

Aus dem Pharmakologischen Institut und dem Institut
für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg

Über die Resorbierbarkeit von Chlorogensäure durch die Ratte

Von G. Czok, W. Walter, K. Knoche und H. Degener

(Eingegangen am 31. März 1974)

Die Chlorogensäure ist im Pflanzenreich weit verbreitet und daher ein nicht zu vernachlässigender Bestandteil vieler Nahrungsmittel¹⁾ und Getränke wie Kaffee, Tee, Kakao, Wein und Bier (Herrmann 1963). Aus diesem Grunde ist es wichtig, ihre physiologischen und pharmakologischen Wirkungen kennenzulernen. Eingehendere Untersuchungen zu dieser Frage wurden erst vor etwa zehn Jahren aufgenommen, als bei Auseinandersetzungen über die Bekömmlichkeit des Kaffeegetränkes die bisher gegenüber dem Coffein vollständig vernachlässigte Chlorogensäure Gegenstand tierexperimenteller Forschung wurde.

Bisher konnten nach Verabreichung von Chlorogensäure im Tierexperiment die folgenden Wirkungen nachgewiesen werden, die sich im wesentlichen am *Zentralnervensystem*, am *Magen-Darm-Kanal*, am *Leber-Galle-System* und an der *Niere* manifestieren.

Am *Zentralnervensystem* bewirkt Chlorogensäure eine Zunahme der zentralnervösen Erregbarkeit. Dieser Effekt war bei Ratten nach oraler Verabreichung von 3,75–15,0 mg/kg Chlorogensäure durch Krampfschwellenmessung nachweisbar (Czok und Lang 1961); bei der Maus konnte durch Messung der Tiermotilität eine entsprechende Wirkung nach s. c. Injektion von 37,5–75 mg/kg bzw. oraler Gabe von 22,5–90 mg/kg Chlorogensäure festgestellt werden. (Heyl 1963, Kargoscha 1967, Valette et Morin 1969). Im Gegensatz hierzu konnten Hach und Heim 1971 bei der Maus keine Beeinflussung der Tiermotilität und der Cardiazolkrampfschwelle nach i. p. Injektion von 3,5–270 mg/kg Chlorogensäure nachweisen.

Am *Magen-Darm-Kanal* zeigt Chlorogensäure gleichfalls eine anregende Wirkung. So kam es bei Mäusen nach oraler Zufuhr von Chlorogensäure in Dosierungen von 5–20 mg/kg zu einer Zunahme der Darmperistaltik, die anhand des beschleunigten Tuschetransports nachgewiesen werden konnte (Czok und Lang 1963). Da dieser Effekt nicht durch Atropin, sondern nur durch Papaverin aufgehoben werden konnte, ist zu vermuten, daß Chlorogensäure am Darm eine rein muskulotrope Wirkung entfaltet.

Am *Leber-Galle-System* kam es unter dem Einfluß von Chlorogensäure bei Gallenfistelratten zu einer deutlichen Zunahme der Galle-

¹⁾ Chlorogensäure wurde nachgewiesen in Apfel, Birne, Quitte, Sauerkirsche, Süßkirsche, Pflaume, Pfirsich, Aprikose, Brombeere, Himbeere, Erdbeere, Stachelbeere, Johannisbeere, Kartoffel.

sekretion. Dieser Effekt war nach i. v. Injektion (25–100 mg/kg) erheblich stärker ausgeprägt als nach oraler Applikation (Czok und Lang 1963, Czok und Schulze 1973).

An der Niere verstärkt Chlorogensäure, wie Gebhardt 1939 an Kaninchen und Ratten nachweisen konnte, die diuretische Wirksamkeit von Coffein und führt so zu einer schnelleren Coffeinelimination und gegebenenfalls bei Gabe sehr großer Coffeindosen zu einer Herabsetzung der Coffeintoxizität.

Beim Menschen haben Czok und Lang 1961 nach oraler Gabe von Chlorogensäure (200 mg) eine deutliche Zunahme der Magensekretion mit Steigerung der Salzsäurebildung nachweisen können. Dieser Effekt ging mit einer Abnahme der Pulsfrequenz, wahrscheinlich durch Vagusreizung bedingt, einher und ließ sich auch durch Verabreichung von Kaffeesäure in entsprechender Dosierung erzielen. Chinasäure war dagegen wirkungslos.

Durch die Untersuchungen von Booth et al. 1957, 1960, 1963 sind wir auch über den Stoffwechsel von Chlorogensäure im Organismus hinreichend unterrichtet. Danach erfolgt beim Menschen und bei der Ratte im Körper eine Aufspaltung der Chlorogensäure in Kaffeesäure und Chinasäure, die dann weiteren Umwandlungen unterliegen. Die Kaffeesäure wird dabei nach Hydrierung, Dehydrierung und β -Oxidation der Seitenkette, Methylierung, Demethylierung und Dehydroxylierung der phenolischen Hydroxylgruppen, nach Kondensation mit Glycin und Glukuronsäure, ausgeschieden.

