

## METABOLISCHE UMWANDLUNG VON PHENACETIN UND *N*-ACETYL-*p*-AMINOPHENOL NACH VORBEHANDLUNG MIT PHENOBARBITAL\*, †

H. BÜCH, W. GERHARDS, K. PFLEGER, W. RÜDIGER† und W. RUMMEL

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes, Homburg, Saar

(Received 19 December 1966; accepted 16 February 1967)

**Abstract**—Pretreatment of rats with phenobarbital activates the metabolism of acetophenetidin and of *N*-acetyl-*p*-aminophenol (NAPAP). The *O*-desalkylation of acetophenetidin and the conjugation of NAPAP with glucuronic acid are increased. These results were obtained by measuring the serum levels and by controlling the excretion of acetophenetidin, NAPAP and its conjugates in the urine. After administration of high doses of acetophenetidin in induced animals an increased concentration of methemoglobin was detected which indicates that the desacetylation and the *N*-hydroxylation are stimulated. Therefore pretreatment with phenobarbital in rats not only causes an enhanced detoxication of acetophenetidin, but also under high doses of acetophenetidin leads to an increase in its toxicity. The augmented conjugation of NAPAP after phenobarbital pretreatment, however, accelerates exclusively the detoxication.

DAUER und Intensität einer Arzneimittelwirkung werden beeinflußt durch die Geschwindigkeit, mit der das betreffende Pharmakon metabolisch inaktiviert wird. Durch Untersuchungen von Axelrod<sup>3,4</sup> sowie von Brodie und Mitarb.<sup>5,6</sup> konnte gezeigt werden, daß ein Teil der für die metabolische Umwandlung von Fremdstoffen verantwortlichen Enzyme in den Mikrosomen—vornehmlich der Leber—lokaliert ist. Eine vorausgehende Anwendung einer Reihe von Pharmaka hat eine erhöhte Aktivität dieses mikrosomalen Systems zur Folge.<sup>7-14</sup>

Gegenstand unserer Untersuchungen war die Frage, inwieweit durch eine Vorbehandlung mit Phenobarbital, das als Induktor arzneistoffabbauender Enzyme bekannt ist,<sup>8,13,15-18</sup> Schritte der metabolischen Umwandlung des Phenacetins bzw. des *N*-Acetyl-*p*-aminophenols (NAPAP) beeinflußt werden. Dabei sollte geprüft werden, ob neben der *O*-Desalkylierung des Phenacetins—dem Hauptabbauweg—auch noch andere Umwandlungsschritte wie z.B. die *N*-Hydroxylierung oder die Konjugation des durch *O*-Desalkylierung entstandenen NAPAP induzierbar sind. Der *N*-Hydroxylierung kommt insofern Bedeutung zu, als eine Steigerung derselben zu einer Zunahme

\* Herrn Professor Dr. F. Hahn zum 60. Geburtstag gewidmet.

† Ein Teil der Ergebnisse wurde auf der 5.<sup>1</sup> bzw. 6.<sup>2</sup> Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft, Mainz 1964 bzw. 1965, vorgetragen.

‡ Adresse: Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

der Toxizität des Phenacetins führen würde, während sonst im allgemeinen eine induktive Aktivierung des Arzneimittelum- und -abbaues eine schnellere Entgiftung mit sich bringt.

Hinsichtlich der *O*-Desalkylierung des Phenacetins bei induzierten Versuchstieren liegen bereits Untersuchungen vor. So konnten Conney und Mitarb.<sup>19, 20</sup> zeigen, daß sich bei der Katze wie auch bei der Ratte die *O*-Desalkylierung des Phenacetins durch Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren induktiv steigern läßt. Auch durch DDT und Dieldrin ist, wie Koransky und Mitarb.<sup>21</sup> an Rattenlebermikrosomen nachgewiesen haben, eine Stimulierung der *O*-Desalkylierung des Phenacetins möglich.

Die Frage einer Aktivierung konjugierender Umwandlungsschritte durch Phenobarbital verdient deshalb besonderes Interesse, weil das Hauptumwandlungsprodukt des Phenacetins, das NAPAP, wegen seiner geringen Toxizität immer häufiger selbst therapeutisch Verwendung findet. Es wird zu über 80% durch Konjugation mit Schwefelsäure bzw. Glucuronsäure entgiftet und nur zum geringeren Teil unverändert ausgeschieden.<sup>22, 23</sup> Eine induktive Steigerung der Konjugation des NAPAP müßte demnach mit einer Abnahme der Wirksamkeit einhergehen. Da Phenobarbital nicht selten zusammen mit Phenacetin bzw. NAPAP therapeutisch angewendet wird erschien diese Frage besonders untersuchenswert.

## METHODIK

### Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Als Versuchstiere wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 – 300 g verwendet. Das Blut für die Methämoglobin-Bestimmung konnte nach Schnitt in eine Sublingualvene aus der Mundhöhle entnommen werden. Zur Bestimmung der Phenacetin- bzw. NAPAP-Konzentration im Serum wurde Blut durch Herzpunktion entnommen (Thorakotomie in Äthernarkose). Bei den Ausscheidungsversuchen saßen die Ratten einzeln in Stoffwechselkäfigen, die ein getrenntes Auffangen von Urin und Kot ermöglichen. Der Urin wurde entweder sofort aufgearbeitet oder bis zur Analyse bei –5° eingefroren.

Verabreicht wurden Phenacetin, DAB 6 (Farbwerke Hoechst AG), *N*-Acetyl-*p*-aminophenol = NAPAP, DAB 6 (E. Merck AG) und Luminal-Natrium (Farbenfabriken Bayer AG). Phenacetin bzw. NAPAP wurden im Mörser fein zerrieben und als Suspension (je nach Dosis 0,2–1,5%) in 0,9% NaCl-Lösung i.p. verabreicht. Zur Stabilisierung der Suspensionen wurden 0,1% Tragant zugefügt. Luminal-Natrium wurde als 0,75% Lösung in 0,9% NaCl-Lösung ebenfalls i.p. gegeben.

Die Tiere wurden durch Verabreichung von je 75 mg/kg Luminal-Natrium an 4 aufeinanderfolgenden Tagen induziert. Vom Zeitpunkt der letzten Luminal-Injektion bis zur Gabe von Phenacetin bzw. NAPAP bestand durchschnittlich eine Pause von 48 Stunden. Die Tiere waren durch die Verabreichung des Barbiturates nicht in der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme beeinträchtigt.

Die bei den Bestimmungsmethoden verwendeten Chemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Firma E. Merck AG.

