

Vergleichende Stoffwechseluntersuchungen von Salicylsäure und Salicylsäurekonjugaten

KAARLO HARTIALA und HANS KRIEGER

Medizinisches Forschungslaboratorium der Lääke Oy, Turku, Finnland

The metabolism and resorption of salicylic acid and some of its conjugates given *per os* to rabbits were studied and compared. It was found that the resorption of the β -glucuronide or glucoside conjugates of salicylic acid was less than that of the free salicylic acid. Since the gastrointestinal tract itself is able to form glucuronide conjugates from a great variety of biologically active substances, this protective detoxification function obviously contributes to the loss of active material even before reaching the circulation after oral administration.

Die Konjugation mit Glucuronsäure spielt beim Metabolismus von Arzneimitteln eine bedeutende Rolle. Im Gegensatz zu den früheren Anschauungen, nach denen dieser synthetische Prozess im Organismus vorwiegend in der Leber und der Niere vor sich geht, konnte seit 1954^{1,2} wiederholt gezeigt werden, dass der gastrointestinale Trakt in besonderem Masse zur Glucuronidbildung befähigt ist.

Es schien von Interesse zu untersuchen, wie sich die Verabreichung von Konjugaten verglichen mit der der unkonjugierten Substanzen hinsichtlich Resorption, Abbau und Verträglichkeit äussert. Wir wählten zu diesem Zweck die Salicylsäure (I) und ihre Konjugate, da über den Abbau der Salicylsäure ein reichhaltiges Material vorliegt³.

Zur Verfütterung an Kaninchen gelangten folgende Substanzen: Salicylsäure (I), *o*-Carbomethoxyphenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucuronsäuremethylester (II), *o*-Carboxyphenyl- β -D-glucuronid (III), Salicyloyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucuronsäuremethylester (IV), Salicylursäure (VI), *o*-Carboxyphenyl- α -D-glucosid (VIII) und Gentisinsäure (IX).

Die Salicylsäure kann zwei Arten von Glucuroniden bilden, je nachdem ob die Verknüpfung mit dem Glucuronsäurerest über das Phenolhydroxyl (»Ätherglucuronid III») oder über das Säurecarboxyl (»Esterglucuronid V») erfolgt, wenn man nur die natürlich auftretenden β -Glucuronide berücksichtigt. Das Ätherglucuronid wurde von Lunsford und Murphey⁴ durch Kondensation von Acetobromglucuronsäureester und Salicylsäureester in Gegenwart von Silber-

hydroxybenzoesäure nachweisen sowie zeigen, dass die Gentisinsäure ebenfalls in konjugierter Form vorlag. Sie verwandten zum Teil papierchromatographische Trennmethode, die sie zur halbquantitativen Auswertung durch Vergleich der Fleckengröße heranzogen.

Es konnte kürzlich gezeigt werden¹², dass für den vorliegenden, hier untersuchten Fall das Lösungsmittelsystem Isopropanol — 7 N Ammoniak (4:1) sich als besonders geeignet erwies und eine quantitative Analyse durch Elution der Fleckenzonen mit Äthanol und UV-spektrophotometrische Messung des äthanolischen Eluates möglich macht. Es wurde eine Reihe vorbereitender analytischer Arbeiten durchgeführt. Die Standardkurven der zu untersuchenden und beim Metabolismus auftretenden Substanzen wurden in äthanolischer Lösung und in Kaninchenserum aufgenommen. Um zu prüfen, in welchem Masse Salicylsäure (I), Gentisinsäure (IX) und Salicylsäureglucuronid III durch Adsorption an Serumeiweiß der Messung entgehen, wurde ein vergleichender Extraktionsversuch vorgenommen (s. Beschreibung der Versuche), wobei bekannte Mengen der Stoffe aus wässriger Lösung und aus Serum mit Chloroform und mit Äther extrahiert wurden und spektrophotometrisch bestimmt wurden. Der Versuch ergab, dass Salicylsäure und Gentisinsäure nach der Enteiweißung wegen der Adsorption an Eiweiß nicht mehr vollständig erfasst wurden, weshalb die aufgenommenen Blutspiegel nur relative Gültigkeit haben. Der Gehalt des Glucuronids III, das nach der Lösungsmittlextraktion in der wässrigen Phase verblieb, wurde dagegen nicht beeinflusst.

Das Salicylsäureglucuronid III ist bei Körpertemperatur gegen künstlichen Magensaft beständig, lässt sich aber durch saure Hydrolyse in der Hitze glatt spalten. Die Hydrolyse beeinflusst nicht die Gültigkeit der Ablesung der festgesetzten Salicylsäure aus der Standardkurve.

