

STOFFWECHSEL VON CHLORMETHIAZOL IN DER ZYKLISCH PERFUNDIERTEN LEBER DER RATTE*

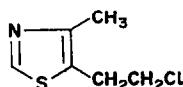
GEORG HERBERTZ, THOMAS METZ, HANS REINAUER und WOLFGANG STAIB

Aus dem Institut für Pathologie, und den Instituten für Physiologische Chemie,
der Universität Düsseldorf, Düsseldorf, West Germany

(Received 15 December 1972; accepted 19 January 1973)

Abstract—Perfused isolated liver of the rat rapidly converts chlormethiazole by pathways similar to those in the living organism. Large quantities of metabolites are excreted into the bile, where a different group of polar metabolites occur. Their structure can be elucidated by splitting and identification of the resulting thiazole compounds. These metabolites are *N*-methyl-thiazolium derivatives of thiazolecarboxylic-acids which normally occur in the liver.

DAS Arzneimittel Chlormethiazol (Distraneurin^R, Hemithiamin^R, Hemineurin^R) ist ein Derivat des Thiazol-Ring-Systems von Thiamin. Chlormethiazol wird bei Delirium tremens und als Antiepileptikum verwendet.



Untersuchungen von Allgen¹ über die Verweildauer des Chlormethiazol in der Ratte ergaben, daß bereits nach einer Stunde Leber und Dünndarm die höchsten Gewebekonzentrationen aufwiesen. Schon nach 3 Stunden war 70% des Chlormethiazol renal ausgeschieden. In Bilanzversuchen wurde eine totale renale Ausscheidung bis zu 96% der verabreichten Menge innerhalb von 3 Tagen festgestellt. Der Metabolismus wurde von Herbertz³ sowohl in der lebenden Ratte als auch in Organhomogenaten untersucht. Die Umsetzung in Homogenaten läuft jedoch nur kurzzeitig und unvollständig und ergibt daher kein vollständiges Bild des Stoffwechsels und seiner Geschwindigkeit. Die Untersuchung in der zyklisch perfundierten isolierten Leber läßt ein besseres Bild des Stoffwechsels von Chlormethiazol erwarten.

MATERIAL UND METHODEN

Zyklische Perfusion. Die Perfusion wurde mit der Leber einer männlichen Wistar II Ratte (200 g Körpergewicht) durchgeführt. Das mit Standard-Kost ernährte Tier hungerte 24 Stunden vor dem Versuch. Vorbereitung und Durchführung entsprach den Angaben von Meiers⁵ und Metz.⁶ Das Perfusionsmedium (51 ml bei Perfusionsbeginn) bestand aus halbsynthetischem Rinderblut, Rudorff,⁷ dem bereits zu Beginn

* Ein Teil dieser Arbeit wurde auf dem VIII Internationalen Kongress für Klinische Chemie 1972 in Kopenhagen vorgetragen.

der Durchführung 1 mg Chlormethiazol-Äthandisulfonat 2-C-14 (40 μ Ci/mg) zugesetzt wurde. Die Glucose Konzentration war 1 mg/ml. Die Leber (Gewicht 8,2 g) wurde über 90 min zyklisch durchströmt. Die Galleproduktion betrug 0,5 ml.

Bestimmung der Metaboliten in der Perfusionsflüssigkeit, Leber und Galle. Alle 10 min wurde ein ml Perfusionsflüssigkeit entfernt, zu 2 ml Methanol zu gegeben und das Gemisch kurz zum Sieden erhitzt. Nach Abzentrifugieren der denaturierten Proteine wurde 0,5 ml vom Überstand auf eine DC Platte (Kieselgel mit Fluoreszenzindikator 254 nm) aufgetragen. Das Chromatogramm wurde zunächst in Äthanol-Äthylacetat (20:80) ca 20 cm, dann in Chloroform-Methanol-25% Ammoniaklösung

