

Die Bedeutung unverseifbarer Nahrungsfettbestandteile für die Bioaktivität von Vitamin E

R. Koop und I. Elmadfa

Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität,
Gießen

Zusammenfassung

In Experimenten an männlichen Wistar-Ratten wurde die Wirkung der unverseifbaren Komponenten DL- α -Tocopherol (60 ppm), DL- γ -Tocopherol (480 ppm), Ubichinon (96 ppm), β -Sitosterin (3035 ppm) auf den Tocopherolstatus in Abhängigkeit vom Fettsäuremuster der zugeführten Nahrungsfette getestet. Über einen Versuchszeitraum von acht Wochen wurden die Tiere mit isoenergetischen Diäten ernährt, die als Fettart Maisöl (60 % PFS), synthetisches Triglyceridgemisch (Fettsäuremuster wie Maisöl) oder Butter (5 % PFS) enthielten.

Unabhängig vom Polyenfettsäuregehalt der Kost lag die Hämolyserate der Erythrozyten bei α - und γ -Tocopherolgaben im Normalbereich. Das Fehlen dieser Komponenten schlug sich bei den T- und B-Gruppen in einer über 70 %igen Hämolyserate schon nach der zweiten Woche nieder. Die maisöleigenen Tocopherolgehalte konnten die Hämolyserate abschwächen. Keinen Einfluß auf die Membranstabilität hatten Ubichinon und β -Sitosterin, wenn sie ohne Tocopherole verabreicht wurden. Entsprechende Resultate erbrachten die Messungen der Creatinkinaseaktivität und der Creatin- und Creatininausscheidung. Die α - und γ -Tocopherolgehalte von Plasma und Erythrozyten wurden für alle Gruppen bestimmt und in Bezug zu den anderen Parametern diskutiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Tocopherolgehalte von Nahrungsfetten nicht immer ausreichend sind, um einen normalen Tocopherolstatus aufrechtzuerhalten. Dies trifft besonders zu, wenn der Polyenfettsäuregehalt der Nahrung zu hoch ist. Für die Beurteilung des Vitamin-E-Gehaltes eines Nahrungsfettes sollte neben dem α -Tocopherol auch das γ -Tocopherol mehr Beachtung finden als bisher.

Summary

In experiments with male Wistar rats the influence of the non-saponifiable constituents of dietary fats: dl- α -tocopherol (60 ppm), dl- γ -tocopherol (480 ppm), ubiquinone (96 ppm) and β -sitosterol (3035 ppm) on the tocopherol status was investigated, considering the fatty acid composition of the tested fats. For a test period of eight weeks the animals were fed isoenergetic diets containing three types of dietary fats: corn oil (60 % PUFA), a kind of "stripped corn oil" (60 % PUFA) and butter (nearly 5 % PUFA).

Independent of the PUFA-content of the diet, the tocopherol supplementations were able to stabilize the erythrocyte membrane; the calculated hemolysis rates were about 2 %. The absence of tocopherols in the diets ("stripped corn oil", butter) caused an increase of the hemolysis rate up to 70 % after two weeks. The original amounts of tocopherols in corn oil tended to minimize the hemolysis. Ubiquinone and β -sitosterol did not reduce the hemolysis rates when they were applied without tocopherols. With respect to creatine-phosphokinase activity, creatine and

creatinine excretion the results were similar. Plasma and erythrocyte levels of α - and γ -tocopherol were determined in all groups and discussed in connection with the other examined parameters of tocopherol status.

The ultimate result of this experiment is that the content of tocopherols in dietary fats is not always adequate to keep vitamin E status normal, especially if polyunsaturated fatty acid content is high in the diet. Reflecting the vitamin E adequacy of dietary fats, not only α -tocopherol but also γ -tocopherol should be much more considered than previously.

Schlüsselwörter: Tocopherole, Ubichinone, β -Sitosterin, Fettarten, Vitamin-E-Status, Ratte

Einleitung

Der Vitamin-E-Bedarf eines Organismus ist durch verschiedene Faktoren beeinflußbar, besonders durch die Zufuhr von Polyenfettsäuren (3, 24, 25, 54, 56). Zum Schutz dieser Polyenfettsäuren vor Oxidation werden pro g zugeführter Polyenfettsäure 0,4–0,6 mg α -Tocopherol als ausreichend angesehen (14, 22).

Pflanzenöle, die einen hohen Gehalt an Polyenfettsäuren haben, liefern gleichzeitig Tocopherole. Ob dieser Anteil zur Deckung des durch die Polyenfettsäuren verursachten Mehrbedarfs ausreicht, wurde untersucht. Gleichzeitig wurde geprüft, ob andere Komponenten der unverseifbaren Fraktion von Fetten – nämlich Ubichinone und β -Sitosterin – Tocopherole in ihren Funktionen unterstützen können. Ebenso wurde ermittelt, welche Bedeutung den genannten Komponenten, bei Zufuhr eines Fettes mit überwiegend gesättigten Fettsäuren zukommt.

Versuchsaufbau

Entwöhnte männliche Wistar-Ratten (18 Gruppen à 10 Tiere) mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von $82,6 \pm 5,4$ g erhielten über einen Zeitraum von acht Wochen eine semisynthetische Kost ad libitum. Die Zusammensetzung der Kost ist aus Tab. 1 zu ersehen.

Die Versuchsdäten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Fettfraktionen. Verwendet wurden die Fettarten: Butter, Maisöl und ein Triglyceridgemisch. Butter steht als Vertreter eines Fettes mit überwiegend gesättigtem Fettsäuremuster und nur bis zu 5 % Polyenfettsäuren; Maisöl dagegen ist ein Pflanzenöl mit hohem Polyenfettsäureanteil von rund 60 %; das Triglyceridgemisch ist aus Pflanzenölen hergestellt und durch Molekulardestillation weitgehend von seinen unverseifbaren Komponenten befreit. Durch Zusatz von Linolsäuremethylestern konnte das Fettsäuremuster

Tab. 1. Zusammensetzung der Versuchsdäten.

Fett	6 %
Protein als Casein	20 %
Kohlenhydrate als Maisstärke	64 %
Ballaststoffe als Cellulose	4 %
Mineralstoffe	5 %
Vitamine	1 %

Tab. 2. Fettarten und unverseifbare Komponenten in der Kost (Gruppenbildung).

Unverseifbare Komponenten	(mg/kg Futter)	Fettarten (6 g/100 g Futter):		
		Triglycerid	Maisöl	Butter
Keine		T ₀	M ₀	B ₀
DL- α -Tocopherol	60	T ₁	M ₁	B ₁
DL- γ -Tocopherol	480	T ₂	M ₂	B ₂
Ubichinon 45 + 50	96	T ₃	M ₃	B ₃
β -Sitosterin	3035	T ₄	M ₄	B ₄
Mischung aus genannten Komponenten	3671	T ₅	M ₅	B ₅

des Triglyceridgemisches dem des Maisöls angepaßt werden. Somit dient es hier als Modell, um die Wirkung einzelner unverseifbarer Komponenten zu testen.

