

### Literatur

1. REIN, H., u. M. SCHNEIDER: Einführung in die Physiologie des Menschen. 13., 14. Aufl. S. 267. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
2. RITTER, W.: Schweiz. Milchztg. **91**, Wissenschaftl. Beil. Nr. 103, 817—828 (1965).
3. SCHULZ, M. E.: Dtsch. Molkerei-Ztg. **59**, 1361—1363 (1938).  
SCHULZ, M.: Milchwiss. **1**, 7—11 (1946).  
SCHULZ, M. E.: Milchwiss. **7**, 292—299 (1952).  
SCHULZ, M. E., u. E. VOSS: Einstufung von Käse, Quark oder Casein nach dem Calcium-Gehalt der fett- und kochsalzfreien Käsetrockenmasse. 4. Aufl. S. 491. In: Das große Molkerei-Lexikon. Milchwirtschaft von A—Z in zwei Bänden. Bd. I. Kempten: Deutsche Molkerei-Ztg. 1965
4. ANTILA, M., u. M. HIETARANTA: Meijerit. Aikakausk. **18/19** 21—24 (1956/57); ref. in Dairy Sci. Abstr. **20**, 695 (1958).
5. SCHWARZ, G., u. H. MUMM: Milchwiss. **4**, 382—391 (1949).
6. LUX, H.: Praktikum der quantitativen Analyse. 2. Aufl., S. 55. München: J. F. Bergmann 1949.
7. TREADWELL, F. P.: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie. Bd. II, 11. Aufl., S. 371. Leipzig und Wien: Franz Deuticke 1927.
8. GEBELEIN, H., u. H. J. HEITE: Statistische Urteilsbildung. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951.
9. LANG, K.: In „Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln“. S. 174. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
10. SCHÜTTE, E.: Mineralstoffwechsel. In: B. FLASCHENTRÄGER u. E. LEHNARTZ: Physiologische Chemie. Bd. II, 1. Teil: Der Stoffwechsel. Bandteil a, S. 639. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.

## Stoffwechselluntersuchungen mit Essig-, Milch- und Citronensäure

Von

FEDOR MEDZIHRADSKY\* und WALTHER LAMPRECHT

Unter experimenteller Mitarbeit von PETER RAUSCHENBACH und HEIDI OFFHAUS

Mitteilung aus dem Biochemischen Laboratorium der Technischen Hochschule München, München-Pasing\*\*

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. April 1965)

Der Stoffwechsel von Essigsäure, Milchsäure oder Citronensäure gilt als eines der am besten bekannten Gebiete der Biochemie. Diese Erkenntnisse berühren jedoch fast ausnahmslos das intermediäre Stoffwechselgeschehen. Man weiß durch die Arbeiten von LYNEN („aktivierte Essigsäure“), von MARTIUS und KREBS (Citratcyclus) oder EMBDEN und MEYERHOF (Glucose-Abbau bzw. Milchsäurebildung), um nur die bedeutendsten Pionierarbeiten zu nennen, über die Bildung oder Verwertung der genannten Säuren im Zellstoffwechsel gut Bescheid.

Die Verwertung der dem Organismus über den Magen-Darm-Trakt zugeführten Säuren ist jedoch noch wenig erforscht. Sicher ist, wie auch die hier vorgelegten Ergebnisse beweisen, daß die zugeführten „alimentären“ Säuren, Essigsäure, Milchsäure

\* Auszug aus der Dissertationsschrift F. MEDZIHRADSKY, Technische Hochschule München (1965).

\*\* Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der AIF (Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen) und mit Mitteln des Bundeswirtschaftsministeriums durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle danken.

Herrn Dr. F. MARTENS sind wir für grundsätzliche Anregungen zu diesem Thema dankbar.

oder Citronensäure, nicht ohne weiteres an den Stellen der längst bekannten Stoffwechselreaktionen eintreten und von da aus, wie die „in-vivo-Säuren“, weiter umgesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden mit Hilfe radiomarkierter Verbindungen Untersuchungen über die Verwertung von Essig-, Milch- und Citronensäure im Tierkörper durchgeführt. Als Versuchstiere dienten Reinzuchtratten. Nach oraler Verabreichung der z. T.  $^{14}\text{C}$ -markierten Säuren durch Schlundsonde wurden bestimmt: Die Bildungsraten von  $^{14}\text{CO}_2$ , der Verlauf der Ausscheidungsraten der unveränderten Säuren im Harn, ihre Retention in Blut, Leber und Niere sowie die Auswirkung der Applikation auf die Zwischenstoffkonzentration glykolytischer Metabolite in diesen Organen. In gesonderten Versuchen wurde der Einbau von in die Pfortader verabreichten Säuren in das Glykogen der Leber untersucht, mit dem Ziel, neben der Einbaurrate auch die betreffenden Stoffwechselwege dieser Verbindungen zum Glykogenaufbau aufzuklären.

## Experimenteller Teil

### 1. Material

Folgende radiomarkierten Verbindungen kamen zur Anwendung: 1- und 2- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure, 2- $^{14}\text{C}$ -Milchsäure, 1,5- $^{14}\text{C}$ -Citronensäure (Radiochemical Centre, Amersham, England). Sämtliche für die enzymatisch-optischen Analysen gebrauchten Enzyme wurden von der Firma C. F. Boehringer & Söhne, Tutzing/Obb., bezogen.

Die zur Radioaktivitätsmessung im Flüssigkeitsscintillationspektrometer benötigten Scintillatoren (PPO, Dimethyl-POPOP), wie auch das Silikat-Pulver Cab-O-Sil, wurden von der Firma „Packard Instruments“ GmbH., Frankfurt a. M., L- und D-Milchsäure vom „Serva-Entwicklungslabor“, Heidelberg, bezogen. Die in den Versuchen verwendeten weiblichen Reinzuchtratten vom Stamm Sprague-Dowley, mit einem Gewicht von 180—200 g, wurden mit Standardfutter „Altromin R“ ernährt.