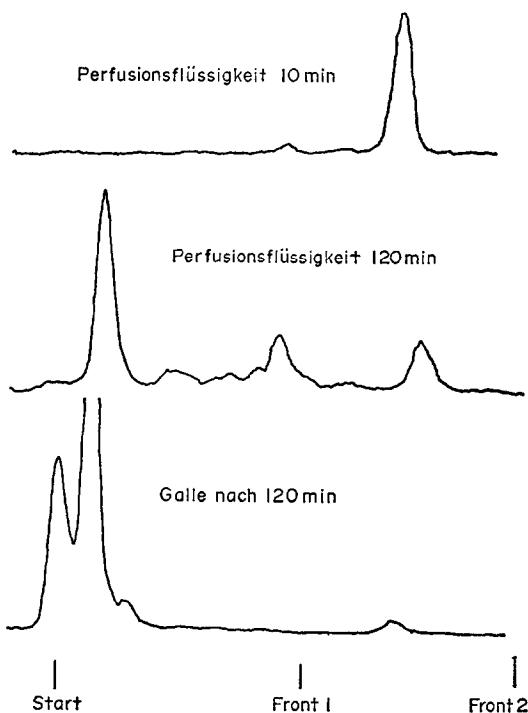


ABB. 1. Radioaktive Zählkurven von Dünnschicht Chromatogrammen in Äthanol-Athylacetat Start-Front 2 und in Chloroform-Methanol-Ammoniak Start-Front 1.

(60:32:8) ca 10 cm weit entwickelt. Die Identifizierung der Metaboliten, nach der Methode von Herbertz,³ erfolgte durch Vergleich der U.V. Absorption der Substanzen Chlormethizaol, 4-Methyl-5-(2-hydroxyäthyl)thiazol, 4 Methyl-thiazolessigsäure-(5) und 2-Hydroxy-4-methyl-thiazolessigsäure-(5) mit der Lage der radioaktiven Zonen. Die Lage der radioaktiven Zonen wurde mit dem DC-Scanner (Berthold LB 2721) ermittelt, R_f -Werte in Tabelle 1 (s.Abb. 1). Unter diesen Bedingungen kann 2-Hydroxy-4-methyl-5-(2-chloräthyl)-thiazol nicht von Chlormethiazol abgetrennt werden. Nach der Lokalisation wurden die Metabolitzonen von der DC-Platte abgeschabt. Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler (Packard Tri-Carb) bestimmt. Die Aktivität aller Zonen wurde addiert, gleich 100% gesetzt und daraus die prozentuale Aktivität der einzelnen Zonen berechnet. Die Bestimmung der

Metabolit-Verteilung in der Galle und im homogenisierten Lebergewebe erfolgte analog.

Inkubation mit Glucuronidase. Metabolit 0 wurde mit 1 ml Wasser vom Kieselgel eluiert. Die Lösung wurde mit Natriumacetat-Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt. Hierzu wurde 20 mg β -Glucuronidase = 6400 Fishman E gegeben. Die Inkubationsmischung blieb 7 Tage bei 37°. Die chromatographische Aufarbeitung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode.

Spaltung der N-Methylverbindungen. Metabolit 0 wurde mit 3 ml Wasser in der Filterfritte eluiert. Zu dem Filtrat wurde 50 μ l Äthanolamin gegeben, dann wurde am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde mit 100 μ l Wasser versetzt und in einem Glasrohr eingeschmolzen. Unter Druck wurde 16 hr auf 140° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Abkühlen auf eine DC-Platte aufgetragen und wie oben angegeben chromatographiert und ausgewertet.

