

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN OXYDATIVEN STOFFWECHSEL DES PHENACETINS BEI DER RATTE

H. BÜCH, K. PFLEGER und W. RUMMEL,

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

V. ULLRICH, D. HEY und HJ. STAUDINGER

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

(Received 9 June 1967; accepted 17 July 1967)

Abstract—Following the administration of phenacetin to rats the urinary excretion of phenacetin, *N*-acetyl-*p*-aminophenol, *N*-acetyl-*p*-aminophenol-sulfate, *N*-acetyl-*p*-aminophenolglucuronide, *p*-phenetidine, 2-hydroxyphenetidinesulfate and 2-hydroxyphenacetin was measured 3-hydroxyphenacetin was detected as a new metabolite of phenacetin.

In vitro, 2-hydroxyphenacetin and 3-hydroxyphenacetin were found in rat liver slices and in the 20,000 g liver fraction as metabolites of phenacetin. Results obtained with *p*-phenetidine *in vitro* indicate that the high percentage of 2-hydroxyphenetidine in the overall excretion of phenacetin *in vivo* is due to the hydroxylation of *p*-phenetidine and does not result from hydroxylation of phenacetin followed by deacetylation.

SEIT den Untersuchungen von Brodie und Axelrod¹ und Smith und Williams² ist bekannt, daß Phenacetin hauptsächlich durch eine oxydative *O*-Desalkylierung zum *N*-Acetyl-*p*-aminophenol abgebaut wird. Dieses wird größtenteils konjugiert (mit Schwefelsäure bzw. mit Glucuronsäure) im Harn ausgeschieden. Die darüberhinaus mögliche Desacetylierung von Phenacetin zu *p*-Phenetidin besitzt für den Metabolismus quantitativ nur eine untergeordnete Bedeutung, da sie weniger als 1 Prozent der verabreichten Phenacetinmenge ausmacht.^{1, 2} Dennoch ist dieser Abbauweg von toxikologischem Interesse, da *p*-Phenetidin für die Entstehung methämoglobinbildender Metabolite verantwortlich zu machen ist.^{3, 4} Als weiteres Umwandlungsprodukt fanden Conney und Mitarb⁵ nach Körperpassage von Phenacetin bei verschiedenen Spezies (Mensch, Katze, Hund) 2-Hydroxyphenacetin in Mengen von 0,2–2,0% der verabreichten Dosis. Für die Entstehung dieses Metaboliten lassen sich zwei mögliche Reaktionswege diskutieren:

- (1) Eine direkte Kernhydroxylierung von Phenacetin und
- (2) eine Hydroxylierung von intermediär entstandenem *p*-Phenetidin zu 2-Hydroxyphenetidin und dessen erneute Acetylierung.

In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte das 2-Hydroxyphenacetin auch bei der Ratte im Harn nachgewiesen werden. Der Anteil von 2-Hydroxyphenacetin an der Gesamtausscheidung wurde gemessen. Aus den Ergebnissen von *in vitro* Versuchen mit verschiedenen Leberfraktionen und Phenacetin bzw. *p*-Phenetidin als Substrat ließen sich Anhaltspunkte für den Weg der Entstehung des 2-Hydroxyphenacetins gewinnen.

Bei Untersuchungen zum Mechanismus der oxydativen *O*-Desalkylierung und der Hydroxylierung von Phenacetin in Modellsystemen⁶ entsteht neben dem 2-Hydroxyphenacetin auch das 3-Hydroxy-Derivat. Es wurde deshalb außerdem noch geprüft, ob dieses Umwandlungsprodukt des Phenacetins auch *in vivo* als Ausscheidungsprodukt im Harn auftritt bzw. *in vitro* in Gegenwart von verschiedenen Leberfraktionen gebildet wird.

MATERIAL UND METHODEN

2-Hydroxy-phenacetin und das *p*-Phenetidinhydrochlorid wurden uns von der Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss, zur Verfügung gestellt.* 3-Hydroxy-phenacetin wurde durch Hydroxylierung von Phenacetin (in Modellsystemen) gewonnen.⁶ 2-Hydroxy-phenetidinhydrochlorid wurde durch salzsaure Hydrolyse aus 2-Hydroxy-phenacetin dargestellt. Die Tierversuche wurden mit Phenacetin, DAB 6, der Farbenwerke Hoechst AG vorgenommen.

