

## DIE TRENNUNG DER PHENOLSÄUREN MIT HILFE DER HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORESE

A. STURM JR. UND H. W. SCHEJA

*r. Medizinische Klinik\* der Medizinischen Akademie,  
Düsseldorf (Deutschland)*

(Eingegangen den 28. Februar 1964)

Phenolsäuren sind aromatische Carbonsäuren, die am Benzolring statt eines oder mehrerer Wasserstoffatome Hydroxylgruppen tragen. Untersuchungen in den letzten Jahren über die angeborenen Stoffwechsellanomalien, insbesondere über die Phenylketonurie und Alkaptonurie, über die Umwandlung und Entgiftung aromatischer Aminosäuren<sup>33</sup> und über die Ursache psychischer und neurologischer Veränderungen Leberkranker<sup>13-15</sup> haben es wahrscheinlich gemacht, dass die Phenolsäuren eine wesentliche pathophysiologische Bedeutung besitzen können. Eingehende Untersuchungen über die physiologische Schwankungsbreite des menschlichen Phenolsäuremusters und über dessen Veränderungen bei verschiedenen Krankheitsbildern stossen jedoch immer wieder auf die Schwierigkeit, mehrere Phenolsäuren in einem Arbeitsgang qualitativ und quantitativ zu erfassen. Mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese war es uns möglich, 15 bis 20 Phenolsäuren auf dem Pherogramm exakt zu trennen. Über das Ergebnis dieser Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

### METHODIK

#### *Apparatur*

Die Untersuchungen wurden mit Hochspannungselektrophorese-Apparaturen mit flüssigen und mit festen Wärmeaustauschern durchgeführt. Als Elektrophoresegerät mit flüssigem Wärmeaustausch wurde die von MICHL<sup>21, 22</sup> beschriebene, von KICKHÖFEN UND WESTPHAL<sup>17, 18</sup> zur Trennung von Peptiden und Aminosäuren und von HEILMEYER und Mitarbeiter<sup>16</sup> zur Trennung des enteweißten Serums modifizierte Apparatur verwandt. Als inertes Medium benutzten wir, wie früher angegeben<sup>27</sup>, statt des Hexans Heptan. Zur Hochspannungselektrophorese mit festem Wärmeaustauscher wurde der Pherograph Original Frankfurt nach WIELAND UND PFLEIDERER<sup>31, 32</sup> verwandt\*\*.

#### *Elektrolyt*

Pyridin-Eisessig-Wasser im Verhältnis 1 : 10 : 89. Das pH dieses Gemisches beträgt 3.6.

#### *Papier*

Schleicher und Schüll 2043 b Mgl. Papiergrösse: 45 × 2.5 cm für die Elektrophorese

\* Direktor: Prof. Dr. F. GROSSE-BROCKHOFF.

\*\* Hersteller: Fa. L. Hormuth (Inh.: W. E. Vetter), Heidelberg-Wiesloch, Deutschland.

mit flüssigem Wärmeaustausch und  $40 \times 32$  cm für die Elektrophorese mit festem Wärmeaustausch.

### Testlösungen

Der grösste Teil der Testsubstanzen konnte käuflich erworben werden. Die *m*-Hydroxyhippursäure, die *o*-Hydroxyhippursäure und das Vanilloylglycin wurden nach Vorschrift<sup>23</sup> nach Einnahme der entsprechenden Benzoesäuren bzw. von Vanillinsäure und Glycin aus dem Urin extrahiert. Die Testsubstanzen wurden in 60–98 %igem Äthylalkohol p.a. aufgelöst. Bei einer Auftragsmenge von 0.02 ml auf den Papierstreifen erwies sich eine Konzentration von 0.5–2.0 mg Testsubstanz/ml Äthylalkohol am geeignetsten.

### Färbereagentien

(a) *p*-Nitroanilin-Reagenz nach Vorschrift von VON STUDTNITZ<sup>24</sup>: 1 Teil 0.1 %ige *p*-Nitroanilinlösung, 1 Teil 0.2 %ige Natriumnitritlösung, 2 Teile 10 %ige Kaliumkarbonatlösung.

