

Über das Verhalten von ^{14}C -markierten Diacetylweinsäuremono- und -diglyceriden *in vitro* und im Organismus der Ratte

Von K. LANG und B. SCHMIDT

Mit 3 Tabellen

(Eingegangen am 25. März 1970)

Die Diacetylweinsäureester von Mono- und Diglyceriden sind wegen ihrer stabilisierenden Eigenschaften in Fettemulsionen bekannt. Untersuchungen an Meerschweinchen, Ratten und Hunden haben gezeigt, daß keine akuten oder chronischen toxische Wirkungen auftreten.

Kurzzeitversuche an Hunden haben gezeigt, daß die Substanz gut vertragen wird, wenn sie per os in Mengen von 27 g/kg Körpergewicht angeboten wird⁴⁾.

Es konnten keine Organschädigungen oder eine Verkürzung der Lebensdauer konstatiert werden.

Methodik

1. Substanz und Versuchslösung. Die untersuchte Substanz, ein Gemisch von Mono- und Diglyceriden der ^{14}C -1,4,-Diacetylweinsäure (Aktieselskabet Grindstedvoerket, Grindsted/Braband, Dänemark) wurde papierchromatographisch (Whatman-Papier Nr. 1, aufsteigend, 16 Stunden in n-Propanol/ NH_3 conc. [7:3]¹⁾) untersucht. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch Messung des Radiochromatogramms mittels eines Endfensterdurchflußzählrohres (Actigraph, Nuclear Chicago) und Synchronschreibung. Die Flächen unter der geschriebenen Kurve wurden zur quantitativen Bestimmung gewogen.

20–30% der eingesetzten ^{14}C -Aktivität wandern mit dem Lösungsmittel und sammeln sich an der Lösungsmittelfront. Dieser Anteil konnte nicht identifiziert werden und wurde unberücksichtigt gelassen.

Die übrige ^{14}C -Aktivität, die sich auf Flecken mit definierten R_f -Werten verteilte, wurde gleich 100% gesetzt.

In Tab. 1 ist eine Zusammenstellung über die Verteilung der ^{14}C -Aktivität auf dem Radiochromatogramm gebracht.

Tab. 1. Verteilung der ^{14}C -Aktivität, in %, auf die chromatographisch trennbaren Fraktionen des Emulgators

Fraktion	^{14}C -Aktivität, in %
Weinsäure-Glycerid*)	85–94
Tartrat	4–11
Tartrat, acetyliert	2–4

*) Es handelt sich um zwei Substanzen, die unter den beschriebenen Bedingungen nicht auftrennbar waren.

Die oben beschriebene Substanz wurde mit reinstem Olivenöl gemischt (Emulgator: Öl = 1:2) und zur Applikation in vivo leicht angewärmt.

2. *Spaltbarkeit der Substanz.* Proben von 100 mg des ^{14}C -markierten Emulgators wurden in 10 ml wäßrigem Medium $1/2$ -24 Stunden bei 37 °C. inkubiert.

Bedingungen: 1) Hydrolyse, pH = 3 (Wasser)

2) „ „ , pH = 7,8 (Tris-Puffer)

3) „ „ „ „ („ „ „ , unter Zusatz von 30 mg Pancreon, Kalichemie AG., Hannover).

Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Proben entnommen, mit einigen Tropfen Eisessig angesäuert und, sofern erforderlich, zentrifugiert. Das Hydrolysat wurde papierchromatographisch aufgetrennt, s. Methodik 1.

3. *Tierversuche.* Männliche Ratten (Sprague Dawley) mit einem Gewicht von 170–260 g, wurden für 24 Stunden in Futterkarenz gehalten, Wasser ad libitum.

In einer Mischung mit Olivenöl wurde die Substanz (35–40 ° warm) in Mengen von 0,5 bis 0,8 g/kg Körpergewicht per os mit der Schlundsonde verabreicht. Die Tiere wurden während der angegebenen Versuchsdauer (bis zu 24 Stunden) in BOLLMANN-Käfigen gehalten. Harn und Faeces wurden getrennt aufgefangen. Die Atemluft wurde bei einer geschlossenen Versuchsanordnung in 1n NaOH absorbiert. Der Magen-Darm-Kanal wurde nach Versuchsende in toto entnommen.

4. *Aufarbeitung der organischen Materialien, Messung der Proben und Fehlerbetrachtung.* Sie erfolgten nach FINGERHUT et al.²⁾.

V Versuchsergebnisse

A. *In vitro*-Experimente zur Hydrolysebeständigkeit der Substanz

Die Stabilität im wäßrigen Medium ist vom herrschenden pH abhängig. Verfolgt man die hydrolytische Spaltung bei 37 ° in Abhängigkeit von der Zeit, so zeigt sich, daß nach 5 Stunden ein Gleichgewichtswert erreicht ist, der sich auch nach 24 Stunden nicht mehr wesentlich verändert. Die gewonnenen Ergebnisse sind aus Tab. 2 ersichtlich.

Tab. 2. Maximale Hydrolyse der Substanz, Verteilung der ^{14}C -Aktivität in %, nach Auftrennung des Hydrolysats.

Fraktion	Wasser (pH = 3)		Tris-Puffer (pH = 7,8)			
	gef.	korr.*)	gef.	korr.*)	+ Pancreon	
					gef.	korr.*)
Weinsäure-Glyceride	59–68	83	83–86	94	79–83	91
Tartrat	24–33	11	10–12	4	13–14	6
Tartrat, acetyliert	7–10	6	5	2	4–5	3

*) korr. = korrigiert, soll heißen, daß bei diesen Werten als 100% der Ausgangsaktivität die Aktivität der Weinsäureglyceridfraktion eingesetzt ist.

