

Identifizierung von *in vitro* Phase-I-Metaboliten des phenolischen Benzotriazols UV-327 mit humanen Lebermikrosomen und LC-MS/MS

C. Fischer¹, E. Leibold², T. Göen¹

¹Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, ²BASF SE Ludwigshafen

Einleitung

2-(5-Chloro-benzotriazol-2-yl)-4,6-di-(*tert*-butyl)phenol (UV-327)

- Findet Anwendung als UV-Stabilisator in Kunststoffen
- Wurde bereits in diversen Umweltmatrizes detektiert
- Zur Toxizität liegen nur Basisdaten aus Tierversuchen vor
- Zum Metabolismus der Substanz gibt es bislang keine Daten

Deshalb wurden *in vitro* Versuche mit humanen Lebermikrosomen (HLM) zur Identifizierung von Phase-I-Metaboliten durchgeführt.

Methoden

UV-327 wurde mit HLM und einem NADPH-generierenden System bei 37°C für sechs Stunden inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels abgebrochen.

Die Extrakte wurden mittels LC-ESI-MS/MS (*liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) analysiert. Hierfür wurden, basierend auf der Fragmentierung von UV-327, mögliche Fragmentierungsmuster der Metaboliten vorhergesagt.

Ergebnisse

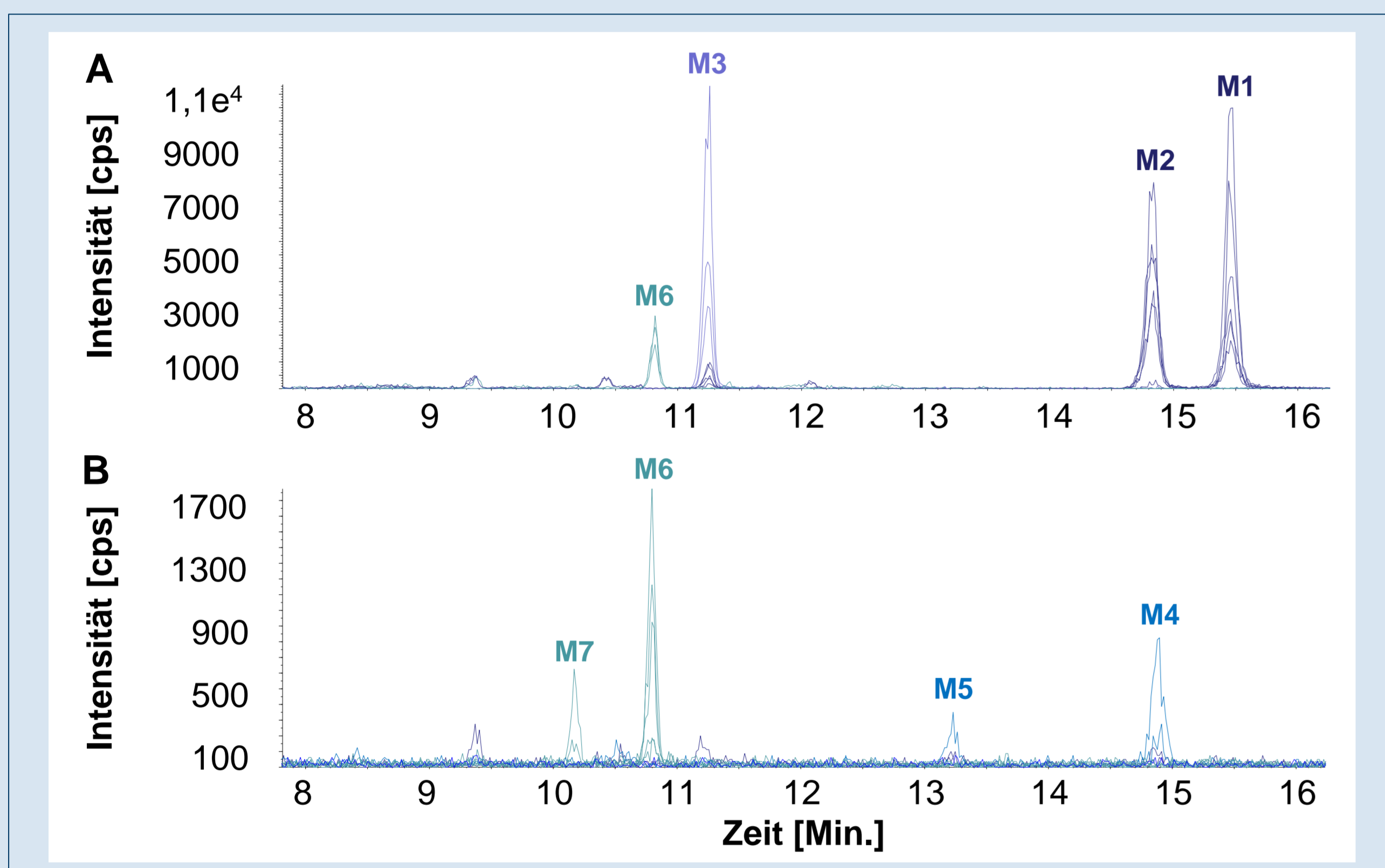


Abb. 1: Verifizierung der postulierten Metaboliten mittels Referenzsubstanzen im Positiv- (A) und Negativmodus (B).

Folgende Metaboliten wurden postuliert: Zwei monohydroxylierte (*mOH*), zwei monocarboxylierte (*mcx*) und zwei kombinierte Metaboliten (*mOH-mcx*), ebenso wie ein dihydroxylierter Metabolit (*diOH*). Die Bildung der Metaboliten wurde mit Hilfe von Referenzsubstanzen bestätigt (Abb. 1):

- UV-327-4-*mOH* (M1) + UV-327-6-*mOH* (M2)
- UV-327-4+6-*diOH* (M3)
- UV-327-4-*mcx* (M4) + UV-327-6-*mcx* (M5)
- UV-327-4-*mcx*-6-*mOH* (M6) + UV-327-4-*mOH*-6-*mcx* (M7)