(b) Aroylglycin-Reagenz nach Angaben von SMITH<sup>23</sup>: 1 Teil 5 %ige *p*-Dimethylaminobenzaldehydlösung in Essigsäureanhydrid, 4 Teile Aceton p.a.

(c) Eisenchlorid-Reagenz nach Vorschrift von SMITH<sup>23</sup>: 2 %ige Eisen(III)-Chlorid-Lösung.

### Durchführung der Elektrophorese

0.02 ml der Äthylalkohol-Testsubstanzlösung wurden mit einer Pipette in Form eines feinen Striches senkrecht zur Laufrichtung auf das mit der angegebenen Elektrolytlösung gut angefeuchtete Papier aufgetragen. Bei Anwendung der Elektrophorese-Apparatur mit flüssigem Wärmeaustausch liegt der Auftragsort 8 cm von der Kathode entfernt. Trennzeit und Voltstärke: 30 min bei 1400 V, anschliessend 60 min bei 2200 V, anschliessend 90 min bei 2700 V (= 30–60 V/cm). Der mittlere Stromdurchgang beträgt hierbei 10–45 mA. Bei Verwendung der Apparatur nach WIELAND UND PFLEIDERER liegt der Auftragsort 13 cm von der Kathode entfernt. Die Trennzeit beträgt 420 min bei einer Spannung von 2100 V (= 50 V/cm). Der mittlere Stromdurchgang schwankt hierbei zwischen 40 und 80 mA.

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurde das Papier im Trockenschrank 30 min bei 60° getrocknet.

### ERGEBNISSE

Auf den in Fig. 1a dargestellten Elektrophoresestreifen waren 16 Testsubstanzen aufgetragen und die elektrophoretische Trennung mit der Apparatur nach MICHL in der beschriebenen Art durchgeführt worden. Anschliessend wurde der Streifen mit *p*-Nitroanilin-Reagenz besprüht. Wie die Abbildung zeigt, stellen sich 14 der aufgetragenen 16 Substanzen als scharf begrenzte Banden gut dar: In Richtung Kathode — vom Auftragsort aus gesehen — in blau-grauer Farbe das DL-Dihydroxyphenylalanin (Nr. 1), in Richtung Anode — ebenfalls vom Auftragsort aus gesehen — in dunkelroter Farbe die 5-Hydroxyindolessigsäure<sup>25</sup> (Nr. 2), in roter Farbe die *p*-Hydroxybenzoesäure (Nr. 3), in grau-brauner Farbe die 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (Nr. 4), in lila-blauer Farbe die *p*-Hydroxyphenylessigsäure (Nr. 5), in

gelber Farbe die  $\alpha$ -Resorcylsäure (Nr. 6), in violett-brauner Farbe die *o*-Hydroxyphenylessigsäure (Nr. 7), in roter Farbe die *m*-Hydroxybenzoesäure (Nr. 8), in lila Farbe das Vanilloylglycin (Nr. 9), in hellroter Farbe die *m*-Hydroxyhippursäure (Nr. 10), in orangener Farbe die *o*-Hydroxyhippursäure (Nr. 11), in grau-blauer Farbe die 3,4-Dihydroxymandelsäure (Nr. 12), in blau-violetter Farbe die Vanillinmandelsäure (Nr. 13) und in lila-blauer Farbe die Xanthurensäure (Nr. 14).