Durch Zusatz der unverseifbaren Komponenten zu den Versuchsdiäten ergab sich eine weitere Unterteilung der Testkollektive. Zunächst wurde jede Fettart ohne Zusatz verfüttert. T₀, M₀, B₀ galten somit als Kontrollgruppe der jeweiligen Fettart (vgl. Tab. 2). Weiter wurden jeder Fettart zugesetzt: DL- α -Tocopherol, DL- γ -Tocopherol, Ubichinon 45 + 50, β -Sisosterin und eine Mischung aus den genannten Komponenten. In Tabelle 2 sind die Fettarten und die unverseifbaren Komponenten der Versuchsdiäten und die sich hieraus ergebende Gruppierung der Testkollektive aufgezeigt. Die im Maisöl enthaltenen unverseifbaren Komponenten wurden in sechsfacher Menge zugesetzt. Diese Dosis ergab sich aus Vorversuchen, wobei die Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten *in vitro* als Kriterium herangezogen wurde. Die zugeführten Mengen pro kg Futter sind ebenfalls der Tabelle 2 zu entnehmen.

Untersuchungsparameter und Methoden

1. Untersuchungsparameter

Eine Parameterübersicht gibt Tabelle 3. Die hier angeführten Kriterien zur Erfassung des Tocopherolstatus wurden nach 2, 4, und 6 Versuchswochen ermittelt und geben somit einen zeitlichen Verlauf des Tocopherolversorgungszustandes wieder. Die Messung der Creatin- und Creatininausscheidung erfolgte nach 6 Versuchswochen. Die Aussagekraft dieser Parameter für den Tocopherolstatus wurde nach Beendigung des Versuchs durch die Bestimmung der α - und γ -Tocopherolgehalte in Plasma und Erythrozyten erhärtet. Gewichtsverlauf, Futterverzehr und Futterverwertung (Futterverzehr/Gewichtszunahme) wurden wöchentlich dokumentiert, um die Entwicklung der Tiere beobachten zu können.

2. Methoden

Die Hämolyseempfindlichkeit der Erythrozyten wurde nach der Methode von Friedman et al. (18) gemessen. Die Bestimmung der Aktivität der Creatin-Kinase (EC. 2. 7. 3. 2.) erfolgte nach Forster et al. (17). Der Farbstest zur Ermittlung der Creatininausscheidung richtet sich nach der Methode von Kanig (29), Raaflaub und Abelin (48). Die Creatininbestimmung erfolgte enzymatisch nach Wahlefeld et al. (53). Die Bestim-

Tab. 3. Parameterübersicht.

Entwicklung der Tiere:

- Gewichtsentwicklung
- Futterverzehr und
- Futterverwertung

Kriterien zur Erfassung des Tocopherolstatus:

- In-vitro-Hämolyse-eigung der Erythrozyten
- Creatin-Kinase im Plasma
- Creatin- und Creatinin-ausscheidung mit dem Urin

Tocopherolanalysen:

- im Plasma
- in Erythrozyten

mung der Plasma- und Erythrozytentocopherole erfolgte mit Hilfe der HPTLC (high-performance thin-layer chromatography) anhand eines eigens dafür entwickelten Verfahrens (32). Die Aufbereitung der Proben (Verseifung) erfolgte für das Plasma in Anlehnung an die Methode von Bieri und Prival (8), für die Erythrozyten nach einer modifizierten Methode von Kayden et al. (30).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse mit anschließendem Scheffé-Test (12). Mittelwertvergleiche wurden zum einen für die Gruppen einer Fettart, zum anderen für die Gruppen mit den gleichen unverseifbaren Komponenten angestellt.

Ergebnisse und Diskussion**1. Entwicklung der Tiere****1.1 Futteraufnahme und Futterverwertung**

Die Futteraufnahme fällt bei den tocopherolfreien Triglyceridgruppen signifikant ($p < 0,01$) niedriger aus als bei den tocopherolfreien Buttergruppen (vgl. Tab. 4). Wahrscheinlich ist dies dadurch zu erklären, daß das

Tab. 4. Futterverzehr (g), n = 10, $\bar{x} \pm s$.

Unverseifbare Komponenten	Fettarten		
	Triglycerid	Maisöl	Butter
0 Keine	729,5 ± 45,5	769,7 ± 56,0	814,7 ± 42,8
1 α -Tocopherol	775,6 ± 30,6	790,0 ± 51,9	776,2 ± 33,3
2 γ -Tocopherol	763,2 ± 63,2	800,8 ± 57,9	793,7 ± 80,0
3 Ubichinone	746,2 ± 26,7	797,1 ± 58,0	815,8 ± 42,2
4 β -Sitosterin	726,0 ± 48,7	765,4 ± 63,8	813,1 ± 62,9
5 Mischung aus 1-4	801,5 ± 62,7	781,5 ± 90,1	790,3 ± 69,8

Signifikanzen zwischen den Gruppen der gleichen Fettart ($p < 0,05$)

- Triglycerid: $T_5 > T_4$

Signifikanzen zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten ($p < 0,05$)

$T_0 < B_0$; $T_3 < B_3$; $T_4 < B_4$

Triglyceridgemisch eine höhere Anfälligkeit gegenüber Oxidation aufweist als Butter. Der Wegfall des Oxidationsschutzes, wie ihn das Tocopherol darstellt, könnte deshalb zu einer sensorischen Verschlechterung des Futters und damit zu einem geringeren Verzehr geführt haben.

Die Oxidationsrate war jedoch so gering, daß sich hinsichtlich der Futterverwertung keine Unterschiede in den angesprochenen Gruppen ergaben.

1.2. Wachstum

Die für alle Gruppen identische Futterverwertung bedingt auch, daß sich in der Gewichtsentwicklung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ergaben. Die Entwicklung der Tiere verlief

