

CHROM. 3351

## Zur säulenchromatographischen Trennung von Katecholaminmetaboliten an Amberlite CG 50

Die als ein Hauptabbauprodukt von Adrenalin und Noradrenalin geltende 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure<sup>1</sup> wird in der Leber des Menschen und der Ratte über die 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglyoxylsäure<sup>2</sup> und den 3-Methoxy-4-hydroxy-benzaldehyd (Vanillin)<sup>3</sup> zur Vanillinsäure<sup>4-6</sup> abgebaut, die zum Teil ein Konjugat mit Glykokoll (Vanilloylglycin)<sup>7</sup> bildet. Der biologische Abbau der ebenfalls als Metabolit von Adrenalin und Noradrenalin beschriebenen 3,4-Dihydroxy-mandelsäure<sup>8</sup> verläuft teilweise in analoger Weise über die 3,4-Dihydroxy-phenylglyoxylsäure und den 3,4-Dihydroxy-benzaldehyd (Protocatechualdehyd) zur Protocatechusäure<sup>9</sup>. SEKI, INAMORI UND SANO<sup>10</sup> beschrieben 1959 Versuche zur chromatographischen Trennung von Phenolcarbonsäuren an Amberlite mit dem Lösungsmittelgemisch Methyläthylketon-Aceton-0.2 N HCl als mobiler Phase. Für die säulenchromatographische Trennung der als Katecholaminmetabolite beschriebenen Phenole hat sich diese Methode sehr gut bewährt.

### *Experimentelles*

**Substanzen.** 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure, 3,4-Dihydroxy-mandelsäure (Calbiochem, Los Angeles), Vanillin (E. Merck A.G., Darmstadt), Protocatechualdehyd (C. Roth, Karlsruhe), Vanillinsäure (T. Schuchardt, München) und Protocatechusäure (Fluka, Buchs) wurden in Form von Handelsprodukten verwendet. 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglyoxylsäure wurde aus Acetovanillon (3-Methoxy-4-hydroxy-acetophenon)<sup>11</sup>, 3,4-Dihydroxy-phenylglyoxylsäure aus Piperonal (3,4-Methylenedioxybenzaldehyd)<sup>12</sup> und Vanilloylglycin aus Vanillinsäure<sup>13</sup> dargestellt.

**Präparation des Harzes.** Die Präparation des im allgemeinen als Ionenaustauscher-Harz verwendeten Amberlite CG-50 II (Gegenion: H, 200-400 mesh, p.A., Serva, Heidelberg) erfolgte nach HIRS, MOORE UND STEIN<sup>14</sup>. Die Äquilibration des Harzes mit dem Laufmittel Methyläthylketon-Aceton-0.2 N HCl (2:1:9, Vol. Teile) wurde auf einer Nutsche so lange durchgeführt, bis die Titration des Filtrats (mit 0.1 N NaOH) mit der des reinen Lösungsmittelgemisches übereinstimmte.

**Präparation der Säule.** Das in der mobilen Phase suspendierte Amberlite wurde in ein Glasrohr von den Ausmassen  $1.0 \times 110$  cm bis zu einer Höhe von 90 cm eingeschwenkt. Durch einen die Säule umhüllenden Glasrohrmantel wurde aus einem Thermostaten Wasser von 30° gepumpt. Das Aufbringen der Substanzen (5 bzw. 2  $\mu$ Mol von jeder Substanz) erfolgte als Lösung jeweils in insgesamt 1.5 ml mobiler Phase, die Fraktionierung mit Hilfe eines Fraktionssammlers ("Radi Rac", Typ LKB 3400) in Fraktionen von je 32 Tropfen. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 32 Tropfen/6 Min.

**Quantitative Analyse der Fraktionen.** Die quantitative Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von SEKI *et al.*<sup>10</sup>: sie wurden mit je 1 ml 0.1 N Natriumacetat-Lösung versetzt, nach Abdampfen des organischen Lösungsmittelanteils (Eindampfgerät nach HECKER UND KARLSON<sup>15</sup>) mit 0.5 N Natriumacetat auf 3.5 ml aufgefüllt, die Extinktionen bei 260 bzw. 280 m $\mu$  spektrophotometrisch gemessen.

*Identifizierung der getrennten Substanzen.* Die Identifizierung der säulenchromatographisch getrennten Substanzen erfolgte im Anschluss an die quantitative Analyse durch Aufnahme von U.V.-Spektren einzelner Fraktionen (Beckman Spektrophotometer DK-2A) sowie durch papierchromatographische Analyse (absteigende Chromatographie, Whatman-Papier Nr. 1) in den Lösungsmittelsystemen Benzol-Propionsäure-Wasser (2:2:1, Vol. Teile)<sup>16</sup> und Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5, Vol. Teile)<sup>17</sup>.

