

Zur Pharmakokinetik von Lipidsenkern, 8. Mitt. ^{*)}:**Eindeutige Charakterisierung des Ciprofibrat-*O*- β -D-Glukuronids^{*)}**

Herbert Oelschläger, Christopher Kohl, Daniel W. Armstrong und Dietrich Rothley

Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M., Georg-Voigt-Straße 14, W-6000 Frankfurt am Main

Department of Chemistry, College of Arts and Sciences, University of Missouri-Rolla, USA

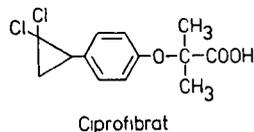
Eingegangen am 22. Juni 1990

Der racemische Lipidsenker Ciprofibrat (1) wird nach oraler Einmalgabe überwiegend (> 90%) als Glukuronid renal und zu einem geringen Teil auch biliar ausgeschieden. Dieses aus dem Harn extrahierte Konjugat wird durch Methylieren der Carboxygruppe und Acetylieren der drei OH-Gruppen der Glukuronsaurekomponente in das hydrophobe Methyl-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyran)-uronat übergeführt, das mit Hilfe der HPLC unter Einsatz der leicht herstellbaren Referenzsubstanz eindeutig identifiziert werden kann. Infolge der Chiralität von 1 resultieren das Glukuronid und sein hydrophobes Derivat vom Schmelzbereich 67-78°C als Diastereomerenmisch. Das letztere konnte analytisch an einer Cyclobond I-Säule in die beiden Diastereomeren getrennt werden.

Pharmacokinetics of Hypolipidemic Agents, VIII: Unequivocal Determination of Ciprofibrate-*O*- β -D-glucuronide

After an oral single dose Ciprofibrate (1) is eliminated mainly (> 90%) as its glucuronide renally and to a small amount on the biliary route. This conjugate could be extracted out of the urine of volunteers. By methylation of the carboxy group and acetylation of the three hydroxy groups of the glucuronic acid the hydrophobic methyl-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyrano)-uronate was formed. This derivative could be identified unequivocally by HPLC using the reference substance which can be obtained easily. Due to the chirality of 1 its glucuronide and the corresponding hydrophobe derivative (melting range 67-78°C) are a mixture of diastereomers. The latter could be separated analytically into the diastereomers using a cyclobond I-column.

In Frankreich ^{**)}, Belgien und Luxemburg ist seit einigen Jahren als neuer Lipidsenker das Ciprofibrat (1, Lipanor^R, F) im Handel. 1 ist im Vergleich zu Clofibrat aufgrund von Versuchen mit hyperlipidamischen Ratten etwa 100 mal wirksamer¹⁾. Es senkt bei hyperlipidamischen Patienten sowohl den Serumtriglycerid- als auch den -cholesterolspiegel bereits effektiv in einer Dosis von 100 mg/Tag und erhöhet gleichzeitig den HDL-Spiegel²⁾. Die Einmalgabe pro Tag sichert eine gute Compliance, die erfahrungsgemäß bei Mehrfachdosierung schnell abnimmt³⁾. Das benzyllische C-Atom von 1 ist chiral, im Handel befindet sich das Racemat. Die schwer zugänglichen Enantiomeren sind noch nicht beschrieben worden⁴⁾.

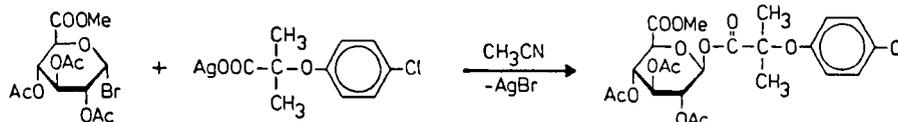


Der bis vor kurzem widersprüchliche Metabolismus von 1 konnte von Oelschläger und Mitarbeitern⁵⁾ durch Versuche mit Referenzsubstanzen an Probanden und freiwilligen Patienten im Rahmen der analytischen Möglichkeiten eindeutig geklärt werden. Im Gegensatz zu älteren Arbeiten⁶⁾ tritt nach oraler Gabe im Plasma nur 1 und in geringer Menge sein Glukuronid auf, das im Gegensatz zu 1 harnfahig ist. Zu einem geringen Teil wird das Glukuronid auch biliar exkretiert⁷⁾, wie Versuche mit freiwilligen Patienten, denen nach Cholezystektomie ein T-drain eingelegt worden ist, er-

geben haben. *In-vitro*-Versuche haben gezeigt, daß 1 durch lysosomale Enzyme der Darmbakterien vermutlich rasch zersetzt wird, während es von *E.coli*-Bakterien mit intakter Zellwand nicht angegriffen wird⁸⁾.

