

der alkalischen Lösung extrahiert werden, verbleiben die Aminosäuren in der wäßrigen alkalischen Phase. Man kann somit die Aminosäuren und die Amine getrennt praktisch in einem Arbeitsgang bestimmen. Die Methode erscheint zuverlässig und einfach durchführbar. Eigenartigerweise waren die Muster an Aminosäuren und Aminen bei unseren Normalfällen relativ einheitlich. Wir erhielten kein völlig ungleichmäßiges Kontinuum an Aminosäuren und Aminen, das wir

wegen der Einwirkung der Darmbakterien eigentlich erwartet hatten. Wir konnten auch keine Peptide nachweisen — jedenfalls nicht in größerer Konzentration. Weitere Untersuchungen sind vor allem in pathologischen Fällen von Durchfall und Malabsorption und bei der *Cöliakie* notwendig. Auch reicht das untersuchte Material nicht aus, um gesicherte Normalwerte anzugeben.

Literatur

1. BICKEL, H., Mschr. Kinderhk. 112, 173 (1964). — 2. PERHEENTUPA, J. und J. K. VISAKORPI, Lancet II, 813 (1965). — 3. HOOFT, C., J. TIMMERMANS, J. SNOECK, I. ANTENER, W. OYAERT und CH. VAN DEN HENDE, Ann. paediatr., Basel 205, 73 (1965); ANTENER, I., persönl. Mitteilung. — 4. SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN und S. MOORE, Analytic. Chem. 30, 1190 (1958). — 5. CRAMER, F., Papierchromatographie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962). — 6. CLOTTEN, R. und A. CLOTTEN, Hochspannungselektrophorese, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962). — 7. PATAKI, G., Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1966). — 8. WALZ, D., A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER und M. BRENNER, Experientia, Basel 19, 213 (1963). — 9. BÜRGI, W., J. P. COLOMBO und R. RICHTERICH, Klin. Wschr. 43, 1202 (1965). — 10. MCINTIRE, F. C., L. M. CLEMENTS und M. SPROULL, Analytic. Chem. 25, 1757 (1953). — 11. PATAKI, G., persönl. Mitteilung.

Dr. H.-Ch. Curtius
CH 8032 Zürich, Steinwiesstr. 75

Nachweis und Bestimmung von Phenacetin, N-Acetyl-p-aminophenol sowie ihren Hauptumwandlungsprodukten in Harn und Serum

VON H. BÜCH, K. PFLEGER UND W. RÜDIGER¹⁾

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Direktor: Prof. Dr. W. Rummel) und dem Institut für Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Bielig) der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar — Saarbrücken

(Eingegangen am 18. Juli 1966)

Es werden Methoden zur Bestimmung von Phenacetin, N-Acetyl-p-aminophenol („NAPAP“), NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid im Harn angegeben. Mit gleicher Methodik können Phenacetin und NAPAP im Serum bestimmt werden. Die Bestimmbarkeitsgrenze für Phenacetin und NAPAP liegt bei 4 mg % (im Harn) bzw. 1 mg % (im Serum). Die Nachweisbarkeitsgrenze beträgt für NAPAP mit *Folin's* Phenolreagenz 0,5 µg/Fleck und für Phenacetin im UV-Licht 2 µg/Fleck. NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid können im Harn bis zu einer Konzentration von 20 mg % bestimmt und bis 2 µg/Fleck nachgewiesen werden. Nach Gabe von Phenacetin bzw. von NAPAP an Ratten in Harn und Serum durchgeführte Bestimmungen zeigen, daß sich die Verfahren infolge ihrer einfachen Handhabung für Untersuchungen über den Stoffwechsel dieser beiden Pharmaka eignen.

Methods are given for the determination of phenacetin, N-acetyl-p-aminophenol („NAPAP“), NAPAP-sulphate and NAPAP-glucuronide in urine. The same methods can be used for the determination of phenacetin and NAPAP in serum. The limits of measurement are 4 mg % for phenacetin (in urine), and 1 mg % for NAPAP (in serum). The limits of detection are 0.5 µg/spot for NAPAP with *Folin's* phenol reagent, and 2 µg/spot for phenacetin in UV-light. NAPAP-sulphate and NAPAP-glucuronide can be determined in urine down to a concentration of 20 mg % and detected as low as 2 µg/spot. Determinations in the urine and serum of rats after the administration of phenacetin or NAPAP show that these methods, because of their easy operation, are suitable for investigations on the metabolism of these two pharmaceuticals.

Ein einfaches Verfahren, das dem Toxikologen aus einer Harnprobe von etwa 1,0 ml indirekt den Nachweis und die Bestimmung der häufig verwendeten Analgetica Phenacetin und N-Acetyl-p-aminophenol („NAPAP“) erlaubt, haben wir kürzlich beschrieben (2). Ermittelt wird dabei p-Aminophenol, das durch salzsaure Hydrolyse aus den im Urin vorliegenden Hauptumwandlungsprodukten der beiden Analgetica entsteht. Mit dieser Methode können dem behandelnden Arzt nicht nur in Vergiftungsfällen sondern auch bei chronischem Abusus ausreichende Angaben über die Ausscheidung im Urin gemacht werden.

