HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 351, S. 1151–1153, September 1970

Isolierung von Desoxybiliansäure, Phenylessigsäure und Ferulasäure aus normalem Menschenharn

WILHELM DIRSCHERL und UDO PELZER

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Bonn**

(Der Schriftleitung zugegangen am 1. Juli 1970)

Zusammenfassung: Aus hydrolysiertem Menschenharn wurden mit Hilfe der Säulenchromatographie an Aluminiumoxid, Celite 545 und Amberlite CG 50 II Desoxybiliansäure (3,4-Seco-12-oxo-5β-cholan-3,4,24-trisäure), Phenylessigsäure und Ferulasäure in kristallisierter Form isoliert und identifiziert. Über das Vorkommen von Desoxybiliansäure im Harn scheint bisher nichts bekannt gewesen zu sein.

Summary: *The isolation of deoxybilianic acid, phenylacetic acid and ferulic acid from normal human urine.* Deoxybilianic acid, phenylacetic acid and ferulic acid were isolated in crystalline form, from hydrolysed human urine, with the aid of column chromatography on aluminium oxide, Celite 545 and Amberlite CG 50 II. This appears to be the first report of the occurrence of deoxybilianic acid in urine.

In früheren Arbeiten haben wir auf der Suche nach sauren ZIMMERMANN-Chromogenen aus der „sauren Ketonfraktion" hydrolysierten Menschenharns Vanillinsäure[1] und Sebacinsäure[2] isoliert. In Fortführung dieser Arbeiten haben wir nun auch Phenylessigsäure, Ferulasäure und Desoxybiliansäure in kristallisierter Form isoliert und identifiziert[3]. Soweit diese Säuren im Urin als Konjugate vorliegen, sind sie durch die Hydrolyse freigesetzt worden.

Die saure Fraktion aus 500 *l* hydrolysiertem Sammelharn von jungen Männern wurde mit einer in Vorversuchen ermittelten ausreichenden Menge GIRARDS Reagens T in Nichtketon- und Ketonfraktion zerlegt. Wie in früheren Versuchen festgestellt, gelang die Trennung nicht völlig. Die „saure Ketonfraktion" enthielt noch saure Nichtketone. So ließen sich durch Sublimation leichtflüchtige Säuren, wie besonders *Benzoesäure*, entfernen. Der Sublimationsrückstand wurde dann an einer Aluminiumoxidsäule vorgereinigt. Die Eluate 144–200, gelbbraune verklebte Kristalle enthaltend, wurden vereinigt und an Celite verteilt. Kristalle fanden sich nur in den Eluaten 10–15, die wiederum einer Sublimation unterworfen wurden. Aus dem Sublimat wurden außer Benzoesäure durch Umfällen aus Äthanol/Petroläther 19 mg einer plattenförmig kristallisierten Substanz von Schmp. 76°C und süßlichem Geruch gewonnen, die durch Mischschmelzpunkt, IR-Spektrum und Überführung in das Amid als *Phenylessigsäure* charakterisiert wurde. Auch diese Säure hat sich teilweise in die „saure Ketonfraktion" verirrt.

Es scheint nicht festzustehen, ob Phenylessigsäure als solche im Normalharn vorkommt; ihr Konjugat mit Glutamin, das Phenylacetylglutamin, und dessen Harnstoffverbindung sind vor Jahrzehnten nach Einnahme von Phenylessigsäure aus Men-

* Postanschrift: Prof. Dr. Dr. W. DIRSCHERL, D-53 Bonn, Nußallee 11.

[1] W. DIRSCHERL u. W. SCHMIDTMANN, Naturwissenschaften **46**, 329 [1959]; W. DIRSCHERL u. A. WIRTZFELD, diese Z. **336**, 81 [1964].

[2] W. DIRSCHERL u. W. SCHMIDTMANN, Naturwissenschaften **49**, 301 [1962].

[3] U. PELZER, Dissertat., Mathemat.-Naturwiss. Fakult. d. Univ. Bonn 1968; kurz erwähnt bei W. DIRSCHERL, Arzneimittel-Forsch. **20**, 405 [1970].

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 1:19 AM

schenharn isoliert worden[4]. Bei der von uns vorgenommenen sauren Hydrolyse des Harns dürften die Konjugate gespalten worden sein. Daß bei der FÖLLINGschen Krankheit (Oligophrenia phenylpyruvica) auch Phenylessigsäure und ihr Konjugat ausgeschieden werden, ist bekannt.

Da sich papierchromatographische Hinweise für die Anwesenheit von Phenolsäuren ergeben hatten, wurde der Sublimationsrückstand an Amberlite CG 50 II ($H^{\oplus}$-Form), das sich für solche Trennungen gut eignet[5], chromatographiert.

Die Eluate 9—12 ergaben nach dem Verdunsten farblose Nadeln, die sich als Vanillinsäure erwiesen. Aus den Eluaten 14—17 wurden farblose dünne Stäbchen erhalten, die nach Umkristallisation bei 169°C schmolzen und sich im IR-Spektrum als *Ferulasäure* (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) identifizieren ließen.

