

Die biliäre Ausscheidung choleretisch aktiver Zimtsäure-Derivate durch die Ratte

J. Westendorf und G. Czok

Institut für Pharmakologie der Universität Hamburg,
Universitätskrankenhaus Eppendorf

Zusammenfassung

Ausgehend von dem bekannten choleretischen Effekt der Ferulasäure untersuchten wir die biliäre Ausscheidung, den Metabolismus sowie den Gallefluß nach Applikation von Ferulasäure und verwandten Derivaten der Zimtsäure.

An Wistarratten in Pentobarbitalnarkose mit Gallefistel studierten wir die biliäre Ausscheidung der folgenden ¹⁴C-markierten Verbindungen: Kaffeesäure (KS), Ferulasäure (FS), m-Cumarsäure (mCS), p-Cumarsäure (pCS), iso-Ferulasäure (i-FS), p-methoxy-Zimtsäure (pMZ), m-methoxy-Zimtsäure (mMZ), 3,4-Dimethoxy-Zimtsäure (DMZ) und 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (TMZ). Die Applikation erfolgte i. duod.

Alle Substanzen wurden über die Galle ausgeschieden mit einem Galle-/Serum-Quotienten > 1. Die über die Galle ausgeschiedene Radioaktivität betrug bei den Verbindungen FS, i-FS, DMZ und TMZ ca. 20 %, bei der pMZ 8 % und (1) weniger als 5 % (2) bei den übrigen Verbindungen. Ein Anstieg des Galleflusses war nach Applikation von KS, FS, i-FS und DMZ festzustellen. Die TMZ war trotz der hohen biliären Ausscheidungsrate choleretisch inaktiv.

Die Verbindungen mit phenolischen Hydroxylgruppen wurden vorwiegend an Glukuronsäure gekoppelt über die Galle ausgeschieden, wohingegen im Harn die Glycinkopplung überwog. Die Substanzen mit Methoxygruppen (pMZ, mMZ, TMZ) wurden teilweise entmethyliert und dann an Glukuronsäure gekoppelt. Es konnten aber auch die ungekoppelten Verbindungen in der Galle und im Harn nachgewiesen werden.

Summary

Concerning the well-known choleretic effect of ferulic acid, we made further investigations on biliary excretion, metabolism and bile flow after application of ferulic acid and related compounds.

In anesthetized bile duct cannulated male Wistar-rats, we studied the biliary excretion of the following ¹⁴C labelled cinnamic acid compounds: caffeic acid (CA), ferulic acid (FA), m-coumaric acid (mCA), p-coumaric acid (pCA), isoferulic acid (IFA), p-methoxycinnamic acid (pMCA), 3,4-dimethoxycinnamic acid (DMCA), and 3,4,5-trimethoxycinnamic acid (TMCA). These compounds were given intraduodenally (128–384 µmoles/kg b. wt.). All of the tested compounds were excreted to some extent in bile, giving a bile to the serum conc. ratio greater than 1. The radioactivity excreted by bile within 2 hours (as percent of the given dose) was about 20 % in the case of FA, IFA, DMCA, and TMCA, about 8 % for pMCA, and less than 5 % for CA, mCA and pCA. The biliary excretion increased in a dose-dependent manner only after FA and IFA, but not after application of the other compounds.

A choleric effect was produced by FA, IFA and DMCA, but not by TMCA although it was excreted to the same extent. There was no linear correlation between the biliary excretion rate and the bile flow, suggesting that choleresis is not explained only by an osmotic effect of the substances excreted into the bile.

The compounds with phenolic hydroxyl groups were excreted in the bile mainly as glucuronides. The compounds without hydroxyl groups (pMCA, DMCA, TMCA) appeared in the bile as acid glucuronides, glycine conjugates as well as unconjugated.

Schlüsselwörter: Zimtsäurederivate, Choleresis, Metabolismus

Einleitung

Die galletreibende Wirkung der Ferulasäure ist lange bekannt. In einer Arbeit von 1938 berichtet H. Schöne (1) über die Steigerung des Galleflusses bei Meerschweinchen nach i.v. Applikation von Ferulasäure. Den Haupteffekt sah er jedoch in einer durch diese Substanz ausgelösten Kontraktion der Gallenblase. Aus der Beobachtung, daß auch bei Ratten eine Choleresis auftrat, schloß er jedoch eine intrahepatische Ursache mit ein. Diese konnte in der Folgezeit mehrfach nachgewiesen werden (2, 3).

Die Ferulasäure (3-methoxy,4-hydroxyzimtsäure) ist ein Bestandteil der meisten Gewürzpflanzen, die 60–150 mg/kg davon enthalten (4). Curcuma enthält sogar 1,6 g/kg. Nun sind Gewürze und besonders Curcuma für ihre galletreibende Wirkung bekannt. Neben der Ferulasäure enthalten die meisten Gewürzpflanzen eine ganze Reihe von Hydroxy- und Methoxyzimtsäurederivaten, wie m-Cumarsäure, Sinapinsäure und Kaffeesäure. Der letzteren kommt eine besondere Bedeutung zu, da ihr Vorkommen sich auf zahlreiche Nahrungs- und Genußmittel erstreckt, zu denen Kaffee, Kartoffeln, Gemüse und Obstsorten gehören. Die Kaffeesäure ist dabei häufig esterartig mit Chinasäure verknüpft (Chlorogensäure = 3-Kaffeoylechinasäure). Diese Substanz mit Gerbsäureeigenschaften erfüllt im Pflanzenreich die Rolle einer Reparatur- und Abwehrsubstanz gegen Mikrobenbefall (5). Die Chlorogensäure wird bereits im Magen-Darm-Trakt in Kaffeesäure und Chinasäure gespalten. Nach oraler Aufnahme ist sie im Blut praktisch nicht nachweisbar (6, 7).

Im Körper unterliegt die Kaffeesäure einem Stoffwechsel wobei neben anderen Verbindungen durch Übertragung eines Methylrestes unter dem katalytischen Einfluß der COMT auch Ferulasäure entsteht (8).

Wegen des hohen Gehaltes mancher Nahrungspflanzen an Kaffeesäure (Kaffee = 5–7 %, Kartoffeln = 170–280 mg/kg, Äpfel = 50–190 mg/kg) ist für eine Anwesenheit von Ferulasäure im Körper häufiger die Bildung aus Kaffeesäure als die Aufnahme mit der Nahrung verantwortlich.

Wir interessierten uns für die Frage, welche der zahlreichen, im Pflanzenreich vorkommenden Zimtsäurederivate (bzw. deren Metaboliten) eine choleric Wirkung entfalten können, wobei wir nach Möglichkeit strukturspezifische Beziehungen erkennen und darüber hinaus auch Auskunft über den Mechanismus des cholericen Angriffspunktes dieser Verbindungen erlangen wollten.