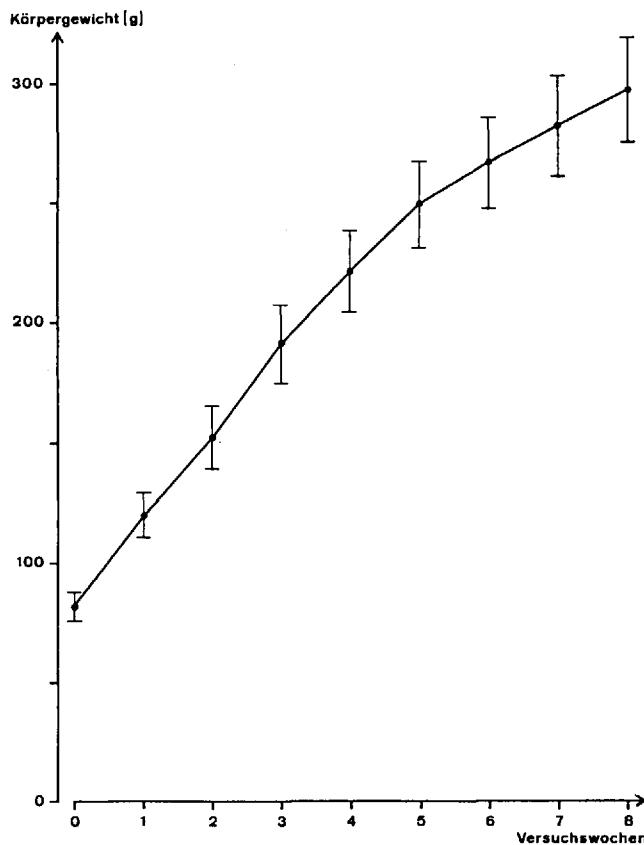


Abb. 1. Einfluß unverseifbarer Nahrungsfettbestandteile auf die Gewichtsentwicklung.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus den Einzeldaten aller Tiere berechnet wurden. Diese Darstellung wurde gewählt, weil es zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede gab.

im übrigen völlig normal, wobei die Gewichtszunahme über acht Wochen ca. 215 g betrug. In der graphischen Darstellung (Abbildung 1) wurde wegen der fehlenden statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf eine Gruppeneinteilung verzichtet. Dieses Ergebnis wird durch andere Versuche bestätigt, in denen sich ein Tocopherolmangel bei der Ratte erst nach längerer Versuchsdauer in einer schlechteren Gewichtsentwicklung bemerkbar machte (32, 36).

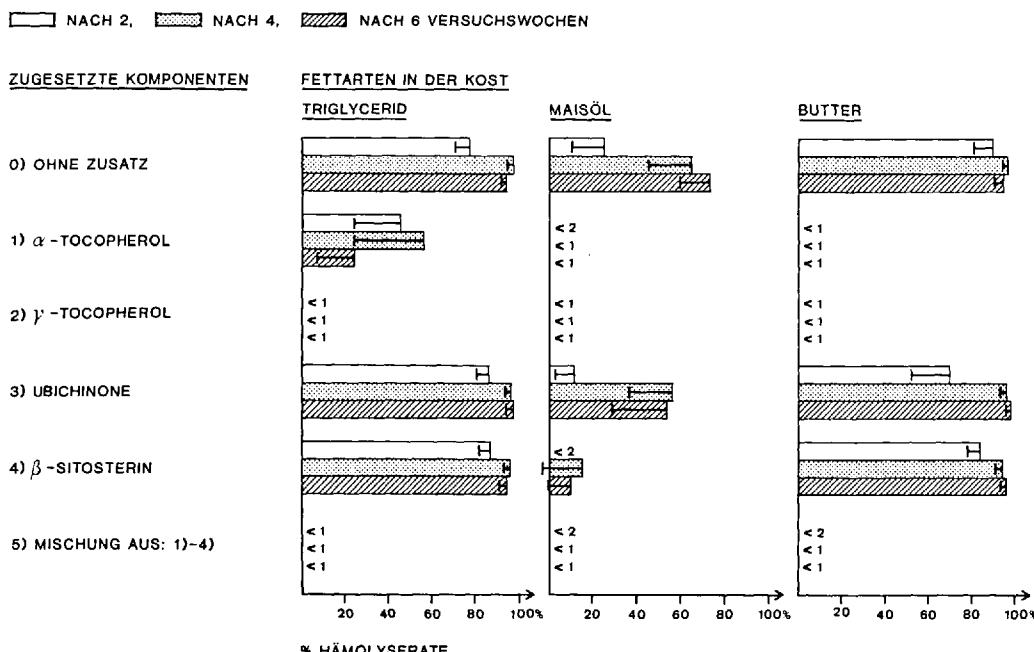


Abb. 2. Einfluß unverseifbarer Nahrungsfettbestandteile auf die In-vitro-Hämolyseneigung der Erythrozyten, ermittelt nach 2, 4 und 6 Versuchswochen, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$.

Signifikanzen zwischen den Gruppen gleicher Fettart ($p < 0,05$)

- Triglycerid:

nach 2 VW: $T_0 > T_1 > T_2, T_5; T_1, T_2, T_5 < T_3 < T_4$

nach 4 VW: $T_0 > T_1 > T_2, T_5; T_1, T_2, T_5 < T_3, T_4$

nach 6 VW: $T_0, T_3, T_4 > T_1, T_2, T_5$

- Maisöl:

Nach 2 VW: $M_4 > M_0 > M_1, M_2, M_5; M_3 > M_1, M_2, M_5$

nach 4 VW: $M_3 > M_0 > M_1, M_2, M_4, M_5$

nach 6 VW: $M_3 > M_0 > M_1, M_2, M_4, M_5$

- Butter:

nach 2 VW: $B_0 > B_1, B_2, B_3, B_5; B_1, B_2, B_5 < B_3 < B_4$

nach 4 VW: $B_0, B_3, B_4 > B_1, B_2, B_5$

nach 6 VW: $B_0, B_3, B_4 > B_1, B_2, B_5$

Signifikanzen zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten ($p < 0,05$)

nach 2 VW: $M_0 < T_0, B_0; T_1 > M_1, B_1; M_3 < B_3 < T_3; M_4 < B_4, T_4$

nach 4 VW: $M_0 < T_0, B_0; T_1 > M_1, B_1; M_3 < B_3 < T_3; M_4 < B_4, T_4$

nach 6 VW: $M_0 < T_0, B_0; T_1 > M_1, B_1; M_3 < B_3 < T_3; M_4 < B_4, T_4$

2. Kriterien zur Erfassung des Tocopherolstatus

2.1 Hämolseneigung der Erythrozyten *in vitro*

Die Hämolseneigung der Erythrozyten gegenüber leicht oxidierend wirkenden Verbindungen, wie z. B. Dialursäure, gilt auch bei der Ratte als Nachweis für einen Vitamin-E-Mangel (7, 26, 27, 49). Abbildung 2 zeigt die Hämolseneigung der Erythrozyten *in vitro*, ermittelt nach 2, 4 und 6 Versuchswochen.

Zunächst ist auffällig, daß die Hämolyserate durch α - und γ -Tocopherol und durch die Mischung aller unverseifbaren Komponenten, unabhängig vom Polyenfettsäuregehalt (vgl. M_1 , B_1 und M_2 , B_2 und M_5 , B_5), unter 2 % gehalten werden konnte. Eine Ausnahme bildet das α -Tocopherol in der Triglycerid-Diät (T_1). Die Hämolyserate lag hier wesentlich höher als in den entsprechenden anderen Versuchsgruppen (M_1 , B_1) und ebenfalls gegensätzlich zu den anderen α - bzw. γ -Tocopherol-supplementierten Gruppen, nahm sie mit der Versuchsdauer ab. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die α -Tocopherolmenge zunächst nicht ausreichte, um den höheren Peroxidgehalt der Triglycerid-Kost gegenüber der Maisöl- und Butter-Diät zu kompensieren. Durch die stetige Tocopherolversorgung und den mit zunehmendem Alter der Ratte abnehmendem Tocopherolbedarf (2, 7, 11, 21) fällt die Hämolyserate zum letzten Untersuchungszeitpunkt hin ab. Jedoch unterscheidet sich T_1 auch dann noch von den entsprechenden Gruppen der anderen Fettarten.