Die Verfütterung an Kaninchen wurde so vorgenommen, dass stets der Salicylsäuregehalt der verabreichten Substanzdosis 0.5 g/kg Körpergewicht betrug. Aus dem Versuchsmaterial sind in den Abbildungen 1—6 Beispiele zusammengestellt. Wie ein Vergleich von Abb. 1—3 ergibt, ist die gleichzeitige Verabreichung von Glucuronlacton bzw. Glucose ohne Einfluss auf den Ver-

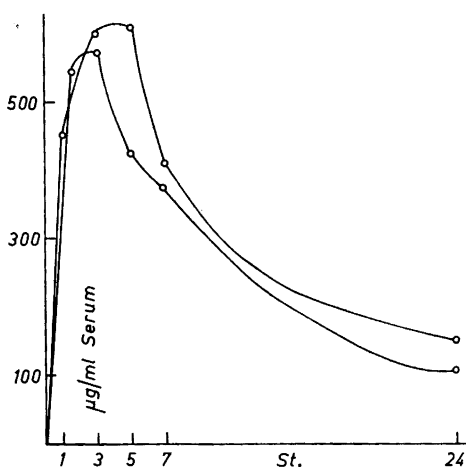


Abb. 1. Verfüterung von Salicylsäure.

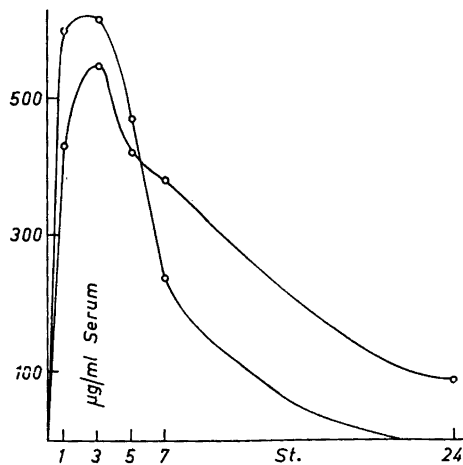


Abb. 2. Verfüterung von Salicylsäure und Glucuronlacton.

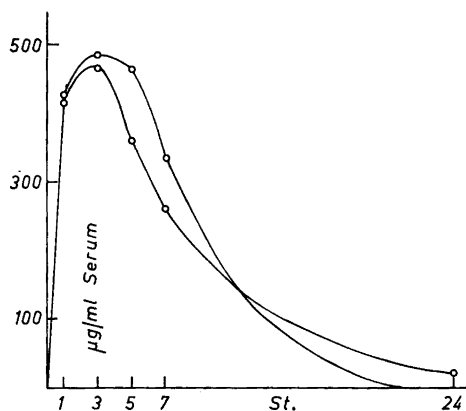


Abb. 3. Verfüterung von Salicylsäure und Glucose.

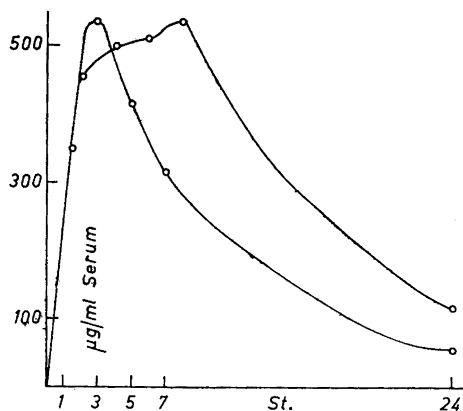


Abb. 4. Verfüterung von *o*-Carboxyphenyl- β -D-glucuronid (III).

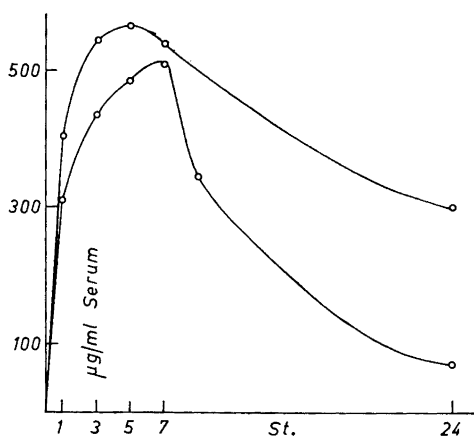


Abb. 5. Verfüterung von *o*-Carboxyphenyl- α -D-glucosid (VIII).

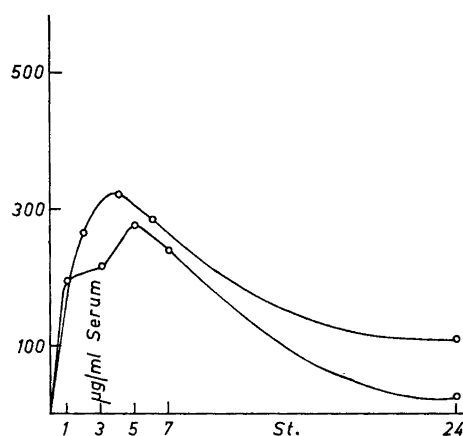


Abb. 6. Verfüterung von Salicylsäure.

lauf des Blutspiegels. Bei der Verabreichung von III und von VIII liegen die Maxima bei etwa dem gleichen Salicylsäuregehalt wie bei der Salicylsäure selbst. Eine gewisse längere Verweiltendenz im Blut ist erkennbar, jedoch nicht sehr ausgeprägt. Verabreicht man dagegen die Glucuronidester II bzw. IV, so wird nur noch ein ganz geringer, flach ansteigender Salicylsäurespiegel erhalten, dessen Maximum bei *ca.* 24 Stunden aber nicht mehr über 100 $\mu\text{g/ml}$ Serum hinaussteigt. Die schlechte Resorption dieser Substanzen zeigte sich besonders deutlich in der — verglichen mit der Verabreichung von Salicylsäure — geringen Mengen an im Urin ausgeschiedenen Abbauprodukten. Bei der Ver-