Die an frühere Arbeiten (2) anknüpfenden Untersuchungen konnten wir durch eine ^{14}C -Markierung der Prüfsubstanzen entscheidend verbessern.

Dadurch war eine problemlose quantitative Verfolgung der Ausscheidung möglich, und metabolische Studien gestalteten sich einfacher.

Mit dem Mechanismus der Cholerese durch die unterschiedlichsten Substanzen befassen sich eine sehr große Anzahl von Arbeiten. Hier seien nur zwei Übersichten erwähnt (9, 10). Die Bildung der Galle erfolgt dabei hauptsächlich auf zwei Wegen, a) dem aktiven Transport von Na^+ in die Canaliculi und b) dem aktiven Transport von Gallensäure in die Canaliculi. Dem Na^+ folgen passiv Cl^- und HCO_3^- als Gegenionen sowie Wasser bis zur Wiederherstellung eines osmotischen Gleichgewichts (Isotonie mit dem Serum). Die Galle läßt sich daher in einen gallesalzabhängigen (engl. bile-salt dependent) und gallesalzunabhängigen (engl. bile-salt independent) Anteil scheiden. Fremdstoffe, die eine Mehrausscheidung von Galle verursachen, können entweder selber aktiv in die Canaliculi transportiert werden, wobei sie Wasser bis zur Herstellung isotoner Verhältnisse mitschleppen oder über eine im Mechanismus noch weitgehend unbekannte Stimulierung des aktiven Na^+ -Transportes den Gallefluß stimulieren, wobei sie selber von dem dadurch produzierten Wasserfluß mitgeschleppt werden. Schließlich ist eine Steigerung des Galleflusses auch auf der dukulären Seite möglich. Diese geschieht durch Vermittlung des Hormons *Sekretin* und führt zu einer besonders bicarbonatreichen Galle.

Der Anteil an kanalikulärer Galle läßt sich durch Bestimmung der ^{14}C -Erythritol-Clearance ermitteln. Die Methode ist der Bestimmung der Inulin-Clearance, die ein Maß für den glomerulären Harnanteil darstellt, analog.

Es besteht Einigkeit darüber, daß nahezu alle Choleretika durch Steigerung des kanalikulären Galleflusses wirken, wobei eine metabolische Umformung in der Leberzelle möglich sein und ausreichend schnell verlaufen muß (11). Stoffspezifische Unterschiede bestehen aber hinsichtlich des exkretorischen Mechanismus. Die folgende Arbeit befaßt sich mit diesen Fragen am Beispiel einer Reihe von Hydroxy- und Methoxyzimtsäurederivaten.

Material und Methodik

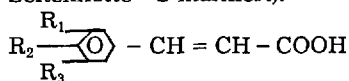
Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten ^{14}C -markierten Testsubstanzen stellten wir, wie bereits früher beschrieben (3), aus den betreffenden aromatischen Aldehyden und 2- ^{14}C -Malonsäure durch Kondensation nach „Knoevenagel“ dar. Die inaktiven Substanzen entstammen dem Handel, bis auf pMZ und mMZ, die wir analog der oben beschriebenen Methode mit inaktiven Ausgangssubstanzen synthetisierten.

Für die Versuche stellten wir uns durch Auflösen der betreffenden inaktiven Säuren unter Zusatz einer äquimolaren Menge NaHCO_3 Stammlösungen mit einer Konzentration von 128,8 $\mu\text{Mol/ml}$ (\triangleq 25 mg/ml FS) her. Durch Zusatz der ^{14}C -markierten Verbindungen, die als konzentrierte äthanolische Lösungen mit einer spezifischen Aktivität von 500 $\mu\text{Ci/mMol}$ vorlagen, stellten wir spezifische Aktivitäten zwischen 10 und 20 $\mu\text{Ci/mMol}$ ein. Eine Übersicht der verwendeten Testsubstanzen geht aus Tabelle 1 hervor.

Tierexperimente

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 300–400 g. Die Tiere wurden mit 60 mg/kg (i.p. Inj.) Nembutal-Na betäubt. Die

Tab. 1. Untersuchte Zimtsäurederivate (alle Verbindungen waren am C-2-Atom der Seitenkette ^{14}C -markiert).

Name	Abk.	R ₁	R ₂	R ₃
Kaffeesäure	KS	- OH	- OH	- H
Ferulasäure	FS	- OCH ₃	- OH	- H
3,4-Dimethoxyzimtsäure	DMZ	- OCH ₃	- OCH ₃	- H
3,4,5-Trimethoxyzimtsäure	TMZ	- OCH ₃	- OCH ₃	- OCH ₃
i-Ferulasäure	iFS	- OH	- OCH ₃	- H
p-Cumarsäure	pCS	- H	- OH	- H
m-Cumarsäure	mCS	- OH	- H	- H
m-Methoxyzimtsäure	mMZ	- OCH ₃	- H	- H
p-Methoxyzimtsäure	pMZ	- H	- OCH ₃	- H

Körpertemperatur wurde durch eine Infrarotlampe in Verbindung mit einem rektalen Temperaturfühler auf 37°C gehalten. In den abführenden Gallengang wurde eine Kanüle eingebunden. Für eine kontinuierliche Blutentnahme wurde eine A. carotis kanüliert. Nach i.d. Gabe der Testsubstanz wurde die Galle in Fraktionen zu je 5 min gesammelt. Nach 2 Stunden wurden die Tiere getötet und die Harnblase zur Bestimmung der renal ausgeschiedenen Aktivität entnommen.

Na-Cholatinfusion

In diesem Falle wurde zusätzlich eine Kanüle in die V. jugularis eingebunden. Während der gesamten Versuchsdauer wurde eine Lösung von Na-Cholat in Ringerlösung infundiert mit einem Fluß von 1,2 µMol Na-Cholat/min/100 g KG.

^{14}C -Erythritol-Clearance

Verwendet wurde ^{14}C -(U)-Erythritol (50 mCi/mMol) der Fa. Amersham, Buchler. Die Tiere erhielten eine i.v. Injektion von 5 µCi in 0,1 ml NaCl-Lösung gleichzeitig mit der i.d. Gabe des Choleretikums (nicht radioaktiv). Die Galle wurde in 5 Fraktionen gesammelt (10–20, 20–30, 30–60, 60–90, 90–120 Minuten) und die radioaktiven Konzentrationen im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Zur Ermittlung der radioaktiven Serumkonzentration wurden Blutproben aus einer A. carotis entnommen, und zwar während der Mitte einer jeden Gallesammelperiode, also 15, 25, 45, 75 und 105 Minuten nach Applikation.

Analytische Methoden

Die Bestimmung der Radioaktivität in der Galle, im Harn und im Plasma erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Mod. 2660).

