

Originalarbeiten / Original Works

**Spaltung von 2-Phenylpropan-1-ol-
und 2-Phenylpropan-2-ol-Glucuronid,
zweier Metaboliten des Isopropylbenzol (Cumol)***

S. Goenechea¹, G. Rücker², G. Hoffmann¹, M. Neugebauer² und M. Langer¹

¹Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn,
Stiftsplatz 12, D-5300 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

²Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn,
Kreuzbergweg 26, D-5300 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

**Cleavage of the Glucuronides of 2-Phenylpropane-1-ol
and 2-Phenylpropane-2-ol,
two Metabolites of Isopropylbenzene (Cumene)**

Summary. The behaviour of 2-phenyl-1-propanol (I) and 2-phenyl-2-propanol (II) and their glucuronides with HCl has been investigated. While I shows a high acidic constancy, II undergoes a partial conversion into 2-phenylpropane (III) which itself yields numerous products. The glucosidic bond of glucuronide I is quantitatively split by 10.0% HCl, whereby an aglucone yield of nearly 100% is obtained. The second glucuronide behaves otherwise: the recovery of II is very low (only 40% to 45%) with HCl concentrations of 1.0%–20.0%, although with 1.0% HCl 100% of the glucuronide is hydrolysed.

Key words: Cumene, metabolites – Isopropylbenzene, metabolites

Zusammenfassung. Es wird über das Verhalten von 2-Phenylpropan-1-ol (I) und 2-Phenylpropan-2-ol (II) (beide sind Metaboliten von Cumol) und ihrer Glucuronide gegenüber HCl berichtet. Während I eine hohe Säurebeständigkeit aufweist, erfährt II eine Umwandlung in 2-Phenylpropan (III), aus dem durch Folgereaktionen zahlreiche Produkte entstehen. Die glykosidische Bindung des I-Glucuronides wird mit 10,0% HCl quantitativ gespalten, wobei eine Aglykonusausbeute von nahezu 100% erzielt wird. Anders verhält sich das II-Glucuronid: die Wiederfindungsraten an II liegen mit nur 40 bis 45% im gesamten HCl-Konzentrationsbereich (1,0% bis 20,0%) sehr

* Auszugsweise vorgetragen bei der 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in St. Gallen, 9.–13. 9. 1986

Sonderdruckanfragen an: S. Goenechea (Adresse siehe oben)

niedrig, obwohl schon mit 1,0% HCl eine Hydrolyserate des Glucuronides von 100% erreicht wird.

Schlüsselwörter: Cumol, Metaboliten – Isopropylbenzol, Metaboliten

Isopropylbenzol (Cumol) benutzt man u. a. zur Herstellung von Phenol, Acetophenon, α -Methylstyrol und von Cumolsulfonat, das als Lösungsvermittler Verwendung findet [7, 12]. Sein MAK-Wert wurde auf 245 mg/m^3 (50 ml/m^3) festgesetzt [3]. Isopropylbenzol wird bei Kaninchen nach oraler Gabe zu etwa 40% in 2-Phenylpropan-2-ol (II) und zu etwa je 25% in 2-Phenylpropan-1-ol (I) und 2-Phenylpropionsäure umgewandelt [9]. Diese drei Metaboliten werden als Glucuronide ausgeschieden. Bei Menschen wurden etwa 35% des inhalierten Isopropylbenzols in II umgewandelt [10]. Das Ziel dieser Arbeit war, die Wiederfindungsraten von I und II bei der Spaltung ihrer Glucuronide zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde das Glucuronid von I synthetisiert; das II-Glucuronid wurde aus Mäuseharn – nach Fütterungsversuchen mit Cumol bzw. mit II – isoliert.

Arbeitsmethodik

Gewinnung der Glucuronide

I-Glucuronid wurde durch Kondensation von I mit Acetylbromglucuronsäure [1] in Gegenwart von $\text{Ag}_2\text{CO}_3/\text{Celite}$ [4] und anschließender alkalischer Hydrolyse der Schutzgruppen in 4 N NaOH/Aceton mit 40% Ausbeute erhalten [5]. II-Glucuronid wurde aus Sammelharn von Mäusen, die mit Cumol bzw. mit II gefüttert worden waren, gewonnen [5].