### 2. $^{14}\text{CO}_2$ -Bildungsraten aus $^{14}\text{C}$ -markierter Essig-, Milch- und Citronensäure

Den Tieren wurde 6 Std vor Versuchsbeginn das Futter entzogen. Jeweils 200 mg und 15  $\mu\text{C}$  der zur Untersuchung gelangten Verbindungen wurden in 1 ml auf pH 4 eingestellter Lösung den Tieren durch Schlundsonde verabreicht und diese rasch in die unter leichtem Unterdruck gesetzte Stoffwechselapparatur gebracht.

Für das stündliche Auffangen von  $\text{CO}_2$  wurde eine handelsübliche Apparatur der Delmar Scientific Laboratories Inc., Maywood, Ill., USA) von uns modifiziert: Das ausgeatmete  $\text{CO}_2$  wurde in mit Glasfritten (G-4) versehenen Absorptionsfallen in 2,5 n-Natronlauge gesammelt. Ein Glashahn-Schaltssystem ermöglicht ein schnelles Umleiten des Ausatemungs- $\text{CO}_2$  in die einzelnen Kolonnen. Der Tierraum der Apparatur besitzt eine Ablaufvorrichtung, durch die laufend Harnproben unter Toluol aufgefangen werden konnten.

Die stündlichen Ausatemungsraten wurden jeweils 8 Std lang verfolgt und sodann der letzte Stundenwert der 24stündigen Ausatmung (23.—24. Std nach Versuchsbeginn) gesondert aufgefangen. In Kurzzeitversuchen wurde die 15minütige  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung im Laufe der ersten Stunde nach der Applikation bestimmt.

Im Aliquot der carbonathaltigen Lösung erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationsmeßgerät TRI-CARB (Fa. Packard). Es wurde eine Suspensionszählung unter Zuhilfenahme von Silicatpulver (Cab-O-Sil) verwandt: 1 ml der alkalischen Lösung wird in das lose mit Silicatpulver gefüllte Zählglas gegeben und anschließend werden 15 ml Scintillationslösung (100 g sublimiertes und umkristallisiertes Naphthalin, 7,0 g PPO, 0,3g Dimethyl-POPOP mit Dioxan pro anal. auf 1 l aufgefüllt) zugefügt. Nach Schließen des Zählglases wird durch kräftiges Schütteln eine leicht trübe Gel-Suspension hergestellt und diese zur Messung gebracht. Die Zähl-Ausbeutebestimmung erfolgte mit einer  $^{14}\text{C}$ -Benzoessäure-Standardlösung. Als Blindwert wurde mit 1,0 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -haltiger 2,5 n-NaOH-Lösung wie oben verfahren. Gemessen wurde im optimalen  $E^2/B$ -Bereich ( $E$  = Zählausbeute,  $B$  = Untergrund) des Gerätes.

### 3. Bestimmung der Retentions- und Ausscheidungsraten

Neben dem Anteil der untersuchten Säuren an der Endoxydation wurde ihre Retention im Tierkörper durch Messung der Radioaktivität und der Metabolitgehalte in Blut und Organen (Leber und Niere) untersucht. Unmittelbar nach dem Auffangen der letzten  $^{14}\text{CO}_2$ -Rate wurden

von den Tieren Blut-, Leber- und Nierenproben entnommen. Ein Teil des Blutes wurde durch Einwiegen in vorgelegte Perchlorsäure enteiweißt (Endkonzentration der Säure 6%), mit  $K_2CO_3$  neutralisiert und der Überstand für die Analyse folgender Metabolite verwendet: Brenztraubensäure (BTS), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), Fructosediphosphat (FDP), Glycerinphosphat (GP) und L-Milchsäure (L-MS). Diese Substrate wurden sämtlich in zusammengesetzten enzymatisch-optischen Testen (Photometer „Eppendorf“) bei 366 nm bestimmt (1).

Ein weiterer Teil des Blutes wurde gewogen, gefriergetrocknet, fein gepulvert und nach Entfärbung mit  $H_2O_2$  (2) mittels Silicatpulver und Dioxan-Scintillationslösung in Suspension der Radioaktivitätsbestimmung im TRI-CARB unterworfen.

Die Organproben wurden sofort nach der Entnahme in flüssige Luft verbracht, nach dem Einfrieren in der Reibschale fein gepulvert. Für die Metabolitbestimmung wurde ein Teil des Trockenpulvers enteiweißt und neutralisiert. Nach der Gefriertrocknung wurde in einem weiteren Teil Organpulver (Einwaagen um 50 mg) mit der Suspensionszählung die Radioaktivität gemessen.

Zur Prüfung der physiologischen Verwertbarkeit der zu den Untersuchungen gelangten Säuren, insbesondere im Hinblick auf die Stereospezifität der Milchsäure, wurde in gesonderten Versuchen jeweils 125 mg Citrat sowie L- und D-Lactat in je 1 ml mit NaOH auf pH 4 eingestellt. Diese Lösungen wurden mittels Schlundsonde den Tieren verabreicht, diese anschließend 72 Std bei ausschließlicher Trinkwasserversorgung in der Stoffwechselapparatur belassen. Der Harn der Tiere wurde aufgefangen und nach Bestimmung des pH-Wertes mit Perchlorsäure enteiweißt und dann im Neutralisat die entsprechenden Substratkonzentrationen analysiert.

