

In vivo og in vitro hydrolyse og omsætning af alternativ blødgører

Soft-N-Safe er udviklet som alternativ til phthalater i blødgjort PVC og andre plasttyper. Her beskrives de undersøgelser, Danisco har foretaget af hydrolyse, absorption, distribution, metabolisme og ekskretion

Af Flemming Vang Sparsø, Senior Scientist og Torkil Fischer Jensen, Senior Scientist, Danisco A/S

GRINDSTED¹ SOFT-N-SAFE, der tidligere er omtalt i Dansk Kemi [1], er udviklet som et svar på mistanken om phthalaters hormonforstyrrende effekter.

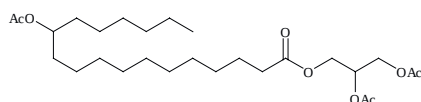
Denne artikel handler om de undersøgelser, Danisco har foretaget af hydrolyse, absorption, distribution, metabolisme og ekskretion af Soft-N-Safe i tre *in vitro* hydrolyse-studier i fordøjelsesvæskesimulanterne spyt, mavesaft og intestinal væske (pancreatin) samt to *in vivo* studier i Sprague-Dawley rotter, hvor absorption, metabolisme, distribution og ekskretion af den radioaktivt mærkede hovedkomponent, 12-([1-¹⁴C]-acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester blev undersøgt.

Soft-N-Safe består overvejende af de acetylerede monoglycerider og diglycerider af fuldhærdet castorolie. Den typiske fedtsyresammensætning af hærdet castorolie er vist i tabel 1.

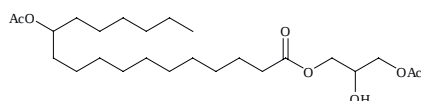
Hardened Castor Oil	
Fatty Acid	Content [%]
Palmitic (C16)	1.3
Stearic (C18)	9.3
Oleic (C18:1)	0.9
Linoleic (C18:2)	0.2
Arachidic (C20)	0.7
Ricinoleic, hard (C18-OH)	84.9

Tabel 1. Fedtsyresammensætning af fuldhærdet castorolie.

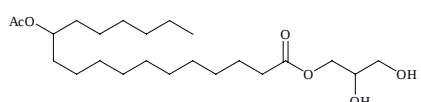
Figur 1 viser en oversigt over de kemiske strukturer og forkortelser, der vil blive omtalt i det følgende, uden dog at medtage positionsisomerer med samme molvægt.



12-(acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propyl ester
MONO 2AC 18OAc



12-(acetyloxy)-octadecansyre 2-(hydroxy)-3-(acetyloxy)-propyl ester
MONO 1AC 18OAc



12-(acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(hydroxy)-propyl ester
MONO 18OAc

In vitro hydrolyse-studier

I *in vitro* hydrolyse-studierne blev det undersøgt, hvor og hvor hurtigt Soft-N-Safe bliver hydrolyseret i mave-tarmkanalen. Testen blev udført i overensstemmelse med ECC Guidelines² og i tre forskellige fordøjelsesvæskesimulanter

Hydrolyse i spyt- og mavesaftsimulant:

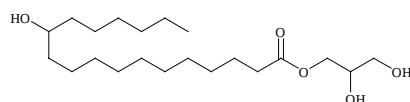
Soft-N-Safe blev undersøgt for hydrolyse i spytsimulant i 30 min og i mavesaftsimulant i 4 timer. Undersøgelsen viste, at hovedkomponenten, de to positionsisomerer af fuldacetylet monoglycerid af hydroxyoctadecansyre, forkortet Mono 2Ac 18OAc, ikke blev hydrolyseret af hverken spyt- eller mavesaftsimulanten.

De to simulanter, der anvendes i ECC Guidelines, indeholder ikke de lipaser, der normalt er til stede i mundhulen og mavesækken og som ifølge litteraturen vil være særligt aktive over for kortkædede acylglyceroler, som eddikesyreester, af glycerol [2], hvorfor det må forventes, at der *in vivo* vil ske en vis hydrolyse allerede i mundhulen og mavesækken.