Die Gallensäurekonzentration in der Galle bestimmten wir mit Hilfe der Hydroxysteroiddehydrogenase-Reaktion. Zur Bestimmung der über Galle und Harn ausgeschiedenen Metaboliten benutzten wir die dünnschichtchromatographische Trennung auf Kieselgel 60 (Merck) in Verbindung mit einem Radio-DC-Scanner (Fa. Berthold) sowie die Hochdruckflüssigchromatographie (Spectra Physics, Mod. SP 8000 B). Eine Trennung der Metaboliten in 3 Fraktionen (Glukuronide, Glycinate und freie Säuren) erreichten wir durch direkte Chromatographie von Harn und Galle auf Kieselgelplatten in 2-Butanol, Eisessig, Wasser (14:1:5). Die Identität der Glukuronidfraktion erkannten wir an deren Ausbleiben, wenn die Galle bzw. der Harn zuvor mit β -Glukuronidase (Sulfatase-frei, aus Rinderleber, Fa. Boehringer, Mannheim) behandelt wurde. Für den Nachweis der Glycinkonjugate verwendeten wir den Farbstest mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in Essigsäureanhydrid (11).

Eine Charakterisierung der verschiedenen, ineinander umgewandelten Carbonsäuren gelang nach Spaltung der Kopplungsprodukte mit Arylsulfatase-Glukuronidase aus *Helix pomatia* in Acetatpuffer (pH 5), Extraktion mit Essigsäureäthylester und DC-Trennung in Chloroform, Eisessig, Wasser (2:1:1, untere Phase). Die radioaktiven Zonen wurden mit Methanol eluiert und anschließend mit Hilfe der HPLC auf einer RP-18-Säule, 10 μ , mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser (+ 0,1 % Essigsäure), Tetrahydrofuran unter Verwendung eines UV-Detektors bei $\lambda = 300$ nm getrennt und identifiziert.

Ergebnisse und Diskussion

Biliäre Ausscheidung der Ferulasäure

Um eine Vorstellung von der Kinetik der biliären FS-Ausscheidung zu erhalten, prüften wir den zeitlichen Verlauf der radioaktiven Konzentration in Galle und Serum nach i.d. Applikation von 10 mg/kg, einer Dosis, die noch keine Cholereise erzeugt. Es zeigte sich, daß die Kinetik in beiden Kompartimenten den gleichen Verlauf nahm (Abb. 1), in der Galle aber eine ca. 20fache Anreicherung auftrat. Die zeitliche Verschiebung der Konz.-Maxima von 6 min entsteht bei Übergang der Verbindung vom Blut über Leber und Gallengänge bis zum Katheterausgang.

Die Tatsache, daß der Konzentrationsgradient zwischen Serum und Galle zeitlich konstant ist, deutet darauf hin, daß die hepatozytäre Clearance der Substanz ebenfalls konstant ist.

Eine choleretische Wirksamkeit der Ferulasäure ist bei Dosen über 20 mg/kg zu erkennen. In Abbildung 2 ist der Zusammenhang zwischen der biliären Ausscheidung der Ferulasäure, Gallensäure sowie dem Gallefluß graphisch dargestellt. Die FS-Dosis betrug dabei 75 mg/kg.

FS-Ausscheidung und Gallefluß verlaufen deutlich parallel, was auf einen linearen Zusammenhang hindeutet. Die Gallensäureausscheidung ist während der choleretischen Phase ebenfalls erhöht, als Folge einer gleichbleibenden Konzentration und eines gesteigerten Galleflusses. Die durch das Experiment bedingte Depletion an Gallensäure führt aber schließlich doch zu einem Absinken der GS-Konzentration und die Ausscheidung sinkt unter den Anfangswert, so daß in der Bilanz die temporäre Mehrausscheidung wieder kompensiert wird. Bei intaktem enterohepatischem Kreislauf sollte aber eine Erhöhung des GS-„Turn-over“ eintreten.

Wegen der Änderung der Gallensäure-Ausscheidung während der Versuche war es nötig, den gallesalzabhängigen Gallefluß zu ermitteln und

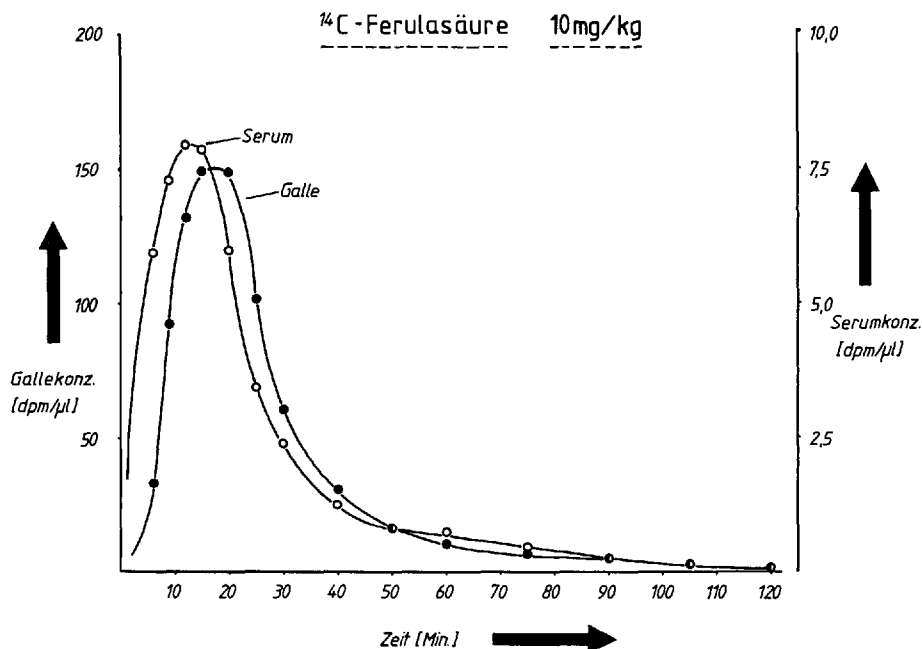


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Radioaktivität in Galle und Serum nach i.d. Applikation von 10 $\mu\text{g/kg}$ ^{14}C -Ferulasäure ($= 1,5 \times 10^6$ DPM) bei der Ratte.

ihn vom Gesamtgallefluß zu subtrahieren. Nur so ist eine Aussage über den FS-abhängigen Anteil am Gallefluß möglich.

Die Abbildung 3 zeigt die Abhängigkeit des Galleflusses von der GS-Ausscheidung. Die Versuchstiere erhielten dazu Infusionen von 0,4, 0,8 und 1,2 μMol Na-Cholat/min und 100 g KG. Eine Extrapolation der Korrelationsgeraden gegen die fiktive Null-Ausscheidung ergibt einen galle Salz-unabhängigen Gallefluß (engl. *Bile salt Independent Fraktion*) von 4,5 $\mu\text{l/min}$. 100 g. Aus der Steigung der Geraden entnimmt man, daß 1 μMol GS eine Ausscheidung von 7,7 μl Galle bedingt. Diese Werte zeigen eine befriedigende Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (9).