### *Ergebnisse und Diskussion*

Wie aus Fig. 1 ersichtlich, lässt sich ein Gemisch von je 5  $\mu$ Mol der 3-Methoxy-4-hydroxy-Verbindungen 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (I), Vanilloylglycin (II), 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglyoxylsäure (III), Vanillinsäure (IV) und Vanillin (V) säulenchromatographisch gut auftrennen.

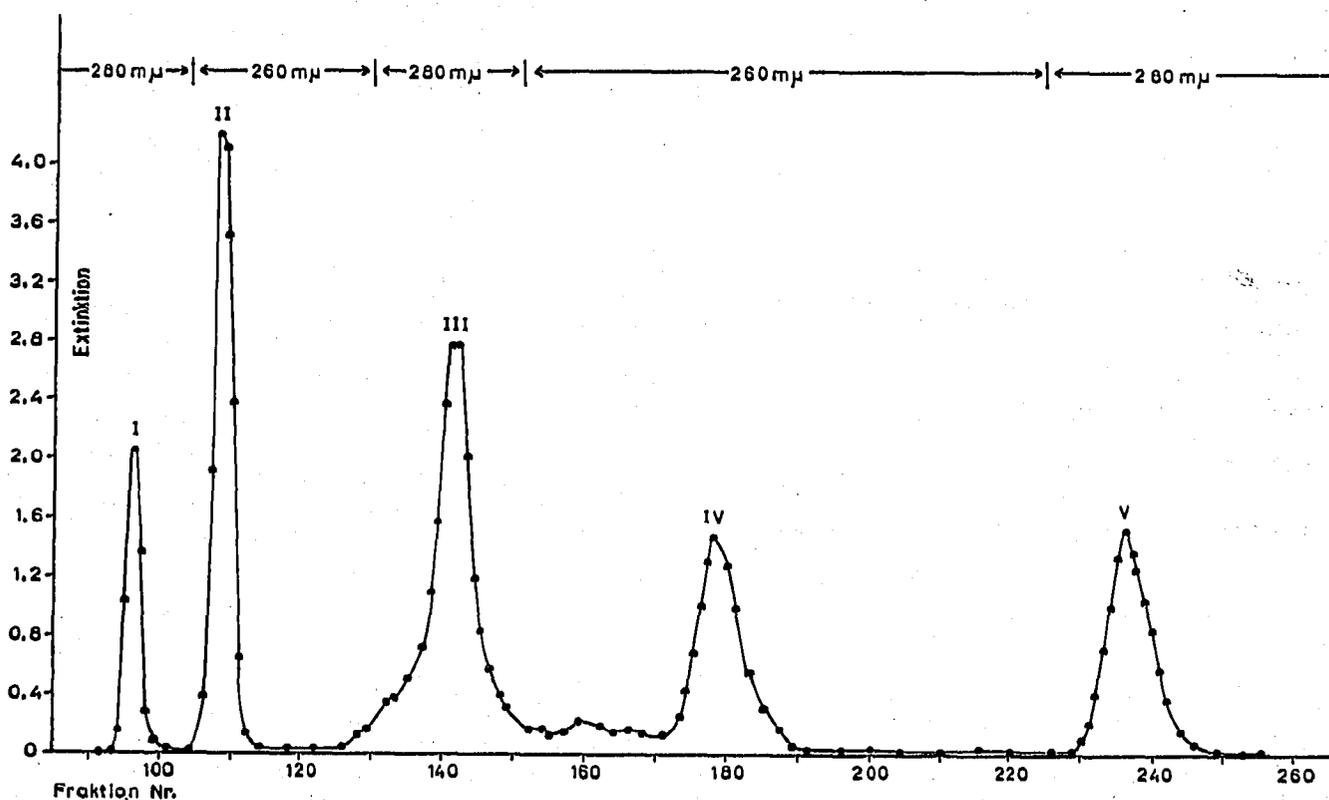


Fig. 1. Säulenchromatogramm eines Gemisches von je 5  $\mu$ Mol 3-Methoxy-4-hydroxy mandelsäure (I), Vanilloylglycin (II), 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglyoxylsäure (III), Vanillinsäure (IV) und Vanillin (V). Amberlite CG-50 II, p.A., 200-400 mesh. Mobile Phase: Methyläthylketon-Aceton-0,2 N HCl (2:1:9, Vol. Teile).

