

Nachweis, Strukturaufklärung und Synthese bisher unbekannter Aminosäurekonjugate aus menschlichem Harn I

Michael Spiteller und Gerhard Spiteller*

Laboratorium für Organische Chemie, Universität Bayreuth,
D-8580 Bayreuth, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 10. Oktober 1979. Angenommen 17. Oktober 1979)

*Identification, Structure Determination and Synthesis of Until now Unknown
Amino Acid Conjugates from Human Urine I*

The conjugates of glycine with furan 2,5-dicarboxylic acid and of picolinic acid as well as a conjugate of pyroglutamic acid with phenylacetic acid, previously unknown as natural metabolites, were detected to be normal metabolites in human urine.

(*Keywords: Amino acid conjugates; Conjugates of amino acids; Metabolic profiling*)

Einleitung

Konjugate von Aminosäuren mit aromatischen Säuren sind als Stoffwechselprodukte schon lange bekannt. Manche dieser Konjugate (z. B. Hippursäure) werden in großer Menge im Harn ausgeschieden¹. Durch kombinierte Anwendung chromatographischer Trennverfahren und der Massenspektrometrie gelingt es, bisher unbekannte Spurenbestandteile zu fassen². Vor allem Aminosäurekonjugate zeigen oft typische Massenspektren, die häufig eine Strukturzuordnung erlauben, die durch Synthese von Vergleichsverbindungen und deren Untersuchungen in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer (GC-MS) abgesichert werden. Darüber soll im folgenden berichtet werden.

* Meinem Lehrer Prof. Dr. H. Bretschneider zum 75. Geburtstag gewidmet.

