

**Versuche zur Darstellung
hochmolekularer Pharmazeutika, 2. Mitt.:**

Stoffwechseluntersuchungen
von Acetylsalicylsäurestärkeestern

Von

K. Kratzl* und **E. Kaufmann**

Organisch-chemisches Institut der Universität Wien

und

O. Kraupp und **H. Stormann**

Pharmakologisches Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 27. Februar 1961)

Acetylsalicylsäure und dessen Stärkeester wurden intramuskulär Hunden und Kaninchen injiziert. Durch kolorimetrische und radiochemische Messung des Salicylsäurespiegels im Plasma konnte gezeigt werden, daß der Stärkeester nur sehr schwer im physiologischen Milieu aufspaltbare Bindungen besitzt.

Es sollte untersucht werden, ob der Stärkeester der Acetylsalicylsäure¹ eine Depotform der Acetylsalicylsäure darstellt. Dazu mußte die Menge freier Acetylsalicylsäure oder deren Umwandlungsprodukte, die nach Applikation des Stärkeesters während einer bestimmten Zeitspanne im Körper vorhanden sind, bestimmt werden.

Der Acetylsalicylsäureester der Stärke wurde intramuskulär (Oberschenkel) Hunden appliziert. Eine Gabe per os hätte auf jeden Fall nur kurze Verweilzeiten gebracht, da entweder die Glucosidkette schnell gespalten oder der Ester unverändert ausgeschieden worden wäre. Über den Stoffwechsel der Acetylsalicylsäure selbst sind zahlreiche Arbeiten er-

* Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. *A. v. Wacek* zum 65. Geburtstag in aufrichtiger Dankbarkeit gewidmet.

¹ Siehe voranstehende Mitteilung.

schienen². Bei subkutaner Injektion ist sie nach 5 Min. im Blut nachweisbar; die Ausscheidung ist nach 24 Stunden beendet³. Im Blut findet keine Konjugation statt⁴. Gepaarte Produkte werden natürlich im Harn gefunden. Folgende Salicylsäurestoffwechselprodukte wurden gefunden: Salicylsäure, Salicylursäure, Gentisinsäure, Salicylglucuronid, Gentisinglucuronid, etwas Schwefelsäureester der Salicylsäure und Salicylglucuronid^{5, 6}.

Bei der intramuskulären Injektion des Stärkeesters war die Wahl des Lösungsmittels wegen der geringen Wasserlöslichkeit des polymeren Esters schwierig. Es wurde schließlich Solketal (Glycerinacetonid) angewendet, in dem die Substanz bis zu 20% löslich ist. Die erforderlichen größeren Mengen Lösungsmittel sind pharmakologisch nicht inert. Nach der Injektion wurde die abgespaltene Salicylsäure im Blutplasma bestimmt. Damit war ein Maß für die Labilität und Wirksamkeit des Stärkeesters gegeben. Die quantitative Bestimmung der abgespaltenen Acetyl-salicylsäure wurde nach zwei Methoden durchgeführt.

1. Kolorimetrische Bestimmung:

Die kolorimetrische Acetylsalicylsäurebestimmung beruht auf einer Phenolreaktion der freien Salicylsäure⁷. Wir benützten eine Methode von *O. Folin* und Mitarbeitern⁸, die von *M. J. H. Smith* und *J. M. Talbot*³ zur Bestimmung von 7–10 mg% Salicylsäure im Plasma angewendet wurde. Man muß nach *R. Fabre*⁹ mindestens 0,06 g Acetylsalicylsäure pro Kilogramm einsetzen. Die Methoden sind nicht frei von Fehlern, Blindwerten usw. Obwohl Verbesserungen vorgeschlagen wurden, erwiesen sich diese in unserem Fall nicht anwendbar. Daher wurden die Bestimmungen im wesentlichen nach *M. J. H. Smith* und *J. M. Talbot*³ durchgeführt, wobei die Verseifung nach *R. Fabre*¹⁰ mit 2n HCl erfolgte.

Es wurden Parallelbestimmungen an zwei Hunden vorgenommen. Der eine erhielt reine Acetylsalicylsäure, der zweite Acetylsalicylsäurestärkeester. Dadurch wurden Vergleichswerte erhalten. Die Mindest-

² Nähere Angaben: Siehe Dissertation *E. Kaufmann*, Universität Wien 1957.

³ *M. J. H. Smith* und *J. M. Talbot*, Brit. J. Exptl. Path. **31**, 65 (1950).