Die Bestimmung der Citronensäure erfolgte colorimetrisch nach NATELSON u. Mitarb. bzw. ELLIOT (3, 4): Citronensäure wird mit  $KMnO_4$  und KBr oxydativ in Pentabromaceton überführt. Diese Verbindung liefert mit Thioharnstoff einen Farbkomplex, dessen Farbintensität bei 430 nm bestimmt wird.

L-Milchsäure wurde im enzymatisch-optischen Test mit Hilfe von Lactatdehydrogenase bestimmt (1).

Die Analyse der Gehalte an DL-Milchsäure erfolgte auf colorimetrischem Wege nach der Methode von BARKER und SUMMERSON (5). Mit diesem Verfahren wird nach Entfernung der Störsubstanzen Milchsäure mit konz.  $H_2SO_4$  in Acetaldehyd überführt. Der mit p-Hydroxydiphenyl entstehende Farbkomplex wird bei 560 nm colorimetriert.

Der D-Milchsäure-Gehalt wurde durch Differenzbildung aus dem Ergebnis der Gesamtmilchsäurebestimmung und der enzymatischen L-Lactat-Analyse errechnet.

#### 4. Pfortaderinfusion von DL- und D-Lactat

In dieser Versuchsreihe wurde der Stoffwechsel von D-Milchsäure nach unmittelbarem Einbringen in die Blutbahn (Pfortader-Infusion) durch Analyse der D- und L-Milchsäuregehalte und der Konzentration glykolytischer Metabolite untersucht:

Reinzuchttratten wurden 12 Std vor Versuchsbeginn das Futter entzogen, die Tiere mit Urethan in Narkose versetzt (1,8 ml 20%ig intraperitoneal), die Bauchhöhle geöffnet und die Pfortader sowie die *vena cava* von dem umgebenden Fettgewebe freigelegt. Vor der Infusion wurden für die Bestimmung der Normalwerte Blut- und Leberproben entnommen. Blut wurde aus der *vena cava* entnommen (ca. 0,2 ml), mit vorgelegter Perchlorsäure rasch enteiweißt und mit  $K_2CO_3$  neutralisiert. Zur Entnahme der Leberproben wurde ein Teil eines Leberlappens abgebunden, das Gewebestück mit den Aluminium-Backen einer in flüssiger Luft vorgekühlten Frierstoppzange umschlossen, abgetrennt und schnell in flüssige Luft gebracht. Die eingefrorenen Leberproben wurden in flüssiger Luft pulverisiert und in vorgelegte Perchlorsäure eingewogen. Nach der Neutralisation der sauren Extrakte mit  $K_2CO_3$  wurde im klaren Überstand die Substratbestimmung durchgeführt.

Die Verabreichung von DL- und D-Lactat erfolgte ebenfalls durch Pfortaderinfusion. 0,9 bis 1,4 mmol der Verbindungen wurden in 0,5 ml Wasser bzw. in einigen Versuchen in Periston (Polyvinylpyrrolidon — Blutersatzmittel) gelöst und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min in die Pfortader infundiert. Mit dieser Technik gelang es, in einigen Fällen von einem Tier 4—5 Blut- und Leberproben zu entnehmen.

In den Neutralisaten wurden analysiert: Gesamtmilchsäure (5) sowie L-Milchsäure, Glycerinphosphat, Brenztraubensäure, Dihydroxyacetonphosphat und Fructosediphosphat im zusammengesetzten enzymatischen Test (1).

#### 5. Einbauarten in das Leberglykogen, Glykogenisolierung und Hexoseabbau

In weiteren Versuchsreihen wurde der Einbau der alimentären Säuren in das Glykogen der Leber verfolgt. Appliziert wurden 1- und 2- $^{14}C$ -Acetat, 1- und 2- $^{14}C$ -Lactat sowie 1,5- $^{14}C$ -Citrat. 50—80  $\mu C$  und 1 mmol. (Trägersubstanz) dieser Verbindungen wurden, wie oben beschrieben, in die Pfortader infundiert.

Citrat konnte nicht in den mit Acetat und Lactat vergleichbaren Mengen in die Blutbahn eingebracht werden, da schon 0,15 mmol der Verbindung einen abrupten Herzstillstand bei den Tieren verursachte. Der wahrscheinliche Grund dieses Effektes ist der Entzug der Ca-Ionen des Blutes durch Komplexbildung mit Citrat und die somit erfolgte Stilllegung des Herzens. Mit 0,5 ml 3,8%iger Citratlösung konnte jedoch die Infusion durchgeführt werden.

Der Hungerzustand der Tiere vor Beginn dieser Versuche betrug 15 Std. 30 min nach der Infusion wurde die Leber mit der Frierstoppzange entnommen und in flüssige Luft getaucht. Nach dem Wiegen wurde das Organ unter Zusatz von flüssiger Luft fein gepulvert, mit heißer 30%iger Kalilauge im Verhältnis 3 ml zu 1 g Leber übergossen und 30 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Die fast klare, rotbraune Lösung (geringe Eiweißrückstände bleiben als feiner Niederschlag ungelöst) wurde abgekühlt, mit gesättigter Natriumsulfatlösung im Verhältnis 0,5 ml zu 1 g Leber versetzt und unter Rühren das 1,2fache Volumen an 96%igem Alkohol zugefügt. Der schwach bräunliche Niederschlag, der das Rohglykogen darstellt, wurde 5 min bei 1000 g abzentrifugiert und ohne weitere Reinigung 2 Std mit  $n\text{-H}_2\text{SO}_4$  bei 100° C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Ionenaustauscher entsäuert und aliquote Teile des neutralisierten Glykogenhydrolysats wurden zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität (Rohaktivität) und der Glucosekonzentration verwendet. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im TRI-CARB-Gerät unter Verwendung einer Dioxan-Scintillationslösung. Die derart erhaltenen Rohaktivitätswerte dienen als Hinweis auf die Höhe des Einbaus an verabreichten Substanzen in das Glykogen der Leber.

