

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. BORNMANN, 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 (Schmelzsätze) 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

(= Orthophosphat) zu deuten, d. h. es muß angenommen werden, daß die Lebensmitteln zugesetzten Polyphosphate in Abhängigkeit vom Kondensationsgrad im Magen-Darm-Trakt partiell oder vollständig in Monophosphat rückgewandelt und als solches in gleichem Ausmaß wie primär als Monophosphat zugesetztes Phosphat resorbiert werden (HAHN, LANG).

Diese Rückwandlung der per os aufgenommenen Polyphosphate läßt sich nicht nur indirekt erschließen, sondern konnte in direkt darauf gerichteten Versuchen bereits bewiesen werden (VAN GENDEREN et al., GOSSELIN, SCHREIER und NÖLLER, LANG u. Mitarb.). Die Untersuchungsergebnisse waren insofern einheitlich, als festgestellt wurde, daß lediglich Monophosphat und daneben möglicherweise kleinere Mengen Diphosphat (= Pyrophosphat) bzw. Oligophosphate (das sind die papierchromatographisch trennbaren Einzelglieder der polymerhomologen Reihe der Polyphosphate mit einem Kondensationsgrad $n \leq 12$) resorbiert werden.

Im Gegensatz hierzu hat EICHHOLTZ, gestützt auf Versuche seines Mitarbeiters RIVERSON, über perorale kardiale toxische Polyphosphatwirkungen berichtet, die vom Di- über Triphosphat zum Grahamschen Natriumpolyphosphat ansteigen sollen und bei letzterem schon bei 6,25 mg/kg nachweisbar seien. Monophosphat wurde nicht untersucht. Nach diesen Untersuchungen soll das Blut einmalig mit Polyphosphaten gefütterter Ratten nach Übertragung auf das Herz-Lungen-Präparat (HLP) des Meerschweinchens zur Herzlähmung führen. Die sorgfältige methodisch gleiche Nachprüfung dieser Befunde durch HAHN hat jedoch ergeben, daß diese auf einem experimentellen Irrtum beruhen insofern, als die primär toxische Wirkung des Rattenblutes für das Herz-Lungen-Präparat des Meerschweinchens nicht berücksichtigt wurde. Wird dies jedoch getan, so findet sich nach HAHN kein Unterschied in der Wirkung von normalem Rattenblut und dem polyphosphatgefütterter Ratten.

Diese Frage abschließend zu klären war auch im Hinblick auf die Arbeiten von FLEISCH u. Mitarb. von besonderem Interesse. Von diesen wurde nämlich gezeigt, daß Diphosphat oder Polyphosphat die Eigenschaft besitzt, in kleinster Konzentration die Calciumphosphatausfällung *in vitro* zu hemmen (FLEISCH und NEUMAN) und einer durch Vitamin D erzeugten Aortenverkalkung bei Ratten vorzubeugen (FLEISCH et al.). Da Diphosphat von diesen Autoren auch im Blut nachgewiesen wurde, nehmen sie an, daß diese Verbindung eine regulatorische Rolle beim Verkalkungsprozeß spielt (FLEISCH). Der Zusatz von Polyphosphaten zu Lebensmitteln sollte daher im Lichte dieser Resultate neu erwogen werden (FLEISCH). FLEISCH konnte jedoch durch Verfütterung von Diphosphat keine Erhöhung der Diphosphatkonzentration im Harn bewirken. Dies war nur durch Verabfolgung sehr hoher Dosen Monophosphat (= Orthophosphat) möglich (FLEISCH, BISAZ und CARE). Dies weist darauf hin, daß das im Blut und Harn befindliche Diphosphat nicht exogener Herkunft sein kann, sondern erst im intermediären Stoffwechsel gebildet wird.

Durch kombinierte Anwendung derzeit optimaler Methoden zur Kontrolle des Ablaufes von Stoffwechselvorgängen, nämlich Indikatorenmethode und Papierchromatographie¹⁾, versuchten wir die Frage zu klären, ob oral applizierte Polyphosphate als solche überhaupt resorbiert werden.

¹⁾ Fräulein H. LEONARDY sei auch an dieser Stelle für ihre zuverlässige, sorgfältige und experimentell geschickte Mitarbeit gedankt.

Methodik

Für die Versuche wurden drei mit ^{32}P markierte Polyphosphate verwendet:

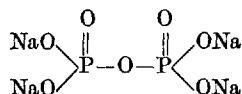
1. Tetranatriumdiphosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), im folgenden Diphosphat genannt.
2. Pentanatriumtriphosphat ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), im folgenden Triphosphat genannt.
3. Natriumpolyphosphat (64,0% P_2O_5), im folgenden Polyphosphat 64 genannt.

Die Prüfung dieser markierten Polyphosphate auf Identität und Reinheit erfolgte durch Papierchromatographie (GRUNZE und THILO) mit einem von uns etwas veränderten Lösungsmittel in Verbindung mit ergänzenden quantitativen Bestimmungen (ZIMMERMANN). Für die Versuchssubstanzen ergaben sich folgende Werte:

1. Diphosphat

	pH	$\sim 9,4$
	P_2O_5 -Gehalt	51,8%
daraus	Tetranatriumdiphosphat:	97,0%
	Wassergehalt:	0,3%
	NaCl -Gehalt:	2,5%

Da auf dem Papierchromatogramm nur ein Fleck mit einem Rf -Wert von 0,54 identifiziert werden konnte, handelte es sich bei dieser Substanz um reines Tetranatriumdiphosphat



das aus der Herstellung einen technisch unvermeidbaren Gehalt an Kochsalz enthielt.