⁴ *M. J. H. Smith*, J. Pharm. Pharmacol. **3**, 409 (1951).

⁵ *G. L. Haberland*, *H. Medenwald* und *L. Köster*, Z. Physiol. Chem. **306**, 235 (1957).

⁶ *E. L. Alpen*, *H. G. Mandel*, *V. W. Rodwell* und *P. K. Smith*, J. Pharmacol. Exptl. Therap. **102**, 150 (1951).

⁷ *B. B. Brodie*, *S. Udenfried* und *A. F. Coburn*, J. Pharmacol. **80**, 114 (1944).

⁸ *O. Folin* und *V. Ciocalteu*, J. Biol. Chem. **73**, 627 (1927).

⁹ *R. Fabre*, *M. Th. Regnier* und *M. E. Grasset*, Acta Pharm. Intern. **1**, 13 (1950).

¹⁰ *R. Fabre*, *M. Th. Regnier* und *M. E. Grasset*, Ann. pharm. franç. **7**, 413 (1949).

menge an freier Acetylsalicylsäure für eine einwandfreie Bestimmung beträgt 0,06 g/kg, also für einen 10 kg schweren Hund 0,6 g. Zur Bestimmung des Stärkeesters mußte man daher 3—10 g Substanz applizieren. Um 6 g Stärkeester zu lösen, wären 30 ml Solketal nötig. Das ist etwa die Hälfte der tödlichen Dosis. Daher konnten nur geringere Mengen Stärkeester injiziert werden. Die Genauigkeit wurde zwar vermindert, doch wurden durch die Parallelbestimmung mit der freien Acetylsalicylsäure brauchbare Vergleichswerte erhalten.

Ein 10 kg schwerer Hund (Rüde) (I) erhielt 2 g Acetylsalicylsäure-stärkeester in 10 ml Solketal. Ein 12 kg schwerer Hund (Rüde) (II) erhielt 1 g Acetylsalicylsäure in 5 ml Solketal, also 0,084 g/kg Acetylsalicylsäure bzw. 0,20 g/kg Stärkeester.

Während der ersten acht Stunden nach der Injektion wurde jede Stunde eine Blutprobe abgenommen, eine weitere nach 24 Stunden und die letzte nach 48 Stunden. Im Plasma wurde die Konzentration der Salicylsäure kolorimetrisch (Messung der Absorption im Lange-Kolorimeter bei 670 μ) bestimmt. Die Eichkurven und Blindwerte wurden vorher festgelegt.

Die Ausscheidung zeigte folgenden Verlauf (Abb. 1).

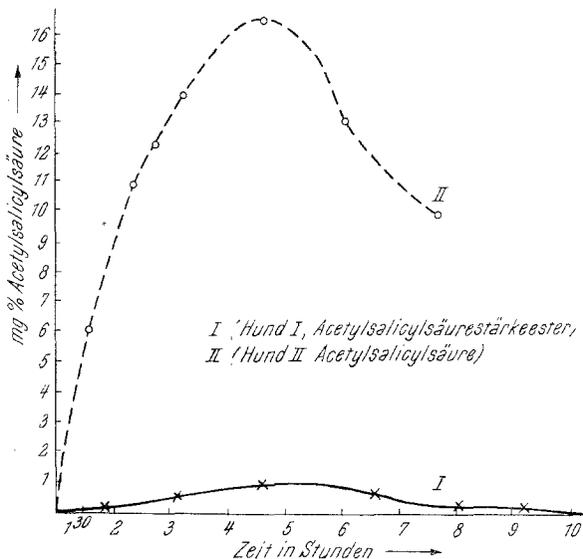


Abb. 1. Bestimmung von Acetylsalicylsäure im Plasma

Nur an Hund II zeigte sich der normale Verlauf der Ausscheidung. Bei Hund I liegt der Acetylsalicylsäurespiegel des Plasmas fast unterhalb der nachweisbaren Grenze. Mit dem Stärkeester wurden nur etwa 5% der Konzentration der Acetylsalicylsäure nach Verabreichung von freier Acetylsalicylsäure im Plasma erreicht.