Glukuronide von Arzneistoffen bzw. von deren Metaboliten werden in der Biotransformationsforschung im allgemeinen indirekt charakterisiert, indem man zunächst das nichtglukuronidierte Aglykon extrahiert und dann nach alkalischer/saurer/enzymatischer Spaltung den in Freiheit gesetzten zweiten Anteil Aglykon nachextrahiert. Auf die Möglichkeit, Ether- und Esterglukuronide durch Synthese ihrer hydrophoben Derivate mit scharfen Schmelzpunkten zu charakterisieren, haben wir 1982 erstmals hingewiesen⁹⁾. So gewannen wir das hydrophobe Esterglukuronid der Clofibrinsäure durch Umsetzung des Silbersalzes der Säure mit 1- α -Brom-2,3,4-tri-*O*-acetyl-glucopyranmethyl-uronat.

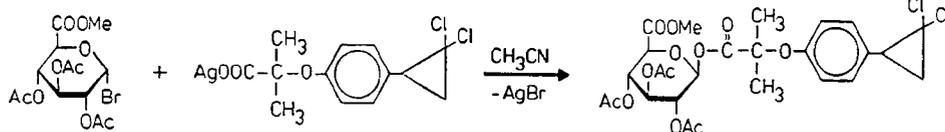
Diese hydrophoben Glukuronide können vorteilhaft als Referenzsubstanzen bei chromatographischen Untersuchungen herangezogen werden. Man geht dabei so vor, daß unbekannte genuine Glukuronide aus sauer gestelltem Harn oder Plasma mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert und durch Umsetzung mit Diazomethan und nachfolgend mit Acetanhydrid/Pyridin in Gegenwart von 4-Dimethylaminopyridin als Katalysator hydrophobisiert werden. Inzwischen konnten wir zahlreiche *O*-Glukuronide, *S*-Glukuronide, auch *N*-Glukuronide von Sulfonamiden auf diesem Weg eindeutig charakterisieren¹⁰⁾. Ferner wurden die Glukuronide nahezu aller Antirheumatika vom Typ der Arylfettsauren so gekennzeichnet¹¹⁾. Die Ausbeuten schwanken zwischen 2-70% und werden stark bestimmt von der Natur des Aglykons.



^{*)} 7. Mitt.: H. Oelschläger, K.-H. Hellwich, D. Rothley und W. Schmidt, *Sci. Pharm.* 57, 367 (1989).

^{*)} Herrn Prof. Frömming mit herzlichen Glückwünschen zum 65. Geburtstag in Verbundenheit gewidmet.

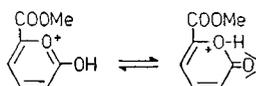
^{***)} Hersteller in Frankreich: Laboratories Winthrop, 91-98 Bal Victor-Hugo, F-92115 Clichy



In vorliegender Untersuchung wurde zur eindeutigen Charakterisierung des Ciprofibrat- O - β -D-glukuronids dessen Hydrophob durch Umsetzung des Ag-Salzes von Ciprofibrat mit 2- α -Brom-2,3,4-tri- O -acetyl-gluco-pyran-methyluronat in CH_3CN im Ultraschallbad angestrebt:

Wir erhielten in guter Ausbeute (64%) das Gemisch der beiden Diastereomeren. Es schmolz zwischen 67 - 78°C , erwies sich in der DC [Kieselgel 60 Plastikfolien (Merck) bzw. HPTLC-Fertigplatten Chir mit Konzentrierungszone (Merck), FM: Toluol + CH_3OH (92.5 + 7.5)] als nicht trennbar und zeigte den hRf -Wert 55 bzw. 30. Die Zuckerkomponente verriet sich durch eine blaue Färbung nach Besprühen mit Naphthoresorcinolphosphorsäurereagenz und Erwärmen im Trockenschrank auf 120°C .

Das MS zeigt M^+ (^{35}Cl) bei m/z 604, das Cl^- zu m/z 569 und zwei Moleküle Essigsäure zu m/z 484 verliert. Alle Intensitäten sind $< 0.5\%$, die Signalgruppen entsprechen den erwarteten Isotopenmustern für Monochlor- bzw. Dichlorverbindungen. Der base peak bei $m/z = 155$ ist dem Fragment der Glukuronsäure



zuzuordnen¹²⁾.

