

CHROM. 7894

Note

Säulenchromatographische Trennung 3,4-isomerer Hydroxymethoxymandelsäuren*

HELMUT THOMAS, HEINRICH PONNATH und DIETER MÜLLER-ENOCH

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

(Eingegangen am 22. August 1974)

Die 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure ("Vanillinmandelsäure") ist der quantitativ dominierende Metabolit der Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin^{1,2}. Eine der endogenen Vorstufen dieser Phenolcarbonsäure stellt die 3,4-Dihydroxymandelsäure dar³. Aus ihr kann, wie Perfusionsversuche an der isolierten Rattenleber ergeben haben, mit Hilfe von S-Adenosylmethionin als Methylendonator durch die katalytische Wirksamkeit der Catechol-O-Methyltransferase^{**},⁴ neben der 4-Hydroxy-3-methoxy- auch die isomere 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure entstehen⁵. Man muss annehmen, dass eine Methylierung der *para*-ständigen Hydroxylgruppe der 3,4-Dihydroxymandelsäure auch in der menschlichen Leber möglich ist. Mathieu und Revol⁶ haben das Vorkommen von 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure in mehreren Proben von menschlichem Harn wahrscheinlich gemacht: Nach Oxydation (Natrium-*m*-perjodat) eines papierchromatographisch isolierten Substanzgemisches mit dem R_F -Wert der beiden isomeren Mandelsäurederivate wurde als Oxydationsprodukt neben dem 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin) auch der 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (Isovanillin) durch Papierchromatographie nachgewiesen.

Inzwischen haben wir über eine papierchromatographische Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxy- und 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure berichtet⁷. Ausserdem wurde eine dünnschicht- sowie eine gaschromatographische Methode zur Trennung der isomeren Säuren in Form der Methylester beschrieben⁸. In der vorliegenden Mitteilung setzen wir uns mit der Möglichkeit der säulenchromatographischen Trennung dieser Isomeren an dem Kationen-Austauscherharz PA-28 auseinander.

EXPERIMENTELLES

Substanzen

4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure (I) ("A grade", Calbiochem, Los Angeles, Calif., U.S.A.) wurde in Form des Handelsproduktes verwendet, 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure (II)^{9,7} wurde aus 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd über das 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäurenitril¹⁰ dargestellt, wobei man als Zwischenprodukt 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäuremethylester (IV)⁹ erhielt. 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäuremethylester (III) liess sich aus 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd über

* Herrn Professor Dr. Wilhelm Dirscherl zum 75. Geburtstag gewidmet.

** S-Adenosylmethionin: Catechol-O-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.6).

das 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäurenitril¹¹ darstellen⁸. Das Kationenaustauscherharz PA-28 (sphärische Partikel eines sulfonierten Styrol-Divinylbenzol-Harzes) wurde von Beckman Instruments (München, B.R.D.) bezogen.

Chromatographie

Die Trennversuche erfolgten an einer Chromatographiesäule (0.9×60 cm) mit Einspritzmembran und Wassertemperiermantel (Firma Biotronik, Frankfurt/Main, B.R.D.), die mit dem Kationenaustauscherharz PA-28 gefüllt war. Das chromatographische System wurde mit Teilen eines Aminosäureanalysators vom Typ Unichrom (Beckman Instruments) nach den Angaben von Lange und Hempel¹² aufgebaut.

Die Extinktionen des Säuleneluats liessen sich in einer Messzelle (Quarz) vom Durchflusstyp (Schichttiefe 3 mm, Volumen 0.1 ml) eines UV-Durchflussphotometers (LKB 8300 A Uvicord II), dem ein Einkanalpunktschreiber (LKB 6520 A-2) angeschlossen war, bestimmen.

