

Verhalten von p-Nitrophenolglucuronid bei der Spaltung mit Mineralsäuren

S. Goenechea, K. Kobbe und K.-J. Goebel

Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn, Stiftsplatz 12, D-5300 Bonn,
Bundesrepublik Deutschland

Behaviour of p-Nitrophenol-Glucuronide in Hydrolysis with Mineral Acids

Summary. The behaviour of p-nitrophenol and synthetic p-nitrophenol-glucuronide with mineral acids has been investigated. With sulfuric acid (33%) about 93% of the glucuronide derivative have been hydrolysed; the solution was heated in open vessel for 15 sec. With hydrochloric acid (6%) only about 65% of the conjugated p-nitrophenol have been converted to the free form. No losses were detected, when free p-nitrophenol was treated under the same conditions. Three other methods of hydrolysis have been applied.

Key word: p-Nitrophenol-glucuronide, Hydrolysis

Zusammenfassung. Das Verhalten von p-Nitrophenol und von synthetischem p-Nitrophenolglucuronid bei der Hydrolyse mit Mineralsäuren wurde untersucht. Mit freiem p-Nitrophenol traten keine Verluste auf. Mit 33%iger Schwefelsäure wurden ca. 93% des p-Nitrophenolglucuronids gespalten (Hydrolysedauer 15 Sek. im offenen Gefäß). Bei einer Istündigen Hydrolyse im kochenden Wasserbad wurden dagegen mit 6%iger Salzsäure nur etwa 65% des Glucuronids hydrolysiert. Drei weitere Hydrolysebedingungen wurden zusätzlich angewandt.

Schlüsselwort: p-Nitrophenolglucuronid, Spaltung

Für die Kontrolle einer Parathion- oder Paraoxonexposition und zur Sicherung der Diagnose bei Verdacht auf eine Intoxikation mit diesen Pflanzenschutzmitteln — vor allem bei Notfalluntersuchungen — wird die Untersuchung von Harn auf einen p-Nitrophenolgehalt empfohlen (von Eicken, 1954; Elliott et al.,

Sonderdruckanfragen an: Prof. Dr. Dipl.-Chem. S. Goenechea (Adresse siehe oben)

1960; Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1966; Henschler, 1976). Bei allen Verfahren erfolgt der Nachweis und die quantitative Bestimmung nach Hydrolyse der Konjugate und Extraktion des freigesetzten p-Nitrophenols.

Die angegebenen Hydrolysebedingungen sind sehr unterschiedlich. Meistens werden Mineralsäuren verwendet. Die Säurekonzentration des Reaktionsgemisches liegt zwischen 6% Salzsäure (von Eicken, 1954; Elliott et al., 1960; Henschler, 1976) und 33% Schwefelsäure (Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1966). Mit Salzsäure wird der Harn eine Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Für die Hydrolyse mit Schwefelsäure wird die Harnprobe 15 Sekunden im offenen Gefäß auf einem Drahtnetz gekocht.

Verschiedene Autoren haben den Einfluß der Salzsäurekonzentration und der Hydrolysedauer (Elliott et al., 1960; Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1966) sowie den Einfluß von verschiedenen Säuren (Geldmacher-v. Mallinckrodt, 1966) auf die p-Nitrophenolausbeute untersucht.

Für diese Untersuchungen wurden Harnproben von parathionexponierten Personen (Elliott et al., 1960) oder von Vergiftungsfällen (Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1966) benutzt. Von Eicken (1954) verwendete Harnproben aus Tierversuchen bzw. aus einem Selbstversuch mit Parathion.

Bei diesen Untersuchungen können die Versuchsbedingungen ausfindig gemacht werden, unter denen die größte p-Nitrophenolausbeute erzielt wird. Es ist jedoch nicht möglich zu erfahren, wieviel der tatsächlich vorhandenen p-Nitrophenolkonjugate gespalten wird und darüber hinaus, wieviel des freigesetzten Aglykons die Hydrolyse übersteht.

Das Ziel unserer Arbeit war, das Verhalten des p-Nitrophenolglucuronids gegenüber Mineralsäuren zu untersuchen. Dafür wurde p-Nitrophenolglucuronid synthetisiert. Bekannte Mengen des authentischen Produktes wurden unter verschiedenen — für die Spaltung von p-Nitrophenolkonjugaten beschriebenen — Hydrolysebedingungen behandelt.