Ohne Gaben von α - oder γ -Tocopherol lag die Hämolyserate schon zum ersten Untersuchungszeitpunkt unabhängig vom Polyenfettsäuregehalt über 70 % (vgl. $T_{0/3/4}$ und $B_{0/3/4}$). Somit scheint das Ubichinon, dem ähnlich wie dem Tocopherol antioxidative Eigenschaft zugeschrieben wird (31, 40, 51), die Hämolyserate im Vitamin-E-Mangel nicht reduzieren zu können (9). Zu verhältnismäßig niedrigeren Hämolyseraten verhalf Ubichinon bei geringem Vorhandensein von Tocopherol (vgl. M_3). Hier scheint es die membranstabilisierende Wirkung von Tocopherol unterstützen zu können (13).

Auch β -Sitosterin konnte aus unbekannten Gründen die membranstabilisierende Wirkung des Tocopherols erhöhen. Jedoch sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß diese Wirkung nur im Verbund mit den anderen unverseifbaren Komponenten des Maisöls erreicht wurde. Keinen Einfluß auf die Membranstabilität hatten Ubichinone und β -Sitosterin, wenn sie ohne Tocopherol verabreicht wurden ($T_{3/4}$ und $B_{3/4}$).

Bei den Tieren der Maisölgruppen machte sich schon der relativ geringe Tocopherolgehalt des Maisöls (M_0) durch eine niedrigere Hämolyserate positiv bemerkbar. Doch im Gegensatz zu Lehmanns Untersuchungen (33) reichte diese Tocopherolmenge im Futter nicht aus, um dieses Tocopherolmangelsymptom zu vermeiden. Auch Poukka-Everts und Bieri wiesen für Maisöl einen adäquaten Tocopherolgehalt zur Vermeidung von Mangelsymptomen nach (47). Vermutlich war jedoch der α -Tocopherolgehalt des von ihnen verwendeten Maisöls höher.

2.2 Creatin-Kinase-Aktivität im Plasma

Mit dem Vitamin-E-Mangel geht eine erhöhte Plasma-Creatin-Kinase-Aktivität einher (6, 10, 23, 37, 52). Sie gilt als ein Indikator einer beginnen-

den Muskelschädigung (6, 23, 52) und geht dieser voraus (59). Abbildung 3 zeigt, daß sich die Zufuhr von α - und γ -Tocopherol bei jeder Fettart in niedrigeren Creatin-Kinase-Aktivitäten widerspiegelt. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei einem Versuch mit Meerschweinchen berichtet (15). In diesen Untersuchungen zeigte sich deutlich, daß die Creatin-Kinase um so schneller ansteigt, je höher der Polyenfettsäuregehalt in der Kost ist. Im Gegensatz zum Hämolysetest waren bei der Creatin-Kinase in unseren

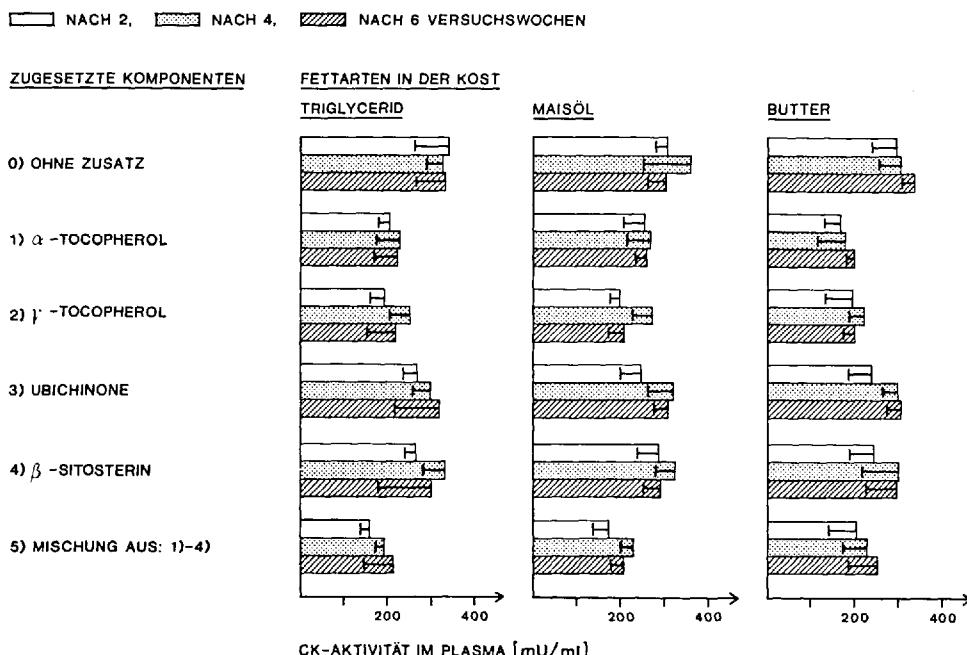


Abb. 3. Einfluß unverseifbarer Nahrungsfettbestandteile auf die Creatin-Kinase-Aktivität im Plasma, ermittelt nach 2, 4 und 6 Versuchswochen, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$.

Signifikanzen zwischen den Gruppen gleicher Fettart ($p < 0,05$)

– Triglycerid:

nach 2 VW: $T_0, T_3, T_4 > T_2, T_5; T_0 > T_1$

nach 4 VW: $T_0, T_3, T_4 > T_5; T_0, T_4 > T_1$

nach 6 VW: ns

– Maisöl:

nach 2 VW: $M_0, M_1, M_3, M_4 > M_5; M_0, M_4 > M_2$

nach 4 VW: $M_0, M_3, M_4 > M_5$

nach 6 VW: $M_0, M_3, M_4 > M_2, M_5$

– Butter:

nach 2 VW: $B_0 > B_1, B_2, B_5$

nach 4 VW: $B_0, B_3, B_4 > B_1$

nach 6 VW: $B_0, B_3, B_4 > B_1, B_2$

Signifikanzen zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten ($p < 0,05$)

nach 2 VW: $M_1 > T_1, B_1$

nach 4 VW: $M_1 > B_1$

nach 6 VW: $M_1 > B_1$

Untersuchungen diese Unterschiede nicht so ausgeprägt. Die Tendenz bleibt jedoch bestehen, obwohl die eindeutige statistische Absicherung fehlt.

Ubichinon, das bei Kindern mit Muskeldystrophie zu einer Senkung der Plasma-Creatin-Kinase führte (16), zeigte in unseren Untersuchungen keinen Effekt in dieser Hinsicht.