2. Triphosphat

	pH	$\sim 9,0$
	P_2O_5 -Gehalt:	44,6%
	Wassergehalt:	22,7%
	NaCl -Gehalt:	0

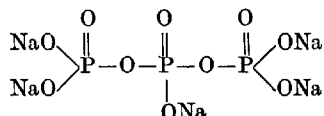
Auf dem Papierchromatogramm konnten quantitativ folgende Phosphate identifiziert werden:

Monophosphat:	($\text{Rf}:0,72$) :	2,19%
Diphosphat:	($\text{Rf}:0,54$) :	9,48%
Triphosphat:	($\text{Rf}:0,44$) :	66,01%
Wasserfreie Substanz:		77,68%

Da es sich nach Angaben der Herstellerfirma¹⁾ um das Hexahydrat handelte, entspricht dies einem Gehalt an $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ von 100,6%, so daß hier reines Pentanatrium-

¹⁾ Radiochemische Abteilung der Farbwerke Hoechst, Hoechst am Main.

triphosphat



vorlag.

3. Polyphosphat 64 $[(\text{NaPO}_3)_n \cdot \text{H}_2\text{O}]$

P _n H	~ 5,7
P ₂ O ₅ -Gehalt:	64,0%
Wassergehalt:	1,6%
NaCl-Gehalt:	0

Die papierchromatographische Identifizierung ergab 80,7% am Startpunkt verbleibender höhermolekularer ($n > 12$) Polyphosphate und 17,1% Oligophosphate einschließlich des technisch unvermeidbaren Gehalts an Cyclophosphaten (Metaphosphaten). Der Gesamt-Polyphosphatgehalt betrug somit 97,8%.

Von der Herstellerfirma wurden uns für die genannten Polyphosphate folgende ^{32}P -Aktivitäten für den 24. 8. 1964 angegeben:

Diphosphat	(5 g)	1125 μC (= 225 $\mu\text{C}/\text{Gramm}$),
Triphosphat	(5 g)	750 μC (= 150 $\mu\text{C}/\text{Gramm}$),
Polyphosphat 64	(5 g)	950 μC (= 190 $\mu\text{C}/\text{Gramm}$).

Im Actigraph II erfolgte für die verwendeten Meßbereiche eine Relativ Eichung:

Tabelle 1.
Eichung: Dämpfung 40 sec, Vorschub 6 inch/h, Spaltbreite $\frac{1}{4}$ inch

Substanz	Meßbereich (I/min)	Gewicht*) ($\mu\text{g}/\text{pC } ^{32}\text{P}$)
Diphosphat	300	109
	500	60,1
Triphosphat	300	97,3
	500	55,1
Polyphosphat 64	300	106
	500	63,1

*) Gewicht der vom Actigraph in Abhängigkeit von der ^{32}P -Aktivität der einzelnen Phosphate umschriebenen, durch Ausschneiden integrierten und ausgewogenen Papierflächen.

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt stets gegen die entsprechende Versuchssubstanz als Eichwert unter Berücksichtigung der jeweiligen Zerfallsrate (HWZ = 14,3 d).

Durchführung der Tierversuche

Zur Applikation der Versuchssubstanzen wurden folgende Lösungen hergestellt:

- a) 3,7437 g Diphosphat ad 100 ml aqua demineralisata
- b) 4,4699 g Triphosphat ad 100 ml aqua demineralisata
- c) 2,8740 g Polyphosphat 64 ad 100 ml aqua demineralisata

Für die Versuche wurden gesunde männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 150–190 g verwendet. Vor der Applikation der Polyphosphatlösungen wurden die Tiere 16 Stunden ohne Nahrung gehalten, Wasser jedoch ad libitum gegeben. Den Tieren wurden jeweils 5 ml Polyphosphatlösung mit der Schlundsonde appliziert¹⁾. Die dabei verabreichten Mengen der einzelnen Versuchssubstanzen wurden durch Auswägen der gegebenen ml Polyphosphatlösung ermittelt. Für die Versuchsdauer (bis 16 Stunden) hielten wir die Tiere in Normalkäfigen.

Die Zahl der Versuchstiere betrug insgesamt 31 Ratten, wovon jeweils 2 für die einzelnen Verweildauern und damit stets 10 für das jeweilige Polyphosphat zur Untersuchung dienten. Eine Ratte war Kontrolle.

Zur Identifizierung der Art und Menge des zur Resorption gelangten Phosphats in Abhängigkeit von der 1, 2, 4, 8 und 16 Stunden betragenden Verweildauer im Magen-Darm-Trakt, wurden die Ratten nach den angegebenen Versuchszeiten mit Diäthyläther narkotisiert, decapitiert, um so das zur Untersuchung erforderliche Frischblut (= 6–10 g/Tier) zu erhalten.

Von diesem Frischblut wurden zur Bestimmung der Gesamt-³²P-Aktivität im Blut als Funktion der Zeit und der Art des jeweils verabreichten Polyphosphats ca. 5–7 Tropfen Blut in 0,5 ml mit Heparin versetztem aqua demineralisata aufgefangen, die Menge durch Differenzwägung ermittelt und zwischen 50–280 mg dieses Haemolysats sofort auf Filterpapier (S & S 2040 b) zur Direktmessung (Doppelbestimmung) im Actigraph II aufgetragen.