Fig. 2 zeigt die chromatographische Trennung eines Gemisches von je 5  $\mu$ Mol der genannten 3,4-Dihydroxy-Verbindungen in folgender Reihenfolge: 3,4-Dihydroxy-mandelsäure (I), 3,4-Dihydroxy-phenylglyoxylsäure (II), Protocatechusäure (III) und Protocatechualdehyd (IV).

Aus Tabelle I sind die für die quantitativen Analysen benutzten Wellenlängen und die prozentuale Wiederfindung der getrennten Substanzen ersichtlich.

Das Säulenchromatogramm eines Gemisches von 3,4-Dihydroxy- und 3-Meth-

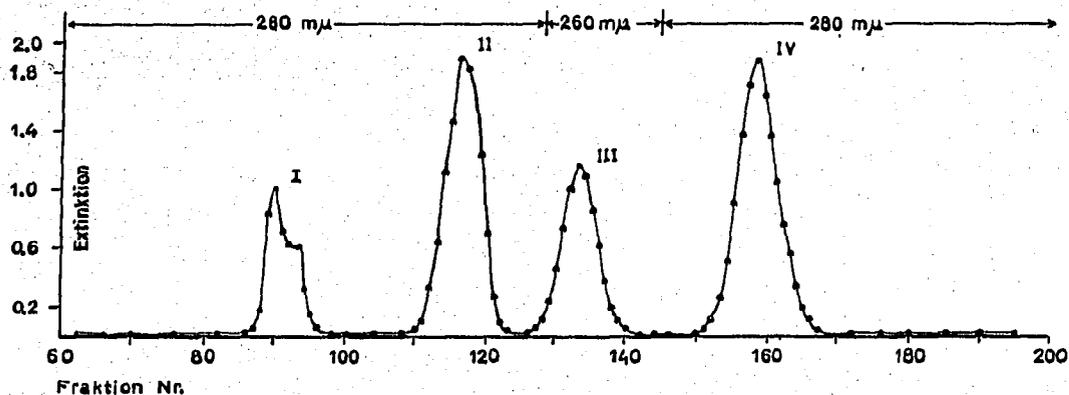


Fig. 2. Säulenchromatogramm eines Gemisches von je 5  $\mu$ Mol 3,4-Dihydroxy-mandelsäure (I), 3,4-Dihydroxy-phenylglyoxyssäure (II), Protocatechusäure (III) und Protocatechualdehyd (IV) Amberlite CG-50 II, p.A., 200-400 mesh. Mobile Phase: Methyläthylketon-Aceton-0.2 N HCl (2:1:9, Vol. Teile).

## TABELLE I

PROZENTUALE WIEDERFINDUNG DER SÄULENCHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN SUBSTANZEN

Substanz	Wellenlänge (m $\mu$ )	Wiederfindung (%)
3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure	280	82
Vanilloylglycin	260	103
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglyoxyssäure	280	101
Vanillinsäure	260	102
Vanillin	280	103
3,4-Dihydroxy-mandelsäure	280	96
3,4-Dihydroxy-phenylglyoxyssäure	280	80
Protocatechusäure	260	81
Protocatechualdehyd	280	104