fütterung von Salicylursäure geht die Säure als solche ins Blut, so dass der Blutspiegel (Abb. 6) den Salicylursäuregehalt im Blut angibt. Eine chromatographische Untersuchung der nach der Verabreichung der Salicylursäure entnommenen Blutproben ergab, dass die Salicylursäure im Blut deutlich nachweisbar war, während sich das Auftreten der Salicylsäure nicht mit Sicherheit nachweisen liess. Die Gentsinsäure geht ebenfalls als solche ins Blut. Ihr Blutspiegel erreicht mit etwa 400 $\mu\text{g/ml}$ Serum nach 1 Stunde sein Maximum. Der Verlauf der Kurve entspricht dem der Salicylsäure. Nach Elimination der Gentsinsäure war keine Salicylsäure im Blut messbar.

Bei dem zuvor erwähnten Extraktionsversuch hatte sich ergeben, dass das Glucuronid III bei der Enteiweissung nicht gespalten wird. Bei zahlreichen Blutproben wurde nach der spektrophotometrischen Messung der Salicylsäure durch Zusatz der gemessenen Menge dieser Säure zum Kontrollserum und erneute Messung eine Elimination vorgenommen. In keinem Fall konnte das Auftreten des Salicylsäureglucuronids im Blut festgestellt werden. Es muss hier allerdings hervorgehoben werden, dass wegen des schwachen Maximums von III nur Mengen von über 100 $\mu\text{g III/ml}$ Serum mit Hilfe des angewandten Verfahrens erfassbar sind. Es sei in diesem Zusammenhang darauf verwiesen, dass es z.B. Staib und seinen Mitarbeitern¹³ trotz Aufarbeitung von ca. 5 l menschlichen Serums nicht gelang, grössere Mengen von 17-Ketosteroidglucuroniden im Blut nachzuweisen.

Um einen Einblick zu bekommen, inwieweit die Konjugation zu einer Änderung der Toxizität führt, wurde zunächst an weissen Mäusen die LD_{50} bei subcutaner Gabe von Salicylsäure und *o*-Carboxyphenyl- β -D-glucuronid (III) bestimmt. Wenn man bei letzterem die LD_{50} auf den Salicylsäuregehalt bezieht, so ergibt sich: LD_{50} s.c. für Salicylsäure: 2.5 g/kg, LD_{50} s.c. für *o*-Carboxyphenyl- β -D-glucuronid 3.6 g/kg, somit eine, wenn auch nicht sehr grosse, aber doch deutliche Abnahme der Toxizität beim Übergang von der Grundsubstanz zur konjugierten Substanz.

Die Aufarbeitung des angesäuerten Urins erfolgte durch Extraktion mit Äther bzw. in manchen Fällen zunächst mit Chloroform, in dem sich Salicylsäure leicht löst, während die Dihydroxybenzoesäuren erst durch Äther erfasst werden. Zur Spaltung der Konjugate wurde der Urin in der Siedehitze mit Salzsäure behandelt und erneut extrahiert. In jedem Fall wurde der Kontrollurin in der gleichen Weise aufgearbeitet. Die aus den verschiedenen Kontrollurinsansätzen erhaltenen Extrakte (g/100 ml Urin) bewegten sich vor der Säurebehandlung zwischen 0.3–0.6 g, nach der Säurebehandlung zwischen 0.05–0.2 g. Die nach dem Abdampfen der Lösungsmittel erhaltenen Rückstände wurden papierchromatographisch, vorwiegend qualitativ, in einigen Fällen auch quantitativ in der früher beschriebenen Weise¹² untersucht. Durch Vergleich mit dem aus dem Kontrollharn erhaltenen Phenolsäuremuster wurden die Stoffwechselprodukte festgelegt. Zur Sicherung der Befunde wurden mehrere Sprühreagenzien — stets diaz. *p*-Nitranilin und diaz. Sulfanilsäure — neben der Untersuchung im UV-Licht verwandt.

Vergleicht man die Chromatogramme der Stoffwechselprodukte, die bei der Verfütterung von A) Salicylsäure, B) Salicylsäure & Glucuronlacton und C) Salicylsäure & Glucose auftreten, so ergibt sich folgendes: In allen drei Fällen überwiegt der Gehalt an freier Salicylsäure bei weitem. Das Verhältnis von freier Salicylsäure zu konjugierter Salicylsäure beträgt bei A ca. 10:1, bei B ca. 31.5:1 und bei C ca. 2.7:1, d.h. die gleichzeitige Verabreichung von Glucose führt zu einer Zunahme an konjugierter Salicylsäure, die gleichzeitige

Verabreichung von Glucuronlacton dagegen zu einer deutlichen Abnahme an konjugierter Salicylsäure. In allen drei Fällen konnte Salicylursäure sowohl in freier Form als auch in konjugierter Form nachgewiesen werden. Die entsprechenden Verhältnisse (A 5:1, B 4.3:1, C 2.7:1) zeigen keine ausgeprägten Unterschiede. Der Betrag an Salicylursäure war 1/8 (A), 1/16 (B) bzw. 1/10 (C) der gefundenen Salicylsäuremenge. Die Gentisinsäure lag ebenfalls in freier und gebundener Form vor, allerdings in nur geringer Masse, wenn Salicylsäure für sich verabreicht wurde, etwas stärker, wenn gleichzeitig Glucuronlacton bzw. Glucose gegeben wurden, jedoch betragen die Mengen nur ein Drittel der Salicylursäuremengen. Im Fall der Verabreichung von Salicylsäure und Glucose liess sich zudem in geringer Menge 2,3-Dihydroxybenzoesäure nachweisen.

