

## 267. Fluoreszenzmethoden zur histochemischen Sichtbarmachung von Monoaminen. 1. Identifizierung der fluoreszierenden Produkte aus Modellversuchen mit 6,7-Dimethoxyisochinolinderivaten und Formaldehyd

von H. Corrodi und N. Å. Hillarp

(20. VIII. 63)

Wenn Catecholamine oder andere Phenyläthylamine und Phenyläthanolamine mit einer *meta*-ständigen Hydroxylgruppe in einer getrockneten Proteinschicht mit Formaldehydgas behandelt werden, kondensieren sie sich mit Formaldehyd zu Isochinolinderivaten, welche im Fluoreszenzmikroskop eine intensive grüne bis gelbgrüne Fluoreszenz aufweisen<sup>1) 2)</sup>. Auf der Basis dieser Reaktion wurde ein hochempfindliches Verfahren zur histochemischen Sichtbarmachung von u. a. Noradrenalin in peripheren und zentralen adrenergen Nerven entwickelt<sup>3)</sup>.

Solche Amine kondensieren sich leicht mit Formaldehyd in wässriger Lösung unter milden Bedingungen zu 1,2,3,4-Tetrahydro-isochinolinderivaten, und diese Reaktion erfolgt ohne Zweifel auch, wenn die Amine in einer getrockneten Proteinschicht gasförmigem Formaldehyd ausgesetzt werden<sup>1) 2) 4)</sup>. Im Gegensatz dazu tritt jedoch in wässriger Lösung die Umwandlung der Tetrahydro-isochinoline in die fluoreszierenden Endprodukte nur in sehr geringem Ausmasse, wenn überhaupt, ein. Bis jetzt wurden quantitative Ausbeuten an fluoreszierenden Endprodukten unter den weiter unten beschriebenen Bedingungen nur dann erhalten, wenn die Amine in getrockneten Proteinschichten (z. B. Human- oder Rinder-Serumalbumin) vorlagen. Bei höheren Temperaturen (80°) und längerer Expositionszeit (2–3 Std.) wurden ziemlich gute Ausbeuten an fluoreszierenden Produkten auch bei Verwendung anderer Trägersubstanzen, z. B. Stärke und Saccharose, erhalten. Die Rolle der Trägersubstanz ist noch unabgeklärt.

Da wir fanden, dass das 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin (I)<sup>5)</sup> ebenso leicht wie das entsprechende 6,7-Dihydroxyderivat bei Behandlung mit Formaldehyd in einer Proteinschicht ein intensiv fluoreszierendes Produkt gibt, haben wir den Verlauf dieser Reaktion zuerst an diesem 6,7-Dimethoxyisochinolin und seinem N-Methylderivat als Modellsubstanzen untersucht.

Die gute Stabilität des fluoreszierenden Produktes aus I gegen Säure und sein UV.-Spektrum wiesen auf ein 3,4-Dihydro-isochinolin hin. Zu Vergleichszwecken synthe-

<sup>1)</sup> B. FALCK, N. Å. HILLARP, G. THIEME & A. TORP, J. Histochemistry Cytochemistry 10, 348 (1962).

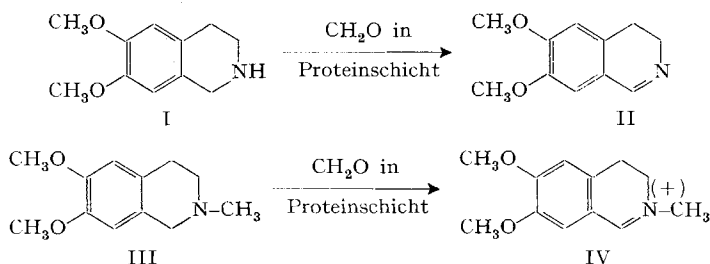
<sup>2)</sup> H. CORRODI, B. FALCK & N. Å. HILLARP, Vortrag gehalten vor der Skandinavischen Pharmakologischen Gesellschaft, Göteborg, 24. August 1962.

<sup>3)</sup> B. FALCK, Acta physiol. scand. 56 (1962), Suppl. 197; A. CARLSSON, B. FALCK & N. Å. HILLARP, *ibid.* 56 (1962), Suppl. 196; A. CARLSSON, B. FALCK, K. FUXE & N. Å. HILLARP, *ibid.* 1963, im Druck.