Zur Identifizierung des im Blut vorhandenen Phosphats und der daran gebundenen ³²P-Aktivität wurde der größte Teil des Frischblutes in 50 ml Zentrifugengläser mit 7,5 ml einer 40%igen Trichloressigsäure-Lösung (TCE) bei Zimmertemperatur (20°) enteiweißt und nach 15 min bei 4200 U/min 12 min lang zentrifugiert. Die TCE wurde durch dreimaliges Ausäthern (mit je 10 ml) entfernt und 0,04 ml dieses enteiweißten Vollblutes entweder sofort auf das Chromatogramm aufgetragen oder nach vorheriger Neutralisation mit einigen Tropfen NaOH bis zum Auftragen (max. 6 Stunden) im Kühlschrank bei +5° C aufbewahrt, wodurch eine nachträgliche Hydrolyse der Polyphosphate ausgeschaltet wurde (Rux).

Nach der Entwicklung der phosphorhaltigen Stellen der Chromatogramme durch Bildung des Molybdophosphatkomplexes und anschließende Reduktion mittels UV-Licht zum „Phosphormolybdänblau“ wurden die Chromatogramme in 35 mm breite Streifen geschnitten, der Anfang eines jeden Chromatogramms mit ⁹⁰Sr-markierter Tusche gekennzeichnet und die Streifen (mit Tesafilm) aneinandergeklebt. Das so erhaltene Papierband wurde zur Ausmessung der in den Chromatogrammstellen vorhandenen Aktivität des säurelöslichen ³²P in der Actigraph-II-Meßapparatur (Nuclear Chicago) gemessen. Die über ein Ratemeter ermittelte Aktivität (I/min) wurde dabei kontinuierlich auf einem Schreiber aufgezeichnet. Die von den so erhaltenen Kurven umschriebene Papierfläche wurde – wie bei der Eichung – unterhalb der Peaks ausgeschnitten und dieses Flächengewicht zur Bestimmung der Aktivität herangezogen.

Ergebnisse

A. Gesamt-³²P-Aktivität im Blut als Funktion der Verweildauer im Magen-Darm-Trakt

In den folgenden Tabellen sind die aus den Direktmessungen des hämolyisierten Blutes erhaltenen ³²P-Aktivitäten nach Gabe der drei Polyphosphate in Abhängigkeit von der Verweildauer im Magen-Darm-Trakt zusammengestellt.

¹⁾ Den Herren Professor Dr. BÄSSLER, Dr. CZOK und Dr. HARTH danken wir für ihre Mithilfe.

Zur Umrechnung auf die im Gesamtblut vorhandene Aktivität diene die Relation, wonach die Gesamtblutmenge $\frac{1}{13}$ des Körpergewichts der Ratte beträgt.

Tabelle 2.

Tier Nr.	Vers.- Dauer (Std.)	Körpergew. (g)	Subst. (g)	Gabe μC	³² P vorh. im Ges. Blut μC	Prozent d. Gabe	Mittel- wert	³² P/g Blut (nC)
1. Nach Gabe von Diphosphat								
13	1	172	0,177	19,1	0,26	1,36	1,1	19,3
14	1	155	0,183	19,8	0,17	0,86		14,6
11	2	171	0,183	19,8	0,49	2,47	2,1	37,4
12	2	175	0,188	20,3	0,37	1,82		27,7
9	4	156	0,178	19,2	0,36	1,88	1,6	30,0
10	4	145	0,179	19,3	0,25	1,30		21,8
27	8	175	0,180	13,9	0,16	1,15	1,4	11,5
28	8	166	0,176	13,6	0,22	1,62		16,8
33	16	166	0,183	14,1	0,30	2,13	1,8	23,1
34	16	153	0,188	14,5	0,20	1,39		17,1
2. Nach Gabe von Triphosphat								
19	1	179	0,214	14,8	0,12	0,81	0,84	8,9
20	1	170	0,217	15,0	0,13	0,87		9,9
17	2	160	0,207	14,3	0,15	1,05	0,92	11,9
18	2	169	0,222	15,3	0,12	0,78		9,1
15	4	190	0,216	14,9	0,19	1,28	1,37	13,3
16	4	145	0,220	15,2	0,22	1,45		19,7
29	8	150	0,208	10,8	0,14	1,30	1,33	12,2
30	8	168	0,212	11,0	0,15	1,36		11,9
35	16	176	0,218	11,3	0,16	1,42	1,36	12,0
36	16	148	0,223	11,6	0,15	1,29		12,9
3. Nach Gabe von Polyphosphat 64								
25	1	143	0,141	11,7	0,008	0,07	0,075	0,7
26	1	158	0,141	11,7	0,009	0,08		0,7
23	2	187	0,139	11,5	0,010	0,09	0,10	0,7
24	2	150	0,143	11,9	0,013	0,11		1,1
21	4	197	0,138	11,5	0,012	0,10	0,11	0,8
22	4	187	0,139	11,5	0,014	0,12		1,0
31	8	157	0,147	12,2	0,024	0,20	0,16	2,0
32	8	170	0,138	11,5	0,014	0,12		1,1
37	16	168	0,143	11,9	0,021	0,18	0,32	1,6
38	16	153	0,144	12,0	0,051	0,43		4,3

B. Radiometrische Auswertung der Chromatogramme

Die Entwicklung der phosphorhaltigen Stellen des Chromatogramms ergab bei allen Versuchen nur zwei Flecken, deren radiometrische Auswertung in folgenden Abbildungen zusammengestellt ist:

Abb. 2. Pentanatriumtriphosphat ^{32}P -markiert →

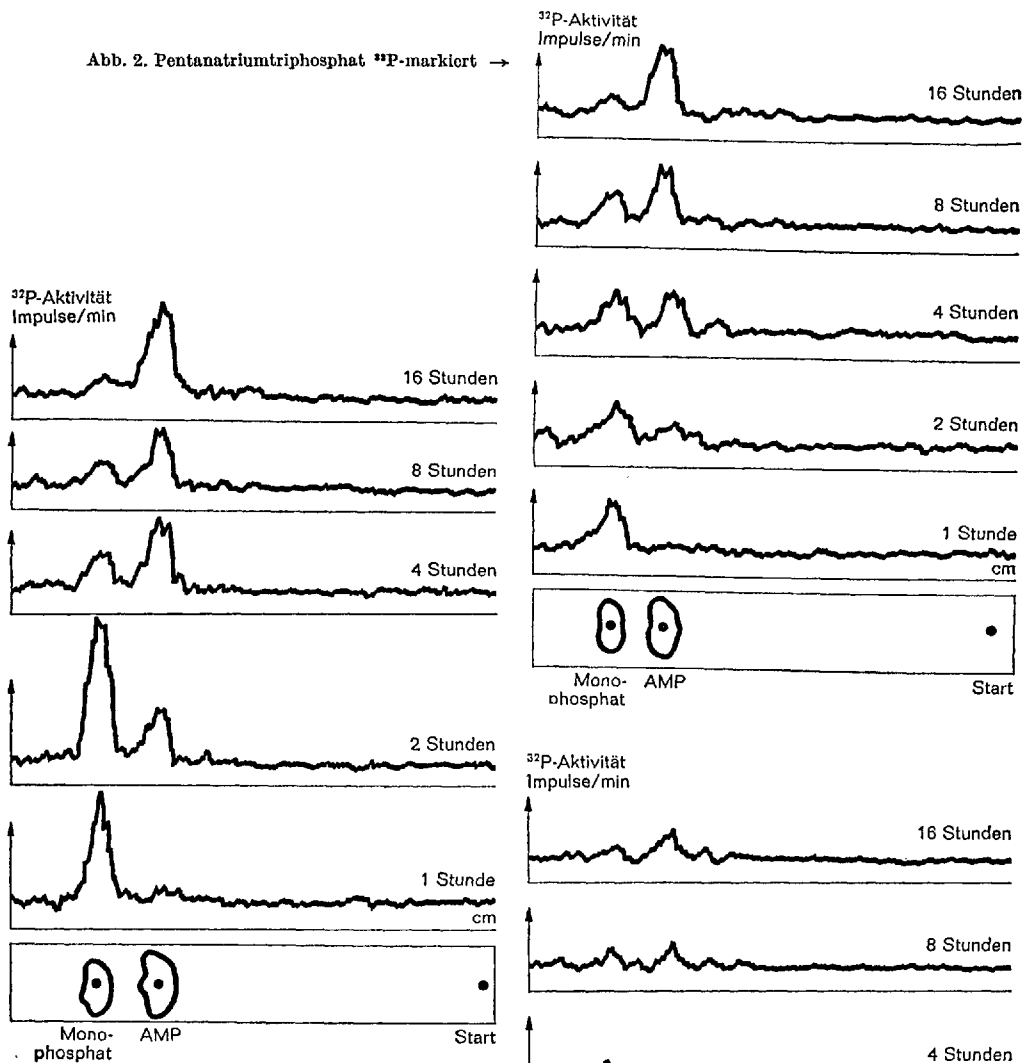
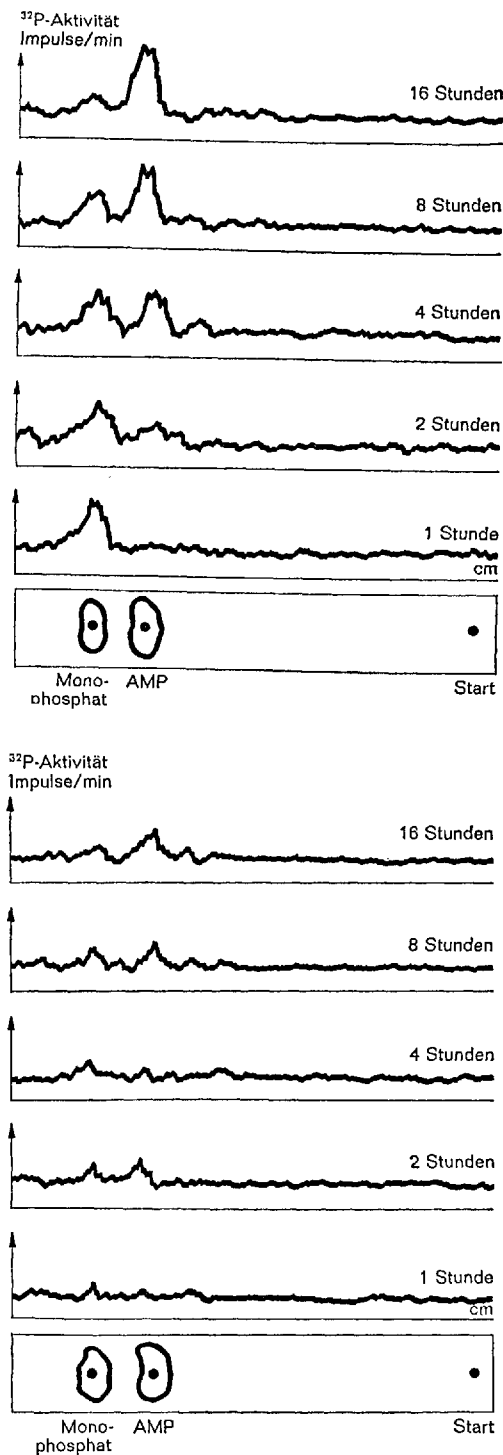