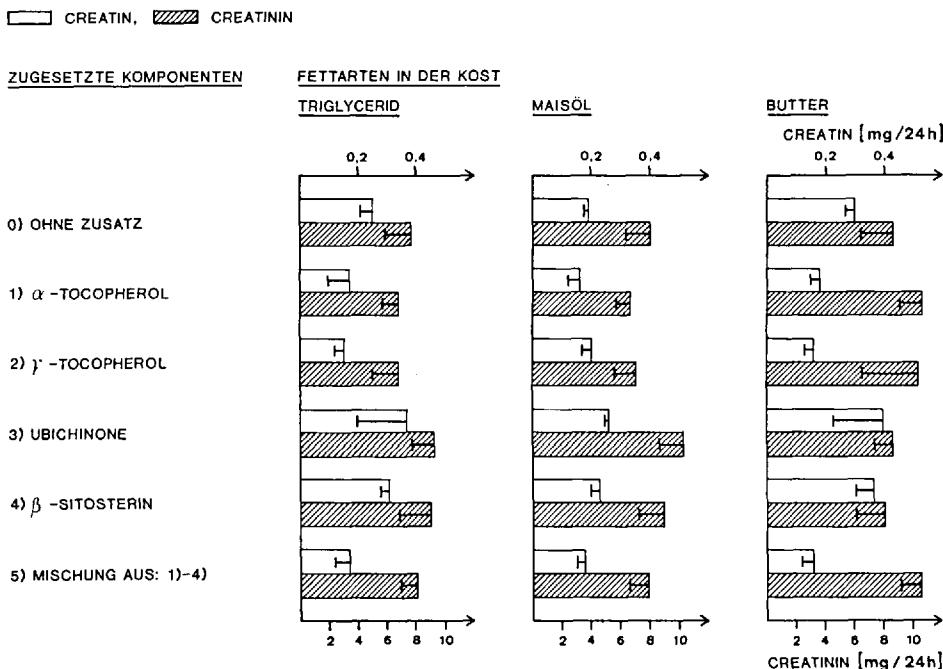


Abb. 4. Einfluß unverseifbarer Nahrungsfettbestandteile auf die Creatin- und Creatininausscheidung im Urin, ermittelt nach 6 Versuchswochen, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$.

Signifikanzen für Creatininausscheidung ($p < 0,05$)

- zwischen den Gruppen gleicher Fettart

- Triglycerid: $T_3 > T_1, T_2, T_5$
- Maisöl: $M_3 > M_0, M_1, M_5$
- Butter: $B_0 > B_1, B_2, B_5; B_3, B_4 > B_1, B_2, B_5$

Signifikanzen zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten

$M_0 < B_0; M_3 < B_3; M_4 < T_4, B_4$

Signifikanzen für Creatininausscheidung ($p < 0,05$)

- zwischen den Gruppen gleicher Fettart

- Triglycerid: ns
- Maisöl: $M_3 > M_1, M_2$
- Butter: ns

Signifikanzen zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten

$B_1 > M_1, T_1; M_5, T_5 < B_5$

2.3 Creatin- und Creatinin-Ausscheidung mit dem Urin

Ein weiterer biochemischer Test für die Tocopherolversorgung ist die Messung der Creatin- und Creatininausscheidung mit dem Urin. Die im Tocopherolmangel nachweisbare Creatinurie (42, 57) zeigte sich bei den Tieren der tocopherolfreien Gruppen T_0 , T_3 , T_4 (vgl. Abb. 4). Bei den Maisölgruppen gab es keine so deutlichen Unterschiede (vgl. M_0 , M_1). Auch hier verhinderten die maisöleigenen Tocopherole ein Auftreten von Mangelsymptomen bis zu diesem Zeitpunkt. Trotz des angenommenen

PLASMATOCOPHEROLE: α -TOCOPHEROL, γ -TOCOPHEROL

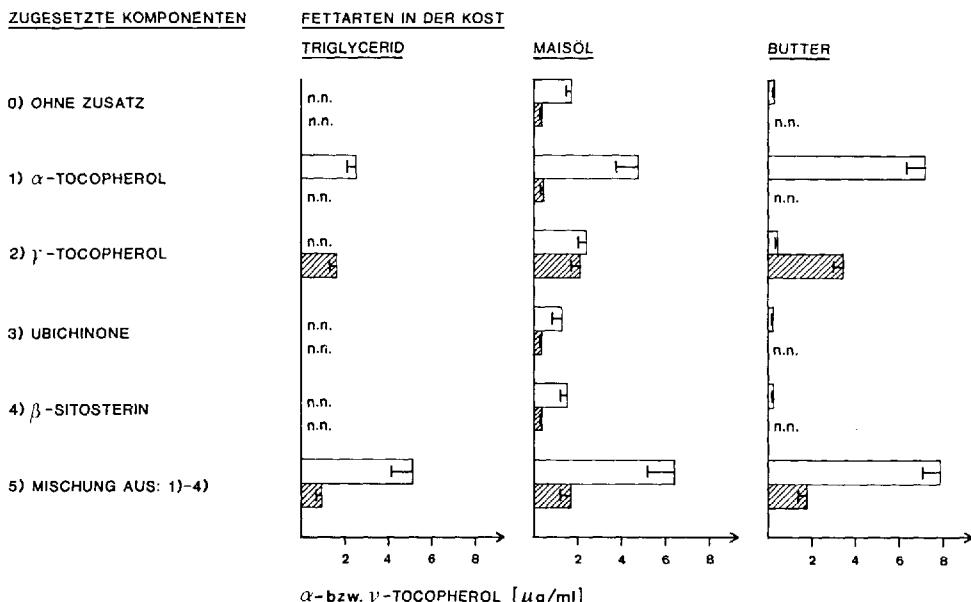


Abb. 5. Einfluß unverseifbarer Nahrungsfettbestandteile auf den α - und γ -Tocopherolgehalt des Plasmas, ermittelt nach 8 Versuchswochen, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$.

Signifikanz für α -Tocopherol ($p < 0,05$)

- zwischen den Gruppen gleicher Fettart

- Triglycerid: $T_1 < T_5$
- Maisöl: $M_5 > M_0, M_2, M_3, M_4; M_1 > M_0, M_2, M_3, M_4; M_2 > M_3$
- Butter: $B_1, B_5 > B_0, B_2, B_3, B_4$

- zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten

- $M_0 > B_0; B_1 > M_1 > T_1; M_2 > B_2; M_3 > B_3; M_4 > B_4; B_5, M_5 > T_5$

Signifikanz für γ -Tocopherol ($p < 0,05$)

- zwischen den Gruppen gleicher Fettart

- Triglycerid: $T_2 > T_5$
- Maisöl: $M_2, M_5 > M_0, M_1, M_3, M_4$
- Butter: $B_2 > B_5$

- zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten

- $B_2 > M_2, T_2; B_5, M_5 > T_5$

geringeren Tocopherolbedarfs der Tiere der Buttergruppen (57), machte sich auch hier ein Mangel durch höhere Creatinausscheidung bemerkbar.