Von der Firma C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim, stammten: NADP, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowie das Enzympräparat β -Glucuronidase + Arylsulfatase (*Helix pomatia*).

Das Reagenz nach Folin und Ciocalteu (Firma E. Merck, Darmstadt) wurde zum Gebrauch 1:3 verdünnt.

Für eine Probe E 600 (98–99% rein) danken wir Herrn Dr. Schrader von den Farbfabriken Bayer, Leverkusen.

Tierversuche

Es wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von *ca* 250 g verwendet. Zum Auffangen des Harns saßen die Tiere in kleinen Stoffwechselkäfigen, die eine Trennung von Urin und Kot sicher gewährleisten. Der Urin wurde entweder sofort aufgearbeitet oder bei –5°C bis zur Analyse aufbewahrt. Phenacetin wurde im Mörtel fein zerrieben und in 0,9% NaCl-Lösung unter Zugabe von 0,1% Tragant suspendiert. Die Verabreichung erfolgte *ip*.

In vitro-Versuche mit Leber

Die Lebern stammten von männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von *ca.* 200 g und wurden vor der Aufarbeitung in eiskalter 0,25 m Saccharose-Lösung gewaschen.

(a) *Leberschnitte*. Diese (Gesamtmenge 3 bzw. 1,5 g) wurden in 50 bzw. 25 ml Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung (pH 7,5) mit 0,25% Glucose bei 37°C während 120 Min. unter leichtem Schütteln in O₂-Atmosphäre inkubiert. Die übrigen Angaben sind in den Legenden zu Tabelle 3 bzw. Tabelle 4 enthalten.

(b) *Homogenat-Fraktionierung*. Die Rattenlebern wurden in dem 3-fachen Volumen 0,25 m Saccharose-Lösung homogenisiert und die Kerne sowie die Mitochondrien während 20 Min. bei 20.000 g abzentrifugiert. Aus diesem 20.000 g Überstand wurde durch einstündige Zentrifugation die Mikrosomenfraktion als Sediment gewonnen. Die Mikrosomen wurden anschließend in 0,05 m Tris-Puffer (pH 7,5) homogenisiert, so daß 2,0 ml dieser Suspension 1 g Leber entsprach. Der Protein-Gehalt wurde nach der Biuret-Methode bestimmt.

* Der Firma Dr. Karl Thomae GmbH sei an dieser Stelle für die Überlassung der genannten Produkte gedankt.

Isolierung und Bestimmung der Umwandlungsprodukte

(a) *Isolierung aus dem Harn.* Die Konjugate des *N*-Acetyl-*p*-aminophenols (Sulfat bzw. Glucuronid) werden nach einer bereits beschriebenen Methode dünnschichtchromatographisch isoliert.⁷ Zur Abtrennung eines weiteren Phenacetin-Metaboliten, des 2-sulfonyloxy-phenetidins, vom *N*-Acetyl-*p*-aminophenolsulfat wird auf derselben Dünnschichtplatte mit dem sauren Fließmittel IV eine zweite Chromatographie durchgeführt. Fließmittelzusammensetzung und R_F -Werte der betreffenden Substanzen sind in der Tabelle 1 angegeben. Nicht konjugiertes *N*-Acetyl-*p*-aminophenol und unverändertes Phenacetin, die nur in geringer Konzentration im Harn ausgeschieden werden, extrahiert man mit Butanol-(1). Einzelheiten dieser Methode sind ebenfalls bereits beschrieben.⁷

2-Hydroxy-phenacetin und 3-Hydroxy-phenacetin werden im Harn nur in geringer Konzentration größtenteils mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure konjugiert ausgeschieden. Zur Hydrolyse dieser Konjugate wird der Harn nach Zugabe von 1 m Acetatpuffer (pH 5) und von 0,1 ml einer Lösung von β -Glucuronidase + Arylsulfatase für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzymprotein durch Zugabe von 0,2 ml 1,7% Uranylacetat-Lösung und Erhitzen auf 80°C (10 Min.) gefällt und durch Zentrifugation (5 Min. bei 4000 U/Min.) sedimentiert. Der Überstand je eines Ansatzes wird quantitativ in einen Schütteltrichter übergeführt, mit Kochsalz gesättigt, mit 0,5 ml 5 n Salzsäure angesäuert und mit jeweils dem 5-fachen Volumen Chloroform dreimal extrahiert. Der nach dem Einengen des Extraktes verbleibende Rückstand wird in Methanol aufgenommen, auf Dünnschichtplatten aufgetragen und mit Fließmittel I (siehe Tabelle 1) chromatographiert. Die 2-Hydroxy-phenacetin bzw. 3-Hydroxy-phenacetin enthaltenden Kieselgelzonen werden von der Dünnschichtplatte abgelöst und mit Methanol eluiert. Nach Einengen des Eluates erfolgt die Rechromatographie mit Fließmittel II.