### Methämoglobinbestimmung

Die Bestimmung von Methämoglobin erfolgte nach der Methode von Havemann und Mitarb.<sup>24</sup>, die zur einfacheren Handhabung modifiziert wurde.<sup>25</sup>

*Isolierung des Phenacetins und des NAPAP sowie ihrer Hauptumwandlungsprodukte NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid aus Serum bzw. Harn*

Einzelheiten der Verfahren sind an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt.<sup>26</sup>

*Serum.* Phenacetin und NAPAP werden aus dem mit NaCl gesättigten Serum mit Äther extrahiert. Nach Einengen des Ätherextraktes wird der in Methanol wieder aufgenommene Rückstand quantitativ auf Kiesel gel-Dünnschichtplatten (Die Dünnschichtplatten werden nach der Methode von Stahl<sup>27</sup> hergestellt aus Kieselgel GF<sub>254</sub>) aufgetragen und mit dem sauren Fließmittel I entwickelt. Die Identifizierung erfolgt im U.V.-Licht anhand von Vergleichssubstanzen. *R<sub>f</sub>*-Werte und Fließmittelanlagen siehe Tabelle 1.

TABELLE 1. *R<sub>f</sub>*-WERT- UND FLIEßMITTEL-ANGABEN, AUFSTEIGENDE CHROMATOGRAPHIE MIT KAMMERSÄTTIGUNG

Fließmittel I: Dichloräthan/Essigsäureäthylester/98% Ameisensäure (60:20:20);  
Fließmittel II: Chloroform/iso-Propanol/33% Ammoniak (45:45:50); Fließmittel III:  
Aceton/Butanol-(1)/Wasser (50:40:10)

<i>R<sub>f</sub></i> -Werte				
Fließmittel	Phenacetin	NAPAP	NAPAP-sulfat	NAPAP-glucuronid
I	0·80	0·65	—	—
I*	0·91*	0·78*	0·50*	0·17*
II	0·94	0·80	—	—
III	0·92	0·92	0·68	0·20

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

*Harn.* (a) Phenacetin und NAPAP werden aus dem angesäuerten Harn mit Butanol-(1) extrahiert. Ein Teil des Butanol-Extraktes wird quantitativ auf Dünnschichtplatten (wie oben) aufgetragen. Entwickelt wird mit dem basischen Fließmittel II. *R<sub>f</sub>*-Werte und Fließmittelanlagen siehe Tabelle 1.

(b) NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid, die nach Verabreichung von Phenacetin bzw. NAPAP in hoher Konzentration im Harn auftreten, können durch direkte Chromatographie des Harnes isoliert werden. Hierzu trägt man kleine Harnmengen (0·02–0·04 ml) auf die Dünnschichtplatte auf und chromatographiert mit dem neutralen Fließmittel III. Anschließend wird auf der gleichen Dünnschichtplatte eine 2. Chromatographie mit dem sauren Fließmittel I durchgeführt, wonach NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid sauber fraktioniert vorliegen. Durch die Rechromatographie mit dem sauren Fließmittel wird u.a. ein weiterer Phenacetinmetabolit—das *p*-Äthoxy-*o*-sulfonyloxy-anilin abgetrennt.<sup>26,28</sup> Die Identifizierung der beiden Konjugate, NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid, erfolgt im U.V.-Licht anhand von Vergleichssubstanzen; NAPAP-sulfat wurde zu diesem Zweck synthetisch gewonnen, während NAPAP-glucuronid zunächst aus Harn isoliert und anhand seiner chemischen Eigenschaften als solches nachgewiesen wurde.<sup>26</sup>

*Bestimmung der isolierten Produkte*

Phenacetin, NAPAP, NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid, die auf den fluoreszierenden Dünnschichtplatten als dunkle Flecke erkennbar sind, werden einzeln mit

Methanol aus dem Kieselgel eluiert. Nach Sedimentieren des Kieselgels durch kurzes scharfes Zentrifugieren erfolgt die Bestimmung durch Messung der Extinktion beim jeweiligen U.V.-Maximum mit dem Spektralphotometer PQM II (Zeiss): für Phenacetin bei  $248 \text{ m}\mu$  und für NAPAP sowie für seine Konjugate bei  $245 \text{ m}\mu$ . Einzelheiten der Methode, wie z.B. Anlegen der Eichkurven, auftretende Verluste, Bestimmbarkeitsgrenzen und Streuung sind an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt.<sup>26</sup>

### ERGEBNISSE

#### A. *Methämoglobin-Bildung nach Gabe von Phenacetin bei induzierten Ratten*

In Tabelle 2 ist die Methämoglobin-Konzentration im Blut der induzierten Tiere nach i.p. Gabe von  $200 \text{ mg/kg} = 1\cdot12 \text{ mM/kg}$  Phenacetin wiedergegeben. In einer ersten Phase (30–60 min nach Injektion) steigt bei den mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren die Methämoglobin-Konzentration auf höhere Werte an als bei den Kontrollen. In einer zweiten Phase (150–240 min nach Injektion) hingegen fällt sie dann

TABELLE 2. METHAEMOGLOBIN IN PROZENTEN DES GESAMTHAEMOGLOBINS NACH I.P. GABE VON  $200 \text{ MG/KG}$  PHENACETIN BEI INDUIZIERTEN RATTEN (INDUKTION:  $75 \text{ MG/KG}$  PHENOBARBITAL AN 4 AUF EINANDERFOLGENDEN TAGEN, 48 STUNDEN PAUSE VOR DER PHENACETIN-APPLIKATION).

Minuten nach Applikation	Kontrollen % Met-Hb	Induziert % Met-Hb
30	$9\cdot2 \pm 1\cdot9$ <i>n</i> = 7	$14\cdot7 \pm 3\cdot3^*$ <i>n</i> = 5
60	$21\cdot4 \pm 4\cdot5$ <i>n</i> = 20	$28\cdot2 \pm 5\cdot5^*$ <i>n</i> = 18
150	$36\cdot7 \pm 4\cdot5$ <i>n</i> = 14	$23\cdot5 \pm 11\cdot7^*$ <i>n</i> = 12
240	$27\cdot9 \pm 7\cdot8$ <i>n</i> = 14	$3\cdot1 \pm 3\cdot1^*$ <i>n</i> = 12

\* Unterschied gegenüber den Kontrollen:  $P < 0\cdot01$ .

schneller ab als bei den Kontrollen. Dieser durch Induktion mit Phenobarbital verursachte andersartige Verlauf der Methämoglobin-Konzentration in der ersten Phase lässt sich am ehesten durch eine induktiv gesteigerte Desacetylierung und *N*-Hydroxylierung erklären. Der raschere Abfall im späteren Verlauf könnte dagegen eine Folge der Aktivitätszunahme der anderen gleichzeitig ablaufenden Umwandlungsschritte wie z.B. der *O*-Desalkylierung, der Kernhydroxylierung,\* der Konjugation, etc. sein.