Es wurden ferner drei weitere Hydrolysemethoden angewandt. Sie sind nicht speziell für die Untersuchung auf p-Nitrophenol beschrieben, sie werden jedoch sehr häufig bei Arzneimittel-„screenings“ im Harn verwendet.

Arbeitsmethodik

Synthese von p-Nitrophenolglucuronid

Sie erfolgte nach der Methode von Kato, K. et al. (1960).

Hydrolyse des p-Nitrophenolglucuronid

Eine wäßrige p-Nitrophenolglucuronidlösung (4,32 mg pro 100 ml) wurde unter folgenden Bedingungen hydrolysiert:

a) Methode 1 (Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1966). Das Reaktionsgemisch enthielt 33% Schwefelsäure und wurde 15 Sekunden auf dem Drahtnetz im offenen Gefäß gekocht.

b) Methode 2 (von Eicken, 1954; Elliott et al., 1960; Henschler, 1976). Das Reaktionsgemisch enthielt 6% Salzsäure und wurde in einem mit Schliffstopfen verschlossenen Gefäß 1 Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt.

c) Methode 3 (Geldmacher-v. Mallinckrodt et al., 1970; Schütz, 1971). Die Hydrolyse wurde mit 20% Salzsäure durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde auf dem Drahtnetz 6 Minuten im offenen Gefäß gekocht.

d) Methode 4. Die Hydrolyse erfolgte mit 12–13% Salzsäure. Das Reaktionsgemisch wurde im offenen Gefäß 30 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt.

e) Methode 5 (Kamm et al., 1969). Es wurde mit ca. 5%iger Salzsäure 30 Minuten lang im kochenden Wasserbad unter Rückfluß hydrolysiert.

Extraktion und quantitative Bestimmung

Das freigesetzte p-Nitrophenol wurde aus dem Reaktionsgemisch mit ca. 2 Volumina Extraktionsgemisch (Petroleumbenzin/Äther/Isoamylalkohol (800:200:1)) extrahiert.

Das organische Lösungsmittel wurde abgetrennt und mit 4 ml 2 N Ammoniaklösung ausgeschüttelt. Diese Lösung wurde dann zwischen 350 und 450 nm gegen 2N NH₄OH gemessen und aus der Extinktion bei 400 nm die p-Nitrophenolkonzentration berechnet. Es wurde ein Leitz-Unicam-Spektralphotometer Modell SP 800 B verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Zuerst wurde die p-Nitrophenolbeute unter den angegebenen Extraktionsbedingungen ermittelt. Die Wiedergewinnungsrate betrug 88%. Um die aus dem Glucuronid bei den verschiedenen Hydrolysemethoden freigesetzte p-Nitrophenolmenge genau zu bestimmen, wurden bekannte Mengen p-Nitrophenol genauso behandelt wie das Glucuronid. Bei keinem der Verfahren traten meßbare Verluste auf.

In Tabelle 1 sind die p-Nitrophenolmengen, die unter den verschiedenen Hydrolysebedingungen aus dem Glucuronid gespalten wurden, angegeben.

Die besten Ergebnisse wurden — trotz der kurzen Hydrolysedauer — mit den höheren Säurekonzentrationen und Temperaturen erzielt. Mit Methode 1 wurden ca. 93%, mit Methode 3 ca. 85% des p-Nitrophenolglucuronids gespalten.

Bei etwa gleicher Temperatur (kochendes Wasserbad) und gleicher Hydrolysedauer (30 Minuten) werden mit 12–13% Salzsäure (Methode 4) ca. 75%, aber mit etwa 5% Salzsäure (Methode 5) nur etwa 42% des p-Nitrophenolglucuronids hydrolysiert. Bei ebenfalls gleicher Temperatur, aber im geschlossenen Gefäß und bei einer Istündigen Hydrolysedauer wurden mit 6% Salzsäure (Methode 2) ca. 65% des Glucuronids gespalten.