TABELLE 1. R_F -WERTE

Fließmittel	Phenacetin	<i>o</i> -OH-Phenacetin	<i>m</i> -OH-Phenacetin	NAPAP	NAPAP-sulfat	NAPAP-glucuronid	2-sulfonyloxy-phenetidin
I	0,92	0,74	0,66	0,49	—	—	—
II	0,75	0,69	0,53	0,36	—	—	—
III	0,92	—	—	0,92	0,68	0,20	0,73
IV	0,91*	—	—	0,78*	0,50*	0,17	0,63*
V	0,94	0,75	0,76	0,80	—	—	—

Fließmittel I = Chloroform/iso-Propanol/33-proz. Ammoniak (80:15:5), im Schütteltrichter kräftig geschüttelt, 90 ml der unteren Phase + 5 ml Methanol.

Fließmittel II = Benzol/Methanol/Eisessig (45:8:4).

Fließmittel III = Aceton/Butanol-(1)/Wasser (50:40:10).

Fließmittel IV = Dichloräthan/Essigsäureäthylester/98-proz. Ameisensäure (60:20:20).

Fließmittel V = Chloroform/iso-Propanol/33-proz. Ammoniak (45:45:10).

* Nach Chromatographie mit Fließmittel III über eine Laufstrecke von 10 cm und kurzem Trocknen der Platte erneut aufsteigende Chromatographie in der gleichen Richtung mit dem Fließmittel IV über eine Laufstrecke von 16 cm.

Zur Isolierung von *p*-Phenetidin wird die nach der sauren Extraktion zurückbleibende wässrige Phase mit 5 n Natronlauge neutralisiert und zweimal mit dem 5-fachen Volumen Äther ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt wird eingengt, quantitativ auf Dünnschichtplatten aufgetragen und in Fließmittel II aufgetrennt (R_F -Wert des *p*-Phenetidins = 0,28).

(b) *Isolierung aus den Inkubationsansätzen mit Leberschnitten bzw. Fraktionen von Leberhomogenaten.* Die Ansätze mit Phenacetin werden nach der Inkubation mit Kochsalz versetzt und dreimal mit 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der gesamte Chloroformextrakt wird danach auf 20 ml eingengt und die Phenole in 1 ml 3 n Natronlauge durch Schütteln überführt. Die wässrige alkalische Phase wird abgehoben, angesäuert und mit Kochsalz gesättigt. Die Phenole können nun durch zweimaliges Ausschütteln mit 10 ml Äther extrahiert werden. Nach dem Abdampfen des Äthers wird der Rückstand quantitativ auf Dünnschichtplatten aufgetragen und in Fließmittel II aufgetrennt.

Die Ansätze mit *p*-Phenetidin werden nach der Inkubation mit Kochsalz gesättigt und zweimal mit 100 ml Äther ausgeschüttelt. Aus der Ätherphase lassen sich die freien Amine (*p*-Aminophenol und 2-Hydroxy-phenetidin) durch Schütteln in 10 ml 0,02 n Salzsäure überführen.

(c) *Bestimmung der Ausscheidungs- bzw. Umwandlungsprodukte.* Die Bestimmungsverfahren für Phenacetin, NAPAP und dessen Konjugate nach der Isolierung aus dem Harn sind an anderer Stelle mitgeteilt.⁷

Zur Bestimmung des 2-Hydroxy-phenetidins wird die Kieselgelfraktion, welche das im Urin ausgeschiedene 2-sulfonyloxy-phenetidin enthält (siehe Abschnitt a) abgelöst und mit 2 ml 2 n HCl hydrolysiert. Durch Zugabe von Natriumkarbonat wird das Hydrolysat bzw. bei den *in vitro* Versuchen ein aliquoter Teil der salzsauren Lösung (siehe Abschnitt b) neutralisiert, wobei das 2-Hydroxy-phenetidin zu dem gelben 3-Amino-7-äthoxy-phenoxazon-(2) kondensiert.^{8,9} Dieses gelbe Kondensationsprodukt wird mit Chloroform extrahiert. In Chloroform wird bei 455 nm ($d = 1$ cm) die Extinktion ermittelt. Zur Aufstellung der Eichkurve werden ansteigende Konzentrationen von 2-Hydroxy-phenacetin nach Hydrolyse mit Salzsäure (zur Abspaltung der Acetylgruppe) der gleichen Prozedur unterworfen.

