

Metabolisierung von 3,4-Dimethoxybenzaldehyd und 3,4-Dimethoxybenzoesäure in der isoliert perfundierten Rattenleber

Metabolism of 3,4-Dimethoxybenzaldehyde and 3,4-Dimethoxybenzoic Acid
in Perfused Rat Liver

D. Müller-Enoch, H. Thomas, P. Holzmann

Abteilung für Biochemie, Universität Ulm

und

K. Haider und H. Harms

Institut für Biochemie des Bodens, Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode

(Z. Naturforsch. **29 c**, 602—607 [1974]; eingegangen am 15. Mai 1974)

Metabolism of 3,4-Dimethoxybenzaldehyde, 3,4-Dimethoxybenzoic Acid, Rat Liver

Isolated rat livers were perfused with 3,4-dimethoxybenzaldehyde and 3,4-dimethoxybenzoic acid, which were ^{14}C -labelled in the *meta*- and/or *para*-configured methoxy group. Because the aldehyde group was completely oxidized to the carboxylic acid, the perfusions with 3,4-dimethoxybenzaldehyde and those with 3,4-dimethoxybenzoic acid exhibited principally the same results. After perfusion with a 1:1 mixture of (4-O- ^{14}C methyl)- and (3-O- ^{14}C methyl)-3,4-dimethoxybenzaldehyde, each of which had the same specific activity, thin layer chromatography of an extract of the perfusate revealed both radioactive 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid and radioactive 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid as demethylation products. The distribution of radioactivity between these two metabolites was determined as 20:1. Thus, demethylation of the 3,4-dimethoxyphenyl compound occurs preferentially at the *para*-configured methoxy group. After perfusion with a mixture of (4-O- ^{14}C methyl)- and (3-O- ^{14}C methyl)-3,4-dimethoxybenzoic acid under identical conditions the distribution of radioactivity of the named demethylation products was determined as 15:1.

After perfusion with (4-O- ^{14}C methyl)-3,4-dimethoxybenzaldehyde or (4-O- ^{14}C methyl)-3,4-dimethoxybenzoic acid alone, extracts of the perfusates revealed the expected radioactive 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid. In addition it was found, that the 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid produced contained small quantities of radioactivity. From these results it may be inferred that an interconversion between 3-hydroxy-4-methoxy- and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid has occurred. The identification of the metabolites, separated by thin-layer chromatography, was performed by the reversed isotope dilution technique.

Als ein Hauptweg für den biologischen Abbau von Brenzkatechinderivaten wie Adrenalin und Noradrenalin wird die Methylierung der *meta*-ständigen Hydroxylgruppe angesehen. Durch *in-vitro*-Versuche mit gereinigter Brenzkatechin-Methyltransferase (EC 2.1.1.6) ist aber gezeigt worden, daß 3,4-Dihydroxyphenyl-Verbindungen auch in *para*-Stellung methyliert werden können^{1,2}. Bei der Ratte ließ sich darüberhinaus *in vivo* eine *p*-O-Methylierung von nicht biogenen Substraten (Adrenalin, Noradrenalin und 3,4-Dihydroxyacetophenon) nachweisen¹. Beim Menschen wurden nach oraler Applikation von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) Substanzen nachgewiesen, die sich papierchromatographisch wie 3-Hydroxy-4-methoxyphenyläthylamin und 3-Hydroxy-4-methoxyphenylethylsäure verhielten³. Im Rahmen von Perfusionsversuchen

zum Stoffwechsel der Brenzkatechinamin-Metabolite 3,4-Dihydroxybenzaldehyd⁴ und 3,4-Dihydroxybenzoesäure⁵, die wir an isolierten Rattenlebern durchgeführt haben, stellte sich ebenfalls heraus, daß auch eine Methylierung der *para*-ständigen OH-Gruppe erfolgte, daß aber die 4-O-Methyläther im Perfusat in wesentlich geringerer Konzentration vorlagen als die isomeren 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-Verbindungen.