<sup>4)</sup> H. CORRODI & N. Å. HILLARP, 1963, in Vorbereitung.

<sup>5)</sup> J. S. BUCK, J. Amer. chem. Soc. 56, 1769 (1934).

tisierten wir deshalb nach bekannten Methoden das 6,7-Dimethoxy-3,4-dihydro-isochinolin (II)<sup>6)</sup>, dessen Methojodid (IV-Jodid)<sup>6)</sup>, sowie 6,7-Dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin<sup>7)</sup> (III).



I gab bei der Behandlung in einer getrockneten Serumalbuminschicht (s. exp. Teil) ein mit wässriger oder alkoholischer Salzsäure extrahierbares Produkt II, das sich papierchromatographisch in 7 Systemen und in seiner Fluoreszenz als identisch mit 6,7-Dimethoxy-3,4-dihydro-isochinolin erwies. Die folgenden Befunde erhärten diese Schlussfolgerung. Durch Chromatographie an einer Ionenaustauschersäule konnte II präparativ von noch unverändertem I abgetrennt werden. Das erlaubte, die Absorption im UV. in 0,1N HCl und 0,1N NaOH zu untersuchen, und es zeigte sich, dass die Maxima sich in der für 3,4-Dihydro-isochinoline charakteristischen Weise nach längeren Wellenlängen hin verschoben, wenn man von der freien Base zu dem Salz ging<sup>8)</sup> (Fig.). Ebenso war das Fluoreszenzspektrum von II (Maximum bei 470  $m\mu$  mit drei Aktivierungsmaxima bei 240, 305 und 355  $m\mu$ ) zwischen pH 1 und 6,5 mit dem von authentischem 6,7-Dimethoxy-3,4-dihydro-isochinolin identisch; entsprechend zeigten beide Verbindungen im UV.- und Fluoreszenzspektrum die gleichen Veränderungen, wenn das pH von 6,5 stufenweise um je 0,5 Einheiten auf 10 erhöht wurde. Die UV.- und Fluoreszenzspektren wurden auch direkt in der Proteinschicht bestimmt, wobei auch hier mit Formaldehyd behandeltes I und synthetisches II sich gleich verhielten.

In Kontrollversuchen wurde synthetisches II in einer getrockneten Serumalbuminschicht auf gleiche Weise mit Formaldehydgas behandelt. Es liess sich nachher unverändert wieder eluieren. Untersuchungen im Fluoreszenzmikroskop<sup>1)</sup> erlaubten, die Umwandlung von I in II quantitativ unter verschiedenen Bedingungen zu verfolgen.

Natriumborhydrid reduzierte die Doppelbindung von II momentan und quantitativ sowohl in Lösung wie in der Proteinschicht. Das UV.- und Fluoreszenzspektrum der reduzierten Substanz war mit dem von I identisch. Diese Reduktion mit Natriumborhydrid kann auch in der histochemischen Fluoreszenzmethode als Spezifitätstest für Catecholamine angewendet werden<sup>9)</sup>.

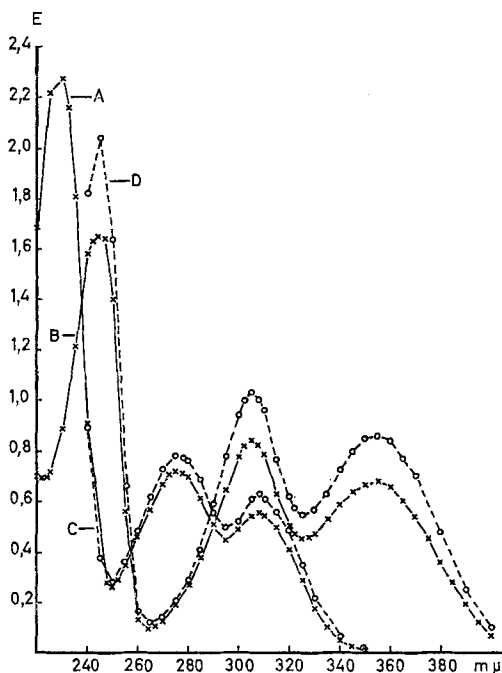
<sup>6)</sup> E. SPÄTH, Sitzungber. Akad. Wiss. Wien, Abt. 2B, 137, 1142 (1928); E. SPÄTH & H. EPSTEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. 59, 2796 (1926).