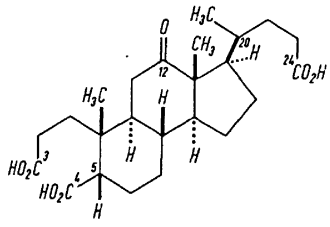
Ferulasäure und Feruloylglycin sind im Menschenharn papierchromatographisch nachgewiesen worden[6].

In den Eluaten 26—42 fand sich wiederum Benzoesäure. Aus den Eluaten 43—65 wurden 12,4 mg einer in Quadern kristallisierenden Substanz (s. Abb.) vom Schmp. 293°C erhalten. Das Mol.-Gew. wurde aus dem Massenspektrogramm zu 436 ermittelt. Durch Titration ließen sich 3 CO_2H-Gruppen im Molekül nachweisen. Da die ZIMMERMANN-Reaktion mit *m*-Dinitrobenzol positiv ausfiel, muß im Molekül wenigstens eine Ketogruppe vorliegen. Mit Anisaldehyd/Eisessig/Schwefelsäure („modifizierte Farbreaktion" nach KÄGI und MIESCHER[7]) gab die Substanz eine weinrote Färbung. Der positive Ausfall ließ an Steroide und ähnliche Verbindungen denken. Allerdings ist diese Farbreaktion sehr unspezifisch, da sie bei sehr verschiedenen Substanzgruppen, wie Steroiden, Phenolen, Terpenen, Zuckern, positiv verläuft, wobei auch nahe verwandte Stoffe verschiedene Färbungen liefern können. Sie wird jedoch des öfteren bei Steroiden,

Abbildung. Kristallisierte Desoxybiliansäure (isoliert).

besonders zur Lokalisation auf Papier, angewandt. In unseren Fall ist es von Interesse, daß auch Desoxycholsäure reagiert (hellblaue Färbung).

Bei der Ermittlung der Summenformel erwies sich das NMR-Spektrum zur Bestimmung der Protonenanzahl als sehr nützlich. Die ermittelten Daten stimmen mit denen der Desoxybiliansäure überein.



Der Vergleich mit der authentischen Substanz, die durch Oxidation von Desoxycholsäure mit rauchender Salpetersäure leicht zu erhalten ist[8], ergab in Bezug auf Schmp. und Misch-Schmp., sowie auf IR- und NMR-Spektrum Übereinstimmung.

Da die Bildung der Gallensäuren bekanntlich durch Abbau von Cholesterin erfolgt, ist die Desoxybiliansäure kein Zwischenprodukt der Synthese, sondern wahrscheinlich ein Abbauprodukt, das durch Oxidation aus Desoxycholsäure in der Leber entsteht. Die experinentelle Bestätigung dieser Annahme steht noch aus.

Die Desoxybiliansäure ist das einzige saure ZIMMERMANN-Chromogen aus Menschenharn, das wir bisher identifizieren konnten. Die Hauptmenge der

[4] H. THIERFELDER u. C. P. SHERWIN, Ber. dtsch. chem. Ges. **47**, 2630 [1914]; diese Z. **94**, 1 [1915].

[5] T. SEKI, K. INAMORI u. K. SANO, J. Biochemistry [Tokyo] **46**, 1653 [1959]; vgl. a. H. THOMAS, J. Chromatogr. [Amsterdam] **34**, 106 [1968].

[6] M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW u. P. E. WALL, J. biol. Chemistry **218**, 293 [1956]; s. a. A. S. SAINI, J. Chromatogr. [Amsterdam] **19**, 619 [1965].

[7] K. MIESCHER, Helv. chim. Acta **29**, 743 [1946]; s. a. R. NEHER u. A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta **34**, 2278 [1951].

[8] H. WIELAND u. A. KULENKAMPFF, diese Z. **108**, 295 [1920].

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 1:19 AM

sauren ZIMMERMANN-Chromogene hat sich bisher der Kristallisation entzogen; sie konnten daher noch nicht identifiziert werden.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sind wir für Gewährung einer Sachbeihilfe zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche

Vorbereitung und Fraktionierung des Harns

500 *l* Sammelharn von jungen Männern wurden portionsweise bei 25°C und 10 Torr auf 1/10 eingeengt, nachdem je 5 *l* mit 100 m*l* konz. Salzsäure versetzt worden waren.

Je 750 m*l* Konzentrat wurden dann mit 75 m*l* konz. Salzsäure unter Rückfluß 30 min gekocht, um die Hydrolyse der Konjugate zu vervollständigen. Danach wurde mit Benzol ausgeschüttelt; die vereinigten Auszüge (1,5 *l*) wurden zur Abtrennung der Carboxylsäuren 3mal mit je 500 m*l* gesätt. Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, die Extrakte mit Salzsäure auf pH 2 angesäuert und 3mal mit je 500 m*l* Äther ausgeschüttelt. Nach 2maligem Waschen mit je 300 m*l* dest. Wasser wurden die Ätherauszüge im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht („saure Harnfraktion"; 0,98 g). 500 *l* Harn lieferten so 66 g saure Fraktion. Je 10 g wurden mit 6,5 g GIRARDS Reagens T in üblicher Weise in Keton- und Nichtketon-Fraktion zerlegt. Insgesamt wurden 40,5 g „saure Ketonfraktion" erhalten, aus der sich durch Sublimation bei 40°C und 10 Torr etwa 20 g leichtflüchtige Säuren, im wesentlichen Benzoesäure, entfernen ließen.