Zum näheren Studium des Abbaues und der Ausscheidung dieser Stoffe haben wir nun Verfahren aus-

gearbeitet, welche es erlauben: 1. Phenacetin („I“) und NAPAP („II“) im Serum und im Harn quantitativ zu erfassen und 2. die Hauptumwandlungsprodukte (II-sulfat und II-glucuronid) im Harn zu bestimmen. Mit diesen Verfahren, die im folgenden beschrieben werden, wurden bereits einige Untersuchungen sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen durchgeführt (3—6).

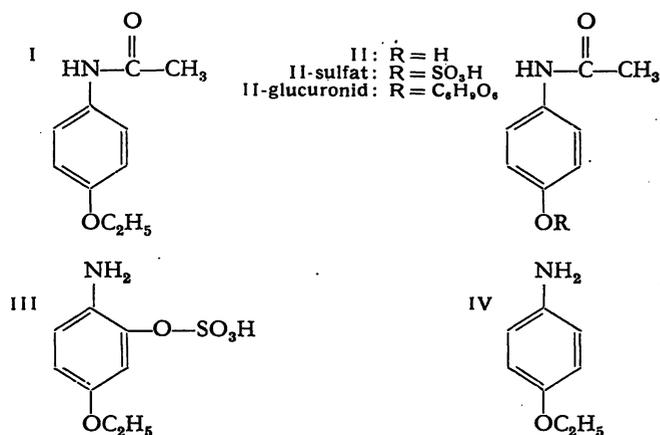
Trennung und qualitativer Nachweis

Harn

Die Trennung der zu analysierenden Produkte gelingt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC). Chromatographiert man Harnproben von Ratten, denen 2—4 Stdn. vorher NAPAP (beispielsweise 150 mg/kg i. p.) verabreicht worden war auf fluoreszierendem Kieselgel mit einem neutralen Fließmittel (Aceton/n-Butanol/Wasser = 50 : 40 : 10), so sieht man bei Bè-

¹⁾ Ein Teil der Ergebnisse wurde auf der 6. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft, Mainz 1965, vortragen (1).

trachtung im UV-Licht auf dem hellen Untergrund 3 dunkle Flecke (R_F -Werte = 0,92; 0,68 und 0,20). Diese Flecke fehlen im Kontrollversuch, d. h. nach chromatographischer Auftrennung von Leerurin. Die den Flecken zugrunde liegenden Substanzen werden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert. Die im Chromatogramm am weitesten wandernde Substanz ist unverändert ausgeschiedenes NAPAP (II), wie aus dem Vergleich der R_F -Werte in mehreren Fließmitteln (s. Tab. 3), der Reaktion mit dem Phenolreagenz von *Folin* und *Ciocaltu* sowie der UV-Absorptionskurve der isolierten Substanz mit einem Vergleichspräparat hervorgeht. Die beiden anderen Substanzen, die im Chromatogramm bedeutend langsamer als NAPAP wandern, liefern bei der Hydrolyse mittels Eisessig oder nach der Einwirkung von Arylsulfatase bzw. β -Glucuronidase NAPAP, sind mithin dessen Konjugate (II-sulfat bzw. II-glucuronid). Die Substanz des mittleren Fleckes stimmt im R_F -Wert in mehreren Fließmitteln (s. Tab. 3) mit synthetisch gewonnenem NAPAP-sulfat überein und wird wie dieses durch Arylsulfatase zu NAPAP gespalten. Nur die im Chromatogramm am weitesten zurückgebliebene Substanz wird durch β -Glucuronidase zerlegt, wobei NAPAP und Glucuronsäure entstehen. Diese ist nach Überführung in das Lacton dünnschichtchromatographisch nachweisbar.



Die Nachweisbarkeitsgrenze liegt für NAPAP (II), II-sulfat und II-glucuronid im UV-Licht bei $2 \mu\text{g}/\text{Fleck}$, für II nach Blaufärbung mit *Folins* Phenolreagenz bei $0,5 \mu\text{g}/\text{Fleck}$.

