

*Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)*

Über enzymatische Spaltung und Stoffwechsel von Umsetzungsprodukten des Pyrokohlensäurediäthylesters mit Bestandteilen von Lebensmitteln

VON K. LANG, M. FINGERHUT, E. KRUG, W. REIMOLD und O. PAULI

Mit 8 Tabellen

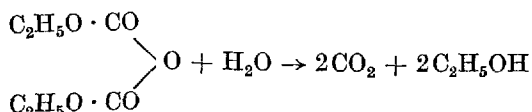
(Eingegangen am 27. Juli 1965)

Die entkeimende Wirkung des Pyrokohlensäurediäthylesters (PKE) wurde 1955 in den Laboratorien der Farbenfabriken Bayer entdeckt. Die Verbindung wirkt bereits in niedriger Konzentration abtötend auf Gärhefen und viele in Getränken vorkommende Bakterien, in höherer Konzentration auch auf Schimmelpilze. Die Wirksamkeit des Mittels ist von der Keimzahl abhängig; bei hoher Keimdichte wird eine Abtötung erst bei relativ hoher PKE-Konzentration erreicht. Daher ist die Anwendung nur bei niedriger Keimzahl sinnvoll, wobei 500 Keime/ml als Grenze gelten sollte.

PKE ist seither von vielen Autoren (1, 2, 3, 4, 11, 12) als Entkeimungsmittel für die kaltsterile Getränkeabfüllung vorgeschlagen worden. Bei geringer Keimzahl ist ein Zusatz von 30 mg/l meist schon ausreichend; in der Praxis haben sich bei Fruchtsäften, Limonaden und Wein Zusätze von 50–200 mg/l bewährt. Da PKE nur in sehr keimarmen Getränken wirksam ist, werden durch seine Anwendung gute Betriebshygiene und sorgfältiges Arbeiten nicht überflüssig.

Bei vielen Getränken kann PKE die Hitzebehandlung (Pasteurisation) ersetzen, hat aber nicht deren Nachteile, d. h. die mit PKE entkeimten Getränke sind frei von „Kochgeschmack“ und haben einen unvermindert hohen Vitamin-Gehalt. – Die Anwendung dieses Mittels ist in vielen Ländern, auch in der Bundesrepublik Deutschland, bereits zugelassen.

PKE ist eine fruchtartig riechende, in Wasser nur wenig lösliche Flüssigkeit. Löst man das Produkt in Wasser oder wässrigen Lösungen, so wird es zu Alkohol und Kohlensäure hydrolysiert:



Die Hydrolysegeschwindigkeit ist stark von der Temperatur und weniger stark vom pH-Wert der Lösung abhängig. Bei 10–20° C ist PKE in den durchweg sauer reagierenden Getränken 15–20 Stunden nach der Zugabe nicht mehr nachweisbar. Kohlensäuredrucke bis 10 at beeinflussen die Hydrolyse nicht.

Da die geringen im Getränk entstehenden Mengen an Alkohol und Kohlensäure keine konservierende Wirkung haben, ist ein mit PKE entkeimtes Getränk nach beendeter Hydrolyse wieder gärfähig, – die Wirkung des Mittels ist daher auch als „kalte Pasteurisation“ bezeichnet worden.

Die relativ schnelle Hydrolyse bedingt, daß die Anwendung des Mittels nur unmittelbar vor der Abfüllung der Getränke sinnvoll ist.

Auf Grund dieser besonderen Eigenschaften kann PKE nicht mit den üblichen im Lebensmittel verbleibenden Konservierungsstoffen wie Benzoesäure oder Sorbinsäure verglichen werden – das gilt auch für die gesundheitliche Beurteilung dieses Stoffes.

PKE ist eine reaktionsfähige Substanz, die unter geeigneten Bedingungen auch mit Aminen, Aminosäuren, Phenolen, Enolen und Alkoholen reagiert (5, 6). Es verhält sich chemisch wie ein Acylierungsmittel, z. B. wie Essigsäureanhydrid. Durch Umsetzung mit den vorgenannten Stoffen entstehen N- bzw. O-Carbäthoxy-Verbindungen, d. h. Derivate der Kohlensäure. Eine alkylierende Wirkung des PKE konnte ausgeschlossen werden. – Die mikrobizide Wirkung des PKE dürfte auf einer Umsetzung mit NH_2 - oder SH-Gruppen der Enzyme im Inneren der Hefe-Zellen beruhen.

