

Untersuchungen zum Metabolismus von Guaifenesin mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie

G. Kauert, L. v. Meyer und G. Drasch

Institut für Rechtsmedizin der Universität München,
Frauenlobstrasse 7a, D-8000 München 2, Federal Republic of Germany

Investigations of Guaifenesine Metabolism with Gas Chromatography – Mass Spectrometry

Abstract. Recently the authors reported about toxicological investigations after uptake of guaiacol glyceryl ether containing drugs. There had been detected two intensive pink spots on the TLC from urine samples after detection with Marquis-reagent. It is reported about the identification of *Catechol glyceryl ether* and *Hydroxyguaifenesine* via Gas Chromatography Mass Spectrometry.

Until today only the oxidation of guaiacol glyceryl ether to β -(2-methoxyphenoxy)lactic acid is described. The demethylation of G. is performed by O-Demethylase localized in liver microsomes. This enzyme seems to be the main enzyme for the metabolism of G.

It is pointed out to a pharmacologically interesting relationship between the chemical structure of guaiacol glyceryl ether and codeine.

Key words: Guaifenesine metabolism – Gas chromatography mass spectrometry – O-Desmethylguaifenesine – Hydroxyguaifenesine.

Zusammenfassung. Kürzlich berichteten die Autoren über toxikologische Untersuchungen nach Aufnahme Guaifenesin-haltiger Arzneimittel. Dabei waren bei der Dünnschichtchromatographie von hydrolysierten Urinproben nach Detektion mit Marquis-Reagenz zwei intensiv violette Flecken aufgefallen. Es wird über den Gang der Identifizierung von *O-Desmethylguaifenesin* und *Hydroxyguaifenesin* mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie berichtet. Über den Metabolismus von Guaifenesin beim Menschen wurde bisher nur die Oxidation zu β -(2-Methoxyphenoxy)milchsäure mitgeteilt. Die Demethylierung von Guaifenesin wird durch die in den Lebermikrosomen enthaltene O-Demethylase durchgeführt und diese scheint Hauptmetabolisierungsenzym für Guaifenesin zu sein. Es wird auf eine pharmakologisch interessante Strukturbeziehung zwischen Guaifenesin und Codein hingewiesen.

Einleitung

Guaifenesin (Guaiakolglyzerinäther) wurde ursprünglich als zentral wirksames Muskelrelaxans insbesondere zur Operationsvorbereitung eingesetzt. Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt findet es darüber hinaus seit vielen Jahren Anwendung in Expectorantia und seit der Einführung der Rezeptpflicht für Bromharnstoffe und Diäthylpentenamid auch in leicht wirksamen Schlafmitteln, vorwiegend in Kombination mit Diphenhydramin.

Kürzlich berichteten wir über toxikologische Untersuchungen nach Aufnahme Guaifenesin-haltiger Arzneimittel (Kauert et al. 1979 [5]). Im Rahmen unserer dünn-schichtchromatographischen Routineanalytik von hydrolysierten Urinproben waren uns bei der Detektion mit Formaldehyd-Schwefelsäure zwei intensiv violette Flecken mit Rf-Werten von 0,5 und 0,7 aufgefallen, welche das Vorliegen eines Metaboliten neben dem bereits identifizierten Guaifenesin vermuten ließen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die gaschromatographisch-massenspektrometrische Identifizierung dieser Verbindung unter Verwendung von Derivatisierungsverfahren. Im Verlaufe unserer Untersuchungen fanden wir mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie noch eine weitere Verbindung, die als Metabolit von Guaifenesin in Frage kommt, und deren Identifizierung wir hier ebenfalls beschreiben. In der bisherigen Literatur ist über den Metabolismus von Guaifenesin beim Menschen nur die Oxidation zu β -(2-Methoxyphenoxy)milchsäure (Vandenheuvcl 1972 [7]) bekannt.

Geräte und Material

Gaschromatograph Varian Aerograph S 1400, gekoppelt mit einem Massenspektrometer Varian MAT 112 in on line-Kopplung mit einem Datensystem Varian SS 188. Aluminiumblock mit thermostatierbarer Heizplatte zur Derivatisierung (eigene Anfertigung). Fest-Flüssig-Extraktionseinrichtung für XAD2 Säulen Mass Skreen Brinkman. 20 ml Urinproben, entnommen 3 h nach Aufnahme von 250 mg Guaifenesin (Sirotol, STADA). Propionsäureanhydrid p.a., FLUKA, Ulm. N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA), Macherey-Na-gel + CO, Düren. Ammoniak Reaktantgas 99,95%, Linde. Helium Trägergas 99,995%, Linde. 3% Dexsil 400 auf Supelcoport 100/120 mesh, Supelco. Alle weiteren Reagentien p.a. handelsüblich.

Methoden

Die Urinproben (20 ml) der Versuchspersonen wurden in Anlehnung an unsere Routineaufarbeitung für die Dünnschichtchromatographie mit 5 ml konz. HCl versetzt und 20 min lang bei 100° C hydrolysiert. Anschließend wurden sie mit Karbonat-Puffer auf pH 9,5 gebracht und über eine mit XAD2 gefüllte Säule gegeben. Das XAD2-Harz wurde mit 3 × 5 ml eines Äther-Äthylacetatgemisches 1 : 1 eluiert und die organische Phase zur Trockne eingeengt.