Die in Tab. 2 zusammengestellten Werte ergeben sich nach der Auswertung des Radiochromatogramms, d. h. es sind die nach der Hydrolyse in den chromatographisch auftrennbaren Fraktionen angetroffenen Anteile der ^{14}C -Aktivität.

Im sauren Bereich ist die Emulgator-„Säure“ am instabilsten: bei pH 3 liegen maximal 24–33% der ^{14}C -Aktivität als Tartrat vor. Berücksichtigt man, daß der native Emulgator schon 4–11% einer ^{14}C -Aktivität als Tartrat enthält, so ergibt sich

eine effektive Abspaltung von 11% der markierten Weinsäure, wenn man als 100% die ^{14}C -Aktivität der Diglyceridfraktion vor der Hydrolyse zugrunde legt.

Im leicht alkalischen Bereich (pH 7,8) liegt die Substanz in ihrer Salzform vor und ist offensichtlich stabiler. Berücksichtigt man als 100%-Wert nur die ^{14}C -Aktivität der Glyceridfraktion, so werden jetzt nur 4% in der Weinsäurefraktion gefunden. Auch ein Zusatz an Pancreon erhöht diesen Wert nur auf 6%.

Bezüglich der Spontanhydrolyse wurden schon früher Untersuchungen¹⁾ angestellt. Man erkennt, daß – unter Vernachlässigung der im nativen Emulgator vorhandenen Bruchstücke – die Abspaltung gering ist.

In vivo dürften die Verhältnisse ähnlich liegen⁶⁾ und es ist anzunehmen, daß der abgespaltene Anteil während der Magenpassage gelöst wird.

Tab. 3. Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Organismus der Ratte, in % der Dosis, nach einer Versuchsdauer von 24 Stunden.

Tier Nr.	Gabe g/kg Körpergewicht	Gefunden in % der Dosis					NR *)
		Atemluft	Harn	Carcass	Magen-Darm-Trakt	Faeces	
1	0,53		17		24	50	74
2	0,62		13	2	50	19	69
3	0,71	20	11	11			
4	0,73	0	10		72		
5	0,76		12				
6	0,81	12	8	2	89	0	89

*) NR = Nicht resorbiert, Summe aus Magen-Darm-Trakt und Faeces.

B. Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Organismus der Ratte

Tab. 3 zeigt die Verhältnisse nach 24 Stunden, wenn die in Form des Emulgators (mit Nebenbestandteilen) vorliegende ^{14}C -Aktivität per os angeboten wird.

In 24 Stunden werden nur 26–31% der ^{14}C -Aktivität, die in Form des Emulgators und seiner niedermolekularen Bruchstücke angeboten wurde, resorbiert. 12–20% werden oxydiert und erscheinen in der Atemluft. 8–13% werden via Niere ausgeschieden und nur 2% werden im Carcass retiniert.

Die Resorption scheint geringer zu sein als in früheren Arbeiten⁴⁾ berichtet wurde. Ein ähnlicher Wert, wie wir ihn gefunden haben, wurde allerdings ebenfalls berichtet³⁾. Die geringe Retention im Organismus spricht für einen ausreichenden Umsatz des resorbierten Anteils bzw. seine Ausscheidung. Außerdem ist bekannt⁶⁾, daß 10% der Weinsäure, als Glycerid angeboten, im Harn erscheinen, ein Befund, der mit den von uns gefundenen 8–13% in guter Übereinstimmung steht.

24–33% der ^{14}C -Aktivität liegen nach saurer Hydrolyse bei den in vitro-Spaltungen in der Weinsäurefraktion vor. 26–31% der per os applizierten Dosis werden vom Darm der Ratte aufgenommen. Der Vergleich dieser beiden Befunde drängt den Schluß auf, daß es lediglich die als Weinsäure vorliegende Aktivität, ist die vom Emulgator abgespalten war, die von der Ratte resorbiert wird.

Zusammenfassung

1. Die vorliegende Substanz wird in geringem Umfang, maximal zu 10–20%, im wäßrigen Medium gespalten.

2. Im Organismus der Ratte wird rd. $\frac{1}{3}$ der ^{14}C -Aktivität der Substanz resorbiert.
3. Die Ausscheidung der ^{14}C -Aktivität erfolgt zu 12–20% via Lunge, zu 8–13% via Niere, während der im Körper verbleibende Anteil nur 2% ausmacht.

Summary

1. In aqueous phosphate buffer diacetyl tartaric acid monoglyceride is hydrolyzed to glyceride and tartaric acid.
2. Orally administered ^{14}C -labeled emulsifier to rats is absorbed to 26–31% of the activity given.
3. 21–20% are oxidized to $^{14}\text{CO}_2$, 8–13% are excreted in the urine, 2% are retained in the carcass.

Literatur

1. AUSTIN, P. C. und J. R. PARK, *J. chem. Soc* **127**, 1926 (1925). — 2. FINGERHUT, M., B. SCHMIDT und K. LANG, *Biochem. Z.* **336**, 118 (1962). — 3. FINKLE, P., *J. biol. Chem.* **100**, 349 (1933). — 4. KOPPANYI, T. und V. J. DARDIN, 1950: unveröffentlicht, Bericht der Georgetown University. — 5. KRÖLLER, E., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **64**, 602 (1962). — 6. SOURKES, T. L. und T. KOPPANYI, *J. Amer. Pharmaceut. Assoc., Scient. Ed.* **39**, 275 (1950).

Anschrift der Verfasser:

Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität
6500 Mainz