2-Hydroxy-phenacetin und 3-Hydroxy-phenacetin werden mit dem Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteus bestimmt.¹⁰ Die hier verwendete Modifikation dieser Bestimmungsmethode ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben.¹¹ Sehr niedrige Mengen von 2-Hydroxy- und 3-Hydroxy-phenacetin konnten nur halbquantitativ durch Vergleich mit Eichwerten bekannter Konzentrationen nach Ansprühen auf der Dünnschichtplatte bestimmt werden.

p-Aminophenol wird in einem aliquoten Teil der salzsauren Lösung (siehe Abschnitt b) nach einer Vorschrift von Brodie und Axelrod¹² bestimmt. Hypobromid erwies sich zur Oxydation als ungeeignet, da es anwesendes *p*-Phenetidin unter *O*-Desalkylierung angreift. Diese Störung läßt sich durch Verwendung von Hypojodid umgehen.

Das aus Urin isolierte *p*-Phenetidin (siehe Abschnitt a) läßt sich nach Diazotieren mit α -Naphthol kuppeln und bestimmen.¹

Zum Nachweis und zur eventuellen Bestimmung von 3-Hydroxy-phenetidin wurde der eingengte Ätherextrakt (siehe Abschnitt b) eines Mikrosomenansatzes acetyliert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

ERGEBNISSE

(a) Nachweis und quantitative Erfassung der nach Gabe von Phenacetin ausgeschiedenen Umwandlungsprodukte

Neben bisher bekannten Ausscheidungsprodukten des Phenacetins wurden zwei noch nicht beschriebene Umwandlungsprodukte im Urin der Ratte vorgefunden. Bei einer der Substanzen handelt es sich, wie durch Vergleich ihres IR-Spektrums mit der authentischen Verbindung festgestellt wurde, um das 2-Hydroxy-phenacetin. Das zweite Produkt, das in geringerer Konzentration ausgeschieden wird, wurde anhand seines chromatographischen Verhaltens in 3 Fließmitteln, seiner Reaktionen mit Dichlorchinonchlorimid bzw. Folin's Reagenz und seines UV-Spektrums als 3-Hydroxy-phenacetin identifiziert. Der Anteil beider Metabolite an der Gesamtausscheidung ist zusammen mit den übrigen Umwandlungsprodukten in Tabelle 2 angegeben.

TABELLE 2. AUSSCHIEDUNG VON PHENACETIN UND DESSEN UMWANDLUNGSPRODUKTEN BEI DER RATTE

Tiere: weibl. Wistar-Ratten, 250–300 g; Dosis und Art der Verabreichung: 200 mg/kg (ca. 300 μ Mol/Tier) ip.

Sammelharn: 0–8 Std. nach Verabreichung des Phenacetins. (Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus 12 Einzelversuchen.)

	μ Mol	% der gegebenen Dosis
Phenacetin	1,4	0,5
NAPAP	10,4	3,5
NAPAP-sulfat	98,8	32,9
NAPAP-glucuronid	65,1	21,7
2-sulfonyloxy-phenetidin	18,2	6,1
p-Phenetidin	0,9	0,3
3-Hydroxy-phenetidin	—	—
2-Hydroxy-phenacetin	0,2	0,07
3-Hydroxy-phenacetin	0,1	0,04
in 8 Stunden insgesamt	195,1	65,1

Zur Prüfung der Frage, inwieweit durch Phenobarbital-Vorbehandlung bei der Ratte die O-Desalkylierung des Phenacetins und die Konjugation des entstandenen NAPAP induzierbar sind, wurden bereits Untersuchungen über die Ausscheidung von Phenacetin, NAPAP und dessen Konjugate im Zeitraum von 0–4 Stunden nach Applikation durchgeführt.¹³ Bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnissen wurde neben der quantitativen Erfassung der noch nicht beschriebenen Metabolite außerdem die untersuchte Ausscheidungsperiode auf 0–8 Stunden ausgedehnt (Tabelle 2).