Die Creatinausscheidung war bei polyenfettsäurerreicher Kost (Triglyceridgemisch) in den tocopherolfreien Gruppen höher als in den unversorgten Gruppen (T_3 , T_4 , T_1 , T_2 , T_5). Bei Zufuhr eines gesättigten Fettes zeigte sich das umgekehrte Bild. Die Creatinausscheidung lag bei den tocopherolversorgten Gruppen höher. Dies ist ein Zeichen, daß die physiologischen Verhältnisse der Relation von Creatin- zu Creatinausscheidung gewahrt blieben.

ERYTHROZYTENTOCOPHEROLE: □ α -TOCOPHEROL, ■ γ -TOCOPHEROL

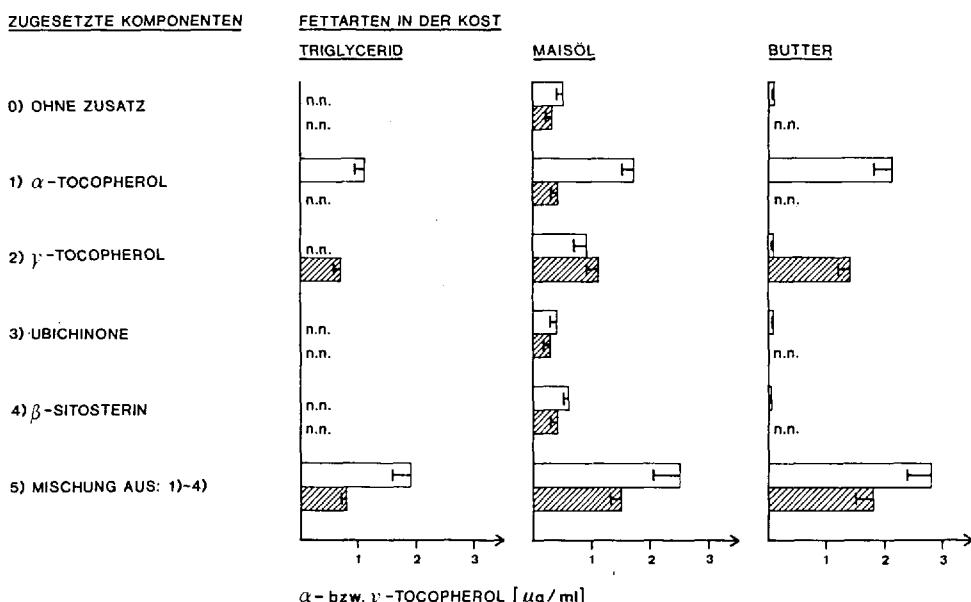


Abb. 6. Einfluß unverseifbarer Nahrungsfettbestandteile auf den α - und γ -Tocopherolgehalt der Erythrozyten, ermittelt nach 8 Versuchswochen, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$.

Signifikanzen für α -Tocopherol ($p < 0,05$)

- zwischen den Gruppen gleicher Fettart

- Triglycerid: $T_5 > T_1$

- Maisöl: $M_5 > M_0, M_1, M_2, M_3, M_4; M_1 > M_0, M_2, M_3, M_4; M_2 > M_3, M_0$

- Butter: $B_5 > B_1 > B_0, B_2, B_3, B_4$

- zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten

$M_0 > B_0; B_1 > M_1, T_1; M_2 > B_2; M_3 > B_3; M_4 > B_4; B_5, M_5 > T_5$

Signifikanzen für γ -Tocopherol ($p < 0,05$)

- zwischen den Gruppen mit gleicher Fettart

- Triglycerid: ns

- Maisöl: $M_5 > M_2 > M_0, M_1, M_3, M_4$

- Butter: ns

- zwischen den Gruppen mit gleichen Komponenten

$B_2 > M_2 > T_2; M_5 > T_5$

3. Tocopherolgehalte in Plasma und Erythrozyten

Abbildung 5 zeigt die Tocopherolgehalte im Plasma. Es ist sofort ersichtlich, daß ohne Tocopherolzulagen im Futter, die Plasmakonzentrationen nach acht Versuchwochen auf nicht mehr nachweisbare Konzentrationen sanken.

Die α -Tocopherolkonzentration im Plasma hängt direkt von der Menge des Nahrungstocopherols ab (34, 58). Sie ist aber auch Ausdruck des verfütterten Nahrungsfettes. Während Machlin et al. (38) keinen Unterschied im Plasmatocopherolgehalt bei Verfütterung von Schmalz bzw. Maisöl fand, lag in unserem Versuch die α -Tocopherolkonzentration im Plasma bei den polyenfettsäurereichen Fetten niedriger. Zu diesem Ergebnis, das frühere Befunde unserer Arbeitsgruppe bestätigt (14), kamen auch Wilson et al. bei Kaninchen (55). Wahrscheinlich spielt hier die geringere Resorptionsrate von Tocopherol bei Zufuhr von Polyenfettsäuren eine Rolle (20).

Auch für γ -Tocopherol zeichnete sich das beschriebene Bild ab. γ -Tocopherol – es wurde in biologisch äquivalenten Mengen zugesetzt – erreichte jedoch nur halb so hohe Plasmakonzentrationen wie α -Tocopherol. Dies könnte Ausdruck einer geringeren Resorption (46) und/oder Retention des γ -Tocopherols im Organismus (5) sein.

Besonders bemerkenswert ist, daß bei gleichzeitiger Gabe von α - und γ -Tocopherol, die α -Tocopherolkonzentrationen höher lagen als in den entsprechenden α -Tocopherolgruppen. Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich, daß die antioxidative Kapazität des γ -Tocopherols größer ist als die des α -Tocopherols (28, 39, 43, 44). γ -Tocopherol wird deshalb im Organismus wohl eher zu antioxidativen Schutzfunktionen herangezogen, was gewissermaßen einen α -tocopherolsparenden Effekt haben könnte, der sich in höheren α -Tocopherol-Plasmakonzentrationen ausdrückt.

Das für die Tocopherolgehalte im Plasma beschriebene Bild spiegelte sich auch in den Erythrozyten wider (Abb. 6). Jedoch lagen hier die Konzentrationen, wie zu erwarten (1, 41), niedriger.

Schlußbetrachtung

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Tocopherolgehalte der verwendeten Nahrungsfette nicht ausreichen, biologisch verfügbare Tocopherolreserven – gemessen an Plasma- und Erythrozytenkonzentration – aufrechtzuerhalten, um biochemische Veränderungen zu verhindern. Zusätze von α - und γ -Tocopherol, getrennt oder in Mischung, führen zu einem Anstieg der Tocopherolkonzentrationen in Plasma und Erythrozyten, abhängig von der Fettart. Beide Tocopherolgehalte hängen damit direkt vom Nahrungstocopherol bzw. einem leicht mobilisierbaren Tocopherolspeicher – wie z. B. der Leber (19, 32) – ab.