Ungeklärt ist dagegen, ob Chlorogensäure nach oraler Zufuhr vom Magen-Darm-Kanal in unveränderter Form resorbiert wird. Zur Klärung dieser Frage wurden die hier mitgeteilten Untersuchungen durchgeführt.

Durchführung der Versuche und Ergebnisse

Tierversuche

Die Untersuchungen wurden an Wistar-Ratten im Gewicht von durchschnittlich 250 g durchgeführt, die Altromin®-Trockenfutter und Wasser ad libitum erhalten hatten. Alle Versuche wurden in Urethan-Narkose (1,0 g/kg 25%ige Lösung i. p.) vorgenommen. Es wurden insgesamt 4 verschiedene Versuchsserien durchgeführt.

In Versuchsserie 1 wurde bei den Tieren eine Gallengangsfistel angelegt und Chlorogensäure (80 mg) i. v. verabreicht. Nach 5 bzw. nach 30 Minuten wurden die Tiere entblutet und in Serum und Gallenflüssigkeit das Vorhandensein von Chlorogensäure geprüft.

In Versuchsserie 2 wurde bei den Tieren gleichfalls der Gallengang kanüliert, Chlorogensäure aber in das Duodenum appliziert. Die Tiere wurden anschließend nach 30 bzw. 60 Minuten entblutet. In den so erhaltenen Serum- und Gallenproben wurden dann Chlorogensäurebestimmungen vorgenommen.

In Versuchsserie 3 wurde den Ratten der Magenausgang unterbunden und 10 bzw. 20 mg Chlorogensäure in den abgebundenen Magen eingegeben. 60 Minuten später wurden die Tiere entblutet und in Serum und Mageninhalt Chlorogensäurebestimmungen vorgenommen.

In Versuchsserie 4 wurden den Ratten 10 bzw. 20 mg Chlorogensäure in ein abgebundenes Dünndarmstück (Duodenum) eingegeben und wiederum nach

Ablauf von 60 Minuten Chlorogensäurebestimmungen in Serum und Darminhalt durchgeführt.

Die Bestimmung von Chlorogensäure in den genannten biologischen Flüssigkeiten erfordert noch einige besondere Maßnahmen. Bekanntlich wird Chlorogensäure bei schwach alkalischer Reaktion, wie sie auch in biologischen Flüssigkeiten vorliegt, rasch oxidiert, wobei Viridinsäure, ein in seiner Konstitution noch nicht aufgeklärtes Abbauprodukt von Chlorogensäure, entsteht. Um die Oxidation der Chlorogensäure zu verhüten, wurden die Proben in angesäuertem Zustand aufgearbeitet und bei 0° C gelagert. Wurden Serum- bzw. Galleproben in dieser Weise behandelt, so konnte zugesetzte Chlorogensäure in den betreffenden Proben wiedergefunden werden.

Chlorogensäurenachweis

Dieser wurde nach verschiedenen Verfahren vorgenommen:

1. Gaschromatographie

Unter Verwendung von Trifluoressigsäure wurde Chlorogensäure silyliert mit N,0-bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) und auf dem Gerät F 20 der Firma Perkin Elmer der Gaschromatographie unterworfen, und zwar auf einer 2 m langen mit OV 17 belegten Chromosorb-G-Säule mit Glaswandung. Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases (Stickstoff) 25 ml/min, Arbeitstemperatur 300° C, Einspritzblocktemperatur 300° C. Die untere Nachweisgrenze betrug hierbei 0,1 mg/1 ml Lösung.

2. *Dünnschichtchromatographie* an gipshaltigem Kieselgel mit Fluoreszenzindikator GF₂₅₄ (Merck).

Die folgenden Lösungsmittelgemische erwiesen sich hierbei als geeignet:

- a) n-Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5
- b) n-Butanol-n-Butylacetat-Eisessig-Wasser 9 : 2 : 47 : 16
- c) Toluol-n-Butanol-Eisessig-Wasser 10 : 15 : 5 : 3
- d) n-Butanol-Acetessigsäuremethylester-Eisessig-Wasser 12 : 25 : 1 : 5

3. UV-Spektroskopie

In Serum und Galle wurde Chlorogensäure nach papierchromatographischer Abtrennung und Elution durch ihr charakteristisches UV-Spektrum nachgewiesen.

4. Remissionsspektrophotometrie

Nach dünnschichtchromatographischer Trennung mit dem Lösungsmittelgemisch a). Vermessung bei 325 nm.

Ergebnisse

Nach i. v. Injektion von Chlorogensäure konnte sowohl im Serum als auch in der Galle Chlorogensäure nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde die Verbindung weder nach intraduodener Verabreichung noch nach ihrer Eingabe in den abgebundenen Magen oder Darm der Ratte in Serum und Galle aufgefunden.