In diesem Zusammenhang interessiert nun auch die Frage nach der endogenen Entstehung von 3,4-Dimethoxyphenyl-Verbindungen. Mehrere Untersucher haben mitgeteilt, daß bei Schizophrenen ein zweifach methyliertes Produkt von 3,4-Dihydroxyphenyläthylamin nämlich 3,4-Dimethoxyphenyläthylamin im Harn ausgeschieden werden könne^{6,7}. Der Befund ist mit einer „gestörten Transmethylierung“, nämlich einer „abnormen *p*-O-Methylierung“ erklärt worden^{7,8}. Es fragt sich aber, ob ein solcher Befund nicht darauf zurückgeführt werden

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Thomas, Abteilung für Biochemie, Universität Ulm, D-7900 Ulm/Donau, Oberer Eselsberg, N 26.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

kann, daß eine normalerweise erfolgende Demethylierung von endogenen 3,4-Dimethoxyphenyl-Verbindungen gestört ist, und zwar eine Demethylierung, die vorzugsweise die *para*-ständige Methoxy-Gruppe betrifft.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Perfusionsversuchen an der isolierten Rattenleber die Demethylierung von 3,4-Dimethoxybenzaldehyd und 3,4-Dimethoxybenzoesäure – diese Substanzen sind als Intermediate der Brenzkatechin-Metabolite 3,4-Dihydroxybenzaldehyd und 3,4-Dihydroxybenzoesäure zu erwarten – untersucht. Die Versuche waren auch im Hinblick auf die Ergebnisse der erwähnten Leberperfusionen mit 3,4-Dihydroxybenzaldehyd und 3,4-Dihydroxybenzoesäure von Interesse.

Material und Methoden

Substanzen

4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Dr. T. Schuchardt, München), 3,4-Dimethoxybenzoesäure, 3,4-Dimethoxybenzaldehyd, 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (C. Roth, Karlsruhe), 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (E. Merck AG, Darmstadt) waren Handelspräparate. 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure wurde aus 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd in Analogie zur Darstellung von 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure synthetisiert⁹.

Synthese der 3- bzw. 4-O-¹⁴CH₃ markierten Dimethoxy-Verbindungen

Zur Darstellung der 3- bzw. 4-O-¹⁴CH₃ markierten Dimethoxybenzoesäure-Präparate wurde 3-Hydroxy-4-methoxy- bzw. 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure-äthylester in Anlehnung an die von Haider und Lim¹⁰ veröffentlichte Vorschrift mit ¹⁴CH₃J methyliert. Hierzu wurden 309,4 mg des jeweiligen Äthylesters (1,7 mmol) in 10 ml Äthylmethylester gelöst und mit 241,2 mg CH₃J (1,7 mmol) und 0,5 mCi ¹⁴CH₃J (spezifische Aktivität 60 mCi/mmol, Radiochemical Centre, Amersham) sowie 300 mg K₂CO₃ versetzt und erst 4 Stunden auf 65 °C, dann 20 Stunden auf 85 °C unter Rückfluß erhitzt (Kühlfüssigkeit – 5 °C). Anschließend wurde vom K₂CO₃ abfiltriert, der Extrakt mit 300 mg frischem K₂CO₃ und 1 ml Dimethylsulfat versetzt und nochmals 90 min unter Rückfluß gekocht. Nach Abfiltrieren wurde das Filtrat eingedampft und der zurückbleibende Ester mit 20 ml äthanolischer NaOH (3% NaOH) durch einstündiges Kochen unter Rückfluß gespalten; nach Ansäuern ließ sich die freie Säure mit Äther extrahieren. Der Eindampfrückstand

wurde aus Äthanol/H₂O (1:1) unter Zusatz von etwas Tierkohle nach Filtration umkristallisiert. Die Ausbeute betrug etwa 75%, bezogen auf das eingesetzte ¹⁴CH₃J.

