

Note

Dünnschicht- und gaschromatographische Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxy- und 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure

HELMUT THOMAS, EDMUND RODNEY LAX und HEINRICH OCKENFELS

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

(Eingegangen am 21. März 1973)

Das Hauptabbauprodukt der Hormone Adrenalin und Noradrenalin stellt die 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure dar¹, deren quantitative Erfassung im menschlichen Harn für die Diagnose catecholaminproduzierender Tumoren eine hervorragende Rolle spielt². Voraussetzung für die Entstehung dieses Metaboliten ist eine *meta*-O-Methylierung biogener Brenzcatechin-Derivate (Adrenalin, Noradrenalin bzw. 3,4-Dihydroxy-mandelsäure) durch die Catechol-O-Methyltransferase*. Von diesem Enzym ist bekannt, dass es *in vitro* auch eine Methylierung der *para*-ständigen Hydroxylgruppe katalysieren kann^{3,4}. Eine *para*-O-Methylierung, allerdings von nicht biogenen Substraten, konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden⁴. Ausserdem wurde über die Entstehung von 4-O-Methyläthern der Catecholamin-Metabolite 3,4-Dihydroxy-benzaldehyd⁵ und 3,4-Dihydroxy-benzoesäure⁶ in der isoliert perfundierten Rattenleber berichtet. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass eine *para*-O-Methylierung der 3,4-Dihydroxy-mandelsäure als normaler Stoffwechselschritt möglich ist. Die Tatsache, dass sich das zu erwartende Methylierungsprodukt 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure bisher als Metabolit nicht nachweisen liess, könnte auf das Fehlen leistungsfähiger Trennmethode zurückzuführen sein.

Kürzlich wurde über die Möglichkeit einer papierchromatographischen Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxy- und 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure berichtet⁷. In der vorliegenden Mitteilung wird eine dünnschicht- sowie eine gaschromatographische Methode zur Trennung dieser Isomeren in Form ihrer Methylester beschrieben.

EXPERIMENTELLES

Von der 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure wurde die Reinheitsstufe "A grade" des Handelsproduktes der Fa. Calbiochem, Los Angeles, Calif., U.S.A. verwendet. 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure^{8,7} stellte man aus Isovanillin über das 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäurenitril⁹ dar. Zwischenprodukt dieser Synthese war 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäuremethylester⁸ (I).

Für die Herstellung des bisher nicht in Substanz beschriebenen 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäuremethylesters (II) war Vanillin Ausgangsprodukt; Cyanhydrinsynthese ergab 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäurenitril¹⁰. Das hieraus mit Methanol und wasserfreiem Chlorwasserstoff erhaltene Imidoesterhydrochlorid wurde zum

* S-Adenosylmethionin: Catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6).

Methylester II hydrolysiert: Farblose Blättchen vom Schmp. 84–85° (Chloroform-Petroläther).

Veresterung

Die Veresterung der isomeren Hydroxy-methoxy-mandelsäuren, die den chromatographischen Trennungen vorausgehen muss, wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 ml 0.2 *N* methanolische Salzsäure, Substanzmengen bis 1000 μg , 3 h bei 0° unter Ausschluss von Wasser mit frisch zubereiteter methanolischer HCl. Hierbei war die Veresterung der Säuren quantitativ und führte in beiden Fällen zu einem einheitlichen Reaktionsprodukt, das jeweils das gleiche chromatographische Verhalten wie der authentische Methylester I bzw. II zeigte. Der Ansatz wurde sogleich am Rotationsverdampfer (ohne Verwendung eines Bades) in Vakuum zur Trockne gebracht. Den Abdampfrückstand nahm man in Methanol auf; anschliessend wurden aliquote Teile der Lösung auf Dünnschichtplatten oder im Falle der Gaschromatographie auf Chrom-Nickel-Spiralen aufgetragen.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde in Trogkammern (Desaga, Heidelberg, B.R.D.) bei Kammersättigung durchgeführt unter Verwendung von DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ (20×20 cm; Schichtdicke 0.25 mm) der Fa. Merck (Darmstadt, B.R.D.). Zur Trennung dienten die Fließmittel A: Chloroform; B: Benzol-Triäthylamin (10:2); und C: Chloroform-Cyclohexan-Diäthylamin (5:4:1). Es wurde jeweils dreimal in einer Dimension über eine Strecke von 15 cm aufsteigend chromatographiert; die Laufzeiten betragen für eine einmalige Entwicklung 45–55 min (Systeme A und B) bzw. 60–70 min (C). Die Detektion der getrennten Substanzen (je 5 μg) erfolgte auf der trockenen Platte unter UV-Licht oder durch Besprühen mit diazotierter Sulfanilsäure bzw. diazotiertem *p*-Nitranilin^{7,11}.