Bei der Verfütterung des Salicylsäureglucuronids III war die freie Salicylsäure ebenfalls der Hauptbestandteil der ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte. Das Verhältnis von freier zu konjugierter Salicylsäure betrug hier 7:1. Salicylursäure kam ebenfalls in freier und gebundener Form vor (ca. 1/30 der Salicylsäuremenge). Gentisinsäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure liessen sich dagegen nicht UV-spektrophotometrisch erfassen. In den Chromatogrammen der Stoffwechselprodukte der Glucuronidester II und IV konnte in nur sehr geringem Masse Salicylsäure festgestellt werden.

Nach Verfütterung von Salicylursäure war der dominierende Bestandteil im Chromatogramm die Salicylursäure selbst in freier und in konjugierter Form, jedoch ausgeprägter in freier Form. Daneben fanden sich etwa gleichgrosse Mengen an freier und konjugierter Salicylsäure, während Gentisinsäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure nicht nachweisbar waren. Im Extrakt der konjugierten Substanz fand sich zudem ein nichtidentifizierter Fleck bei R_f 0.79 (Färbung: mit diaz. *p*-Nitranilin zinnoberrot, mit diaz. Sulfanilsäure zitronengelb).

Auf Grund obiger Befunde lässt sich sagen, dass in dem untersuchten Fall die perorale Verabreichung von Konjugaten (Glucuronid und Glucosid) gegenüber der Grundsubstanz keine wesentlichen Vorteile mit sich bringt, die für eine intensivere Bearbeitung dieses Gebietes sprechen. Die recht zeitraubende und zugleich kostspielige Synthese derartiger Konjugate ist zudem ein wesentlicher Faktor, der bei billigen Grundsubstanzen ausschlaggebend ist.

Zu prüfen bleibt indessen die Frage, in welcher Weise die gleichzeitige Verabreichung von Enzyminhibitoren auf den Stoffwechsel der Konjugate einwirkt, und ob ihnen dann möglicherweise Depoteigenschaften zukommen können. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse das Verhalten bei der Einwirkung von Saccharolacton und von Eugenol. Das erstere ist bekanntlich ein β -Glucuronidaseinhibitor, während das letztere sich als ein besonders wirksamer Glucuronyl-transferase-Inhibitor erwiesen hat¹⁴.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

I. Synthesen der untersuchten Substanzen

1-Brom-2,3,4-triacetyl-D-glucuronsäuremethylester. Die Darstellung des Esters erfolgte nach Bollenback und Mitarbeitern¹⁵. Hierzu wurde Glucuronlacton in Gegenwart katalytischer Mengen Natriummethylat mit Methanol in den Glucuronsäuremethylester überführt und dieser in Pyridinlösung mit Acetanhydrid acetyliert. Der aus

der Reaktionsmischung ausgeschiedene Tetraacetyl- β -D-glucuronsäuremethylester schmolz bei 177–178° (aus Äthanol), $[\alpha]_D^{22} + 16.6^\circ$ (CHCl_3) [Lit.¹⁶: Schmp. 175–176°, $[\alpha]_D^{30} + 10.0^\circ$ (CHCl_3)]. Das beim Aufarbeiten der Mutterlauge erhaltene α -Isomere schmolz bei 119–121° (aus Methanol), $[\alpha]_D^{22} + 114^\circ$ (CHCl_3) [Lit.¹⁶: Schmp. 120–122°, $[\alpha]_D^{23} + 122.8^\circ$ [CHCl_3]]. Die Bromierung der Tetraacetylmethylester wurde mit einer 25-proz. Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig vorgenommen und das Produkt in der von Pelzer¹⁷ benutzten Modifikation durch Extraktion mit Chloroform aufgearbeitet und isoliert. Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol von 40° Schmp. 105.5–106.5°, $[\alpha]_D^{22} + 206.6^\circ$ (CHCl_3) [Lit.¹⁸: Schmp. 104–105°, $[\alpha]_D^{24} + 198^\circ$ (CHCl_3)].

o-Carbomethoxyphenyl-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucuronsäuremethylester. (II). Die Synthese des Esters erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Lundsford und Murphey⁴. 24 g Acetobromglucuronsäureester wurden mit 18.2 g Salicylsäuremethylester und 30 ml frisch destilliertem Isochinolin in einem eisgekühlten Mörser verrieben und 15.2 g frisch zubereitetes Silberoxyd in 15 Min. unter starken Rühren zugegeben, wobei zum Schluss die Mischung zähflüssig wurde. Sie wurde anschliessend im Exsiccator über Schwefelsäure bis zum folgenden Morgen aufbewahrt. Das Reaktionsprodukt wurde fünfmal mit Äther unter Mischen mit einem Vibromischer gründlich ausgezogen, die äther. Lösung über Calciumsulfat getrocknet und der Äther abdestilliert. Der Rückstand wurde 4–5mal mit Petroläther geschüttelt, wobei er allmählich kristallin wurde, und dann aus Äthanol von 60° umkristallisiert. Schmp. 113.0–114.5°, $[\alpha]_D^{22} - 55.3^\circ$ (CHCl_3) [Lit.⁴: Schmp. 111.5–113°, $[\alpha]_D^{23} - 41.8^\circ$ (CHCl_3)].