Zur Darstellung des 3- bzw. 4-O-¹⁴CH₃-Dimethoxybenzaldehyds wurden die entsprechend markierten Säuren durch einstündiges Kochen mit überschüssigem Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt. Nach Abdampfen des Thionylchlorids wurde das Säurechlorid in einem Kugelrohr bei 10⁻² Torr und 150–155 °C fraktioniert destilliert. Das Säurechlorid wurde in trockenem Xylol gelöst und mit 100 mg eines Pd/BaCO₃-Katalysators (5% Pd) sowie 0,01 ml Chinolin S versetzt und dann bei 150 °C mit einem starken H₂-Strom zum Aldehyd reduziert. Der Ablauf der Reduktion war nach etwa 5 Stunden vollständig abgeschlossen. Danach wurde vom Katalysator abfiltriert und das Xylol abgedampft. Der im Rückstand verbleibende Aldehyd wurde durch Sublimation bei 10⁻² Torr und 135 °C im Kugelrohr gereinigt. Die Ausbeute betrug 80–85%, bezogen auf die eingesetzte 3,4-Dimethoxybenzoesäure.

Für die Szintillationsmessung wurde eine Lösung von 3 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,1 g 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzol (POPOP) (E. Merck AG, Darmstadt) in 1 l Toluol verwendet.

Versuchstiere

Versuchstiere waren 8–14 Wochen alte, 270–360 g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten, deren Nahrung aus dem Standardfutter Altromin und Wasser bestand. 30 min vor der Dekapitation wurde den Tieren 1 ml Liquemin injiziert.

Leberperfusion und Aufarbeitung des Perusates

Für die Perfusion, die retrograd von der Lebervene her erfolgte^{11,12}, wurde eine jeweils frisch hergestellte Salzlösung¹³ folgender Zusammensetzung verwendet: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,7 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ und 24 mM NaHCO₃.

Nach Durchströmung der Leber mit 500 ml dieser Lösung (Vorlauf) perfundierte man das Organ in 10 Durchgängen mit einem der folgenden Perfusionsmedien.

Perfusionsmedium 1: 5 mg (3-O-[¹⁴C]Methyl)-3,4-Dimethoxybenzaldehyd (spezifische Aktivität: 1166600 dpm/mg) und 5 mg (4-O-[¹⁴C]-Methyl)-3,4-Dimethoxybenzaldehyd (spezifische Aktivität: 1166600 dpm/mg) in 100 ml Salzlösung.

Perfusionsmedium 2: 10 mg (4-O-[¹⁴C]Methyl)-3,4-Dimethoxybenzaldehyd (spezifische Aktivität: 1050000 dpm/mg) in 100 ml Salzlösung.

Perfusionsmedium 3: 5 mg (3-O- ^{14}C Methyl)-3,4-Dimethoxybenzoesäure (spezifische Aktivität: 790000 dpm/mg) und 5 mg (4-O- ^{14}C Methyl)-3,4-Dimethoxybenzoesäure (spezifische Aktivität: 790000 dpm/mg) in 100 ml Salzlösung.

Persufionsmedium 4: 17 mg (4-O- ^{14}C Methyl)-3,4-Dimethoxybenzoesäure (spezifische Aktivität: 1400000 dpm/mg) in 170 ml Salzlösung. Die mittlere Durchflußgeschwindigkeit betrug $1,1 - 1,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Die Perfusionszeiten betrugen 33 – 88 min.

Die Perfusate 1 und 2 wurden zunächst bei pH 7,4 2-mal mit 200 ml Äther extrahiert, sodann auf pH 1–2 angesäuert, mit NaCl gesättigt und erneut 4-mal mit 200 ml Äther extrahiert.

Im Falle der Perfusate 3 und 4 erfolgten die Extraktionen ausschließlich bei pH 1–2.

Die jeweils vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Eindampfrückstand ließ sich jeweils in 10 ml Aceton lösen („Perfusat-Extrakt“).

Dünnschichtchromatographie

Sie erfolgte mit DC-Fertigplatten Kieselgel F_{254} (20×20 , 0,25 mm; Merck AG, Darmstadt).

Die folgenden Fließmittel wurden verwendet: Benzol/Eisessig/Wasser 2:2:1 (obere Phase) (A) (zweimalige Chromatographie über eine Strecke von 15 cm) und Toluol/Chloroform/Aceton 40:25:35 (B) (einmalige Chromatographie über eine Strecke von 15 cm).

Eine Lokalisation der Substanzen erfolgte visuell unter UV-Licht, durch Besprühen mit diazotierter Sufanilsäure¹⁴ bzw. einer 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1000 ml Äthanol, mit 10 ml konz. HCl versetzt).

