

*Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Ehem. Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)*

Untersuchungen über die Verträglichkeit von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

1. Mitteilung: Chronischer Fütterungsversuch mit HMF und Stoffwechsel der Substanz

Von K. LANG, W. KIECKEBUSCH, K. H. BÄSSLER, W. GRIEM und G. CZOK

Mit 2 Tabellen

(Eingegangen am 25. März 1970)

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) entsteht aus Kohlenhydraten bei saurer Reaktion insbesondere beim Erhitzen, ferner bei der MAILLARD-Reaktion. Die Frage, ob es gesundheitlich unbedenklich ist oder nicht, hat daher eine gewisse Bedeutung für die Ernährung, die parenterale Ernährung und die Infusionstherapie.

In hitzesterilisierten Fruchtsäften wurden bis zu 300 mg/Liter HMF nachgewiesen. Dagegen enthalten Fruchtsäfte, die durch entkeimende Filtration oder durch Kurzzeiterhitzen sterilisiert worden waren nur Spuren bis etwa 10 mg HMF/Liter (KOCH und KLEESAAT 4). Größere Mengen HMF enthaltende Fruchtsäfte werden bei der organoleptischen Prüfung immer schlechter beurteilt als die HMF-freien. In 7 Jahren gelagerten, Fruktose enthaltenden Infusionslösungen wurden schon bis über 100 mg HMF/Liter gefunden. Bei sachgemäßem Arbeiten liegen die HMF-Werte in Glucose enthaltenden Infusionslösungen unter 10 mg/Liter, bei Fruktose enthaltenden mitunter etwas darüber. In hitzebehandelten eiweißhaltigen Lebensmitteln ist der HMF-Gehalt nur sehr gering (z. B. Fleisch und Milch). HMF trägt hier nichts zur Ausbildung des Aroma bei. Nach STREULI (5) beträgt der Geschmacksschwellenwert von HMF 2 mg/Liter. In gerösteten Lebensmitteln sind zum Teil größere HMF-Konzentrationen festgestellt worden z. B. im Röstkaffee 0,01–0,09, in Ersatzkaffees 2–30 und in der Brotkruste 30–70⁰/₀₀ (5).

Da in der Literatur keine Angaben über die akute und chronische Toxizität von HMF zu finden waren, haben wir diesbezüglich Untersuchungen durchgeführt.

In dieser ersten Mitteilung berichten wir über Versuche zum Stoffwechsel der Substanz sowie über einen chronischen Fütterungsversuch von 40 Wochen Dauer.

Methodik

Die Darstellung des HMF erfolgte nach HAWORTH und JONES (2). Für die Überlassung der Substanz danken wir Herrn Prof. Dr. J. KOCH (Institut für Getränkeforschung GmbH, Nieder-Olm bei Mainz). Zur Fütterung wurde etwa alle 4 Wochen eine neue Charge eingesetzt. Die Präparate enthielten 95% HMF, gaschromatographisch bestimmt.

Für den Fütterungsversuch wurden Sprague-Dawley-Ratten der Züchterei Gassner (München) mit einem Anfangsgewicht von im Mittel 48 g eingesetzt. Während der gesamten Versuchsdauer befanden sich die Tiere in Drahtboden-Einzelkäfigen bei einer Raumtemperatur von $23 \pm 2^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 55 und 65%. Die Fütterung erfolgte mit der „paired-fed“-Technik. Trinkwasser stand ad libitum zur Verfügung. Unsere Versuchsanordnung ermöglichte eine exakte Bestimmung der Nahrungsaufnahme, da die Tiere bei der verwendeten Futterapparatur (Futtergefäß mit Laufrohr) kein Futter verwerfen konnten.

Die Diät hatte folgende Zusammensetzung: Casein 20%, Hefe 2%, Cellulose 2%, Salzmischung (SHAW) 5%, Sojaöl 5%, Mondamin 66%. Sie enthielt weiterhin je Tag folgende Vitaminmengen in μg : Thiamin 100, Lactoflavin 100, Niacin 1000, Ca-pantothenat 100, Pyridoxol 50, Cholinchlorid 15000, p-Aminobenzoesäure 3000, Folsäure 20, Biotin 0,5, B₁₂ 0,1, Menadion 200. Außerdem erhielten die Tiere wöchentlich, in jeweils 0,1 ml Arachisöl gelöst, 120 IE Vitamin A-Palmitat und 3 mg α -Tocopherylacetat.

Die HMF-Dosis betrug 250 mg/kg/Tag.