Unter diesem Gesichtspunkt war es von Interesse zu prüfen, wie sich der Verlauf der Methämoglobin-Konzentration bei induzierten Tieren verhält, die eine hinsichtlich der Methämoglobin-Bildung eben gerade 'überschwellige' Phenacetin-Dosis erhielten. Diese Dosis wurde so gewählt, daß noch gut messbare Methämoglobin-Konzentrationen auftraten, die jedoch weit unter denjenigen liegen, welche unter hohen Dosen maximal erreichbar sind. Die nach Gabe von  $50 \text{ mg/kg} = 0\cdot28 \text{ mM/kg}$  Phenacetin

\* Wie an anderer Stelle mitgeteilt ist, können nach Verabreichung von Phenacetin im Rattenurin auch *o*-OH- und *m*-OH-Phenacetin nachgewiesen und quantitativ erfaßt werden.<sup>28</sup>

erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Es zeigt sich, daß unter diesen Bedingungen die in der ersten Phase unter der hohen Phenacetin-Dosis ( $200 \text{ mg/kg} = 1\cdot12 \text{ mM/kg}$ ) nach Phenobarbitalvorbehandlung erzielbare Steigerung der Methämoglobin-Konzentration nicht zustandekommt. Dagegen liegt unter  $50 \text{ mg/kg}$  Phenacetin bei den induzierten Ratten während des ganzen Verlaufs die Methämoglobin-Konzentration deutlich unter derjenigen der Kontrollen. Demnach reicht bei

TABELLE 3. METHAEMOGLOBIN IN PROZENTEN DES GESAMTHAEMOGLOBINS NACH I.P. GABE VON  $50 \text{ MG/KG}$  PHENACETIN BEI INDUIZIERTEN RATTEN (INDUKTION SIEHE TABELLE 2)

Minuten nach Applikation	Kontrollen % Met-Hb	Induziert % Met-Hb
30	$4\cdot7 \pm 1\cdot4$ $n = 10$	$3\cdot5 \pm 2\cdot0^*$ $n = 13$
60	$9\cdot6 \pm 2\cdot2$ $n = 10$	$1\cdot3 \pm 0\cdot8^*$ $n = 13$
120	$7\cdot9 \pm 3\cdot6$ $n = 10$	$0\cdot7 \pm 0\cdot6^*$ $n = 13$
180	$2\cdot0 \pm 2\cdot0$ $n = 10$	$0\cdot5 \pm 0\cdot5$ $n = 13$

\* Unterschied gegenüber den Kontrollen:  $P < 0\cdot01$ .

niedriger Phenacetin-Dosis die Aktivitätszunahme entgiftender Umwandlungsschritte aus, um den Anfall nennenswerter Mengen *N*-hydroxylierter Produkte zu verhindern. In Abb. 1 ist die Auswirkung der Vorbehandlung mit Phenobarbital auf die Methämoglobin-Bildung unter  $200 \text{ mg/kg} = 1\cdot12 \text{ mM/kg}$  Phenacetin als prozentuale Abweichung von den zugehörigen Kontrollen dargestellt.

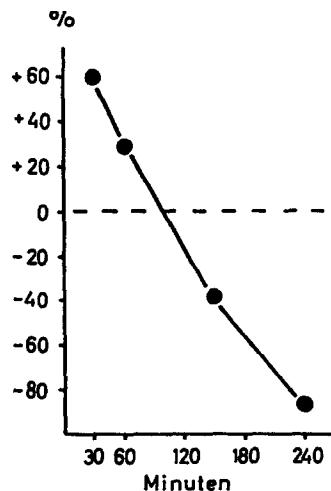


ABB. 1. Prozentuale Abweichung der Methämoglobinwerte gegenüber den Kontrollen (= 100%) bei induzierten Ratten nach Gabe von  $200 \text{ mg/kg} = 1\cdot12 \text{ mM/kg}$  Phenacetin.  
(Absolutwerte der Methämoglobin-Konzentrationen, Streuungen und Signifikanzen siehe Tabelle 2).

**B. Phenacetin- und NAPAP-Konzentration im Serum bei induzierten Ratten nach Gabe von Phenacetin**

In Abb. 2 sind die Ergebnisse nach 200 mg/kg = 1·12 mM/kg Phenacetin wiedergegeben. Bereits der Ausgangswert der Phenacetin-Konzentration im Serum (30 min nach Injektion) liegt mit 37 µg/ml Serum bei den induzierten Ratten um mehr als die

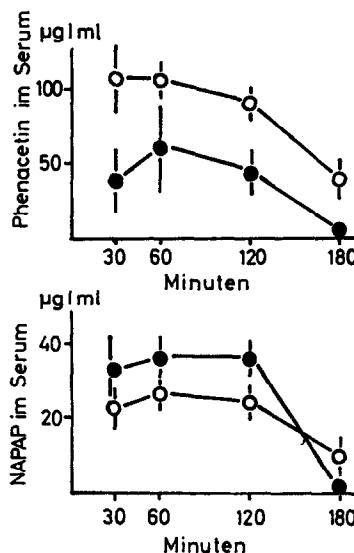


Abb. 2. Konzentration von Phenacetin und NAPAP im Serum ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) nach Gabe von 200 mg/kg = 1·12 mM/kg Phenacetin bei nicht induzierten (○—○) und induzierten Ratten (●—●).

Alle Meßpunkte sind Mittelwerte aus mindestens 4, maximal 7 Einzelbestimmungen.

Mit Ausnahme der NAPAP-Konzentration bei 30 min sind alle Unterschiede gegenüber den Kontrollen signifikant mit einem P-Wert  $< 0\cdot01$ .