o-Carboxyphenyl- β -D-glucuronsäure (III). 34.6 g des Glucuronsäureesters II wurden mit 1200 ml 0.37 N Bariumhydroxydlösung über Nacht gerührt. Anschliessend liess man 365 ml 1.22 N Oxalsäure zutropfen. Nach 1stdg. Stehen im Eisschrank wurde das ausgefallene Bariumoxalat abfiltriert und das Filtrat i.Vak. auf dem Wasserbad (30–40°) eingedampft. Der anfallende pulverige Rückstand wurde im Exsiccator über Kaliumhydroxyd aufbewahrt. Ausb. 18.8 g (81 % d. Theor.). Schmp. 149–151°, $[\alpha]_D^{22} - 80.5^\circ$ (H_2O) [Lit.⁴: Schmp. 145–146°, $[\alpha]_D^{23} - 75.9^\circ$ (H_2O)].

Salicyloyl-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucuronsäuremethylester (IV). Die Darstellung des Esters erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Lundsford und Murphey⁴. 24.0 g Acetobromglucuronsäureester wurden mit 15.6 g Silbersalicylat und 18 ml Isochinolin unter Kühlen 20 Min. im Mörser gemischt, dann über Nacht im Exsiccator aufbewahrt und anschliessend vielfach unter Mischen mit einem Vibromischer mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und der Äther abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 168–169°, $[\alpha]_D^{22} - 32.6^\circ$ (CHCl_3) [Lit.⁴: Schmp. 168.5–169°, $[\alpha]_D^{25} - 31.9^\circ$ (CHCl_3)].

Es war nicht möglich, die Verbindung ohne Aufspaltung der Glucuronidbindung weder mit Bariumhydroxyd in der zuvor beschriebenen Weise noch mit 1 N HCl oder in methanolischer Lösung mit einer katalytischen Menge von Natriummethylat zu hydrolysieren.

o-Carbomethoxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucose (VII). 45.6 g Salicylsäuremethylester und 38 g Quecksilbercyanid wurden unter Mischen mit einem Vibromischer auf dem Wasserbad auf 50° erhitzt und 84.5 g Acetobrom-D-glucose zugesetzt. Die Mischung wurde zwei Stunden auf dem Wasserbad auf 75–80° erhitzt und nach dem Erkalten mehrfach mit Ligroin gewaschen. Die Ligroinauszüge wurden verworfen. Der Rückstand wurde mit 150 ml warmem Benzol behandelt und die Festsubstanz abgesaugt. Die Benzollösung wurde dreimal mit 1 N Natronlauge gewaschen, anschliessend mit Wasser und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Benzols hinterblieb eine grösstenteils kristalline Masse, die mit kaltem Äthanol verrieben und aus Äthanol umkristallisiert wurde. Ausb. 25.1 g (17.5 % d. Theor.). Farblose Blättchen vom Schmp. 132.5–133.0°, $[\alpha]_D^{20} + 138.3^\circ$ (CHCl_3). (Gef. C 54.77; H 5.46. Ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$: C 54.77; H 5.43.)

o-Carboxyphenyl- α -D-glucosid (VIII). 21.5 g des Glucosidesters VII wurden 24 Stdn. mit 1150 ml 0.38 N Bariumhydroxydlösung bei Zimmertemperatur gerührt, wonach 1.03 g ungelöst blieben. Anschliessend liess man 280 ml 1.59 N Oxalsäure zu der klaren

Lösung zutropfen und filtrierte nach zweistündigem Stehen im Eisschrank das gebildete Bariumoxalat ab. Der nach dem Abdampfen des Wassers i. Vak. hinterbleibende Rückstand wurde aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 164.0–166.5°, $[\alpha]_D^{20} + 109.3^\circ$ (H₂O).

Katalytische Oxydation des Glucosids VIII. In Anlehnung an die von Marsh und Levy¹⁰ gegebene Vorschrift für die katalytische Oxydation des Phenyl- α -D-glucosids wurden 4.4 g *o*-Carboxyphenyl- α -D-glucosid in 100 ml Wasser unter gelindem Erwärmen gelöst und mit 2 g mit Wasserstoff aktiviertem Platinoxid versetzt. Nach Zusatz von 0.5 N Natriumhydrogencarbonatlösung bis zum pH 9 wurde die Lösung auf 90° erwärmt und ein kräftiger Sauerstoffstrom durch eine Glasfritte eingeleitet. Durch Zutropfen von Natriumbicarbonatlösung aus einer Bürette wurde dafür Sorge getragen, dass der pH-Wert etwa 9.2 betrug. Das Ende der Reaktion zeigte sich dadurch an, dass auch bei weiterem Einleiten von Sauerstoff der pH sich nicht mehr änderte. Der Gesamtverbrauch an 0.5 N Natriumhydrogencarbonatlösung betrug 35 ml. Der Katalysator wurde abfiltriert, die wässrige Lösung i. Vak bei einer Badtemperatur von 35–40° eingedampft und in wenig Wasser gelöst durch eine Säule von Amberlite IR 120 und Permutit "ES" (1:1) geschickt. Schmp. 135.5–137.0°, $[\alpha]_D^{22} + 93.5^\circ$ (H₂O), Glucuronsäuregehalt: Ber. 56.1 %, Gef. 56.7 %.

