

UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER HYDROXYLIERUNG UND DER OXYDATIVEN O-DESALKYLIERUNG VON PHENACETIN AN MODELLSYSTEMEN*

V. ULLRICH, D. HEY und HJ. STAUDINGER

Physiologisch-Chemisches Institut der Justus-Liebig-Universität, Giessen, Deutschland
and

H. BÜCH, und W. RUMMEL

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland

(Received 9 June 1967; accepted 17 July 1967)

Abstract—In model systems (reduced heavy metal complexes and O_2), which originally were used to study the mechanisms of action of microsomal hydroxylases, the hydroxylation and the *O*-dealkylation of phenacetin were determined. In addition to 2-hydroxyphenacetin, 3-hydroxyphenacetin, a new not yet described oxidation product of phenacetin was isolated and characterized. The ratio between ring hydroxylation and *O*-dealkylation depends on the model system used. This observation can be explained by the assumption that two oxidation mechanisms are involved. OH-radicals are mainly responsible for hydroxylation at the aromatic ring, whereas oxygen atoms ('oxene-mechanism') are probably responsible for the *O*-dealkylation of phenacetin.

DER HAUPTABBAUWEG von Phenacetin in der Leber führt über die *O*-Desalkylierung zum *N*-Acetyl-*p*-aminophenol. Von Conney und Mitarb.¹ wurde kürzlich bei verschiedenen Spezies auch ein kernhydroxylierter Metabolit von Phenacetin gefunden und als 2-Hydroxyphenacetin identifiziert. Einen weiteren hydroxylierten Metaboliten konnten wir als das isomere 3-Hydroxyphenacetin charakterisieren.²

Die für die *O*-Desalkylierung und Kernhydroxylierung verantwortlichen mikrosomalen Enzyme gehören zur Gruppe der mischfunktionellen Oxygenasen. Es wird allgemein angenommen, daß beide Reaktionen nach demselben Mechanismus verlaufen. Nach Gillette³ geht der Desalkylierung eine Hydroxylierung am α -C-Atom der Alkylgruppe voraus. Daher sollten die Modellsysteme für die mikrosomale Hydroxylierung auch für die Untersuchung des Mechanismus der mikrosomalen Desalkylierung geeignet sein. Schon Udenfriend und Mitarb.⁴ sowie Brodie und Mitarb.⁵ beschrieben in dem von ihnen gefundenen Hydroxylierungsmodell ($Fe^{2+}/EDTA/Asc./O_2$) eine Desalkylierung von Phenacetin. Wie wir fanden, stellt dieses System jedoch nur ein Spezialfall einer großen Zahl analoger hydroxylierender Systeme dar, denen allen eine Sauerstoffreduktion durch reduzierte Schwermetalle gemeinsam ist.

Neben dem Hydroxylierungsmechanismus durch OH-Radikale⁶ läßt sich in diesen Systemen noch ein weiterer Mechanismus nachweisen, der ein ganz anderes chemisches

* Auszugsweise vorgetragen auf dem internationalen Symposium über *Oxygenasen* in Kyoto, Japan, vom 16.–19. Mai (1966).

Verhalten zeigt.⁷⁻¹⁰ So wird Acetanilid von OH-Radikalen elektrophil angegriffen. Dabei entstehen Acetaminophenole mit einer o:m:p-Relation von 47:2:51. Im Gegensatz dazu führt der neue Mechanismus zu einer fast statistischen Substitution durch Sauerstoff, was auf einen direkten Angriff an den CH-Bindungen durch 'Sauerstoffatome' hinweist. Wegen der Ähnlichkeit mit den Carben-Reaktionen wurde für diesen Mechanismus der Begriff 'Oxen-Reaktion' vorgeschlagen.¹¹ Da bei der nichtenzymatischen Oxydation in Modellsystemen eine Unterscheidung zwischen der Oxydation durch OH-Radikale und derjenigen durch 'Sauerstoffatome' möglich ist, schien es aussichtsreich, auf diesem Wege der Beantwortung der Frage näher zu kommen, ob sich die O-Desalkylierung und die Hydroxylierung des aromatischen Ringes hinsichtlich des Oxydationsmechanismus unterscheiden.

MATERIAL UND METHODEN

Proben von 2-Hydroxy-4-äthoxy-acetanilid (im folgenden als 2-Hydroxyphenacetin bezeichnet) wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. A. H. Conney und der Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riss, zur Verfügung gestellt. NADH und NADPH stammten von der Firma C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim. Die mikrosomale Cytochrom-c-Reduktase wurde nach der Vorschrift von Omura und Sato¹² präpariert.

