

CHROM. 5915

Papierchromatographische Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxy- und 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure

Die Catechol-O-Methyltransferase¹ (EC 2.1.1.6) bewirkt beim biologischen Abbau der Catecholamine nach bisheriger Auffassung eine Methylierung der *meta*-ständigen Hydroxylgruppe. Aus Adrenalin und Noradrenalin entstehen so im ersten Schritt des Hauptabbauweges die pharmakologisch inaktiven Metabolite Metanephrin und Normetanephrin. Eine sich anschliessende oxydative Desaminierung mittels der Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4) führt zur 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure², die von ARMSTRONG UND McMILLAN³ erstmals im Harn nachgewiesen wurde und deren Bestimmung als quantitativ dominierendes Abbauprodukt des Catecholamin-Stoffwechsels für die Diagnose von catecholaminproduzierenden Tumoren herangezogen wird.

Bemerkenswert ist, dass die Catechol-O-Methyltransferase *in vivo* ausschliesslich eine *meta*-O-Methylierung der Catecholamine bewirken soll. Im *in-vitro*-Versuch liess sich nämlich zeigen, dass dieses Enzym auch in der Lage ist, die Methylierung der *para*-ständigen Hydroxylgruppe von Adrenalin⁴, Noradrenalin⁴ und Dopamin⁵ zu katalysieren. Bei Verwendung der nicht biogenen Substrate 3,4-Dihydroxy-acetophenon, Adrenalon oder Arterenon konnte auch *in vivo* eine *para*-O-Methylierung bei der Ratte nachgewiesen werden⁴. In der isoliert perfundierten Rattenleber entstanden aus dem Catecholamin-Metaboliten Protocatechualdehyd sowohl Vanillin als auch — durch 4-O-Methylierung — Isovanillin⁶.

Es liegt somit nahe anzunehmen, dass auch 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure als Stoffwechselprodukt von Adrenalin und Noradrenalin entstehen kann. Der Nachweis dieser eventuell auftretenden 4-Methoxy-Verbindung neben dem Hauptmetaboliten 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure ist dann möglich, wenn eine Methode zur Auftrennung der beiden Isomeren existiert. Trennversuche mit Hilfe von Hochspannungselektrophorese, Papier- und Dünnschichtchromatographie waren bisher erfolglos^{7,8}. Auch die in einem Falle angegebenen geringen Differenzen in den R_F -Werten⁹ reichen für eine Trennung nicht aus. Erst nach Kupplung mit diazotiertem *p*-Nitranilin oder diazotierter Sulfanilsäure war eine papierchromatographische Auftrennung der aus den beiden Phenolcarbonsäuren entstandenen Azoderivate möglich⁷. Eine Methode, die 3,4-isomeren Hydroxy-methoxy-mandelsäuren als solche voneinander zu trennen, wird in vorliegender Mitteilung aufgezeigt.

Experimentelles

4-Hydroxy-3-methoxy-DL-mandelsäure (I) wurde von Calbiochem, Los Angeles, bezogen (Reinheitsstufe: A grade). Für die Darstellung von 3-Hydroxy-4-methoxy-DL-mandelsäure (II) war Isovanillin Ausgangsprodukt. Durch Cyanhydrinsynthese erhielt man zunächst 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäurenitril¹⁰. Addition von Methanol in Gegenwart von wasserfreiem Chlorwasserstoff führte zum Imidoesterhydrochlorid. Der hieraus durch Hydrolyse gewonnene Methylester wurde alkalisch verseift und ergab dünnschichtchromatographisch reines II (Lit. 11): Schmp. 128–129° (Aceton–Petroläther) (Lit. 11 und 12: Schmp. 123–124° bzw. 75°).

Von den Isomeren wurden je 20 μ g als äthanolische Lösung auf Whatman-

Papier Nr. 1 (17 × 50 cm) aufgetragen. Laufmittel: Benzol–Eisessig–Wasser (2:2:1), obere Phase. Die Entwicklung erfolgte absteigend bei 28°; unmittelbar vor dem Start wurden 200 ml der unteren Phase auf den Boden des nicht mit Filterpapier ausgekleideten Chromatographietanks (30 × 20 × 50 cm) gegeben. Die Laufzeit für das Durchlaufchromatogramm betrug 64 h.

Zur Lokalisation der Substanzen auf den Chromatogrammen wurden folgende Sprühreagenzien verwendet: (a) Diazotiertes *p*-Nitranilin und diazotierte Sulfanilsäure — Lösung A: 0.3 g *p*-Nitranilin bzw. 0.3 g Sulfanilsäure gelöst in 100 ml HCl (8 ml konz. HCl mit Wasser ad 100 ml), Lösung B: 5 g NaNO₂ mit Wasser ad 100 ml und Lösung C: 20 g NaCO₃ mit Wasser ad 100 ml. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden 2.5 ml A, 0.15 ml B und 3.0 ml C zusammengegeben. (b) Diazotiertes (β -Diäthylamino-äthyl)-(*p*-aminophenyl)-sulfon (Roses Reagenz)¹³.

Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Fig. 1 ersichtlich, lässt sich unter den angegebenen Bedingungen die Verbindung I (Laufstrecke: 22.0 cm) von dem Isomeren II (Laufstrecke: 19.5 cm) deutlich trennen. Die isomeren Substanzen zeigen keine unterschiedlichen Farbreaktionen bei Verwendung von diazotiertem *p*-Nitranilin (violett) und diazotierter Sulfanilsäure (orange) als Sprühreagenzien. Werden die Substanzen jedoch durch Kuppeln mit diazotiertem Roses Reagenz sichtbar gemacht, so entwickelt sich im Falle von I ein rot-violetter Farbstoff, während aus II ein rosafarbenes Azoderivat entsteht.