Radiodünnschichtchromatogramme wurden mit einem Dünnschicht-Scanner der Firma Berthold (LB 2723) aufgenommen.

Identifizierung

Sie erfolgte außer durch Dünnschichtchromatographie mittels der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik. Nach Durchströmung mit Perfusionsmedium 1 und 3 wurde ein Aliquot (1/20) des jeweiligen Perfusat-Extrakts in System A chromatographisch aufgetrennt (strichförmiger Auftrag; Breite: 3 cm). Eine Teilstrecke der Substanzbahn wurde in 1 mm schmalen Zonen von der Platte gekratzt, die ^{14}C -Aktivität der einzelnen Kieselgel-Zonen im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Im Falle der Perfusionen mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd wurde darüberhinaus 1/20 des Perfusat-

Extrakts in System B aufgetrennt. Die Substanzen wurden wie oben beschrieben lokalisiert.

In allen Fällen wurden 9/10 des Perfusat-Extrakts auf je 2 Dünnschichtplatten verteilt und in System A chromatographiert. Anschließend wurde ein Radiodünnschichtchromatogramm aufgenommen. Die radioaktiven Zonen, deren R_F -Werte denen von authentischer 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure, 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure bzw. 3,4-Dimethoxybenzoesäure entsprachen (Substanzen I, II und III), ließen sich mit Methanol eluieren, die beiden jeweils vereinigten Eindampfrückstände wurden im Falle der biogenen Substanzen I und II rechromatographiert. Im Falle der Substanz III wurde ein aliquoter Teil direkt zur umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik verwendet.

Die nach Rechromatographie erhaltenen radioaktiven Zonen mit dem R_F -Wert der authentischen 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure bzw. 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure wurden erneut eluiert.

1/10 des Eluats diente zur ^{14}C -Aktivitäts-Bestimmung im Szintillationszähler. Mit den verbleibenden 9/10 wurde wie früher beschrieben die umgekehrte Isotopenverdünnungstechnik durchgeführt⁵. Daß diese Methode auch für die Identifizierung der beiden isomeren Säuren anwendbar ist, ließ sich in einer früheren Arbeit beweisen⁵.

Ergebnisse

1/20 des nach Durchströmung mit Perfusionsmedium 1 (Gemisch aus (3-O- ^{14}C Methyl)- und

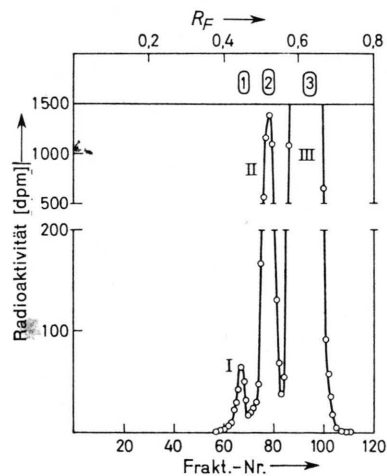


Abb. 1. Radiochromatogramm eines aliquoten Teils (1/20) des nach Durchströmung mit Perfusionsmedium 1 gewonnenen Extrakts (Einzelheiten s. Text). Zweimalige Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatten Kieselgel F_{254} (20×20 , 0,25 mm). Fließmittel: Benzol/Eisessig/Wasser 2:2:1 (obere Phase). Authentische Substanzen: 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (I), 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (2), 3,4-Dimethoxybenzoesäure (3).

(4-O- ^{14}C Methyl)-3,4-Dimethoxybenzaldehyd) erhaltenen Perfusat-Extrakts wurde in System A aufgetrennt. In dem in Abb. 1 gezeigten Radiochromatogramm ist die ^{14}C -Aktivität der einzelnen Kieselgelzonen gegen die Laufstrecke aufgetragen. Das Chromatogramm zeigt radioaktive Substanzonen in Höhe der authentischen 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure ($R_F = 0,44$), 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure ($R_F = 0,51$) und 3,4-Dimethoxybenzoesäure ($R_F = 0,62$) (Metabolite I, II und III).

Die Radioaktivitätsmengen (Metabolit I : Metabolit II) verhalten sich wie 1 : 20.