<sup>7)</sup> F. L. PYMAN, J. chem. Soc. 95, 1273 (1909).

<sup>8)</sup> Vgl. J. L. BILLS & C. R. NOLLER, J. Amer. chem. Soc. 70, 957 (1948); C. R. NOLLER & M. AGIMA, *ibid.* 72, 17 (1950); C. R. NOLLER & E. A. WUNDERLICH, *ibid.* 74, 3835 (1952); A. T. OPENSHAW & H. C. S. WOOD, J. chem. Soc. 1952, 391; A. R. BATTERSEY & R. BINKS, *ibid.* 1958, 4333; H. T. OPENSHAW & N. WHITTAKER, *ibid.* 1961, 4939.

<sup>9)</sup> H. CORRODI, N. Å. HILLARP & G. JONSSON, 1963, in Vorbereitung.

Es bestehen also keine Zweifel darüber, dass I durch Behandlung mit Formaldehyd in einer Proteinschicht in II übergeht, und zwar quantitativ, wenn die Kon-



UV.-Spektren von II und von mit  $\text{CH}_2\text{O}$ -behandeltem I

A: II in 0,1N HCl; B: II in 0,1N NaOH; C: Reaktionsprodukt aus I in 0,1N HCl; D: dasselbe in 0,1N NaOH.

zentration des Tetrahydroderivates in der Schicht nicht zu gross ist. Es war bisher noch nicht möglich, den Mechanismus dieser ungewöhnlichen Reaktion sowie die Rolle des Proteins als Trägersubstanz abzuklären. Eine Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydro-isochinolininen zu 3,4-Dihydroderivaten war bisher nur durch Behandeln mit Quecksilber(II)-acetat<sup>10)</sup> oder Natriumhypochlorit<sup>11)</sup> gelungen. Unter milden Bedingungen (30 Min. bei 20° oder 15 Min. bei 50°) verlief die Formaldehyd-Reaktion in den meisten der untersuchten Proteine glatt; Protaminsulfat, Zein oder Gliadin aber gaben nur schlechte Ausbeuten. In Übereinstimmung mit den Catecholaminen gaben auch andere Trägersubstanzen (Stärke, Ribonucleinsäure oder Saccharose) recht gute Ausbeuten an II, besonders bei höherer Temperatur und längerer Reaktionszeit. Wenn hingegen I ohne eine solche Trägersubstanz als Base oder Hydrochlorid mit Formaldehyd behandelt wurde, liess sich kein II feststellen.

Auch Catecholamine mit einer sekundären Aminogruppe, z. B. Adrenalin, lassen sich wie die primären mit Formaldehyd zu den entsprechenden 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolininen kondensieren<sup>1) 4)</sup>. Dagegen verläuft die weitere Umsetzung dieser Zwi-

<sup>10)</sup> J. KNABE, Arch. Pharmaz. 292, 652 (1959).

<sup>11)</sup> H. T. OPENSHAW & N. WHITTAKER, J. chem. Soc. 1963, 1461.

schenprodukte zu den fluoreszierenden Verbindungen nur unter viel energischeren Bedingungen (z. B. mehrere Stunden bei 80°, je nach dem Wassergehalt des Formaldehydes), was zur histochemischen Unterscheidung von Dopamin (3,4-Dihydroxy- $\beta$ -phenyläthylamin) und Noradrenalin einerseits und von Adrenalin andererseits ausgewertet wurde<sup>2)</sup> 3). Es war anzunehmen, dass die aus den sekundären Aminen entstandenen fluoreszierenden Produkte quaternäre 3,4-Dihydro-isochinolininderivate seien. Synthetisches 6,7-Dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin<sup>7)</sup> (III) wurde deshalb in einer Proteinschicht auf gleiche Weise mit Formaldehydgas behandelt. Das so erhaltene fluoreszierende Produkt zeigte in jeder Hinsicht die Eigenschaften von synthetischem 6,7-Dimethoxy-2-methyl-3,4-dihydroisochinolinium-Kation (IV). Die charakteristischen pH-abhängigen Veränderungen im UV.-Spektrum bewiesen die quaternäre Natur des Produktes. Obschon die aus III entstandene Substanz nur papierchromatographisch isoliert wurde, ist doch an ihrer Identität mit IV nicht zu zweifeln. Auch diese Umwandlung von III in IV verläuft nur an einer Trägersubstanz. IV liess sich ebenfalls leicht in Lösung wie in der Proteinschicht zu III rückreduzieren.