Zur Verträglichkeit des PKE haben sich schon BORNHANN und LOESER (7) und HECHT (8) geäußert: Bei Ratten, die zwei Monate lang als einziges Getränk einen mit 50facher PKE-Dosis versetzten Traubensaft erhielten, konnten keinerlei nachteilige Befunde festgestellt werden.

Auf Grund der Reaktionsfähigkeit des PKE war anzunehmen, daß es neben der Hydrolyse auch zu Nebenreaktionen mit den Getränke-Inhaltsstoffen kommt. Für die gesundheitliche Beurteilung der Getränke-Entkeimung mittels PKE war daher eine genaue Kenntnis der PKE-Folgeprodukte, und zwar nach ihrer Art und Menge, notwendig. – Bei diesen Untersuchungen wurde als erstes Nebenprodukt Diäthylcarbonat (2) gefaßt, das bei der Behandlung alkoholischer Getränke in Mengen von 4–6 mg/l entsteht. Weitere Folgeprodukte konnten auch bei stark erhöhter PKE-Dosierung weder in natürlichen noch in Modell-Getränken nachgewiesen werden. Ihre Menge mußte daher unter der Nachweisgrenze der Dünnschicht- oder Gas-Chromatographie, d. h. unter 0,5–1 mg/l liegen. Das Reaktionsverhalten des PKE konnte daher nur mit der wesentlich empfindlicheren Tracer-Methode aufgeklärt werden.

Die im Isotopenlabor der Farbenfabriken Bayer¹⁾ mit einem ^{14}C -markierten PKE durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß die normale Hydrolyse des PKE stets die vorherrschende Reaktion ist. Von der jeweils zugesetzten Menge reagieren nur wenige Prozent mit den Getränke-Inhaltsstoffen, d. h. ein so entkeimtes Getränk enthält in 1 Liter einige mg – meist unter 10 mg – an Inhaltsstoffe gebundenes PKE. – Die Versuche mit dem ^{14}C -PKE haben ferner gezeigt, daß PKE – wenn auch unterschiedlich stark – mit allen natürlichen Aminosäuren u. Peptiden, mit Polyphenolen und Enolen und in ganz geringem Umfang auch mit den verschiedenen Zuckerarten und einigen α -Hydroxysäuren reagiert. Dabei entstehen die N- bzw. O-Carbäthoxy-Derivate der betreffenden Inhaltsstoffe.

¹⁾ Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Rahmen einer größeren Veröffentlichung ausführlich in der „Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung“ gebracht werden.

Bei der komplexen Zusammensetzung aller Getränke entfällt auf den einzelnen Inhaltsstoff nur ein geringer Anteil des durch Nebenreaktionen umgesetzten PKE. Die absolute, an die einzelnen Inhaltsstoff gebundene PKE-Menge liegt meist weit unter 1 mg/l. Damit erklärt sich auch, warum selbst mit chromatographischen Methoden außer Diäthylcarbonat bisher keine anderen PKE-Folgeprodukte gefaßt werden konnten.

Die Untersuchungen mit dem ^{14}C -PKE haben gezeigt, daß die Umsetzungen mit den Inhaltsstoffen dem Massenwirkungsgesetz folgen, d. h. die Menge an Folgeprodukten nimmt streng proportional mit der PKE-Dosis und der Konzentration der Inhaltsstoffe zu. Mit steigendem pH-Wert der Lösung nimmt auch der Anteil der Nebenreaktionen zu, so daß die Anwendung des Mittels auf saure Getränke beschränkt werden sollte.

Die Untersuchungen wurden mit einem Präparat hoher Aktivität durchgeführt, so daß Nebenreaktionen bis herab zu 0,1 ppm direkt meßbar waren. Noch geringere Umsätze sind auf Grund des Massenwirkungsgesetzes durch Umrechnung zugänglich.