Salicylursäure wurde durch Umsetzung von Salicylsäuremethylester mit Hydrazinhydrat, Überführung des gebildeten Hydrazids in das Azid und dessen Reaktion mit Glycin dargestellt⁶. Schmp. 166.5–168.5° (aus Wasser), Lit.⁶: Schmp. 170–172°.

II. Stoffwechseluntersuchungen

Verfütterung an Kaninchen. Die Substanzen wurden als Lösung in 5-proz. gum. tragacanth-Lösung (20 ml) mit der Schlundsonde an Kaninchen verabreicht, wobei stets Mengen zur Anwendung kamen, die 0.5 g Salicylsäure pro kg Körpergewicht entsprachen. Die Tiere wurden zwei Tage in Stoffwechselkäfigen gehalten und der Urin in dieser Zeit aufgefangen. Der anfallende Urin wurde bis zur Aufarbeitung nach Versuchsende im Eisschrank aufbewahrt. Vor jedem Versuchs wurden zur Kontrolle bestimmte Urin- und Blutproben genommen. Nach Verabreichung wurden in zweistündigen Intervallen innerhalb der ersten acht Stunden sowie 24 Stdn. nach der Verabreichung Blutproben genommen. Die Urinproben wurden auf Aussehen, Menge und pH geprüft.

Vorbereitende analytische Proben. Für die Auswertung der weiter unten beschriebenen Analysen wurden eine Reihe von Standardkurven aufgenommen. Hierzu wurden bekannte Mengen in Äthanol gelöst und die Extinktion UV-spektrisch gemessen. Die gefundenen Werte wurden in ein Koordinatensystem in Abhängigkeit von der Menge in $\mu\text{g/ml}$ eingetragen. Für Lösungen in 96 proz. Äthanol wurden so lineare Funktionen erhalten (Substanz, Maxima, Messbereich: Salicylsäure, 303 $m\mu$, 0–60 μg ; *m*-Hydroxybenzoesäure, 298 $m\mu$, 0–80 μg ; *p*-Hydroxybenzoesäure, 253 $m\mu$, 0–15 μg ; 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 247 $m\mu$, 0–40 μg , 317 $m\mu$, 0–90 μg ; 2,4-Dihydroxybenzoesäure, 295 $m\mu$, 0–50 μg ; Gentisinsäure, 332 $m\mu$, 0–70 μg ; 2,6-Dihydroxybenzoesäure, 302 $m\mu$, 0–90 μg ; 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 295 $m\mu$, 0–50 μg ; 3,5-Dihydroxybenzoesäure, 308 $m\mu$, 0–100 μg ; Salicylursäure, 300 $m\mu$, 0–80 μg ; *o*-Carboxyphenyl- β -D-glucuronsäure, 285 $m\mu$, nur 0–100 μg linear, darüber hinaus 100–200 μg leicht konvex gewölbt). Im Zusammenhang mit papierchromatographischen Untersuchungen wurden Standardkurven verwandt, deren Äthanol zunächst zur Extraktion eines im System Isopropanol – 7 N Ammoniak (4:1) chromatographierten leeren Bogens benutzt wurde. In diesen Fällen weichen die Maxima etwas von obigen Werten ab, z.B. Salicylsäure 302 $m\mu$, 2,3-Dihydroxybenzoesäure 247 und 308 $m\mu$, Gentisinsäure 326 $m\mu$. Die Geraden haben zudem eine etwas geringere Neigung. Für die Blutbestimmungen wurden Standardkurven aufgenommen, bei denen bekannte Substanzmengen zu Kaninchenserum zugesetzt wurden, die dann in der üblichen Weise mit 4-proz. Trichloressigsäurelösung enteiwesst wurden. Die so erhaltenen Messkurven waren ganz schwach konvex gebeugt. Salicylsäure, 302 $m\mu$, 0–800 $\mu\text{g/ml}$ Serum; Gentisinsäure, 330 $m\mu$, 0–800 $\mu\text{g/ml}$ Serum; Salicylursäure, 298 $m\mu$, 0–1000 $\mu\text{g/ml}$ Serum.

Um festzustellen, in wie starkem Masse die Bindung der Mono- und Dihydroxybenzoesäuren an Eiweiss die Messergebnisse beeinflusst, wurde ein Extraktionsversuch durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 1 ml einer eingestellten Messlösung (25 mg

Tabelle 1.

Lsg.		m μ	<i>E</i>	$\mu\text{g/ml}$	
				gef.	ber.
A	1	303	1.020	34	40
	2	303	1.070	37	40
B	1	332	0.965	35	40
	2	332	0.995	36	40
C	1	280	0.428	83	100
	2	280	0.435	85	100

Salicylsäure/25 ml H₂O, 25 mg Gentisinsäure/25 ml H₂O, 25 mg *o*-Carboxyphenyl- β -D-glucuronsäure/10 ml H₂O) vereinigt und auf 25 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde dreimal mit je 10 ml Chloroform (A), dann dreimal mit je 10 ml Äther (B) jeweils 10 Min. auf der Schüttelmaschine ausgeschüttelt. Die Chloroform- und die Ätherlösung wurden eingedampft und in einem Messkolben auf 25 ml aufgefüllt. Die nach der Extraktion vorliegende Lösung (C) wurde als solche spektrophotometrisch gemessen (s. Tabelle 1).