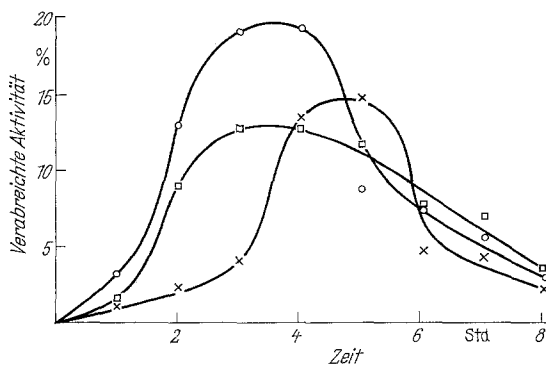
Die Glucosebestimmung erfolgte enzymatisch-optisch mit Hilfe der Enzyme Hexokinase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase.

Die aus dem neutralisierten Glykogenhydrolysat gewonnene Glucose wurde einem chemischen Abbauprozess nach SIMON und STEFFENS (6) unterworfen. Dieses Verfahren gestattet, durch sukzessiven Abbau der Hexose die Radioaktivität an jedem Kohlenstoffatom der Glucosekette zu ermitteln.

Die Radioaktivität des im Laufe des Abbaues zunächst hergestellten Osazons bzw. Phenylsotriazols der Glucose wurde bestimmt, als „Feinaktivität“ bezeichnet und diese Meßwerte als Maß des Glykogeneinbaues betrachtet. Als Einbaurrate wird der Anteil der Feinaktivität an der gesamt verabreichten Radioaktivität, bezogen auf Organgewichtseinheit, definiert. Die im Laufe des Abbaues anfallenden festen Verbindungen wurden teils durch oxydativen Aufschluß mit  $\text{KClO}_4$  im geschlossenen Bombenrohr bei 650° C in  $\text{CO}_2$  umgewandelt, dann die Radioaktivität des  $^{14}\text{CO}_2$  in Proportional-Gasfüllzählrohren ausgemessen, teils wurde in einer Vereinfachung der Meßmethodik anstelle der Gasphasenmessung die Messung der Radioaktivität der Derivate in gelöster Form im Flüssigkeitsscintillationsmeßgerät „TRI-CARB“ durchgeführt. Aus Verbindungen freigesetztes  $\text{CO}_2$  wurde in Hyamin aufgefangen und der Gehalt an  $^{14}\text{CO}_2$  nach Zusatz von Scintillationslösung im „TRI-CARB“ bestimmt.

## Ergebnisse und Diskussion

Der Verlauf der  $\text{CO}_2$ -Ausatmung nach Verabreichung der untersuchten markierten Säuren (Abb. 1) läßt bei der Verwertung dieser Verbindungen im Tierkörper eine hohe Endoxydation erkennen. Citronensäure zeigt in relativ kurzer Zeit (3 Std) eine hohe  $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmungsrate. Die entsprechenden Maximalwerte für Essigsäure und



Milchsäure erscheinen erst in der 5. bzw. 4. Stunde. Diese Unterschiede im zeitlichen Ablauf der Endoxydationsraten treten noch deutlicher in den Kurzzeitversuchen hervor (Abb. 2). Der im Gegensatz zu Essig- und Milchsäure sprunghaft einsetzende Anstieg der  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus

Abb. 1.  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildungsraten nach oraler Verabreichung von  $^{14}\text{C}$ -markierter Essig-, Milch- und Citronensäure.  
 × = 2- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure, □ = 2- $^{14}\text{C}$ -Milchsäure, ○ = 1,5- $^{14}\text{C}$ -Citronensäure

1,5-<sup>14</sup>C-Citronensäure (bereits 30 min nach der oralen Verabreichung) weist auf eine bevorzugte und beschleunigte Zufuhr dieser Verbindung zur Endoxydation hin.

Der Verbleib der verabreichten Säuren im Organismus, gemessen am Ende der 24stündigen Ausatmungsperiode, fällt bei einer mengenmäßigen Bilanz gering aus.

Tabelle 1. Retentionsraten der Radioaktivität in Blut, Leber und Niere 24 Std nach oraler Verabreichung von <sup>14</sup>C-Acetat-, Lactat- und Citrat

Verabreicht	Retentionsraten je g Frischgewicht bezogen auf verabreichte Aktivität		
	Blut %	Leber %	Niere %
1- <sup>14</sup> C-Acetat . .	0,024	0,10	0,10
2- <sup>14</sup> C-Acetat . .	0,036	0,18	0,06
2- <sup>14</sup> C-Lactat . .	0,042	0,06	—
1,5- <sup>14</sup> C-Citrat . .	0,004	0,02	0,49

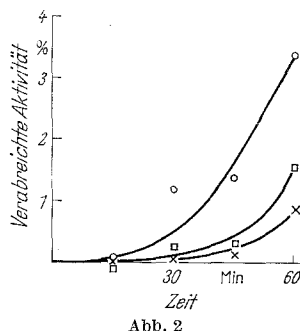


Abb. 2. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildungsraten nach oraler Verabreichung von <sup>14</sup>C-markierter Essig-, Milch- und Citronensäure. Kurzzeitversuche. × = 2-<sup>14</sup>C-Essigsäure, □ = 2-<sup>14</sup>C-Milchsäure, ○ = 1,5-<sup>14</sup>C-Citronensäure

Die Retentionsraten der Radioaktivität in Blut und Leber zeigen für Citronensäure einen rund 10mal niedrigeren Wert gegenüber Essig- und Milchsäure (Tab. 1). Hinzuweisen ist demgegenüber auf den relativ hohen Radioaktivitätsgehalt der Niere nach Gaben von Citronensäure. Die Konzentrationen glykolytisch bedeutsamer Metabolite, gemessen im Rahmen der Retentionsbestimmung, ergaben erwartungsgemäß 24 Std nach der Applikation keine wesentliche Veränderung gegenüber den Normalwerten (Tab. 2).