Die Untersuchungen mit dem ^{14}C -PKE haben zwar die Fragen nach Art und Menge der PKE-Folgeprodukte befriedigend beantwortet; sie haben aber auch gezeigt, daß in Anbetracht der außerordentlich geringen Konzentration der Folgeprodukte und ihrer großen Zahl die sonst für die gesundheitliche Beurteilung von Lebensmittelzusätzen üblichen Untersuchungsmethoden, z. B. chronische Tierversuche, hier kaum anwendbar sind.

Pyrokohlensäurediäthylester zerfällt, wie schon erwähnt, im Wasser in CO_2 und Alkohol. In Fruchtsäften und im Wein sind jedoch Substanzen vorhanden, die ebenfalls reaktionsfähig sind, so daß in kleinerem Umfange Nebenreaktionen ablaufen, die zu der Bildung carbäthoxylierter Derivate Anlaß geben. Eine Zulassung der Verwendung von Pyrokohlensäurediäthylester zur Haltbarmachung von Getränken setzt voraus, daß diese Umsetzungsprodukte gesundheitlich unbedenklich sind. Chronische Fütterungsversuche mit dem Pyrokohlensäureester haben wenig Aussagewert, da die Substanz als solche nach kurzer Zeit in den behandelten Getränken nicht mehr vorhanden ist. Die Durchführung solcher Fütterungsversuche mit den erwähnten Umsetzungsprodukten mit der erforderlichen Überdosierung ist aber aus verschiedenen Gründen nicht möglich:

1. Infolge der geringen Konzentration der in den behandelten Fruchtsäften oder Wein enthaltenen Reaktionsprodukte lassen sich die notwendigen hohen Dosen derselben durch die Getränke nicht zuführen, da die Versuchstiere die erforderlichen Flüssigkeitsmengen nicht aufzunehmen in der Lage sind. Selbst wenn man auf eine hohe Überdosierung verzichten würde, wäre die aufzunehmende Flüssigkeitsmenge immer noch so groß, daß mit sekundären Schädigungen der Tiere, etwa durch den Alkohol oder bei sauren Fruchtsäften mit Zahnerosionen zu rechnen wäre, also mit Folgen, die nichts mit den Wirkungen der zu untersuchenden Substanzen zu tun haben.
2. Die zu untersuchenden Substanzen sind nicht in den erforderlichen Mengen darstellbar.
3. Ist die Zahl der zu untersuchenden Substanzen infolge der komplexen Zusammensetzung von Fruchtsäften und Wein viel zu groß.

In dem vorliegenden Falle mußten daher die sonst üblichen Fütterungsversuche durch biochemische Untersuchungen, insbesondere Stoffwechselversuche und enzymatische Versuche ersetzt werden, so wie es auch für solche Fälle von dem Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (9) vorgesehen ist.

Unsere Versuche erstreckten sich daher in erster Linie auf die Frage, ob die mit dem Pyrokohlensäurediäthylester gebildeten Reaktionsprodukte durch die Verdauungsenzyme gespalten werden. Denn wenn dies der Fall ist, so entstehen durch die enzymatische Hydrolyse unter Abspaltung des Carbäthoxyrestes wieder die in dem Getränk enthaltenen Ausgangssubstanzen, während die Umsetzungsprodukte gar nicht in den Organismus gelangen und keine toxikologischen Probleme aufwerfen. In der Tat konnten wir auch zeigen, daß dies für alle untersuchten repräsentativen Vertreter der Substanzgruppen, die mit dem Pyrokohlensäureester reagieren, Pflanzenphenole, Hydroxysäuren, Aminosäuren und Äthanol zutrifft. Eine Ausnahme machte lediglich das Reaktionsprodukt mit Ascorbinsäure, dessen Stoffwechsel daher näher untersucht werden mußte, vor allem im Hinblick auf eine etwaige Speicherung.

Bei der großen Zahl der mit Pyrokohlensäurediäthylester reagierenden Lebensmittelbestandteile mußten unsere Versuche auf eine Auswahl repräsentativer Umsetzungsprodukte beschränkt werden. Aus den verschiedenen Substanz-Klassen die als Bestandteile von Getränken in Frage kommen, wurden die in der Tab. 1 angeführten ausgewählt.