Hälften niedriger als bei den Kontrollen (108 µg/ml). Im späteren Verlauf nimmt die Phenacetin-Konzentration im Serum der induzierten Tiere zwar noch etwas zu, bleibt aber weit unter derjenigen der Kontrolltiere und sinkt schließlich sehr rasch ab. Demgegenüber ist die NAPAP-Konzentration zu den Zeitpunkten 60 und 120 min gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht, was für eine induktiv bedingte Zunahme der O-Desalkylierung spricht. Diese allerdings im Vergleich zu der starken Abnahme der Phenacetin-Konzentration nicht sehr deutlich ausgeprägte Steigerung der NAPAP-Konzentration im Serum führte zu der Annahme, daß durch gleichzeitige Beschleunigung nachfolgender Umwandlungsschritte (wie z.B. der Konjugation des NAPAP) aus Phenacetin entstehendes NAPAP bei den induzierten Tieren in verstärktem Maße gleich weiter metabolisch umgewandelt wird, so daß die durch Induktion bedingte Steigerung der O-Desalkylierung gemessen an der NAPAP-Konzentration im Serum weniger deutlich in Erscheinung tritt.

**C. NAPAP-Konzentration im Serum nach Gabe von NAPAP bei induzierten Ratten**

Durch die Ergebnisse des in Tabelle 4 wiedergegebenen Versuchs konnte bestätigt werden, daß tatsächlich auch der O-Desalkylierung des Phenacetins nachfolgende Umwandlungsschritte, die zu einer verstärkten Elimination des NAPAP führen,

durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital induktiv beeinflußt werden. Nach Gabe von 600 mg/kg = 4 mM/kg NAPAP nimmt die NAPAP-Konzentration im Serum bei den induzierten Tieren rasch ab als bei den Kontrollen. Auch hier liegt bereits der Ausgangswert (nach 30 min) mit 395 µg/ml Serum bei den induzierten Ratten tiefer als bei den Kontrollen (538 µg/ml Serum).

TABELLE 4. NAPAP-KONZENTRATION IM SERUM NACH I.P. GABE VON 600 MG/KG NAPAP BEI INDUIZIERTEN RATTEN (INDUKTION SIEHE TABELLE 2)

Minuten nach Applikation	Kontrollen µg/ml	Induziert µg/ml
30	538 ± 89 <i>n</i> = 6	395 ± 116 <i>n</i> = 5
60	462 ± 61 <i>n</i> = 6	315 ± 33* <i>n</i> = 5
120	244 ± 65 <i>n</i> = 9	165 ± 33* <i>n</i> = 6
180	175 ± 56 <i>n</i> = 6	58 ± 26* <i>n</i> = 6
240	124 ± 8 <i>n</i> = 4	36 ± 15* <i>n</i> = 4

\* Unterschied gegenüber den Kontrollen:  $P < 0.01$ .

#### D. Ausscheidungsverhältnisse im Urin nach Gabe von Phenacetin bei induzierten Ratten

Eine wichtige Ergänzung für die Beurteilung des Verhaltens der Methämoglobin-Konzentration und der Phenacetin- bzw. NAPAP-Konzentration im Serum liefert die Bestimmung der im Urin nach Gabe von Phenacetin ausgeschiedenen Produkte.

Die Prüfung der Ausscheidungsverhältnisse nach 200 mg/kg = 1.12 mM/kg Phenacetin ergibt (Tabelle 5), daß bei den induzierten Tieren die Ausscheidung an

TABELLE 5. AUSSCHEIDUNGSMUSTER NACH 200 MG/KG PHENACETIN I.P. RATTEN, (BEI INDUIZIERTEN INDUKTION SIEHE TABELLE 2)

Stunden nach Applikation	ausgeschieden im Urin					
	Phenacetin µM	NAPAP µM	NAPAP-sulfat µM	NAPAP-glucuronid µM	Insgesamt µM	<i>n</i>
insgesamt	0-2	1.4 ± 0.7	3.6 ± 2.2	19.9 ± 6.0	7.8 ± 5.4	32.7
	2-4	0.9 ± 0.5	3.2 ± 1.3	28.0 ± 15.6	13.2 ± 6.1	45.3
	0-4	2.3	6.8	47.9	21.0	78.0
insgesamt	0-2	0.9 ± 0.4	5.0 ± 2.1	30.3 ± 10.8	36.0 ± 11.8*	72.2
	2-4	0.8 ± 0.5	6.9 ± 2.3*	48.5 ± 13.9*	67.9 ± 23.4*	124.1
	0-4	1.7	11.9	78.8	103.9	196.3

Unterschiede gegenüber den Kontrollen:  $P < 0.01$ .

nicht konjugiertem NAPAP im Zeitraum von 2–4 Stunden nach Verabreichung und die Ausscheidung an konjugiertem NAPAP—sowohl als Glucuronid wie auch als Sulfat—während der gesamten Dauer des Versuchs gesteigert ist. Aus dem Vergleich der in 4 Stunden insgesamt ausgeschiedenen Menge an NAPAP = Summe aus nicht konjugiertem + konjugiertem NAPAP ( $75.7 \mu\text{M}$  bei den Kontrollen und  $194.6 \mu\text{M}$  bei den induzierten Ratten) ergibt sich, daß bei den mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten die *O*-Desalkylierung um etwa das 2 1/2-fache zugenommen hat. Die vermehrt im Harn auftretenden Konjugate machen es andererseits verständlich, daß die Zunahme der NAPAP-Konzentration im Serum der induzierten Ratten, die als zwangsläufige Folge der erhöhten *O*-Desalkylierung zu erwarten war, nicht in vollem Umfang in Erscheinung treten konnte.

In Abb. 3 sind die insgesamt erfaßten Ausscheidungsprodukte umgerechnet in Prozent, bezogen auf die verabreichte Phenacetin-Dosis, dargestellt. Dabei kommen auch noch Werte für spätere Zeitpunkte, die in Tabelle 5 nicht aufgeführt sind, zur

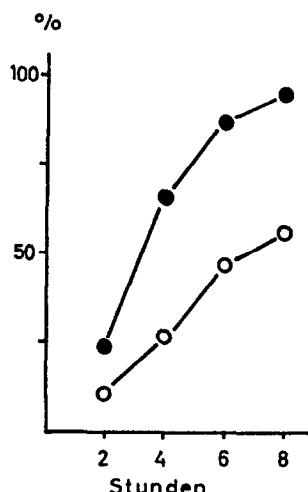


ABB. 3. Summe aller gemessenen Ausscheidungsprodukte im Urin (Phenacetin, NAPAP, NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid) nach Gabe von  $200 \text{ mg/kg} = 1.12 \text{ mM/kg}$  Phenacetin bei nicht induzierten (○—○) und bei induzierten Ratten (●—●) in Prozenten der applizierten Dosis.