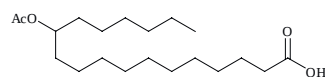
Hydrolyse i intestinalvæskesimulant (pancreatin):

In vitro hydrolyse af Soft-N-Safe blev foretaget i en buffer indeholdende pancreas-enzym fra svin (pancreatin). Hydrolysen blev foretaget over 4 timer, og der blev udtaget prøver efter 0, 1, 2 og 4 timer. Resultaterne er vist i tabel 2.

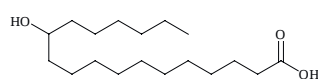
Tabellen viser, at lipaserne i pancreatin hydrolyserer Soft-N-Safe ved hydrolyse af både 12-(acetyloxy)-octadecansyre og ed-



12-(hydroxy)-octadecansyre 2,3-bis(hydroxy)-propyl ester
MONO 18OH



12-(hydroxy)-octadecansyre
FFA18OAc



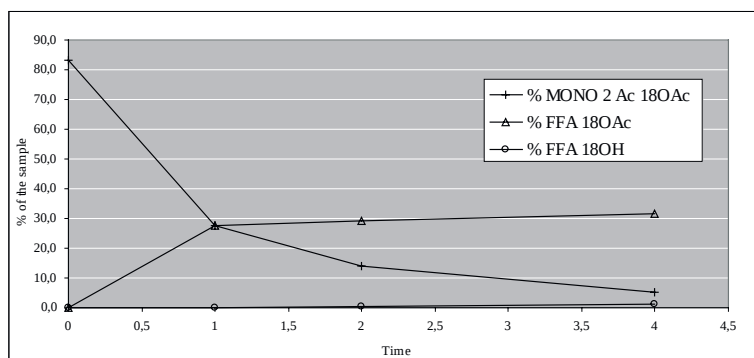
12-(hydroxy)-octadecansyre
FFA18OH

Figur 1. Strukturformler og forkortelse for hovedkomponenten i Soft-N-Safe og dens hydrolyse-produkter.

Komponent	0 hours	1 hour	2 hours	4 hours
MONO 2 Ac 18OAc	83.1	27.7	14.1	5.3
MONO 1Ac 18OAc	1.2	2.3	9.2	8.3
MONO 18OAc	0.00	0.06	0.06	0.04
MONO 18OH	0.0	0.6	1.3	3.0
FFA 18OAc	0.1	27.7	29.2	31.5
FFA 18OH	0.00	0.17	0.39	1.10

Tabel 2. Resultater af hydrolyse-forsøg med Soft-N-Safe i intestinalvæskesimulant (pancreatin). Resultaterne er gennemsnittet af en tredobbel bestemmelse. Forkortelser og strukturformler kan findes i figur 1.

dikesyre fra glycerol. Derimod sker der næsten ingen hydrolyse af acetylgruppen på 12-(acetyloxy)-octadecansyre, som må formodes at blive optaget uforandret gennem tarmvæggen. Det er ikke undersøgt, om der sker ændringer i forholdet mellem de forskellige positionsisomerer. Figur 2 viser en grafisk fremstilling af resultaterne.



Figur 2. Grafisk fremstilling af resultaterne af hydrolyse-forsøg med Soft-N-Safe i intestinalvæskesimulant (pancreatin). MONO 2Ac 18OAc, to positionsisomerer af fuldacyleret monoglycerid af 12-(hydroxy)-octadecansyre. FFA 18OAc, 12-(acetyloxy)-octadecansyre. FFA 18OH, 12-(hydroxy)-octadecansyre.

In vivo studie af absorption, distribution, metabolisme og ekskretion af 12-([1-¹⁴C]-acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester (ADME-studie)³