ERGEBNISSE

Die in der Perfusionsflüssigkeit auftretenden Metaboliten erweisen sich als identisch mit den von Herbertz³ im Urin von Ratten gefundenen Ausscheidungsprodukten. Nach 2 Studen ist noch 80% der Ausgangsaktivität im perfundierten Organystem auffindbar. Setzt man diese Gesamtaktivität nach zwei Stunden gleich 100%, so entfallen davon 53% auf die Perfusionsflüssigkeit, 12% auf die Leber und 35% auf die Galle. Die 14-C-Aktivität in der Galle ist mit 22,6 μ Ci/ml sehr hoch. Das entspricht einer 34-fachen Anreicherung gegenüber der Ausgangsaktivität im Perfusionssystem. Die Ausscheidung in die Galle erfolgt demnach gegen ein starkes Konzentrationsgefälle. In der Galle findet sich in größerer Menge ein Metabolit, der in der Perfusionsflüssigkeit nur in Spuren, im Urin gar nicht dagegen in Leberhomogenaten auftritt (Herbertz).³ Bei DC-Trennungen in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ erweist sich der Metabolit als so polar, daß sein R_f -Wert gleich 0 ist. Diese Substanz wird im folgenden Metabolit 0 genannt (s.a. Abb. 1).

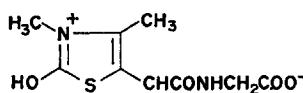
Die Inkubation von Metabolit 0 mit Glucuronidase ergab keine Umsetzung. Auch die Hydrolyse mit 6 N HCl bei 110° ergab nur eine unvollständige Spaltung. Hierbei entstand wenig 4-Methyl-thiazolessigsäure-(5). Diese Stabilität gegenüber Glucuronidase und Säurehydrolyse zeigt, daß hier kein Glucuronid, Schwefelsäure-ester, ein Aminosäurekonjugat oder *N*-Acetylverbindung vorliegen kann. Die Stabilität gegenüber Salzsäure deutet auf eine *N*-Methylverbindung hin. In dem Fließmittel Eisessig-Wasser-Äthanol (20:30:50) zeigt Metabolit 0 auf Kieselgel-DC den gleichen R_f -Wert von 0,40 wie 3,4-Dimethyl-thiazolessigsäure-(5). Zur schonenden Spaltung wurde das präparative Verfahren von Hünig,⁴ die Spaltung von *N*-Alkylverbindungen in siedendem Äthanolamin (K_p 172,2°) modifiziert. Da als Spaltprodukt von Metabolit 0 eine Thiazolcarbonsäure zu erwarten ist und die Abtrennung durch größere Mengen Äthanolamin behindert würde, kann nicht in reinem Äthanolamin gearbeitet werden. Die Spaltung gelingt aber auch in wässriger Äthanolamin-Lösung. Die Abtrennung der Thiazolverbindung vom Äthanolamin erfolgt auf der DC-Platte. Bei dieser Reaktion entsteht:

41% 2-Hydroxy-4-methyl-thiazolacetat-(5)-glycin,

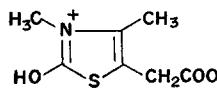
15% 2-Hydroxy-4-methyl-thiazolessigsäure-(5),

18% 4-Methyl-thiazolessigsäure-(5).

Metabolit 0 ist demnach ein Gemisch der Verbindungen.

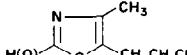
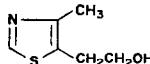
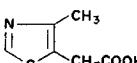
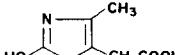
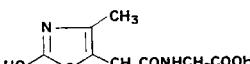
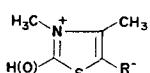


2-Hydroxy-3,4-dimethyl-thiazolacetyl-(5)-glycin



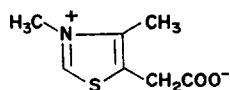
2-Hydroxy-3,4-dimethyl-thiazolessigsäure-(5)