2. Radiochemische Bestimmung:

Da die geringen Mengen von Acetylsalicylsäure bzw. Salicylsäure, die aus dem Stärkeester im Körper abgespalten wurden, nicht mehr genau nach der kolorimetrischen Methode bestimmt werden konnten, und außerdem bei der Applikation größere Mengen eines toxischen Lösungsmittels verwendet werden mußten, wurde ein radioaktiv markierter Stärkeester¹ eingesetzt. Die Menge der markierten Abbauprodukte im Plasma wurde radiochemisch bestimmt. Hier kann man leicht eine zehnmal so große Genauigkeit erreichen. Als Versuchstiere wurden Kaninchen verwendet. Die kleinere Blutmenge ist ausreichend und eine Vernichtung des getöteten, mit Aktivität verseuchten Tieres leichter möglich.

Kaninchen A (2,3 kg, männlich) erhielt 100 mg Acetylsalicylsäure mit einer Aktivität von $5,38 \cdot 10^5$ dpm pro mg, also insgesamt $5,38 \cdot 10^7$ dpm in 1 ccm Solketal in den Oberschenkelmuskel intramuskulär injiziert.

Kaninchen B (2,4 kg, männlich) erhielt 200 mg Stärkeester mit einer Aktivität von $2,29 \cdot 10^5$ dpm pro mg, insgesamt $4,58 \cdot 10^7$ dpm in 2 ccm Solketal.

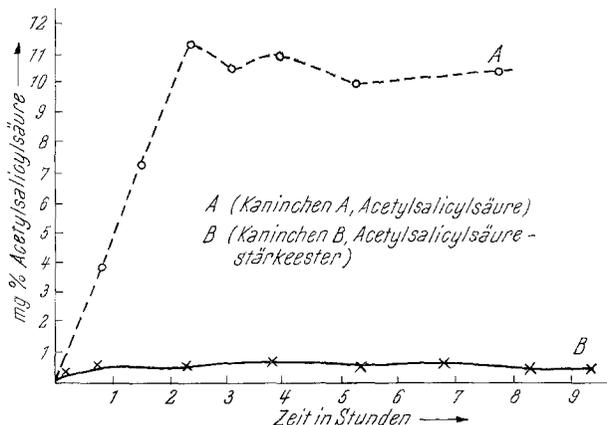


Abb. 2. Bestimmung von radioaktiver Acetylsalicylsäure im Plasma

Die Blutabnahme erfolgte durch die Halsschlagader. Die Aktivität des Blutes wurde während 9 Stunden verfolgt. Dazu wurden je 0,5 ml Plasma in kleinen Metallschälchen eingedampft und die Aktivitäten gemessen. Der Trockenrückstand wurde dann durch Na_2O_2 -Oxydation¹¹ in aktives Bariumcarbonat übergeführt und wieder die Aktivität bestimmt. Daraus ergab sich, daß im Durchschnitt ein ipm etwa 70 dpm entspricht. Aus den gefundenen dpm lassen sich die Mengen der Acetylsalicylsäure berechnen.

Der Kurvenverlauf weicht in der zweiten Hälfte von den Ergebnissen der kolorimetrischen Bestimmung ab. Dies wurde auf zwei Ursachen zurückgeführt:

¹¹ H. Schmid und K. Schmid, Helv. chim. Acta **36**, 489 (1953).

a) Die kleinen Versuchstiere waren gegen Ende sehr geschwächt, dabei wurde die Acetylsalicylsäure vermutlich langsamer aus dem Blut eliminiert als bei normalen Bedingungen.

b) Durch die laufenden, relativ großen Blutabnahmen wurde die Gesamtmenge des Blutes geringer, folglich bei gleichbleibender Acetylsalicylsäuremenge deren Konzentration im Blut höher.

Nach Abschluß der Prüfung wurde die restliche Aktivität an der Injektionsstelle bestimmt. Beim Kaninchen A waren es 10% der Gesamtaktivität, beim Kaninchen B aber über 95%!

Schlußfolgerungen:

Die Ergebnisse der kolorimetrischen und radioaktiven Messungen zeigten einen ungefähr gleichartigen Verlauf. Der Stärkeester lieferte nur 5% der Konzentration an Acetylsalicylsäure im Blut, die nach Verabreichung freier Acetylsalicylsäure auftrat. Die direkte Esterbindung der Carboxylgruppe der Acetylsalicylsäure an die Hydroxylgruppen der Stärke ist zu stabil, um im nennenswerten Umfang physiologisch aufgespalten zu werden.

Den Österreichischen Stickstoffwerken danken wir für die Unterstützung, die sie dieser Arbeit angedeihen ließen.