Darstellung. Aus der Abb. 3 ist zu erkennen, daß die induzierten Ratten bereits zwischen 2–4 Stunden nach Injektion über 50 % der verabreichten Phenacetin-Dosis wieder ausgeschieden haben, während die Kontrollen erst zwischen 6 und 8 Stunden gleich viel eliminiert haben. Anders ausgedrückt: Die Geschwindigkeit der metabolischen Elimination des Phenacetins wird durch die vorausgehende Induktion mit Phenobarbital auf das Doppelte erhöht.

Die vermehrte Ausscheidung von NAPAP nach Gabe von Phenacetin an induzierte Ratten besagt demnach eindeutig, daß die *O*-Desalkylierung des Phenacetins durch Phenobarbital induktiv gesteigert wird.

Die vermehrte Ausscheidung von Konjugaten hingegen ist kein eindeutiges Resultat. Denn es konnte außer einer induktiven Aktivierung der Konjugation auch bedeuten,

daß durch das in erhöhtem Ausmaß anfallende NAPAP eine u.U. nicht völlig ausgeschöpfte Kapazität kuppelnder Enzymsysteme besser ausgenützt wird. Um nun zu prüfen, ob es zu einer induktiven Aktivierung der Sulfat- bzw. Glucuronid-Konjugation des NAPAP nach Vorbehandlung mit Phenobarbital kommt, wurden die Ausscheidungsverhältnisse nach Gabe von NAPAP anstelle von Phenacetin bei nicht induzierten und induzierten Ratten untersucht.

#### E. Dosisabhängigkeit des Ausscheidungsmusters nach NAPAP bei nicht induzierten Ratten

Die während 4 Stunden insgesamt im Harn gemessenen Ausscheidungsprodukte (NAPAP, NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid) umgerechnet in Prozent, bezogen auf die verabreichten NAPAP-Dosen, sind in Abb. 4 dargestellt. Wie aus der Kurve

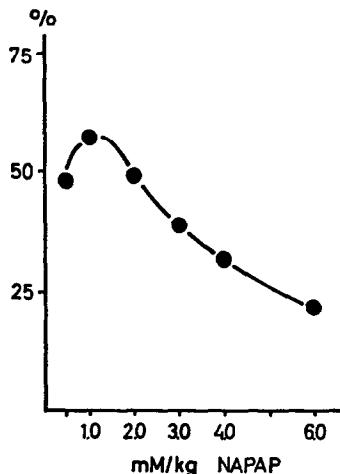


ABB. 4. Gesamtmenge der in 4 Stunden mit dem Urin bei nicht induzierten Ratten ausgeschiedenen Produkte (NAPAP, NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid) in Prozenten der verabreichten Menge in Abhängigkeit von der NAPAP-Dosis.  
(Absolutzahlen siehe Tabelle 6)

ersichtlich ist, erhält man für  $150 \text{ mg/kg} = 1.0 \text{ mM/kg}$  NAPAP den maximalen Wert der prozentualen Ausscheidung. Danach nimmt die Ausscheidung stetig ab.

Da nach Gabe von Phenolen, wie frühere Untersuchungen zeigen konnten,<sup>29-31</sup> das Verhältnis von Schwefelsäure-/Glucuronsäure-Konjugat im Harn sich in Abhängigkeit von der verabreichten Phenol-Dosis ändert, wurde zunächst die Ausscheidung der beiden Konjugate bei nicht induzierten Ratten unter ansteigender NAPAP-Dosis studiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tabelle 6 wiedergegeben. Bis zu einer NAPAP-Dosis von  $150 \text{ mg/kg} = 1.0 \text{ mM/kg}$  überwiegt die Ausscheidung an NAPAP-sulfat. Im höheren Dosis-Bereich (2.0-6.0 mM/kg) hingegen wird der größte Teil des verabreichten NAPAP als Glucuronid ausgeschieden. Es ließ sich somit bestätigen, daß niedrige Phenol-Dosen—hier des *N*-Acetyl-*p*-amino-phenols—vorwiegend als Schwefelsäure-Konjugat, höhere Dosen hingegen als Glucuronsäure-Konjugat ausgeschieden werden. Bemerkenswert ist die bei 6.0 mM/kg

auftretende Abnahme der NAPAP-sulfat-Ausscheidung, die Ausdruck einer Hemmung der Konjugation mit Schwefelsäure bei NAPAP-Überschuß sein könnte.

An Abb. 5 ist der prozentuale Anteil an der Gesamtausscheidung in 4 Stunden für NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid getrennt dargestellt. Der Verlauf beider

TABELLE 6. AUSSCHEIDUNGSMUSTER NACH I.P. GABE VON NAPAP IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DOSIS IM ZEITRAUM VON 0-4 STUNDEN NACH APPLIKATION

ausgeschieden im Urin nach 4 Stunden					
i.p. NAPAP mM/kg	NAPAP μM	NAPAP-*sulfat μM	NAPAP-* glucuronid μM	Insgesamt μM	n
0.5	6.9 ± 1.7	47.8 ± 12.3	18.4 ± 4.6	73.1	10
1.0	21.8 ± 7.4	87.8 ± 14.7	62.3 ± 6.5	171.9	8
2.0	53.6 ± 18.9	99.2 ± 20.0**	143.2 ± 27.9	296.0	12
3.0	69.3 ± 26.4	98.0 ± 25.1	180.1 ± 25.4	347.4	5
4.0	113.5 ± 33.1	85.1 ± 35.6	180.4 ± 41.6	379.0	10
6.0	130.4 ± 34.0	72.3 ± 12.6**	189.2 ± 62.0	391.9	5

\* Unterschiede hinsichtlich der Ausscheidung von NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid. P < 0.01.

\*\* Abnahme der NAPAP-sulfat-Ausscheidung im hohen Dosisbereich zwischen den bezeichneten Meßpunkten. P < 0.01.

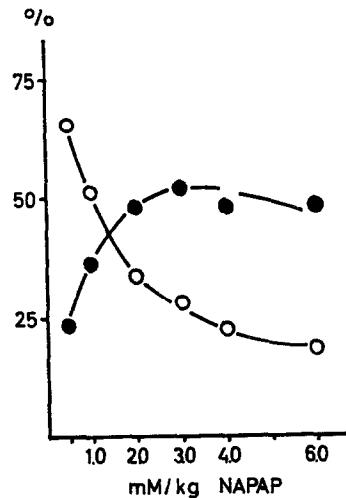


Abb. 5. Prozentualer Anteil von NAPAP-sulfat ○—○ und NAPAP-glucuronid ●—● an der Gesamtausscheidung in 4 Stunden in Abhängigkeit von der NAPAP-Dosis bei nicht induzierten Ratten.