Tabelle 2. Metabolitkonzentrationen in Blut, Leber und Niere 24 Std nach oraler Verabreichung von Acetat, Lactat und Citrat

Verabreicht	Metabolitkonzentration in µmol je g Frischgewicht					
	BTS in	L-MS in	GP in	DHAP in	FDP in	Glucose in
a) Blut						
Acetat	0,29	1,95	—	0,02	—	5,34
Lactat	0,12	1,89	—	0,05	—	4,56
Citrat	0,40	2,10	—	0,02	—	4,03
b) Leber						
Acetat	0,05	2,40	0,87	0,03	0,06	7,7
Lactat	—	4,12	1,39	—	0,025	8,9
Citrat	0,08	4,64	1,13	0,03	0,06	11,5
c) Niere						
Acetat	0,02	3,58	0,13	0,03	0,05	2,3
Citrat	0,06	4,18	1,27	0,03	0,08	3,2
d) Normalwerte						
Blut	0,15	2,9	—	—	0,037	4,5
Leber	0,97	1,32	0,17	0,05	0,01	8,9

In Übereinstimmung mit dem gemessenen, relativ hohen Radioaktivitätsgehalt der Niere nach Verabreichung von Citronensäure ist in einem starken Ausmaß die Ausscheidung dieser unveränderten Säure via Niere festzustellen. Substratbestimmungen im Harn ergaben (Tab. 3), daß bereits 2 Std nach Verabreichung von 0,65 mmol

Tabelle 3. *Ausscheidungsraten nach oraler Verabreichung von 125 mg (0,65 mmol) Citrat*

Zeit in Std, min	pH	Ausscheidungsrate $\mu\text{mol/ml}$	Gesamtausscheidung $\mu\text{mol}$
Normalwert	6,0	1,34	—
2,10	9,2	24,32	44,48
2,45	9,2	30,46	15,52
3,35	9,3	36,30	19,63
5,30	9,3	42,29	13,95
13,45	9,3	52,70	47,81
22,45	8,3	17,91	5,54
34,30	6,0	5,04	2,36
43,15	5,9	5,28	2,17
58,00	5,7	5,86	2,92
72,00	5,7	5,89	1,68

Gesamtausscheidung in 72 Std: 156,10  $\mu\text{mol}$  = 24% der verabreichten Menge.

reapeutischen oder diätetischen Praxis bedeutungsvoll. Wir denken in diesem Zusammenhang z. B. an Fälle von Nierenerkrankungen, wobei vielerorts noch in Kliniken oder von Ärzten eine sofortige Umstellung von Essig auf Zitronensaft bei der Ansäuerung von Salaten empfohlen wird. Die eben dargelegten Befunde können ebenfalls zur Erklärung der Wirkung der sog. „Schaukeldiät“ dienen, also einem wechselnden Umstellen des Harn-pH vom Sauren zum Alkalischen. Dieser Therapieversuch wird häufig zur Entfernung von Nierensteinen angewendet.

Nach oralen Gaben von L-Milchsäure, der „physiologischen“ Säure, ist deren Ausscheidung durch die Niere mit 0,22% der verabreichten Menge gering (Tab. 4).

Tabelle 4. *Ausscheidungsraten nach oraler Verabreichung von 125 mg (1,39 mmol) L-Lactat*

Zeit (Std, min)	pH	L-MS $\mu\text{mol/ml}$	DL-MS $\mu\text{mol/ml}$	D-MS $\mu\text{mol/ml}$	D/L	Gesamtaussch.	
						L-MS $\mu\text{mol}$	D-MS $\mu\text{mol}$
Norm. W.	6,0	0,18	1,55	1,36	7,5	—	—
2,10	8,0	0,45	0,91	0,43	0,9	0,29	0,26
2,45	9,5	0,19	0,59	0,40	2,1	0,10	0,22
3,45	9,5	0,21	0,69	0,48	2,3	0,12	0,18
6,40	9,5	0,28	0,94	0,66	2,3	0,22	0,53
13,55	7,7	0,33	1,13	0,80	2,4	0,48	1,17
19,20	6,0	0,37	1,35	0,98	2,6	0,13	0,35
21,55	5,7	0,44	1,99	1,55	3,5	0,16	0,57
28,30	5,7	0,36	1,60	1,24	3,4	0,20	0,68
34,40	6,5	0,31	1,34	1,03	3,3	0,32	1,07
43,25	6,3	0,55	1,59	1,04	1,8	0,38	0,72
49,50	5,9	0,51	1,38	0,87	1,7	0,27	0,47
58,10	6,0	0,29	1,85	1,56	5,3	0,20	1,11
72,00	6,0	0,28	2,23	1,95	6,9	0,15	1,04

Gesamtausscheidung in 72 Std: 11,40  $\mu\text{mol}$  (3,09 L-MS, 8,37 D-MS) = 0,8% der verabreichten Menge.

Citrat eine Ausscheidungsrate von 24  $\mu\text{mol/ml}$  resultiert, die im späteren Verlauf der Ausscheidung auf 52  $\mu\text{mol/ml}$  Harn anstieg. Nach 24 Std ist die Ausscheidung in diesen hohen Raten beendet. Innerhalb von 72 Std verlassen 24% der zugeführten Menge an Citronensäure unverändert den Tierkörper.