Ein Teil dieser Extrakte wurde in 100 μ l Äthanol aufgenommen und davon 1 μ l auf die GC-Säule injiziert. Der andere Teil der Extrakte wurde zur Derivatisierung von OH-Gruppen in 200 μ l Propionsäureanhydrid und 200 μ l Pyridin aufgenommen und 30 min lang auf 100° C gehalten. Nach Abkühlung und Abdampfen des überschüssigen Reaktionsgemisches am Rotavapor wurde der derivatisierte Urinextrakt in 100 μ l Äthylacetat aufgenommen und 1 μ l davon auf die GC-Säule injiziert.

Zur Isolierung des von Vandenheuvcl [7] beschriebenen sauren Metaboliten von Guaifenesin, der mit dem oben beschriebenen Aufbereitungsverfahren nicht erfaßt wird, wurde eine weitere Urinprobe nach saurer Hydrolyse bei pH 1 mit Äthylacetat (2 × 5 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen einge-

Gaschromatographische Bedingungen

Einspritzblocktemperatur:	250° C
Temperaturprogrammierte Säulenaufheizung:	120–290°
Aufheizrate:	10°/min
Trägergasfluß:	20 ml/min
GC-Säulenmaße: Länge:	120 cm
Innendurchmesser:	2 mm
Säulenfüllung:	3% Dexsil 400 Supelcoport 100/120 mesh

Massenspektrometrische Bedingungen

Temperatur Spaltseparator:	250° C
Temperatur Interfaceleitung:	250° C
Temperatur Ionenquelle:	200° C
Emissionsstrom Kathode: (EI und CI)	0,7 mA
Elektronenenergie EI:	80 eV
Elektronenenergie CI:	120 eV
Sekundärelektronenverstärkung:	ca. 2,5 kV
Skangebiet: EI	m/e 50–500
Skangebiet: CI	m/e 100–500
Skannrate:	2 s/Dec.

engt und der erhaltene Extrakt mit 100 µl N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) 30 min lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Überschüssiges BSTFA wurde anschließend am Rotavapor abgezogen, der silylierte Rückstand in 100 µl Äthylacetat aufgenommen und 1 µl davon auf die GC-Säule injiziert.

Die massenspektrometrischen Daten wurden mit Elektronenstoßionisation sowie mit Chemischer Ionisation unter Verwendung von Ammoniak als Reaktantgas aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt das Gaschromatogramm des nicht derivatisierten Urinextraktes, in dem zwei intensive Peaks bei Rt 08.02 und 09.11 min zu sehen sind. Die Peakform des zweiten Peaks (Metabolit I) deutet auf eine offensichtlich sehr polare und damit schlecht chromatographierbare Verbindung hin.

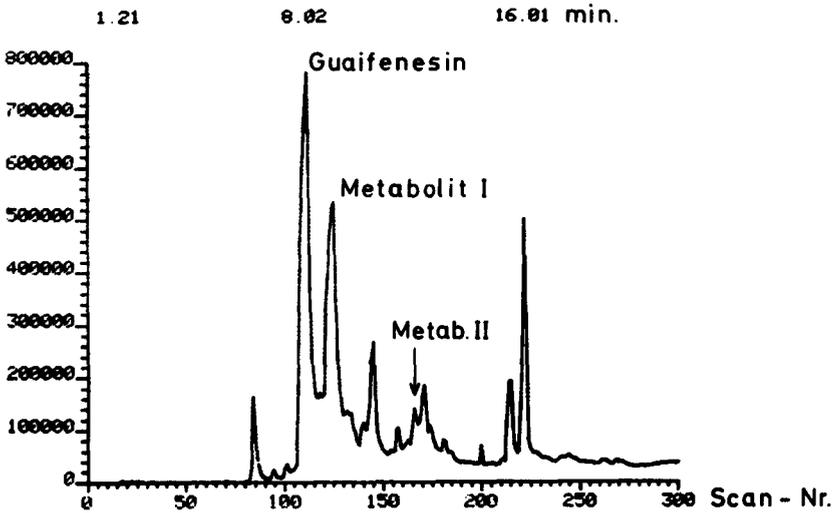
Darüber hinaus ist auf diesem Chromatogramm noch ein Peak als Metabolit II gekennzeichnet, auf dessen Identifizierung wir später noch eingehen werden.

Die EI-Massenspektren der beiden großen Peaks in Abb. 2 weisen auf das bereits identifizierte Guaifenesin (oberes Spektrum) und auf eine um 14 Masseneinheiten kleinere Verbindung hin (unteres Spektrum), wenn man die Masse 184 als Molekül-Ion annimmt. Es könnte sich möglicherweise um die O-demethylierte Form von Guaifenesin handeln, wobei sich die Masse 110 als Brenzkatechinion interpretieren ließe.