Identifizierung der Produkte

In 480 ml einer gesättigten, wäßrigen Lösung von Phenacetin (= ca $0,5 \cdot 10^{-3}$ M) werden 30 mMol $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ gelöst und 10 mMol $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 20 ml Wasser zugegeben. Man rührt die Lösung im offenen Gefäß bei 25°C an der Luft und stoppt nach 30 min. mit 5 ml konz. NaOH. Der Ansatz wird zweimal mit 500 ml Äther extrahiert; die ätherische Lösung wird verworfen und die wäßrige Phase mit 5 ml konz. H_2SO_4 angesäuert. Nach Zusatz von NaCl bis zur Sättigung schüttelt man die Phenole zweimal mit 500 ml Äther aus. Die vereinigten Ätherextrakte werden eingengt und strichförmig auf Kieselgelplatten HF₂₅₄ (Merck AG, Darmstadt) (20 × 40 cm, 1 mm Schichtdicke) aufgetragen. Man chromatographiert zweimal in einem Fließmittel aus 79 Teilen Benzol, 14 Teilen Methanol und 7 Teilen Eisessig. Die einzelnen Kieselgelzonen werden im Soxhlet-Apparat mit Methanol extrahiert und rechromatographiert. Nach erneuter Elution filtriert man über eine Aluminiumoxyd-Säule und kristallisiert den eingengten Rückstand aus Aceton um.

Bestimmung der Produkte

Für die Bestimmung der phenolischen Metabolite von Phenacetin inkubiert man die Ansätze (Gesamtvolumen von 2,0 ml) in Schliffreagenzgläsern. Die Konzentrationen und Versuchsbedingungen sind in den Legenden der Tabellen angegeben. Nach der Inkubation wird die Reaktion mit 0,1 ml 5 n NaOH gestoppt und der Ansatz mit 8 ml Äther geschüttelt. Die Ätherphase wird verworfen und die wäßrige Phase mit 0,2 ml 5 n H_2SO_4 angesäuert. Unter Zusatz von NaCl werden die Phenole mit 10 ml Äther ausgeschüttelt und 9 ml des Ätherextraktes in Reagenzgläsern auf dem Wasserbad eingengt. Den Rückstand trägt man unter zweimaligem Nachspülen mit einem Äther-Aceton Gemisch (1:2 v/v) quantitativ auf Dünnschichtplatten HF₂₅₄ (Merck AG, Darmstadt) auf und entwickelt in dem Fließmittel aus 79 Teilen Benzol, 14 Teilen Methanol und 7 Teilen Eisessig. Nach einer Laufstrecke von 16 cm werden die Flecke

unter der UV-Lampe markiert und die Kieselgelzonen in Zentrifugengläser überführt. Nach Zugabe von 1,0 ml NaOH (0,1 n), 1,0 ml Phenolreagenz [nach Folin-Ciocalteu, (Merck AG, Darmstadt) 1:3 verdünnt] und 1,0 ml Na_2CO_3 -Lösung (1 m) wird die Farbe während 30 min bei 37° im Wasserbad entwickelt und die Extinktion in 0,5 cm Küvetten bei 578 nm bestimmt.

Eichkurven

Die Ausbeute an den entstandenen Phenolen wurden an Hand von Eichkurven bestimmt. Während die Doppelbestimmungen untereinander nur geringe Abweichungen zeigen, ist die Wiederfindung bei den Eichwerten von den Inkubationsbedingungen abhängig. Das erklärt sich aus der Empfindlichkeit der Phenole gegenüber den anwesenden Oxydationsmitteln (Metallionen, Sauerstoffradikale), die je nach Art des verwendeten Systems völlig verschieden sind. Für jedes System werden daher eigene Eichkurven angefertigt, deren Einzelwerte mit den jeweils drei Referenzsubstanzen unter den gleichen Bedingungen wie die Ansätze inkubiert werden müssen. Da das Substrat den Eichwerten nicht zugesetzt werden kann, wird es in den Eichansätzen durch eine andere Verbindung ersetzt, die die gleiche Menge Sauerstoffradikale abfängt und die Analytik der Phenolbestimmung nicht stört. Dafür eignet sich Methanol. Die Methanolkonzentration, die in den Ansätzen die Hydroxylierung des Substrates um 50% hemmt, entspricht dann in ihrer Wirksamkeit als Radikalfänger gerade der Substratkonzentration.

Die angegebenen Fehlergrenzen stellen den mittleren Fehler des Mittelwertes dar.