Dieses Ergebnis, wonach ein großer Teil der zugeführten Citronensäure unverändert durch den Harn ausgeschieden wird, ist für bestimmte Bereiche der the-

Die außerdem relativ verzögert einsetzende Ausscheidung läßt sich auch aus dem Verhältnis von ausgeschiedener D- zur L-Form dieser Säure feststellen. Die anfängliche Relation L- zu D-Lactat von 0,9 erreicht erst innerhalb von 72 Std mit 0,69 etwa den Normalwert. D-isomere Milchsäure dagegen wird rasch und in hohen Raten im Harn unverändert ausgeschieden. 36% der applizierten D-Milchsäure verläßt in 72 Std den Organismus (Tab. 5), wobei schon 3 Std nach der Verabreichung rund 200  $\mu\text{mol/ml}$  im Harn gemessen wurden und die Hauptphase der Ausscheidung nach 14 Std beendet ist.

Tabelle 5. Ausscheidungsraten nach oraler Verabreichung von 125 mg (1,39 mmol) D-Lactat

Zeit (Std, min)	pH	L-MS $\mu\text{mol/l}$	DL-MS $\mu\text{mol/ml}$	D-MS $\mu\text{mol/l}$	D/L $\mu\text{mol/l}$	Gesamtaussch.	
						L-MS $\mu\text{mol}$	D-MS $\mu\text{mol}$
Norm. W.	6,0	0,18	1,55	1,36	7,5	—	—
2,10	7,0	0,80	82,89	82,09	102,3	1,36	167,10
2,45	9,0	2,66	204,56	201,90	75,5	2,24	149,22
4,35	9,0	1,41	107,77	106,36	75,3	0,75	56,54
13,45	9,0	1,13	18,80	17,67	15,6	1,06	16,50
19,10	6,8	1,20	5,49	4,29	3,5	0,55	1,35
24,20	6,5	0,79	3,72	2,93	3,7	0,27	1,72
34,30	6,0	0,68	3,02	2,34	3,4	0,35	1,05
43,15	6,3	0,66	3,28	2,90	4,4	0,45	1,94
52,25	6,3	0,65	4,13	3,48	5,3	0,29	1,57
72,00	6,4	0,72	4,41	3,69	5,1	0,51	2,03

Gesamtausscheidung in 72 Std: 507,14 mmol (8,12 L-MS, 499,02 D-MS) = 36,5% der verabreichten Menge.

Von besonderer Bedeutung scheint uns die Beobachtung zu sein, wonach in der Phase der erhöhten Ausscheidung der alimentären Säuren (Citronensäure, D-Milchsäure) eine Verschiebung des Harn-pH von 6 auf den Wert 9 stattfindet. Ferner läßt sich jedoch in geringem Ausmaß eine Relation der Ausscheidung der beiden stereoisomeren Milchsäuren zueinander feststellen. Die Beobachtung, daß Gaben von D-Milchsäure auch eine Erhöhung der

Ausscheidungsraten der L-Säure zur Folge haben, deutet auf einen möglichen Einfluß des D-Isomeren auf den L-Lactatgehalt im Organismus.

Das Einbringen von DL-Lactat in die Pfortader führt zu unterschiedlicher Erhöhung der Gehalte an L- sowie D-Milchsäure im Blut. Bei einer hohen Konzentration des L-Isomeren wird D-Lactat bis zu einem Schwellenwert von 5,5  $\mu\text{mol/g}$  Frischgewicht aufgenommen (Tab. 6). Ein derartiger D-Lactat „Schwellenhöchstwert“ konnte auch in der Leber festgestellt werden (Tab. 7). Auch im Falle einer höheren Konzentration dieser Verbindung im Blut bleibt der D-Lactatgehalt in der Leber (mit dem Wert von 1,8  $\mu\text{mol/g}$  Frischgewicht) unverändert. Es kann daher angenommen werden, daß das einen maximalen Wert übersteigende Angebot an D-Lactat aus dem Blut durch die Niere ausgeschieden wird (Tab. 4). Die Frage nach einem

Tabelle 6. L- und D-Lactatgehalt in Blut nach portaler Verabreichung von 1,4 mmol DL-Lactat (FG = Frischgewicht)

Zeit min	Hungerzust. Std	L-MS in $\mu\text{mol je g FG}$	D-MS in $\mu\text{mol je g FG}$
Normalwert	15	3,6	0,7
11	15	15,5	5,4
30	15	8,2	5,6

besonderen Verwertungsweg für D-Milchsäure im Organismus erscheint nach diesen Ergebnissen berechtigt.

Über Versuchsreihen und Ergebnisse mit Acetat in Blut und Organen, nach entsprechenden Belastungen, wird in Kürze gesondert berichtet. Diesbezügliche Voruntersuchungen vgl. (8).

Tabelle 7. *Metabolitkonzentrationen in Leber und Blut nach portaler Verabreichung von 0,9 mmol D-Lactat. (Hungerzustand: 6 Std)*

Zeit min	L-MS	D-MS	BTS	GP	DHAP	FDP
	in $\mu\text{mol je g Frischgewicht}$					
Normalwert	2,6	0,3	0,08	0,24	0,04	0,08
30	5,3	1,8	0,03	1,00	0,04	0,08
51	13,7	1,8	0,07	1,21	0,05	0,09
51 (Blut)	7,6	3,7	0,22	—	—	—

Der Einbau der untersuchten Säuren in das Glykogen der Leber ist größenordnungsmäßig gering. Die maximalen Einbauraten betragen an Milchsäure 0,3%, an Citronensäure 0,17% und an Essigsäure 0,08% (in % der verabreichten Menge). Nach portaler Verabreichung von 2-<sup>14</sup>C-Acetat, 1- und 2-<sup>14</sup>C-Lactat und 1,5-<sup>14</sup>C-Citrat hat RAUSCHENBACH (9) die Verteilung der Radioaktivität im Molekül der aus dem Glykogen gewonnenen Glucose gemessen (Tab. 8).