Abb. 1. Tetranatriumdiphosphat ^{32}P -markiert

Abb. 3. Natriumpolyphosphat ^{32}P -markiert →



Die prozentuale Auswertung der Aktivität ist aus der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3.

t (Std.)	Fleck 1 (pC)	Prozent	Fleck 2 (pC)	Prozent	Fleck 1 + 2 (= 100%) (pC)
<i>1. Nach Gabe von Diphosphat</i>					
1	141	79,8	35,6	20,2	176,6
1	147	86,9	22,2	13,1	169,2
2	141	72,0	54,9	28,0	195,9
2	243	87,8	33,7	12,2	276,7
4	64,5	35,5	117	64,5	181,5
4	74,1	44,0	94,4	56,0	168,5
8	48,2	33,1	97,2	66,9	145,4
8	45,3	25,1	135	74,9	180,3
16	113	42,3	154	57,7	267,0
16	31,8	16,2	164	83,8	195,8
<i>2. Nach Gabe von Triphosphat</i>					
1	87,5	83,6	17,2	16,4	104,7
1	85,3	79,0	22,7	21,0	108,0
2	82,0	72,4	31,3	27,6	113,3
2	77,7	80,9	18,4	19,1	96,1
4	71,2	45,8	84,2	54,2	155,4
4	78,8	40,9	114	59,1	192,8
8	55,0	34,2	106	65,8	161,0
8	51,8	33,9	101	66,1	152,8
16	27,0	17,2	130	82,8	157,0
16	28,0	16,4	143	83,6	171,0
<i>3. Nach Gabe von Polyphosphat 64</i>					
1	×		×		×
1	×		×		×
2	×		×		×
2	13,3	36,2	23,4	63,8	36,7
4	34,7	100,0	×		34,7
4	18,4	100,0	×		18,4
8	14,5	100,0	×		14,5
8	18,7	47,3	20,8	52,7	39,5
16	8,7	23,5	27,0	76,5	35,3
16	19,7	29,2	47,7	70,8	67,4

× = nicht auswertbar, da ^{32}P -Aktivität innerhalb der Schwankungsbreite des Null-effektes.

Infolge der geringen ^{32}P -Aktivität der beiden Flecken nach Gabe von Polyphosphat 64 sind die hierfür angegebenen Werte mit einem entsprechend großen Fehler behaftet, weshalb die aus 1. und 2. ableitbare und aus den folgenden Abbildungen ersichtliche Systematik einer von der Verweildauer im Magen-Darm-Trakt abhängigen Verschiebung der Aktivität von Fleck 1 nach Fleck 2 nicht einwandfrei reproduzierbar ist.

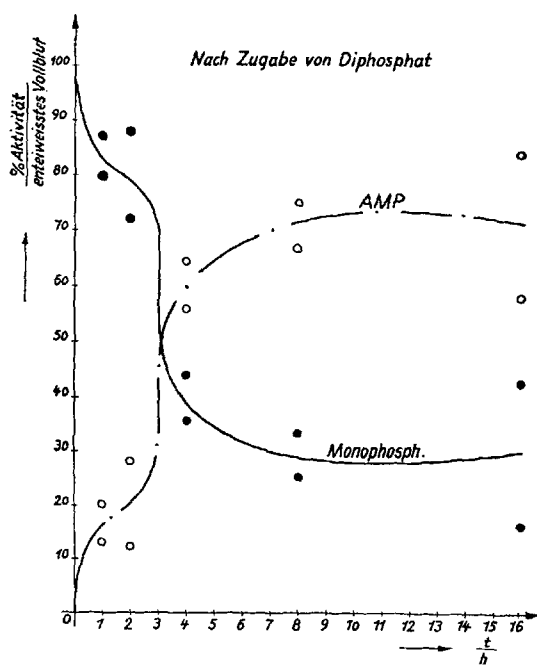


Abb. 4. Nach Zugabe von Diphosphat

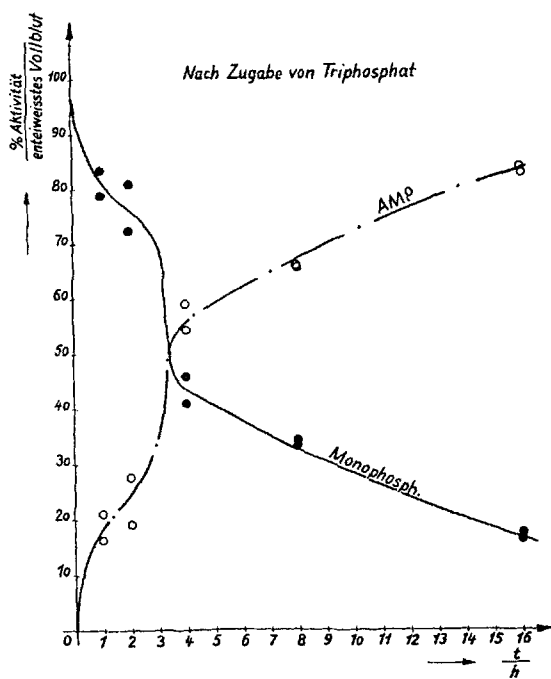


Abb. 5. Nach Zugabe von Triphosphat

Durch die von uns angewandte Arbeitsweise erfaßten wir bis zu 8 pC pro Fleck, was etwa $6 \times 10^{-5} \%$ der verabfolgten ^{32}P -Gabe entsprach.

C. Identifizierung der Phosphatflecken

Die Identifizierung der auf den Chromatogrammen ausschließlich festgestellten zwei Flecken erfolgte zunächst durch Bestimmung der Rf-Werte und Positionskonstanten, nachdem vorher durch entsprechende qualitative Reaktionen das Vorliegen phosphathaltiger Verbindungen nachgeprüft war.