(Absolutzahlen, Streuung und Signifikanz siehe Tabelle 6).

Kurven gibt die Unterschiede zwischen der Sulfat- und Glucuronid-Konjugation wieder. Demnach nimmt die Ausscheidung an NAPAP-sulfat, wenn man diese auf die Gesamtausscheidung bezieht, mit aufsteigender Dosis ab. Dagegen steigt der Anteil an ausgeschiedenem NAPAP-glucuronid nach Gabe von NAPAP bis zu 2 mM/kg an

und macht von da an bis zu 6 mM/kg gleichbleibend 50 % der Gesamtausscheidung aus, d.h. er beträgt mehr als das Doppelte der Ausscheidung an NAPAP-sulfat.

Schließlich ist in Abb. 6 in der unteren Geraden der prozentuale Anteil der Ausscheidung an nicht konjugiertem NAPAP ebenfalls bezogen auf die Gesamtausscheidung wiedergegeben. Der lineare Anstieg findet eine Erklärung, wenn man ihm die

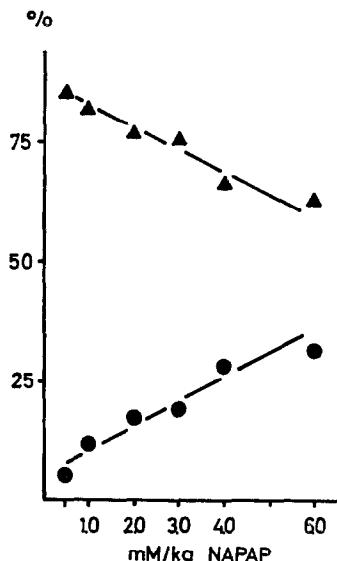


ABB. 6. Prozentualer Anteil an der Gesamtausscheidung in 4 Stunden für NAPAP ●—● und die Summe der ausgeschiedenen Konjugate (NAPAP-sulfat + NAPAP-glucuronid) ▲—▲ bei nicht induzierten Ratten.

(Absolutzahlen, Streuung und Signifikanzen siehe Tabelle 6.)

Summe der ausgeschiedenen Konjugate in Prozent bezogen auf die Gesamtausscheidung gegenübergestellt. Bei dieser Darstellung kommt zum Ausdruck, daß wie zu erwarten eine von der Dosis abhängige umgekehrte Proportionalität zwischen dem Anteil der insgesamt ausgeschiedenen Konjugate einerseits und dem Anteil des unveränderten NAPAP an der Gesamtausscheidung andererseits besteht.

#### F. Beeinflussung des Ausscheidungsmusters nach Gabe von NAPAP durch Vorbehandlung mit Phenobarbital

Nachdem die Dosisabhängigkeit des Ausscheidungsmusters von NAPAP an nicht induzierten Ratten geprüft worden war, konnten die Versuche zur Beantwortung der noch offenstehenden Frage, nämlich einer eventuellen Beeinflussung konjugierender Enzymsysteme durch Vorbehandlung mit Phenobarbital, durchgeführt werden. Hierzu wurde NAPAP in niedriger ( $150 \text{ mg/kg} = 1.0 \text{ mM/kg}$ ) und in hoher ( $600 \text{ mg/kg} = 4.0 \text{ mM/kg}$ ) Dosis an induzierte Ratten verabreicht. Dabei ergab sich (Abb. 7), daß unter diesen Bedingungen nur eine induktive Zunahme der Konjugation von NAPAP mit Glucuronsäure zu beobachten ist, hingegen die Konjugation mit Schwefelsäure offensichtlich unbeeinflußt bleibt (siehe Tabelle 7). Die Steigerung der Ausscheidung an NAPAP-glucuronid beträgt im Zeitraum bis zu 4 Stunden nach der

Injektion von NAPAP bei der niedrigen Dosis rund 100% und bei der hohen Dosis immerhin noch 60%. Im Zeitraum von 4–8 Stunden nach Verabfolgung ist die Ausscheidung an NAPAP-glucuronid gegenüber den Kontrollen auch noch stark erhöht. Bei der hohen Dosis liegt sie noch doppelt so hoch. Bei der niedrigen Dosis hingegen ist die Ausscheidung schon nach der ersten Untersuchungsperiode (von 0–4 Stunden) weitgehend abgeschlossen. Daß sich auch die Konjugation des NAPAP mit Schwefelsäure induktiv steigern läßt—allerdings nur nach Zulage von Sulfat—wurde bereits kurz mitgeteilt.<sup>32</sup>

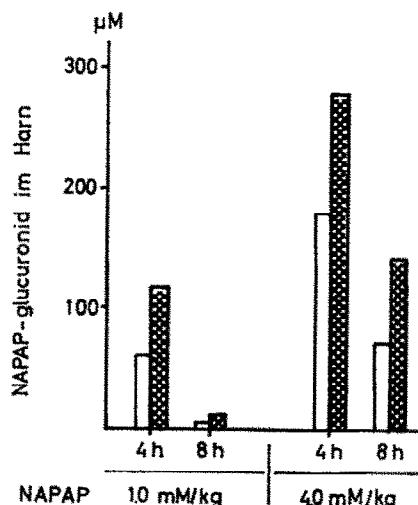


ABB. 7. Steigerung der Ausscheidung des NAPAP-glucuronids bei induzierten Ratten nach Gabe von NAPAP in verschiedener Dosierung. Induziert = ■; nicht induziert = □.

(Absolutzahlen, Streuung und Signifikanzen siehe Tabelle 7).

TABELLE 7. AUSSCHEIDUNGSMUSTER BEI INDUIZIERTEN RATTEN NACH 1·0 BZW. 4·0 mM/kg (= 150 BZW. 600 MG/kg NAPAP i.p. IM ZEITRAUM VON 0–8 STUNDEN (INDUKTION SIEHE TABELLE 2)

NAPAP mM/kg	Stunden nach Applikation	ausgeschieden im Urin					n
		NAPAP μM	NAPAP-sulfat μM	NAPAP- glucuronid μM	Insgesamt μM		
1·0	0–4	21·8 ± 1·7	Kontrollen		62·3 ± 6·5	171·9	8
	4–8	1·3 ± 0·3	87·8 ± 14·7	1·7 ± 1·1	18·0	9	
1·0	0–4	25·6 ± 7·1	Induziert		90·6 ± 26·7	117·9 ± 33·3*	10
	4–8	—	15·0 ± 5·7	9·8 ± 4·0*	25·7	10	
4·0	0–4	113·5 ± 33·1	Kontrollen		85·1 ± 35·6	180·4 ± 41·6	10
	4–8	30·4 ± 16·5	26·7 ± 12·5	73·8 ± 12·5	134·5	14	
4·0	0–4	100·1 ± 25·2	Induziert		67·7 ± 23·3	279·1 ± 45·1*	8
	4–8	18·4 ± 4·8	31·9 ± 8·5	142·0 ± 57·8*	192·3	10	

\* Unterschied gegenüber den Kontrollen: P < 0·01.

