

Arch. Pharm. (Weinheim) 315, 457-462 (1982)

Eindeutige Bestimmung von Glucuroniden, speziell des Clofibrinsäure- β -glucuronids**)

Dietrich Rothley und Herbert Oelschläger*

Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Georg-Voigt-Str. 14, D-6000 Frankfurt am Main
Eingegangen am 22. Juni 1981

Aus biologischem Material extrahierte Ester- und Etherglucuronide lassen sich durch Methylieren und Acetylieren in die korrespondierenden hydrophoben 2,3,4-Tri-O-acetyl- β -D-glucopyran-methyl-uronate überführen, die durch HPLC und ggf. GC gegen leicht herstellbare Referenzsubstanzen identifiziert werden können (Beispiele: Clofibrinsäure und 4-Chlorphenol).

Unequivocal Determination of Glucuronides, in particular of Clofibrin β -Glucuronide

Ester and ether glucuronides isolated from biological material can be transformed by methylation and acetylation into the hydrophobic methyl 2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranuronates. These derivatives are detectable by HPLC or GLC with the aid of easily available reference substances (examples: clofibrin acid and 4-chlorophenol).

Unter den verschiedenen Phase II-Reaktionen des Arzneistoffmetabolismus dominiert bei Säugetieren und beim Menschen die Glucuronidbildung. Aktivierte Glucuronsäure (Uridin-5'-diphospho- α -D-glucuronsäure) reagiert in Gegenwart einer Glucuronyltransferase mit Säuren zu Ester- und mit Alkoholen, Phenolen oder Thiolen zu Ether-glucuroniden. Außerdem sind seltener N- und C-Glucuronide beobachtet worden. Die schwierige quantitative Erfassung der hydrophilen Glucuronide basiert bisher ganz überwiegend auf einem indirekten Verfahren, in dem sie entweder mit Säure oder Lauge hydrolysiert oder mit β -Glucuronidase enzymatisch gespalten werden und das extrahierte hydrophobe Aglucon mit empfindlichen analytischen Methoden, z.B. Densitometrie, GC, HPLC oder Fluoreszenzspektroskopie bestimmt wird. Außerdem sind Glucuronide über extrahierbare Komplexe¹⁾, z.B. mit Ionenaustauschern wie Methyltricaprylammoniumchlorid, der Bestimmung zugänglich gemacht worden.

Die Notwendigkeit einer exakten Bestimmung der Glucuronide stellt sich auch im Bereich der Arterioskleroseforschung und -therapie, da hier in erheblichem Umfang Lipidsenker (z.B. Clofibrat, Etofibrat, Nicofibrat, Simfibrat) eingesetzt werden, die Clofibrinsäureglucuronide bilden. Nach Angaben zahlreicher Forscher wird die z.B. aus Clofibrat durch Biohydrolyse entstandene Clofibrinsäure ganz überwiegend renal ausgeschieden. Ungefähr 60 % der im Harn nach Clofibratgabe auftretenden Clofibrinsäure sind konjugiert, vornehmlich als β -Glucuronid²⁾. Vermutlich ist aber der konjugierte Anteil wesentlich höher³⁾. Überraschenderweise wird von einzelnen Autoren in der

***) Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. K.E. Schulte, Münster, anlässlich seines 70. Geburtstages in Verbundenheit gewidmet.

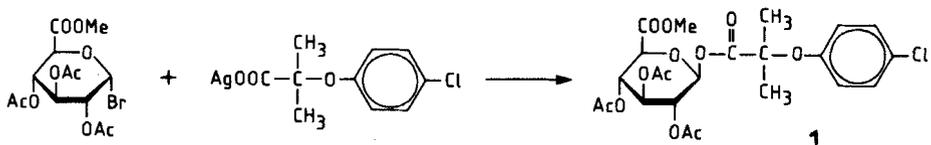
jüngsten Zeit behauptet, daß es außer dem mit β -Glucuronidase spaltbaren Esterglucuronid der Clofibrinsäure auch β -Glucuronidase-stabile Glucuronide geben soll. *Hignite* und Mitarbeiter⁴⁾ postulieren z.B., daß nach Einnahme von Clofibrat im Harn von Versuchspersonen das Glucuronid der Clofibrinsäure in vier isomeren Formen: β -Pyranose, α -Pyranose, β -Furanose und α -Furanose vorkommen soll, können aber die Bildung von Artefakten nicht ausschließen. Von diesen sollen die α -Anomere schlechte Substrate der β -Glucuronidase sein. Der Nachweis der Isomere erfolgte nach Silylierung bei 70° gc und durch MS.