Folgende Puffer wurden verwendet¹²: Puffer I — Natriumcitratpuffer, pH 2.2. 19.6 g Natriumcitrat \cdot 2 H₂O, 5 ml Thiodiglycol, 1 g Brij-35, 1 ml *n*-Caprylsäure, 850 ml aqua dest. und 19.6 ml konz. HCl (37%). Die Lösung wurde mit 6 *N* HCl auf pH 2.2 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt. Puffer II — Natriumcitratpuffer, pH 3.28. 392.2 g Natriumcitrat \cdot 2 H₂O, 100 ml Thiodiglycol, 20 g Brij-35, 2 ml *n*-Caprylsäure, 18 l aqua dest. und 264.5 ml konz. HCl. Die Lösung wurde auf pH 3.28 eingestellt und auf 20 l aufgefüllt. Puffer III — Natriumcitrat-Borsäurepuffer, pH 4.53. 392.2 g Natriumcitrat \cdot 2 H₂O, 100 ml Thiodiglycol, 20 g Brij-35, 2 ml *n*-Caprylsäure, 18 l aqua dest., 414 ml konz. HCl und 600 g Borsäure. Die Lösung wurde auf pH 4.53 eingestellt und auf 20 l aufgefüllt.

Säulenchromatogramm 1. Je 1 mg der Substanzen I, II, III und IV löste man in insgesamt 10 ml 0.4 *N* HClO₄. Zunächst wurde 1 ml dieser Lösung, sodann 2 ml von Puffer I mit einer Vollglasspritze durch die Einspritzmembran auf die 60 min mit Puffer II äquilibrierte Säule gegeben. Dabei stieg der Druck in der Säule auf etwa 9 atm an. Mittels einer Accu-Flo-Pumpe liess er sich auf 10 atm steigern und konstant halten. Die Elution wurde wie folgt durchgeführt: 20 min Puffer II, sodann 120 min Puffer III und schliesslich 40 min 0.2 *N* NaOH.

Bei einem konstanten Druck von 10 atm war der Durchfluss auf 37 ml/h eingestellt. Die Säulentemperatur betrug 55°. Die Extinktion des Eluats wurde bei 280 nm gemessen. Zur Fraktionierung diente ein Fraktionsammler (LKB 7000 "Ultrarac").

Säulenchromatogramm 2. Die Säule wurde 15 min mit 0.2 *N* NaOH durchströmt und 120 min mit Puffer III äquilibriert. Je 100 µg der Substanzen I und II, in insgesamt 1 ml 0.4 *N* HClO₄ gelöst, wurden, wie oben beschrieben, auf die Säule gebracht, anschliessend 2 ml Puffer I.

Die Elution führte man unter den angegebenen Bedingungen (10 atm, 55°, 37 ml/h) wie folgt durch: 10 min Puffer II, sodann 30 min Puffer III und schliesslich 20 min 0.2 *N* NaOH. Die Extinktionsmessung des Eluats erfolgte wiederum bei 280 nm.

Identifizierung der getrennten Substanzen

Die Identifizierung der getrennten Substanzen erfolgte durch papierchromatographische Analyse⁷, absteigende Chromatographie auf Whatman-Papier Nr. 1 mit dem Lösungsmittelsystem Benzol-Eisessig-Wasser (2:2:1) (obere Phase), bzw. durch

Dünnschichtchromatographie⁸, DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, B.R.D.) mit dem Fließmittel Chloroform-Cyclohexan-Diäthylamin (5:4:1).

ERGEBNISSE

Fig. 1 zeigt das Säulenchromatogramm eines Gemisches von je 100 μg 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure (I), 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure (II), 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäuremethylester (III) und 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäuremethylester (IV). Unter den angegebenen Bedingungen (Chromatogramm 1) liess sich eine vollständige Auflösung der beiden Methylester (III und IV) erzielen, während eine Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxy- und 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure nicht möglich war.

Eine nicht ganz vollständige Auftrennung der beiden isomeren Mandelsäurederivate in Form der freien Säuren wurde unter den Bedingungen des Säulenchromatogramms 2 (Äquilibrierung des Harzes mit Puffer II) erreicht (Fig. 2).