Löst man 1 μMol GS in 7,7 μl Wasser, dann erhält man eine Molarität von 0,13. Unter der Annahme, daß Taurocholat bzw. Glykocholat beim pH-Wert der Galle (pH 7,4) in ein Anion und ein Kation dissoziieren, erhält man eine osmotisch aktive Partikelkonzentration von 0,26 Osmol, was nahezu Isotonie mit dem Serumwert (0,30) bedeutet. Eine osmotische Ursache der GS-bedingten Galleausscheidung ist daher wahrscheinlich.

Trägt man nun den korrigierten Gallefluß (BIF) gegen die biliäre Ausscheidung der applizierten Ferulasäure auf, wie das in Abbildung 4 geschehen ist, so erhält man eine Punkteschar, durch die man ebenfalls eine Korrelationsgerade legen kann.

1 μMol ausgeschiedener Substanz bedingt in diesem Falle eine Ausscheidung von 26 μl Galle. Eine rein osmotische Erklärung, wie an anderer

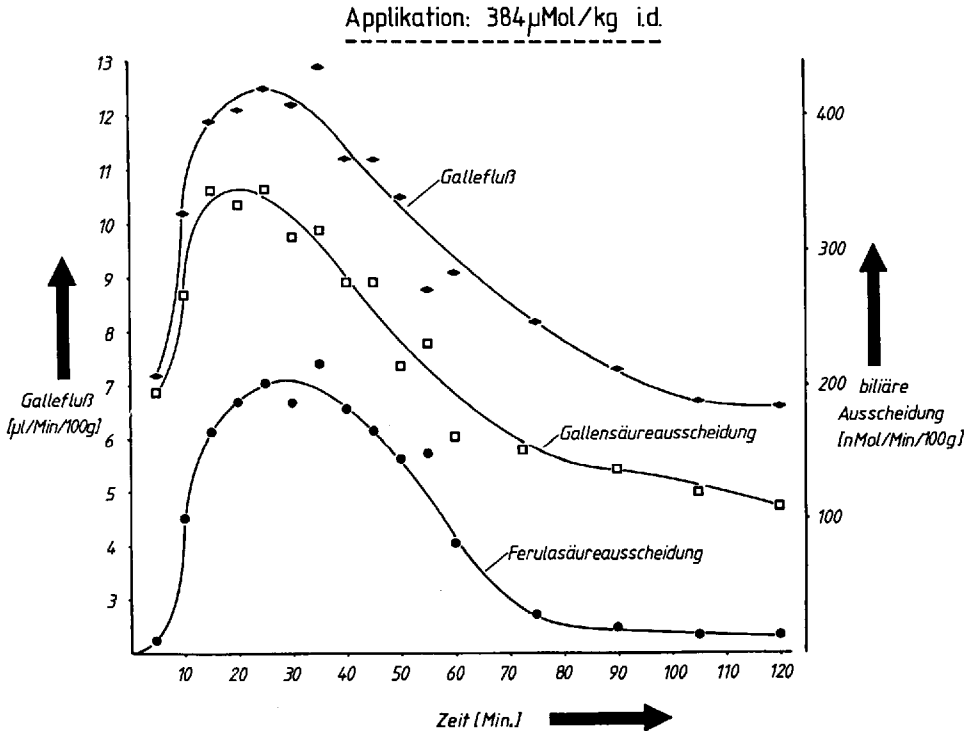


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf des Galleflusses und der biliären Ausscheidung von Gallensäure und Ferulasäure nach i.d. Gabe von $384 \mu\text{Mol/kg } ^{14}\text{C}$ -Ferulasäure.

Stelle geschehen (12), kann hier nicht genügen. Wie wir gesehen haben, kann eine Substanz, die maximal in zwei Partikel dissoziieren kann (und das ist bei der FS und auch dem Glukuronid der FS der Fall), je $1 \mu\text{Mol}$ nicht mehr als $6,7 \mu\text{l}$ Flüssigkeit beanspruchen. Das bedeutet, daß der überwiegende Teil des gesteigerten Galleflusses seinen osmotischen Druck von anderen Partikeln erhält, und dafür kann nur NaCl verantwortlich sein. Frühere Versuche hatten erbracht (2), daß sich während der choleretischen Phase die NaCl -Konzentration der Galle praktisch nicht verändert, was einer Steigerung der biliären Na^+ -Ausscheidung entspricht.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß in Abhängigkeit von der FS-Konzentration in der Leberzelle (möglicherweise über den Stoffwechsel, d. h. Glukuronidierung dieser Substanz) eine Stimulierung des aktiven Na^+ -Transports in die Canaliculi erfolgt. Mit dem passiven Folgefluß von Cl^- (und bzw. HCO_3^-) und H_2O werden in der Leberzelle angereicherte Stoffe wie FS-Glukuronid und Taurocholat mitgeführt, was einer Steigerung der Ausscheidung dieser Substanzen entspricht.

Biliäre Ausscheidung der verschiedenen Zimtsäurederivate

Um nun einen Einblick zu erhalten, inwieweit strukturspezifische Aspekte der Zimtsäurederivate einen Einfluß auf die choleretische Wirk-

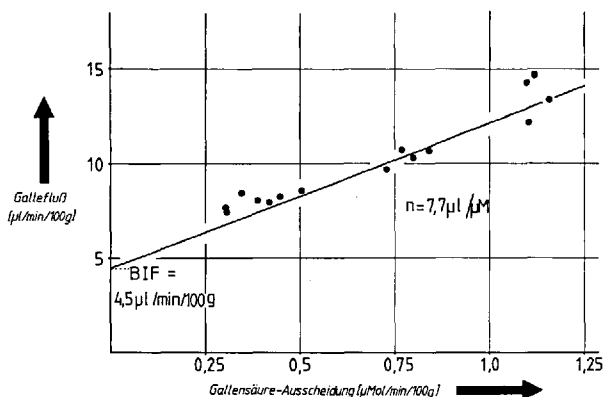


Abb. 3. Korrelation zwischen Gallefluß und Gallensäure-Ausscheidung bei Ratten. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ist ein Maß für die Bile salt Independent Fraction (BIF), die Steigung (n) gibt den molaren Volumenbedarf der Gallensäure in der Galle an.

samkeit haben, testeten wir die in Abbildung 1 aufgeführten Substanzen der Reihe nach. Wir verwendeten dabei je Substanz 3 Dosierungen im Verhältnis $(1:2:3) \times 128 \mu\text{Mol/kg}$ und je Konzentration 4 Tiere, was einer Gesamtzahl von 108 Versuchen entspricht. Die 2stündigen Gallesammelperioden teilten wir jeweils in 16 Fraktionen (bis 1 Std. à 5 min, 1–2 Std. à 15 min), wobei wir von jeder Gallefraktion das Volumen, die rad. Konzentration und die GS-Konzentration feststellten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Die biliäre Ausscheidung (in % der Dosis/2 h) ist ein Maß für die Gallegängigkeit der Substanz und für die Akkumulation in der Leberzelle.