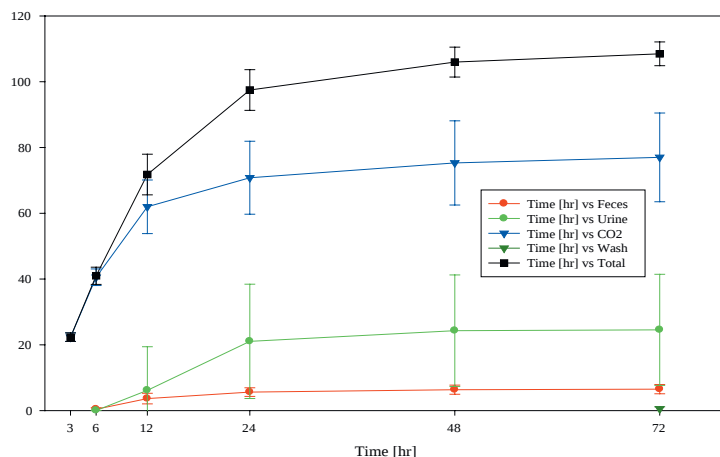
Resultatet fra *in vitro* hydrolyse-studiet med pancreatin, hvor acetoxygruppen på 12-(acetyloxy)-octadecansyre ikke blev hydrolyseret, ledte til forsøget med det radioaktivt mærkede stof 12-([1-¹⁴C]-acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester, med placeringen af den radioaktive mærkning i acetylgruppen på 12-(acetyloxy)-octadecansyre som en naturlig konsekvens.

Til forsøget blev der fremstillet 1 gram radioaktivt mærket stof med en specifik aktivitet på 1 mCi/gram og en renhed på 79,2 vægt %, med 12-hydroxyoctadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester som væsentligste urenhed (15,8 vægt %). Stoffet blev fremstillet ved acetylering af 12-hydroxyoctadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester med radioaktivt [1-¹⁴C]-acetylchlorid.

ADME-undersøgelsen blev tilrettelagt som 2 separate forsøg over hhv. 72 timer og 168 timer.

Massebalance-studie

Det første forsøg var et massebalance-studie af ekskretionen af radioaktivitet over 72 timer. Massebalancen viser den akkumulerede fordeling af radioaktivitet i udåndingsluft, urin, fæces samt restindhold af radioaktivitet i dyrene efter forsøget. Der blev anvendt fem Sprague-Dawley hanrotter til forsøget. Rotterne fik først en daglig dosis på 5000 mg/kg/dag af umærket Soft-N-Safe via oral gavage (direkte via sonde ned i mavesækken) i 5 dage. På studiets 6. dag fik dyrene 5000 mg/kg af en



Figur 3. Middel ekskretion af radioaktivitet fra han Sprague-Dawley rotter, efter én oral gavage dosis af 12-([1-¹⁴C]-acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester på 6. dagen i et 12 dage langt fodringsforsøg med 5000 mg/dag/kg dosis af Soft-N-Safe.

blanding af Soft-N-Safe og den radioaktivt mærkede testprøve. Målet var en radioaktivitet på 10 µCi/dyr. Administration af 5000 mg/kg/dag umærket Soft-N-Safe fortsatte gennem resten af studiet. Dyrene blev termineret efter 72 timer og analyseret for restindhold af radioaktivitet.

Figur 3 viser resultatet af forsøget, hvor mere end 70% af den radioaktive acetylgruppe udåndes som CO₂ i løbet af de første 24 timer og totalt bliver ca. 77% af radioaktiviteten udåndet i løbet af de 72 timer forsøget løb, efter at radioaktiviteten blev indgivet. Det tyder på en hurtig spaltning og omsætning af den radioaktivt mærkede acetylgruppe i 12-([1-¹⁴C]-acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylesteren.

Totalt blev ca. 25% udskilt sammen med fæces og kun 6,5% via urinen. Efter forsøget var der i gennemsnit 6,7% tilbage i dyret, og der blev i alt bestemt ca. 115% radioaktivitet ift. den indgivne radioaktivitet.

Fordelingen mellem fæces og udåndingsluft tyder på, at hydrolysen og optagelsen af 12-([1-¹⁴C]-acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester ikke er total, og fra andre studier er det vist, at fæces indeholder en del fri 12-(acetyloxy)-octadecansyre.

Dyrene indeholder i gennemsnit 6,7% af den indgivne radioaktivitet i kroppen efter 72 timer, hvilket er forventeligt, da den radioaktivt mærkede gruppe [1-¹⁴C]-acetyloxy vil indgå i den normale metabolisme som acetyl-donor via acetylCoA.