Nach Verabreichung von *Phenacetin* (I) (beispielsweise $200 \text{ mg}/\text{kg}$ i. p.) findet man im Harn unter den angegebenen Bedingungen die gleichen 3 Ausscheidungsprodukte (II, II-sulfat und II-glucuronid), wie sie nach Gabe von NAPAP auftreten. Zusätzlich ist auf dem Dünnschichtchromatogramm wenig oberhalb vom NAPAP-sulfat ein weiteres Abbauprodukt als dunkler Fleck im UV-Licht sichtbar. Dieses an der Luft rasch braun werdende Umwandlungsprodukt des Phenacetins wurde als p-Äthoxy-o-sulfonyloxy-anilin (III) identifiziert (5, 2)¹⁾. Seine sichere Abtrennung vom NAPAP-sulfat wird durch Chromatographie auf derselben DC-Platte mit

¹⁾ Eine Bestimmungsmethode für diesen Phenacetinmetaboliten soll noch mitgeteilt werden.

einem sauren Fließmittel (Dichloräthan/Essigsäure-äthylester/98-proz. Ameisensäure = 60 : 20 : 20) erreicht (s. Tab. 3). Zugleich trennt sich unverändert ausgeschiedenes Phenacetin, das bei der ersten Chromatographie zusammen mit nichtkonjugiertem NAPAP wandert, in dem sauren Fließmittel von NAPAP ab und läßt sich mit Hilfe der UV-Absorption identifizieren. Die Nachweisbarkeitsgrenze für Phenacetin beträgt im UV-Licht, wie bei II und dessen Konjugaten, $2 \mu\text{g}/\text{Fleck}$.

Nach kleineren Phenacetin-Dosen, besonders aber längere Zeit nach der Verabreichung, gelingt der Nachweis von unverändert ausgeschiedenem Phenacetin und nichtkonjugiertem NAPAP, im Gegensatz zum NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid, die auch dann noch in hoher Konzentration vorliegen, erst nach Anreicherung z. B. durch Extraktion des angesäuerten Harns mit n-Butanol. Den butanolischen Extrakt trägt man auf DC-Platten auf und trennt I von II mit einem alkalischen Fließmittel (Chloroform/iso-Propanol/33-proz. Ammoniak = 45 : 45 : 10, vgl. Tab. 3).

Serum

Auch im Serum können Phenacetin und NAPAP nachgewiesen werden. Sie werden hierzu von den Proteinen, welche die Chromatographie stören, nach Sättigung des Serums mit NaCl durch Extraktion mit Äther abgetrennt. Dieses Vorgehen ermöglicht gleichzeitig eine Anreicherung. Im Rückstand des Ätherauszuges werden die beiden Substanzen (I und II) dann nach dünnschichtchromatographischer Trennung mit dem sauren Fließmittel anhand von Vergleichssubstanzen (s. Tab. 3) nachgewiesen. NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid, die mit Äther nicht extrahierbar sind, werden hier nicht erfaßt. p-Phenetidin (IV), ein weiteres Stoffwechselprodukt des Phenacetins, das in sehr geringer Konzentration ebenfalls im Serum auftritt (8) und bei pH 7 mit Äther extrahierbar ist, wird bei der angegebenen Chromatographie sicher von Phenacetin und NAPAP getrennt (R_F -Wert s. Tab. 3). Die Nachweisbarkeitsgrenzen für die Substanzen I und II im Serum sind dieselben wie im Harn.

Quantitative Bestimmung

Phenacetin (I), NAPAP (II), II-sulfat und II-glucuronid, die auf der fluoreszierenden DC-Platte als dunkle Flecken erkennbar sind, werden einzeln mit Methanol aus dem Kieselgel eluiert. Die Bestimmung erfolgt durch Messung der Extinktion beim jeweiligen UV-Maximum: für I bei $248 \text{ m}\mu$ und für II und seine Konjugate bei $245 \text{ m}\mu$. Zur Berechnung der Konzentrationen an I, II und II-sulfat werden Eichkurven verwendet, wozu jeweils die Extinktionen gegen die ansteigenden Konzentrationen der Reinsubstanzen in Methanol aufgetragen werden. II-glucuronid, das zur Aufstellung einer Eichkurve nicht zur Verfügung stand, besitzt in Wasser nach SMITH und WILLIAMS (7) denselben molaren Extinktionskoeffizienten, den wir für II und II-sulfat (ebenfalls in Wasser) fanden. Da dies auch für die

methanolischen Lösungen zutreffen wird, kann für die Berechnung der Konzentration von II-glucuronid die Eichkurve von II oder die damit identische von II-sulfat herangezogen werden. Bei der Aufstellung der Eichkurven ist zu berücksichtigen, daß die 4 Produkte (I, II und seine beiden Konjugate) durch einmalige Elution mit Methanol nicht vollständig aus dem Kieselgel herausgelöst werden. Die dadurch entstehenden Verluste sind reproduzierbar und betragen im Bereich der Eichkurven für Phenacetin 2%, für NAPAP 11%, für NAPAP-sulfat 9% und für NAPAP-glucuronid 15%. — Die untere Bestimmbarkeitsgrenze für NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid liegt bei 20 mg%. Werden Phenacetin und NAPAP, die infolge ihrer metabolischen Umwandlung vielfach nur noch in sehr geringer Konzentration unverändert im Harn auftreten, daraus durch Extraktion mit n-Butanol angereichert, so liegt ihre Bestimmbarkeitsgrenze nach chromatographischer Auftrennung bei 4 mg%. In allen Fällen beträgt die Streuung, die sich aus einer Anzahl von Doppelbestimmungen ergibt, etwa $\pm 5\%$. Im Serum liegt die Bestimmbarkeitsgrenze für Phenacetin bzw. NAPAP bei 1 mg%; die Streuung beträgt auch hier etwa $\pm 5\%$.