Wurde 1/20 des Perfusat-Extrakts in System B, in dem eine Abtrennung der Phenolaldehyde (Dimethoxybenzaldehyd, 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd) von den entsprechenden Phenolcarbonsäuren möglich ist, aufgetrennt, so ließen sich in Höhe der authentischen genannten Aldehyde keine Substanzen nachweisen, weder das eingesetzte Substrat noch die anderen – eventuell als Metabolite zu erwartenden – Phenolaldehyde.

9/10 des Perfusat-Extrakts dienten nach entsprechender chromatographischer Auftrennung (s. Methodik) der Identifizierung der radioaktiven Metabolite. Aus Tab. I geht hervor, daß sich der Metabolit II als 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure und III als 3,4-Dimethoxybenzoesäure identifizieren ließ. Bei dieser Perfusion erwies sich die Radioaktivität des Metaboliten I mit der Wanderungsgeschwindigkeit von authentischer 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure als zu gering für die Durchführung der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik. Dieser Metabolit ließ sich aber nach Durchströmung mit Perfusionsmedium 2 (s. u.) als 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure identifizieren.

Nach Perfusion mit Perfusionsmedium 2 ((4-O- ^{14}C Methyl)-3,4-Dimethoxybenzaldehyd) zeigten sich nach Chromatographie eines Aliquots des Perfusat-Extrakts erwartungsgemäß radioaktive Peaks mit den R_F -Werten von 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (I) und 3,4-Dimethoxybenzoesäure (III). Darüberhinaus fand sich jedoch auch Radioaktivität in der rechromatographierten Substanzzone mit dem R_F -Wert von 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (II) (Abb. 2). Das Ergebnis der Identifizierung

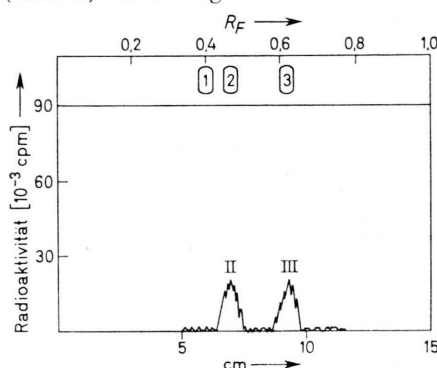


Abb. 2. Radiochromatogramm nach Rechromatographie der Substanzzone mit dem R_F -Wert von 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (II) (Durchströmung mit Perfusionsmedium 2, Einzelheiten s. Text). Dünnschichtchromatographie wie unter Abb. 1 beschrieben.

der Metabolite mittels der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik geht aus Tab. I hervor.

Wurde ein Aliquot des nach Durchströmung mit Perfusionsmedium 3 (Gemisch aus (3-O- ^{14}C Methyl)- und (4-O- ^{14}C Methyl)-3,4-Dimethoxybenzoesäure) erhaltenen Perfusat-Extrakts in System A aufgetrennt, so wies ein Radiodünnschichtchromatogramm ebenfalls Substanzonen in Höhe von 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (Metabolit I), 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Metabolit II) sowie

Tab. I. Identifizierung der nach den Perfusionen mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (Perfusionsmedium 1 bzw. Perfusionsmedium 2) aus dem Perfusat-Extrakt isolierten Metabolite I, II und III mittels der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik. Einer definierten Menge ^{14}C -Aktivität wurde eine bestimmte Menge (s. u.) der authentischen, nicht markierten Verbindung zugesetzt. Die spez. Aktivität (dpm/mg) wurde berechnet und nach jeder Kristallisation (Aceton/Petroläther) im Tri-Carb-Szintillationszähler bestimmt.

Perfusion	Metabolit	zugesetzter „Carrier“	Berechnet	Spez. Aktivität [dpm/mg] Gefunden nach Kristallisation				
				1	2	3	4	5
mit Perfusionsmedium 1	II	20 mg 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	3261	2570	2503	2520	2504	2501
	III	20 mg 3,4-Dimethoxybenzoesäure	22536	21274	21795	21075	20634	21909
mit Perfusionsmedium 2	I	11 mg 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure	121	115	106	104	104	106
	II	12 mg 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	108	85	81	80	80	79
	III	20 mg 3,4-Dimethoxybenzoesäure	5903	5792	5766	5681	5644	5661