Im Magen- und Darminhalt waren 60 Minuten nach Verabreichung von Chlorogensäure regelmäßig noch größere Mengen davon analytisch

nachweisbar. Orientierende Untersuchungen mit Hilfe der Remissionspektroskopie ergaben, daß die Konzentration der Chlorogensäure im Darminhalt stärker abgenommen hatte als im Mageninhalt. Da eine Resorption der Verbindung nicht nachweisbar war, müssen Spaltungsreaktionen ablaufen. Es hat den Anschein, als ob dabei außer den bereits bekannten Spaltprodukten Chinasäure und Kaffeesäure noch weitere Produkte gebildet werden, über deren Natur noch keine weiteren Angaben gemacht werden können.

Diskussion

Aus den hier vorgelegten Untersuchungsergebnissen, nach denen Chlorogensäure nur nach i. v. Injektion, nicht aber nach Verabreichung in den Magen oder Darm im Serum nachgewiesen werden konnte, ist zu schließen, daß per os aufgenommene Chlorogensäure wohl nicht in unveränderter Form, sondern erst nach Aufspaltung im Magen-Darm-Kanal resorbiert wird. In diesem Sinne kann man auch den Befund verwerfen, daß die in Magen oder Darm eingegebene Chlorogensäure sich nach 60 Minuten deutlich verringerte und gleichzeitig gewisse Mengen von Spaltprodukten der Chlorogensäure in Form von Kaffeesäure bzw. Chinasäure nachgewiesen werden konnten. Der fehlende Nachweis von Kaffeesäure und Chinasäure im Serum könnte darauf hinweisen, daß diese Spaltprodukte der Chlorogensäure entweder bereits im Magen-Darm-Kanal oder/und im Blut in weitere Substanzen umgewandelt werden, die mit den hier angewandten Methoden nicht zu erfassen waren.

Aus neueren Untersuchungen von Czok und Schulze 1973 ergab sich ebenfalls ein wichtiger Hinweis, der auf eine Chlorogensäureaufspaltung im Darm schließen läßt. Chlorogensäure, in einer Dosierung von 50 mg/kg i. d. verabreicht, ergab nämlich bei der Ratte nur eine halb so starke choleretische Wirkung wie Kaffeesäure in entsprechender Dosierung. Da vom Chlorogensäuremolekül aber rund 50% auf Kaffeesäure entfallen, liegt die Vermutung nahe, daß der choleretische Effekt durch Kaffeesäure ausgelöst wird, die bei der Aufspaltung von Chlorogensäure im Darm gebildet wird.

Zusammenfassung

In Untersuchungen an urethan-narkotisierten Ratten wurde nach Applikation von Chlorogensäure in den Magen und in den Darm im Gegensatz zur i. v. Injektion ein Erscheinen von Chlorogensäure im Blutserum und auch in der Galle nicht beobachtet. Da sich die in Magen und Darm eingegebene Chlorogensäuremenge zeitabhängig verringerte und gleichzeitig Kaffeesäure und Chinasäure nachgewiesen werden konnten, ist zu folgern, daß Chlorogensäure im Magen und Darm aufgespalten wird und in Form seiner primären Spaltprodukte bzw. weiterer Metabolisierungsprodukte resorbiert wird.

Summary

By application of chlorogenic acid into the stomach and the intestine of urethan-anaesthetized rats the substance was not detected in serum or bile, contrary to the observations after i. v. application. As the amount of chlorogenic acid applied into stomach and intestine decreases with time and caffeic as well as quinic acid were identified, it is concluded that chlorogenic acid is

cleaved in stomach and intestine and is absorbed presumably in form of its primary fragments or further metabolits.

Literatur

Booth, A. N., D. H. Emerson, F. T. Jones and F. De Eds, *J. Biol. Chem.* **229**, 51, 1957. – Booth, A. N., D. J. Robbins, M. S. Masri and F. De Eds, *Nature* **187**, 691, 1960. – Booth, A. N. and R. T. Williams, *Nature* **198**, 684, 1963. – Czok, G. und K. Lang, *Arzneimittelforschg.* **11**, 335, 1961. – Czok, G. und K. Lang, *Arzneimittelforschg.* **13**, 908, 1963. – Czok, G. und P. J. Schulze, *Z. Ernährungswiss.* **12**, 224, 1973. – Hach, B. und F. Heim, *Arzneimittelforschg.* **21**, 23, 1971. – Herrmann, K., *Dtsch. Lebensmittelrundschau* **59**, 309, 1963. – Heyl, H., *Diss. Hamburg* 1963. – Kargoscha, R., *Diss. Hamburg* 1967. – Valette, G. and A. Morin, *4. Int. Kolloquium über Kaffeechemie, Amsterdam* 1969.

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. G. Czok, Pharmakolog. Institut der Universität
2000 Hamburg 20, Martinistraße 52