ERGEBNISSE

Nach der Inkubation von Phenacetin in den verschiedenen Modellsystemen erhält man bei präparativer Schichtchromatographie in den 4 Hauptzonen folgende Reaktionsprodukte:

Zone 1 (R_f -Wert = 0,92) enthält das nicht umgesetzte Phenacetin. Zone 2 (R_f -Wert = 0,74): Die hieraus eluierte Substanz reagiert mit Dichlorchinonchlorimid und ist entsprechend dem chromatographischen Verhalten in drei Laufmitteln, dem Schmelzpunkt (und Mischschmelzpunkt), sowie dem UV- und IR-Spektrum mit 2-Hydroxyphenacetin identisch. Zone 3 (R_f -Wert = 0,66): Hier befindet sich ebenfalls ein Phenol, das sich mit dem Reagenz nach Folin-Ciocalteu und mit Dichlorchinonchlorimid anfärben läßt. Der Schmelzpunkt beträgt 163° (korr.), λ_{max} (0,1n NaOH) = 299 nm) Aus dem IR-Spektrum und dem NMR-Spektrum läßt sich ablesen, daß ein Aromat mit den drei Substituenten $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{OC}_2\text{H}_5$ und $-\text{OH}$ vorliegt. Demnach handelt es sich um 3-Hydroxyphenacetin (2-Äthoxy-5-acetaminophenol). Zone 4 (R_f -Wert = 0,49): Dem R_f -Wert sowie dem UV- und IR-Spektrum nach entspricht die hier befindliche Substanz authentischem *N*-Acetyl-*p*-aminophenol (4-Hydroxyacetanilid).

Die einfachsten hydroxylierenden Systeme bestehen aus reduzierten Schwermetallionen, die molekularen Sauerstoff reduzieren. In Tabelle 1 sind die wichtigsten dieser Systeme aufgeführt.

Neben der Hydroxylierung in 2- und 3-Stellung des aromatischen Kerns beobachtet man auch eine Desalkylierung des Phenacetins. Das Verhältnis der Kernhydroxylierung zur Desalkylierung variiert von System zu System stark. Die Produkte wurden stets nach einer gleichlang gewählten Inkubationsdauer bestimmt. Die Ausbeuten entsprechen daher nicht den nach vollständiger Oxydation der eingesetzten Menge an Schwermetall maximal möglichen Ausbeuten.

TABELLE 1. HYDROXYLIERUNG UND DESALKYLIERUNG VON PHENACETIN IN SYSTEMEN MIT REDUZIERTEN SCHWERMETALLIONEN UND SAUERSTOFF

No.	System	Ausbeute μMol	2-Hydroxy- phenacetin %	3-Hydroxy- phenacetin %	4-Hydroxy- acetanilid %
1	$\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{O}_2$	0,91	$32 \pm 0,1$	$34 \pm 0,7$	$34 \pm 0,6$
2	$\text{Fe}^{2+}/\text{P}_2\text{O}_7^{4-}/\text{O}_2$	1,45	$29 \pm 0,5$	$32 \pm 0,5$	$39 \pm 0,7$
3	$\text{Fe}^{2+}/\text{Citrat}/\text{O}_2$	0,52	$30 \pm 0,9$	$30 \pm 1,4$	$40 \pm 2,3$
4	$\text{Cu}^{1+}/\text{O}_2$	1,72	$20 \pm 0,4$	$46 \pm 0,4$	$34 \pm 0,5$
5	$\text{Ti}^{3+}/\text{O}_2$	0,03	$16 \pm 1,8$	$28 \pm 1,4$	$56 \pm 2,1$
6	V^{2+}/O_2	0,32	$26 \pm 2,1$	$31 \pm 1,8$	$43 \pm 1,9$
7	$\text{Sn}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{O}_2$	0,21	$27 \pm 1,7$	$28 \pm 1,4$	$45 \pm 0,8$

Konzentrationen: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 μMol , CuCl 20 μMol , TiCl_3 (15%ige Lös.) 20 μMol , VCl_2 (10%ige Lös.)* 20 μMol , $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 μMol , EDTA 30 μMol , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 H_2O 60 μMol , $\text{Na}_2\text{-citrat}$ 50 μMol , Na_2HPO_4 200 μMol . Phenacetin 10 μMol . Endvolumen 2 ml.

Versuchsbedingungen: Phenacetin wird in 1,0 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5,8 gelöst. Nach Zugabe des Metallions und des Komplexbildners wird mit Wasser auf ein Endvolumen von 2,0 ml aufgefüllt und der pH auf 5,8 (bei No 2 pH 10,2, bei No 7 pH 9,5) eingestellt. Es wird 40 min. bei 25° in Schliffreagenzgläsern durch Schütteln an der Luft inkubiert. Bei zu geringen Ausbeuten wurden Mehrfachansätze durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittel aus fünf Versuchen.

* Für die Präparation danken wir Herrn Dr. H. W. Loh.