Beispiele

Mit den zuvor beschriebenen Methoden wurde die Konzentration an Phenacetin bzw. an NAPAP im Serum der Ratte 1 Std. nach i. p. Applikation von Phenacetin bzw. NAPAP gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Wie die Tabelle 1 zeigt, ist die Serumkonzentration an Phenacetin bzw. an NAPAP abhängig von der verabreichten Phenacetin-Dosis. Bei Verringerung der Dosis von 200 auf 100 mg/kg Phenacetin findet man 1 Std. nach Verabreichung sowohl die Phenacetin- wie auch die NAPAP-Konzentration um mehr als die Hälfte niedriger. Das Konzentrationsverhältnis Phenacetin/NAPAP im Serum beträgt bei der

Tab. 1
Serum-Konzentration nach Gabe von Phenacetin bzw. NAPAP i. p. (weibl. Ratten, etwa 300 g)

Verabreicht	mg/kg	1 Std. nach Verabreichung		n
		Phenacetin $\mu\text{g/ml}$	NAPAP $\mu\text{g/ml}$	
Phenacetin	100	37 ± 8	11 ± 4	10
	200	107 ± 11	26 ± 7	6
NAPAP	600	—	462 ± 61	6

niedrigen Dosis 3:1 und bei der höheren Dosis 4:1, d. h. die Konzentration des durch Desalkylierung aus Phenacetin entstandenen NAPAP überschreitet zu diesem Zeitpunkt nicht die Konzentration der Ausgangssubstanz.

Zusätzlich wurden bei Ratten im Urin die mit dieser Methode erfaßbaren Umwandlungsprodukte 4 Stdn. nach i. p. Verabreichung von Phenacetin bzw. NAPAP quantitativ ermittelt. Wie die in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, wird NAPAP rascher ausgeschieden als Phenacetin. Denn die Summe der gemessenen Ausscheidungsprodukte in Prozenten bezogen auf die verabreichte Dosis beträgt in 4 Stdn. nach 300 mg/kg rund 59% und nach 600 mg/kg NAPAP immerhin noch 38%. Hingegen werden nach 200 mg/kg Phenacetin in 4 Stdn. nur 27% ausgeschieden. Phenacetin wird, wie die Tabelle 2 zeigt, bis zum Zeitpunkt 4 Stdn. nach Applikation überwiegend als NAPAP-sulfat ausgeschieden. Hingegen wird das NAPAP zum größten Teil als NAPAP-glucuronid im Urin wiedergefunden.

Wie diese Beispiele zeigen, lassen sich mit diesem Verfahren sichere Aussagen über die Resorption und Ausscheidung von Phenacetin und NAPAP machen. Wegen der leichten Erfassung und Differenzierung der Hauptumwandlungsprodukte des Phenacetins und NAPAP eignet sich die hier beschriebene Methode für Untersuchungen über Umwandlungen dieser beiden Analgetica im Stoffwechsel, Gegenüber bisher beschriebenen Nachweismethoden (7, 8, 9), die entweder auf dem

Tab. 2
Ausscheidungsverhältnisse im Harn nach Verabreichung von Phenacetin bzw. NAPAP i. p. (weibl. Ratten, etwa 275 g)

Verabreicht	mg/kg	$\mu\text{Mol/Tier}$	Harnvol. ml	In 4 Stdn. ausgeschiedene Mengen in μMol					n	
				Phenacetin	NAPAP	NAPAP-sulfat	NAPAP-glucuronid	insgesamt		in % der gegebenen Dosis
Phenacetin	200	310	2,3	$0,9 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,7$	$50,4 \pm 6,8$	$29,2 \pm 6,1$	84,5	27	11
	300	540	6,5	—	$53,6 \pm 18,9$	$99,2 \pm 20,0$	$143,2 \pm 27,9$	296,0	59	12
NAPAP	600	1080	5,2	—	$113,5 \pm 33,1$	$85,1 \pm 35,6$	$180,4 \pm 41,4$	379,0	38	10

Tab. 3
 R_F -Werte von Phenacetin, N-Acetyl-p-aminophenol und ihren Hauptumwandlungsprodukten

Fließmittel	R_F -Werte						
	Phenacetin	NAPAP	NAPAP-sulfat	NAPAP-glucuronid	p-Äthoxy-o-sulfonyloxy-anilin	p-Phenetidin	
A	0,92	0,92	0,68	0,20	0,73		
B	0,91 ¹⁾	0,78 ¹⁾	0,50 ¹⁾	0,17 ¹⁾	0,63 ¹⁾		
C	0,80	0,65				0,33	
D	0,94	0,80	0,17	0,00	0,23		
E	0,90	0,58					
E	0,97	0,79					

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

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

C = Chloroform/iso-Propanol/35-proz. Ammoniak (45:45:10)

D = Benzol/Methanol/Eisessig (45:8:4)

E = Chloroform/iso-Propanol/33-proz. Ammoniak (80:15:5) nach kräftigem Umschütteln werden zu 90 ml der organischen unteren Phase 5 ml Methanol zugemischt. Die wäßrige Phase wird verworfen.