Zur Ermittlung bzw. Absicherung des Molekulargewichtes dieser Verbindung wurde derselbe Urinextrakt mit Chemischer Ionisation unter Verwendung von Ammoniak als Reaktantgas aufgenommen. Das hierbei erhaltene Massenspektrum für den zweiten GC-Peak zeigt Abb. 3, wo die Masse 202 als Basispeak erscheint und die Masse 184 mit ca. 8% relativer Intensität ebenfalls noch erkennbar ist. Im Vergleich zum CI-NH₃ Massenspektrum von Guaifenesin (Abb. 4) liegt hier ebenfalls das Ammonium-Ion (184+18) vor, so daß das Molekulargewicht von 184 als gegeben betrachtet werden kann.

Die Bestätigung unserer Annahme, daß es sich um Brenzkatechinglycerinäther (Desmethylguaifenesin) als Metaboliten von Guaifenesin handelt, sollte noch durch Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid zu Bildung der Propionylester erhärtet werden.

Abbildung 5 zeigt das Gaschromatogramm des propionylierten Urinextraktes, hier ebenfalls mit intensiven Peaks bei Rt 11,4, 13,7 sowie 16,7 min. Die nach oben verschobene Retentionszeit war aufgrund der nun vorliegenden Di- bzw. Tripropionylesterivate der uns interessierenden Substanzen zu erwarten.



DEXSIL4003% 120-290/10

Abb. 1. Computerrekonstruiertes Gaschromatogramm eines Urinextraktes nach Aufnahme von 250 mg Guaifenesin. Gaschromatographische Bedingungen siehe Text

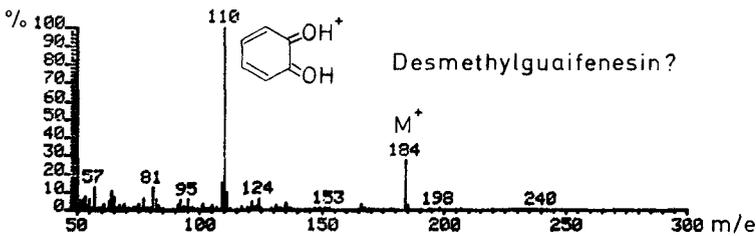
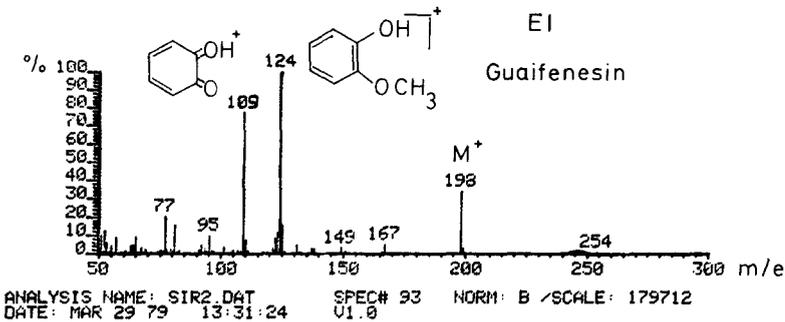


Abb. 2. Elektronenstoßionisiertes Massenspektrum von Guaifenesin und des vermuteten Desmethylguaifenesin

In Abbildung 6 sind die EI-Massenspektren der GC-Peaks dargestellt, die eine mehr oder weniger identische Fragmentierung beider Verbindungen aufweisen. Die Masse 57 für das Propionyl-Ion tritt nach unseren Erfahrungen bei der Elektronenstoßionisation von Propionylderivaten in der Regel als Basispeak auf. Die Masse 187 läßt sich als Dipropionyl-Propyldiol-Ion, also nach Abspaltung von Guaiakol bzw. Brenzkatechin, interpretieren.

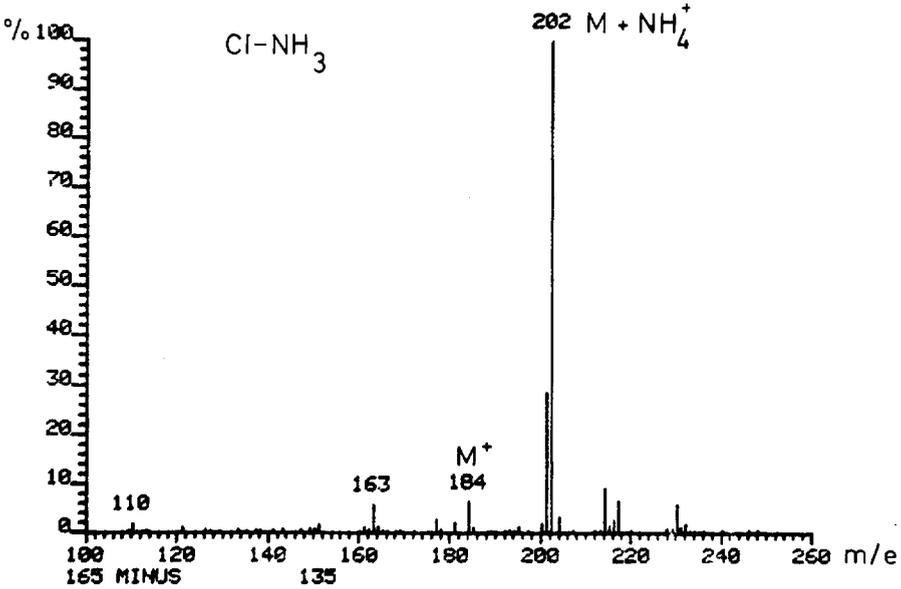


Abb. 3. Massenspektrum von vermutetem Desmethylguaifenesin nach Chemischer Ionisation mit Ammoniak