Tabelle 1. Die in die Untersuchung einbezogenen Substanzen

Substanz	Reaktionsprodukt mit Pyrokohlensäurediäthylester
Gallussäure	Tri-carbäthoxy-gallussäure
Chlorogensäure	Di-carbäthoxy-chlorogensäure
Catechin	Mono- und Di-carbäthoxy-catechin
Milchsäure	Carbäthoxy-milchsäure
Glycin	N-Carbäthoxy-glycin
L-Prolin	N-Carbäthoxy-L-prolin
L-Valin	N-Carbäthoxy-L-valin
L-Glutaminsäure	N-Carbäthoxy-L-glutaminsäure
L-Lysin	α - und ϵ -N-Carbäthoxy-L-lysin
Threonin	N-Carbäthoxy-threonin
Methionin	N-Carbäthoxy-methionin
Cystein	N,S-Dicarbäthoxy-cystein
Äthanol	Diäthylcarbonat
Ascorbinsäure	Mono- und Di-Carbäthoxy-ascorbinsäure

Für diese Untersuchungen wurde in den Laboratorien der Farbenfabriken Bayer eine repräsentative Auswahl von Getränke-Inhaltsstoffen mit PKE zu den betreffenden Carbäthoxy-Derivaten umgesetzt und ihre Identität durch Analyse sichergestellt. Sämtliche Derivate sind nach LORKE nur sehr wenig toxisch. Die perorale LD₅₀ war > 1 g, bei einigen Produkten sogar > 3 g/kg. Das Ascorbinsäure-Folgeprodukt erwies sich in einem subakuten Fütterungsversuch ebenfalls als sehr gut verträglich. – Diäthylcarbonat, das von

allen Folgeprodukten in der größten Absolutmenge vorliegt, wurde durch A. LÖSEER (10) in einem chronischen Tierversuch untersucht. Auch bei ganz extremer Überdosierung wurde dieser Stoff zwei Jahre lang ohne nachteiligen Befund vertragen.

Die Spaltung der carbäthoxylierten Phenole und Milchsäure sowie des Diäthylcarbonats wurde manometrisch in der Warburg-Apparatur verfolgt. Gemessen wurde der Druckanstieg durch das aus Hydrogencarbonat in Freiheit gesetzte CO_2 .

Für die Versuche zur Spaltung der Carbäthoxyderivate der Pflanzenphenole und Milchsäure dienten Pankreashomogenate, Dünndarmschleimhaut-homogenate und Leberhomogenate als Enzymquellen.

Tabelle 2. Enzymatische Spaltung von carbäthoxylierten Pflanzenphenolen
Die Zahlenangaben betreffen $\mu\text{l CO}_2$ in 2 Std. in Freiheit gesetzt. Jede Zahlenangabe ist der Mittelwert aus 2–3 Parallelbestimmungen

Substrat Addukt mit	Pankreashomogenat	Dünndarm- schleimhauthomogenat	Leberhomogenat
Catechin	98	52	120
	69	99	104
Gallussäure	110	167	204
	85	124	208
Chlorogensäure	43	42	85
	88	58	

Bei der vollständigen Spaltung der jeweils eingesetzten $5 \mu\text{Mol}$ Substrat hätten im Falle des Mono-carbäthoxy-catechins 112, im Falle der Tri-carbäthoxy-gallussäure 336, im Falle der Dicarbäthoxychlorogensäure $224 \mu\text{l CO}_2$ entstehen müssen. Die gefundenen Zahlen zeigen, daß unter den Versuchsbedingungen hohe Spaltungsraten zu verzeichnen waren. (Tab. 3).

Tabelle 3. (μMole Substrat gespalten durch jeweils 100 mg Protein in 2 Stunden

Addukt mit	Pankreashomogenat	Dünndarm- schleimhauthomogenat	Leberhomogenat
Catechin	44	13	5,4
	31	22	4,7
Gallussäure	16	13	3,1
	13	9	3,1
Chlorogensäure	9,5	4,8	1,9
	20	7,5	

Man kann daraus schließen, daß die Carbäthoxyverbindungen der Pflanzenphenole im Magen-Darm-Trakt gespalten und nicht ungespalten resorbiert werden.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei den Pflanzenphenolen wurde die Carbäthoxy-milchsäure etwas schlechter gespalten.