Wie wir früher gezeigt haben, ist für ein hydroxylierendes System die Autoxydation von reduzierten Schwermetallionen erforderlich.⁷ Gelingt es daher durch Zusatz geeigneter Reduktionsmittel, das oxydierte und damit inaktive Metallion in die niedrigere aktive Wertigkeitsstufe zurückzuführen, so genügen bereits katalytische Mengen des Schwermetalls. Reduziert man den Eisen (III)-EDTA-Komplex mit Ascorbinsäure, so erhält man das bekannte Udenfriend-System. In den Versuchen der Tabelle 2 wird neben Ascorbinsäure auch Ninhydrin, sowie metallisches Eisen und Kupfer zur Reduktion der Schwermetallionen eingesetzt. Wie Versuch 8 zeigt, kann der inaktive Fe^{3+} -EDTA-Komplex auch kathodisch reduziert werden. Demnach kommt dem Reduktionsmittel keine spezifische Bedeutung zu.

Bei den mikrosomalen mischfunktionellen Oxygenasen wird die terminale Oxydase, das Cytochrom P 450, durch NADPH oder auch NADH reduziert. Diese Reduktion ist an die Anwesenheit eines Elektronenüberträgers gebunden, der den Zweielektronenschritt (Hydridion) in zwei Einelektronenschritte auflöst. Das gilt auch für die nicht-enzymatischen Systeme, in denen Methylenblau oder Flavine diese Rolle übernehmen können (Versuche 1–5, Tabelle 3). Da in den Mikrosomen die Elektronenübertragung von NADPH auf Cytochrom P 450 sehr wahrscheinlich über die flavinhaltige Cytochrom c-Reduktase verläuft,¹³ kann Versuch 6 als Modell für den Elektronentransport der mischfunktionellen Oxygenasen angesehen werden.⁹

Durch Radikalfänger läßt sich die Hydroxylierung und Desalkylierung des Phenacetins fast vollständig hemmen (Tabelle 4). Hydrochinon ist ein weitgehend unspezifischer Radikalfänger, während Sulfit,¹⁴ Mangan (II)-Ionen,^{15, 16} *p*-Nitrosodimethylanilin¹⁷ und Kaliumbromid¹⁸ als mehr oder minder spezifische Fänger für Sauerstoffradikale gelten.

TABELLE 2. HYDROXYLIERUNG UND DESALKYLIERUNG VON PHENACETIN IN AEROBEN SYSTEMEN MIT KATALYTISCHEN MENGEN SCHWERMETALLIONEN UND ELEKTRONENDONATOREN

No.	System	Ausbeute μMol	2-Hydroxy- phenacetin %	3-Hydroxy- phenacetin %	4-Hydroxy- acetanilid %
1	Fe ³⁺ /EDTA/Asc.*/O ₂	2,78	34	34	32
2	Fe ³⁺ /P ₂ O ₇ ⁴⁻ /Asc./O ₂	1,03	27	37	36
3	Fe ³⁺ /EDTA/Ninh.†/O ₂	1,32	33	30	37
4	Cu ²⁺ /Asc./O ₂	2,23	26	33	41
5	Fe ³⁺ /EDTA/Fe _{met} /O ₂	1,55	31	32	37
6	Cu ²⁺ /Cu _{met} /O ₂	0,17	31	38	31
7	Fe ³⁺ /EDTA/O ₂ /e (Kathode)	0,33	31	32	37

* Asc. = Ascorbinsäure

† Ninh. = Ninhydrin

Konzentrationen in 2,0 ml: Fe₂(SO₄)₃ 9H₂O und CuSO₄ · 5H₂O 5 μMol, EDTA 7,5 μMol, Na₂P₂O₇ · 10 H₂O 15 μMol, Ascorbinsäure 30 μMol, Ninhydrin 30 μMol, Fe- und Cu-Pulver 20 mg. Versuch 7 wurde als 100 facher Ansatz durchgeführt und die Ausbeuten auf 20 μMol Elektronen umgerechnet. Die Reduktion erfolgte an einer Platin-Netzelektrode mit KCl-Brücke.

Es wurde 6 Stunden bei 25°, mit 3,8 mA und 2,0 V elektrolysiert. Alle übrigen Versuchsbedingungen sind in Tabelle 1 angegeben. Die Werte sind Mittel aus drei Versuchen.

TABELLE 3. REDUKTION DES EISEN (III)-EDTA KOMPLEXES MIT PYRIDINNUKLEOTIDEN

No.	System	Ausbeute μMol	2-Hydroxy- phenacetin %	3-Hydroxy- phenacetin %	4-Hydroxy- acetanilid %
1	Fe ³⁺ /EDTA/NADH/O ₂	0,00	—	—	—
2	Methylenblau/NADH/O ₂	0,08	—	—	—
3	FMN/NADH/O ₂	0,03	—	—	—
4	Fe ³⁺ /EDTA/Me.blau/ NADH/O ₂	0,71	33	34	33
5	Fe ³⁺ /EDTA/FMN/NADH/O ₂	0,37	29	32	39
6	Fe ³⁺ /EDTA/Cyt.-C-red./ NADPH/O ₂	0,46	33	33	34

Konzentrationen in 2,0 ml: Fe₂(SO₄)₃ · 9H₂O 5 μMol, EDTA 7,5 μMol Methylenblau 4 μMol, FMN 4 μMol, NADH und NADPH 8 μMol, Cytochrom c-Reduktase 0,1 m Phosphat-puffer bei Hp 7,0 unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen im diffusen Tageslicht inkubiert. Die Werte sind Mittel aus drei Versuchen.