Diese mit I und III durchgeführten Modellversuche lassen es äusserst wahrscheinlich erscheinen, dass auch die bei der histochemischen Sichtbarmachung von Catecholaminen auftretenden fluoreszierenden Produkte 3,4-Dihydro-isochinolininderivate sind. Ob es sich dabei um 6,7- oder 7,8-Dihydroxyderivate handelt, oder ob der Formaldehyd eine Hydroxymethylierung oder weitergehende Kondensation dieser Phenole bewirkt, soll durch Versuche mit Dihydroxy-dihydro- und -tetrahydro-isochinolinen abgeklärt werden<sup>4)</sup>.

Unter *milden* Bedingungen kann die erste Stufe, der Ringschluss von Phenyläthylaminderivaten zu Tetrahydro-isochinolin, nur unter dem aktivierenden Einfluss einer *meta*-ständigen Hydroxylgruppe verlaufen<sup>12)</sup>. In voller Übereinstimmung mit diesem Befund entwickelten nur *m*-Hydroxyphenyläthylaminderivate eine intensive Fluoreszenz. So reagiert z. B. *m*-Tyramin ebenso leicht wie Dopamin, während *p*-Tyramin und die 3-O-methylierten Metabolite der Catecholamine (Normetanephrin, Metanephrin, 3-Methoxytyramin) nicht reagieren.

In Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit geben tertiäre Amine (z. B. N-Methyladrenalin) oder Amide (z. B. 3,4-Dihydroxyphenylacetamid, H 13/49)<sup>13)</sup> keine Fluoreszenz. Während einer zweijährigen Zusammenarbeit mit B. FALCK<sup>14)</sup> und A. CARLSSON<sup>15)</sup> wurden sowohl in Modellversuchen als auch in tierischen Geweben ausser gewissen Tryptaminderivaten, besonders 5-Hydroxytryptamin, keine anderen Substanzen gefunden, die eine derartige Fluoreszenz geben, als die oben erwähnten Phenyläthylamine.

Die Reaktion zwischen Formaldehyd und 5-Hydroxytryptamin in einer getrockneten Proteinschicht wurde ebenfalls untersucht<sup>4)</sup>. Ohne Zweifel ist das dabei analog entstehende fluoreszierende Produkt 6-Hydroxy-3,4-dihydro- $\beta$ -carbolin oder ein dar-

<sup>12)</sup> W. M. WHALEY & T. R. GOVINDACHARI, «The Pictet-Spengler Synthesis of Tetrahydroisochinolines and Related Compounds» in R. ADAMS (Editor), Organic Reactions, J. Wiley Inc., New York, 1951, Vol. VI, 151–180.

<sup>13)</sup> Vgl. A. CARLSSON, H. CORRODI & B. WALDECK, Helv. 46, 2271 (1963).

<sup>14)</sup> Histologiska Institutionen, Universitetet, Lund.

<sup>15)</sup> Farmakologiska Institutionen, Universitetet, Göteborg.

aus durch Einwirkung von Formaldehyd auf den Benzolring entstehendes Derivat. Unglücklicherweise liegt das Hauptaktivierungsmaximum der fluoreszierenden Substanz in der Proteinschicht im Wellenbereich (390–410  $m\mu$ ) des Aktivierungsmaximums der von den Catecholaminen herrührenden 3,4-Dihydro-isochinoline. Das Fluoreszenzmaximum (510–520  $m\mu$ ) liegt jedoch 30–40  $m\mu$  höher, und man kann es daher zur histochemischen Unterscheidung von 5-Hydroxytryptamin und Catecholaminen verwenden.