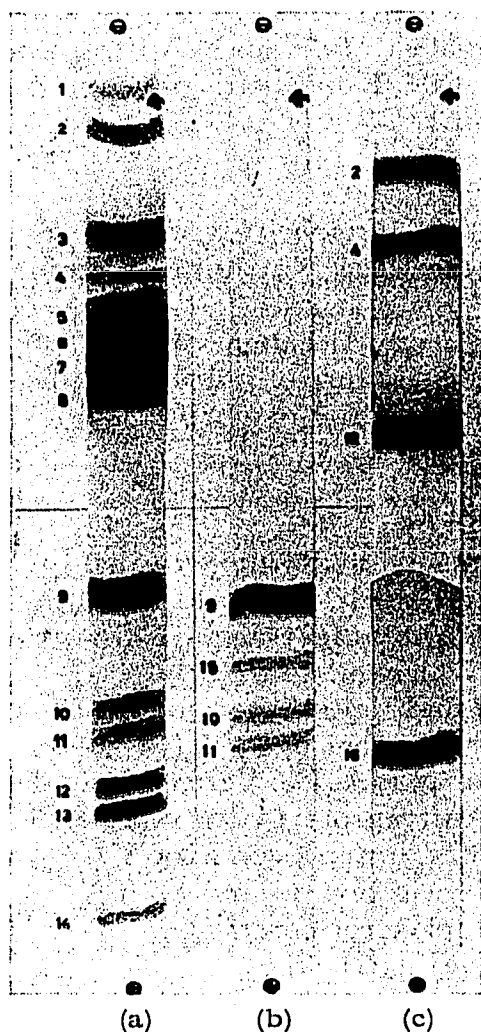


Fig. 1. Phenolsäuren-Hochspannungspherogramm ( $\rightarrow$ : Auftragsort). (a) Spray mit *p*-Nitroanilin-Reagenz. Trennung bei 30–60 V/cm. Trennzeit: 180 min. (b) Spray mit Aroylglycin-Reagenz. Trennung bei 30–60 V/cm. Trennzeit: 180 min. (c) Spray mit Eisenchlorid-Reagenz. Trennung bei 30–60 V/cm. Trennzeit: 90 min. Weitere Erklärungen siehe Text.

Zwei der aufgetragenen 16 Testsubstanzen stellen sich auf dem Elektrophoresestreifen der Fig. 1a nicht dar: die *p*-Hydroxyhippursäure und die Phenylbrenztraubensäure. Bei Anfärbung des Elektrophoresestreifens mit Aroylglycin kommt die *p*-Hydroxyhippursäure (Nr. 15) — wie in Fig. 1b dargestellt — zwischen dem Vanilloylglycin (Nr. 9) und der *m*-Hydroxyhippursäure (Nr. 10) in dunkelgelber Farbe gut zur Darstellung. Als weitere Fraktion ist bei Anfärbung mit Aroylglycin die *o*-Hydroxyhippursäure sichtbar (Nr. 11).

Die Phenylbrenztraubensäure hingegen "wandert" bei der angegebenen Trenndauer und Voltstärke aus dem Streifen heraus in den Puffer hinein. Zur Darstellung dieser Fraktion ist daher eine kürzere Laufzeit und niedrigere Spannung (30 min bei 1400 V, anschliessend 60 min bei 2200 V) — bei gleichem Auftragsort — notwendig. Unter diesen Bedingungen ist auch die Phenylbrenztraubensäure (Nr. 16) nach Anfärbung mit Eisenchlorid, am weitesten anodisch liegend, als grau-blaue Bande gut sichtbar (siehe Fig. 1 c). Wie die Fig. 1 c weiter zeigt, stellen sich auf dem gleichen Streifen nach Anfärbung mit Eisen(III)-Chlorid auch die 5-Hydroxyindolessigsäure, die 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und die 3,4-Dihydroxymandelsäure gut dar.

Vier Phenolsäuren, die Homovanillinsäure, die Ferulasäure, die Vanillinsäure<sup>20</sup> und die 2-(4-Hydroxyazobenzoe)benzoesäure sind in dem als inertes Medium verwandten organischen Lösungsmittel Heptan teilweise löslich. Um Substanzverluste bei der Auftrennung zu vermeiden, wurden diese Säuren mit einem Pherographen mit festem Wärmeaustausch getrennt. Fig. 2 zeigt einen aus dem Papierbogen ausgeschnittenen Elektrophoresestreifen nach Auftrennung der genannten vier Test-