Tab. II. Identifizierung der nach den Perfusionen mit 3,4-Dimethoxybenzoesäure (Perfusionsmedium 3 bzw. Perfusionsmedium 4) aus dem Perfusat-Extrakt isolierten Metabolite I und II mittels der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik. Einer definierten Menge ^{14}C -Aktivität wurde eine bestimmte Menge (s. u.) der authentischen, nicht markierten Verbindung zugesetzt. Die spez. Aktivität (dpm/mg) wurde berechnet und nach jeder Kristallisation (Aceton/Petroläther) im Tri-Carb-Szintillationszähler bestimmt.

Perfusion	Metabolit	zugesetzter „Carrier“	Berechnet	Spez. Aktivität [dpm/mg] Gefunden nach Kristallisation				
				1	2	3	4	5
mit Perfusionsmedium 3	II	10 mg 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	657	621	608	590	590	598
mit Perfusionsmedium 4	I	11 mg 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure	424	394	390	387	386	385
	II	10 mg 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	190	142	101	105	101	102

von 3,4-Dimethoxybenzoesäure (Substrat) auf. Die Radioaktivitätsmengen (Metabolit I : Metabolit II) verhielten sich wie 1 : 15.

Die Identifizierung von II erfolgte, wie beschrieben, mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik (Tab. II).

Nach Perfusion mit Medium 4 ((4-O- ^{14}C -Methyl)-3,4-Dimethoxybenzoesäure) erschienen im Dünnschichtchromatogramm eines aliquoten Teils des Perfusat-Extrakts erwartungsgemäß radioaktive Peaks in Höhe der 3,4-Dimethoxybenzoesäure (Substrat) und der 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (I). In der rechromatographierten Substanzzone mit dem R_F -Wert von 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (II) fand sich auch hier Radioaktivität.

Aus Tab. II geht die Identität von Metabolit I mit 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure und die von II mit 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure hervor.

Diskussion

Nach den Perfusionen mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd ließen sich im Perfusat-Extrakt keine Aldehyde mehr nachweisen, da die Aldehydgruppe vollständig zur Carboxylgruppe oxydiert wurde. Die Perfusionen mit 3,4-Dimethoxybenzaldehyd führten also prinzipiell zu den gleichen Ergebnissen wie die mit 3,4-Dimethoxybenzoesäure. Eine Demethylierung von 3,4-Dimethoxybenzaldehyd bzw. 3,4-Dimethoxybenzoesäure erfolgt in der perfundierten Rattenleber in wesentlich stärkerem Umfang an der *para*-ständigen Methoxygruppe als an der *meta*-ständigen, wie aus dem Verhältnis der Radioaktivitätsmengen der Demethylierungsprodukte hervorgeht.

In *in-vitro*-Versuchen mit der Mikrosomenfraktion von Kaninchenleber¹⁵ bzw. mit Mikrosomen-

und löslicher Fraktion von Ratten- und Meerschweinchenleber¹, wobei Monomethyläther von Brenzkatechinderivaten als Substrat dienten, konnten schon Axelrod und Mitarbeiter zeigen, daß aus den meisten der untersuchten *para*-O-Methyläther mehr Formaldehyd freigesetzt wurde als aus den *meta*-O-Methyläthern.

Wie eingangs erwähnt, ist die Vermutung geäußert worden, daß bei Schizophrenen das mit dem Mescaline verwandte 3,4-Dimethoxyphenyläthylamin aufgrund einer zusätzlich zur 3-O-Methylierung erfolgenden „abnormen 4-O-Methylierung“ von 3,4-Dihydroxyphenyläthylamin entstehen könne. Da man aber davon ausgehen kann, daß die *p*-O-Methylierung ein auch normalerweise in der Leber ablaufender Stoffwechselweg ist, bietet sich für die Möglichkeit, daß durch eine Störung im Intermediärstoffwechsel in vermehrtem Umfang ein 3,4-Dimethyläther eines Catecholamins auftreten kann, die Erklärung an, daß es zum Ausfall einer Demethylase kommt, die bevorzugt eine Demethylierung der *p*-ständigen Methoxygruppe katalysiert.