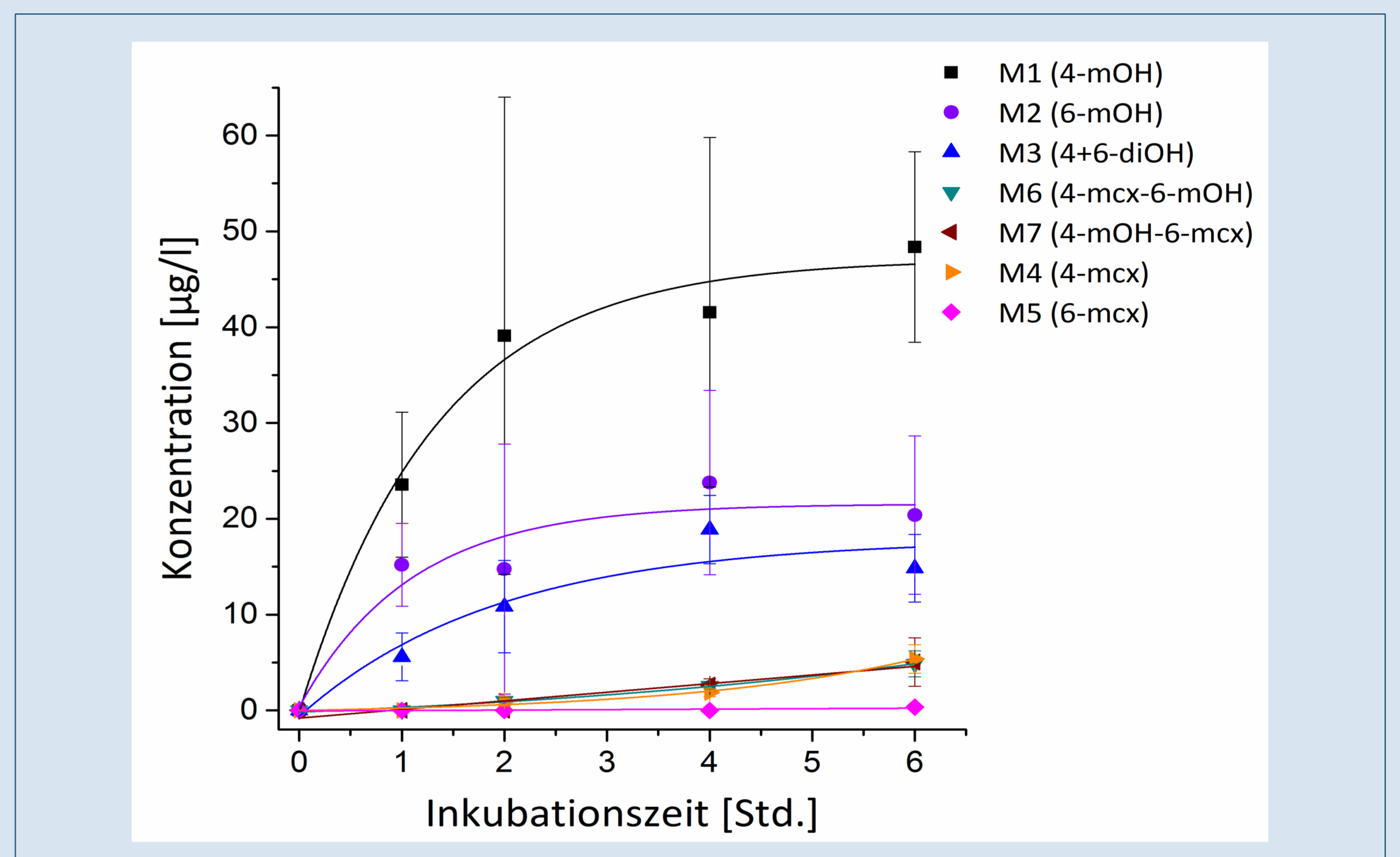


Abb. 2: Bildung der Metaboliten über eine Inkubationsdauer von bis zu sechs Stunden.

Über eine Inkubationsdauer von bis zu sechs Stunden konnten alle Metaboliten detektiert werden (Abb. 2):

- UV-327-4-*mOH* (M1) trat als dominierender Metabolit auf, gefolgt von UV-327-6-*mOH* (M2) und UV-327-4+6-*diOH* (M3)
- Die drei hydroxylierten Metaboliten (M1-M3) lagen bereits nach einer Stunde in hohen Konzentrationen vor
- Die Bildung der höher oxidierten Biotransformationsprodukte M4-M7 fand verzögert (nach 2 – 6 Stunden) statt