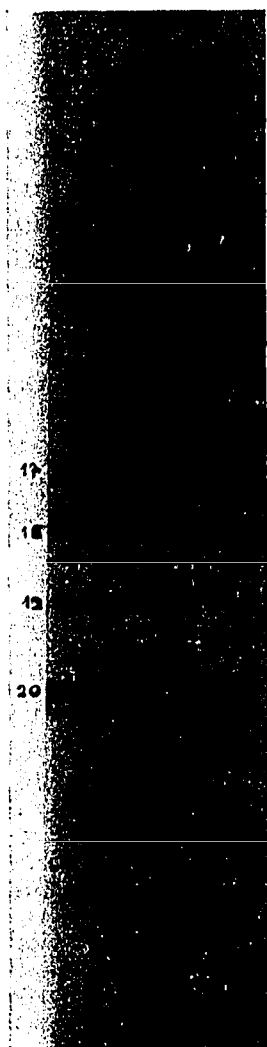


Fig. 2. Phenolsäuren-Hochspannungspherogramm (→: Auftragsort). Spray mit *p*-Nitroanilin-Reagenz. Trennung bei 50 V/cm. Trennzeit: 420 min. Weitere Erklärungen siehe Text.

substanzen: auf der kathodischen Seite stellt sich nach Spray mit *p*-Nitroanilin-Reagenz die Vanillinsäure (Nr. 17) in blau-violetter Farbe und die Ferulasäure (Nr. 18) in blau-grüner Farbe, auf der anodischen Seite die Homovanillinsäure (Nr. 19) in dunkelgrau-blauer und die 2-(4-Hydroxyazobenzoe)benzoesäure (Nr. 20) in gelb-brauner Farbe gut dar.

#### BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Obwohl die Phenolsäuren, wie eingangs darauf hingewiesen, eine wesentliche patho-physiologische Bedeutung besitzen können, wurden eingehendere Untersuchungen über ihre Ausscheidung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen bisher nur von wenigen Autoren durchgeführt.

CLOTTEN UND CLOTTEN<sup>8</sup> trennten mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese mit flüssigem Wärmeaustausch Phenolsäuren im Urin auf. Ihre bisher mitgeteilten Ergebnisse beschränkten sich jedoch auf einzelne wenige Phenolsäuren und sind noch unvollständig. Bei den üblichen, vornehmlich papierchromatographischen und



Fig. 3. Phenolsäuren-Hochspannungserogramm des Urins. Spray mit *p*-Nitroanilin-Reagenz. Trennung bei 30–60 V/cm. Trennzeit: 110 min.

elektrophoretischen Bestimmungsmethoden<sup>1-7, 9-15, 19, 20, 23, 28-30</sup> überlagern sich die einzelnen Phenolsäurefraktionen auf dem Papier häufig, sodass eine exakte Bestimmung nicht durchgeführt werden kann. Mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese ist es möglich, einen grossen Teil der Phenolsäuren relativ rasch in schmale, scharf von einander abgegrenzte einzelne Fraktionen zu trennen. Das Hochspannungspherogramm der Phenolsäuren gestattet so nicht nur einen raschen, gut orientierenden Überblick über das Phenolsäuremuster des Untersuchten, sondern es ermöglicht auch eine quantitative Bestimmung der meisten Phenolsäuren, da sich diese auf dem Pherogramm nur selten überlagern und so exakt einzeln eluiert werden können. Insbesondere bei Fragestellungen und Untersuchungen, die die Erfassung aller unterschiedlichen Phenolsäuren erfordern, dürfte die hochspannungselektrophoretische Trennmethode besonders geeignet sein, bzw. als ideale Ergänzungsmethode für andere Untersuchungsmethoden dienen. In Fig. 3 sei als Beispiel für die klinische Anwendung der beschriebenen Methode das Phenolsäuren-Urinpherogramm eines Patienten demonstriert. Die Abbildung zeigt, dass sich die Phenolsäuren des Urins mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese gut darstellen und trennen lassen. Über die Einzelheiten der Identifizierung dieses Urinpherogrammes wird an anderer Stelle berichtet werden.

## DANK

Einige Testsubstanzen wurden uns liebenswürdigerweise von Herrn Prof. Dr. O. KRAUPP, Pharmakologisches Institut der Universität Wien, zur Verfügung gestellt, wofür wir sehr herzlich danken. Herrn Prof. Dr. F. HARTMANN, Direktor der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg und seinem Mitarbeiter, Herrn Dr. RUGE dürfen wir für wertvolle Hinweise bei der Beschaffung einiger Testsubstanzen danken.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über eine Methode berichtet, die es gestattet, mit Hilfe von hohen Spannungsgefällen 15 bis 20 Phenolsäuren in einzelne Fraktionen zu trennen. Die Möglichkeiten der Methodik werden diskutiert.