Die vorliegenden Untersuchungen gestatten keine Schlußfolgerung auf die Gesamtausbeute an p-Nitrophenol bei der Durchführung von Harnuntersuchun-

Tabelle 1. Ergebnisse der Spaltung von p-Nitrophenolglucuronid mit Mineralsäuren

Methode	Gespalten	Nicht gespalten
1 (n = 10)	93,2%	6,8%
2 (n = 10)	65,4%	34,6%
3 (n = 3)	85,1%	14,9%
4 (n = 3)	74,9%	25,1%
5 (n = 3)	42,3%	57,7%

gen, da das p-Nitrophenol zwar wahrscheinlich vorwiegend als Glucuronid ausgeschieden wird, aber auch in Form von anderen Konjugaten (Sulfat und Acetat), deren Anteil in der Gesamtausscheidung nicht bekannt ist.

Die Untersuchungen haben aber gezeigt, daß mit den zwei geläufigsten Analysemethoden zur quantitativen p-Nitrophenolbestimmung im Harn (Methode 1 und 2) bei der Glucuronidspaltung recht unterschiedliche Ausbeuten an Aglykon erzielt werden.

Dies verdeutlicht — wie bei den Untersuchungen mit Morphin-3- und Codein-6-glucuronid gezeigt wurde — die Problematik der Interpretation quantitativer Ergebnisse durch den bloßen Vergleich mit den veröffentlichten Daten, wenn die jeweils angewandten Aufbereitungsverfahren unberücksichtigt bleiben. Mit den Methoden 3, 4 und 5 ergibt sich in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Morphin-3- (Goenechea et al., 1978 a) und Codein-6-glucuronid (Goenechea et al., 1978 b), daß unter den gegebenen zeitlichen Verhältnissen (30 Minuten) und Temperatur (kochendes Wasserbad) mit ca. 5% HCl (Methode 5) mehr als die Hälfte der Aglykone nicht freigesetzt wird. Die besten Ausbeuten wurden bei allen drei Glucuroniden mit 20% HCl erzielt (Methode 3): sie liegen zwischen 85 und 93%.

Es ist aber durchaus denkbar, daß bei der Spaltung mancher konjugierten Verbindung aufgrund der Säurelabilität der Aglykone stärkere Säurekonzentrationen zur Vernichtung erheblicher Mengen der gesuchten Substanzen führen können. Deshalb dürfen aus den bisherigen Untersuchungen keine allgemeinen Schlüsse auf die Eignung der ausgewählten Verfahren gezogen werden.

Literatur

1. Eicken, S. von: Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel „E 605“. *Angew. Chem.* **66**, 551—553 (1954)
2. Elliott, J. W., Walker, K. C., Penick, A. P., Durham, W. F.: A sensitive procedure for urinary p-nitrophenol determination as a measure of exposure to parathion. *J. Agr. Food Chem.* **8**, 111—113 (1960)
3. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Deinzer, K.: Schnellreaktion auf p-Nitrophenol im Harn zum Nachweis einer E 605-Vergiftung. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **4**, 81—85 (1966)
4. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Mang, U.: Schnellnachweis von Metaboliten des Methaqualon und der Chlordiazepoxid-Gruppe im Harn. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **8**, 259—262 (1970)
5. Goenechea, S., Goebel, K.-J.: Verhalten von Morphin-3-Glucuronid bei der Hydrolyse mit Salzsäure. *Beiträge zur gerichtl. Med.* **36**, 503—507 (1978 a)
6. Goenechea, S., Kobbé, K., Goebel, K.-J.: Verhalten von Codein und Codein-6-glucuronid bei der Hydrolyse mit Salzsäure. *Arzneim. Forsch.* **28**, 1070—1071 (1978 b)
7. Henschler, D.: Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd. 2. Analyse in biologischem Material. Weinheim: Verlag Chemie 1976
8. Kamm, G., Kelm, R.: Quantitativer Nachweis von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on im Plasma bei einmaliger und längerer Verabreichung. *Arzneim. Forsch.* **19**, 1659—1662 (1969)
9. Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H., Nobunaga, M., Masuya, M., Sawada, T.: Synthesis of p-nitrophenol- β -D-glucopyranosid uronic acid and its utilization as a substrate for the assay of β -glucuronidase activity. *Chem. Pharm. Bull. (Japan)* **8**, 239 (1960)
10. Schütz, H. W.: Über den Nachweis von Morphin und Morphinderivaten im Urin. *Beitr. Ger. Med.* **28**, 354—358 (1971)

Eingegangen am 10. Januar 1979