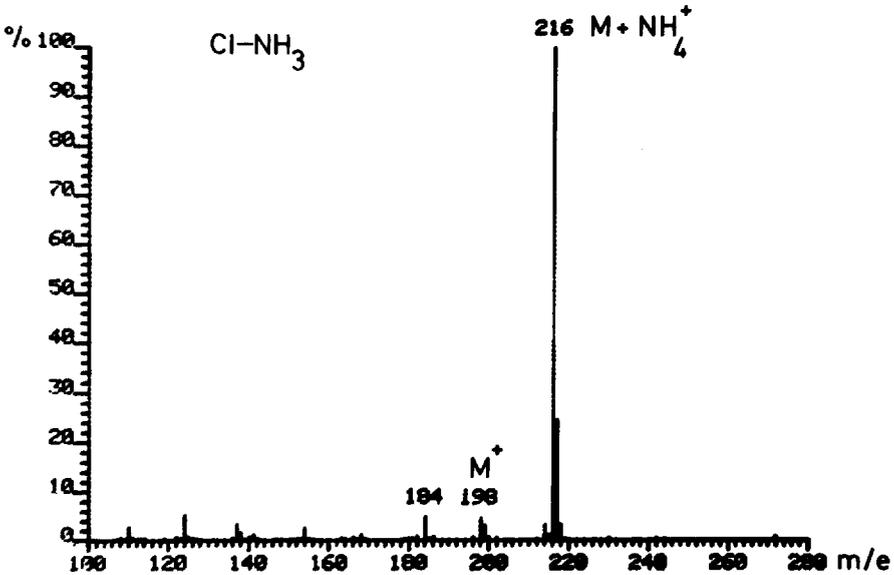
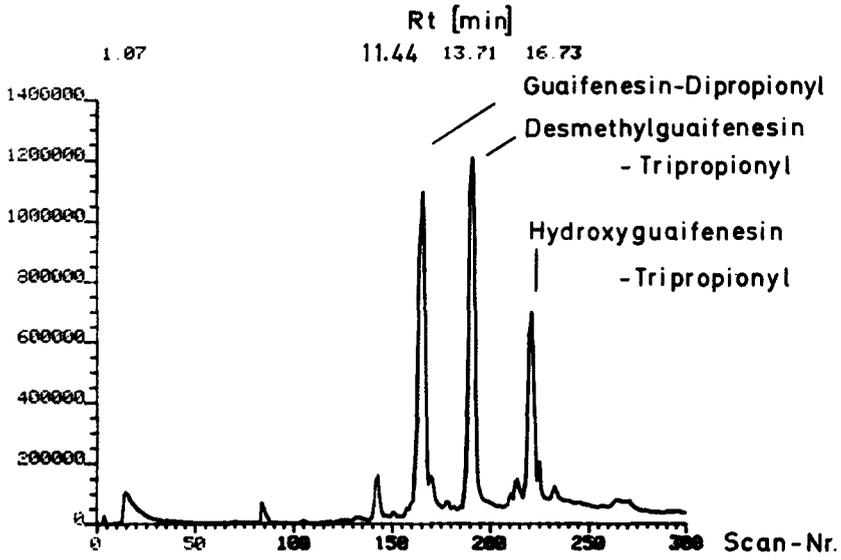


Abb. 4. Massenspektrum von Guaifenesin nach Chemischer Ionisation mit Ammoniak

Von dem propionylierten Urinextrakt führten wir ebenfalls eine Chemische Ionisation mit Ammoniak durch, wonach wir für unsere beiden Verbindungen die in Abb. 7 und 8 dargestellten Massenspektren erhielten. Als Basispeak wurden wiederum die Ammonium-Ionen von Guaifenesin und Desmethylguaifenesin ($M + 18$) in Form ihrer Propionylderivate registriert. Die übrige Zuordnung der Fragmente ist dem Formelschema in Abb. 7 und 8 zu entnehmen. Die Massendifferenz von 42 weist auf den Verlust der



DEXSIL4003% 120-290-10

Abb. 5. Computerrekonstruiertes Gaschromatogramm des propionylierten Urinextraktes. Gaschromatographische Bedingungen siehe Text