Hinweise auf den näheren Reaktionsmechanismus der Sauerstoffradikale können aus dem Verhältnis der Ausbeuten der drei entstehenden Oxidationsprodukte von Phenacetin erhalten werden.

Zunächst stellt man bei der Betrachtung dieser Werte fest, daß die Relationen der Oxidationsprodukte in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Schwermetallkomplexes stark variieren. Wie wir zuerst mit Acetanilid und später auch mit anderen

aromatischen Verbindungen¹⁹ zeigen konnten, ist dieses Verhalten charakteristisch für die Oxidationen mit reduzierten Schwermetallionen und molekularem Sauerstoff. Es ließ sich zeigen, daß die Ursache dafür in dem Auftreten mindestens zweier verschiedener Sauerstoffradikale (das OH-Radikal und sehr wahrscheinlich das Sauerstoffatom 'Oxen') zu suchen ist. Je nachdem ob an der Oxidation der Substrate mehr OH-Radikale oder mehr Sauerstoffatome beteiligt sind, beobachtet man Unterschiede in der Art und dem Verhältnis der Oxidationsprodukte.

TABELLE 4. HEMMUNG DER HYDROXYLIERUNG UND DESALKYLIERUNG VON PHENACETIN IM SYSTEM $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{O}_2$ DURCH RADIKALFÄNGER

No.	Hemmstoff	Hemmung %
1	—	0
2	Hydrochinon	85 \pm 9
3	Sulfitionen	78 \pm 3
4	Mangan (II)-ionen	94 \pm 2
5	<i>p</i> -Nitroso-dimethylanilin	60 \pm 9
6	Kaliumbromid	71 \pm 3

Konzentrationen der Hemmstoffe in 2,0 ml = 50 μMol . Alle übrigen Bedingungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Werte sind Mittel aus drei Versuchen.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Phenacetin-Oxidation bei den beiden reinen Hydroxylierungssystemen und bei einem anderen System aufgeführt, in dem beide Oxydationsmechanismen zusammen auftreten. Gleichzeitig wurde die Abhängigkeit der Verteilung der Produkte von der Reaktionstemperatur verfolgt. Wird die Oxidation mit OH-Radikalen, wie bei der Reduktion von Wasserstoffperoxyd durch den Fe^{2+} -EDTA-Komplex in Gegenwart von Ascorbinsäure und unter Ausschluß von Sauerstoff durchgeführt,⁶ so erhält man neben der Hydroxylierung in Stellung 2 zur *N*-Acetylgruppe eine hohe Hydroxylierungsrate in Stellung 3 und eine relativ geringe Abspaltung der Äthoxylgruppe. Der Einfluß der Temperatur ist nur gering und wirkt sich in einem geringfügigen Anstieg der Desalkylierungsrate aus. In dem System $\text{Sn}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{O}_2$ verläuft dagegen die Hydroxylierung fast ausschließlich nach dem Oxen-Mechanismus.²⁰ Hier findet man einen hohen Anteil an Desalkylierungsprodukt und gleiche Mengen 2- und 3-Hydroxyphenacetin. Oberhalb 25°C ist keine Änderung der Produktverteilung mit der Temperatur zu beobachten. Nur bei einer Ernie-drigung der Temperatur nimmt der Prozentsatz der Desalkylierung noch etwas zu.

Im System $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{O}_2$ hingegen ist der relative Anteil der verschiedenen Oxydationsprodukte von Phenacetin von der Versuchstemperatur abhängig. Der relative Anteil der Desalkylierung am Gesamtumsatz von Phenacetin nimmt mit steigender Temperatur ab, während sich der Anteil an kernhydroxylierten Produkten erhöht. Die absolute Ausbeute an 4 Hydroxy-*N*-Acetyl-anilid (NAPAP) bleibt hingegen fast konstant. Die absolute Ausbeute an 2- und 3-OH Phenacetin hingegen nimmt mit steigender Temperatur zu. Die erhaltenen Werte bei 0° entsprechen dabei sehr gut denen des Sn^{2+} -Systems und bei 100° zeigen sie eine gute Übereinstimmung mit der Produktverteilung, die in dem System mit OH-Radikalen ($\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{N}_2$) erhalten wird. Ein ganz analoges Verhalten wurde früher bei der Hydroxylierung von Acetanilid in diesem System gefunden. Dieser starke Temperatureffekt auf die