### DISKUSSION

Die Versuche ergaben, daß durch Induktion mit Phenobarbital die *O*-Desalkylierung, die *N*-Hydroxylierung und die Konjugation mit Glucuronsäure gesteigert werden können.

Schon Conney und Mitarb.<sup>19, 20</sup> zeigten, daß bei der Katze wie auch bei der Ratte nach Induktion mit 3-Methylcholanthren Phenacetin verstärkt *O*-desalkyliert wird. Unter unseren Versuchsbedingungen sinkt analog hierzu bei den mit Phenobarbital induzierten Tieren als Zeichen der verstärkten *O*-Desalkylierung die Phenacetin-Konzentration im Serum immer rascher ab, während die NAPAP-Konzentration im Serum erwartungsgemäß gegenüber den Kontrollen erhöht ist. Verglichen mit dem rapiden Abfall der Phenacetin-Konzentration im Serum stieg die NAPAP-Konzentration im Serum verhältnismäßig wenig an. Der Verdacht, daß neben der *O*-Desalkylierung möglicherweise auch die Konjugation des entstandenen NAPAP durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital aktiviert wurde, konnte durch weitere Versuche bewiesen werden.

Die beschleunigte Elimination von NAPAP bei induzierten Ratten gab die Berechtigung, an eine induktive Beeinflussung der Konjugation zu denken. Durch Messung der Ausscheidungsprodukte im Urin konnte dann tatsächlich auch eine ausgeprägte Mehrausscheidung von NAPAP-glucuronid nachgewiesen werden. Bereits Remmer hat—diesem Ergebnis analog—gezeigt, daß bei der Ratte nach Vorbehandlung mit Phenobarbital Sulfadimethoxin in erhöhtem Umfang als Glucuronid-Konjugat im Urin ausgeschieden wird.<sup>33</sup> Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital kann unter den besonderen Bedingungen einer gleichzeitigen Zulage von Sulfat auch eine gesteigerte Konjugation von NAPAP mit Schwefelsäure nachgewiesen werden, wie bereits kurz mitgeteilt wurde.<sup>32</sup> Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kupplungsreaktionen traten hier auch bei den nicht induzierten Ratten in Erscheinung. Der Befund, daß das Ausscheidungsverhältnis Schwefelsäure-/Glucuronsäure-Konjugat in Abhängigkeit von der NAPAP-Dosis variiert, so daß NAPAP bei niedriger Dosierung vorwiegend als Sulfat bei höherer hingegen größtenteils als Glucuronid ausgeschieden wird, ist am Kaninchen mit Phenolen bereits beschrieben.<sup>29, 30</sup> In unseren Untersuchungen fällt auf, daß im hohen Dosisbereich sogar absolut eine Abnahme der Ausscheidung des NAPAP-sulfates auftritt. Es sieht so aus, als ob hier eine Substrathemmung die Ursache ist. Demgegenüber nimmt die Konjugation des NAPAP mit Glucuronsäure äute bis in den hohen Dosisbereich zu (Tabelle 6).

Die durch Vorbehandlung mit Phenobarbital bedingte Aktivierung von Abbau und Konjugation hat eine verringerte Wirksamkeit und beschleunigte Entgiftung der beiden Analgetica zur Folge. Eine Vorbehandlung mit Phenobarbital kann aber auch das Gegenteil, nämlich eine Steigerung der Toxizität, verursachen. Denn bei ausreichender Dosierung von Phenacetin entsteht als Folge einer Zunahme der von Krisch beschriebenen mikrosomalen Esterase der Leber<sup>34-36</sup> vermehrt *p*-Phenetidin, das seinerseits infolge der Aktivierung der *N*-Hydroxylierung vermehrt in *p*-Äthoxyphenyl-hydroxylamin bzw. *p*-Äthoxy-nitrosobenzol umgewandelt wird. Auf der Zunahme dieser toxischen Metaboliten beruht aller Wahrscheinlichkeit nach die vermehrte Bildung von Methämoglobin nach Phenobarbitalvorbehandlung bei ausreichendem Phenacetin-Angebot. Diese Steigerung der Methämoglobin-Bildung ist bei den induzierten Tieren jedoch nur in einer ersten Phase nachweisbar. In einer zweiten Phase kehrt die Methämoglobin-Konzentration dann aber bei den mit Phenobarbital vorbehandelten

Ratten schneller wieder zur Norm zurück als bei den nicht induzierten Tieren. Dieser biphasische Effekt beruht wohl darauf, daß kurz nach der Applikation genügend Phenacetin zur Desacetylierung und *N*-Hydroxylierung zur Verfügung steht. Daneben wird aber bei den induzierten Tieren infolge Aktivierung der *O*-Desalkylierung Phenacetin gleichzeitig vermehrt eliminiert, so daß bald ein Stadium erreicht ist, wo weniger Substrat für eine *N*-Hydroxylierung als bei den nicht induzierten Ratten verfügbar ist. Das steht auch mit der niedrigeren Phenacetin-Konzentration im Serum der induzierten Tiere in Übereinstimmung. (Abb. 2). Darauf beruht auch die raschere Abnahme der Methämoglobin-Konzentration bei den induzierten Tieren in der zweiten Phase.

Mit einer derartigen Interpretation steht auch der Befund in Einklang, daß bei niedriger Dosierung während des ganzen Beobachtungszeitraumes weniger Methämoglobin gebildet wird. Bei der niedrigen Dosierung reicht die Beschleunigung der *O*-Desalkylierung und der Konjugation offenbar aus, das hydroxylierbare Material in dem Maße zu vermindern, daß die erhöhte Aktivität der zu den toxischen Metaboliten führenden Umwandlungsvorgänge sich gar nicht mehr auswirken kann. Neben der Erhöhung der Methämoglobin-Konzentration unter Phenacetin, die eine Folge der induktiven Aktivierung der Desacetylierung und *N*-Hydroxylierung durch Phenobarbital ist, konnte auch das Umgekehrte, nämlich eine Verminderung der Methämoglobin-Bildung durch Phenobarbital nachgewiesen werden, die zweierlei Ursachen haben kann. Bei nicht induzierten Tieren ist diese Verminderung der Methämoglobin-Konzentration durch Phenobarbital nach gleichzeitiger Gabe von Phenacetin wohl auf die kompetitive Hemmung der Hydroxylasen zurückzuführen.<sup>25</sup> Bei induzierten Tieren dagegen handelt es sich um die Folge einer beschleunigten Elimination durch gesteigerte *O*-Desalkylierung und Konjugation.