Tabelle 8. *Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in der Glykogen-Glucose nach intraportaler Infusion von <sup>14</sup>C-markiertem Acetat, -Lactat und -Citrat (9, 10)*

Verabreicht	Verteilung der Radioaktivität bei						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	Summe
	in %	in %	in %	in %	in %	in %	in %
2- <sup>14</sup> C-Lactat . . .	18,1	23,2	5,1	14,6	18,7	20,1	99,8
2- <sup>14</sup> C-Lactat . . .	16,4	23,1	4,7	3,24	19,2	0	96,3
1- <sup>14</sup> C-Lactat . . .	1,2	9,6	38,4	47,1	5,3	0	101,6
1- <sup>14</sup> C-Lactat . . .	4,0	6,9	43,6	47,0	9,1	0	110,6
2- <sup>14</sup> C-Acetat . . .	22,5	22,5	7,1	11,4	18,2	22,6	104,3
2- <sup>14</sup> C-Acetat . . .	20,2	18,5	6,5	7,2	22,4	22,6	97,4
1,5- <sup>14</sup> C-Citrat . . .	1,5	6,7	41,6	47,6	0,8	0,3	98,5
1,5- <sup>14</sup> C-Citrat . . .	0	11,9	39,2	50,2	1,5	0	102,8

2-<sup>14</sup>C-Acetat wird hauptsächlich in die Kohlenstoffatome 1, 2, 5, 6 der Glucose eingebaut. Ein viel geringerer Teil der Radioaktivität kann in C-3 und C-4 festgestellt werden. 2-<sup>14</sup>C-Lactat führt zu einer 1,2- und 5,6-Markierung der Hexose in fast gleich hohen Raten. Mit 1-<sup>14</sup>C-Lactat findet sich die Radioaktivität zum überwiegenden Teil in C-3 und C-4. 1,5-<sup>14</sup>C-Citrat führt zu einer überwiegenden C-3 und C-4-Markierung. Über die theoretischen Konsequenzen dieser Ergebnisse wird an anderer Stelle berichtet (10).

Grundsätzlich läßt sich aus den erhaltenen Verteilungsmustern über die gluconeogenetische Verwertung der alimentären Säuren folgende Deutung ableiten:

Lactat kann auf folgende Weise zur Neubildung von Glucose verwendet werden: a) über Pyruvat durch die oxydative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA, das nach Durchlaufen des Citratcyclus Oxalacetat liefert. Diese Verbindung kann in der Utter-Reaktion durch Phosphorylierung und gleichzeitige Decarboxylierung in Phosphoenolpyruvat (PEP) umgewandelt werden. Die weitere Verwertung von PEP zu Glucose



erfolgt dann in einer Umkehr der reversiblen glykolytischen Reaktionskette.  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat würde auf diesem Wege zu einer 3,4-Markierung der Glucose führen. Das C-1 Atom von  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat wird bei der Umwandlung in Acetyl-CoA eliminiert. Allerdings kann das  $^{14}\text{CO}_2$  durch die reduktive Carboxylierung von Pyruvat mit Malat-Enzym Äpfelsäure und somit auch Oxalacetat und PEP ergeben. Auf diesem Wege führt der Einbau von  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat zu einer 3,4-Markierung der Glykogen-Glucose.

b) Lactat kann über Pyruvat und dessen direkte Carboxylierung zu Malat Oxalacetat und PEP liefern.  $2\text{-}^{14}\text{C}$ - bzw.  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat müssen durch diese Reaktionsfolgen eine 1,2,5,6- bzw. 3,4-Markierung der Hexose ergeben.

c) Obwohl die Direktphosphorylierung von Pyruvat zu PEP an der Pyruvat-Kinase als Umkehr der Glykolysereaktion energetisch ungünstig ist, weil sie hohe ATP-Konzentrationen erfordert, konnte die Existenz dieser Reaktion im tierischen Organismus von mehreren Arbeitskreisen bestätigt werden. Auf diesem Wege könnte aus  $2\text{-}^{14}\text{C}$ - bzw.  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat über gleichmarkiertes Pyruvat und PEP 2,5- bzw. 3,4-markierte Glucose resultieren.

Methylmarkiertes Acetat führt im Citratcyclus zur Markierung der mittleren C-Atome von Succinat und Oxalacetat. Die Bildung von PEP aus Oxalacetat, wie oben beschrieben, führt zur Markierung der Methyl- und Carboxylgruppe und zum Einbau der Radioaktivität in die C-Atome 1, 2, 5, 6 der Glucose. Das Wiedereintreten von Oxalacetat in den Citratcyclus liefert carboxylmarkiertes Succinat, Oxalacetat und Pyruvat und somit auch eine zusätzliche 3,4-Markierung der Glucose. Da dieser Wiedereinbau erst nach 2 weiteren Umläufen des Cyclus zustandekommt, tritt in der Zwischenzeit eine Isotopenverdünnung durch die endogen entstehenden Substrate ein. Das Ergebnis dieses verzögerten Einbaues ist eine relativ geringe Radioaktivität in den C-Atomen 3 und 4 des Zuckers.

Das C-1-Atom von  $1,5\text{-}^{14}\text{C}$ -markiertem Citrat wird im Citratcyclus durch die Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutar Säure eliminiert. Der Rest des Moleküls ergibt carboxylmarkiertes Oxalacetat. Diese Verbindung wird durch die phosphorylierende Decarboxylierung in carboxylmarkiertes PEP umgewandelt, das in der reversiblen glykolytischen Reaktionskette zu einer 3,4-Markierung der Glucose führt.