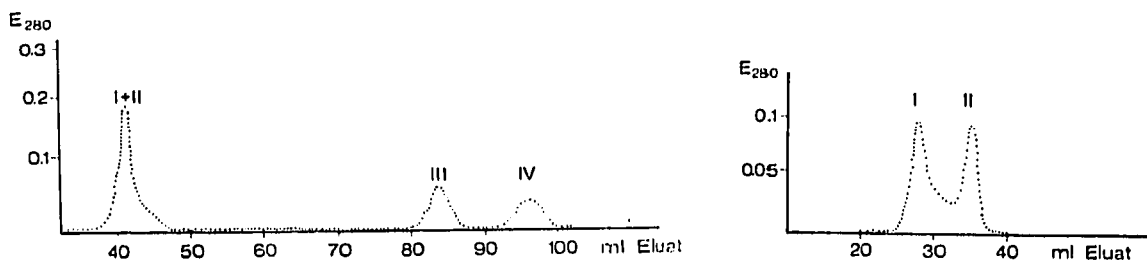


Fig. 1. Säulenchromatogramm eines Gemisches von je 100 μg 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure (I), 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure (II), 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäuremethylester (III) und 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäuremethylester (IV). Säule: 0.9 \times 60 cm; Harz: PA-28 ($16 \pm 6 \mu\text{m}$), äquibriert mit Natriumcitratpuffer pH 3.28; Elution: 0–20 min Natriumcitratpuffer pH 3.28, 20–140 min Natriumcitrat-Borsäurepuffer pH 4.53, anschliessend 0.2 N NaOH. Durchfluss: 37 ml/h; Druck: 10 atm; Säulentemperatur: 55°.

Fig. 2. Säulenchromatogramm eines Gemisches von je 100 μg 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure (I) und 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure (II). Säule: 0.9 \times 60 cm; Harz: PA-28 ($16 \pm 6 \mu\text{m}$), äquibriert mit Natriumcitrat-Borsäurepuffer pH 4.53; Elution: 0–10 min Natriumcitratpuffer pH 3.28, 10–40 min Natriumcitrat-Borsäurepuffer pH 4.53, anschliessend 0.2 N NaOH. Durchfluss: 37 ml/h; Druck: 10 atm; Säulentemperatur: 55°.

Es ist festzustellen, dass die Trennung des Catecholaminmetaboliten 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure von der isomeren 3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure am besten in Form der Methylester erfolgt. Die Veresterung der isomeren Hydroxymethoxymandelsäuren, die einer solchen chromatographischen Trennung vorausgehen muss, lässt sich unter folgenden Bedingungen durchführen⁸: Substanzmengen bis 1000 μg werden mit 1 ml frisch zubereiteter 0.2 N methanolischer Salzsäure versetzt und 3 h bei 0° unter Ausschluss von Wasser stehen gelassen. Die Veresterung der Säuren ist hierbei quantitativ und führt in beiden Fällen zu einem chromatographisch einheitlichen Reaktionsprodukt. Der Ansatz wird sogleich am Rotationsverdampfer (ohne Verwendung eines Bades) in Vakuum zur Trockne gebracht und, wie beschrieben, auf die Säule gegeben.

DANK

Die Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Herrn Professor K. Hempel und Herrn Dr. H.-W. Lange danken wir für die Beratung beim Aufbau des Chromatographiesystems. Fräulein S. Hildenbrand sei für die technische Assistenz gedankt.

LITERATUR

- 1 M. D. Armstrong und A. McMillan, *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 16 (1957) 146.
- 2 M. D. Armstrong, A. McMillan und K. N. F. Shaw, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 422.
- 3 L. C. Leeper, H. Weissbach und S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.*, 77 (1958) 417.
- 4 J. Axelrod und R. Tomchik, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 702.
- 5 H. Thomas, D. Müller-Enoch und E. R. Lax, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354 (1973) 1097.
- 6 P. Mathieu und L. Revol, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 1347.
- 7 H. Thomas und H. Ockenfels, *J. Chromatogr.*, 67 (1972) 197.
- 8 H. Thomas, E. R. Lax und H. Ockenfels, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 187.
- 9 A. La Manna und V. Ghislandi, *Gazz. Chim. Ital.*, 89 (1959) 1231.
- 10 G. Hahn und M. R. Tulus, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 74 (1941) 500.
- 11 K. N. F. Shaw, A. McMillan und M. D. Armstrong, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 27.
- 12 H.-W. Lange und K. Hempel, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 53.