Säulenchromatographische Trennungen

Bei allen Trennungen wurde der automatische Fraktionssammler LKB (Ultrorac Type 7000) verwendet.

a) Vortrennung an Aluminiumoxid (Aktivität II nach BROCKMANN u. SCHODDER): Der nicht sublimierbare Anteil der sauren Ketonfraktion (ca. 20 g) wurde in 4 Portionen zu je 5 g auf eine Säule (66 × 3,5 cm, 500 g Füllmaterial) gebracht und nacheinander mit je 1 *l* Aceton, Methanol, dest. Wasser und Essigsäure/Wasser 3:2 eluiert (200 Fraktionen/700 Tropfen). In den höheren Fraktionen fanden sich in zunehmendem Maße Kristalle. Die Eluate 144—200 wurden zur Abtrennung von Aluminiumoxid-Verunreinigungen mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt; nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden je 2,33 g, insgesamt 9,32 g Trockensubstanz erhalten (Fraktion VI).

b) Celite 545: Je 2,4 g (1/4) von VI wurden auf die Säule (64 × 3,5 cm, 165 g Füllmaterial) gebracht und zuerst mit 750 m*l* Petroläther (50—75°C), dann mit 750 m*l* Petroläther/Methanol 3:7 eluiert (62 Eluate/750 Tropfen). Die Eluate 1—9 und 16—41 waren leer, die Eluate 10—15 wurden vereinigt (VI/1), ebenso 42—62 (VI/2). Aus der Gesamtmenge von VI wurden erhalten: 7,1 g VI/1 (hellgelb, kristallin) und 2,2 g VI/2 (tiefbraun, ölig). VI/1 lieferte bei 40°C und 10 Torr 0,82 g Sublimat (VI/1 S); der Sublimationsrückstand (VI/1 R) wog 6,31 g.

Durch Umfällen des Sublimats aus Äthanol mit Petroläther wurden außer Benzoesäure (78 mg) 19 mg einer süßlich riechenden, kristallisierten Substanz vom Schmp. 75°C erhalten. Sie erwies sich als identisch mit Phenylessigsäure (Misch-Schmp., IR-Spektrum; Herstellung des Amids vom Schmp. 156°C mit Thionylchlorid und Ammoniak).

c) Amberlite CG 50 II, $H^{\oplus}$-Form: Je 2 g des Sublimationsrückstandes (VI/1 R) wurden auf die Säule (72 × 2,5 cm; 200 g Füllmaterial) gebracht. Eluiert wurde mit 1200 m*l* 0,2N HCl/Methyläthylketon/Aceton 9:2:1. 70 Eluate/500 Tropfen wurden in kleine Bechergläser umgegossen, in denen sie bei Raumtemperatur langsam verdunsten konnten. Die Eluate 1—8, 13, 18—25 und 66—70 waren leer. Der Trockenrückstand von 9—12 (93 mg) ergab nach Umkristallisation farblose Nadeln vom Schmp. 207°C, die als Vanillinsäure identifiziert wurden (IR-Spektrum). Der Rückstand von 14—17 (451 mg) ergab nach langwierigem Umkristallisieren eine Substanz vom Schmp. 169°C, die als Ferulasäure charakterisiert wurde. In den Eluaten 26—42 fand sich wieder Benzoesäure.

Der Trockenrückstand der Eluate 43—65, ein braungelbes Öl, wurde in Aceton gelöst und mit Petroläther versetzt. Es schieden sich gelbe Öltröpfchen ab, von denen die überstehende milchige Flüssigkeit abgehebert und zur Trockne eingedampft wurde. Es blieben schmutzigweiße Kristalle zurück, die, aus 94proz. Äthanol umkristallisiert, farblose Quader vom Schmp. 293°C ergaben. In Tüpfelreaktionen auf Filterpapier reagierte die Substanz positiv mit *m*-Dinitrobenzol (ZIMMERMANN), negativ mit diazotierter Sulfanilsäure; mit Anisaldehyd/Eisessig/Schwefelsäure[7] trat eine weinrote Färbung auf. Das Mol.-Gew. ergab sich zu 436 (Massenspektrogramm).

Titration der Carboxylgruppen: 4,36 mg (10^{-5} Mol), gelöst in 10 m*l* Äthanol/Wasser 1:1, verbrauchten 3,01 m*l* 0,1N NaOH (3,01 × 10^{-5} Mol). Somit enthält 1 Molekül 3 CO_2H-Gruppen.

Brought to you by | Purdue University Libraries
Authenticated
Download Date | 5/26/15 1:19 AM