Von den insgesamt verabreichten 300 μ Mol Phenacetin pro Tier werden in 8 Stunden 65% als Ausscheidungsprodukte im Urin wiedergefunden. Davon werden nur 0,5% als Phenacetin, d.h. unverändert, ausgeschieden. Der größte Teil (58% der gegebenen Dosis) wird O-desalkyliert und vorwiegend in konjugierter Form ausgeschieden.

Die Gesamtmenge der gemessenen kernhydroxylierten Ausscheidungsprodukte beträgt dagegen nur 6,2% der verabreichten Dosis. Das 2-Hydroxy-phenetidin (konjugiert mit Schwefelsäure) bildet mit 6% den Hauptanteil der kernhydroxylierten Ausscheidungsprodukte. 3-Hydroxy-phenetidin konnte dagegen nicht gefunden werden. Die Ausscheidung an 2-Hydroxy- und 3-Hydroxy-phenacetin beträgt zusammen genommen weniger als 0,2% der verabreichten Phenacetin-Dosis.

(b) *Hydroxylierung und oxydative O-Desalkylierung von Phenacetin in Leberpräparaten*

Es war bekannt, daß Phenacetin in der Mikrosomenfraktion der Leber durch mischfunktionelle Oxygenasen zu *N*-Acetyl-*p*-aminophenol desalkyliert wird.¹⁴ Das Vorkommen von 2-Hydroxy-phenacetin und 3-Hydroxy-phenacetin *in vivo* wies darauf hin, daß in geringem Umfang auch der Kern hydroxyliert wird. Die Ausscheidung dieser beiden Phenole im Urin konnte jedoch nicht allein als Beweis für eine Hydroxylierung des Phenacetins selbst angesehen werden. Denn diese Produkte könnten nach Desacetylierung des Phenacetins und nachfolgende Hydroxylierung von *p*-Phenetidin durch Reacetylierung entstanden sein. Umgekehrt kommen für die Entstehung des 2-Hydroxy-phenetidins, das im Urin in beträchtlicher Menge als Schwefelsäurekonjugat ausgeschieden wird, theoretisch zwei Möglichkeiten in Frage: (1) Phenacetin wird zu *p*-Phenetidin desacetyliert und dieses in 2-Stellung hydroxyliert. (2) Phenacetin wird in 2-Stellung hydroxyliert und dann desacetyliert.

Es wurde zunächst geprüft, ob nach Inkubation von Phenacetin in Leberpräparationen mit NADPH 2-Hydroxy- und 3-Hydroxy-phenacetin nachgewiesen werden können. Bei diesen Versuchsansätzen wurde die Abspaltung der Acetylgruppe des Phenacetins durch die mikrosomale Leberesterase¹⁵ durch Zugabe von E₆₀₀ (*p*-Nitrophenylphosphat), das als spezifischer Inhibitor für dieses Enzym bekannt ist,¹⁶ verhindert.

TABELLE 3. HYDROXYLIERUNG UND DESALKYLIERUNG VON PHENACETIN IN LEBERPRÄPARATIONEN

Für jeden Versuch werden 3 g Leber bzw. die entsprechende Menge Leberfraktion eingesetzt. Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 ml folgende Zusätze: Phenacetin 2×10^{-3} M. Nikotinsäureamid 2×10^{-3} M, MgCl₂ 2×10^{-3} M, E₆₀₀ 10^{-5} M. Die Ansätze 2-4 enthalten 0,05 M Tris-Puffer pH 7,5, NADP 5×10^{-4} M und Glucose-6-phosphat 5×10^{-3} M. Zu Ansatz No. 4 wird außerdem 1 mg Glucose-6-phosphat Dehydrogenase zugesetzt. Es wird 60 Min. bei 25° inkubiert. Die Versuchsbedingungen für System No 1 sind im methodischen Teil angegeben. Die Werte sind Mittel aus drei Versuchen.