Weitere Versuche zur Konstitutionsaufklärung der aus den Catecholaminen und aus 5-Hydroxytryptamin mit Formaldehyd in Proteinschichten entstehenden fluoreszierenden Produkte und zur Abklärung der Rolle des Proteinträgers sind im Gang<sup>4)</sup>.

Frl. Ing. G. HOLMBERG und den Herren Ing. G. HALLHAGEN und Ing. G. THIEME möchten wir für die Mithilfe bei den Versuchen danken. Diese Untersuchung wurde mit der finanziellen Unterstützung des SCHWEDISCHEN MEDIZINISCHEN FORSCHUNGSRATES, der STIFTUNG KNUT UND ALICE WALLENBERG, der STIFTUNG ZUM ANDENKEN AN GUSTAF UND TYRA SVENSSON, sowie des US PUBLIC HEALTH SERVICE (NB 02854-03) ausgeführt.

### Experimentelles

1. *Vergleichssubstanzen* (nach den zitierten Angaben hergestellt): a) I-Hydrochlorid<sup>5)</sup>, Smp. 250° (Lit.: 253°); b) II<sup>6)</sup>, Sdp. 150°/0,5 Torr (Lit.: 155–160°/1 Torr); c) III<sup>6)</sup>, Smp. 82° (Lit.: 81–83°); d) IV-Jodid<sup>7)</sup>, Smp. 199° (Lit.: 202°).

2. *Aufnahme der Spektren*. Die UV.-Spektren wurden mit Hilfe eines BECKMAN-DU-Gerätes registriert. Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem AMINCO-BOWMAN-Spektrophotofluorimeter mit Schreiber aufgenommen. Betr. die Fluoreszenzmikroskopie siehe 1). Die Konzentration der untersuchten Lösungen lag zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{g/ml}$ , wobei jedesmal eine niedrige (z. B. 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) und eine höhere Konzentration (z. B. 5  $\mu\text{g/ml}$ ) angewendet wurde. Die abgelesenen Wellenlängen wurden nicht korrigiert.

3. *Einfluss des pH auf die Spektren*. Die Spektren wurden in 0,1N HCl, in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer bei pH 4 und 6, in Phosphatpuffer bei pH 6,5–8, in Glycin-NaOH-Puffer bei pH 8–12, sowie in 0,1N und 1N NaOH untersucht.

4. *Allgemeines Verfahren zur Herstellung der fluoreszierenden Produkte*. I (oder in den Kontrollversuchen II) wurde mit Hilfe der äquivalenten Menge Salzsäure in einer 2–5-proz. Serumalbuminlösung (in einigen Versuchen Gelatinelösung) so gelöst, dass die Konzentration 1–5 mg/ml betrug. Auf Objektgläsern wurden je 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in möglichst dünner Schicht ausgebreitet, an der Luft getrocknet und dann die Schicht 5–30 Min. bei 50° in einem geschlossenen Gefäß Formaldehyddämpfen (aus 35-proz. Formalinlösung *p. a.* MERCK) ausgesetzt. Während dieser Behandlung wurden die Schichten von I ungefähr gleich gelb wie diejenigen, welche mit II hergestellt waren. Nachher wurden die Schichten 12 Std. im Dunkeln aufbewahrt. 20–50 so behandelte Schichten wurden abgekratzt und daraus die Amine mit 5–10 ml 0,01N oder 0,1N wässriger oder äthanolischer HCl ausgezogen. Nach 1 Std. wurde zentrifugiert, wobei ein klarer Extrakt erhalten wurde. Aliquote Teile davon wurden verwendet für:

a) UV.-Spektren bei verschiedenem pH; b) Fluoreszenzspektren bei verschiedenem pH; c) Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop<sup>1)</sup>; d) Papierchromatographie und Ionenaustauscherchromatographie. Überall wurden als Vergleichssubstanzen synthetisches I, II, III, IV und 6,7-Dimethoxy-1-methyl-3,4-dihydro-isochinolin<sup>6)</sup> benützt.

In den Versuchen mit III und IV wurde gleich verfahren, mit dem Unterschied, dass die Formaldehydbehandlung bei 80° und während 2–3 Std. erfolgte, da nur dann gute Ausbeuten erzielt wurden; als Formaldehydquelle diente mit einer kleinen Menge 35-proz. Formalin befeuchteter Paraformaldehyd.