Die Hochauflösung der Multipletts eines 300 MHz - $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums zwischen 1.73 - 1.79 ppm und 1.91 - 1.97 ppm gibt eindeutige Hinweise für das Vorliegen eines Diastereomeren-Gemisches. So treten statt eines Singulets zwei Singulets bei 1.83 und 1.84 ppm auf, die der Acetoxygruppe in 2'-Stellung des Glukuronsäurederivats entsprechen¹³⁾. Die bei 1.56 und 1.57 ppm erkennbaren 2 Singulets müssen den Methylgruppen am quartären C-Atom der Ciprofibratkomponente des hydrophoben Glukuronids zugeordnet werden und sind charakteristisch für die vorliegenden Diastereomeren. Bei 1 und seinem Ethylester tritt dagegen nur ein Singulett bei 1.61 bzw. 1.59 ppm auf¹⁴⁾.

Die Einsatzmöglichkeiten unserer Methode für pharmakokinetische Untersuchungen mit 1 erhielt Abb. 1.

Chromatogramm A weist mit einer Retentionszeit von 15.7 min den Peak des nach der Silbersalzmethode synthetisierten hydrophoben 1-Glukuronids auf. Er entspricht exakt dem Peak des nach Extraktion aus dem Probenharn durch Hydrophobisierung erhaltenen 1-Glukuronids (Chromatogramm B). Eine Trennung in die Diastereomeren trat unter diesen experimentellen Bedingungen nicht ein (C₁₈-Eurospher, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 6 + 4). Chromatogramm C zeigt die HPLC-Analyse des in gleicher Weise behandelten Harnes des Probanden (Ch.K.) vor Einnahme von 1. Erhalten wurde das hydrophobe Glukuronid wie folgt: Dem Probanden wurden 100 mg 1 als Kapsel verabfolgt, ein Aliquot des 24 h -Sammelharns wurde lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 4N-HCl auf $\text{pH } 2$ gebracht und das 1-Glukuronid mit Ethylacetat extrahiert. Der eingeeengte Extrakt wurde in der oben beschriebenen Weise hydrophobisiert.

Eine offene Frage war schließlich noch, ob sich die diastereomeren hydrophoben Glukuronide, die aus 12 h -Sammelharn ge-

wonnen worden waren, an chiralen Säulen trennen lassen. Die Trennung gelang uns bei Einsatz von chiralen aus β -Cyclodextrin bestehenden Säulen (Cyclobond I, Fa. Astec, Whippany, NJ/USA) mit einem Gemisch von CH_3OH und 1proz. Triethylammoniumacetatpuffer (TEAA, $\text{pH } 4.1$) (55 + 45).

Der Vergleich der Chromatogramme A und B (Abb. 2) deutet u.E. auf Selektionsprozesse im Organismus, die z.B. auf einer enantioselektiven Glukuronidierung und/oder enantioselektiven Ausscheidung des 1-Glukuronids beruhen können. Diese Möglichkeiten werden z.Zt. von uns näher untersucht.

Dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt am Main, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Gad Godesberg, danken wir für die Förderung vorstehender Arbeit.

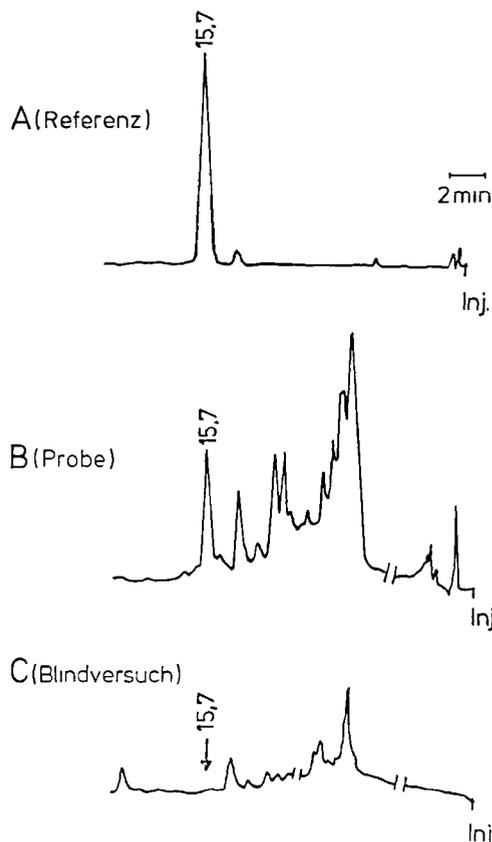


Abb. 1: Identifizierung des 1-Glukuronids über sein hydrophobes Derivat (RP-18 Säule)