No.	System	Ausbeute μMol	2-Hydroxy- phenacetin μMol	3-Hydroxy- phenacetin μMol	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> - aminophenol μMol
1	Leberschnitte	2,40 ±0,27	0,024 ±0,013	0,005 ±0,003	2,37 ±0,25
2	20.000 g Überstand	1,84 ±0,23	0,022 ±0,015	0,006 ±0,003	1,81 ±0,21
3	105.000 g Überstand	0,02 ±0,01	—	—	—
4	Mikrosomen	1,22 ±0,16	—	—	1,22 ±0,16

Sowohl in den Versuchen mit Leberschnitten der Ratte als auch mit dem 20.000 g Überstand von Leberhomogenat der Ratte konnten geringe Mengen 2-Hydroxy-phenacetin (1,1%*) und 3-Hydroxy-phenacetin (0,3%*) nachgewiesen und halbquantitativ bestimmt werden. Dagegen verlief der Nachweis einer Kernhydroxylierung von Phenacetin mit der isolierten Mikrosomenfraktion negativ. In diesem System beträgt aber im Gegensatz zu den übrigen Leberpräparationen die Wiederfindung von zugesetztem 2-Hydroxy-phenacetin und 3-Hydroxy-phenacetin (0,05–0,2 μMol) nur etwa 10%, so daß die beiden Phenole wahrscheinlich unter der analytischen Nachweisgrenze bleiben. Diesem Ergebnis zufolge ist die Annahme nicht abwegig, daß *in vivo* gefundenes 2-Hydroxy-phenacetin bzw. 3-Hydroxy-phenacetin durch eine direkte Hydroxylierung des Phenacetins entstehen.

(c) *Hydroxylierung und O-Desalkylierung von p-Phenetidin in Leberpräparaten*

In einer anderen Versuchsreihe wurde geprüft, ob *p*-Phenetidin mit den verschiedenen Rattenleberpräparationen in Gegenwart von NADPH und Luftsauerstoff in 2-Stellung hydroxyliert werden kann.

TABELLE 4. HYDROXYLIERUNG UND DESALKYLIERUNG VON PHENETIDIN IN LEBERPRÄPARATIONEN

Konzentrationen und Versuchsbedingungen entsprechen denen in Tabelle 3. Statt Phenacetin wurde Phenetidin (2×10^{-3} M) eingesetzt und die Ansätze in einem Gesamtvolumen von 25 ml inkubiert.

No.	System	Ausbeute μMol	2-Hydroxy-phenetidin μMol	<i>p</i> -Aminophenol μMol
1	Leberschnitte	1,65	0,48 $\pm 0,19$	1,17 $\pm 0,30$
2	20.000 g Überstand	1,95	0,61 $\pm 0,22$	1,34 $\pm 0,41$
3	105.000 g Überstand	0,03	—	—
4	Mikrosomen	2,20	0,42 $\pm 0,11$	1,78 $\pm 0,48$

Als Umwandlungsprodukte von *p*-Phenetidin konnten nur 2-Hydroxy-phenetidin und das Desalkylierungsprodukt—*p*-Aminophenol—gefunden werden. Beide Verbindungen sind unter den Bedingungen der Inkubation instabil. 2-Hydroxy-phenetidin wird in glatter Reaktion zu dem analytisch leicht erfaßbaren 3-Amino-7-äthoxyphenoxazon-(2) kondensiert und läßt sich so leicht quantitativ bestimmen; *p*-Aminophenol geht zum Teil in braune Oxydationsprodukte über, deren quantitative Bestimmung nicht möglich ist. Für die Wiederfindung von *p*-Aminophenol ergeben sich daher relativ große Fehlerbreiten. Tabelle 4 zeigt, daß—bezogen auf die insgesamt vorliegende Ausbeute—sowohl in Leberschnitten wie auch im 20.000 g Überstand und in der präparierten Mikrosomenfraktion *ca.* 25% in 2-Hydroxy-phenetidin und *ca.* 75% in *p*-Aminophenol umgewandelt werden.

* Die angegebenen Prozentzahlen sind bezogen auf die insgesamt vorliegende Ausbeute, wobei die O-Desalkylierung mit 98% überwiegt.