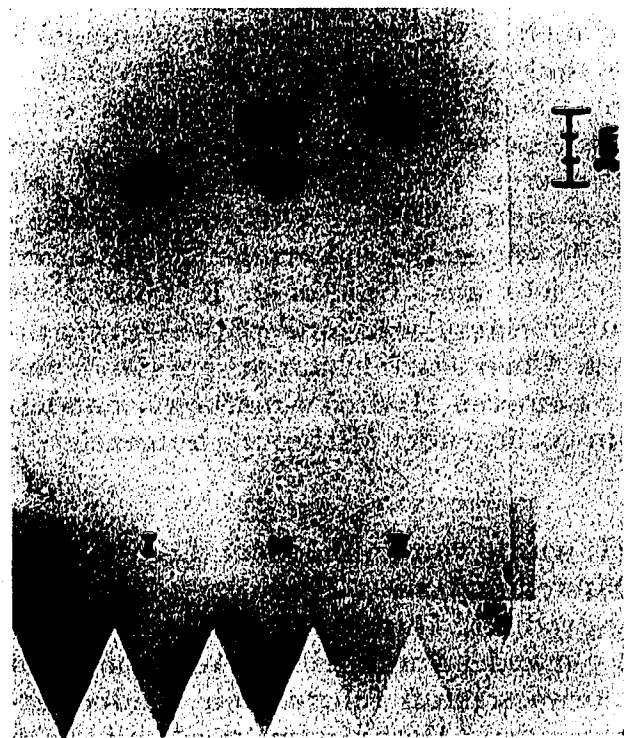


Fig. 1. Durchlaufchromatogramm (Whatman-Papier Nr. 1). I = 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure; II = 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure; M = Mischung der beiden Isomeren; je 20 μ g. Laufmittel: Benzol–Eisessig–Wasser (2:2:1), obere Phase. Laufzeit: 64 h. Laufstrecken: 22.0 cm (I), 19.5 cm (II). Temperatur 28°. Einzelheiten s. Text.

Die chromatographische Trennung von Phenolen nach vorausgehender Kuppelung mit diazotiertem *p*-Nitranilin bzw. diazotierter Sulfanilsäure auf dem Startpunkt des Papiers⁷ kann zu Fehldeutungen führen, denn strukturell unterschiedliche Phenole ergeben nach dem Kuppeln unter Umständen denselben Azofarbstoff. So haben GOODMAN *et al.*¹⁴ im präparativen Masstab gezeigt, dass aus I sowohl mit diazotiertem *p*-Nitranilin als auch mit diazotierter Sulfanilsäure jeweils dasselbe Azoderivat entsteht wie bei Verwendung von Guajakol als Phenolkomponente. Die Autoren weisen darauf hin, dass infolgedessen beim Nachweis und bei der Bestimmung von 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure Unklarheiten entstehen können durch Anwesenheit von Guajakol, das als Bestandteil von Zigarettenrauch, Fuselölen und pharmazeutischen Präparaten sowie als Verunreinigung des Vanillins in biologische Flüssigkeiten gelangen kann. Unter diesem Aspekt erscheint es notwendig, die Phenole als solche chromatographisch aufzutrennen, bevor die Kupplung zum Azofarbstoff erfolgt.

Abteilung für Biochemie der Universität Ulm,
Ulm (B.R.D.)

HELMUT THOMAS
HEINRICH OCKENFELS

- 1 J. AXELROD UND R. TOMCHICK, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 702.
- 2 L. C. LEEPER, H. WEISSBACH UND S. UDENFRIEND, *Arch. Biochem. Biophys.*, 77 (1958) 417.
- 3 M. D. ARMSTRONG UND A. McMILLAN, *Fed. Proc.*, 16 (1957) 146.
- 4 J. W. DALY, J. AXELROD UND B. WITKOP, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1155.
- 5 S. SENOH, J. DALY, J. AXELROD UND B. WITKOP, *J. Amer. Chem. Soc.*, 81 (1959) 6240.
- 6 H. THOMAS UND S. ROTH, *Z. Physiol. Chem.*, 351 (1970) 1325.
- 7 W. VON STUDNITZ, *Clin. Chim. Acta*, 12 (1965) 330.
- 8 P. MATHIEU UND L. REVOL, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 371.
- 9 J. DITTMANN, *J. Chromatogr.*, 32 (1968) 764.
- 10 G. HAHN UND M. R. TULUS, *Ber.*, 74 (1941) 500.
- 11 A. LA MANNA UND V. GHISLANDI, *Gazz. Chim. Ital.*, 89 (1959) 1231.
- 12 F. EISENLOHR UND G. MEIER, *Ber.*, 71 (1938) 1005.
- 13 R. J. BOSCOFF UND W. T. COOKE, *Quart. J. Med.*, 23 (1954) 307.
- 14 I. GOODMAN, A. P. OLENCZAK, J. W. SCHERRER UND R. B. HIATT, *Biochim. Biophys. Acta*, 156 (1968) 364.

Eingegangen am 16. November 1971

J. Chromatogr., 67 (1972) 197-199