Experimenteller Teil

Geräte:

Massenspektrometer: MAT 212 (90 eV), Finnigan MAT.- Kernresonanzspektrometer: AC 300 (300 MHz), Bruker.- IR-Spektrophotometer: 299, Perkin-Elmer.- UV-Spektrophotometer: DU-70, Beckman.- HPLC: Hochdruckpumpe Model 590 bzw. Model 6000 A, Waters; Detektor UV/VIS Filterphotometer, Knauer; Rheodyne Injektor, $20\ \mu\text{l}$ -Probenschleife.

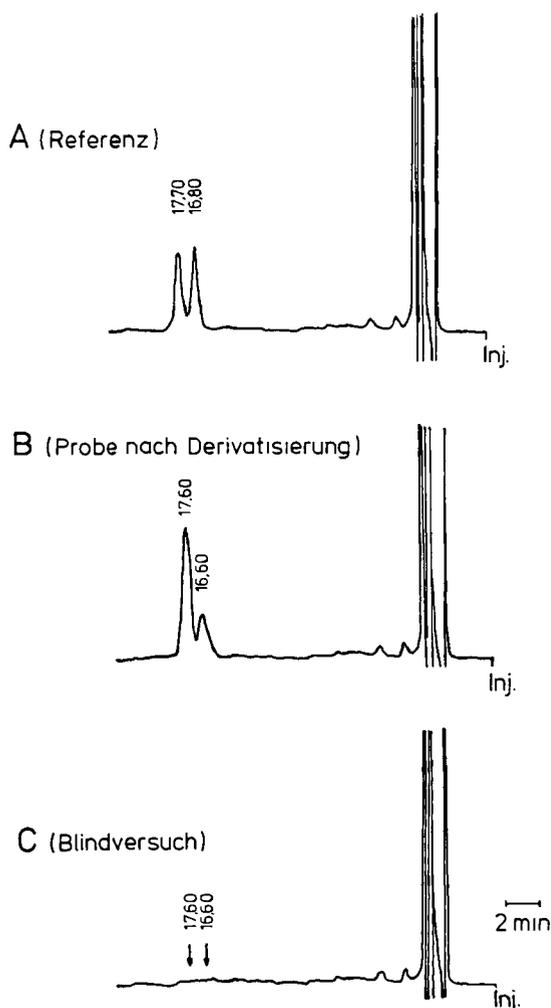


Abb. 2: Trennung der hydrophoben 1-Glukuronid-Diastereomeren (Cyclobond I-Säule)

1. Synthese der Referenzsubstanz Methyl(1'-O-2-(4-(2,2-Dichlorcyclopropyl)-phenoxy)-2-methylpropionyl-2',3',4'-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranuronat) als Diastereomerenmischung

6-Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-derivate der diastereomeren Esterglukuronide von Ciprofibrat (1)

2.76 g (6.97 mMol) Ciprofibratsilbersalz, dargestellt nach Wulff und Schröder¹⁵⁾, wurden in 35 ml destilliertem trockenem CH₃CN gelöst und dieser Lösung 1.81 g (4.56 mMol) Methyl-(2,3,4-Tri-O-acetyl-1α-brom-D-glucopyranuronat), synthetisiert nach Bollenback et al.¹⁶⁾, in 9 ml CH₃CN unter Licht- und Feuchtigkeitsschluss zugesetzt. Der Ansatz wurde über 44 h im Ultraschallbad in Suspension gehalten, bis die Umsetzung abgeschlossen war (DC-Kontrolle, FM Toluol/MeOH 92.5 + 7.5). Dann filtrierte man die ausgefallenen Silbersalze ab, wusch mit 40 ml destilliertem Dichlormethan nach und zog das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (RV) (< 50°C) ab. Der Rückstand wurde in 33 ml trockenem Chloroform und 5.3 g Collidin aufgenommen und 2 h auf 60° erhitzt. Nach Erkalten filtrierte man die Lösung und wusch sie 4 mal mit 20 ml N-HCl und einmal mit Wasser. Die org. Phase wurde nach Trocknen über Na₂SO₄ am RV abgezogen (< 40°) und der resultierende gelbliche Sirup aus Ethanol kristallisiert. Ausb. 1.75 g (63%) farbloser Kristalle vom Schmelzbereich 67-78 °C.