## SUMMARY

A high-voltage electrophoretic method is described by which it is possible to separate mixtures of 15-20 phenolic acids into distinct fractions. The applications of the method are discussed.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW AND P. E. WALL, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 293.
- <sup>2</sup> E. C. BATE-SMITH UND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.
- <sup>3</sup> H. BICKEL UND F. SOUCHON, *Arch. Kinderheilkunde*, (1955) Beiheft No. 31.
- <sup>4</sup> R. J. BOSCOFF UND C. W. COOKE, *Quart. J. Med.*, 23 (1954) 307.
- <sup>5</sup> R. J. BOSCOFF UND B. H. KIRMAN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 4.
- <sup>6</sup> E. BOYLAND UND D. C. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 64 (1956) 578.
- <sup>7</sup> K. G. BRAY, W. V. THORPE AND K. WHITE, *Biochem. J.*, 46 (1950) 271.
- <sup>8</sup> R. CLOTTEN UND A. CLOTTEN, *Hochspannungselektrophorese*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1962.
- <sup>9</sup> F. CRAMER, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstrasse, 4. Aufl., 1958.
- <sup>10</sup> C. E. DALGLIESH, *J. Clin. Pathol.*, 8 (1955) 73.

- <sup>11</sup> M. EFRON, *High voltage paperelectrophoresis*, in I. SMITH, *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, W. Heinemann Medical Books Ltd., London, 1960.
- <sup>12</sup> I. M. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, VEB Gustav Fischer, Jena, 1960.
- <sup>13</sup> H. HARTMANN, *Gastroenterologia*, Suppl. 95 (1961) 182.
- <sup>14</sup> H. HARTMANN, *Klin. Wochschr.*, 39 (1961) 273.
- <sup>15</sup> H. HARTMANN UND W. RUGE, *Deut. Arch. Klin. Med.*, 208 (1962) 298.
- <sup>16</sup> L. HEILMEYER, R. CLOTTEN, J. SANO, A. STURM JR. UND A. LIPP, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 831.
- <sup>17</sup> B. KICKHÖFEN UND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 655.
- <sup>18</sup> B. KICKHÖFEN UND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 659.
- <sup>19</sup> D. KLEIN UND J. M. CHERNAIK, *Clin. Chem.*, 7 (1961) 257.
- <sup>20</sup> O. KRAUPP, H. STORMANN, H. BERNHEIMER UND H. OBENAU, *Klin. Wochschr.*, 37 (1959) 76.
- <sup>21</sup> H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 489.
- <sup>22</sup> H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 83 (1952) 737.
- <sup>23</sup> I. SMITH, *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, W. Heinemann Medical Books Ltd., London, 1960.
- <sup>24</sup> W. VON STUDNITZ, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12, Suppl. 48 (1960).
- <sup>25</sup> A. STURM JR., *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 714.
- <sup>26</sup> A. STURM JR., *Deut. Med. Wochschr.*, 88 (1963) 1000.
- <sup>27</sup> A. STURM JR., *Klin. Wochschr.*, 39 (1961) 365.
- <sup>28</sup> T. SWAIN, *Biochem. J.*, 53 (1953) 200.
- <sup>29</sup> S. L. TOMPSETT, *J. Pharm. Pharmacol.*, 13 (1961) 747.
- <sup>30</sup> S. L. TOMPSETT, *Clin. Chim. Acta*, 3 (1958) 149.
- <sup>31</sup> TH. WIELAND UND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 257.
- <sup>32</sup> TH. WIELAND AND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 199.
- <sup>33</sup> R. T. WILLIAMS. Biological oxidation of aromatic rings, *Biochem. Soc. Symp.*, No. 5 (1950); zit. nach K. DIMROTH, *Einfache isocyclische Verbindungen*, aus HOPPE-SEYLER-TIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Springer, Berlin, 1955.