Die gewonnenen Glucuronide wurden massenspektrometrisch identifiziert [2]. Für die Hydrolyseversuche von II-Glucuronid wurde ein angereichertes Produkt, das 60% der Verbindung enthielt, verwendet, da die Gewinnung der Reinsubstanz wegen ihrer Wärme- und Säurelabilität [9] nicht möglich war.

Quantitative Bestimmung

Kapillar-GC: Gaschromatograph: DANI 3900 (DANI-Analysentechnik, Mainz-Kastel) mit Shimadzu-Chromatopac C-R2A-(X)-Integrator (Shimadzu Corporation, Tokyo). Borosilikatglas Kapillarsäule, 20 m lang, 0,25 mm innerer Durchmesser. Filmdicke: 0,30 μm . Stationäre Phase: SE 54 (Supelco). Trägergas N_2 20 cm/s. Injektionstemperatur: 200°C. Injektor, Split (Verhältnis 1/30 bzw. 1/40), Ofentemperatur: 100°C (isotherm). FID. Detektortemperatur: 200°C. Innerer Standard: Benzylalkohol. Probenmenge: 1 μl .

Kovats-Indices: III: 991; Benzylalkohol: 1035; I: 1091; II: 1169.

HPLC: Liquid Chromatograph 1010A mit UV-Detektor, variable Wellenlänge (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn) und Shimadzu Chromatopac-Integrator C-R1B (Shimadzu Corporation, Tokyo), Säule: Spherisorb 5 ODS II (Kontron) $125 \times 5 \text{ mm}$. Fließmittel: Methanol/Acetonitril/ H_2O (20:20:60)-Geschwindigkeit: 2.0 ml/Min (isokratisch). UV-Detektion bei 258 nm. Probenmenge: 20 μl (Probenschleife). Innerer Standard: Benzylalkohol. Retentionszeiten: Benzylalkohol: 2.4 min; I: 5.1 Min.

Hydrolyseversuche

Je 10 ml einer wäßrigen Lösung des Glucuronides, die zwischen 10 und 30 mg/l der untersuchten Verbindung enthielt, wurde unter folgenden Bedingungen hydrolysiert:

Methode A: die Lösung wurde mit 20% HCl 6 Min lang unter Rückfluß gekocht.

Methode B: die Hydrolyse erfolgte mit 12.5% HCl unter Rückfluß im siedenden Wasserbad. Hydrolysezeit 30 Min.

Methode C: es wurde wie bei Methode B hydrolysiert, jedoch mit 5% HCl.

Methode D: zusätzlich wurden Hydrolysen mit H₂O – also ohne HCl-Zusatz – und mit HCl-Konzentrationen von 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0, 17,5 und 20,0% durchgeführt. Die Lösungen wurden jeweils unter Rückflußkühlung im siedenden Wasserbad 30 Min lang erhitzt.

II und sein Glucuronid wurden außerdem mit 1,0, 2,0, 3,0 und 4,0% HCl hydrolysiert.

Extraktion der Aglykone

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Kondensat im Rückflußkühler mit ca. 25 ml dest. Wasser in die Vorlage gespült. Die Ansätze wurden im Kühlschrank auf +4°C gekühlt und anschließend der pH-Wert der Lösung auf 6,5 bis 7,5 eingestellt. Die Extraktion von I, II und III erfolgte mit Baker-Octadecyl-(C₁₈)-Extraktionssäulen. Für die GC-Analyse wurden I, II und III mit 1,0 ml einer Lösung von Benzylalkohol in CHCl₃ (101,1 mg/l) und anschließend dreimal mit je 0,2 ml CHCl₃ eluiert. Die vereinigten CHCl₃-Lösungen wurden mit wenig wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und der Überstand gaschromatographisch untersucht. Für die HPLC-Analyse erfolgte die Elution von I mit 1,0 ml einer Lösung von Benzylalcohol in Methanol (101,0 mg/l) und dann dreimal mit je 0,2 ml Methanol. Die erhaltene methanolische Lösung wurde direkt untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Für das angewandte Extraktionsverfahren betrug die Wiederfindungsrate von 2-Phenylpropan-1-ol (I) $100,4 \pm 2,1\%$ (GC) bzw. $97,1 \pm 3,0\%$ (HPLC) und von 2-Phenylpropan-2-ol (II) $96,0 \pm 5\%$ (GC). Von 2-Phenylpropan (III) wurden $95,0 \pm 11\%$ (GC) wiedergefunden.