DC Kieselgel 60 F₂₅₄, FM Toluol/CH₃OH 92.5 + 7.5: hRf 55;
DC Kieselgel 60 F₂₅₄, FM Toluol/Aceton 100 + 4: hRf 16;
DC Kieselgel 60 F₂₅₄, FM Toluol/Ethylacetat 100 + 10: hRf 17;
DC CHIR, FM Toluol/Ethylacetat 100 + 10: hRf 30.

EI-MS (90 eV), m/z (% rel. Intens. ³⁵Cl) = 604 (0.4; M⁺), 569 (0.3; M - Cl)⁺, 484 (0.1; M - 2 HAc)⁺, 317 (32; M - Ciprofibrat)⁺, 257 (70)⁺, 243 (58)⁺, 215 (38)⁺, 201 (40)⁺, 197 (42)⁺, 167 (79)⁺, 155 (100)⁺, 127 (64)⁺. Es wurden nur Fragmente mit m/z > 120 angegeben.

* Glukuronsäurekomponente ** Ciprofibratkomponente

¹H-NMR (300 MHz, TMSi, δ, ppm): 1.56 und 1.57 (s, 6H; 2 CH₃, C-2); 1.73-1.79 (m, 1H; CH₂-CCl₂); 1.83 und 1.84 (s, 3H; AcO, C-2'); 1.91-1.97 (m, 1H; CH₂-CCl₂); 2.01 (s, 3H; AcO); 2.04 (s, 3H; AcO); 2.78-2.84 (m, 1H; CH-CCl₂); 3.75 (s, 3H; COOMe); 4.20 (d, 1H; J_{4',5'} = 9.5 Hz, H-5'); 5.15-5.35 (m, 3H; H-2' - H-4'); 5.79 (d, 1H; J_{1',2'} = 8 Hz, H-1'); 6.81-6.86 (m, 2H; arom.); 7.09-7.12 (m, 2H; arom.).- UV (CH₃CN): λ max = 231 nm (ε = 7857); 274 nm (ε = 497).- IR (KBr, cm⁻¹): 3500 (w; C=O); 3010 (w; C-H Aromat); 2965 (w; CH₃); 2865 (w; CH₃); 1760 (s; C=O); 1615 (m; C=C); 1585 (w; C=C); 1515 (s; C=C); 1445 (m; -CH₃); 1375 (s; CO-CH₃); 1250-1225 (s; CO-O, O-Ar); 1175 (s); 1080 (s; O-C); 1040 (s; O-C); 980 (m); 900 (m); 840 (m); 810 (m); 795 (w); 735 (w); 715 (w); 695 (w); 650 cm⁻¹ (w).

2. Untersuchung von Probandenharn auf Ciprofibratglukuronid

2.1 Nachweis des Glukuronids

100 ml 24 h-Sammelharn eines Probanden, der 100 mg Ciprofibrat als Kapsel eingenommen hatte, wurden gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde mit 4 N-HCl auf pH 2 angesäuert und mit 40 ml frisch destilliertem Ethylacetat extrahiert. Die org. Phase befreite man nach dem Trocknen und Filtrieren am RV (< 40°C) vom Solvens und versetzte den Rückstand mit 10 ml einer frisch hergestellten, ca. 0.5 proz. etherischen Diazomethanlösung (Diazald-Kit[®], Fa. Aldrich, Steinheim). Nach 15 min wurde der Ether unter N₂ abgeblasen und dem Rückstand eine Mischung aus je 2 ml Acetanhydrid p.a. und Pyridin p.a. und 40 mg 4-Dimethylaminopyridin zugefügt. Nach 6 h bei 20°C fügte man zu dem Ansatz 10 ml Wasser und extrahierte über RP-18 Kartuschen (Baker SPE-10). Nach Waschen mit 0.01 N-HCl und einer Mischung aus MeOH und 0.01 N-HCl (1 + 9) wurde mit 2 ml MeOH eluiert.