DISKUSSION

Conney and Mitarb⁵ konnten 2-Hydroxy-phenacetin als Umwandlungsprodukt des Phenacetins bei verschiedenen Spezies (Mensch, Hund und Katze) nachweisen und bestimmen. Wie die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, entsteht dieser Phenacetinmetabolit auch bei der Ratte. In etwas geringerer Menge fanden wir daneben das bisher nicht bekannte 3-Hydroxy-phenacetin. Beide Phenole entstehen aus Phenacetin genau wie das *O*-Desalkylierungsprodukt *N*-Acetyl-*p*-aminophenol in Gegenwart von NADPH und molekularem Sauerstoff sowohl in Leberschnitten als auch im 20.000 g Überstand. Der hohe Anteil der *O*-Desalkylierung weist darauf hin, daß bei der Oxydation des Phenacetins durch mischfunktionelle Oxygenasen die Seitenkette bevorzugt wird. Diese Oxygenasen greifen aber bei Phenacetin wie bei vielen Fremdstoffen auch an anderen Stellen, z.B. am Ring, an.

Bei den Versuchen mit Leberpräparationen wurde eine mögliche Desacetylierung durch die mikrosomale Leberesterase¹⁵ mit dem Hemmstoff E₆₀₀ verhindert.¹⁶ Dadurch läßt sich eine exakte Aussage darüber machen, in welchem Umfang Phenacetin selbst in 2-Stellung hydroxyliert wird. Dies ist insofern von Interesse, als bei der

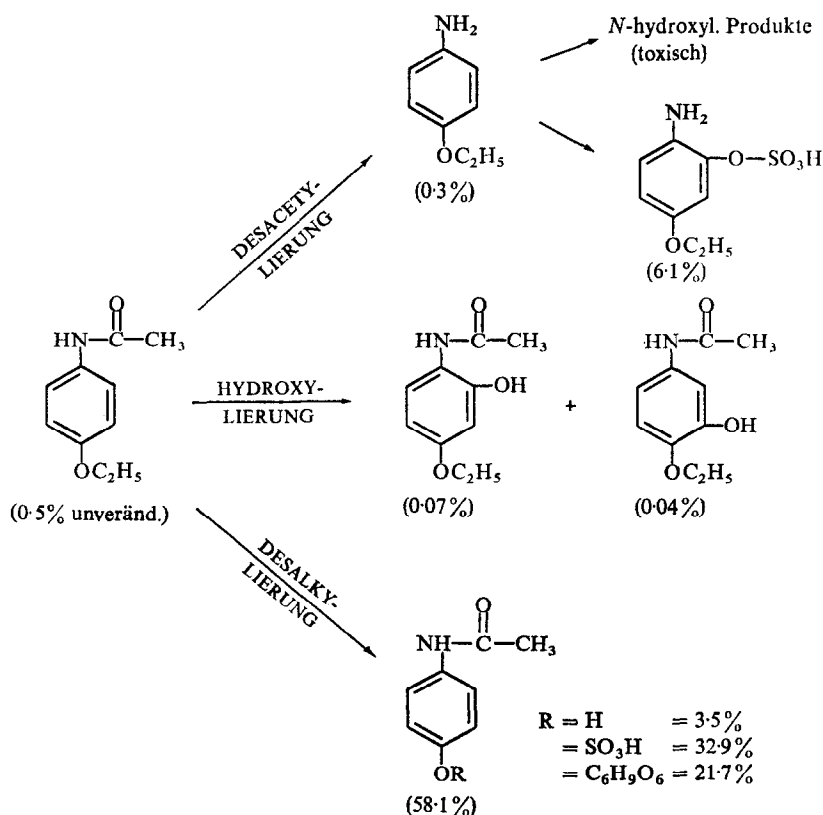


ABB. 1. Metabolische Umwandlung des Phenacetins bei der Ratte. (Die Angaben beziehen sich auf Prozent der gegebenen Dosis ausgeschieden im 8-Std.-Harn.)

Ratte und beim Menschen⁸ ein beträchtlicher Prozentsatz des verabreichten Phenacetins als 2-Hydroxy-phenetidin (mit Schwefelsäure konjugiert) im Harn ausgeschieden wird. Durch unsere Untersuchungen an Leberpräparationen der Ratten konnte gezeigt werden, daß Phenacetin nur zu etwa 1% (bezogen auf die Ausbeute) zu 2-Hydroxy-phenacetin umgewandelt wird; *p*-Phenetidin hingegen wird zu ca. 25% in 2-Stellung (bezogen auf die Ausbeute) hydroxyliert. Aus diesen Befunden ergibt sich, daß das im Urin nach Gabe von Phenacetin in nicht unbeträchtlicher Menge (6% der verabreichten Dosis) ausgeschiedene 2-Hydroxy-phenetidin wahrscheinlich folgendermaßen entstanden ist: Zunächst Desacetylierung von Phenacetin zu *p*-Phenetidin und danach Hydroxylierung in 2-Stellung.