¹⁾ Nach Chromatographie mit Fließmittel A über eine Laufstrecke von 10 cm und kurzem Trocknen der Platte erneut aufsteigende Chromatographie mit dem Fließmittel B über eine Laufstrecke von 16 cm.

Auswägen der isolierten Ausscheidungsprodukte oder auf Farbreaktionen der durch Hydrolyse erhaltenen freien Aminoverbindung nach deren Trennung durch Verteilungsverfahren beruhen, bieten diese Verfahren bei einfacher Handhabung den Vorteil der direkten exakten Bestimmung der einzelnen Umwandlungsprodukte wie auch der unveränderten Ausgangssubstanzen. Darüber hinaus sind diese Verfahren aber auch dem Toxikologen (eigene Erfahrungen liegen bereits vor) wegen ihrer Einfachheit und der leichten Übertragbarkeit auf die Verhältnisse beim Menschen eine wertvolle Hilfe zur Feststellung von akuten Intoxikationen und chronischem Missbrauch mit diesen Analgetica.

Methodik

Chemikalien

Diese stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Fa. Merck (Reinheitsgrad: p. a. bzw. „Zur Chromatographie“). Der verwendete Äther ist peroxydfrei. — Die im Tierversuch verabreichten wie auch zur Identifizierung und zur Bestimmung als Vergleichssubstanzen verwendeten Phenacetin- und NAPAP-Präparate wurden von den Farbwerken Hoechst AG bezogen. NAPAP-sulfat wurde synthetisch gewonnen.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtplatten werden nach der Methode von STAHL (10) mit Kieselgel GF₂₅₄ beschichtet und bis zum Gebrauch im Exsikkator über Blaugel aufbewahrt. Je nach Verwendungszweck werden DC-Platten mit einer Schichtdicke von 0,25 bzw. 0,50 mm benutzt. Die Chromatographie wird stets bei Kammersättigung aufsteigend durchgeführt. Die Vergleichssubstanzen werden als 0,1-proz. methanolische Lösungen (5–10 µg/Fleck) aufgetragen.

Folgende *Fließmittel* werden angewendet:

- A (neutral): Aceton/n-Butanol/Wasser (50:40:10)
- B (sauer): Dichloräthan/Essigsäureäthylester/98-proz. Ameisensäure (60:20:20)
- C (alkalisch): Chloroform/iso-Propanol/33-proz. Ammoniak (45:45:10)
- D (11): Benzol/Methanol/Eisessig (45:8:4)
- E: Chloroform/iso-Propanol/33-proz. Ammoniak (80:15:5) werden in einem kleinen Scheidetrichter kräftig umgeschüttelt, dann werden 90,0 ml der unteren Phase mit 5,0 ml Methanol vermischt.
- F: Aceton/iso-Butanol/Wasser/Diäthylamin (50:20:20:10).

UV-Absorption: Zur Aufnahme der UV-Spektren und zur Messung der Extinktionen im UV-Licht wird ein „Zeiss“ Spektralphotometer PMQ II benutzt. Die Fluoreszenzlöschung auf der Dünnschichtplatte wird mit der Lampe Short Wave Ultra-Violet Model SL 2537 der Fa. UV-Products INC, South Pasadena U.S.A. festgestellt.

Darstellung des NAPAP-sulfates

Zu 2,0 g NAPAP, in der Mischung von 2,0 g Pyridin und 15,0 ml Chloroform suspendiert, werden 0,9 ml (1,5 g) Chlorsulfonsäure unter Eiskühlung tropfenweise zugegeben. Die Mischung wird noch 1 Std. bei 0° gerührt und dann 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Eingießen des Ansatzes in 100 ml Methanol und Versetzen mit der Lösung von 1,0 g Kaliumhydroxyd in 10,0 ml Methanol filtriert man sofort ab. Aus dem Filtrat scheiden sich innerhalb von 12 Stdn. farblose Blättchen ab, die abgesaugt und aus Methanol umkristallisiert werden. Ausbeute: 1,5 g (41% d. Th.), Schmelzpunkt 213–215°, UV-Absorption in Methanol $\lambda_{\max} = 245 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 12800$; in Wasser $\lambda_{\max} = 242 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 10400$.