Zur Ermittlung der Hydrolyserate wurden zuerst die Aglykone genauso behandelt und untersucht wie die Glucuronide.

Die Vorversuche ergaben, daß I eine hohe Säurebeständigkeit aufweist. Unter den Bedingungen von Methode D (HCl-Konzentration zwischen 2,5 und 20,0%) wurde im Mittel eine Wiederfindungsrate von $94 \pm 2,9\%$ erzielt. Für die in der forensischen Praxis üblichen Hydrolysemethoden wurden die in Tabelle 1 angegebenen Wiederfindungen ermittelt.

Abb. 1 zeigt die Ergebnisse der Spaltung des I-Glucuronides.

Schon beim Erwärmen in Wasser ohne Säurezusatz wurde die Verbindung zu 7% gespalten (Methode D). Mit steigender HCl-Konzentration nahm die Hydrolyserate zu und erreichte mit 10,0% HCl ihr Maximum.

Mit den Methoden A und B wurden ebenfalls Hydrolyseraten von etwa 100% erzielt, die Aglykonausbeute bei Methode A betrug $86,8 \pm 4,6\%$ und bei

Tabelle 1. Wiederfindungsraten an 2-Phenylpropan-1-ol (I) nach Behandlung von I mit HCl

Hydrolyse mit	Wiederfindung [%]
Methode A	$88,0 \pm 4,9$
Methode B	$94,3 \pm 4,8$
Methode C	$95,1 \pm 10,2$

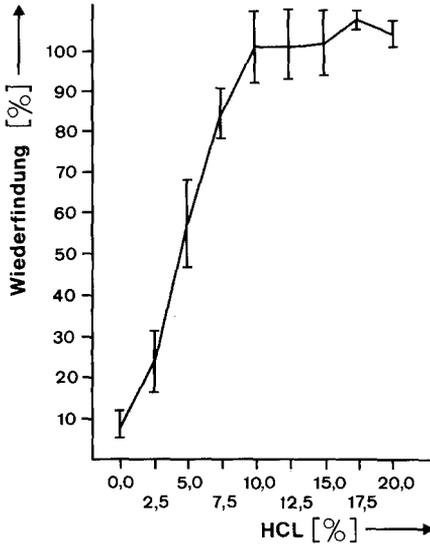


Abb. 1. Wiederfindungsraten an 2-Phenylpropan-1-ol (I) nach Hydrolyse seines Glucuronides mit HCl (Methode D)

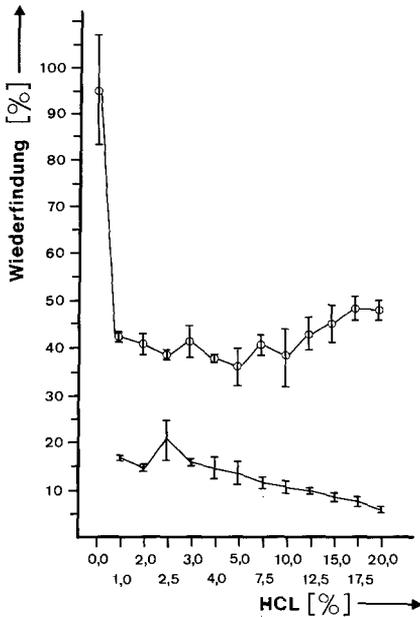


Abb. 2. Wiederfindungsraten an 2-Phenylpropan-2-ol (II) (○—○) und Ausbeute an 2-Phenylpropen (—) nach Behandlung von II mit HCl (Methode D)

Methode B $94,9 \pm 5,5\%$. Mit nur 5,0% HCl (Methode C) wurden – bei einer Hydrolyserate von $69,0 \pm 6\%$ – nur $65,7 \pm 6\%$ des Aglykons wiedergefunden.

