliche White-Whistar-Ratte, 280 g, Fa. Ivanowaz/7964 Kisslegg. Die Enzyminkubationen wurden in einem Schüttelwasserheizbad der Fa. Köttermann/Hänigsen durchgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Induktion des Cytochrom P-450-Systems

Zur Induktion wurde dem Versuchstier von der 96. Stunde an vor Entnahme der Leber 0.1% Phenobarbital im Trinkwasser angeboten.

3.2.2 Herstellung der Puffer und Cofaktorlösungen

3.2.2.1 Tris-KCl-Puffer pH 7.4

Tris (= Trishydroxymethylaminomethan)	3.033 g
Kaliumchlorid	1.150 g
konz. Salzsäure (36%)	17.5 ml
gereinigtes Wasser	ad 100.0 ml

3.2.2.2 Phosphat-Puffer (1/15 M) pH 7.4

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	1.910 g
KH ₂ PO ₄	0.179 g
gereinigtes Wasser	ad 100.0 ml

3.2.2.3 Phosphat-Puffer pH 6.5

KH ₂ PO ₄	1.361 g
Natriumhydroxid	0.101 g
gereinigtes Wasser	ad 100.0 ml

3.2.2.4 Cofaktorlösung für Cytochrom P-450

NADP	7.7 mg
Glucose-6-Phosphat	15.2 mg
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	5.0 µl
Magnesiumchlorid	95.2 mg
Phosphatpuffer pH 7.4	ad 10.0 ml

3.2.2.5 Cofaktorlösung für die Kopplung mit Glutathion

Glutathion-S-Transferase (EC 2.5.1.18)	50.0 mg (= 425 u)
reduziertes Glutathion	50.0 mg
Phosphatpuffer pH 6.5	ad 5.0 ml

3.2.2.6 Cofaktorlösung für die Kopplung mit Glukuronsäure

Uridindiphosphoglukuronsäure (UDPGA)	3.5 mg (= 5 µmol)
Magnesiumchlorid	4.76 mg
Phosphatpuffer pH 7.4	ad 10.0 ml

3.2.3 Herstellung des 10.000 x g-Überstandes

Die Ratte wurde durch Genickschlag getötet. Nach kurzem Ausbluten wurde die Leber entnommen, in eiskaltem Tris-KCl-Puffer (pH 7.4) gewaschen, fein geschnitten und in einem dem Lebergewicht entsprechenden Volumen Tris-KCl-Puffer mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator

homogenisiert. Anschließend wurde mit Tris-KCl-Puffer so aufgefüllt, daß in 2 ml Homogenisat 1 g Frischleber enthalten war. Das Homogenisat wurde bei 0-4 °C und 10.000 x g 20 min zentrifugiert. Der Überstand diente der Inkubation.

3.2.4 Gehaltsbestimmung von Cytochrom P-450

Für die Messung der Cytochrom P-450 Differenzspektren wurde 1 ml (= 0.5 g Leber) des 10.000 x g Überstandes mit 4 ml Tris-KCl-Puffer (pH 7.4) verdünnt. Nach Einleiten von Kohlenmonoxid (30 s) wurden je 2.5 ml der verdünnten Suspensionen in zwei Küvetten pipettiert. Der Inhalt der Probeküvette wurde mit 10 mg Na₂S₂O₄, derjenige der Vergleichsküvette mit 10 mg NADH reduziert. Anschließend erfolgte an einem Shimadzu-UV-Zweistrah-Photometer die Aufzeichnung des Differenzspektrums. Aus der Extinktion bei 449 nm, die 0.204 betrug, wurde nach Mazel⁽¹³⁾ der Cytochrom P-450-Gehalt der induzierten Rattenleber zu $2.24 \cdot 10^{-8}$ mol = 22.4 nmol Cytochrom P-450 pro g Lebergewebe berechnet.

3.2.5 Inkubationsansätze mit dem 10.000 x g-Überstand

Als Substratlösung diente für Ciprofibrat eine 1proz. Lösung in Methanol. Ciprofibratglukuronid wurde den Inkubationsansätzen als Bestandteil eines Probandenurins zugesetzt, der 5 h nach oraler Applikation von 200 mg 1 gelassen worden war und lt. HPLC-Analyse 20 µg Ciprofibratglukuronid/ml enthielt. Der mit 0.5proz. Essigsäure angesäuerte Urin wurde mit 10proz. NaOH tropfenweise unter Rühren und gleichzeitiger Messung mit einer Glaselektrode auf pH 6.5 (für die Glutathionkonjugation) bzw. pH 7.4 (für die Untersuchung des oxidativen Metabolismus) eingestellt. Die einzelnen Bestandteile der Inkubationsansätze wurden in der angegebenen Reihenfolge in 20 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben (Untersuchung des oxidativen Metabolismus) bzw. 35 ml-Reagenzgläser (Untersuchung der Glutathionkonjugation) pipettiert, die in einem auf 37 °C temperierten Schüttelwasserbad vorgewärmt worden waren.

