

168. Furancarbonsäuren aus Rinderharn

von Sonja Bauer und Gerhard Spiteller*

Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Bayreuth, Postfach 3008, Universitätsstrasse 30,
D-8580 Bayreuth

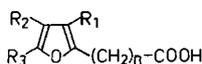
Prof. Dr. T. Gäumann zum 60. Geburtstag gewidmet

(19.VI.85)

Furancarboxylic Acids in Cattle Urine

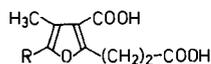
The urine of cattle contains large amounts of furancarboxylic acids. The same acids were isolated from rats after feeding with methyl esters of the so-called F-acids. Since the F-acids were not detected in cattle-food, they must be produced somewhere in the body of cattle.

Einleitung. – Im Fettgewebe der Leber und den Testes von Fischen entdeckten *Glass et al.* 1974 eine bis dahin unbekannte Klasse von Fettsäuren [1], deren Struktur 1975 ermittelt werden konnte. Es handelt sich um furanoide Fettsäuren, die F-Säuren genannt wurden [2]. Bisher konnten zwei Gruppen dieser F-Säuren in Fischen nachgewiesen werden. Die eine enthält einen tetrasubstituierten Furanring **1**, die zweite einen trisubstituierten Furanring **2**. Im Humanurin, aber auch im Blut findet man eine andere Klasse von Verbindungen, sogenannte Urofuransäuren **3** [3].

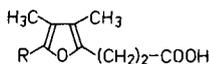


1 $R_1, R_2 = \text{CH}_3$
 $R_3 = \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_5\text{H}_{11}$
 $n = 8, 10, 12$

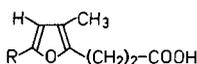
2 $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$
 $R_3 = \text{C}_6\text{H}_{11}$
 $n = 8, 10$



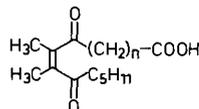
3 $R = \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_5\text{H}_{11}$



4a $R = (\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$
b $R = (\text{CH}_2)_4\text{-COOH}$



5a $R = (\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$
b $R = (\text{CH}_2)_4\text{-COOH}$

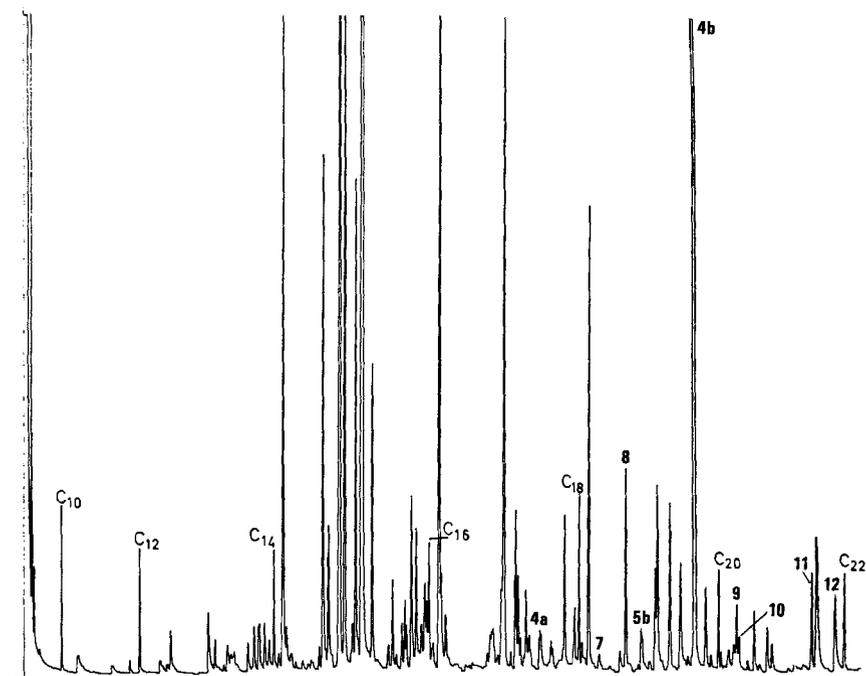


6 $n = 6, 8, 10$

Da Urofuransäuren **3** Metaboliten der tetrasubstituierten F-Säuren **1** sein könnten, wurde ein Gemisch von F-Säure-methylestern an Ratten verfüttert, nachdem durch Blindversuche sichergestellt war, dass diese in ihrem Urin weder F-Säuren noch Urofuransäuren ausscheiden. Nach dem Fütterungsexperiment fand man in deren Harn hauptsächlich die Metaboliten **4** und **5** und nur in geringer Menge Urofuransäuren **3** [4].