TABELLE 5. VERTEILUNG DER REAKTIONSPRODUKTE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TEMPERATUR

t	System Fe ²⁺ /EDTA/O ₂			System Fe ₂ ⁺ /EDTA/Asc./H ₂ O ₂ /N ₂			System Sn ²⁺ /HPO ₄ ²⁻ /O ₂					
	Ausbeute μMol	2-Hydroxy- phenacetin %	3-Hydroxy- phenacetin %	4-Hydroxy- acetanilid %	Ausbeute μMol	2-Hydroxy- phenacetin %	3-Hydroxy- phenacetin %	4-Hydroxy- acetanilid %	Ausbeute μMol	2-Hydroxy- phenacetin %	3-Hydroxy- phenacetin %	4-Hydroxy- acetanilid %
0	0,51	19 ± 0,8	19 ± 0,8	62 ± 2,0	2,10	30 ± 0,5	47 ± 0,9	23 ± 0,2	0,20	22 ± 0,8	23 ± 0,4	55 ± 1,2
25	0,91	32 ± 0,1	34 ± 0,7	34 ± 0,6	3,01	27 ± 0,5	49 ± 0,1	24 ± 0,4	0,42	27 ± 1,5	28 ± 1,4	45 ± 0,2
50	2,00	32 ± 0,4	44 ± 0,1	24 ± 0,2	3,04	26 ± 0,7	48 ± 0,7	26 ± 0,7	1,40	27 ± 0,9	29 ± 0,6	44 ± 0,5
100	2,00	28 ± 2,0	43 ± 0,9	29 ± 1,0	3,05	25 ± 0,7	45 ± 0,4	30 ± 0,8	2,20	25 ± 0,9	29 ± 0,4	46 ± 0,7

Konzentration: System Fe²⁺/EDTA/O₂:FeSO₄·7 H₂O 20 μMol, EDTA 30 μMol. System Fe²⁺/EDTA/Ascorbinsäure/H₂O₂/N₂:FeSO₄·7 H₂O 5 μMol, EDTA 7,5 μMol, Ascorbinsäure 30 μMol, Phenacetin 10 μMol, H₂O₂ 15 μMol. System Sn²⁺/HPO₄²⁻/O₂: SnCl₂·2 H₂O 40 μMol, Na₂HPO₄ 400 μMol, Phenacetin 10 μMol. Endvolumen 2,0 ml.

Versuchsbedingungen: EDTA und Ascorbinsäure werden zusammen mit Phenacetin in 0,1 m Acetatpuffer auf pH 5,8 eingestellt und 5 Min mit N₂ durchströmt. Nach Zugabe der Eisenionen wird mit H₂O₂ gestartet und 6 Min unter N₂ inkubiert. SnCl₂ wird in NaOH gelöst und nach Zugabe der Phosphatlösung auf pH 9,0 eingestellt. Die aeroben Versuche bei 0 und 100°C werden mit Luft begast, die übrigen Ansätze an der Luft geschüttelt.

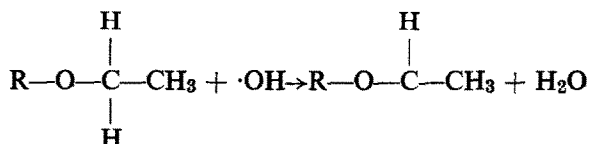
Verteilung der Oxidationsprodukte kann in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen⁸ auf unterschiedliche Temperaturabhängigkeit der an der Oxidation des Substrates beteiligten Mechanismen erklärt werden.

DISKUSSION

Für Phenacetin als Substrat nichtenzymatischer aerober Hydroxylierungssysteme werden ganz analoge Ergebnisse wie mit Acetanilid erhalten. Im Prinzip stellt jedes System, das den molekularen Sauerstoff durch Schwermetalle reduziert, ein potentielles Hydroxylierungssystem dar. Für die praktische Durchführung einer Substrathydroxylierung ist eine genügend große Geschwindigkeit der Sauerstoffreduktion notwendig, die aber fast immer durch die Wahl eines geeigneten Komplexbildners erreicht werden kann.