Auch die Spaltung des Diäthylcarbonats wurde manometrisch verfolgt. Die Ergebnisse zeigt die Tab. 4.

Tabelle 4. Enzymatische Spaltung von Diäthylcarbonat

	Nierenhomogenat	Dünndarm- schleimhauthomogenat
$\mu\text{l CO}_2/\text{Stunde je Ansatz}$	175	52
in 2 Std. wurden gespalten $\mu\text{Mole Substrat je Ansatz}$	15,6	4,6
In 2 Std. wurden gespalten $\mu\text{Mole Substrat je 100 mg Protein}$	218	83

Diäthylcarbonat wurde demnach durch Nieren und Dünndarmschleimhaut intensiv gespalten. Der Versuchsausfall zeigt, daß damit zu rechnen ist, daß per os aufgenommenes Diäthylcarbonat nicht ungespalten resorbiert wird.

Die Spaltung der Carbäthoxy-Aminosäuren wurde mittels Dünnschicht-Chromatographie (Freisetzung der Aminosäuren) verfolgt. Die Methode erlaubt halbquantitative Aussagen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt die Tab. 5.

Tabelle 5. Die enzymatische Spaltung von Carbäthoxy-Aminosäuren

Carbäthoxyderivat von	Niere	Spaltung durch Pankreas	Darmschleimhaut
Glutaminsäure	++	+	(+)
Valin	++	—	—
Cystein	—	+	—
Prolin	+	—	++
Lysin- α -	+	++	+
Threonin	(+)	++	+

Alle Carbäthoxyaminosäuren erwiesen sich als enzymatisch spaltbar.

Als Enzympräparate dienten, wie bei den Versuchen mit Diäthylcarbonat, Dialysate des Überstandes hochtourig zentrifugierter Homogenate von Rinderorganen.

Pyrokohlensäurediäthylester reagiert auch mit Ascorbinsäure unter Bildung von Mono- und Bis-carbäthoxyverbindungen. Beide Verbindungen hydrolysieren in Wasser und 0,1 n HCl leicht spontan. Das Reaktionsprodukt zeigt bei der Hydrolyse eine Halbwertszeit von 5–10 Tagen¹⁾.

Bei unseren Versuchen hat sich gezeigt, daß dieses Ascorbinsäure-Umsetzungsprodukt durch Enzyme nicht oder nur minimal gespalten wird. Außerdem störte hierbei die spontane Hydrolyse. Aus diesem Grunde wurde ein ¹⁴C-markiertes Umsetzungsprodukt der Ascorbinsäure mit Pyrokohlensäurediäthylester²⁾ auf sein Stoffwechselverhalten untersucht.

¹⁾ Untersuchungen der Farbenfabriken Bayer, Elberfeld.

²⁾ Hergestellt vom Isotopenlabor der Farbenfabriken Bayer, Elberfeld, im folgenden auch PS 76 bezeichnet.

Gesunde normal ernährte Ratten erhielten die wäßrige Lösung carbäthoxylierter Ascorbinsäure. Pro Tier wurden 7,5–12 mg/kg Körpergewicht gegeben (nur 3 Tiere erhielten zwischen 5–6 mg/kg Körpergewicht).

Die Versuche ergaben, daß die Aktivität außerordentlich rasch aus dem Organismus ausgeschieden wird, was auf einen raschen Abbau des Adduktes schließen läßt. So wurden innerhalb von 24 Stunden im Mittel 54% als $^{14}\text{CO}_2$ ausgeatmet. Zu diesem Zeitpunkt waren im Tier, jedoch ohne den Verdauungstrakt, noch 1,5% und nach 48 Stunden noch 0,5% der verabreichten Aktivität nachzuweisen. Als entsprechende Werte wurden im Blut gemessen 0,1 und 0,04% der gegebenen Aktivität. Nach 48 Stunden liegt die im Resttier verbliebene Aktivität unter 1% der Gabe.

Die in einzelnen Organen gemessenen Werte lagen unter 0,4% der Gabe, bezogen auf das Gesamtorgan. Mit dem Kot wurden nach 24 Stunden zwischen 12–34% der Aktivität ausgeschieden, mit dem Harn zwischen 4–6%.