Beschreibung der Bestimmungsverfahren

Bestimmung von Phenacetin (I) und von NAPAP (II) im Harn

1,0 ml Urin werden nach Zugabe von 0,2 ml 1N HCl mit 0,4 ml n-Butanol in einem kleinen Zentrifugenröhrchen (etwa 5,0 ml) durch

kräftiges Umschütteln extrahiert. Durch kurzes scharfes Zentrifugieren werden die Phasen voneinander getrennt. 0,1 ml des butanolischen Überstandes werden auf mehrere Auftragspunkte (nicht mehr als 0,02 ml/Fleck) einer DC-Platte verteilt. Aufgetrennt wird mit Fließmittel C über eine Laufstrecke von 10 cm. Nach dem Trocknen der DC-Platte sieht man bei Betrachtung im kurzwelligigen UV-Licht I und II als dunkle Flecke oder Zonen. Die betreffenden Stellen werden durch Umranden gekennzeichnet. Das Kieselgel dieser Zonen wird von der DC-Platte abgelöst und in 15,0 ml fassende Zentrifugenröhrchen übergeführt. Nach Zugabe von 3,0 ml Methanol wird 2 Min. kräftig umgeschüttelt und sodann das Kieselgel bei 4000 U./Min. abgeschleudert (3 Min.). Der klare Überstand dient zur Extinktionsmessung, die in Quarzküvetten ($d = 1,00 \text{ cm}$) für Phenacetin bei 248 m μ und für NAPAP bei 245 m μ vorgenommen wird. Es werden für I und II Eichkurven angelegt, die den durch den Analysengang bedingten Verlusten Rechnung tragen. Hierzu werden I und II Urin beigemischt: von 0,1-proz. methanol. Lösungen (I bzw. II) werden jeweils 0,06; 0,12, 0,18, 0,24 und 0,30 ml — entsprechend 60, 120, 180, 240 und 300 µg von I bzw. II — in die Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit Urin auf 1,0 ml aufgefüllt. Der weitere Analysengang erfolgt wie zuvor beschrieben. Die erhaltenen Eichkurven gehen durch den Nullpunkt und sind linear. Die aus Mehrfachbestimmungen ($n = 6$) bei 2 verschiedenen Meßpunkten der Eichkurven erhaltene Streuung liegt bei $\pm 5\%$.

Bestimmung von NAPAP-sulfat und von NAPAP-glucuronid im Harn

Nach *Gabe von NAPAP (II)* werden 0,02–0,04 ml Harn mit einer Mikropipette direkt auf die DC-Platte aufgetragen und mit Fließmittel A über eine Laufstrecke von 10 cm chromatographiert. Sind die Konjugate von II nach *Gabe von Phenacetin* zu bestimmen, dann wird nach dem Trocknen der DC-Platte eine zweite Chromatographie mit Fließmittel B in gleicher Richtung über eine Laufstrecke von 15 cm angeschlossen. Das weitere Vorgehen — Erkennen der Flecke, Kennzeichnen, Ablösen der Schicht — erfolgt wie zuvor beschrieben. Eluiert wird hier mit 5,0 ml Methanol. Unter Zugrundelegen gleicher molarer Extinktion kann für II-sulfat und II-glucuronid eine mit ansteigenden Mengen (20, . . . 100 µg) von II oder II-sulfat angelegte Eichkurve zur Auswertung benutzt werden. Auch diese Eichkurve ist linear und geht durch den Nullpunkt. Die aus Mehrfachbestimmungen ($n = 6$) bei zwei verschiedenen Meßpunkten der Eichkurve ermittelte Streuung ist $< \pm 5\%$.

Bestimmung von Phenacetin (I) und NAPAP (II) im Serum

2–4 ml Serum werden mit 1 g NaCl gesättigt und dreimal mit je 10,0 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen werden durch einen Rundfilter (Schleicher und Schüll, Nr. 595, $\varnothing 9 \text{ cm}$) in einen Rundkolben filtriert. Im Wasserstrahlvakuum wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Fa. Büchi), Wasserbad von 30°, der Äther abgedampft. Der Rückstand wird mit 2,0–4,0 ml Äther in ein 15,0 ml fassendes Zentrifugenröhrchen mit Schliff quantitativ überführt und ebenfalls wieder mittels Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird in 0,2–0,4 ml Methanol gelöst und entweder teilweise, wenn 4 und mehr ml Serum zur Extraktion zur Verfügung standen, oder vollständig, wenn weniger als 4,0 ml Serum verfügbar waren, auf die DC-Platte aufgetragen (verteilt auf mindestens 5 Auftragspunkte) und mit Fließmittel B über eine Laufstrecke von 10 cm chromatographiert. Zur Ermittlung der durch die Methode bedingten Verluste werden I und II in ansteigenden Mengen (20–100 µg) je 2,0 ml Serum beigemischt und dem ganzen Analysengang unterzogen. Mit einer Streuung von $\pm 5\%$ ist zu rechnen.