Mithin wird Phenacetin in weit größerem Umfang desacetyliert als bisher allgemein angenommen wurde.^{1, 2} Die Annahme, daß Phenacetin zu weniger als 1% der verabreichten Dosis desacetyliert wird, stützte sich auf den Nachweis und die Bestimmung von *p*-Phenetidin und dessen toxischen Folgeprodukten in Körperflüssigkeiten.

Die Vorstellung, daß 2-Hydroxy-phenetidin aus Phenacetin durch Desacetylierung und nachfolgende Hydroxylierung von *p*-Phenetidin entsteht, wird durch Ergebnisse von Smith und Williams am Kaninchen¹⁷ und eigene Untersuchungen an der Ratte¹⁸ wahrscheinlich gemacht, bei denen nach Verabreichung von *p*-Phenetidin das 2-Hydroxy-phenetidin als Schwefelsäurekonjugat im Urin ausgeschieden wurde.

Zusammenfassend lassen sich unsere Vorstellungen vom Phenacetin-Abbau in folgendem Schema darstellen (Abb. 1).

Zusammenfassung—Folgende nach Verabreichung von Phenacetin im Harn der Ratte auftretende Ausscheidungsprodukte wurden quantitativ erfaßt: Phenacetin, *N*-Acetyl-*p*-aminophenol, *N*-Acetyl-*p*-aminophenol-sulfat bzw. -glucuronid, *p*-Phenetidin, das Sulfatkonjugat des 2-Hydroxy-phenetidins und 2-Hydroxy-phenacetin. Außerdem wurde das ausgeschiedene 3-Hydroxy-phenacetin, das erstmals nachgewiesen wurde, bestimmt.

Auch *in vitro* ließen sich an Leberschnitten und an der 20.000 g Leber-Fraktion von Ratten 2-Hydroxy-phenacetin und 3-Hydroxy-phenacetin als Umwandlungsprodukte des Phenacetins nachweisen und bestimmen. Untersuchungen mit *p*-Phenetidin als Substrat zeigten, daß der *in vivo* nach Phenacetingabe gefundene hohe Anteil an 2-Hydroxy-phenetidin an der Gesamtausscheidung nur durch Hydroxylierung von *p*-Phenetidin zustandegekommen sein kann und nicht durch Hydroxylierung von Phenacetin und nachfolgende Desacetylierung entsteht.

LITERATUR

1. B. B. BRODIE and J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **97**, 58 (1949).
2. J. N. SMITH and R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **44**, 239 (1949).
3. H. BAADER, S. GIRGIS, M. KIESE, H. MENZEL und L. SKROBOT, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **241**, 317 (1961).
4. M. KIESE und H. MENZEL, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **242**, 551 (1962).
5. A. KLUTCH, M. HARFENIST and A. H. CONNEY, *J. mednl Chem.* **9**, 63 (1966).
6. V. ULLRICH, D. HEY, HJ. STAUDINGER, H. BÜCH und W. RUMMEL, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2237 (1967).
7. BÜCH, K. PFLEGER und W. RÜDIGER, *Z. Klin. Chem.* **5**, 110 (1967).
8. H. BÜCH, H. HÄUSER, K. PFLEGER und W. RÜDIGER, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **253**, 25 (1966).
9. H. BÜCH, H. HÄUSER, K. PFLEGER und W. RÜDIGER, *Z. Klin. Chem.* **4**, 288 (1966).
10. O. FOLIN and V. CIOCALTEUS, *J. biol. Chem.* **73**, 627 (1927).
11. HJ. STAUDINGER und V. ULLRICH, *Biochem. Z.* **339**, 491 (1964).
12. B. B. BRODIE and J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **94**, 22 (1948).

13. H. BÜCH, W. GERHARDS, K. PFLEGER, W. RÜDIGER und W. RUMMEL, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1585 (1967).
14. J. AXELROD, *Biochem. J.* **63**, 634 (1956).
15. K. KRISCH, *Biochem. Z.* **337**, 531, 546 (1963).
16. K. KRISCH, *Biochim. biophys. Acta* **122**, 265 (1966).
17. J. N. SMITH and R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **44**, 250 (1949).
18. H. BÜCH, unveröffentlicht.