Schlussfolgerungen

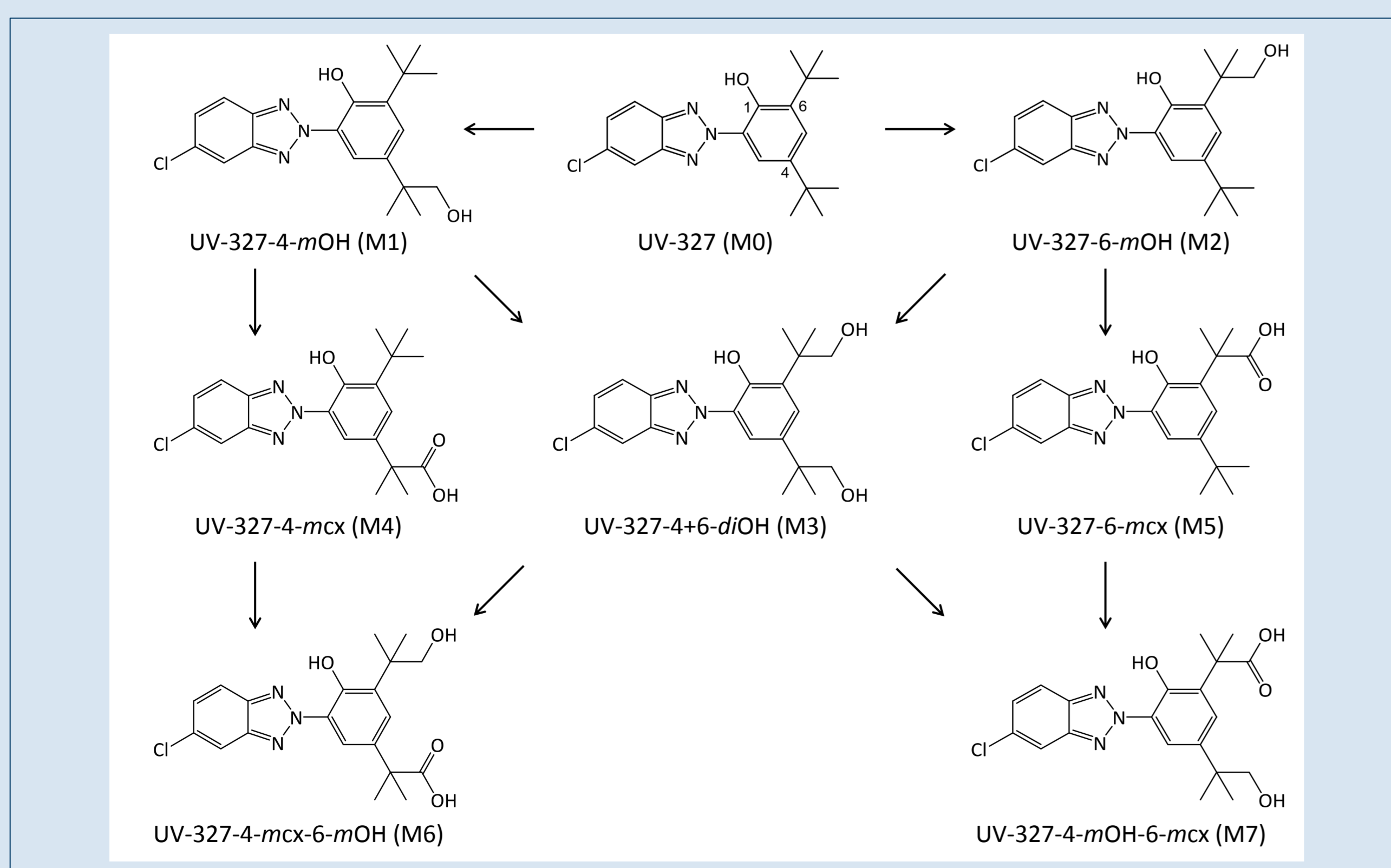


Abb. 3: Postulierter Phase-I-Stoffwechselweg von UV-327. Die Phase-I-Metaboliten tragen Hydroxy- und Carboxygruppen an den *tert*-Butyl Seitenästen.

Es wurden insgesamt sieben oxidative Phase-I-Metaboliten von UV-327 identifiziert, die sowohl Hydroxy- als auch Carboxygruppen tragen.

Mono- und dihydroxylierte Metaboliten wurden in deutlich höheren Konzentrationen gebildet als die höher oxidierten carboxylierten Stoffwechselprodukte. Auf Basis dieser Daten wurde der *in vitro* Phase-I-Stoffwechselweg von UV-327 postuliert (Abb. 3).

Die identifizierten Metaboliten werden im weiteren Verlauf als spezifische Biomarker in die Entwicklung analytischer Methoden zum Human-Biomonitoring von UV-327 in Urin und Blut aufgenommen und die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten zur Aufklärung der *in vivo* Biotransformation von UV-327 genutzt.