Gaschromatographie

Zur Gaschromatographie wurde ein Gerät (Modell 7300) der Fa. Packard (Zürich, die Schweiz) verwendet, das mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet war. Dimensionen der Glassäulen: Länge 1.83 m (6 ft.), Innendurchmesser 4 mm. Die Untersuchung erfolgte an 5 stationären Phasen auf Gas-Chrom Q (100–120 mesh) als Träger unter folgenden Bedingungen: 3% OV-1 (Säulentemperatur 140°; Trägergas Stickstoff mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 40 ml/min bei 0.81 kp/cm²); 3% OV-17 (180°; N₂: 40 ml/min bei 0.67 kp/cm²); 3% OV-210 (145°; N₂: 45 ml/min bei 0.81 kp/cm²); 3% OV-225 (180°; N₂: 41 ml/min bei 0.77 kp/cm²); 1% HI-EFF-8BP und 1% HI-EFF-1BP (200°; N₂: 41 ml/min bei 0.97 kp/cm²). Die Proben, auf Chrom-Nickel-Spiralen aufgetragen, wurden mittels eines Festprobengebers auf die Säule gebracht. Als innerer Standard diente Anthracen.

Bei der Herstellung der Trimethylsilyl-Derivate (TMS-Derivate) löste man die Substanz in *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) und hielt die Reaktionsmischung 2 h auf 60°. Dann wurde quantitativ auf Chrom-Nickel-Spiralen übertragen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die dünnschichtchromatographische Trennung der isomeren Mandelsäuremethylester (I und II) war unter den angegebenen Bedingungen in den drei verwen-

deten Fließmitteln ausreichend; die besten Ergebnisse wurden mit Fließmittel B und C erzielt (Tabelle I).

TABELLE I

MEHRFACHENTWICKLUNG AUF DC-FERTIGPLATTEN KIESELGEL F₂₅₄

Fließmittel A: Chloroform; B: Benzol-Triäthylamin (10:2); C: Chloroform-Cyclohexan-Diäthylamin (5:4:1). Dreimalige Entwicklung über eine Strecke von 15 cm. R_{ST} = bezogen auf Guajacol (= 1.00) als Standard nach Dreifachentwicklung; Laufstrecke von Guajacol: 10.5 cm (Fließmittel A), 9.2 cm (B) bzw. 7.0 cm (C).

Verbindung	<i>R_{ST}-Werte</i>		
	<i>Fließmittel</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäuremethylester	0.20	0.37	0.24
4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäuremethylester	0.28	0.58	0.49

Eine gaschromatographische Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxy- und 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure in Form der freien Säuren war unter den angegebenen Bedingungen nicht möglich, da die Substanzen infolge ihrer hohen Polarität nicht eluiert werden konnten. Die durch Silylierung der beiden Säuren mit BSA gewonnenen tris(TMS)-Derivate sind zwar chromatographierbar, jedoch liess sich nur eine unzureichende Auflösung der Peaks erreichen.

Nach Veresterung der isomeren Säuren mit methanolischer Salzsäure wurde dagegen an fünfstationären Phasen eine vollständige Auftrennung der entsprechenden Methylester I und II erzielt (Tabelle II). Die beste Trennung erhielt man mit der HI-EFF-Säule, allerdings bei einer Säulentemperatur, die keine weitere Steigerung mehr zulässt, da für HI-EFF-1BP eine Begrenzung bei 200° gegeben ist. Bei Verwendung

TABELLE II

RELATIVE RETENTIONSZEITEN VON 3-HYDROXY-4-METHOXY- UND 4-HYDROXY-3-METHOXY-MANDELSÄUREMETHYLESTER

Einzelheiten siehe unter Experimentelles.