Caldwell und *Sinclair*⁵⁾ vertreten aufgrund von in vitro-Versuchen die Auffassung, daß das Esterglucuronid der Clofibrinsäure unter physiologischen Bedingungen der Acylwanderung unterliegen kann, wodurch mindestens 3 weitere isomere Acylglucuronide resultieren sollen, von denen die C-2-, C-3- und C-4-Acylglucuronide keine Substrate der β -Glucuronidase seien. Gegen die analytische Technik und die Konsequenzen dieser Befunde für die Biotransformationsforschung hegen wir gewichtige Bedenken und haben daher die aufgeworfene Frage isomerer Formen von Glucuroniden im Zuge unserer Untersuchungen über die Biotransformation von Lipidsenkern, speziell Etofibrat⁶⁾, zu lösen versucht. Für eine solche analytische Studie ist das Vorliegen von „samples“ der postulierten Substanzen für die Beweisführung von entscheidender Bedeutung. Die beiden zitierten Forschergruppen haben auf diese Voraussetzung verzichtet.

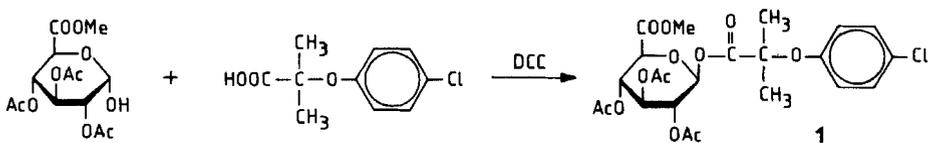
Die Synthese des Esterglucuronids der Clofibrinsäure ist bisher nicht beschrieben worden. In Anlehnung an die von verschiedenen Autoren⁷⁾ gegebene Darstellung von Esterglucuroniden sind wir die vielstufige Synthese des Esterglucuronids der Clofibrinsäure, ausgehend vom Methyl- β -D-glucopyranosid angegangen, haben sie dann aber wegen der verlustreichen Reinigungsschritte abgebrochen. Die sich anbietende Isolierung des Esterglucuronids aus Probandenharn stieß aus den gleichen Gründen ebenfalls auf große Schwierigkeiten.

Daher unternahmen wir den Versuch, statt des hydrophilen Esterglucuronids sein hydrophobes Derivat **1** darzustellen, das in der Carboxylfunktion durch Methylierung mit Diazomethan und in den 3 sekundären Alkoholgruppen (2, 3, 4) durch Acetylierung verschlossen ist. Dies gelang auf den Wegen A und B (s. Schema 1).

Weg A :



Weg B :



Schema 1: Darstellung des hydrophoben Glucuronids **1**

Als Nebenprodukt entsteht auf Weg A der Orthoester, der sich durch Erwärmen in Chloroform in Gegenwart von 2,6-Lutidin ebenfalls in das gewünschte Endprodukt überführen läßt⁸⁾. Die Struktur von **1** wurde durch Massen- (s. Abb. 1) und NMR-Spektrum bewiesen.