Ob die Hydroxylierungsaktivität durch das Metallion selbst, etwa durch eine Stabilisierung der Sauerstoffradikale beeinflusst wird, muß noch untersucht werden. Die Unterschiede in dem Verhältnis der Oxidationsprodukte lassen sich, wie schon bei den Versuchen mit Acetanilid als Substrat gezeigt wurde, auf eine konkurrierende Beteiligung von OH-Radikalen und Sauerstoffatomen (Oxen-Mechanismus) an der Oxidation des Phenacetins zurückführen. Die Hydroxylierung und Desalkylierung durch beide Sauerstoffradikale kommt dabei nach zwei sehr verschiedenen Mechanismen zustande.⁸

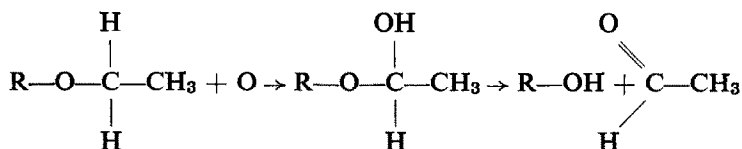
OH-Radikale greifen stabile CH-Bindungen praktisch nicht an^{11, 20} und addieren sich bevorzugt an das π -Elektronensystem des aromatischen Kerns.²¹ Der hohe relative Anteil der Kernhydroxylierung wird damit verständlich. Die Bevorzugung der 3-Stellung könnte bei der elektrophilen Natur des OH-Radikals auf eine höhere Elektronendichte in dieser Position zurückgeführt werden. Im Phenacetin sind die dem Äther-Sauerstoff benachbarten CH-Bindungen so labil, daß OH-Radikale neben der Addition an den Kern auch ein Wasserstoffatom abstrahieren können:



Das so entstandene Radikal kann mit einem weiteren OH-Radikal zum Phenol und Acetaldehyd weiterreagieren. Die Ätherspaltung mit Chloratomen findet nach dem gleichen Mechanismus statt.²² Man weiß, daß bei Radikalreaktionen eine Temperaturerhöhung allgemein zur Steigerung der Reaktivität und damit zur Abnahme der Selektivität führt.²³ Man kann daher annehmen, daß mit höherer Temperatur die Abstraktion des Wasserstoffatoms gegenüber der Addition an den Kern zunehmend an Gewicht gewinnt. Damit findet der sehr geringe, aber signifikante Anstieg der Desalkylierungsrate mit OH-Radikalen seine Erklärung.

Für den bisher nur sehr wenig untersuchten Oxen-Mechanismus konnte als charakteristische Eigenschaft eine direkte Oxidation der CH-Bindungen nachgewiesen werden. Da der Sauerstoff der OH-Gruppe aus dem Luftsauerstoff stammt,²⁴ ist die Einschlebung eines Sauerstoffatoms anzunehmen. Der Oxen-Mechanismus wird daher nicht von der Elektronendichte des aromatischen Kerns beeinflusst und führt zu einer

gleich hohen Kernhydroxylierung in Position 2 und 3. Schwächere CH-Bindungen werden auch bei diesem Mechanismus bevorzugt angegriffen ($\text{CH}_{\text{prim.}}:\text{CH}_{\text{tert.}}$ bei 2-Methylbutan = 1:2,8).²⁰ Die relativ hohe Desalkylierungsrate läßt sich daher durch folgenden Reaktionsablauf erklären:



Da Phenacetin in vivo von den mischfunktionellen Oxygenasen fast ausschließlich desalkyliert wird,² stellt der Oxen-Mechanismus ein wesentlich besseres Modell für die mikrosomalen mischfunktionellen Oxygenierungen dar als die Oxidation durch OH-Radikale. Auch die enzymatische *O*-Desalkylierung muß über eine direkte Oxidation der CH-Bindung am α -C-Atom des Alkylrestes verlaufen, da der Sauerstoff der als Aldehyd abgespaltenen Alkylgruppe aus dem Luftsauerstoff stammt.²⁵ Bereits von Gillette³ wurde der oben aufgeführte Desalkylierungsmechanismus durch ein Sauerstoffatom für die mikrosomalen Desalkylierungen postuliert.

Diese Vorstellungen lassen sich auch auf die Desalkylierungen am Stickstoff und Schwefel übertragen, da im Falle der *N*-Desalkylierung sogar das am α -Kohlenstoff hydroxylierte Zwischenprodukt aufgefunden werden konnte.²⁶

Die Annahme eines oxen-analogen Hydroxylierungsmechanismus in den Mikrosomen erklärt auch, warum kein Wasserstoffperoxyd als Zwischenprodukt der enzymatischen Sauerstoffreduktion auftritt. Dieser Mechanismus erklärt die enzymatische Hydroxylierung von Aliphaten (z.B. Steroiden) und die Dihydrodiol-Bildung von kondensierten Aromaten.¹¹ Beide Reaktionen laufen mit OH-Radikalen nicht ab.

Andererseits gibt es jedoch zwischen dem aktiven Sauerstoff der Mikrosomen und dem Oxen-Mechanismus in Modellen Unterschiede, die darauf hinweisen, daß das Sauerstoffatom bei enzymatischen Hydroxylierungen nicht frei, sondern an Metallionen am Enzym stabilisiert auftritt.¹⁶

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die gewährte Unterstützung.

