

## 6.0 Summary.

Experiments were carried out to establish the bioeffectivities of three natural tocopherols and one mixture of these tocopherols in broiler chicken. Ex-vivo/in-vitro tests using haemolysis with Tween 20, ex-vivo/in-vitro pentane production by liver microsomes and liver and brain retention assays were the methods used in the study.

For two experiments, 18 and 20 groups consisting of 14 to 16 one day old male broiler chicken were formed respectively. In the first experiment, one group received the basal tocopherol-deficient diet prepared with 10% re-esterified soya triacylglyceride. The others were fed the basal diet with either 2.75, 11, 22, 44, 88 ppm DL- $\alpha$ -TA, 44, 88, 176, 352, 704, 1408 ppm D- $\Gamma$ -TA or mixtures of natural tocopherols with increasing levels of D- $\alpha$ -TA and a constant amount of total tocopherol (TOC 151-154).

In the second experiment, the first group was fed the same basal diet. The others received either 2.75, 5.5, 11, 22, 44, 88 ppm of either D- $\alpha$ -TA or DL- $\alpha$ -TA or 176, 352, 704, 1408 ppm D- $\delta$ -TA or increasing amounts of the tocopherol mixture (TOC 153:25, 50, 100 ppm).

After 14 and 21 days of feeding respectively, the animals were euthanised to obtain blood and tissue samples. Pentane measurements were made from liver microsomal samples using the 'head space' technique with gas chromatography. The haemolysis test was performed on erythrocytes with Tween 20 using a photometer. The tocopherol determinations were done using HPLC and electrochemical detection.

The following results were obtained from the two experiments:

- 1 - A deficiency of tocopherol led to encephalomalacia in broiler chicken. 5.5 ppm DL- and D- $\alpha$ -TA were sufficient to prevent the disease.
- 2 - There was no influence of neither the type nor the dosage of tocopherol on the body weight gain.
- 3 - Pentane production following provocation with ADP-Fe<sup>3+</sup> was dependent on the level of tocopherols supplied in the feed. The relationship was logarithmic. There was no significant difference between DL- $\alpha$ -TA and the corresponding amount of D- $\alpha$ -TA in the tocopherol mixtures with regard to pentane production. The parallel line assay gave the bioeffectivities of the tocopherol acetates relative to DL- $\alpha$ -TA as follows:

Tocopherol	Age in days	
	14	21
DL- $\alpha$ -TA	100	100
D- $\alpha$ -TA	134	137
D- $\Gamma$ -TA	18	16
D- $\delta$ -TA	4	4
TOC 153	64	61

- 4 - The decrease in erythrocyte haemolysis was positively influenced by the type and the amount of tocopherols supplemented. With levels higher than 22 ppm D- $\alpha$ -TA, the curve declined rapidly; an indication that the requirement of tocopherol in chicken was met. The relative bioeffectivities of the tocopherols using the haemolysis test were:

Tocopherols	Age in days	
	14	21
DL- $\alpha$ -TA	100	100
D- $\alpha$ -TA	127	131
D- $\Gamma$ -TA	14	9
TOC 153	92	92

With regard to the tocopherol mixtures 151, 152, 153, and 154 which contained increasing concentration of D- $\alpha$ -TA, it appeared that they were more effective than the corresponding levels of DL- $\alpha$ -TA in depressing the haemolysis. This was valid for increasing amounts of the tocopherol mixture TOC 153 employed in the second experiment.

- 5 - For all the tocopherols investigated, there was a strong positive linear relationship between the amount of tocopherols applied in the feed and the tocopherol retained in the organs. By using the slope ratio assay the following bioeffectivities of tocopherols were obtained:

Tocopherol	Age in days		
	14	21	14
	Brain		Liver
DL- $\alpha$ -TA	100	100	100
D- $\alpha$ -TA	117	105	104

- 6 - The results of the experiments gave no hint to a possible synergistic effect using tocopherol mixtures.