Tabelle 4.

Tier Nr.	Verweildauer (Std.)	Fleck 1		Fleck 2	
		Rf	Pk	Rf	Pk
1. Nach Gabe von Diphosphat					
13	1	0,72	100	0,61	84,7
14	1	0,73	100	0,61	83,5
11	2	0,71	100	0,59	83,1
12	2	0,71	100	0,60	84,5
9	4	0,71	100	0,59	83,1
10	4	0,72	100	0,61	84,7
27	8	0,74	100	0,63	85,1
28	8	0,75	100	0,63	84,0
33	16	0,74	100	0,63	85,1
34	16	0,74	100	0,63	85,1
Mittelwerte:		0,73	100	0,61	84,3
2. Nach Gabe von Triphosphat					
19	1	0,72	100	0,60	83,3
20	1	0,71	100	0,58	81,7
17	2	0,71	100	0,62	87,3
18	2	0,72	100	0,60	83,3
15	4	0,71	100	0,58	81,7
16	4	0,72	100	0,60	83,3
29	8	0,75	100	0,67	89,3
30	8	0,76	100	0,66	86,8
35	16	0,75	100	0,64	85,3
36	16	0,75	100	0,65	86,7
Mittelwerte:		0,73	100	0,62	84,9
3. Nach Gabe von Polyphosphat 64					
25	1	0,72	100	0,61	84,7
26	1	0,75	100	0,63	84,0
23	2	0,72	100	0,61	84,7
24	2	0,72	100	0,61	84,7
21	4	0,71	100	0,58	81,7
22	4	0,72	100	0,62	86,1
31	8	0,75	100	0,64	85,3
32	8	0,75	100	0,64	85,3
37	16	0,74	100	0,62	83,8
38	16	0,75	100	0,63	84,0
Mittelwerte:		0,73	100	0,62	84,4

Der in diesen Versuchen für Fleck 1 ermittelte Rf-Wert war mit dem für Monophosphat praktisch gleich. Es lag daher die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um reines anorganisches Monophosphat handelt. Da der Rf-Wert für Fleck 2 nicht dem für Diphosphat entsprach, wurde die von RUF schon vor Jahren geäußerte Vermutung überprüft, ob es sich hierbei um einen der in jedem Blut enthaltenen Adenosinphosphorsäureester handeln könne. Dies erfolgte durch Vergleichsschromatogramme mit Reinsubstanzen von Monophosphat, Diphosphat (auch Triphosphat), Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) und zwar sowohl direkt als auch nach versuchsgleicher Behandlung mit TCE. Die dabei ermittelten Rf- und Pk-Werte zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 5.

Lfd. Nr.:	Monophosphat		Diphosphat		AMP		ADP		ATP	
	Rf	Pk	Rf	Pk	Rf	Pk	Rf	Pk	Rf	Pk
1	0,72	100	0,53	73,6						
2	0,71	100	0,52	73,2						
3	0,73	100	0,55	75,3						
4	0,70	100	0,52	74,3						
5	0,74	100					0,40	57,1	0,27	38,6
6							0,41	55,4		
7	0,73	100	0,54	74,0					0,31	
8	0,71	100	0,53	74,6	0,60	84,5				
9	0,72	100			0,60	83,3				
10	0,71	100	0,52	73,2	0,60	84,5				
11	0,72	100	0,53	73,6	0,61	84,7				
12	0,73	100	0,55	75,3						
13	0,72	100	0,53	73,6	0,61	84,7				
14	0,72	100	0,55	76,4						
15	0,71	100	0,53	74,7						
16	0,70	100			0,58	82,9				
17	0,72	100	0,53	73,6						
18	0,71	100			0,61	85,9	0,37	52,1	0,25	35,2
19					0,59					
20							0,39			
21									0,26	
22	0,76	100	0,59	77,6						
23	0,76	100	0,59	77,6	0,66	88,8				
24					0,64					

Aus den Chromatogrammen 1–24 wurden folgende Mittelwerte für die Rf- und Pk-Werte errechnet:

Tabelle 6.

Substanz	Rf-Wert	Pk-Wert
Monophosphat	0,72	100
Diphosphat	0,54	74,7
Triphosphat	0,44	61,7
Adenosinmonophosphorsäure (AMP)	0,61	84,6
Adenosindiphosphorsäure (ADP)	0,39	54,8
Adenosintriphosphorsäure (ATP)	0,27	36,9

Da bekanntlich das Monophosphat als Fixpunkt in der Papierchromatographie der Phosphate angesehen werden muß und die Positionen der übrigen Phosphate am besten in Relation zur Lage des Monophosphates angegeben werden (GRUNZE und THILO), wurde auch unsererseits die Berechnung des Pk-Wertes auf dieses Monophosphat mit einem solchen von 100 bezogen.

Vergleicht man nun die Mittelwerte von Fleck 2 mit den aus den Kontrollchromatogrammen ermittelten Rf- und Pk-Werten, so lassen sich die beiden ermittelten Flecken als

Fleck 1 = Monophosphat

Fleck 2 = Adenosinmonophosphorsäure (AMP)

identifizieren. Da zu den Rf-Werten des Diphosphates und der anderen Oligophosphate bzw. Adenosinphosphorsäureester ein signifikanter Unterschied besteht, kann also zweifelsfrei geschlossen werden, daß ausschließlich Monophosphat zur Resorption gelangt. Einen Beweis für dieses Ergebnis lieferte uns die papierchromatographische Untersuchung des entweißten Blutes einer Kontrollratte. Auch hierbei ließen sich nur zwei phosphathaltige Flecken nachweisen, nämlich anorganisches Monophosphat und Adenosinmonophosphorsäure (Nr. 16 der Tabelle 5).