Beschreibung der Versuche

Gewinnung von Harn und Serum

Diese wurden von Ratten gewonnen, denen vorher Phenacetin (200 mg/kg) oder NAPAP (300 bzw. 600 mg/kg) als Suspension in Tragant i. p. verabreicht worden war. Zum Auffangen des Harns wurden die Tiere einzeln in kleinen Stoffwechsellkäfigen gehalten, in denen ein getrenntes Auffangen von Urin und Kot möglich war. Zur Gewinnung von Serum wurden die Ratten in Äther-

narkose thorakotomiert und das Blut durch Herzpunktion entnommen. Nach der Blutentnahme wurden die Erythrozyten sofort bei 4000 U./Min. abgeschleudert (10 Min.). Harn und Serum wurden entweder sofort weiter aufgearbeitet oder bis zur Analyse bei -5° eingefroren.

Qualitativer Nachweis von NAPAP (II), II-sulfat und II-glucuronid im Harn

0,02—0,04 ml Rattenharn (nach 300 mg/kg NAPAP i. p.) wurden mit einer Mikropipette auf mehrere Startpunkte verteilt (nicht mehr als 0,01 ml/Fleck auf eine DC-Platte (Schichtdicke 0,25 mm) aufgetragen. Die Chromatographie mit Fließmittel A über eine Laufstrecke von 10 cm ergab 3 im UV-Licht gegen den hellen Untergrund sichtbare dunkle Flecke der Substanzen II, II-sulfat und II-glucuronid, die im Leerurin nicht vorhanden waren (R_F -Werte siehe Tab. 3). Zur präparativen Isolierung dieser 3 Substanzen wurden 1—2 ml Rattenharn auf mehrere DC-Platten (Schichtdicke 0,50 mm) aufgetragen. Nach Auftrennung mit Fließmittel A wurde von der zuvor getrockneten DC-Platte das Kieselgel mit den Substanzen II, II-sulfat und II-glucuronid einzeln abgelöst. Durch mehrmalige Elution mit Methanol ließen sich die 3 Produkte vom Kieselgel (welches jedes Mal wieder abgeschleudert wurde) abtrennen. Nach dem Abdampfen des Methanols im Wasserstrahlvakuum bei 45° (Rotationsverdampfer Fa. Büchi) erhielt man die II, II-sulfat bzw. II-glucuronid enthaltenden Rückstände, die zur weiteren Analyse verwendet wurden.

Nachweis von NAPAP (II): Der Rückstand von II wird in einer kleinen Menge Methanol gelöst und auf DC-Platten aufgetragen. In den Fließmitteln A—E hat II mit authentischem NAPAP identische R_F -Werte. Wie NAPAP reagiert II mit dem Phenolreagenz von *Folin* und *Ciocalteu* unter Blaufärbung: Nach dem Besprühen der DC-Platte mit einer 5-proz. Na_2CO_3 -Lösung und kurzem Trocknen wird eine 20-proz. wäßrige Lösung des Phenolreagenz aufgesprüht. — Die methanolische Lösung von II hat im UV-Licht ein dem NAPAP entsprechendes Maximum bei 245 m μ .

Hydrolyse der NAPAP-Konjugate und Isolierung des freigesetzten NAPAP: Der Rückstand von II-sulfat bzw. von II-glucuronid wurde sauer und enzymatisch aufgespalten.

Zur sauren Hydrolyse wurde der Rückstand in Wasser gelöst und nach Zugabe von Eisessig (Endkonzentration 25%) 30 Min. unter Rückfluß gekocht. Nach Verdünnen mit Wasser (1:1) wurde mit Chloroform (gleiches Volumen) dreimal extrahiert. Der Chloroform-Rückstand wurde zur weiteren Analyse verwendet.

Zur enzymatischen Hydrolyse wurden Stammlösungen von β -Glucuronidase (Fa. Sigma) und β -Glucuronidase/Arylsulfatase (Fa. Boehringer) hergestellt: die β -Glucuronidase wurde in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 4,5) gelöst (1500 Fishman Einheiten/ml); die β -Glucuronidase/Arylsulfatase wurde mit 0,15 M Acetatpuffer (pH 5,0) verdünnt, so daß 1000 Fishman Einheiten der β -Glucuronidase und 500 Whitehead Einheiten der Arylsulfatase pro ml vorlagen. Die isolierten Produkte (II-sulfat und II-glucuronid) wurden in 1,0 ml Puffer (je nach verwendetem Enzym Acetat- oder Phosphatpuffer) gelöst und nach Zugabe von 1,0 ml gepufferter Enzymlösung 60 Min. bei 37° inkubiert. Zur Prüfung der enzymatischen Hydrolyse wurden Ansätze mit 100 μ g Phenolphthalein-

glucuronid (Fa. Serva) bzw. 100 μ g des synthetisch gewonnenen NAPAP-sulfates und den entsprechenden Enzymlösungen gemacht. Zur Fällung des Enzymproteins wurde den Ansätzen je 0,1 ml einer gesättigten (etwa 1,7-proz.) wäßrigen Uranylacetat-Lösung zugesetzt und im Wasserbad 5 Min. bei 70° stehengelassen. Das ausgefallene Enzymprotein wurde anschließend bei 4000 U./Min. abgeschleudert (5 Min.). Der Überstand wurde zur Isolierung des freigelegten NAPAP mit 2 Tropfen Eisessig angesäuert und mit Chloroform (gleiches Volumen) dreimal extrahiert.