Ergebnisse

1. Fütterungsversuch.

Die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich Gewichtszunahme, Futterverzehr und Futter-Efficiency sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Eingesetzt waren 20 Männchen als Kontrolle und 19 Männchen in der HMF-Gruppe. Wie die Tabelle 1 zeigt, war die Futter-Efficiency bei der HMF-Gruppe etwas, aber statistisch nicht signifikant kleiner. Während der Versuchszeit von 40 Wochen verstarb 1 Tier und zwar aus der Kontrollgruppe.

Tab. 1. Futterverzehr, Körpergewicht und Futter-Efficiency nach Verfütterung von 250 mg/kg HMF

| | 2 Wochen | 4 Wochen | 6 Wochen | 8 Wochen | 40 Wochen |
|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------|
| Kontrolltiere. n = 20 | | | | | Endgewicht |
| Gewichtszunahme | 49 | 113 | 185 | 226 | 334 g |
| Futterverzehr g | 154 | 371 | 627 | 883 | — |
| Futter-Efficiency. | $0,32 \pm 0,03$ | $0,30 \pm 0,005$ | $0,29 \pm 0,003$ | $0,26 \pm 0,003$ | — |
| HMF-Tiere. n = 19 | | | | | Endgewicht |
| Gewichtszunahme g | 47 | 107 | 170 | 208 | 334 g |
| Futterverzehr g | 152 | 372 | 633 | 892 | — |
| Futter-Efficiency | $0,31 \pm 0,04$ | $0,29 \pm 0,01$ | $0,27 \pm 0,005$ | $0,24 \pm 0,005$ | — |

Nach 40 Wochen wurden die Tiere getötet und die Organe Leber, Nieren, Herz, Milz und Testes histologisch untersucht. Die makroskopische Betrachtung der Organe hatte keine abnormen Befunde ergeben. Die Organe wurden in 5%igem Formalin fixiert. Die angefertigten Gefrier- und Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Sudan III angefärbt.

Bei den *Lebern* der Versuchstiere und Kontrolltiere zeigten sich keine entzündlichen oder degenerativen Veränderungen im Leberparenchym. Die peripher gelegenen Leberzellen waren bei sämtlichen Tieren geringgradig bis mittelgradig verfettet. Bei den geringgradig verfetteten Leberzellen lagen die Fetttröpfchen in der Regel perivascular. In den stärker verfetteten Leberzellen waren die Fetttröpfchen diffusocellulär angeordnet. Die Zellkerne sowohl der stärker verfetteten Zellen als auch die der fettfreien Zellen waren kreisrund und wiesen ein feines Chromatingerüst auf.

Auch die *Nieren* sämtlicher Tiere waren frei von pathologisch-histologisch nachweisbaren Veränderungen. Die Kapillarschlingen der Nierenkörperchen waren fein und zart und die Zellen der BOWMANschen Kapsel schmal und langgestreckt. Bei sämtlichen Tieren konnte man in den Zellen der Hauptstücke basal angeordnet feine Fetttröpfchen durch die Sudan III-Fettfärbung nachweisen. Die Zellkerne der Hauptstücke hatten ein feines Chromatingerüst und der Bürstensaum war gut nachweisbar.

In der *Herzmuskulatur* war die Querstreifung sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den HMF-Tieren deutlich erkennbar, und die Zellkerne der Herzmuskelzellen hatten eine ovale Gestalt mit einem feinen Chromatingerüst.

In den *Milzen* wiesen die Milzkörperchen bei sämtlichen Tieren keine Anzeichen einer Schwellung auf. Auch der Pigmentgehalt im Milzparenchym entsprach bei allen Tieren der Norm.

Das *Hodenparenchym* wies bei allen Kontrolltieren und HMF-Tieren in der Regel eine geringgradige Verbreiterung des Bindegewebes auf, da dieser von einer sich bei der H.-E.-Färbung rötlich anfärbenden Flüssigkeit durchtränkt war. Jedoch waren in den Samenkanälchen noch unzählige Spermien nachweisbar. Lediglich bei einigen Tieren der Versuchstiergruppe waren diese Veränderungen etwas stärker ausgebildet. In diesen Fällen war die Spermiogenese gestört und in den Samenkanälchen lagen nur noch Spermiogonien und Spermiozyten vor.

Nach 9 und 40 Tagen Fütterungsdauer wurde die *Leberfunktion* mit dem von CZOK (1) angegebenen Bromsulphthalein-Test überprüft. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 2 wiedergegeben. Es zeigte sich, daß die Ausscheidungsfunktion der Leber durch die Verfütterung von HMF nicht beeinträchtigt wurde.

Tab. 2. Leberfunktionsprüfung mittels Bromsulphthalein-Ausscheidung nach Verfütterung von HMF.