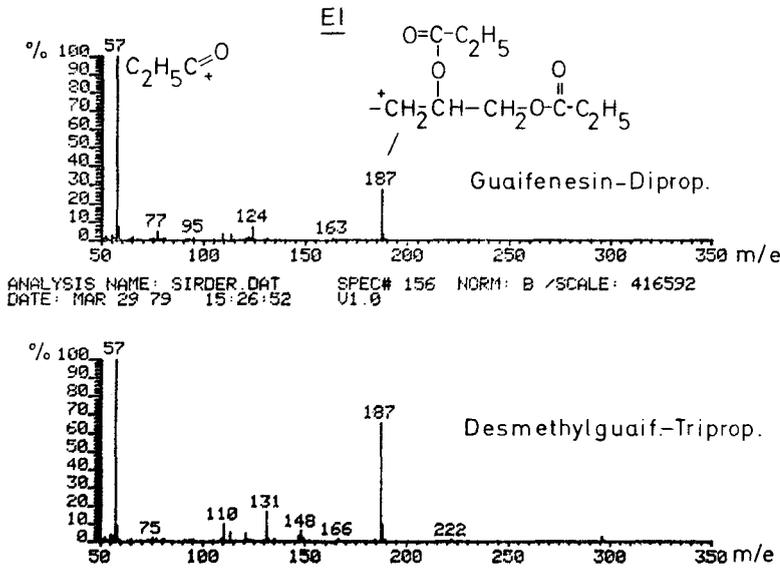


Abb. 6. Elektronenstoßionisiertes Massenspektrum von Dipropionyl-Guaifenesin und Tripropionyl-Desmethylguaifenesin

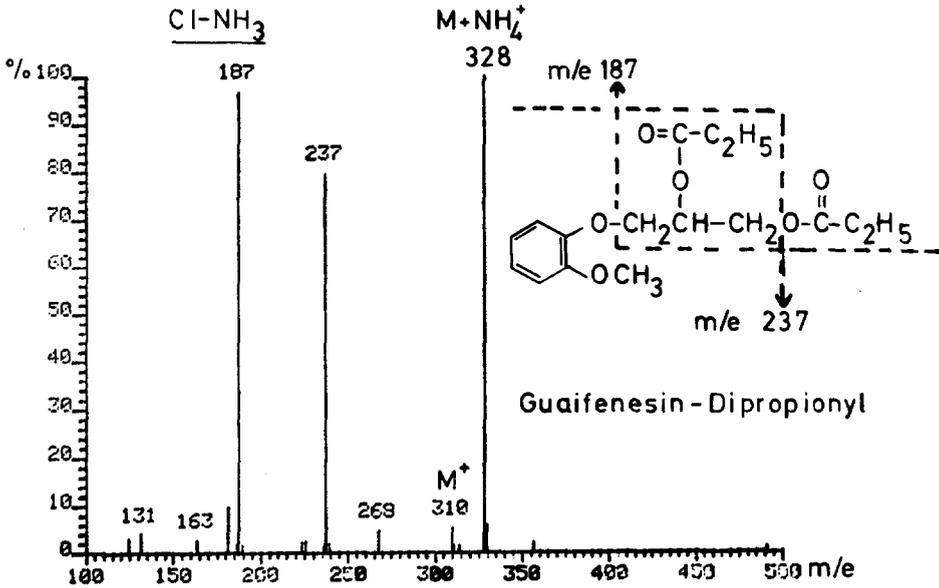


Abb. 7. Massenspektrum von Dipropionyl-Guaifenesin nach Chemischer Ionisation mit Ammoniak

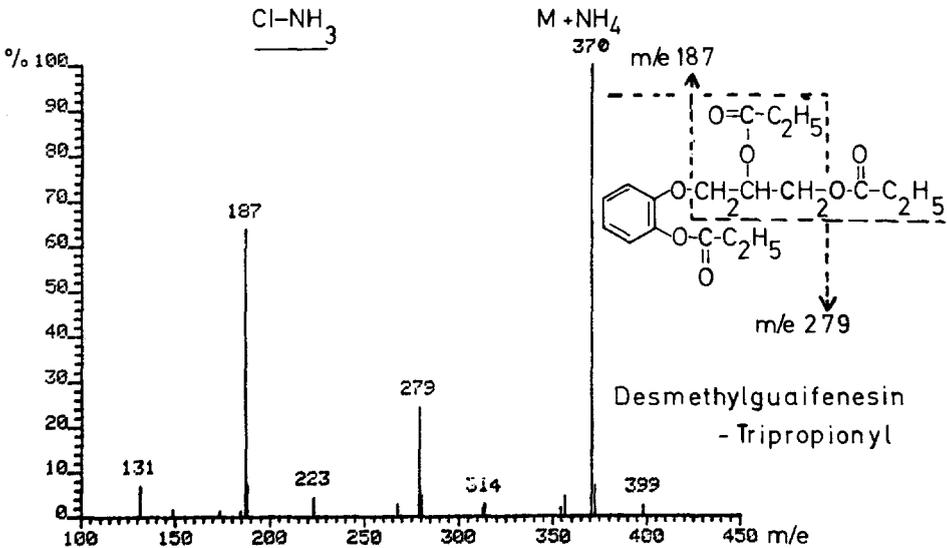


Abb. 8. Massenspektrum von Tripropionyl-Desmethylguaifenesin nach Chemischer Ionisation mit Ammoniak

Guaiakol-Methylgruppe und die Veresterung der freien phenolischen OH-Gruppe mit Propionsäureanhydrid hin.

Wie eingangs bereits erwähnt und auf den beiden Gaschromatogrammen (Abb. 1 und 5) ersichtlich, fiel während unserer Untersuchungen eine weitere Verbindung auf, die aufgrund ihrer massenspektrometrischen Fragmentierung der Guaifenesinstruktur zuzuordnen war.