Absorptions- og distributionsstudie

Det andet studie var et studie af absorption og distribution af radioaktivitet fra 12-([1-¹⁴C]-acetyloxy)-octadecansyre 2,3-bis(acetyloxy)-propylester gennem et 12 dage langt fodrings-

SKANLAB MM 301 Svingmølle

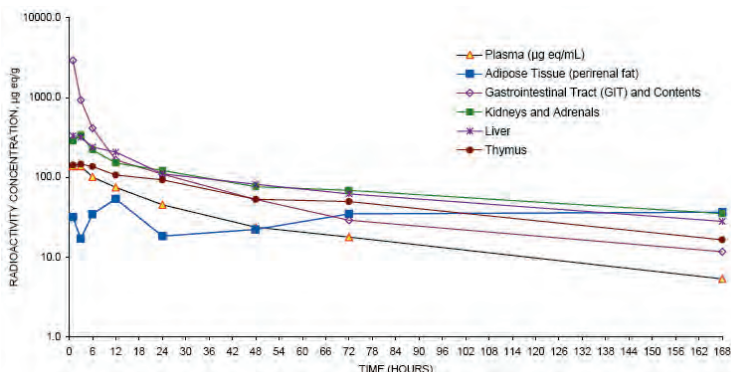


Reproducerbar formaling og kornstørrelsesanalyse

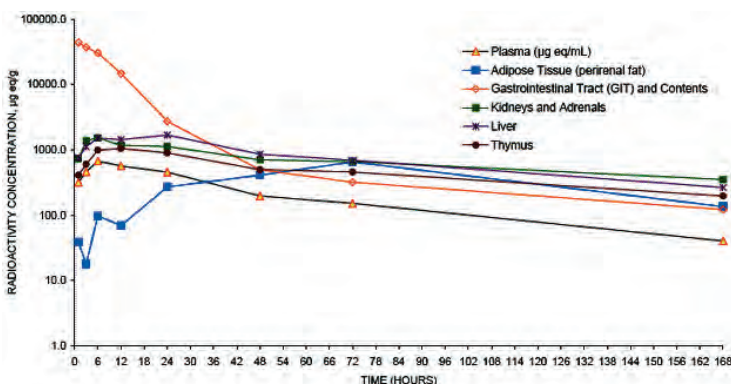
Velegnet til nedbrydning af biologiske celler i f.m. DNA/RNA undersøgelser.

Tlf. 47 38 10 14 www.skanlab.com

studie med to dosisgrupper på hhv. 500 og 5000 mg/gram/dag oralt gavage med 24 Sprague-Dawley hanrotter i hver gruppe. På forsøgets 6. dag fik dyrene en blanding af mærket og ikke mærket testprodukt svarende til 10 µCi/dyr. Hhv. 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 samt 168 timer efter blev fordelingen af radioaktivitet undersøgt i div. væv, herunder fedtvæv, mave-tarmkanalen, nyre, lever, thymus, samt resten af kroppene. Der blev udtaget 3 dyr pr. tidspunkt. Figur 4 og 5 viser fordelingen af radioaktivitet i de forskellige væv for hhv. den lave og den høje dosisgruppe.



Figur 4. Fordelingen af radioaktivitet i plasma og væv i Sprague-Dawley hanrotter efter en enkel dosis radioaktivt mærket testprøve gennem et 12 dage langt fodringsforsøg med 500 mg/dag/kg dosis af Soft-N-Safe



Figur 5. Fordelingen af radioaktivitet i plasma og væv i Sprague-Dawley hanrotter efter en enkelt dosis radioaktivt mærket testprøve gennem et 12 dage langt fodringsforsøg med 5000 mg/dag/kg dosis af Soft-N-Safe