Die Entdeckung, dass dimethyl-substituierte Dioxo-en-fettsäuren vom Typ 6 beim Zerkleinern von Rinderleber in wässrigem Medium entstehen [5] und der Nachweis, dass sich allgemein Fettsäuren mit 1,4-Dioxo-2-en-System durch Lipoxygenase-Oxidation aus den entsprechenden furanhaltigen Fettsäuren bilden [6], legte die Vermutung nahe, dass auch in Rinderharn Abbauprodukte von F-Säuren enthalten sein könnten.

Identifizierung von F-Säure-Metaboliten in Rinderharn. – Dem Rinderharn wurden, wie bereits früher für Humanurin beschrieben [7], mit CHCl_3 die Säuren entzogen. Die mit CH_2N_2 veresterte Säurefraktion liess sich an einer Kieselsäule mit einem Stufengradienten aus Cyclohexan/ Et_2O weiter auftrennen und mittels GC/MS analysieren. Die Figur zeigt das GC der Fraktion C (Cyclohexan/ Et_2O 7:3), in der die in Tab. aufgeführten Furane identifiziert werden konnten.

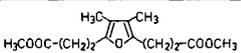
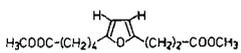
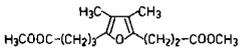
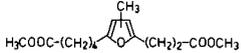
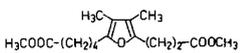
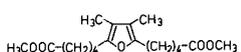
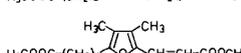
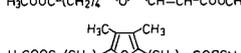
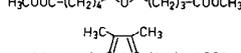


Figur. Glaskapillar-GC der Fraktion C der säulenchromatographischen Trennung von Säure-methylestern aus Rinderharn. (Bedingungen s. *Exper. Teil.*) C₁₀, C₁₂, C₁₄, ...: Markergemisch von *n*-Alkanen, das der Probe zur Bestimmung der Retentionszeiten einzelner Peaks unmittelbar vor der Messung zugesetzt wurde.

Eine Kontrolluntersuchung des Rinderfutters ergab, dass dieses weder F-Säuren noch Stoffwechselprodukte dieser Säuren enthält. Um auszuschliessen, dass F-Säuren oder analoge Verbindungen in gebundener Form in der Nahrung enthalten sind, wurde eine Probe des Rinderfutters mit H_2SO_4 hydrolysiert. Auch in diesem Ansatz fanden sich weder F-Säuren noch Abbauprodukte.

Rinderharn enthält somit die gleiche Klasse von Säuren, die bei den Metabolisierungsversuchen der F-Säuren mit Ratten im Harn dieser Tiere nachgewiesen werden

Tabelle. Verzeichnis der in Rinderharn identifizierten Furancarbonsäure-methylester. RI: Retentionsindex, MG: Molgewicht.

Verb. Nr.	RI	Strukturformel	MG	MS
4a	1764		268	268(38, M ⁺), 208(40), 195(78), 149(14), 135(100)
7	1824		268	268(22, M ⁺), 237(20), 208(37), 180(30), 167(41), 149(34), 121(64), 107(100)
8	1868		282	282(32, M ⁺), 251(13), 222(10), 209(38), 208(26), 195(42), 149(16), 135(100)
5b	1890		282	282(39, M ⁺), 251(18), 222(20), 209(40), 195(9), 194(7), 181(32), 153(14), 135(55), 121(100)
4b	1965		296	296(46, M ⁺), 265(17), 236(12), 223(48), 208(12), 195(74), 149(34), 135(100)
9	2031		310	310(36, M ⁺), 279(11), 237(6), 236(12), 223(48), 209(60), 149(37), 135(100)
10	2037		310	310(33, M ⁺), 250(10), 237(30), 223(8), 208(10), 195(81), 177(11), 149(46), 135(100)
11	2151		324	324(35, M ⁺), 293(9), 223(100), 209(5), 191(7), 163(5), 149(67), 135(22)
12	2188		294	294(30, M ⁺), 263(42), 262(68), 221(6), 206(28), 193(100), 175(38), 161(10), 147(11), 133(25)

konnten. Diese Versuche zeigen, dass Rinder im Gegensatz zu Ratten in relativ grosser Menge F-Säure-Metaboliten ausscheiden. Unter der Annahme, dass der Stoffwechsel in der Ratte während des oben erwähnten Experimentes [4] gleich demjenigen im Rind bei Normalfütterung ist, sollten F-Säuren oder Vorstufen davon im Stoffwechselgeschehen von Rindern eine Rolle spielen.