Im Gegensatz zu I entstand aus II – wie schon beschrieben [9] – durch säurekatalysierte Dehydratisierung ein Artefakt, das 2-Phenylpropen (III); Dimerisierung, Polymerisation und andere Folgereaktionen ergaben dann weitere Produkte, die möglicherweise, z. T. bei der gaschromatographischen Analyse entstanden sind. Hauptprodukt war III. Die Verluste an II (Abb. 2) lagen schon

Tabelle 2. Wiederfindungsraten von 2-Phenylpropan-2-ol (II) und Artefakt (III) nach Behandlung von II mit HCl

Verbindung	Wiederfindung [%] mit Methode		
	A	B	C
II	42,7 ± 3,4	43,5 ± 3,2	34,4 ± 3,9
III*	5,6 ± 0,8	5,8 ± 0,7	14,3 ± 1,3

* Berechnet als II

mit 1,0% HCl bei fast 60%; sie verringerten sich bei höheren HCl-Konzentrationen (17,5 bis 20,0%) auf ca. 50%.

Die Ausbeute an III betrug bei Säurekonzentrationen von 1,0 bis 2,5% etwa 16 bis 20%; diese sank mit steigender HCl-Konzentration deutlich auf nur 6% (mit 20,0% HCl) ab.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Behandlung von II mit HCl unter den anderen Hydrolysebedingungen (Methode A, B und C) wiedergegeben. Das II-Glucuronid zeigte erwartungsgemäß ein anderes Verhalten als das I-Glucuronid; die Wiederfindungsraten an II waren mit durchschnittlich etwa 40% in dem gesamten Konzentrationsbereich (1,0 bis 20,0% HCl) sehr niedrig, obwohl schon mit 1,0% HCl eine Hydrolyserate des Glucuronides von 100% erreicht wurde.

Die Artefaktausbeute, die anfänglich bei ca. 20% lag (mit 1,0 bis 3,0% HCl) sank auf weniger als 8% mit 15,0 bis 20,0% HCl ab. Mit den anderen Hydrolyseverfahren wurden – wie nicht anders zu erwarten – ebenfalls niedrige Wiederfindungsraten an II ermittelt, zwischen etwa 43% mit Methode A und B und ca. 38% mit Methode C. Mit Methode A wurden etwa 8% und mit Methode C ca. 16% des Aglykons als III wiedergefunden.

Die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich Hydrolyserate und Aglykonusbeute führen zu der Überlegung, warum in menschlichen Harn nach Cumolexposition nur die Ausscheidung des säurelabilen II und nicht die des stabilen und leicht bestimmbaren I verfolgt wurde [10]. Es stellt sich die Frage, ob Cumol bei Menschen nicht – wie bei Kaninchen beschrieben [9] – in I umgewandelt wird. Bei unseren Mäuseversuchen mit Cumol wurde in dem Harn nur II-Glucuronid nachgewiesen.

Auffallend war die leichte Hydrolysierbarkeit der untersuchten Glucuronide, die mit 1,0% HCl (II-Glucuronid) bzw. 10,0% HCl (I-Glucuronid) quantitativ gespalten wurden. Entsprechend dem für die acidolytische Spaltung der glykosidischen Bindung angenommenen A-1-Mechanismus, für den je nach Struktur des Aglykons zwei Formulierungsmöglichkeiten unterschieden wurden [6, 8, 11] kann das Verhalten der hier untersuchten Glucuronide interpretiert werden (Abb.3). Demnach reagiert das zunächst protonierte II-Glucuronid nach dem Mechanismus für tertiäre Alkohole (Mechanismus 1) und wird schon durch milde Hydrolysebedingungen quantitativ gespalten.

Das I-Glucuronid kann nach Mechanismus 1 und 2 reagieren; dies wird offensichtlich durch Nachbargruppeneffekte unter Bildung eines mesomerie-