Um eine Übersicht über den Anteil der Aktivität zu erhalten, der als $^{14}\text{CO}_2$ vom Tier veratmet wird, und die Verteilung im Resttier auf einzelne Organe zu untersuchen, wurden für 3 Versuchszeiten Bilanzversuche durchgeführt. Dazu setzten wir die Tiere in geschlossene Apparaturen, bei denen die ausgeatmete Luft durch Natronlauge geleitet wurde und nach dem Versuch das dort absorbierte $^{14}\text{CO}_2$ gemessen werden konnte. Aus früheren Versuchen war festgestellt, daß dabei keine Aktivitätsverluste auftreten. In Tab. 6 sind die

Tabelle 6

Vers.-Dauer Tier-Nr.	6 Std.		12 Std.		24 Std.			
	13	14	15	16	17	18	23	22 ⁴⁾
% veratmet	23,7	37,0	35,3	48,0	53,3	45,7	66,5	49,8
Harn	3,87	1,22	3,41	4,86	4,86	2,88	10,7 ³⁾	21,9 ³⁾
Kot	47,3	0,15	58,3	26,7	34,2	29,1 ¹⁾	17,9	21,6
Verdauungs- trakt	23,2	57,3	1,89	16,7	1,0	10,5	1,0	0,42
Leber	0,23	0,33	0,17	0,28	0,14	0,18		
Blut	0,16	0,37	0,14	0,22	0,12	0,15	0,18	0,09
Lunge	0,015	0,04	0,01	0,02	0,01	0,018		
Niere	0,03	0,06	0,02	0,05	0,015	0,037		
Resttier	1,74	2,36	1,74	1,94	1,52	1,10		
Summe im Tierkörper	2,18	3,16	2,08	2,51	1,80	1,49	1,35	1,27
Bilanz in %	100,3	98,8	101,0	98,8	95,2 ²⁾	89,7 ²⁾	97,5	95,0

¹⁾ Darin sind 1,65% am Fell klebender Aktivität enthalten (Fell mit Kot verschmiert, wurde abgezogen und getrennt aufgearbeitet).

²⁾ Die Stoffwechselrohre waren mit Kot verschmiert. Der Kot war verkrustet und nicht zu sammeln. Wegen der hohen Aktivität des Kotes können dadurch 5–10% Aktivitätsverlust eingetreten sein.

³⁾ Mit Kot verunreinigt.

⁴⁾ Tier 22 wurde 16 Stunden vor Versuchsbeginn ohne Nahrung gehalten, Wasseraufnahme ad libitum.

gefundenen ^{14}C -Aktivitäten in Prozent der Gabe für die Versuchszeiten zusammengestellt. Die Tiere erhielten 8,1–10 mg carbäthoxylierter Ascorbinsäure- ^{14}C pro kg Körpergewicht.

Da bei den vorangegangenen Versuchen die einwandfreie Trennung von Kot und Harn nicht möglich war, fixierten wir 3 Tiere für 24 Stunden so, daß wir den Harn über einem Trichter auffangen konnten, ohne daß er mit Kot in Berührung kam. Harn und Kot wurden wie vorher beschrieben getrennt nach Veraschung gemessen. Es ergaben sich die in der Tab. 7 wiedergegebenen Werte.

Tabelle 7. In Harn und Kot innerhalb 24 Stunden ausgeschiedene Aktivität in Prozent der Gabe
Verabreicht wurden 5,0–5,7 mg der carbäthoxylierten Ascorbinsäure

Versuch-Nr.	Kot	Harn
19	22,6	4,87
20	22,5	3,90
21	12,3	6,01

Diskussion der Ergebnisse

Die vorstehenden Versuche haben gezeigt, daß die untersuchten Substanzen durch Enzyme, insbesondere durch die Enzyme des Verdauungstraktes, ergiebig aufgespalten werden. Daraus folgt, daß die Umsetzungsprodukte mit Pyrokohlensäurediäthylester nicht oder nicht in nennenswerten Mengen resorbiert werden können. Durch die enzymatische Spaltung dieser Umsetzungsprodukte werden außer CO_2 die physiologischen Grundsubstanzen dieser Verbindungen, d. h. die Polyphenole, Milchsäure, Alkohol und Aminosäuren wieder in Freiheit gesetzt.