Entscheidende Auswirkungen hat dies auf die Stabilität der Erythrozytenmembran – wie der Hämolysetest zeigte – aber auch auf andere Membransysteme, wie z. B. die Mitochondrienmembran (50). Diese Schutzfunktionen der Tocopherole für Membranen ist wohl in erster Linie auf ihre antioxidative Wirkung zurückzuführen. Ihre mögliche Funktion als spezifischer Membranstabilisator (35) könnte dabei unterstützend wirken.

Wesentlich erscheint die Tatsache, daß raffinierte Pflanzenöle mit hohem Polyenfettsäuregehalt nicht immer ausreichende Tocopherolgehalte aufweisen, um die ungesättigten Fettsäuren vor einer Peroxidierung zu schützen. Dies gilt sowohl für die Lagerung der Fette als auch für ihre Funktionen *in vivo*. Da eine Minderung der Tocopherolverluste bei der Raffination durch schonendere Verfahren in naher Zukunft nicht zu erwarten ist, erhebt sich die Frage, ob eine Vitaminierung empfohlen werden sollte.

Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, daß für die Beurteilung des Vitamin-E-Gehaltes eines Nahrungsfettes nicht nur der α -Tocopherolgehalt herangezogen werden sollte. Die für die menschliche Ernährung relevanten Pflanzenöle liefern in beträchtlichem Umfang auch γ -Tocopherol (64), das die Wirkung von α -Tocopherol unterstützen oder teilweise ersetzen kann. Auch veranlassen diese Ergebnisse unter Berücksichtigung weiterer Paralleluntersuchungen (50), die biologische Wirksamkeit des γ -Tocopherols von nur 10 % des α -Tocopherols (45) neu zu überdenken.

Der Zusatz der unverseifbaren Komponenten Ubichinon und β -Sitosterin allein zeigt anhand der aufgezeigten Untersuchungsparameter keine Wirkung auf den Tocopherolstatus.

Literatur

1. Aftergood, L., R. B. Alfin-Slater: Effect of administration of α - and γ -tocopherol on tissue distribution and red cell hemolysis in rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **48**, 32–37 (1978).
2. Bieri, J. G.: Kinetics of tissue α -tocopherol depletion and repletion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **203**, 181–191 (1972).
3. Bieri, J. G., R. K. H. Poukka: In vitro hemolysis as related to rat erythrocyte content of α -tocopherol and polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* **100**, 557–564 (1970).
4. Bieri, J. G., R. Poukka-Evarts: Vitamin E activity of gamma-tocopherol in the rat, chick and hamster. *J. Nutr.* **104**, 850–857 (1974).
5. Bieri, J. G., R. Poukka-Evarts: Gamma Tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition. *J. Clin. Nutr.* **27**, 980–986 (1974).
6. Bieri, J. G., R. Poukka-Evarts: Vitamin E adequacy of vegetable oils. *J. Am. Diet. Assoc.* **66**, 134–139 (1975).
7. Bieri, J. G., R. Poukka-Evarts, J. J. Gart: Relative activity of α -tocopherol and γ -tocopherol in preventing oxidative red cell hemolysis. *J. Nutr.* **106**, 124–127 (1976).
8. Bieri, J. G., E. L. Prival: Serum vitamin E determined by thin-layer chromatography. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **120**, 554–557 (1965).
9. Bunyan, J., J. Green, E. E. Edwin, A. T. Diplock: Studies on vitamin E. 3. The relative activities of tocopherols and some other substances *in vivo* and *in vitro* against dialuric acid-induced haemolysis of erythrocytes. *Biochem. J.* **75**, 460–467 (1960).
10. Chen, L. H., C. T. Lin: Some enzymatic changes associated with pathological changes in rats with long-term vitamin E-deficiency. *Nutr. Rep. Int.* **21**, 387–395 (1980).
11. Chow, C. K., C. J. Chen: Dietary selenium and age-related susceptibility of rat erythrocytes to oxidative damage. *J. Nutr.* **110**, 2460–2466 (1980).
12. Diehl, J. M.: Varianzanalyse, 4. Aufl., Methoden in der Psychologie 3. Fachbuchhandlung für Psychologie, Verl.-Abt. (Ffm. 1983).

13. Diplock, A. T.: The biological function of vitamin E and the nature of the interaction of the vitamin with selenium. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* **31**, 178–183 (1982).
14. Elmadafa, I.: Beitrag zur Wirkungsweise, Bedarfsermittlung und Hypervitaminose von Tocopherol; Untersuchungen am Meerschweinchen. *Habilitationsschrift*, Gießen 1975.
15. Elmadafa, I., W. Feldheim: Enzymaktivitäten, Metaboliten und klinisch nachweisbare Veränderungen beim Tocopherolmangel am Meerschweinchen. *Int. Z. Vit. Ern. Forsch.* **41**, 490–503 (1971).
16. Folkers, K., R. Nakamura, G. P. Littarru, H. Zellweger, J. B. Brunkhorst, C. W. Williams, J. H. Langston: Effect of coenzyme Q on serum levels of creatine phosphokinase in preclinical muscular dystrophy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 2098–2102 (1974).
17. Forster, G., E. Bernt, H. U. Bergmeyer: In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.). *Methoden der enzymatischen Analyse*, S. 817–821. 3. Aufl., Bd. I, Verlag Chemie (Weinheim 1974).
18. Friedman, L., W. Weiss, F. Wherry, O. L. Kline: Bioassay of vitamin E by the dialuric acid hemolysis method. *J. Nutr.* **65**, 143–160 (1958).
19. Gallo-Torres, H. E.: Transport and metabolism. *Basic and Clinical Nutr.* **1**, 193–267 (1981).
20. Gallo-Torres, H. E., F. Weber, O. Wiss: The effect of different dietary lipids on the lymphatic appearance of vitamin E. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **41**, 504–515 (1971).
21. Grinna, L. S.: Effect of dietary α -tocopherol on liver microsomes and mitochondria of aging rats. *J. Nutr.* **106**, 918–929 (1976).
22. Harris, P. L., N. D. Embree: Quantitative considerations of the effect of polyunsaturated fatty acid content of the diet upon the requirements for vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **13**, 385–392 (1963).
23. Hess, J. W., R. P. McDonald, R. J. Frederick, R. N. Jones, J. Neely, Gross: Serum creatine phosphokinase activity in disorders of heart and skeletal muscle. *Annals Int. Med.* **61**, 1015–1028 (1964).
24. Horwitt, M. K., C. C. Harvey, B. Century, L. A. Witting: Polyunsaturated lipids and tocopherol requirements. *J. Am. Dietet. Assoc.* **38**, 231–235 (1961).
25. Jager, F. C., U. M. T. Houtsmailler: Effect of dietary linoleic acid on vitamin E requirement and fatty acid composition of erythrocyte lipids in rats. *Nutr. Metab.* **12**, 3–12 (1970).
26. Jager, F. C.: Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis *in vitro*. *Nutr. Dieta* **10**, 215–223 (1968).
27. Jager, F. C.: Long-term dose-response of vitamin E in rats. Significance of the *in vitro* haemolysis test. *Nutr. Metabol.* **14**, 1–7 (1972).
28. Juillet, M. T.: Vergleich der Vitamin- und Antioxidantienwirkung der verschiedenen Tocopherole bei den wichtigsten Pflanzenölen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **77**, 101–105 (1975).
29. Kanig, K.: Zur photometrischen Bestimmung von Kreatin mit der Diacetyl-Reaktion. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **306**, 247–259 (1957).
30. Kayden, H. J., Ch.-K. Chow, L. K. Bjornson: Spectrophotometric method for determination of tocopherol in red blood cells. *J. Lip. Res.* **14**, 533–540 (1973).
31. Kibata, M., Y. Higuchi: Serum α -tocopherol, coenzyme Q, and thiobarbituric acid reactive substance in acute myocardial damage and stroke. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **393**, 179–182 (1982).
32. Koop, R.: Einfluß von α - und γ -Tocopherol, Ubichinon und β -Sitosterin auf den Vitamin-E-Status wachsender Ratten. Dissertation (in Vorbereitung), Gießen 1983.
33. Lehmann, J.: Comparative sensitivities of tocopherol levels of platelets, red blood cells, and plasma for estimating vitamin E nutritional status in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 2104–2110 (1981).