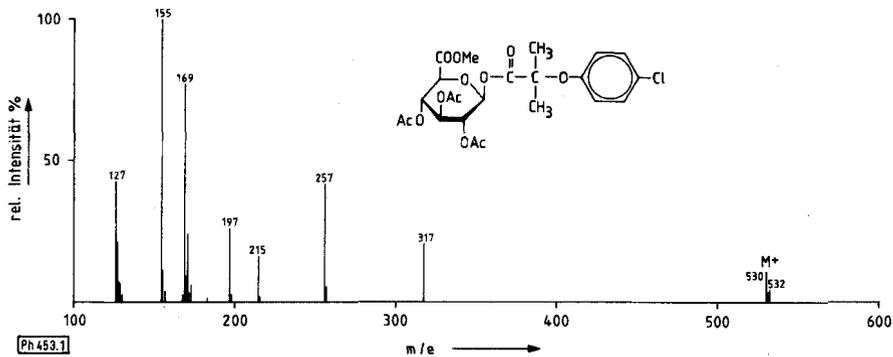


Abb. 1: Massenspektrum von **1**

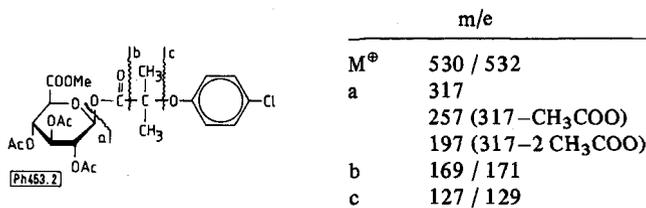
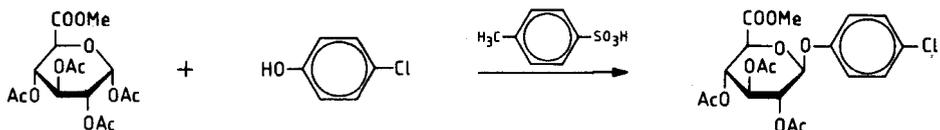


Abb. 2: Zerfall von **1**

Außerdem synthetisierten wir das in gleicher Weise geschützte Derivat **2** des 4-Chlorphenols gemäß Schema 2. 4-Chlorphenol soll bei der Metabolisierung des Lipidsenkers Clofibril bei verschiedenen Species (Ratten, Hunden, Affen) aus dem Primärmetaboliten Clofibrinsäure entstehen⁹⁾.



Schema 2: Darstellung des hydrophoben Glucuronids **2**

Während **2** (Schmp. 152°) bei Raumtemperatur stabil ist, erwies sich **1** (Schmp. 125°) bei 20° nur als bedingt haltbar. Bei -18° kann es dagegen mehrere Monate ohne Degradation aufbewahrt werden.

Die in den Schemata 1 und 2 aufgezeigten Syntheseschritte sind in bezug auf die Acyl- bzw. Hydroxylkomponente verallgemeinerungsfähig und eröffnen damit dem Bioanalytiker die Möglichkeit, sich in zwei- bis dreitägiger Arbeit die jeweils gewünschte Referenzsubstanz für pharmakokinetische Untersuchungen herzustellen.

Als Probe aufs Exempel haben wir aus Harnproben von 3 Probanden, die Etofibrat^{*)} in therapeutischen Dosen erhalten hatten, das Glucuronid der Clofibrinsäure mit Ethylacetat extrahiert, dieses bei Raumtemperatur isoliert und bei 20° durch Methylieren und Acetylieren in das geschützte Uronat **1** umgewandelt, das mit der durch Synthese gewonnenen Referenzsubstanz identisch war. Der gc Vergleich erfordert ein absolut säurefreies **1**, da sonst Degradationen eintreten¹⁰⁾. Von besonderem Gewicht im Hinblick auf die Isomerieproblematik bei Glucuroniden dürfte unser Befund sein, daß wir im Harn der Probanden nach Applikation von Etofibrat und Derivatisierung gc nur **1**, also das β -Glucuronid der Clofibrinsäure, ermittelt haben. Dieser Befund wurde erhärtet durch HPLC-Untersuchungen des derivatisierten Harnextraktes, die ebenfalls eindeutig lediglich das Vorliegen von **1** ergaben (s. Abb. 3). Für isomere Glucuronide zeigte sich kein Hinweis.