Das Ascorbinsäure-Umsetzungsprodukt nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als bei ihm keine nennenswerte enzymatische Spaltung festgestellt wurde. Stoffwechselversuche mit einem ^{14}C -markierten Ascorbinsäure-Pyrokohlensäurediäthylester-Addukt haben aber gezeigt, daß diese Substanz relativ schlecht resorbiert wird. Im Kot werden nach 24 Stunden 20–30% der Aktivität ausgeschieden, was einer Resorption von 70–80% entsprechen würde. Hierbei ist aber nicht berücksichtigt, daß nebenher, auch im Kot, die spontane Zersetzung der Substanz verläuft, so daß die *wahre* Resorption bedeutend niedriger liegt. Die Spontanhydrolyse des labilen Ascorbinsäure-Adduktes liefert neben Ascorbinsäure nur normale Stoffwechselprodukte des Vitamin C, nämlich Dehydroascorbinsäure, Diketogulonsäure und Furfurol.

Von der gegebenen Aktivität fanden sich nach 24 Stunden im Tier nur noch 0,5–2,0%. Damit ist sichergestellt, daß es nicht zu einer Speicherung der Verbindung im Organismus kommt; erfahrungsgemäß findet man bei ähnlichen Stoffwechselversuchen stets, daß 1–2% der Aktivität durch Carboxylierung und andere Reaktion in Fette, Kohlehydrate und andere Verbindungen eingebaut werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Umsetzungsprodukte des Pyrokohlensäurediäthylesters keine toxikologischen Probleme aufwerfen. Gegen die Verwendung des Pyrokohlensäurediäthylesters für die Getränkeentkeimung können daher

keine medizinischen Einwände vorgebracht werden. Hierbei ist noch zu berücksichtigen, daß die Untersuchungen mit weit höheren Konzentrationen als in der Praxis üblich durchgeführt wurden. Einige Beispiele mögen zeigen, über welche hohe Reserveleistung der menschliche Stoffwechsel bei der Spaltung der Pyrokohlensäurediäthylester-Umsetzungsprodukte verfügt:

Als Tagesverzehr wurde 1 Liter der nachstehenden Getränke angenommen:

Rotwein mit 10% Alkohol und 0,2% Catechinderivaten;

behandelt mit 100 ppm Pyrokohlensäurediäthylester

Apfelsaft mit 0,15% Chlorogensäure;

behandelt mit 200 ppm Pyrokohlensäurediäthylester

Orangensaft mit 0,05% Ascorbinsäure;

behandelt mit 200 ppm Pyrokohlensäurediäthylester

Für die Übersetzung der Ergebnisse unserer Enzym-Versuche auf den menschlichen Organismus wurden folgende Organgewichte angenommen:

Tabelle 8

Pankreas	100 g mit 10% Proteingehalt
Dünndarmschleimhaut	100 g mit 10% „
Nieren	350 g mit 12% „

Pyrokohlensäure- diäthylester- Addukte und deren Menge/Liter	Spaltungsvermögen der menschl. Organe in μMol							
	Wein/Saft		Pankreas		Dünndarm		Niere	
	mg	μMol	1	24 Std.	1	24 Std.	1	24 Std.
Wein:								
Diäthylcarbonat	6	51	—	—	4150	100000	46000	1,1 Mio
Catechin	1,15	3,0	1900	44000	900	22000	—	—
Apfelsaft:								
Chlorogensr.	2,05	4,1	750	18000	310	7400	—	—

Bei den Tierversuchen mit dem markierten Ascorbinsäure-Umsetzungsprodukt wurde eine Gabe von 10 mg/kg in wenigen Stunden abgebaut. Die Aktivität im Resttier von 3–4% sofort nach der Gabe sank in 12 Stunden auf weniger als 1% ab. – Der oben erwähnte Orangensaft enthält nach Zusatz des Pyrokohlensäurediäthylesters 7 mg des Ascorbinsäure-Adduktes; auf den Menschen bezogen, entspricht das 0,1 mg/kg – das ist eine

100fach geringere Menge als bei unseren Versuchen mit dem markierten Ascorbinsäure-Addukt.