Zusammenfassung—(1) An Modellsystemen (reduzierte Schwermetallkomplexe und O_2), die ursprünglich zum Studium der Wirkungsweise mikrosomaler Hydroxylasen Verwendung fanden, wurde die Hydroxylierung und die oxydative Desalkylierung von Phenacetin untersucht.

(2) Unter den Oxydationsprodukten wurde neben 2-Hydroxyphenacetin das bisher noch nicht beschriebene 3-Hydroxyphenacetin nachgewiesen und isoliert.

(3) Das Verhältnis von Kernhydroxylierung zu oxydativer Desalkylierung hängt von den verwendeten Modellsystemen ab. Dieser Befund läßt sich durch die Beteiligung zweier Oxidationsmechanismen erklären.

(4) Für die Hydroxylierung am aromatischen Ring von Phenacetin sind vorwiegend OH-Radikale, für die *O*-Desalkylierung wahrscheinlich Sauerstoffatome ('Oxen-Mechanismus') verantwortlich.

Verwendete Abkürzungen:

NAPAP = *N*-Acetyl-*p*-aminophenol

FMN = Flavin-mononukleotid

EDTA = Dinatriumsalz der Äthylendiämin-tetraessigsäure

Anerkennung—Wir danken Herrn K. H. Sommerlad für Hilfe bei der experimentellen Arbeit und Herrn Dr. H. Ahlbrecht für die Aufnahme des NMR-Spektrums.

LITERATUR

1. A. KLUTCH, M. HARFENIST and A. H. CONNEY, *J. mednl Chem.* **9**, 63 (1966).
2. H. BÜCH, K. PFLEGER, W. RUMMEL, V. ULLRICH, D. HEY und HJ. STAUDINGER, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2247 (1967).
3. J. R. GILLETTE, *Arzneimittel-Forsch.* **6**, 11 (1963).
4. B. B. BRODIE, J. AXELROD, P. A. SHORE, S. UDENFRIEND, *J. biol. Chem.* **208**, 741 (1954).
5. B. B. BRODIE und J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **97**, 58 (1949).
6. R. BRESLOW und L. N. LUKENS, *J. biol. Chem.* **235**, 292 (1960).
7. HJ. STAUDINGER und V. ULLRICH, *Z. Naturf.* **19b**, 409 (1964).
8. HJ. STAUDINGER und V. ULLRICH, *Z. Naturf.* **19b**, 877 (1964).
9. HJ. STAUDINGER und V. ULLRICH, *Biochem. Z.* **339**, 491 (1964).
10. R. O. C. NORMAN and J. R. LINDSAY SMITH, *Oxidases and Related Redox Systems*, Bd. 5, S. 131. Wiley, New York (1965).
11. V. ULLRICH and HJ. STAUDINGER, in *Biological and Chemical Aspects of Oxigenases*, (Eds. K. BLOCH and O. HAYAISHI), S. 235. Maruzen Company, Tokio, (1966).
12. T. OMURA and R. SATO, *Biochem. biophys. Acta* **71**, 224 (1962).
13. T. OMURA, R. SATO, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL and R. W. ESTABROOK, *Fedn Proc.* **24**, 1181 (1965).
14. I. FREDOVICH and P. HANDLER, *J. biol. Chem.* **236**, 1836 (1961).
15. I. YAMAZAKI and L. H. PIETTE, *Biochim. biophys. Acta* **77**, 47 (1963).
16. V. ULLRICH, D. HEY, Z. ZUBRZYCKI und HJ. STAUDINGER, *Z. Naturf.* **20b**, 1185 (1965).
17. I. KRALJIC and C. N. TRUMBORE, *J. Am. chem. Soc.* **87**, 2547 (1965).
18. D. G. MARKETOS und N. TH. RAKINTZIS, *Z. phys.-Chem. N.F.* **44**, 285 (1965).
19. E. AMADORI, Dissertation, Gießen, in Vorbereitung.
20. V. ULLRICH, E. AMADORI und HJ. STAUDINGER, *Z. Naturf.* **22b**, 226 (1967).
21. L. M. DORFMAN, I. A. TAUB, R. E. BÜCHLER, *J. chem. Phys.* **36**, 3051 (1962).
22. H. SINGH and J. M. TEDDER, *J. chem. Soc.* 612 (1966).
23. E. S. GOULD, *Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie*, S. 847. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1962).
24. H. S. MASON and I. ONOPRYENKO, *Fedn Proc.* **15**, 310 (1956).
25. J. RENSON, W. WEISSBACH and S. UDENFRIEND, *Molec. Pharmac.* **1**, 145 (1965).
26. H. KEBERLE, W. RIESS, K. SCHMID und K. HOFFMANN, *Archs int. Pharmacodyn. Ther.* **142**, 125 (1963).