3.2.5.1 Inkubationsansatz zur Untersuchung des oxidativen 1-Metabolismus

Phosphatpuffer pH 7.4	0.96 ml
Cofaktorlösung für Cytochrom P-450	1.00 ml
1proz. Stammlösung von Ciprofibrat (1)	0.04 ml
10.000 x g Überstand	2.00 ml

3.2.5.2 Inkubationsansatz zur Untersuchung des oxidativen Metabolismus des 1-Glukuronids

Probandenurin pH 7.4	1.00 ml
Cofaktorlösung für Cytochrom P-450	1.00 ml
10.000 x g Überstand	2.00 ml

3.2.5.3 Inkubationsansatz zur Untersuchung der Glutathionkonjugation von 1

Phosphatpuffer pH 6.5	0.96 ml
Cofaktorlösung für die Glutathionkonjugation	1.00 ml
1proz. Stammlösung von Ciprofibrat (1)	0.04 ml
10.000 x g Überstand	2.00 ml

3.2.5.4 Inkubationsansatz zur Untersuchung der Glutathionkonjugation des 1-Glukuronids

Probandenurin pH 6.5	1.00 ml
Cofaktorlösung für die Glutathionkonjugation	1.00 ml
10.000 x g Überstand	2.00 ml

3.2.5.5 Leerwert für den oxidativen Metabolismus

Phosphatpuffer pH 7.4	1.00 ml
Cofaktorklösung für Cytochrom P-450	1.00 ml
10.000 x g Überstand	2.00 ml

3.2.5.6 Leerwert für die Glutathionkonjugation

Phosphatpuffer pH 6.5	1.00 ml
Cofaktorklösung für die Glutathionkonjugation	1.00 ml
10.000 x g Überstand	2.00 ml

3.2.5.7 Inkubationsansatz zur Untersuchung der Glukuronsäurekonjugation von 1

Cofaktorklösung für die Glukuronsäurekonjugation	2.00 ml
Phosphatpuffer pH 7.4	0.09 ml
1 proz. Stammlösung von Ciprofibrat (1)	0.01 ml
10.000 x g Überstand	1.00 ml

3.2.5.8 Leerwert für die Glukuronsäurekonjugation

Cofaktorklösung für die Glukuronsäurekonjugation	2.0 ml
Phosphatpuffer pH 7.4	1.0 ml
10.000 x g Überstand	1.0 ml

3.2.6 Entnahme von Blindwerten und Zeitwerten

Aus allen Inkubationsansätzen wurden mit einer Eppendorf-Pipette vor Zugabe des 10.000 x g Überstandes sowie 15 und 30 min danach je 0.1 ml entnommen und in HPLC-Bördelgläschen pipettiert, die schon 0.4 ml Acetonitril enthielten. Dadurch kam es bei den 15 min und 30 min-Werten zur Ausfällung des Proteins, das abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde der HPLC-Analyse zugeführt. Insgesamt resultierten 24 zu untersuchende Proben.

Literatur

- 1 A. Arnold, J.P. Mc Auliff und A.L. Beyler, J. Pharm. Sci. 68, 1557 (1979).
- 2 persönliche Mitt. Fa. Sterling-Winthrop SA, F-92115 Clichy.
- 3 J. Rouffy, G. Gheron und B. Jacotot; Hyperlipidemie et Ciprofibrate: L'expérience des generalistes, Le quotidien du Medicin; (Suppl.): 1-22, September 1986.
- 4 J. Rouffy, B. Chanu, R. Bakir, F. Djian und J. Goy-Loeper, Atherosclerosis 54, 273 (1985).
- 5 A. Olsson, Efficacy, long term tolerance and persistence of the effects of Ciprofibrate, JAMA - France (Suppl.): 4-5, Februar 1987.
- 6 K.-H. Beyer und H. Städter, Arch. Pharm. (Weinheim) 315, 1049 (1982).
- 7 Dissertation H. Städter, Freie Universität Berlin 1983.
- 8 C. Davison, D. Benziger, A. Fritz und J. Edelson, Drug. Metab. Dispos. 3, 520 (1975); C.A. 84, 99082x (1976).
- 9 H. Oelschläger, D. Rothley und W. Schmidt, Arch. Pharm. (Weinheim) 321, 367 (1988).
- 10 R.E. MacMahon, J. Pharm. Sci. 55, 457 (1966).
- 11 J.J. Kamm und A. Szuna, J. Pharmacol. Exp. Ther. 184, 729 (1973).
- 12 R.R. Brodie, L.F. Chasseaud, F.F. Elsom, E.R. Franklin und T. Taylor, Arzneim.-Forsch. 26, 896 (1976).
- 13 M.S. Newman und J.A. Cella, J. Org. Chem. 39, 214 (1974).
- 14 P. Mazel in Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition, Eds. B.N. La Du, H.G. Mandel und L.E. Way, The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1971; Vorschriftensammlung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt a.M. (Praktikum Pharm. Chemie III, Teil B).
- 15 A.F. Bickel und W.A. Waters, J. Chem. Soc. 1950, 1764.

[Ph 546]