Die Standardkurve von I wurde durch Auflösen bekannter Mengen in Wasser aufgenommen. Zu 5 ml Serum wurden je 1 ml der obigen Lösungen zugegeben und mit 40 ml 4-proz. Trichloressigsäure enteiweißt. Die weitere Behandlung erfolgte wie zuvor, nur mit der Abweichung, dass die Lösung C auf 50 ml aufgefüllt wurde (s. Tabelle 2). Die Abnahme der gefundenen Werte im Fall der unkonjugierten Säuren ist deutlich. Der Vergleich zeigt, dass Trichloressigsäure unter den angewandten Versuchsbedingungen keine Hydrolyse der Glucuronidbindung zur Folge hat. Zur Enteiweißung ist der Trichloressigsäure gegenüber Äthanol der Vorzug zu geben.

Die Beständigkeit der *o*-Carboxyphenyl- β -D-glucuronsäure III wurde auf folgenden Wegen geprüft: 1) 10.2 mg II wurden in 50 ml 0.1 N HCl gelöst und unmittelbar danach, sowie nach 20 Min, 40 Min., 1 Stde. und 3 Stdn. das Maximum bei 285 m μ gegen 0.1 N HCl gemessen. Die Extinktion blieb innerhalb der Fehlergrenzen unverändert. 2) 100 mg II wurden in 25 ml eines künstlichen Magensaftes (2.0 g NaCl, 3.2 g Pepsin, 7.5 ml konz. HCl, H₂O ad 1000 ml) gelöst und im Thermostaten auf 37° erhitzt. Auf Grund der Konstanz der Extinktion war auch hier gewährleistet, dass die Glucuronidbindung nicht aufgespalten wurde (Einwirkung bis zu 3 Stdn.). Durch Erhitzen dieser Lösung auf 100° (30 Min.) erfolgte die Hydrolyse dagegen. — III lässt sich aus wässrigen Lösungen durch wiederholtes Extrahieren mit Butanol isolieren.

III lässt sich in wässriger Lösung durch Istdg. Erhitzen mit 1/3 seines Volumens an konz. Salzsäure auf dem siedenden Wasserbad glatt spalten. Es wurde zunächst eine Standardkurve mit bekannten Mengen Salzsäure (10–50 $\mu\text{g/ml}$), die in gleicher Weise behandelt wurde, aufgestellt. Der Gehalt dieser Lösungen erwies sich gegenüber nichter-

Tabelle 2.

Lsg.		m	<i>E</i>	$\mu\text{g/ml}$	
				gef.	ber.
A	1	303	0.680	23	40
	2	303	0.665	23	40
B	1	332	0.795	29	40
	2	332	0.718	26	40
C	1	280	0.366	56	50
	2	280	0.276	52	50

hitzten als praktisch gleich. Anschliessend wurden entsprechende Lösungen des Glucuronids III (auf 10–50 μg Salicylsäure/ml umgerechnet) in gleicher Weise behandelt. Die gefundenen Werte (Salicylsäuregehalt aus Standardkurve/Salicylsäuregehalt aus Glucuronidlösung: 10 μg /11.5 μg , 20 μg /21.5 μg , 30 μg /32 μg , 40 μg /40 μg , 50 μg /52.5 μg) ergaben eine einigermassen annähernde Übereinstimmung.

Blutspiegelbestimmungen. 1/2 ml Versuchsserum wurden mit 4.5 ml 4-proz. Trichloressigsäure enteivest und UV-spektrophotometrisch gemessen. Der Salicylsäuregehalt (bzw. Gehalt anderer zu bestimmender Substanzen) wurde aus einer Standardkurve abgelesen. Zur Nachprüfung auf das Vorhandensein weiterer Maxima wurde die gefundene Menge dem Kontrollserum zugesetzt und erneut gegen dieses gemessen. Bei chromatographischer Prüfung einiger Serenproben kam das System Isopropanol – 7 N Ammoniak (4:1) zur Anwendung.

Urinanalysen. Der Urin wurde mit 2 N HCl auf pH 2–3 eingestellt, dreimal mit Äther extrahiert (in einigen Fällen erfolgte zunächst dreifache Extraktion mit Chloroform, dann erst mit Äther), anschliessend mit 1/3 seines Volumens an konz. HCl versetzt und 1 Stde. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde dreimal mit Äther extrahiert (in manchen Fällen zunächst mit Chloroform, dann mit Äther) und nach dem Abdestillieren des Äthers (bzw. Chloroforms) der Rückstand im Exsickator über Phosphor-pentoxyd getrocknet.