Das Solvens wurde unter N₂ vertrieben, der Rückstand in 10 ml 0.1 N-HCl aufgenommen und mit 15 ml n-Hexan extrahiert. Nach erneutem Vertreiben des Lösungsmittels nahm man den Rückstand in 2 ml CH₃CN auf. 20 µl wurden zur HPLC eingesetzt.- HPLC-Parameter: Eluens CH₃CN + H₂O (6 + 4) isokratisch, Flußrate: 1 ml/min, Temp. 20°C, RP-18 Säule 250 x 4 mm, 5 µ, Detektion: UV 220 nm.

2.2 Nachweis der diastereomeren Ciprofibratglukuronide

20 ml 12 h-Sammelharn eines Probanden (Einzeldosis 100 mg 1) wurden mit 4 N-HCl auf pH 2 angesäuert und über RP-18-Kartuschen (Baker, Groß-Gerau, 500 mg) extrahiert. Es wurde mit 0.1 proz. HCl gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml MeOH, das abgeblasen wurde. Weitere Derivatisierung bzw. Aufarbeitung analog 2.1. Der eingedampfte n-Hexanextrakt wurde in 1 ml MeOH + TEAA 1% (pH 4.1) (75 + 25) aufgenommen; 20 µl wurden zur HPLC eingesetzt. HPLC-Parameter: Eluens MeOH + TEAA 1% (pH 4.1) (55 + 45) isokratisch, Flußrate 1 ml/min, Temp. 20°C, Cyclobond I-Säule 250 x 4 mm, 5 µ, Detektion: UV 220 nm.- HPLC-Trennung der Diastereomeren (Cyclobond I-Säule): Kapazitätsfaktoren k'₂ = 5.77, k'₁ = 5.38; Auflösung R = 1.33, Rel. Retention α = 1.07.

Literatur

- 1 A. Arnold, J.P. McAuliff und A.L. Beyler, J. Pharm. Sci. 68, 1557 (1979).
- 2 J. Rouffy, B. Chanu, R. Bakir, F. Djian und J. Goy-Loeper. Atherosclerosis 54, 273 (1985); Mitt. des Herstellers.
- 3 E.A. Swinyard in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eds. Goodman und Gilman, 7. Aufl., S. 1661, Macmillan Publishing Company New York, Toronto, London 1985.

- 4 Mitt. des Herstellers.
- 5 H. Oelschläger, D. Rothley und W. Schmidt, Arch. Pharm. (Weinheim) 321, 367 (1988). H. Oelschläger, H.-J. Peters und Th. Stanek, Arch. Pharm. (Weinheim) 321, 953 (1988). H. Oelschläger, D. Rothley, K.-H. Hellwich und W. Schmidt, Arch. Pharm. (Weinheim) 322, 337 (1989). H. Oelschläger, D. Rothley, K.-H. Hellwich und W. Schmidt, Arch. Pharm. (Weinheim) 322, 629 (1989). H. Oelschläger, K.-H. Hellwich, D. Rothley und W. Schmidt, Sci. Pharm. 57, 367 (1989).
- 6 K.-H. Beyer und H. Städter, Arch. Pharm. (Weinheim) 315, 1049 (1982); Dissertation H. Städter, Freie Universität Berlin 1983.
- 7 H. Oelschläger, D. Rothley, D. Schröder und W. Schmidt, Arch. Pharm. (Weinheim), im Druck.
- 8 unveröffentlichte Versuche.
- 9 D. Rothley und H. Oelschläger, Arch. Pharm. (Weinheim) 315, 457 (1982).
- 10 Dissertation Chr. Kohl (in Vorbereitung) Universität Frankfurt a.M., auszugsweise vorgetragen auf der Frühjahrstagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Regensburg am 10. März 1990, Pharm. Unserer Zeit 19, 117 (1990).
- 11 unveröffentlichte Versuche.
- 12 G.D. Paulson, R.G. Zaylskie und M.M. Dockter, Anal. Chem. 45, 21 (1973).
- 13 N. Pravdic und D. Keglevic, Carbohydr. Res. 12, 193 (1970).
- 14 K.-H. Hellwich, Diplom-Arbeit, Universität Frankfurt a.M. 1989.
- 15 G. Wulff und U. Schröder, Chem. Ber. 113, 2760 (1980).
- 16 G.N. Bollenback, J.W. Long, D.G. Benjamin und J.A. Lindquist, J. Am. Chem. Soc. 77, 3310 (1955). [Ph827]