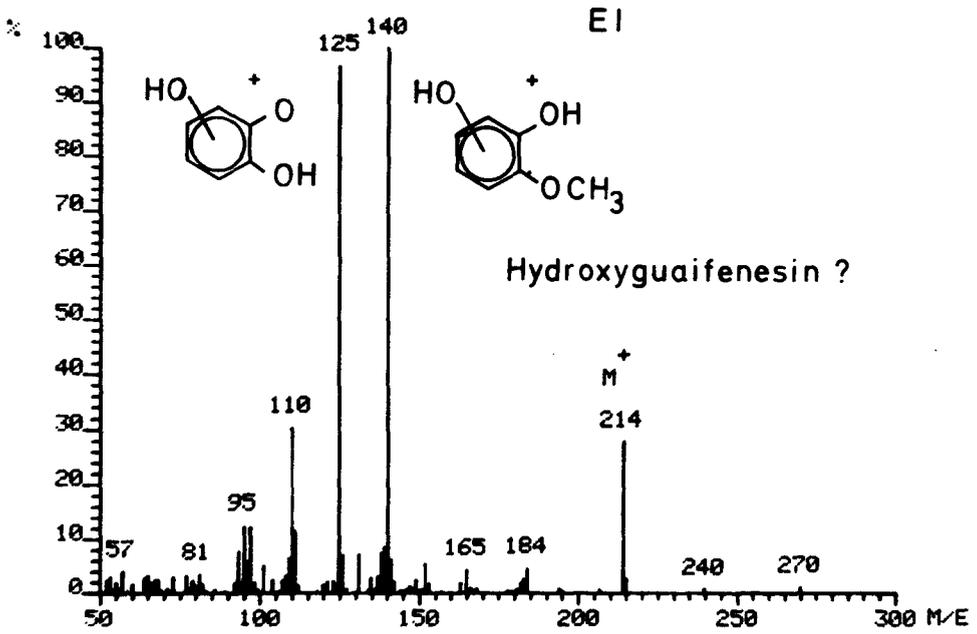


Abb. 9. Elektronenstoßionisiertes Massenspektrum von Hydroxyguaifenesin

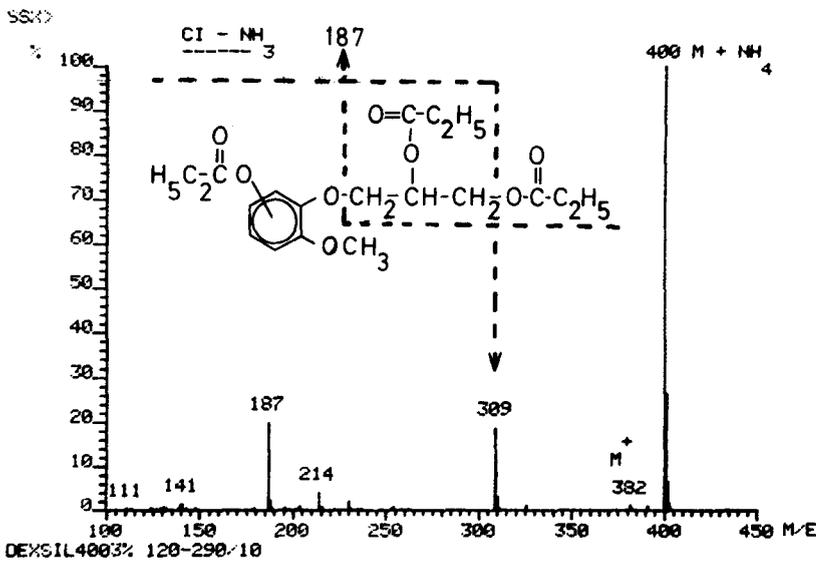


Abb. 10. Massenspektrum von Tripropionyl-Hydroxyguaifenesin nach Chemischer Ionisation mit Ammoniak

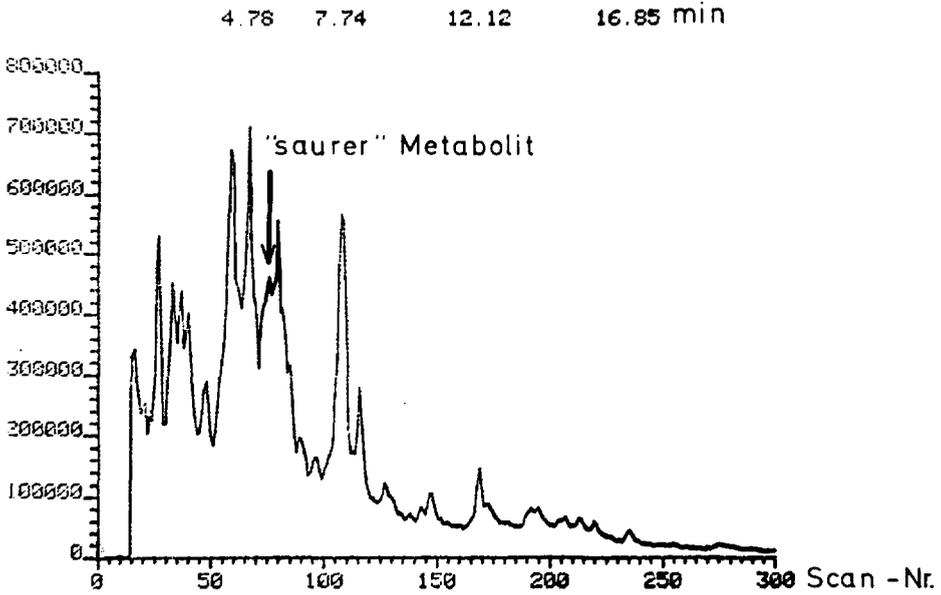


Abb. 11. Computerrekonstruiertes Gaschromatogramm eines sauren, silylierten Urinextraktes