5. *Untersuchung der UV.- und Fluoreszenzspektren von I und II in der Proteinschicht vor und nach Behandlung mit Formaldehyd*. Die Schichten wurden wie unter 4 beschrieben hergestellt, mit dem Unterschied, dass 0,3-proz. Lösungen in 5-proz. Gelatine bereitet wurden, von welchen 20  $\mu\text{l}$  als rechteckiger Fleck (1  $\times$  0,5 cm) auf Quarzglas ausgebreitet wurde. Die Trocknung erfolgte im

Vakuum. Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Gläser so fixiert, dass das auffallende Licht die Schicht in einem Winkel von  $45^\circ$  traf. Auf gleiche Weise hergestellte Gelatineschichten wurden zur Blindwertbestimmung benützt.

6. *Papierchromatographie*. Aliquote Teile der Extrakte (siehe 4) enthaltend 25–50  $\mu\text{g}$  Substanz wurden aufsteigend an WHATMAN-1-Papier mit folgenden Systemen chromatographiert: 1. *n*-Butanol gesättigt mit 1N HCl; 2. *n*-Butanol-Essigsäure- $\text{H}_2\text{O}$  (4:1:5); 3. Isopropanol-konz. wäss.  $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$  (40:1:9); 4. *n*-Butanol-Propionsäure- $\text{H}_2\text{O}$  (5:3:2); 5. Benzol-Propionsäure- $\text{H}_2\text{O}$  (20:14:1); 6. Propanol-konz. wäss.  $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}$  (6:3:1); 7. Pyridin- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), mit Essigsäure auf pH 6 gebracht.

Die Papiere wurden im UV.-Licht auf fluoreszierende Flecke untersucht, UV.-absorbierende Flecke wurden durch Kontaktkopierung festgestellt. Das fluoreszierende Produkt aus I war in allen 7 Systemen identisch mit II, sowohl im Rf-Wert wie in seiner kräftigen blauweissen Fluoreszenz. Wenn Schichten mit I oder II längere Zeit Formaldehyddampf ausgesetzt worden waren, konnte in den Extrakten manchmal ein kleiner, gelb fluoreszierender Fleck von unbekannter Herkunft beobachtet werden.

7. *Ionenaustauscherchromatographie*. Der Extrakt aus einem mit grösseren Mengen durchgeführten Versuch (5 mg I in 1 ml 2-proz. Serumalbumin, 20–30 Min. Formaldehydbehandlung) wurde an einer Ionenaustauschersäule (Dowex 50 W-X 4, 200–400 mesh,  $\text{H}^+$ ;  $200 \times 6$  mm) chromatographiert, wobei mit 0,5N, 1N und 2N Salzsäure eluiert wurde. Es wurden Fraktionen zu 5 ml aufgefangen und direkt durch UV.-Absorptionsmessung (Substanz I bei 280  $\text{m}\mu$ , Substanz II bei 310  $\text{m}\mu$ ) analysiert. Mit 2N Salzsäure konnte II in ungefähr 40–60% Ausbeute eluiert werden; daneben war auch noch unverändertes I anwesend. II wurde spektroskopisch und papierchromatographisch identifiziert.

#### SUMMARY

When primary or secondary catecholamines are treated with formaldehyde gas in a dried protein layer a strong fluorescence appears which is used for histochemical identification of these amines in central and peripheral adrenergic nerves.

Since the primary reaction is a condensation of the catecholamines with formaldehyde to 1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolines, the behaviour towards formaldehyde of 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline and its N-methyl derivative in a dry protein layer has been investigated. The intensely fluorescent products formed are identified as 6,7-dimethoxy-3,4-dihydro-isoquinoline and its N-methyl derivative respectively.

Therefore the fluorescent products obtained from catecholamines in the histochemical reaction mentioned are to be considered as derivatives of 6,7-dihydroxy-3,4-dihydro-isoquinoline.

Biochemisches Forschungslaboratorium AB HÄSSLE, Göteborg, und  
Histologische Abteilung, Karolinska Institutet, Stockholm