TABELLE 1. PROZENTUALE METABOLIT-ZUSAMMENSETZUNG NACH 120 MIN PERfusion

Von der Gesamtaktivität nach 120 min entfallen auf	<i>R_f</i> Wert	Perfusionsflüssigkeit 53%	Leber 12%	Galle 35%
	0,85*	20,8 %	6,4 %	3,7 %
2-Hydroxy-4-methyl-5-(2-chloroethyl)thiazol und Chloromethiazol				
	0,72*	3,6 %	3,8 %	0,4 %
4-Methyl-5-(2-hydroxyethyl)thiazol	1,00†	22,8 %	6,7 %	3,5 %
Metaboliten an der Front 1				
	0,51†	5,1 %	3,4 %	2,0 %
4-Methyl-thiazolessigsäure-(5)				
	0,35†	8,2 %	6,9 %	6,9 %
2-Hydroxy-4-methyl-thiazolessigsäure-(5)				
	0,29†	37,9 %	50,0 %	63,2 %
2-Hydroxy-4-methyl-thiazolacetyl-(5)-glycin				
	0,00-0,09†	1,5 %	12,8 %	20,1 %
Metaboliten O				

* Fließmittel: Äthylacetat—Äthanol

† Fließmittel: $\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}-\text{NH}_3$.



3,4-Dimethyl-thiazolessigsäure-(5)

Die qualitative Zusammensetzung der übrigen Metaboliten weist zwischen Leber, Perfusionsmedium und Galle (s. Tab. 1) keine Unterschiede auf. In der Galle findet sich mehr Glycinkonjugat. Kinetische Messungen (Abb. 2) zeigen, daß in der ersten Stunde die zeitliche Abnahme der Chlormethiazol-Konzentration annähernd linear verläuft. 2-Hydroxy-4-methyl-thiazolessigsäure-(5), 4-Methylthiazolessigsäure-(5) und der Metabolit an der Front 1 (s. Abb 1) steigen zu konstanten Werten an. Das Stoffwechsel-endprodukt 2-Hydroxy-4-methyl-thiazolacetyl-(5)-glycin wird zunächst langsam gebildet, steigt aber später steil an. Als Zusammenfassung der Messergebnisse

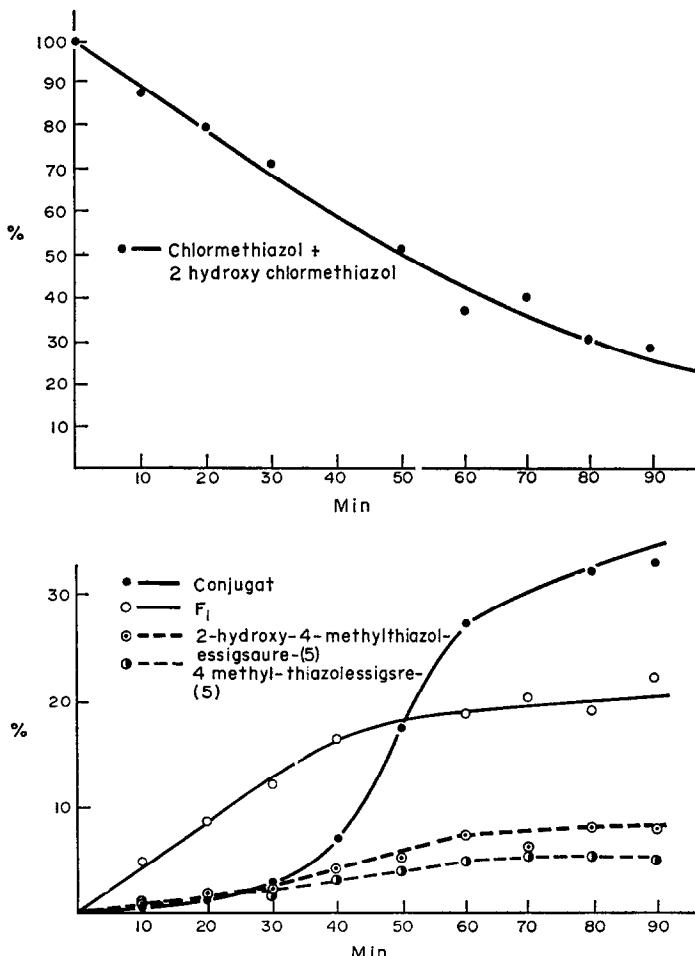


ABB. 2. Zeitlicher Verlauf der Metabolitzusammensetzung im Perfusionsmedium.

zeigt Tabelle 1 die prozentualen Anteile der Metaboliten im Perfusionsmedium, im Lebergewebe und in der Galle nach 2 Stunden.