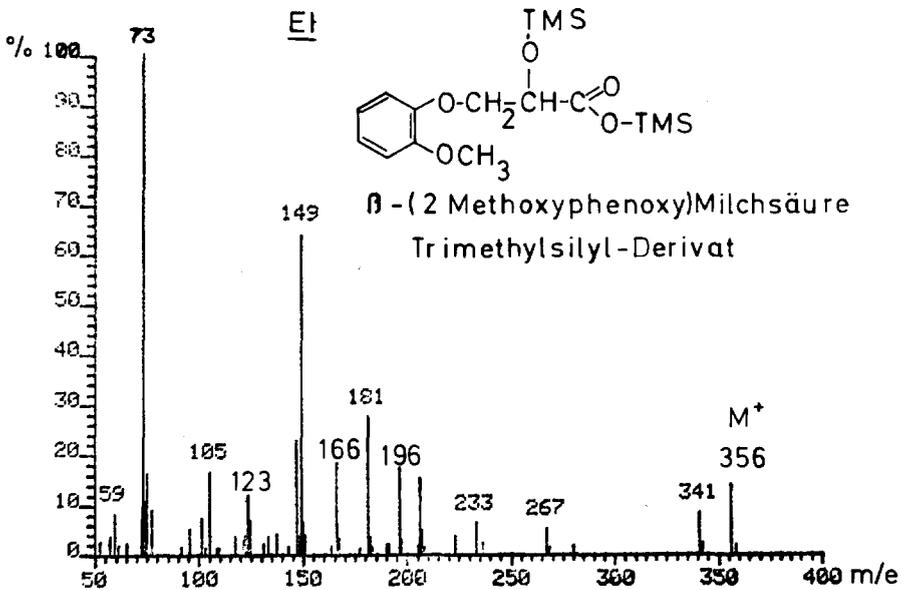


Abb. 12. Elektronenstoßionisiertes Massenspektrum von dem von Vandenhuevel [7] beschriebenen sauren Metaboliten von Guaifenesin

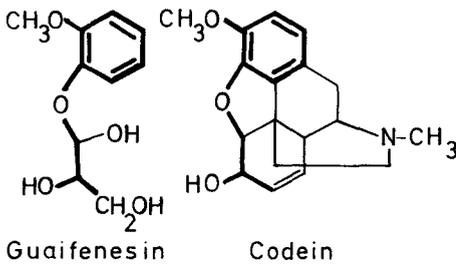


Abb. 13. Übereinstimmungen in Teilstrukturbereichen von Codein und Guaifenesin (Fettgedruckte Formel)

Vergleicht man die elektronenstoßionisierten Massenspektren der „neuen“ Verbindung (Abb. 9) und von Guaifenesin (Abb. 2) miteinander, so fällt ein sehr ähnliches jedoch um 16 Masseneinheiten erhöhtes Fragmentierungsmuster der intensiven Ionen auf. Die Masse 125 entspricht somit einem hydroxyliertem Brenzkatechin-Ion und die Masse 140 dem analogen hydroxyliertem Guaijakol-Ion. Das Molekül-Ion mit der Masse 214 läßt sich ebenfalls als 198 für die Molmasse des Guaifenesins plus 17 (OH-) minus 1 (H) interpretieren.

Nach Propionylierung und Chemischer Ionisation mit Ammoniak ergibt sich, wie in Abb. 10 zu erkennen ist, ein Massenspektrum, welches dieselbe Bruchstückbildung wie beim Dipriopionyl-Guaifenesin (Abb. 7) aufweist.

Das Auffinden dieser in relativ geringer Menge vorliegenden Hydroxyverbindung ist nur der Tatsache zu verdanken, daß die gaschromatographische Säule äußerst gut deaktiviert war und eine derart polare Substanz chromatographieren konnte.

Aufgrund unserer hier beschriebenen Untersuchungsergebnisse konnte die Identifizierung von Brenzkatechinglycerinäther und Hydroxyguaifenesin als Metaboliten von Guaifenesin als abgesichert betrachtet werden. Die Möglichkeit, daß es sich bei dem ersten um ein Artefakt, der z. B. bei der Hydrolyse mit Salzsäure entstand, handelt, konnten wir ausschließen, nachdem wir eine mit Guaifenesin versetzte Urinprobe unter sehr strengen Bedingungen hydrolysiert hatten und danach weder dünn-schichtchromatographisch noch gaschromatographisch-massenspektrometrisch demethyliertes Guaifenesin feststellen konnten.