Diskussion

Nachdem Polyphosphate verschiedenster Kondensationsgrade sich nicht nur im Pflanzenreich oder bei niederen Organismen (KÜHL, EBEL et al., DREWS) finden, sondern auch in höheren Lebewesen (LANG und GROSSMANN, LYNN and BROWN) nachgewiesen wurden und zwar in den Kernen und Mitochondrien der Zellen, wo sie im Intermediärstoffwechsel als langfristige P- und Energiespeicher (PENNIAL and GRIFFIN) große Bedeutung haben dürften, war es von besonderem Interesse zu klären, ob exogen zugeführte Polyphosphate als solche oder erst nach Rückwandlung in Monophosphat resorbiert werden. Insbesondere können damit auch Fragen möglicher toxischer Wirkungen dieser Stoffklasse nach Applikation per os z. B. Beeinflussung des Mineralstoffhaushaltes im Blut etc. beantwortet werden.

Unsere Untersuchungen konnten nun beweisen, daß nach Zufuhr per os von Polyphosphaten ausschließlich Monophosphat resorbiert wird, wobei die Menge eine Funktion des Kondensationsgrades der Polyphosphate und damit der enzymatischen Aufspaltung ist. Das Versuchsergebnis mit Polyphosphat 64 bestätigt außerdem die von HAHN für das Grahamsche Natriumpolyphosphat geäußerte Vermutung, daß die Aufspaltung dieses hochmolekularen Polyphosphates eine gewisse Zeit benötigt und dadurch Phosphat der Resorption entgeht, weshalb Grahamsches Natriumpolyphosphat trotz seines höchsten P-Gehaltes aller Phosphate eine geringere Toxizität als die anderen Polyphosphate, insbesondere als das direkt resorbierbare Monophosphat besitzt. Das aufgenommene anorganische Monophosphat wird mit der durch den Resorptions- bzw. Phosphorylierungsvorgang bedingten zeitlichen Verschiebung, aber trotzdem ziemlich schnell, in die organische Bindung der Adenosinphosphorsäureester übergeführt und so dem Intermediärstoffwechsel zugeleitet, wobei die in diesen Versuchen ermittelte AMP zum großen Teil Ausdruck der durch die TCE-Entweißung gespaltenen säurelabilen ATP sein

dürfte. Damit ist ein weiterer Beweis für das einheitliche Ergebnis aller tier-experimentellen chronischen Toxizitätsstudien einschließlich der stoffwechsel-physiologischen Untersuchungen erbracht, daß sich Polyphosphate bei oraler Zufuhr physiologisch qualitativ und quantitativ gleich wie das Monophosphat verhalten. Die bisher geäußerten Zweifel an der Resorption von Polyphosphaten (auch Oligophosphaten) waren also berechtigt, denn die Zellmembranen sind für die kondensierten Phosphate nicht durchlässig und die Adenosinphosphorsäureester des Serums bzw. die bisher in Stoffwechselkäfigen nicht mögliche einwandfreie Trennung von Harn und Kot der Versuchstiere täuschten eine geringe Resorption von Oligophosphaten vor.

Die toxikologischen Beurteilungen der Polyphosphate durch das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives und der Kommission zur Prüfung fremder Stoffe bei Lebensmitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft finden hierdurch eine weitere, experimentelle Bestätigung, denn oral zugeführte Polyphosphate wirken nur in dem Umfange im Organismus, in dem sie zu ausschließlich resorbierbarem Monophosphat aufgespalten werden. Damit besitzt die hinsichtlich Molekülgröße, Löslichkeit, „Calciumbindungsvermögen“, Abbaugeschwindigkeit usw. relativ heterogene Gruppe der Polyphosphate ein mit dem Monophosphat einheitliches pharmakologisch-toxikologisches Bild. Alle anderen Vorstellungen über schädliche, insbesondere spezifische „Giftwirkungen“ der Polyphosphate sind daher zurückzuweisen. Die in pflanzlichen und tierischen Organismen nachgewiesenen Polyphosphate werden also stets endogen aus resorbiertem Monophosphat aufgebaut.

Zusammenfassung

Es wird über Stoffwechselversuche an Ratten zur Prüfung der Frage nach einer Resorption anorganischer Polyphosphate berichtet. ^{32}P -markierte Polyphosphate, nämlich Tetranatriumdiphosphat, Pentanatriumtriphosphat und Natriumpolyphosphat 64, wurden Ratten mit der Schlundsonde appliziert, die Tiere nach jeweils 1, 2, 4, 8 und 16 Stunden decapitiert und das Frischblut zur Identifizierung des vorhandenen Phosphates und der daran gebundenen ^{32}P -Aktivität radiometrisch und papierchromatographisch untersucht. Im entweißten Vollblut konnten stets nur zwei radioaktive phosphathaltige Substanzen festgestellt werden, die sich als anorganisches Monophosphat und Adenosinmonophosphorsäure AMP identifizieren ließen, d. h. es wird ausschließlich Monophosphat resorbiert, das durch enzymatische Aufspaltung der Polyphosphate gebildet wird.

Die Menge des aus den Polyphosphaten zur Resorption gelangenden Monophosphats ist eine Funktion des Kondensationsgrades und wird mit zunehmender Kettenlänge immer kleiner. Das so aufgenommene Monophosphat wird dann mit der durch den Resorptions- bzw. Phosphorylierungsvorgang bedingten zeitlichen Verschiebung in die organische Bindung der Adenosinphosphorsäureester übergeführt.