Phenacetin und NAPAP sind in Kombinationspräparaten häufig zusammen mit Phenobarbital vorhanden. Da diese analgetisch wirksamen Mischpräparate oft über einen längeren Zeitraum eingenommen werden, kann man annehmen, daß diese im Tierversuch nachgewiesenen Zusammenhänge unter therapeutischen bzw. toxikologischen Verhältnissen auch am Menschen von Bedeutung sind.

**Zusammenfassung**—Die an Ratten durchgeföhrten Untersuchungen ergaben, daß nach Vorbehandlung mit Phenobarbital Phenacetin und *N*-Acetyl-*p*-aminophenol (NAPAP) verstärkt metabolisch umgewandelt werden. Anhand der Messung der Serumkonzentration von Phenacetin und NAPAP sowie deren Ausscheidungsprodukte im Harn konnte eine induktive Steigerung der *O*-Desalkylierung des Phenacetins und der Konjugation des NAPAP nachgewiesen werden. Die bei den induzierten Ratten unter hoher Phenacetin-Dosierung erhöhte Methämoglobin-Konzentration wird auf eine Aktivierung der Desacetylierung und *N*-Hydroxylierung zurückgeführt. Somit läßt sich durch Induktion mit Phenobarbital in Bezug auf die metabolische Umwandlung des Phenacetins einerseits eine Aktivierung entgifrender, für die Elimination maßgebender Vorgänge und andererseits aber gleichzeitig, gemessen an der Methämoglobin-Konzentration, eine Zunahme der Toxizität nachweisen. Die beschleunigte Konjugation des NAPAP nach Induktion mit Phenobarbital hat hingegen ausschließlich eine schnellere Entgiftung zur Folge.

#### LITERATUR

1. H. BÜCH, W. RUMMEL, K. PFLEGER und G. KARACHISTIANDIS, *Arch. exp. Path. Pharmak.*, **247**, 378 (1964).

2. H. BÜCH, G. KARACHRISTIANIDIS und W. RÜDIGER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **251**, 107 (1965).
3. J. AXELROD, *Fedn Proc.* **13**, 332 (1954).
4. J. AXELROD, *J. biol. Chem.* **214**, 753 (1955).
5. B. B. BRODIE, J. R. GILLETTE und B. N. LA DU, *A. Rev. Biochem.* **27**, 427 (1958).
6. B. N. LA DU, L. GAUDETTE, N. TROUSOF und B. B. BRODIE, *J. biol. Chem.* **214**, 741 (1955).
7. H. REMMER, *Naturwissenschaften* **45**, 189 (1958).
8. H. REMMER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **235**, 279 (1959).
9. H. REMMER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **236**, 7 (1959).
10. H. REMMER und H. J. MERKER, *Klin. Wschr.* **41**, 276 (1963).
11. H. A. CONNEY, E. C. MILLER und J. A. MILLER, *J. biol. Chem.* **228**, 753 (1957).
12. A. H. CONNEY, J. R. GILLETTE, J. K. INSCOE, E. R. TRAMS und H. S. POSNER, *Science*, **130**, 1478 (1959).
13. A. H. CONNEY, C. DAVISON, R. GASTEL und J. J. BURNS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **130**, 1 (1960).
14. A. H. CONNEY und J. J. BURNS, *Adv. Pharmac.* **1**, 31 (1961).
15. H. REMMER und B. ALSLEBEN, *Klin. Wschr.* **36**, 332 (1958).
16. H. REMMER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **237**, 296 (1959).
17. R. KATO und P. VASSANELLI, *Biochem. Pharmac.* **11**, 779 (1962).
18. S. A. CUCINELL, A. H. CONNEY, M. SANSUR und J. J. BURNS, *Clin. Pharmac. Ther.* **6**, 420 (1965).
19. R. M. WELCH, A. H. CONNEY und J. J. BURNS, *Biochem. Pharmac.* **15**, 521 (1966).
20. A. H. CONNEY, M. SANSUR, F. SOROKO, R. KOSTER und J. J. BURNS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **151**, 133 (1966).
21. A. GHAZAL, W. KORANSKY, J. PORTIG, H. W. VOHLAND und I. KLEMPAU, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **249**, 1 (1964).
22. B. B. BRODIE and J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **94**, 29 (1948).
23. J. N. SMITH und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **44**, 239 (1949).
24. R. HAVEMANN, F. JUNG und B. VON ISSEKUTZ, *Hinsberg-Lang, Medizinische Chemie*, Urban-Schwarzenberg, München und Berlin (1957).
25. H. BÜCH, W. GERHARDS, G. KARACHRISTIANIDIS, K. PFLEGER und W. RUMMEL, *Biochem. Pharmac.* (1967). Ms. 1674.
26. H. BÜCH, K. PFLEGER und W. RÜDIGER, *Z. Klin. Chem.* im Druck (1966)..
27. E. STAHL, *Dünnenschichtchromatographie*. Springer Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg (1962).
28. H. BÜCH, H. HÄUSER, K. PFLEGER und W. RÜDIGER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **235**, 25 (1965).
29. H. G. BRAY, B. G. HUMPHRIS, W. V. THORPE, K. WITHE and P. B. WOOD, *Biochem. J.* **52**, 416 (1952).
30. H. G. BRAY, B. G. HUMPHRIS, W. V. THORPE, K. WITHE und P. B. WOOD, *Biochem. J.* **52**, 419 (1952).
31. R. T. WILLIAMS, *Detoxication mechanisms*. Chapman & Hall, London p. 279. (1959).
32. H. BÜCH, CH. ESCHRICH und K. PFLEGER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **255**, 6 (1966).
33. H. REMMER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **247**, 461 (1964).
34. H. C. BENÖHR, W. FRANZ und K. KRISCH, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **255**, 163 (1966).
35. K. KRISCH, *Biochem. Z.* **337**, 531 (1963).
36. K. KRISCH, *Biochem. Z.* **337**, 546 (1963).