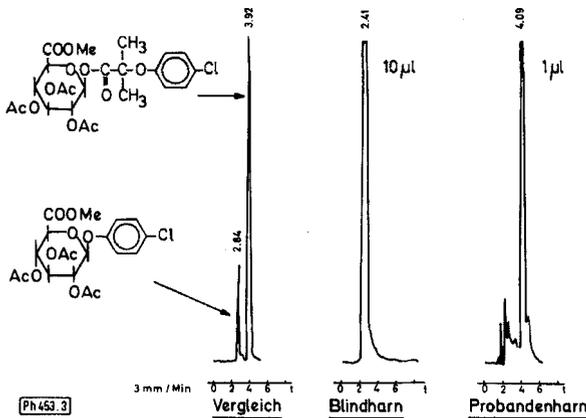


Abb. 3: HPLC-Untersuchung von Probandenharn

Wir sind daher überzeugt, daß die eingangs zitierten Autoren wahrscheinlich experimentellen Irrtümern erlegen sind und daß in vivo Clofibrinsäure nur das „traditionelle β -Glucuronid“ bildet. Zu diesem Ergebnis waren auch *Caldwell* und *Emudianughe*¹¹⁾ vor kurzem gekommen. Zu den Widersprüchen trägt sicher die Tatsache bei, daß nach unseren Beobachtungen Esterglucuronide als Halbacetalester aufgrund geringerer Substratspezifität durch β -Glucuronidasepräparationen in vielen Fällen schwerer spaltbar als Etherglucuronide (Vollacetale) sind. Außerdem treten Artefakte bei der Aufarbeitung von Glucuroniden auf.

Wir konnten schließlich auch die Bildung eines 4-Chlorphenylglucuronids bei Probanden nach Gabe von Etofibrat erneut eindeutig ausschließen¹⁰⁾. Die Beweisführung erfolgte in der gleichen Weise, nämlich durch Derivatisierung des Harnextraktes von Patienten, die Etofibrat eingenommen hatten. Wir fanden nur **1** aber kein **2** (vgl. Abb. 3).

Wir glauben, daß die von uns aufgezeigten Wege zur Darstellung hydrophober Glucuronidderivate als Referenzsubstanzen bzw. aus biologischem Material, die auf bewährten Reaktionen der Kohlenhydratchemie beruhen, auch für die Auffindung und

*) Hersteller: Merz & Co., Frankfurt a.M., Warenzeichen: Lipo-Merz[®] und Lipo-Merz[®] retard

die angestrebte quantitative Bestimmung durch HPLC und/oder GC von Glucuroniden anderer Arzneistoffe und deren Metaboliten brauchbar sind.

Entsprechende Versuche sind in unserem Laboratorium angelaufen. Sie reizen vor allem wegen der Spezifität (durch in vitro hergestellte Referenzsubstanzen), der hohen Selektivität und großen Empfindlichkeit, die wenigstens um eine Zehnerpotenz größer ist als die direkte Bestimmung durch HPLC ohne Extraktion und Derivatisierung¹²⁾.

Dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt a.M., und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, danken wir für die Förderung vorstehender Arbeit und Frau K. Schesmer für umsichtige Mitarbeit.

Experimenteller Teil

1. Darstellung der Referenzsubstanzen

1.1. 1-O-2-(4-chlorphenoxy)-2-methyl-propionyl-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyran-methyl-uronat (1)

(6-Methyl-2,3,4-tri-acetylderivat des Esterglucuronids der Clofibrinsäure)

1.1.1. via 1 α -Bromderivat

2,0 g (5,3 mmol) 1- α -Brom-2,3,4-tri-O-acetyl-glucopyran methyl-uronat, synthetisiert nach *Bollenback et al.*¹³⁾, werden in 10 ml trockenem CH₃CN gelöst und zu einer Lösung von 2,6 g (8,1 mmol) Clofibrinsäuresilbersalz, dargestellt nach *Wulff und Schröder*⁸⁾, in 20 ml trockenem CH₃CN gegeben. Das Gemisch wird 12 h bei Raumtemp. unter Lichtschutz belassen, dann vom ausgeschiedenen AgBr abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (RV) abgezogen. Der Rückstand wird in 25 ml Chloroform gelöst, das 4,0 g Collidin enthält. Diese Lösung wird 2 h auf 60° erwärmt, nach dem Abkühlen mit 1N-HCl ausgeschüttelt, die Chloroformphase über frisch geglühtem Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am RV abdestilliert. Der Rückstand wird aus absol. Ethanol umkristallisiert: farblose Blättchen vom Schmp. 125°. Ausb. 2,0 g (71 % d.Th.). M⁺ = m/e 530/532.

1.1.2. via 1 α -Hydroxyderivat

2,3,4-Tri-O-acetyl- β -D-glucopyran-methyl-uronat wird nach der „Standardmethode“¹⁴⁾ von *Pravdič und Keglevičin* CH₂Cl₂ mit Clofibrinsäure in Gegenwart von DCC umgesetzt. Die Verbindung ist identisch mit der gemäß 1.1.1. erhaltenen: Schmp. 125°. (Ausb. ca. 75 % d.Th.).