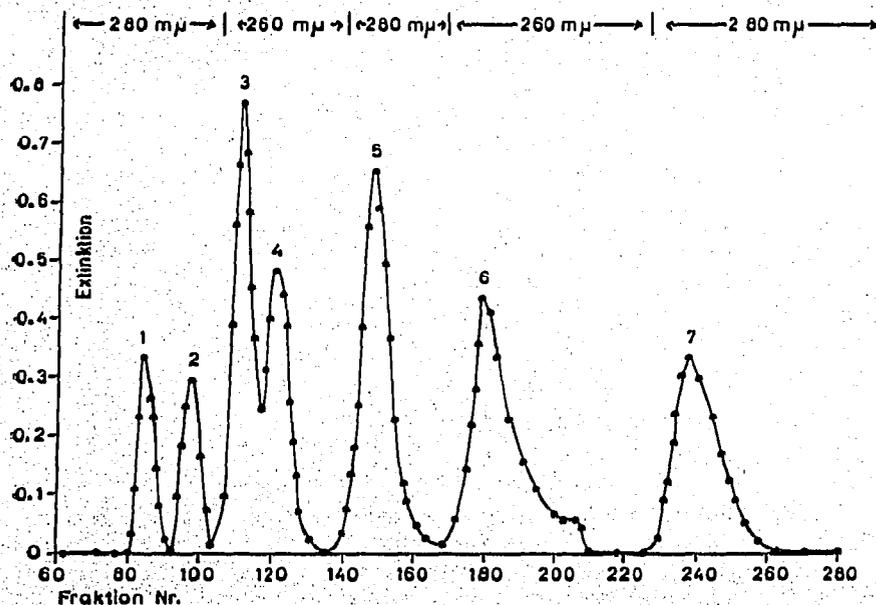


Fig. 3. Säulenchromatogramm eines Gemisches von je 2  $\mu$ Mol 3,4-Dihydroxy-mandelsäure (1), 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (2), Vanilloylglycin (3), Protocatechusäure (4), Protocatechualdehyd (5), Vanillinsäure (6) und Vanillin (7). Amberlite CG-50 II, p.A., 200-400 mesh. Mobile Phase: Methyläthylketon-Aceton-0.2 N HCl (2:1:9, Vol. Teile).

oxy-4-hydroxy-Verbindungen zeigt Fig. 3. Es wurden je 2  $\mu$ Mol der folgenden Substanzen aufgetrennt: 3,4-Dihydroxy-mandelsäure (1), 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (2), Vanilloylglycin (3), Protocatechusäure (4), Protocatechualdehyd (5), Vanillinsäure (6) und Vanillin (7).

Die erzielten Trennungen sind nicht aufgrund eines Ionenaustauschvorgangs zu erklären. SEKI *et al.*<sup>10</sup> weisen darauf hin, dass durch den Salzsäureanteil des als mobile Phase verwendeten Lösungsmittelgemisches die Ionisation der Carboxylgruppen des Amberlite-Harzes zurückgedrängt wird, so dass es für die zu trennenden Substanzen nur als nicht polares Adsorbens dienen kann. Die Verteilung der Substanzen erfolgt offenbar nach Massgabe ihrer Polarität, derart, dass die polaren Substanzen schneller wandern als die weniger polaren.

#### Dank

Die Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Fräulein E. BÜSCHEMANN und Herrn H. W. NOLDEN ist der Autor für die fleissige Mitarbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Bonn\*,  
Bonn (Deutschland)

HELMUT THOMAS

- 1 M. D. ARMSTRONG UND A. McMILLAN, *Federation Proc.*, 16 (1957) 146;
- M. D. ARMSTRONG, A. McMILLAN UND K. N. F. SHAW, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 422.
- 2 H. THOMAS UND W. DIRSCHERL, *Z. Physiol. Chem.*, 339 (1964) 115.
- 3 H. THOMAS UND W. DIRSCHERL, *Acta Endocrinol.*, 47 (1964) 69.
- 4 W. DIRSCHERL, H. THOMAS UND H. SCHRIEFERS, *Gewebs- und Neurohormone, 8. Symp. Deut. Ges. Endocrinol., München, 1.-3.3.1961*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, S. 18; *Acta Endocrinol.*, 39 (1962) 385.
- 5 L. ROSEN UND M. C. GOODALL, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 110 (1962) 767.
- 6 W. DIRSCHERL UND B. BRISSE, *Acta Endocrinol.*, 45 (1964) 641.
- 7 W. DIRSCHERL UND H. THOMAS, *Acta Endocrinol.*, 44 (1963) 101.
- 8 L. C. LEEPER, H. WEISSBACH UND S. UDENTRIEND, *Arch. Biochem. Biophys.*, 77 (1958) 417.
- 9 H. THOMAS, *Naturwiss.*, 53 (1966) 705; *Z. Physiol. Chem.*, 348 (1967) 963.
- 10 T. SEKI, K. INAMORI UND K. SANO, *J. Biochem. (Tokyo)*, 46 (1959) 1653.
- 11 D. W. GLENNIE, H. TECHLENBERG, E. T. REAVILLE UND J. L. MCCARTHY, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 2409.
- 12 G. BARGER UND A. J. EWINS, *J. Chem. Soc. (London)*, 95 (1909) 560.
- 13 E. FISCHER UND K. FREUDENBERG, *Ann. Chem.*, 372 (1910) 32.
- 14 C. H. W. HIRS, S. MOORE UND H. W. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 493.
- 15 E. HECKER UND P. KARLSON, *Chem.-Ing.-Tech.*, 25 (1953) 397.
- 16 M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW UND P. E. WALL, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 293.
- 17 R. K. CROWDEN UND B. J. RALPH, *Australian J. Chem.*, 14 (1961) 475.

Eingegangen den 27. November 1967

\* Direktor: Prof. Dr. Dr. W. DIRSCHERL.