34. Lehmann, J., M. W. Marshall, H. I. Slover, J. M. Iacono: Influence of dietary fat level and dietary tocopherols on plasma tocopherols of human subjects. *J. Nutr.* **107**, 1006–1015 (1977).
35. Lucy, J. A.: Functional and structural aspects of biological membranes: a suggested role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **203**, 4–11 (1972).
36. Machlin, L. J., R. Filipski, J. Nelson, L. R. Horn, M. Brin: Effects of prolonged vitamin E deficiency in the rat. *J. Nutr.* **107**, 2100–2108 (1977).
37. Machlin, L. J., E. Gabriel, H. E. Spiegel, L. R. Horn, M. Brin, J. Nelson: Plasma activity of pyruvate kinase and glutamic oxalacetic transaminase as indices of myopathie in the vitamin E deficient rat. *J. Nutr.* **108**, 1963–1968 (1978).
38. Machlin, L. J., J. Keating, J. Nelson, M. Brin, R. Filipski, O. N. Miller: Availability of adipose tissue tocopherol in the guinea pig. *J. Nutr.* **109**, 105–109 (1979).
39. Mead, J. M.: Membrane lipid peroxidation and its prevention. *JAOCs* **57**, 393–397 (1980).
40. Mellors, A., A. L. Tappel: The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **241**, 4353–4356 (1966).
41. Mino, M., M. Kitagawa, S. Nakagawa: Changes of α -tocopherol levels in red blood cells and plasma with respect to hemolysis induced by dialuric acid in vitamin-E-deficient rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **27**, 199–207 (1981).
42. Nitowski, H. M., K. S. Hsu, H. H. Gordon: Vitamin E requirements of human infants. *Vit. Horm.* **20**, 559–571 (1962).
43. Olcott, H. S., J. van der Veen: Comparison of antioxidant activities of tocol and its methyl derivatives. *Lipids* **3**, 331–334 (1968).
44. Parkhurst, R. M., W. A. Skinner, P. A. Sturm: The effect of various concentrations of tocopherols and tocopherol mixtures on the oxidative stability of a sample of lard. *JAOCs* **45**, 641–642 (1968).
45. Peake, L. R., J. G. Bieri: alpha- and gamma-tocopherol in the rat: *in vitro* and *in vivo* tissue uptake and metabolism. *J. Nutr.* **101**, 1615–1622 (1971).
46. Peake, I. R., H. G. Windmüller, J. G. Bieri: A comparison of the intestinal absorption, lymph and plasma transport, and tissue uptake of α - and γ -tocopherol in the rat. *Biochem. Biophys. Acta* **260**, 679–688 (1972).
47. Poukka-Everts, R., J. G. Bieri: Ratios of polyunsaturated fatty acids to α -tocopherol in tissues of rats fed corn or soybean oils. *Lipids* **9**, 860–866 (1974).
48. Raaflaub, J., J. Abelin: Über eine Methode der direkten Bestimmung des Kreatingehaltes des Harns. *Biochem. Z.* **321**, 158–165 (1950).
49. Rose, C. E., P. György: Specificity of hemolytic reaction in vitamin E deficient erythrocytes. *Am. J. Physiol.* **168**, 414–420 (1952).
50. Schäfer, H., I. Elmada: Einfluß nichtverseifbarer Komponenten in Nahrungs-fetten auf die Atmung von Rattenlebermitochondrien. Vortrag auf der 36. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere, Gießen, 24.–26. 3. 1982.
51. Sugiyama, S., M. Kitazawa, T. Ozawa, K. Suzuki, Y. Izawa: Antioxidative effect of coenzyme Q₁₀. *Experientia* **36**, 1002–1003 (1980).
52. Thomson, W. H. S.: Serum enzyme studies in inherited disease of skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* **35**, 183–191 (1971).
53. Wahlefeld, A. W., G. Holz, H. U. Bergmeyer: In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, S. 1834–1838. 3. Aufl., Bd. II, Verlag Chemie (Weinheim 1974).
54. Weber, F., H. Weisser, O. Wiss: Bedarf an Vitamin E in Abhängigkeit von der Zufuhr an Linolsäure. *ZfE* **4**, 245–253 (1964).
55. Wilson, R. B., C. C. Middleton, G. Y. Sun: Vitamine E antioxidants and lipid peroxidation in experimental atherosclerosis of rabbits. *J. Nutr.* **108**, 1858–1867 (1978).
56. Witting, L. A.: Vitamin E-polyunsaturated lipid relationship in diet and tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**, 952–959 (1974).

57. Witting, L. A., E. M. Harmon, M. K. Horwitt: Extent of tocopherol depletion versus onset of creatinuria in rats fed saturated or unsaturated fat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **120**, 718–721 (1965).
58. Yang, N. Y. J., I. D. Desai: Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats. J. Nutr. **107**, 1418–1426 (1977).
60. Zalkin, H., A. L. Tappel, K. A. Caldwell, S. Shibko, I. Desai, T. A. Holliday: Increased lysosomal enzymes in muscular dystrophy of vitamin E-deficient rabbits. J. Biol. Chem. **237**, 2678–2682 (1962).

Eingegangen 25. Juli 1983

Für die Verfasser:

Prof. Dr. I. Elmadafa, Institut für Ernährungswissenschaft, Wilhelmstraße 20,
D-6300 Gießen