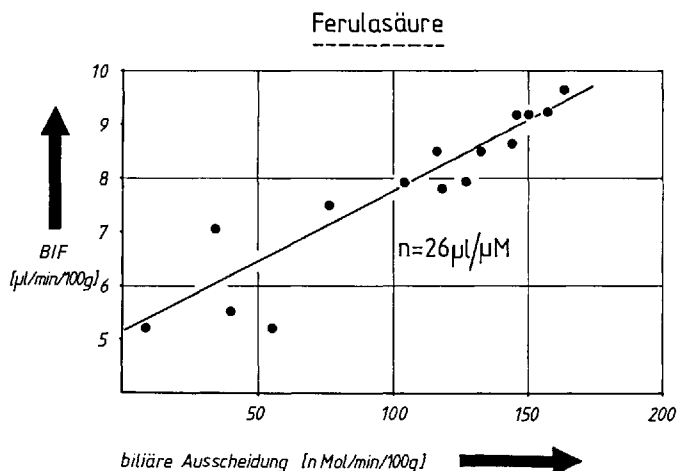


Abb. 4. Korrelation zwischen korrigiertem Gallefluß (Gallefluß – Gallensäure-abhängiger Gallefluß) und biliärer Ausscheidung von Ferulasäure bei Ratten. Die Steigung (n) ist ein Maß für den molaren Volumenbedarf der FS in der Galle.

Die unterschiedlich substituierten Zimtsäuren verhalten sich in dieser Hinsicht nicht einheitlich. Die Verbindungen FS, i-FS, DMZ und TMZ haben Ausscheidungsraten um 20 %. Die Substanzen KS, pCS und mCS werden zu etwa 5 % biliär ausgeschieden. Die pMZ liegt mit ca. 9 % dazwischen, wohingegen die mMZ nur Ausscheidungsraten bis 2,5 % erbringt. Diese Substanz ist außerdem wesentlich toxischer als die übrigen Verbindungen, was sich daran zeigte, daß die Versuchstiere bei der Dosis von 384 $\mu\text{Mol/kg}$ etwa 30 min nach Applikation starben.

Betrachtet man nun den maximalen Gallefluß als Maß für die choleretische Wirksamkeit, so zeigt sich ein überraschendes Bild. Erwartungsgemäß sollten die Verbindungen mit hoher biliärer Ausscheidungsrate auch Steigerungen des Galleflusses ergeben. Das ist bei den Verbindungen FS, i-FS und DMZ auch der Fall. Dagegen zeigt die TMZ trotz Anreicherung in der Galle lediglich eine leichte Cholerease bei der höchsten verwendeten

Tab. 2. Biliäre und renale Ausscheidung sowie maximaler Gallefluß nach i.d. Applikation von Zimtsäurederivaten an der Ratte.

Substanz	Dosis ($\mu\text{Mol/kg}$)	Biliäre Ausscheidung (% d. Dosis/2 h)	Renale Ausscheidung (% d. Dosis/2 h)	Maximaler Gallefluß ($\mu\text{l/min/100 g KG}$)
KS	128	$4,9 \pm 0,4$	$39,8 \pm 10,8$	$8,08 \pm 0,82$
	256	$4,7 \pm 0,3$	$27,5 \pm 8,7$	$10,32 \pm 1,01$
	384	$4,4 \pm 0,7$	$20,3 \pm 5,9$	$10,71 \pm 1,38$
FS	128	$17,2 \pm 1,4$	$70,8 \pm 18,6$	$8,28 \pm 0,59$
	256	$20,7 \pm 3,6$	$46,2 \pm 20,8$	$10,44 \pm 2,28$
	384	$24,2 \pm 1,5$	$36,5 \pm 12,9$	$11,92 \pm 1,26$
i-FS	128	$24,2 \pm 0,6$	$40,9 \pm 25,1$	$8,68 \pm 0,33$
	256	$26,4 \pm 2,6$	$68,6 \pm 16,5$	$10,86 \pm 1,66$
	384	$26,5 \pm 2,5$	$53,9 \pm 15,9$	$12,50 \pm 1,11$
DMZ	128	$18,3 \pm 0,4$	$75,4 \pm 8,2$	$8,50 \pm 1,71$
	256	$20,6 \pm 4,4$	$64,7 \pm 1,6$	$12,26 \pm 0,76$
	384	$19,4 \pm 0,4$	$57,6 \pm 7,8$	$12,13 \pm 0,89$
TMZ	128	$16,7 \pm 1,9$	$56,5 \pm 3,7$	$6,98 \pm 0,27$
	256	$19,7 \pm 0,9$	$52,4 \pm 7,1$	$6,80 \pm 0,07$
	384	$19,1 \pm 1,2$	$39,8 \pm 11,8$	$8,20 \pm 0,77$
pCS	128	$4,2 \pm 0,3$	$69,6 \pm 3,4$	$6,58 \pm 1,00$
	256	$5,0 \pm 0,4$	$46,6 \pm 9,1$	$7,14 \pm 0,63$
	384	$4,7 \pm 0,3$	$36,3 \pm 7,8$	$6,83 \pm 0,71$
mCS	128	$3,6 \pm 0,8$	$89,0 \pm 15,4$	$6,80 \pm 0,23$
	256	$6,6 \pm 1,2$	$59,1 \pm 8,3$	$6,73 \pm 0,81$
	384	$4,9 \pm 0,9$	$28,3 \pm 11,7$	$6,71 \pm 0,50$
pMZ	128	$8,3 \pm 0,8$	$41,3 \pm 12,1$	$6,39 \pm 1,59$
	256	$9,3 \pm 1,2$	$36,1 \pm 6,0$	$7,64 \pm 0,07$
	384	$8,5 \pm 2,0$	$25,3 \pm 3,5$	$7,93 \pm 1,01$
mMZ	128	$1,9 \pm 1,5$	$9,1 \pm 7,3$	$5,96 \pm 0,45$
	256	$2,5 \pm 1,4$	$14,26 \pm 3,3$	$5,92 \pm 0,48$
	384	—	—	—

Konzentration. Die KS hingegen bewirkt trotz geringer biliärer Ausscheidungsrate eine Cholerese, die derjenigen der FS ebenbürtig ist. Diese Beobachtung widerspricht erneut der Hypothese, daß die Cholerese ein osmotischer Effekt der ausgeschiedenen Substanzen ist.