## 7.0 Erweiterte Zusammenfassung.

Die vorliegende Untersuchung an wachsenden Broilerküken wurde durchgeführt, um die Bioeffektivitäten der drei natürlich vorkommenden Tocopherole  $\alpha$ ,  $\Gamma$  and  $\delta$  einzeln und in Mischung im Fütterungsversuch zu überprüfen.

Die Messung der provozierten Pentanproduktion aus Lebermikrosomen und der Hämolysetest mit Tween 20 wurden als ex-vivo/in vitro-Methoden herangezogen. Daneben erfolgte die Bestimmung der Tocopherol-Retention in Leber, Gehirn und Omentalfett.

Die zwei aufeinander folgenden Experimente wurden mit 18 bzw. 20 Gruppen, die jeweils mit 14 bis 16 männlichen Eintagsküken besetzt waren, durchgeführt.

Die tocopherol-defiziente Basaldiät in beiden Versuchen enthielt Glucose, Sojaprotein und 10% reverestertes Sojatrigrlycerid, dessen Fettsäuremuster mit dem des Sojaöls übereinstimmt.

Im ersten Versuch erhielt eine Gruppe die Basaldiät, bei den weiteren Gruppen erfolgte eine Supplementierung mit 2.75, 11, 22, 44 und 88 ppm DL- $\alpha$ -TA bzw. 44, 88, 176, 352, 704 und 1408 ppm D- $\Gamma$ -TA bzw. vier Mischungen aus natürlichen Tocopherolen (TOC 151 - 154) mit steigenden D- $\alpha$ -TA, aber annähernd konstantem Gesamttocopherolgehalt (ca 60%).

Im zweiten Versuch war die erste Gruppe wiederum mit der Basaldiät versorgt, während die anderen einen Zusatz von 2.75, 5.5, 11, 22, 44 und 88 ppm entweder als D- $\alpha$ -TA oder DL- $\alpha$ -TA bzw. 176, 352, 704 und 1408 ppm D- $\delta$ -TA erhielten. Daneben wurde TOC 153 in ansteigender Dosierung eingesetzt (25, 50, 100 ppm).

Nach 14 und 21 Tagen wurden die Tiere euthanasiert, um Blut- und Gewebeproben zu gewinnen.

Zur Ermittlung der Bioeffektivitäten der Wirkstoffe wurden folgende Methoden herangezogen:

- 1 - Lebermikrosomen, die nach Separation der Mitochondrien im Pellet und nach Zentrifugation des Resthomogenates bei 104000xg gewonnen wurden, dienten zur Bestimmung der provozierten Pentanproduktion. Dazu erfolgte deren Inkubation zusammen mit NADPH + H<sup>+</sup> und ADP-Fe<sup>3+</sup> im luftdicht verschlossenen Glasgefäß. Nach entsprechender Inkubationszeit konnte aus dem Head-space mittels gasdichter Spritze eine Gasprobe entnommen und gaschromatographisch mit einer Porasil-Säule entstandenes Pentan isoliert und gemessen werden (TIEN und AUST, 1982).
- 2 - Blutproben wurden zunächst mit SPB-Puffer verdünnt und die Erythrozyten abzentrifugiert. Nach Resuspension mit dem

gleichen Puffer erfolgte die Auslösung der Hämolyse durch Zusatz von Tween 20 (1.5%) zur Probe. Der Vergleich von 100%ig hämolysierten Erythrozyten (Aqua dest.) mit den Tween-behandelten Blutzellen lieferte nach photometrischer Analyse der Überstände den probenspezifischen Hämolysegrad (HAMADA und MATSUMOTO, 1980).

- 3 - Die Tocopherolbestimmung in den Geweben Leber, Gehirn und Omentalfett, erfolgte nach Homogenisation und Lösungsmittelextraktion der Proben mittels HPLC an einer Reversed Phase Trennsäule. Das verwendete Analysengerät arbeitete mit einem elektrochemischen Detektor. Auf die Verseifung der Proben konnte verzichtet werden (hohe Detektorempfindlichkeit, Vorsäule).