Verbindung	<i>Relative Retentionszeit</i>				
	<i>Stationäre Phase und Säulentemperatur</i>				
	<i>OV-1 140°</i>	<i>OV-17 180°</i>	<i>OV-210 145°</i>	<i>OV-225 180°</i>	<i>HI-EFF 200°</i>
3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäuremethylester	0.84	1.02	1.65	2.19	3.64
4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäuremethylester	0.71	0.81	1.32	1.72	2.73
Anthracen	1.00 (16.0 min)	1.00 (10.9 min)	1.00 (8.5 min)	1.00 (9.8 min)	1.00 (7.5 min)

von OV-210 als stationäre Phase erwies sich ein Tailing der Peaks als störend. Für Routinezwecke empfiehlt sich die Trennung an OV-225 bei Säulentemperaturen von 180–200° (Fig. 1). Eine quantitative Analyse auf der OV-225-Säule ist für Proben von 5–100 μg unproblematisch; denn für beide Methylester besteht in diesem Bereich eine lineare Abhängigkeit zwischen Substanzmenge und Peakfläche. Für die Bestimmung kleinerer Substanzmengen ist die Aufstellung einer Eichkurve erforderlich.

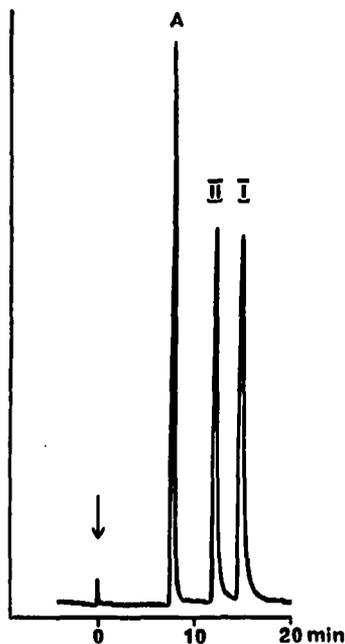


Fig. 1. Gaschromatographische Trennung von 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäuremethylester (I) und 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäuremethylester (II) auf OV-225. (A = Anthracen). Bedingungen: 3% OV-225 auf Gas-Chrom Q (100–120 mesh). Dimensionen der Säule, 1.83 m \times 4 mm; Säulentemperatur, 200°; Trägergas, N₂ (40 ml/min, 0.84 kp/cm²).

Durch Silylierung der Methylester I und II geht der Unterschied im chromatographischen Verhalten fast vollständig verloren, so dass nur an zwei Phasen eine geringe Auftrennung erkennbar war: An OV-17 (180°) betrug die relative Retentionszeit für das bis(TMS)-Derivat von I 0.89, für das von II 0.85; als entsprechende Werte wurden an OV-225 (180°) 0.67 bzw. 0.64 gefunden.

Es lässt sich also festhalten, dass die gaschromatographische Trennung des Catecholamin-Metaboliten 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure von der isomeren 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure am günstigsten in Form der (nicht silylierten) Methylester erfolgt. Die aufgezeigten dünn-schicht- und gaschromatographischen Methoden bieten gegenüber der Papierchromatographie⁷ (Durchlaufchromatogramm, 64 h) den Vorteil des geringeren Zeitaufwandes. Das gaschromatographische Verfahren ist darüber hinaus empfindlicher und erlaubt eine direkte quantitative Auswertung.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATUR

- 1 M. D. Armstrong und A. McMillan, *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 16 (1957) 146.
- 2 J. J. Pisano, J. R. Crout und D. Abraham, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 285.
- 3 S. Senoh, J. Daly, J. Axelrod und B. Witkop, *J. Amer. Chem. Soc.*, 81 (1959) 6240.
- 4 J. W. Daly, J. Axelrod und B. Witkop, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1155.
- 5 H. Thomas und S. Roth, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 351 (1970) 1325; 353 (1972) 138.
- 6 H. Thomas, D. Müller-Enoch und S. Roth, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353 (1972) 1894.
- 7 H. Thomas und H. Ockenfels, *J. Chromatogr.*, 67 (1972) 197.
- 8 A. La Manna und V. Ghislandi, *Gazz. Chim. Ital.*, 89 (1959) 1231.
- 9 G. Hahn und M. R. Tulus, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 74 (1941) 500.
- 10 K. N. F. Shaw, A. McMillan und M. D. Armstrong, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 27.
- 11 H. G. Bray, W. V. Thorpe und K. White, *Biochem. J.*, 46 (1950) 271.