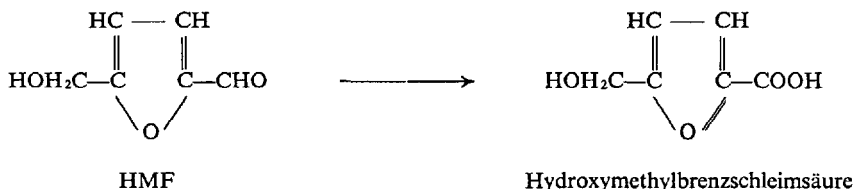
Angegeben BSF-Rentention im Serum in % 20 Minuten nach der BSF-Injektion.

| | \bar{x} | $s \bar{x}$ | p | |
|--------------------------|-----------|-------------|------|------|
| Nach 9 Wochen Fütterung | | | | |
| Kontrollen $n = 13$ | 0,607 | $\pm 0,105$ | — | |
| HMF-Tiere $n = 15$ | 0,761 | $\pm 0,140$ | 0,80 | 0,70 |
| Nach 40 Wochen Fütterung | | | | |
| Kontrollen $n = 19$ | 2,42 | $\pm 0,375$ | — | |
| HMF-Tiere $n = 19$ | 2,41 | $\pm 0,298$ | 0,90 | |

2. Stoffwechsel von HMF

Der einzige Autor, der Versuche über den Stoffwechsel von HMF durchgeführt hatte, war KARASHIMA (3). Er verfütterte in Einzeldosen von jeweils 3 g, insgesamt 12

und 15 g HMF an Kaninchen und stellte fest, daß 44–67% der verabreichten Dosis im Harn in Form von Hydroxymethylbrenzschleimsäure ausgeschieden werden. Eine Ausscheidung dieser Substanz konnte er auch bei Hunden feststellen.



Wir verfütterten an Kaninchen je 1 g HMF und konnten nur eine Ausscheidung von 12 mg unverändertem HMF aber nicht Hydroxymethylbrenzschleimsäure feststellen. Wir fanden lediglich die Ausscheidung von jeweils rund 50 mg einer ätherlöslichen sauren Fraktion, die von uns nicht weiter untersucht wurde. Offensichtlich vermag der Organismus nur eine begrenzte Menge HMF völlig umzusetzen. Bei Überschreiten der Umsatzkapazität bleibt dann Hydroxymethylbrenzschleimsäure als Metabolit liegen und wird im Harn ausgeschieden.

In Warburg-Versuchen fanden wir, daß Leberhomogenate, isolierte Lebermitochondrien und das Überstehende HMF nicht oxydieren. Die zugesetzten Konzentrationen an HMF waren 10^{-2} und 10^{-3} m. Zusatz von 10^{-2} und 10^{-3} m HMF hemmte die Veratmung von Succinat und von Glutamat durch isolierte Lebermitochondrien (Ratte) nicht.

Zusammenfassung

Männliche Sprague-Dawley Ratten erhielten 250 mg/kg 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) 40 Wochen hindurch verfüttert. Bezügl. Gewichtszunahme, Futterverzehr, Futter-Efficiency und erreichtem Endgewicht der Tiere ergaben sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber Kontrolltieren, die kein HMF erhalten hatten. Auch die histologische Untersuchung von Leber, Nieren, Herz, Milz und Testes ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Nach Verfütterung von 1 g HMF an Kaninchen wurden im Mittel 12 mg unverändertes HMF im Harn ausgeschieden. Eine Ausscheidung von Hydroxymethylbrenzschleimsäure wurde nicht festgestellt.

Leberhomogenate, isolierte Mitochondrien und Überstehendes oxydieren kein zugesetztes HMF. HMF stört die Veratmung von Succinat und Glutamat durch isolierte Lebermitochondrien nicht.

Summary

Male Sprague Dawley rats were fed 0 or 250 mg/kg 5-hydroxymethylfurfural in their diet for 40 weeks. Weight gain, food consumption, and food efficiency were not influenced by HMF. The histological examination of liver, kidneys, heart, spleen and testes showed no abnormalities.

After administration of 1 gr HMF to rabbits 12 mg of HMF were excreted in the urine. No metabolite could be detected in the urine.

HMF was not oxidized by liver homogenates, mitochondria or supernatant. The oxidation of succinate and glutamate by liver mitochondria was not influenced by added HMF.

Literatur

1. CZOK, G., Klin. Wschr. **40**, 1211 (1962). — 2. HAWORTH, W. N. und JONES, W. C. M., J. Chem. Soc. **1944**, 667. — 3. KARASHIMA, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **169**, 278 (1937). — 4. KOCH, J. und KLEESAAT, R., Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. **55**, 246, 314 (1959). — 5. STREULI, H., In: H. NEUKOM, Aroma- und Geschmacksstoffe in Lebensmitteln. S. 119. (Zürich 1967).

Anschrift der Verfasser:

Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität
6500 Mainz