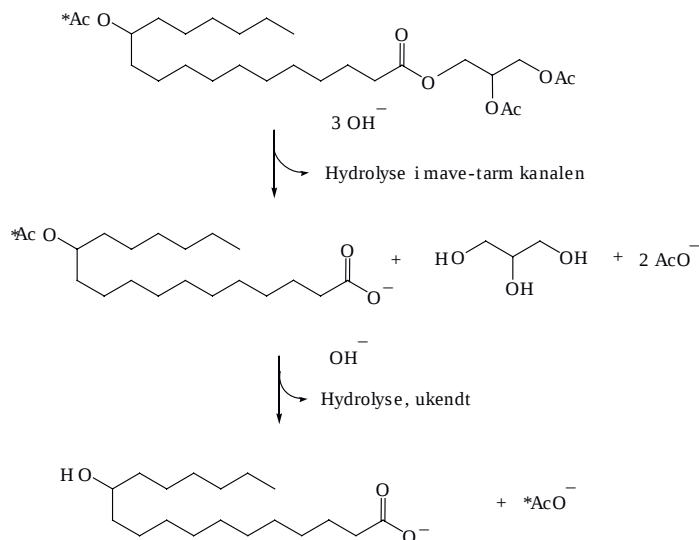
Forsøget viser, at der er en dosisafhængighed i hastigheden, hvormed radioaktiviteten forlader mave-tarmkanalen og fordeles i vævet. I den lave dosisgruppe er radioaktiviteten i mave-tarmkanalen reduceret til 6,6% på 6 timer imod 62,3% for høj dosisgruppen. Pga. den noget hurtigere optagelse har den lave dosisgruppe en højere peak-værdi på 2,5% i leveren efter 1 time, den aftager dog hurtigt hen gennem forsøget og er efter 24 timer nede på 0,8%.

Konklusion

In vitro hydrolyse-forsøgene med Soft-N-Safe viser, at stof-fet hydrolyseres villigt ved oralt indtag og spaltes af pancreas lipase til glycerol, eddikesyre og 12-(acetyloxy)-octadecansyre, der kan optages gennem mave-tarmkanalen. Acetyloxygruppen i 12-(acetyloxy)-octadecansyre hydrolyseres kun i meget ringe grad i intestinalvæskesimulant til 12-(hydroxy)-octadecansyre.

ADME-studiet af radioaktivt mærket hovedkomponent i Soft-N-Safe viser, at den radioaktive acetylgruppe hurtigt fjernes fra tarmen, dog er der en dosisafhængighed, der kan forklares med langsommere absorption pga. den høje dosis på 5000 mg/kg body weight Soft-N-Safe.

Den store andel på mere end 70% af den radioaktive ace-



Figur 6. Formodet metabolisk hydrolyse af 12-[1-¹⁴C]acetoxystearat 2,3-bis(acetyloxy)-propylester, (* indikerer radioaktiv mærkning med ¹⁴C).

tylgruppe, der udåndes som CO₂ i løbet af de første 24 timer, tyder på en hurtig spaltning og omsætning af acetylgruppen fra 12-(acetyloxy)-octadecansyre.

Totalt blev ca. 25% af radioaktiviteten udskilt sammen med fæces. Hydrolyse-studiet og analysen af fæces fra andre fodringsstudier antyder, at det primært er som ikke hydrolyseret 12-(acetyloxy)-octadecansyre, hvilket bekræftes af TLC-analyser foretaget i den organiske fase af en vand/methanol/chloroform-ekstraktion af udtagne mave-tarmkanaler med indhold (ikke illustreret).

Figur 6 viser den formodede metaboliske hydrolyse for Soft-N-Safe ved oralt indtag.

E-mail-adresse

Flemming.vang.sparso@danisco.com

Torkil.fischer.jensen@danisco.com

Fodnoter

¹⁾ GRINDSTED® er et registreret varemærke af Danisco A/S

²⁾ European Communities INT/NG (2/99) Food contact materials; Note for guidance. p. 51-55; Annex 1; »Measurement of hydrolysis of plastics monomers and additives in digestive fluid simulants«.

³⁾ ADME-studiet blev foretaget af CTBR Bio-Research, Inc. (CTBR), 87, Senneville Road, Senneville, Quebec, H9X 3R3, i juli og august 2003.

Referencer:

1. Kristoffersen, B. L. *Dansk Kemi* **2005**, 86(3), 22-23

2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1994**, Vol. 42(2)

Nyt om...

... salpetersyring

Salpetersyring er d.s.s. hydroxoxonitrogen



Elisabeth Wilson har vist, at ved solskin dannes der salpetersyring af humussyrerne i jord.

Bos

Elisabeth Wilson 2006: Nitrous acid from sun and soil. Important atmospheric molecule may be generated by light and humic acid *Chemical & Engineering News*. 24. april 2006: 11