Das Abbauvermögen des Organismus liegt demnach stets um einige Zehnerpotenzen über den tatsächlichen Gegebenheiten.

Zusammenfassung

Die Umsatzprodukte von Pflanzenphenolen, Hydroxysäuren, Aminosäuren und Äthanol mit Pyrokohlensäurediäthylester werden von den Verdauungsenzymen so rasch und so ergiebig gespalten, daß mit einer Resorption derselben nicht zu rechnen ist.

Die Umsatzprodukte mit Ascorbinsäure (Mono- und Dicarbäthoxyascorbinsäure) werden durch die Verdauungsenzyme nicht gespalten. Untersuchungen mit den mit ^{14}C markierten Carbäthoxyverbindungen der Ascorbinsäure ergaben:

1. Beide Verbindungen werden in wäßriger Lösung spontan mit einer Halbwertszeit von 5–10 Tagen hydrolysiert.
2. Die Resorption der Verbindungen ist schlecht.
3. Die Verbindungen werden im Körper nicht gespeichert sondern abgebaut. Nach 24 Stunden finden sich im Organismus nur 0,5–2% der verabreichten Aktivität.

Die Verwendung von Pyrokohlensäurediäthylester zur Behandlung von Fruchtsäften und Wein wirkt daher keine toxikologischen Probleme auf und ist von der gesundheitlichen Seite aus betrachtet duldbar.

Eine ausführliche Publikation der erhaltenen Befunde wird in der Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung erfolgen.

Literatur

1. HENNIG, K., Dtsch. Lebensmittel Rdsch. **55**, 297 (1959). — 2. KIELHÖFER, E., Weinberg u. Keller **9**, 271 (1962). — 3. WUCHERFFENNIG, K., Mineralwasserzeitung **16**, 954 (1963). — 4. MEHLITZ, A. und I. TROMMER, Die industr. Obst- und Gemüseverwertg. **15**, 434–437 (1962). — 5. BOEHM, TH. und D. MEHTA, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1797 (1938). — 6. THOMA, W. und H. RINKE, Justus Liebigs Ann. Chem. **624**, 30 (1959). — 7. BORNHANN, G. und A. LOESER, Archiv für Toxikologie **19**, 69 (1961). — 8. HECHT, G., Z. f. Lebensmittel-Unters. **114**, 292 (1961). — 9. Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser. 144 (Geneva 1958). — 10. Persönliche Mitteilung. — HAWLEY, H. B., Internat. Food Industries Congress, Foos Manufacture 1964. — 12. GENTH, H., Mineralwasserzeitung **18**, 293 (1965).

*Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz*

Zur Frage der Resorption von Polyphosphaten

Von M. FINGERHUT, F. RUF und K. LANG

Mit 5 Abbildungen und 6 Tabellen

(Eingegangen am 13. Oktober 1965)

Seit vielen Jahrzehnten werden die als Polyphosphate bezeichneten linear kondensierten Phosphate mit einem Kondensationsgrad von 2 und höher als Zusatz bei der Herstellung und Zubereitung von Lebensmitteln verwendet, z. B. im Backpulver (Säureträger), bei der Herstellung von Schmelzkäse (Schmelzsalze) und bestimmten Fleischerzeugnissen (ATP-Ersatz bei Kaltfleisch) sowie bei der Trinkwasseraufbereitung (Phosphat-Impfverfahren). Durch umfangreiche, wie kaum für einen anderen Lebensmittelzusatzstoff durchgeführte Toxizitätsstudien (HAHN, LANG) an mehreren Arten von Säugetieren, auch Nichtnagetieren, in Konzentrationen, die jene in den Lebensmitteln stark überschreiten und die bei den Tierversuchen sowohl die ganze Lebensdauer als auch mehrere Generationen umfaßten, wurde festgestellt, daß sich die Polyphosphate bei oraler Zufuhr toxikologisch weder untereinander noch qualitativ und quantitativ von der Wirkung von Monophosphat (= Orthophosphat) unterscheiden und daher auf jeder Konzentrationsstufe ein gleiches Bild zeigen (HAHN).

Dieses Ergebnis ist durch die sowohl chemisch (THILO) als auch enzymatisch (MATTENHEIMER) belegte Aufspaltung der Polyphosphate in Monophosphat