Nach Durchsicht einschlägiger Literatur wurde für Guaifenesin die O-Demethylierung als Metabolisierungsschritt bei einigen Tierspezies, nicht aber beim Menschen beschrieben. Ebenso fanden wir keinen Hinweis für die Hydroxylierung von Guaifenesin beim Menschen, wobei zu bemerken wäre, daß dieser Schritt in der Bio-transformation von Arzneistoffen nichts Ungewöhnliches darstellt. Die Desalkylierung von Äthergruppen sowie auch die Hydroxylierung von Aromaten gehören pharmakologisch zu den Phase I-Reaktionen.

Davis und Wolff [1] stellten bei ihren Untersuchungen 1970 fest, daß Guaifenesin beim Pferd zur Katecholverbindung demethyliert wird, welche als Glucuronid oder Sulfatester im Urin ausgeschieden wird. Giri [4] berichtete 1971 über die O-Demethylierung von Guaifenesin bei der Ratte. Nach Untersuchungen von Gertrude et al. (1958) [2] ist die Demethylierungsrate bei ausgewachsenen männlichen Ratten höher als bei weiblichen. Giri [4] ging bei seinen Untersuchungen 1972 davon aus, daß, wenn die die Demethylierung von Guaifenesin zur Katecholverbindung in erster Linie die pharmakologische Wirkung von Guaifenesin aufhebt, eine kürzere Dauer der Wirkung und eine kürzere Plasma-Halbwertszeit bei der männlichen Ratte im Vergleich zur weiblichen erwartet werden könne. Seine Untersuchungsergebnisse bestätigen diese Annahme.

Aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse glauben wir feststellen zu können, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen von Vandenheuvel [7] die O-Demethylierung von Guaifenesin den Hauptmetabolisierungsschritt darstellt. Zwar konnten wir, wie in den Abb. 11 und 12 zu sehen ist, nach einer modifizierten Aufarbeitung der Urinproben die β -(2-Methoxyphenoxy)milchsäure nachweisen, jedoch scheint die Oxidation von Guaifenesin in quantitativer Hinsicht eindeutig der O-Demethylierung nachzustehen. Ein exakter quantitativer Vergleich der beiden Metaboliten steht noch aus.

Über die pharmakologische Wirksamkeit von O-Desmethyl-Guaifenesin bzw. auch von Hydroxyguaifenesin konnten wir über die von Giri [4] publizierten Untersuchungen hinaus in der Literatur keine Angaben finden. In diesem Zusammenhang möchten wir darauf hinweisen, daß wir inzwischen eine akute Vergiftung mit Guaifenesin und Diphenhydramin zu untersuchen hatten, bei der es zwar „nur“ zur Somnolenz, daneben aber zu erheblichen Hämolyseerscheinungen gekommen war. Bei Guaifenesin war diese Nebenwirkung nach Untersuchungen von Ginzel [3] im Vergleich zu einigen anderen Glycerinäthern am geringsten ausgeprägt. Bei Mephenesin waren Hämolyseerscheinungen auch bei therapeutischer Dosierung beobachtet worden, weshalb dieser Wirkstoff damals durch Guaifenesin ersetzt wurde [3].

Abschließend möchten wir noch auf eine pharmakologisch interessante Strukturbeziehung zwischen Guaifenesin und Codein hinweisen. Stellt man die Strukturformel in geeigneter Weise, wie in Abb. 13 zu sehen ist, der von Codein gegenüber, so fällt eine partielle Strukturübereinstimmung beider Verbindung auf. Sicherlich beruht die Wirkung von Codein in erster Linie auf dem für Opiate charakteristischen C-N-Abstand, aber für die dort ebenfalls auftretende O-Demethylierung des Codeins zu Morphin [6] besteht möglicherweise ein enger Zusammenhang. Es wäre zu prüfen, ob eine geschlechtsspezifische Demethylierung – wie für Guaifenesin an der Ratte beschrieben [4] – auch bei Codein auftritt.

Frl. B. Köper sei an dieser Stelle für ihre technische Assistenz herzlich gedankt.

Literatur

1. Davis LE, Wolff WA (1970) Pharmacokinetics and Metabolism of Glyceryl Guaiacolate in Ponies. *Am J Vet Res* 31:469–473
2. Gertrude PQ, Axelrod J, Brodie BB (1958) Species, Strain and Sex Differences in Metabolism of Hexobarbitone, Amidopyrine, Antipyrine and Aniline. *Biochem Pharmacol* 1:152–159
3. Ginzel KH (1951) Vergleichende Untersuchung einiger antikonvulsiv wirksamer Glycerinäther. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 212:331
4. Giri NS (1973) The Pharmacological Action and O-Demethylation of Glyceryl Guaiacolate Ether in Male and Female Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 24:513–518
5. Kauert G, v Meyer L, Drasch G (1979) Toxikologische Untersuchungen nach Aufnahme Guaifenesin-haltiger Arzneimittel. *Dtsch Apothekerzeitung* 25:986–988
6. Redmont N, Parker JM (1963) Metabolism of Codeine: Urinary Excretion rate of Codeine and Morphin. *Can J Biochem* 41:243–245
7. Vandenheuvel WJA, Smith JL, Silber RH (1972) β -(2-Methoxyphenoxy)lactic Acid, the Major Urinary Metabolite of Glyceryl Guaiacolate in Man. *J Pharm Sci* 61:1997–1998

Eingegangen am 13. Februar 1980