Betrachtet man nun die choleretisch aktiven Substanzen im Hinblick auf strukturelle Verwandtschaften, so erkennt man, daß es sich dabei um die 3,4-disubstituierten Zimtsäuren handelt. Da alle möglichen Kombinationen zwischen Hydroxy- und Methoxygruppen in diesen Stellungen vertreten sind, scheint es für den Effekt belanglos zu sein, ob diese oder jene vertreten ist. Aus den noch zu erörternden metabolischen Studien wird aber deutlich, daß im Falle der DMZ die Abspaltung einer Methylgruppe, die den Weg für eine Kopplung an Glukuronsäure freimacht, in der Leberzelle erfolgt.

Alle untersuchten monosubstituierten Zimtsäuren erwiesen sich als choleretisch inaktiv. Die Werte für die renale Ausscheidung der Substanzen (in % der Dosis/2 h) erhielten wir durch Gewinnung des Gesamtharns aus der Harnblase am Ende des Versuchs. Obwohl die Zahlen mit größeren Streuungen behaftet sind, wird deutlich, daß eine Erhöhung der Dosis allgemein zu einer Verringerung der renalen Ausscheidung führt, wobei lediglich die i-FS eine Ausnahme macht. Außerdem wird deutlich, daß die Substanzen vorwiegend über die Nieren den Körper verlassen. Auffällig ist die geringe Ausscheidungsrate der mMZ, die offenbar Ausdruck einer mangelnden Fähigkeit zur metabolischen Umwandlung ist.

Hemmung der biliären Exkretion durch Na-Cholat-Infusion

Da wir am Beispiel der Ferulasäure festgestellt haben, daß es während der Phase erhöhter Galleproduktion auch zu einer Steigerung der Gallsäureausscheidung kam, prüften wir nun umgekehrt, ob bei einer durch Na-Cholatinfusion bedingten Cholerese die biliäre Ausscheidung der Zimtsäurederivate beeinflusst wird.

Unter dem Einfluß der Cholatinfusion steigerte sich der Gallefluß auf das 2–2,5fache des Normalwertes. Gleichzeitig verringerte sich aber die Konzentration der applizierten Zimtsäurederivate in der Galle, so daß trotz des erhöhten Galleflusses eine Verminderung der biliären Ausscheidungsrate erfolgte. Die Abbildung 5 verdeutlicht diesen Sachverhalt am Beispiel der FS. Gegenübergestellt wurden der zeitliche Konzentrationsverlauf sowie die integrale Ausscheidung der FS mit und ohne Cholatinfusion. Analog verhielten sich auch die übrigen Testsubstanzen. Eine Abweichung konnten wir im Falle der TMZ feststellen (Abb. 6).

Bei dieser Verbindung war die Reduktion der biliären Konzentration etwas geringer, so daß es bis 50 min post appl. unter dem Einfluß der cholatbedingten Cholerese zu einer leichten Erhöhung der Ausscheidungsrate kam.

Da sich der Konzentrationsgehalt zwischen Galle und Serum verringert, die Kinetik der biliären Ausscheidung aber gleich bleibt, ist zu vermuten, daß das erhöhte Angebot an Gallensäuren die hepatozytäre Akkumulation der Zimtsäuren herabsetzt. Eine Kompetition zwischen Gallensäure und Zimtsäurederivat während der Aufnahme in der Leberzelle ist dabei wahrscheinlich.

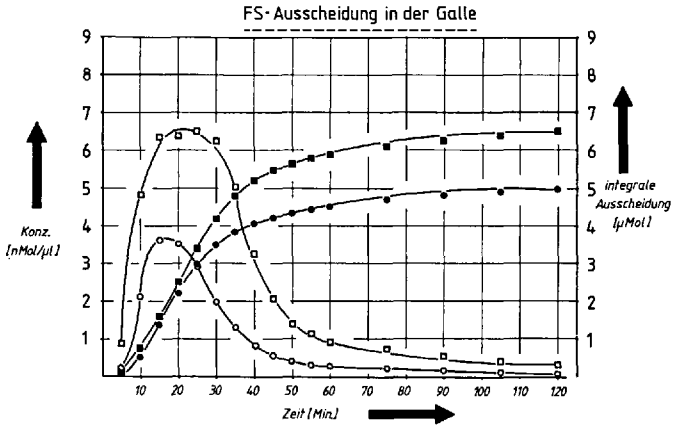


Abb. 5. Ferulasäureausscheidung in der Galle von Ratten nach i.d. Applikation von $384 \mu Mol/kg$ ^{14}C -FS ohne und mit Na-Cholatinfusion ($1,2 \mu Mol/min/100 g$ i.v.).

□ = FS-Ausscheidung ohne Cholatinfusion
 ○ = FS-Ausscheidung bei Cholatinfusion
 ■ = FS-Ausscheidung ohne Cholatinfusion
 ● = FS-Ausscheidung bei Cholatinfusion
 integrale Darstellung des zeitl. Verlaufs

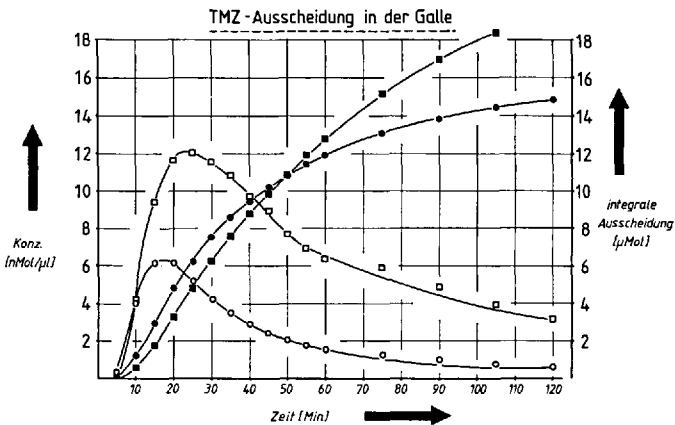


Abb. 6. Trimethoxyzimtsäure-Ausscheidung in der Galle von Ratten nach i.d. Applikation von $384 \mu Mol/kg$ ^{14}C -TMZ ohne und mit Cholatinfusion ($1-2 \mu Mol/min/100 g$ i.v.).

□ = TMZ-Ausscheidung ohne Cholatinfusion
 ○ = TMZ-Ausscheidung bei Cholatinfusion
 ■ = TMZ-Ausscheidung ohne Cholatinfusion
 ● = TMZ-Ausscheidung bei Cholatinfusion
 integrale Darstellung des zeitl. Verlaufs

¹⁴C-Erythritolausscheidung

Um sicherzustellen, daß die choleretisch wirksamen Zimtsäurederivate über eine Steigerung des kanalikulären Galleflusses wirken, bestimmten wir die biliäre Ausscheidung von ¹⁴C-Erythritol, welche zur Bestimmung des kanalikulären Anteils des Galleflusses allgemein verwendet wird. Eine Anreicherung dieser Substanz in der Leberzelle und der kanalikulären Galle gegenüber dem Serum erfolgt nicht. Sollte es aber zu einer duktulären Galleproduktion kommen, dann müßte die ¹⁴C-Erythritolkonzentration unter den entsprechenden Serumwert absinken. Dieses prüften wir am Beispiel der choleretisch aktiven Substanzen FS und DMZ. Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich ist, bewegt sich der ¹⁴C-Erythritol-Quotient aus Serum- und Gallensäurekonzentration immer um den Wert 1, was auf eine kanalikuläre Herkunft des gesteigerten Galleflusses hindeutet.