Im folgenden werden die Befunde aus den beiden Versuchen zusammengefaßt:

- 1 - Tocopheroldefizienz führte bei den Broilerküken zu Encephalomalazie. 5,5 ppm DL- $\alpha$ -TA bzw. D- $\alpha$ -TA verhinderte das Auftreten der Erkrankung.
- 2 - Es gab keinen Einfluß der verschiedenen Tocopherolarten bzw. -dosierungen auf die Körperentwicklung.
- 3 - Die mikrosomale Pentanentwicklung nach Provokation mit ADP-Fe<sup>3+</sup> war abhängig von der Tocopherolversorgung der Tiere. Es besteht dabei eine logarithmische Beziehung. Der Pentanest erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen DL- $\alpha$ -TA und den Mischungen mit entsprechenden Gehalten an D- $\alpha$ -TA.

Der 'parallel-line-assay' ergab für die relativen Bioeffektivitäten, bezogen auf DL- $\alpha$ -TA, folgende Werte:

Tocopherol	Alter in Tagen	
	14	21
DL- $\alpha$ -TA	100	100
D- $\alpha$ -TA	134	137
D- $\Gamma$ -TA	18	16
D- $\delta$ -TA	4	4
TOC 153	64	61

Zur Berechnung der Bioeffektivität von TOC 153 wurde für diese Mischung ein Vitamin E-Gehalt von 36.4 I.E. ( $\hat{=}$ 36.3 mg DL- $\alpha$ -TA) pro 100 mg Gesamttocopherol zugrunde gelegt.

- 4 - Auch die Hämolyse neigung der Erythrocyten war abhängig von Art und Gehalt der supplementierten Tocopherole, wobei eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Beziehung zu beobachten war. Ab der Dosisstufe 22 ppm D- $\alpha$ -TA war ein deutliches Abflachen der Kurve festzustellen, wobei dies als Zeichen der Bedarfsdeckung zu sehen ist.

Die zu testenden Tocopherolmischungen 151, 152, 153 und 154 unterschieden sich in ihrer Wirkung zum Teil signifikant von den entsprechenden Dosierungen mit DL- $\alpha$ -TA. Dies gilt für beide Untersuchungszeitpunkte.

Die relativen Bioeffektivitäten im Hämolysetest ergaben sich danach wie folgt:

Tocopherol	Alter in Tagen	
	14	21
DL- $\alpha$ -TA	100	100
D- $\alpha$ -TA	127	131
D- $\Gamma$ -TA	14	9
TOC 153	92	92

5 - Für alle verwendeten Tocopherole gilt eine streng positiv lineare Beziehung zwischen der Menge an verfüttertem Tocopherol und der Tocopherolretention in den Geweben.

Daraus ergeben sich mit dem 'slope-ratio-assay' folgende relative Bioeffektivitäten:

Tocopherol	Alter in Tagen		
	14	21	14
	Gehirn		Leber
D- $\alpha$ -TA	117	105	104

Fig. 2. Die isometrische Rac-tocopherol.

Der Befund aus dem ersten Versuch, daß das D- $\alpha$ -TA aus den Mischungen in der Leber besser, im Gehirn dagegen schlechter retiniert wird, konnte im zweiten Durchgang so nicht bestätigt werden.

6 - Die Resultate geben keinen Hinweis auf mögliche synergistische Effekte bei Verwendung von Tocopherolmischungen.

Die Versuchsanstellung und deren Durchführung sind geeignet, die Effektivität der verschiedenen Tocopherole im Küken-Bioassay darzustellen. Damit können erstmalig für das Küken die Bioeffektivitäten der verschiedenen Tocopherole angegeben werden. Besonders bemerkenswert ist die ausgezeichnete Übereinstimmung in so unterschiedlichen ex vivo-Testsystemen wie der Hämolyse und der mikrosomalen Pentanproduktion. Die Ergebnisse bestätigen im großen und ganzen die Angaben in der Literatur.