Die Chromatographie der Rückstände erfolgte auf Whatman-1-Papier im System Isopropanol – 7 N Ammoniak nach der absteigenden Methode. Die Entwicklung wurde mit diazotiertem *p*-Nitranilin und ausserdem mit diazotierter Sulfanilsäure vorgenommen. In einigen Fällen kam ausserdem Eisen (III)-chlorid zur Anwendung. Bei jedem Verfütterungsversuch wurde der Kontrollharn in der obigen Weise aufgearbeitet und die so erhaltenen Rückstände gleichzeitig zur Kontrolle mitchromatographiert. Es wurde ausserdem der Versuchsharn und der Kontrollharn als solcher mitlaufen gelassen. Die Flecken wurden auch im UV-Licht festgelegt (UV-Lampe "Mineralight SL").

Zur quantitativen Auswertung wurden 6 Flecken aufgetragen (genau gemessene Mengen zwischen 1000 und 9000 μg) und wie zuvor chromatographiert. Nach der Festlegung im UV wurden die Zonen als Streifen ausgeschnitten und mit Äthanol im Chromatographietank in 5 ml Messflaschen eluiert. Das als Kontrolle benutzte Äthanol wurde in gleicher Weise durch Elution eines im System Isopropanol – 7 N Ammoniak (4:1) chromatographierten leeren Bogens erhalten. Auch in diesen Fällen wurde durch Elimination der gefundenen Mengen geprüft, ob noch andere absorbierende Substanzen gleichzeitig vorhanden waren. Die Brauchbarkeit dieser chromatographischen Methode wurde durch Blindproben mit Reinsubstanzen geprüft (vgl. Ref.¹²).

Von säulenchromatographischen Trennungsmethoden wurde kein Gebrauch gemacht, jedoch lassen sich, wie gefunden wurde, Salicylsäure und Gentsinsäure an Silicagel als Adsorbens mit 5 % Butanol in Benzol trennen.

Die Glucuronsäurebestimmung erfolgte in der üblichen Weise mit Naphthoresorcinlösung und photometrischer Messung bei 578 $m\mu$.

III. Toxizität

Die Bestimmung der akuten Toxizität erfolgte an Albino-Swiss-Mäusen (Stamm Webster). Die Substanzen wurden s.c. in wässriger Polyglykol A 300-Lösung (60:40) an Gruppen von jeweils 10 Mäusen (Durchschnittsgewicht 18–25 g, innerhalb der Gruppe \pm 0.5 g) verabreicht. Für die Auswertung der LD₅₀-Werte wurde die Sterblichkeit innerhalb von 24 Stdn. berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte mittels Wahrscheinlichkeitspapier.

Frau Raija Oinonen danken wir für ihre fleissige und gewissenhafte Mitarbeit.

LITERATUR

1. Hartiala, K. J. *Acta Physiol. Scand.* **31** (1954) *Suppl.* 114, 20.
2. Hartiala, K. J. *Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae* **33** (1955) 239.
3. Smith, P. K. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **86** (1960) 38.

4. Lunsford, C. D. und Murphey, R. S. *J. Org. Chem.* **21** (1956) 580.
5. Tsukamoto, H., Kato, K. und Tatsumi K. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **5** (1957) 570.
6. Hanzlik, P. H. *J. Pharm. Exptl. Therap.* **10** (1917) 461; vgl. Bondi, S. *Z. physiol. Chem.* **52** (1907) 172.
7. Helferich, B. und Weis, K. *Chem. Ber.* **89** (1956) 314; Helferich, B. und Berger, A. *Chem. Ber.* **90** (1957) 2492.
8. Jermyn, M. A. *Australian J. Chem.* **8** (1955) 403; *Chem. Abstr.* **50** (1956) 189.
9. Karrer, P. *Ber.* **50** (1917) 833; Mauthner, F. *J. prakt. Chem.* **97** (1918) 220; Karrer, P., Nägeli, C. und Weidmann, H. *Helv. Chim. Acta* **2** (1919) 425; Karrer, P. und Weidmann, H. *Helv. Chim. Acta* **3** (1920) 252; Robertson, A. und Waters, R. B. *J. Chem. Soc.* **1931** 1881; Helferich, B. und Lutzmann, H. *Ann.* **537** (1939) 11; Wagner, G. und Kühnstedt, H. *Arch. Pharm.* **289** (1956) 247, 488.
10. Marsh, C. A. und Levy, G. A. *Biochem. J.* **68** (1958) 617.
11. Bray, H. G., Ryman, B. E. und Thorpe, W. V. *Biochem. J.* **43** (1948) 561; Bray, H. G., Thorpe, W. V. und White, K. *Biochem. J.* **66** (1950) 271.
12. Krieger, H. *Suomen Kemistilehti B* **34** (1961) 50.
13. Staib, W., Teller, W. und Pelzer, H. *Biochim. Biophys. Acta* **31** (1959) 591.
14. Hartiala, K., Pulkkinen, M. und Ball, P. *Unveröffentlichte Beobachtungen*.
15. Bollenback, G. N., Long, J. W., Benjamin, D. G. und Lindquist, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955) 3310.
16. Tsukamoto, H., Hamama, M., Kato, T. und Kuroda, T. *J. Pharm. Soc. Japan* **76** (1956) 1282.
17. Pelzer, H. *Z. physiol. Chem.* **314** (1959) 234.
18. Goebel, W. F. und Babers, F. H. *J. Biol. Chem.* **111** (1935) 347.

Eingegangen am 11. April 1962.