Die Bildung von Dioxo-en-fettsäuren **6** bei der Homogenisierung von Rinderleber legt nahe, einen biogenetischen Zusammenhang zwischen diesen und den aufgefundenen F-Säure-Metaboliten zu vermuten. F-Säuren selbst konnten bisher weder in Leber- noch in den Blutplasmalipiden von Rindern nachgewiesen werden. Es scheint daher wahrscheinlich, dass sie im Gewebe in Form von Konjugaten vorliegen. Diese Möglichkeit wird zur Zeit überprüft.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, dem *Fonds der Chemischen Industrie* und der *Doktor-Robert-Pfleger-Stiftung* für Sachbeihilfen. Herrn *D. Laatsch* danken wir für die Herstellung der Glaskapillarsäulen und Herrn *M. Glaessner* für die MS-Untersuchungen.

Experimenteller Teil

Allgemeines Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (*Fluka*). *Anal. GC:* Carlo-Erba Modell 4160; Trägergas H₂ (2 ml/min), Splitverhältnis 20:1, *WCOT*-Glaskapillarsäule (30 m Länge, 0,3 mm Durchmesser) belegt mit *OV 101*, Injektortemp. 275°, Detektortemp. 275° (FID); Temp.-Programm: bei 80° 5 min isotherm, dann 2°/min Temp.-Steigerung bis 280°. *GC/MS:* Massenspektrometer *Varian-MAT-312* mit kombinierter EI/CI-Ionenquelle, Ionisierungsenergie 70 eV; *GC:* *Varian-3700*; Temp.-Programm: bei 80° 5 min isotherm, dann 2°/min bis 280°, *WCOT*-Glaskapillarsäule (30 m, 0,3 mm Durchmesser) belegt mit *OV 101*; Datensystem *MAT-SS-200 (PDP-11/34-Rechner)*.

Aufarbeitung der Harnproben Rinderharn (85 ml) wird – nach Ansäuern mit konz. H_2O auf pH 1–4mal mit je 150 ml CHCl_3 extrahiert. Auftretende Emulsionen beseitigt man durch Zentrifugieren. Nach Entfernung des Lsgm. wird zur Trocknung 3mal mit je 70 ml Benzol versetzt und jeweils im Rotationsverdampfer eingedampft. Zur Derivatisierung nimmt man den rotbraunen Rückstand in 10 ml MeOH auf und versetzt mit 5% etherischer CH_2N_2 -Lsg. Nach Verdampfen des überschüssigen CH_2N_2 im N_2 -Strom gibt man zu der in 8 ml MeOH gelösten Probe 100 mg Kieselgel und engt zur Trockene ein. Die an Kieselgel adsorbierte Probe bringt man zur weiteren Auftrennung auf eine Kieselgelsäule (3 g, gepackt in Cyclohexan; Säulenlänge 20 cm, 8 mm Durchmesser) und eluiert mit je 10 ml Cyclohexan/ Et_2O im Volumenverhältnis 95:5 (Fraktion A), 80:20 (B), 70:30 (C), 50:50 (D), 5:95 (E), 0:100 (F). Die getrennten Fraktionen werden im Rotationsverdampfer eingeengt und in 20 μl CHCl_3 aufgenommen. Für GC- und GC/MS-Untersuchungen wurden davon jeweils 0,4 μl verwendet.

Aufarbeitung des Rinderfutters. Rinderfutter (Heu, Pressgras, Futterrüben; 100g) wird mit 700 ml H_2O homogenisiert. Man fügt 20 ml konz. H_2SO_4 zu und erhitzt über Nacht. Von der Lösung werden CHCl_3 100 ml 4mal mit je 150 ml extrahiert und der Extrakt, wie beim Rinderharn beschrieben, weiter aufgearbeitet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. L. Glass, T. P. Krick, A. E. Eckhardt, *Lipids* **1974**, *9*, 1004.
- [2] R. L. Glass, T. P. Krick, D. M. Sand, C. H. Rahn, H. Schlenk, *Lipids* **1975**, *10*, 695.
- [3] M. Spiteller, G. Spiteller, A. G. Hoyer, *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 699.
- [4] D. M. Sand, H. Schlenk, H. Thoma, G. Spiteller, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *751*, 455.
- [5] R. Schödel, G. Spiteller, in Vorbereitung.
- [6] R. F. Boyer, D. Litts, J. Kostishak, R. C. Wijesundera, F. D. Gunstone, *Chem. Phys. Lipids* **1979**, *25*, 237.
- [7] S. Bauer, G. Spiteller, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 813.