Qualitativer Nachweis des NAPAP nach Hydrolyse der Konjugate

II-sulfat liefert nach Hydrolyse mit Essigsäure wie auch nach enzymatischer Hydrolyse mit dem Arylsulfatase enthaltenden Enzym, nicht aber mit der reinen β -Glucuronidase, NAPAP, das — wie oben beschrieben — nachgewiesen wurde.

Desgleichen liefert II-glucuronid nach Hydrolyse mit Essigsäure wie auch nach enzymatischer Aufspaltung mit β -Glucuronidase NAPAP. Die nach enzymatischer Hydrolyse aus II-glucuronid ebenfalls freigesetzte Glucuronsäure wurde wie folgt nachgewiesen: Nach Fällung des Enzymproteins wurden die wäßrigen Ansätze (einem Ansatz war isoliertes II-glucuronid und dem anderen Phenolphthaleinglucuronid zugesetzt worden) bis auf $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Volumens (= 2,9 ml) eingengt und davon je 0,1 ml auf eine DC-Platte aufgetragen. Nach Chromatographie mit Fließmittel F Aceton/iso-Butanol/Wasser (50:20:10) wurde die Glucuronsäure mit dem Naphthoresorcin-Reagenz (STAHL, Reagenz-Nr. 45) nachgewiesen (R_F -Wert = 0,15). Nach Zugabe von 3 Tropfen 1 N HCl und kurzem Kochen wurde die Glucuronsäure in die Lacton-Form übergeführt, welche ebenfalls nach Chromatographie mit Fließmittel F und Besprühen der DC-Platte mit dem Naphthoresorcin-Reagenz nachweisbar war (R_F -Wert = 0,6).

Qualitativer Nachweis von Phenacetin (I) und Abtrennung des Phenacetin-Metaboliten III

Nach Gabe von Phenacetin (z. B. 200 mg/kg i. p.) ist neben II, II-sulfat und II-glucuronid auch die unveränderte Substanz I, allerdings nur in geringer Konzentration, im Harn vorhanden. Zu ihrem Nachweis wurden 1,0 ml Urin nach Zugabe von 0,4 ml n-Butanol in einem kleinen Zentrifugenröhrchen (Volumen etwa 5,0 ml) kräftig umgeschüttelt (3 Min.). Durch kurzes, scharfes Zentrifugieren wurden die Phasen voneinander getrennt und anschließend von dem butanolischen Überstand je 0,1 ml (verteilt auf mehrere Auftragspunkte) auf DC-Platten aufgetragen und mit dem Fließmittel B—D chromatographiert. Zur Identifizierung wurde die Fluoreszenzlösung auf den DC-Platten anhand der mitgelaufenen Vergleichssubstanz und des UV-Spektrums der aus dem Kieselgel mit Methanol eluierten Substanz herangezogen. Für den Nachweis von II, II-sulfat und II-glucuronid nach Verabreichung von Phenacetin gelten die im vorigen Abschnitt gemachten Angaben. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß bei der Chromatographie mit Fließmittel A (Laufstrecke 10 cm) das II-sulfat nicht ausreichend von dem aus Phenacetin gebildeten p-Äthoxy-0-sulfonyloxy-anilin (III) abgetrennt wird. Hierzu wurde nach kurzem Trocknen der DC-Platte in gleicher Richtung mit Fließmittel B über eine Laufstrecke von 15 cm chromatographiert. III befindet sich dann oberhalb von NAPAP-sulfat (R_F -Wert s. Tab. 3).

Literatur

1. RÜDIGER, W. und H. BÜCH, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 251, 107 (1965). — 2. BÜCH, H., H. HÄUSER, K. PFLEGER und W. RÜDIGER, diese Z. 4, 288 (1966). — 3. BÜCH, H., W. RUMMEL, K. PFLEGER und G. KARACHRIANIDIS, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 247, 378 (1954). — 4. BÜCH, H., G. KARACHRIANIDIS und W. RÜDIGER, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 251, 107 (1965). — 5. BÜCH, H., H. HÄUSER, K. PFLEGER und W. RÜDIGER, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 253, 25 (1966). —
6. BÜCH, H., CH. ESCHRICH und K. PFLEGER, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. (im Druck). — 7. SMITH, J. N. und R. T. WILLIAMS, Biochem. J. 44, 250 (1949). — 8. BRODIE, B. B. und J. AXELROD, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 97, 58 (1949). — 9. BRODIE, B. B. und J. AXELROD, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 94, 22 (1948). — 10. STAHL, E., Dünnschichtchromatographie, S. 7—10, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 11. ULLRICH, W., persönliche Mitteilung, Gießen. Physiolog.-Chem. Inst.

Priv.-Doz. Dr. K. Pflieger
6650 Homburg (Saar)