### *Zusammenfassung*

Per os verabreichte Essig-, Milch- und Citronensäure wird innerhalb von 24 Std zum überwiegenden Teil der Endoxydation zugeführt. Nach 60 min werden von den verabreichten Mengen bei Citronensäure 3%, bei Essigsäure 1,5% und bei Milchsäure 0,9% als  $\text{CO}_2$  ausgeschieden. Metabolit- und Radioaktivitätsbestimmungen lassen eine nur geringe Retention der genannten Säuren im Tierkörper feststellen.

Von oral zugeführter Citronensäure wird innerhalb von 24 Std rund 20% unverändert durch die Niere ausgeschieden.

Es besteht ein wesentlicher Unterschied in der Verwertung der zwei Stereoisomeren der handelsüblichen Milchsäure. D-Milchsäure wird rasch und in hohen Raten ausgeschieden. 14 Std nach der Verabreichung lassen sich bereits 30% der oral zugeführten D-Milchsäure im Harn unverändert nachweisen. Sowohl im Blut als auch in der Leber wird trotz Überangebotes durch intraportale Verabreichung ein maximaler Grenzwert von 1,8 bzw.  $5,5 \mu\text{mol/g}$  im Blut bzw.  $\mu\text{mol je g}$  Frischgewicht an D-Lactat nicht überschritten. L-Lactat wird unter gleichen Bedingungen nicht oder kaum ausgeschieden. In Blut und Leber finden sich nach L-Lactatgaben relativ hohe Gehalte dieses Substrates.

Intraportal verabreichtes Lactat, Acetat oder Citrat wird in das Glykogen der Leber eingebaut. Die gemessenen Einbauraten zeigen jedoch nur einen relativ geringen Anteil dieser Verbindungen an der Glykogen-Neubildung. Die maximalen Einbauraten sind bei Lactat 0,3%, bei Acetat 0,08% und bei Citrat 0,17%. Die Verteilung der Radioaktivität in der Glykogen-Glucose nach Pfortaderinfusion von  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat, 1- und  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Lactat oder  $1,5\text{-}^{14}\text{C}$ -Citrat zeigt, daß Acetat und Citrat über die Reaktionsfolgen des Citronensäurecyclus zur Glykogen-Neubildung in der Leber verwertet werden. Als Hauptweg des Glykogeneinbaues von Lactat wird die reduzierende Carboxylierung mit Malat-Enzym („*malic enzyme*“) des aus Lactat gebildeten Pyruvates erkannt. Daneben wird Pyruvat ebenso über den Citronensäurecyclus und die direkte Phosphorylierung mit Hilfe von Pyruvatkinase zu Phosphoenolpyruvat in die gluconeogenetische Reaktionskette eingeschleust.

Aus den vorgelegten Ergebnissen werden Schlußfolgerungen für die therapeutische und diätetische Praxis gezogen. Eine in Krankheitsfällen (z. B. Nierenerkrankungen) empfohlene Umstellung von Essig auf Citronensaft ist nach diesen Stoffwechseluntersuchungen nicht gerechtfertigt.

### Literatur

1. BERGMAYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim, Bergstr.: Verlag Chemie 1964.
2. OKITA, G. T., J. SPRATT u. G. V. LEROY: *Nucleonics* **14**, Nr. 3, 76 (1956).
3. NATELSON, S., J. B. PINCUS u. I. K. LUGOVOY: *J. biol. Chem.* **175**, 745 (1948).
4. ELLIOT, K. A. C.: *Methodes in Enzymology*. Bd. 3, S. 426. New York: Academic Press 1957.
5. BARKER, S. B., u. W. H. SUMMERSON: *J. biol. Chem.* **138**, 535 (1941).
6. SIMON, H., u. J. STEFFENS: *Chem. Ber.* **95**, 358 (1962).
7. SIMON, H., H. DANIEL u. J. F. KLEBE: *Angew. Chemie* **71**, 303 (1959).
8. MEDZIHRADESKY, F.: Stoffwechselwege der Essigsäure und Fructose in der Leberzelle. Diplomarbeit Technische Hochschule München 1961.
9. RAUSCHENBACH, P.: Isotopenversuche zum Studium der Biochemie des Fructosestoffwechsels und der Gluconeogenese in Leber. Dissertation Technische Hochschule München 1964.
10. RAUSCHENBACH, P., F. MEDZIHRADESKY u. W. LAMPRECHT: *Z. physiol. Chem.* (im Druck).

## Zur Bestimmung des Monomergehaltes in Polystyrol

Von

W. GROEBEL

Mitteilung aus dem Chemischen Landes-Untersuchungsamt Nordrhein-Westfalen in Münster

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 2. Juli 1965)

Zur Beurteilung eines Bedarfsgegenstandes aus Polystyrol ist es erforderlich, die flüchtigen Anteile des Kunststoffes quantitativ zu bestimmen, da der Gehalt dieser Anteile nach den Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes (1) auf 0,6% begrenzt ist. Im wesentlichen dürfte nicht-polymerisiertes Styrol den Anteil der flüchtigen Stoffe bestimmen und auch dafür verantwortlich sein, wenn eine unerwünschte und unzulässige geruchliche und geschmackliche Beeinträchtigung eines Lebensmittels eintritt, das in einem Polystyrolbehälter aufbewahrt wird. Die Kenntnis des Monomergehaltes ist deshalb für die Beurteilung eines Kunststoffes von Bedeutung.

Für die Bestimmung des monomeren Styrols in Polystyrol sind verschiedene Methoden vorgeschlagen worden, von denen wir bisher die spektralphotometrische von EISENBRAND (2) mit gutem Erfolg angewandt haben. Wesentlich einfacher aber