1.2. 1-O-(4-Chlorphenyl)-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyran-methyl-uronat (2)

(6-Methyl-2,3,4-triacetylderivat des Etherglucuronids des 4-Chlorphenols.)

Die Darstellung erfolgt nach *Bollenback et al.*¹³⁾ durch Verschmelzen von 1,2,3,4-Tetraacetyl- β -D-glucopyran-methyl-uronat mit 4-Chlorphenol in Gegenwart von etwas p-Toluolsulfonsäuremonohydrat. Farblose Nadeln vom Schmp. 152° (Isopropanol), Lit.¹³⁾: Schmp. 152–154°. Das NMR- und MS-Spektrum korrespondieren mit der Struktur.

2. Untersuchung von Probandenharn auf Clofibrinsäureglucuronid und 4-Chlorphenolglucuronid

50 ml Sammelharn eines Probanden, der an drei aufeinanderfolgenden Tagen je drei Kapseln zu 300 mg Etofibrat eingenommen hatte, bzw. 50 ml Blindharn werden mit 4 N-HCl auf pH 2 angesäuert

und mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird am RV bei 40° vom Solvens befreit und mit 5 ml einer frisch hergestellten ca. 5proz. etherischen Diazomethanlösung versetzt. Nach 15 min wird der Ether am RV abgezogen und der Rückstand mit einer Mischung aus 1 ml Acetanhydrid und 1 ml Pyridin versetzt. Nach Zufügen von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin wird der Ansatz 6 h bei Raumtemp. im Dunkeln aufbewahrt, dann mit 5 ml Wasser versetzt und mit 5 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherphase wird mit 0,1 ml 4 N-HCl und Wasser gewaschen und sofort im Spitzgläschen im Wasserbad eingengt. Kurz vor dem Verschwinden der Etherphase wird das ausgeschiedene Wasser mit einer Pasteurpipette entfernt und anschließend der Rest des Ethers abgeblasen. Der Rückstand wird mit 1 ml Methanol aufgenommen und bei 0° aufbewahrt. 1–10 µl werden zur HPLC eingesetzt.

HPLC: Flüssigchromatograph: Hewlett Packard 1084 B; Trennsäule RP-18 (Knauer 25 cm-Lichrisorb^R 10 µm), Ø 4,8 mm; mobile Phase: CH₃OH/H₂O 65/35; Temp. 22°; Durchfluß: 2 ml/min; Detektion: UV 225 nm; Ergebnis: vgl. Abb. 3.

Literatur

- 1 J. Tomasic in Drug Fate Metabolism, Vol. 2, S. 295, Marcel Dekker, New York 1978.
- 2 G. Houin et al., J. Clin. Pharmacol. 8, 433 (1975).
- 3 unveröffentlichte eigene Ergebnisse
- 4 C.E. Hignite et al., Life Sci. 28, 2077 (1981).
- 5 J. Caldwell und K.A. Sinclair, Privatmitteilung.
- 6 M. Kummer, W. Schatton, H. Linde und H. Oelschläger, Pharm. Ztg. 124, 1312 (1979); H. Oelschläger, D. Rothley, M. Ewert und P. Nachev, Arzneim. Forsch. 30, 984 (1980); D. Rothley und H. Oelschläger, Pharm. Ztg. 126, 939 (1981).
- 7 N. Pravdić und D. Keglević, Tetrahedron 21, 1897 (1965); D. Keglević und D. Ljevaković, Carbohydr. Res. 64, 319 (1978).
- 8 G. Wulff und U. Schröder, Chem. Ber. 113, 2760 (1980).
- 9 G.P. Loiseau et al., J. Pharm. Pharmacol. 32, 483 (1980).
- 10 D. Rothley und H. Oelschläger, Pharm. Ztg. 126, 939 (1981).
- 11 J. Caldwell und T.S. Emudianughe, Biochem. Soc. Trans. 7, 521 (1979).
- 12 J.R. Veenendaal und P.J. Meffin, J. Chromatogr. 223, 147 (1981).
- 13 G.N. Bollenback et al., J. Am. Chem. Soc. 77, 3310 (1955).

[Ph 453]