Metabolismus der Zimtsäurederivate

Die Zimtsäurederivate unterliegen nach Aufnahme in den Körper einer Reihe von Stoffwechselveränderungen. Man hat dabei zu unterscheiden zwischen Reaktionen, die unter dem Einfluß der Darmflora ablaufen und solchen, die durch körpereigene Enzyme katalysiert werden (13). Zu den ersteren gehören hauptsächlich die Hydrierung der C-C-Doppelbindungen in der Seitenkette und der Ersatz einer phenolischen OH-Gruppe durch ein H-Atom, was fast ausschließlich in der para-Position geschieht. Zur zweiten Kategorie gehören die Methylierung einer phenolischen OH-Gruppe, die Abspaltung einer CH₃-Gruppe aus der phenolischen Ätherbindung sowie die oxidative Verkürzung der Seitenkette, wobei die betreffenden Benzoessäurederivate entstehen. Im Harn bzw. in der Galle erscheinen ferner alle diese Verbindungen zum größten Teil als Koppelungsprodukte der Glukuronsäure oder des Glycins. Unter den Bedingungen dieses Versuches entfällt der metabolische Einfluß der Darmflora, da wegen der raschen Resorption der Substanzen und der Ableitung der Galle nach außen ein Kontakt mit den Bakterien des Darms praktisch nicht stattfindet.

Eine Analyse der Metabolitenmuster in Harn und Galle nach Applikation der jeweiligen Zimtsäuren zeigte, daß Unterschiede nur im Hinblick

Tab. 3. ¹⁴C-Erythritolgradient zwischen Galle und Serum nach i. d. Applikation von je 384 µMol/kg FS und DMZ sowie i. v. Injektion von 1 µCi ¹⁴C-Erythritol (spez. Akt. 100 mCi/mMol) an der Ratte in Pentobarbitalnarkose.

Gallefraktion (min p. appl.)	¹⁴ C-Erythritolkonz.	in Galle
	¹⁴ C-Erythritolkonz. FS	im Serum DMZ
10– 20	1,13 ± 0,20	1,00 ± 0,09
20– 30	1,05 ± 0,03	0,99 ± 0,04
30– 60	1,13 ± 0,08	1,08 ± 0,04
60– 90	1,09 ± 0,05	1,11 ± 0,12
90– 120	0,97 ± 0,03	1,03 ± 0,11

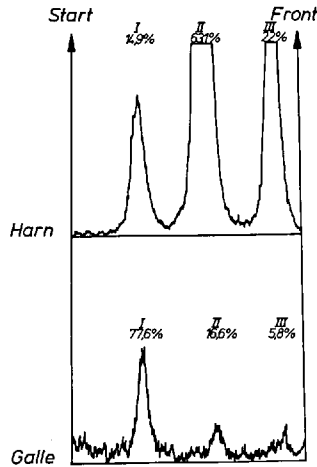


Abb. 7. Radiodünnschicht-Chromatogramme von Harn und Galle nach i.d. Gabe von $384 \mu\text{Mol/kg}$ ^{14}C -m-Cumarsäure auf Kieselgel 60-Platten (Merck) in 2-Butanol-Eisessig-Wasser = 14:1:5.

Aufgetragen wurde ein Aliquot der innerhalb 2 h nach der Applikation gesammelten Harn- bzw. Gallefraktion.

I: Glukuronsäurekonjugat

II: Glycinkonjugat

III: freie m-Cumarsäure

auf die relativen Anteile an den verschiedenen Kopplungsprodukten bestanden. In der Galle überwogen an Glukuronsäure gekoppelte Produkte, während im Harn die Glycinkonjugate vorherrschten. Die Abbildung 7 verdeutlicht dieses am Beispiel der mCS.

Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit die unterschiedlichen Zimtsäurederivate im Organismus inein-

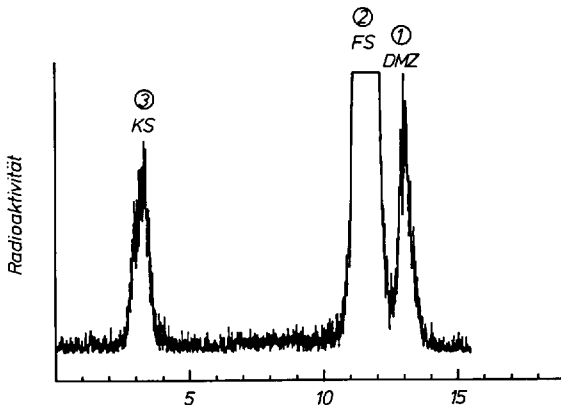


Abb. 8. Radiochromatogramm eines Harnextraktes (Essigesterextrakt) nach i.d. Applikation von $384 \mu\text{Mol/kg}$ ^{14}C -DMZ. Trennung erfolgte auf Kieselgel 60 in Chloroform: Eisessig:Wasser = 2:1:1 (untere Phase).

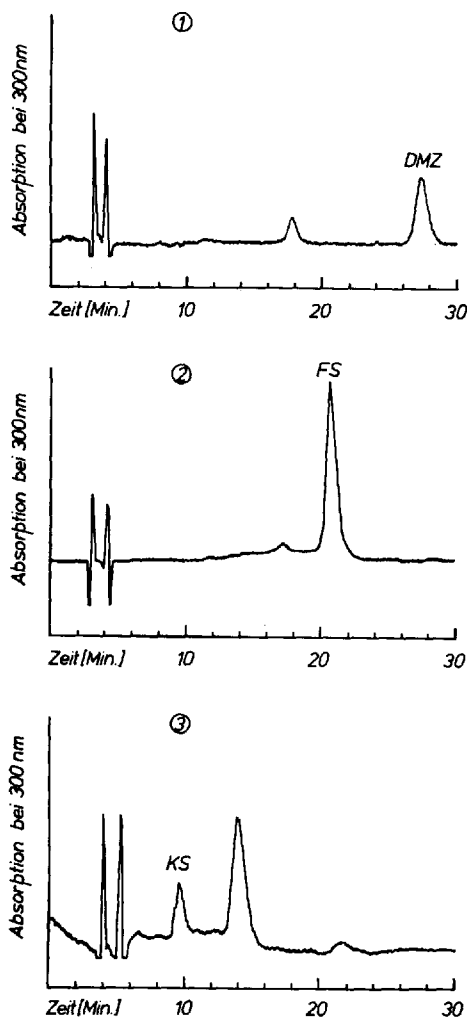


Abb. 9. HPLC-Chromatogramme der von der DC-Trennung der DMZ-Metaboliten (Abb. 8) gewonnenen Trennflecke. Die Trennung erfolgte auf einer 25 cm RP 18/10 μ -Säule mit einem Gemisch aus 10 % Methanol, 80 % Wasser (0,1 % Essigsäure) und 10 % Tetrahydrofuran bei einem Fluß von 1 ml/min.

ander umgewandelt werden können. Hierzu benutzten wir die Essigesterextrakte der Harne nach vorausgegangener Spaltung der Kopplungsprodukte mit Glukuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*. Bemerkenswerterweise wurden dabei auch die Glycinkonjugate gespalten.