DISKUSSION

Wie die Bilanz zeigt, wird ein erheblicher Teil der Stoffwechselprodukte in die Galle ausgeschieden. Das entspricht den autoradiographischen Befunden von Allgen.¹ Da nach Allgens Bilanzversuchen bis zu 96% der injizierten Chlormethiazol Menge renal ausgeschieden wird, muß eine Rückresorption aus dem Darm stattfinden. In der Galle finden sich *N*-Methylverbindungen; diese können wegen ihrer hohen Polarität erst nach Abspaltung der *N*-Methyl-Gruppe rückresorbiert werden. Im Urin wurde von Herbertz³ keine *N*-Methyl-verbindung gefunden. Die Ausscheidung in die Galle kann jedoch im Perfusionssystem größer sein als im lebenden Tier, da im Perfusionssystem polare Metaboliten, die bereits "harnfähig" sind, nicht ausgeschieden werden können. Dadurch wächst ihre Konzentration an. Der Leber stehen dann steigende Mengen dieser polaren Metaboliten für die Methylierungsreaktion und die Ausscheidung in die Galle zur Verfügung. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zum lebenden Tier besteht darin, daß Chlormethiazol im gesamten Körper verteilt wird und sich vorwiegend in allen Lipiden löst. Aus der Arbeit von Frisch² geht hervor, daß die Plasma Konzentration von Chlormethiazol nach Gabe von 1000 mg beim Menschen einen maximalen Wert von 3,2 µg/ml erreicht. Bei gleichmäßiger Verteilung über 70 l wäre eine Konzentration von 14 µg/ml zu erwarten. Da es in dem Perfusionssystem nur wenig Lipoide gibt, ist die Chlormethiazol Konzentration in der wässrigen Phase höher. Hierdurch könnte eine größere Stoffwechselgeschwindigkeit in der Perfusion resultieren. Die Untersuchung der Stoffwechselprodukte im Perfusionssystem zeigt, welche Reaktionen in der Leber ohne Beteiligung anderer Organe ablaufen.

LITERATUR

1. L. G. ALLGEN, U. H. LINDBERG and S. ULLBERG, *Nord. Psykiat. T.* **17**, 13 (1963).
2. E. P. FRISCH and B. ÖRTENGREN, *Acta Psychiat. scand. Suppl.* **192** 42, 35 (1966).
3. G. HERBERTZ und H. REINAUER, *Archs Pharmak.* **270**, 192 (1971).
4. S. HÜNIG and W. BARON, *Chem. Ber.* **90**, 395 (1957).
5. H. G. MEIERS, J. FLAMMANN, G. ALBAUM und W. STAIB, *Biochem. Z.* **344**, 514 (1966).
6. TH. METZ, U. NOGAJ und W. STAIB, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1496 (1972).
7. K. H. RUDORFF, G. ALBRECHT und W. STAIB, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 975 (1970).

Zusammenfassung—In der Perfusion zeigt sich eine hohe Umsetzungsgeschwindigkeit des Chlormethiazol. Der Umsatz verläuft weitgehend ähnlich wie im lebenden Tier. Ein großer Teil der Stoffwechselprodukte wird in die Galle ausgeschieden. In der Galle tritt eine Gruppe von polaren Metaboliten auf. Die Struktur dieser Metaboliten wurde durch Spaltung und Identifizierung der Thiazolverbindungen ermittelt. Es sind *N*-Methylthiazolium-verbindungen der bereits bekannten Thiazolcarbonsäuren.