Damit ist ein weiterer Beweis für das gleiche Ergebnis aller bisherigen chronischen Toxizitätsstudien erbracht, daß sich die Polyphosphate bei oraler Zufuhr physiologisch qualitativ und quantitativ gleich wie das Monophosphat verhalten und daher auch auf jeder Konzentrationsstufe ein gleiches pharmakologisch-toxikologisches Bild zeigen. Polyphosphate besitzen also keine zusätzlichen, insbesondere für diese Stoffgruppe „spezifischen Giftwirkungen“.

Dieses Ergebnis bestätigt erneut die bereits durch die FAO/WHO und die Deutsche Forschungsgemeinschaft erfolgte toxikologische Beurteilung der Polyphosphate, wonach diese nur in dem Umfang im Organismus wirken, in dem sie zu Monophosphat (= Orthophosphat) aufgespalten werden. Daher ist deren tägliche Zufuhr mit der Nahrung nur im Rahmen der täglichen Gesamtphosphatzufuhr (natürlicher P-Gehalt der Nahrung + zugesetzte Mono- und Polyphosphate) zu berücksichtigen.

Literatur

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Mitt. I der Fremdstoff-Kommission, 14. 4. 1964. — DREWS, G., Acides Ribonucléiques et Polyphosphates, Centre National de la Recherche Scientifique p. 533 (Paris 1962). — EBEL, J. P., J. COLAS et S. MULLER, Exptl. Cell Research **15**, 21-42 (1958). — EICHHOLTZ, F., E. A. RIVERTON et J.-D. KLINKE, Ther. Umsch. **20**, 93 (1963). — FLEISCH, H., Clin. Orthop. **32**, 170 (1964). — FLEISCH, H. und S. BISAZ, Z. Ernährungswiss. Suppl. **4**, 166 (1965). — FLEISCH, H., S. BISAZ, and A. D. CARE, Lancet, May **16**, 1065 (1964). — FLEISCH, H., S. BISAZ und A. CARE, Helvet. Physiol. acta **22**, C 16-C 17 (1964). — FLEISCH, H. and W. F. NEUMAN, Amer. J. Physiol. **200**, 1296 (1961). — VAN GENDEREN, H., G. J. VAN ESCH, H. H. VINK und S. J. WIT, Arzneimittelforsch. **7**, 172 (1957). — GOSSELIN, R. E., A. ROTHSTEIN, G. J. MILLER, and H. L. BERKE, J. Pharmacol. exper. Ther. **106**, 180 (1952). — GRUNZE, H. und E. THILO, Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate (Berlin 1956). — HAHN, F., Z. Ernährungswiss. Suppl. **1** (1961). — HAHN, F., Klin. Wschr. **42**, 505 (1964). — HAHN, F. und K. LANG, DLR **57**, 330 (1961). — KÜHL, A., Erg. Biol. **23**, 144 (Heidelberg 1960). — LANG, K., L. SCHACHINGER, O. KARGES, F. K. BLUMENBERG, G. ROSSMÜLLER und K. SCHMUTTE, Biochem. Z. **327**, 118 (1955). — LANG, K., Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln (Heidelberg 1958). — LANG, K. und D. GROSSMANN, Biochem. Z. **336**, 351 (1962). — LYNN, W. S. and H. R. BROWN, Biochem. Biophys. Res. Commun. **11**, 357 (1963). — MATTENHEIMER, H., Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln (Heidelberg 1958). — PENNIAL, R. and J. B. GRIFFIN, Biochem. Biophys. Acta **90**, 429 (1964). — RUF, F., Unveröffentlichte Untersuchungen. — RUF, F., Persönliche Mitteilung. — SCHREIER, K. und H. G. NÖLLER, Arch. Exper. Pathol. Pharmacol. **227**, 199 (1955). — THILO, E. und W. WIEKER, J. Polymer Sci. **53**, 55 (1961). — Wild Hith Org. techn. Rep. Ser. **281** (1964). — ZIMMERMANN, M., Z. angew. Chem. **55**, 28 (1942).

Anschrift der Verfasser:

Dr. M. FINGERHUT u. a., Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität, 6500 Mainz

*Du Centre de Recherches sur la Nutrition, Bellevue
et du Laboratoire de biochimie des Isomères, Paris (France)*

Efficacité biologique des Isomères optiques de la Leucine et de L'isoleucine pour un Lactobacille (*L. arabinosus* 17/5)

Par JEAN ADRIAN et JACQUES NICOLLE

Avec 5 tableaux

(Reçu p. p. le 1 février 1966)

Introduction

A la suite de différents travaux concernant l'activité des antipodes optiques d'acides aminés pour des microorganismes (NICOLLE et coll., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), nous nous proposons de reprendre ce type de recherches en utilisant un lactobacille connu pour son besoin absolu en leucine et isoleucine et qui — pour cette raison — est fréquemment utilisé dans les dosages microbiologiques d'acides aminés: il s'agit de *Lactobacillus arabinosus* 17/5; Les besoins de cette souche sont parfaitement définis dans les conditions du dosage: en absence de leucine ou d'isoleucine la croissance est pratiquement nulle et seul l'isomère L — qui est le plus fréquemment répandu dans le domaine animal ou végétal — peut assurer le développement du microorganisme. L'isomère D est entièrement dépourvu d'activité dans les conditions du dosage microbiologique (ADRIAN et RERAT, 2¹).

¹) C'est à dire à des concentrations de l'ordre de 10 µg par ml de milieu de culture.