Der Vorgang der Trennung und Identifizierung der Metaboliten soll am Beispiel der DMZ gezeigt werden.

Abbildung 8 zeigt ein Radiodünnschichtchromatogramm eines Harnextraktes einer mit ^{14}C -DMZ behandelten Ratte. Es erfolgt eine Auftrennung in 3 Metaboliten. Die R_f -Werte der Trennflecke 1, 2 und 3 sind mit denen

Tab. 4.

Ausgangssubstanz	ausgeschiedene Metaboliten
Kaffeesäure	a) Ferulasäure b) Kaffeesäure c) Vanillinsäure
Ferulasäure	a) Ferulasäure b) Vanillinsäure
iso-Ferulasäure	a) iso-Ferulasäure b) Ferulasäure c) Kaffeesäure
Dimethoxyzimtsäure	a) Ferulasäure b) Dimethoxyzimtsäure c) Kaffeesäure
Trimethoxyzimtsäure	a) Trimethoxyzimtsäure b) Sinapinsäure c) 3,5-Dihydroxymtsäure (?)
p-Methoxyzimtsäure	a) p-Cumarsäure b) p-Methoxyzimtsäure c) Kaffeesäure (wenig)
m-Methoxyzimtsäure	a) m-Cumarsäure b) m-Methoxyzimtsäure c) Ferulasäure (wenig)
p-Cumarsäure	a) p-Cumarsäure b) p-Hydroxybenzoesäure c) Kaffeesäure
m-Cumarsäure	a) m-Cumarsäure b) m-Hydroxybenzoesäure

von DMZ, FS und KS identisch. Die radioaktiven Zonen wurden von der Platte abgekratzt und mit Methanol eluiert. Die auf ein kleines Volumen eingengten Proben wurden dann einer zweiten Trennung durch die HPLC unterworfen.

Die Abbildung 9 zeigt die Chromatogramme der HPLC-Trennung. Die gekennzeichneten Peaks sind hinsichtlich der Retentionszeiten mit den authentischen Substanzen identisch. Bei den übrigen, nicht gekennzeichneten Peaks handelt es sich um nicht radioaktive Harnbestandteile, die durch die DC von den DMZ-Metaboliten nicht abtrennbar waren.

Auf analoge Weise trennten wir auch die Metaboliten der übrigen Zimtsäurederivate.

Die Ergebnisse der aus DC und HPLC kombinierten Trennungen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Die ausgeschiedenen Metaboliten sind in der Reihenfolge ihrer quantitativen Anteile aufgeführt.

Die metabolischen Umwandlungen dienen der Verbesserung der Ausscheidungsfähigkeit. In diesem Sinne werden die Verbindungen, die keine freien phenolischen OH-Gruppen besitzen (DMZ, TMZ, pMZ und

mMZ), durch (oxidative) Abspaltung der Methylgruppen in solche überführt. Diese Reaktion verläuft offenbar bevorzugt bei para-ständigen Methoxygruppen ($\text{DMZ} \rightarrow \text{FS}$, $\text{TMZ} \rightarrow \text{SS}^*$), $\text{pMZ} \xrightarrow{\text{rasch}} \text{pCS}$, $\text{mMZ} \xrightarrow{\text{langsam}} \text{mCS}$, $\text{iFS} \rightarrow \text{KS}$).

Die Einführung einer neuen OH-Gruppe in den Benzolkern konnte gelegentlich beobachtet werden ($\text{pMZ} \rightarrow \text{KS}$, $\text{mMZ} \rightarrow \text{FS}$, $\text{pCS} \rightarrow \text{KS}$) ist aber von untergeordneter Bedeutung, da die Entmethylierung von phenolischen Ätherbindungen oder die Veresterung der Carboxylgruppen mit Glycin oder Glukuronsäure mit ausreichender Geschwindigkeit zu ausscheidungsfähigen Produkten führt. Interessant ist ferner die Beobachtung, daß alle choleretisch aktiven Verbindungen zum großen Teil zu FS verstoffwechselt werden. Die Tatsache, daß der maximale Gallefluß im Verhältnis zu Dosis bei den 4 choleretisch aktiven Substanzen annähernd gleich groß ist (s. Tab. 2), wohingegen die Mengen an biliär ausgeschiedener FS stärker differieren, spricht aber gegen FS als alleinige Ursache des choleretischen Effektes.

Literatur

1. Schöne, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Exp. Pathologie und Pharm. **190**, 372 (1938).
2. Czok, G., W. Midani, R. Finke: Zeitschr. f. Ernährungswiss. Suppl. **14**, 68 (1972).
3. Westendorf, J., G. Czok: Zeitschr. f. Ernährungswiss. **17**, 26 (1978).
4. Schulz, J. M.: Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie **34**, 24 (1980).
5. Herrmann, H.: Die Pharmazie **11**, 433 (1956).
6. Czok, G., W. Walter, K. Knoche u. H. Degner: Zeitschr. f. Ernährungswiss. **13**, 108 (1974).
7. Latza, R., R. Ammon: Ernährungs-Umschau **24**, 169 (1977).
8. Booth, A. N., O. H. Emerson, F. T. Jones, F. DeEds: J. Biol. Chem. **225**, 615 (1957).
9. Horak, W., G. Grabner: Acta Med. Austrian **2**, 73 (1970).
10. Erlinger, S.: Progress in Liver Diseases **4**, 63 (1972).
11. Gaffney, G. W., K. Schreier, N. DiFerrante, K. I. Altmann: J. Biol. Chem. **206**, 695 (1954).
12. Koss, F. W., W. Lamprecht
13. Scheline, R.: J. Pharm. Scienc. **57**, 2021 (1968).

Eingegangen 25. Juli 1983

Für die Verfasser:

Dr. J. Westendorf, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg, Grindelallee 117, 2000 Hamburg 13

*) SS = Sinapinsäure (3,5-methoxy,4-hydroxyzimtsäure).