Zu einer solchen Auffassung kommen auch Sargent und Mitarbeiter¹⁶, die Ratten (3-O- ^{14}C -Methyl)- bzw. (4-O- ^{14}C -Methyl)-3,4-Dimethoxyphenyläthylamin injizierten und jeweils eine direkte Messung des ausgeatmeten $^{14}\text{CO}_2$ durchführten.

Nach Perfusion mit (4-O- ^{14}C -Methyl)-3,4-Dimethoxybenzaldehyd bzw. mit (4-O- ^{14}C -Methyl)-3,4-Dimethoxybenzoesäure erwies sich ein Teil der durch Demethylierung entstandenen 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure als radioaktiv, so daß auch sie mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik identifiziert werden konnte. Daraus läßt sich schließen, daß die durch *meta*-O-Demethylierung (in geringem Ausmaß) entstandene radioaktive 3-Hy-

droxy-4-methoxybenzoesäure teilweise zur 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure umgewandelt worden ist. Hinweise dafür, daß eine solche enzymatische „Interkonversion“ möglich ist, erhielten Kuehl und Mitarbeiter¹⁷. Sie konnten durch *in-vitro*-Experimente mit gereinigter Brenzkatechin-Methyltransferase eine partielle Interkonversion von 3-Hydroxy-4-methoxy- zu 4-Hydroxy-3-methoxyphenyläthyl-

amin und von 4-Hydroxy-3-methoxy- zu 3-Hydroxy-4-methoxyphenyläthylamin wahrscheinlich machen, wobei die Identifizierung der Isomeren anhand papier- und dünnschichtchromatographischer Analysen erfolgte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, Fräulein S. Hildenbrand sei für die gewissenhafte Mitarbeit gedankt.

- ¹ J. W. Daly, J. Axelrod u. B. Witkop, J. Biol. Chem. **235**, 1155 [1960].
- ² S. Senoh, J. Daly, J. Axelrod u. B. Witkop, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 6240 [1959].
- ³ L. P. O'Gorman, O. Borud, I. A. Khan u. L. R. Gjessing, Clin. Chim. Acta **29**, 111 [1970].
- ⁴ H. Thomas u. S. Roth, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 138 [1972].
- ⁵ H. Thomas, D. Müller-Enoch u. S. Roth, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 1894 [1972].
- ⁶ Übersicht s. A. A. Boulton, Nature **231**, 22 [1971].
- ⁷ Übersicht s. J. R. Smythies, Biologische Psychiatrie, p. 31, G.-Thieme-Verlag, Stuttgart 1971.
- ⁸ A. J. Friedhoff u. E. van Winkle, Nature **194**, 879 [1962].
- ⁹ N. Rabjohn, Organic Synthesis, Collective Vol. IV, p. 972, John Wiley u. Sons Inc., New York, London 1963.
- ¹⁰ K. Haider u. S. U. Lim, J. Labelled Compounds **1**, 294 [1965].
- ¹¹ H. Schriefers u. W. Korus, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **318**, 239 [1960].
- ¹² W. Staib, R. Staib, J. Herrmann u. H. G. Meiers, Stoffwechsel der Isoliert Perfundierten Leber, 3. Konf. Ges. Biol. Chem. (W. Staib u. R. Scholz, eds.), p. 155, Springer-Verlag, Berlin 1968.
- ¹³ R. Scholz, Stoffwechsel der Isoliert Perfundierten Leber, 3. Konf. Ges. Biol. Chem. (W. Staib u. R. Scholz, eds.), p. 24, Springer-Verlag, Berlin 1968.
- ¹⁴ H. G. Bray, W. V. Thorpe u. K. White, Biochem. J. **46**, 271 [1950].
- ¹⁵ J. Axelrod, Biochem. J. **63**, 634 [1956].
- ¹⁶ T. W. Sargent, D. M. Israelstam, A. T. Shulgin, S. A. Landaw u. N. N. Finley, Biochem. Biophys. Res. Commun. **29**, 126 [1967].
- ¹⁷ F. A. Kuehl, M. Hichens, R. E. Ormond, M. A. P. Meisinger, P. H. Gale, V. J. Cirillo u. N. G. Brink, Nature **203**, 154 [1964].