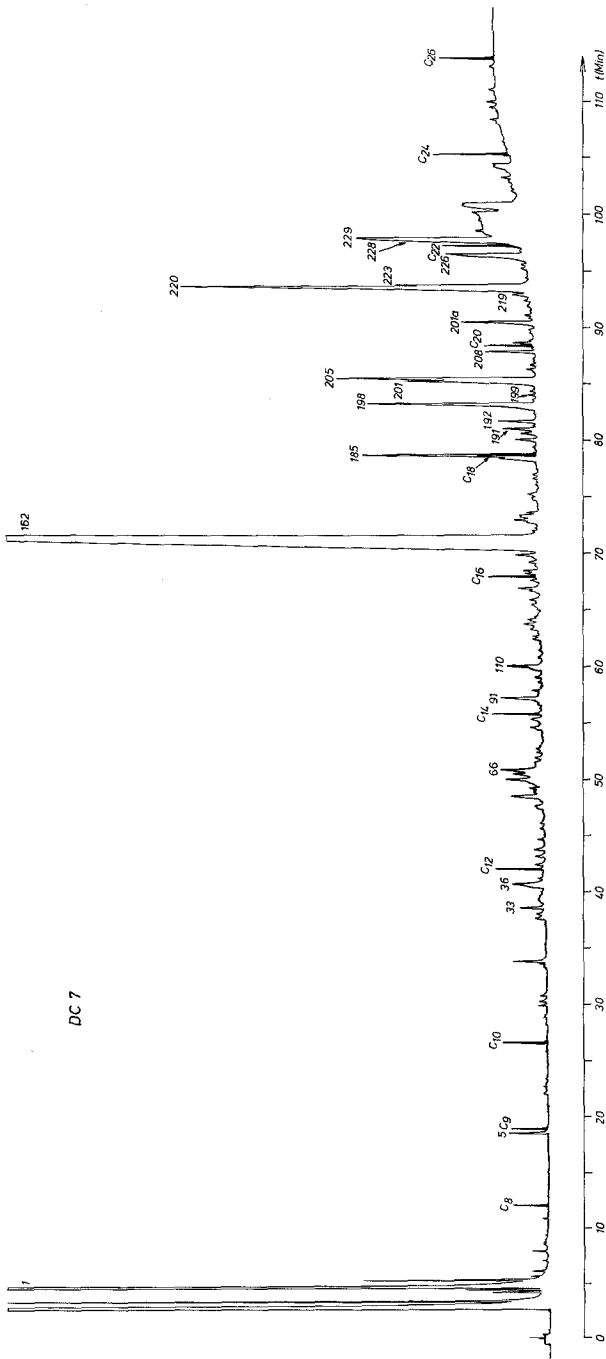


Abb. 1. Gaschromatogramm der Säurefraktion des Harns DC 7

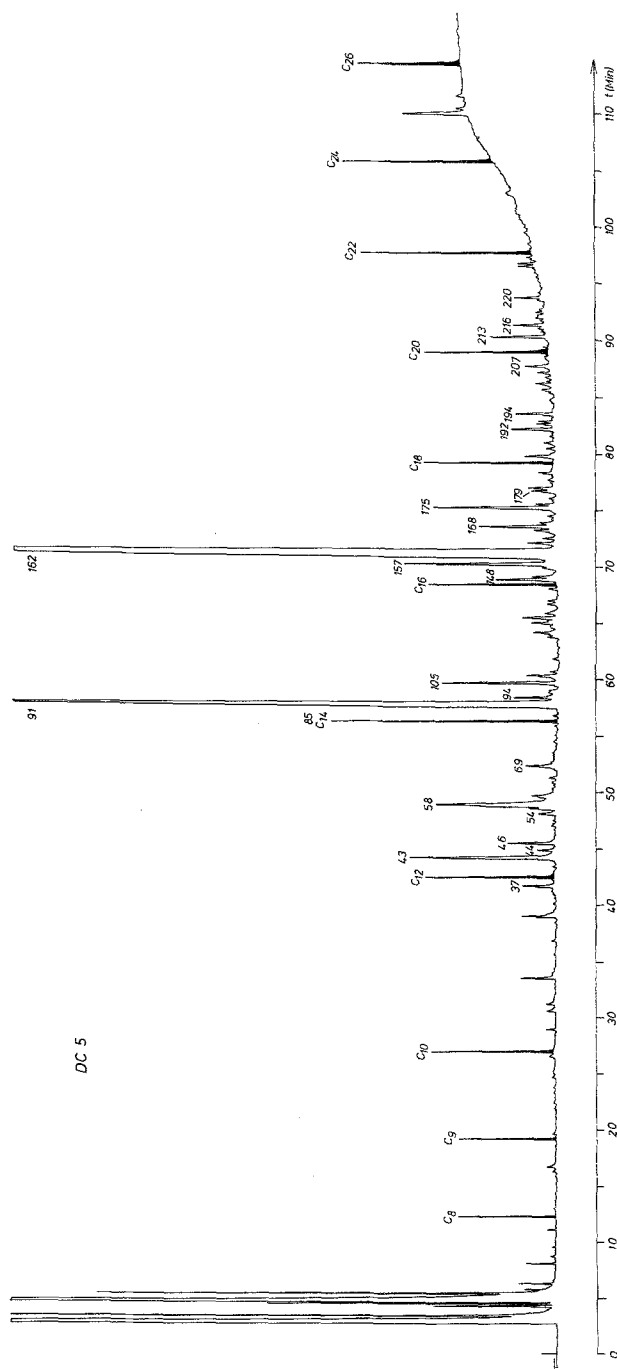


Abb. 2. Gaschromatogramm der Säurefraktion des Harns DC 5

Methodik

Aufarbeitung

Wie bereits früher beschrieben², wurden angesäuerte Harnproben an XAD-4 Säulen von Salzen befreit und dann enzymatisch gespalten. Das Gemisch der nach Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Säuren wurde durch kurzzeitige Einwirkung von Diazomethan (30 Sekunden) methyliert und an Kieselgelplatten 2mal mit einem Gemisch von Ether:Cyclohexan (4:5) getrennt. Die Platten wurden willkürlich in 8 Zonen geschnitten. Die in ihnen enthaltenen Stoffe wurden nach Abkratzen des Kieselgels mit Methanol extrahiert und in der Kombination GC-MS untersucht.

Gaschromatogramme

Die relativ polaren Konjugate zeigen nur wenig Wanderungstendenz und sind daher in den unteren Zonen, insbesondere der Startzone der dünnenschichtchromatographischen Trennung, angereichert.

Nach Aussage der Massenspektren ist in der Startzone DC 7 (Abb. 1) vorwiegend Hippursäure (Peak-Nr. 162) enthalten. Sie wird begleitet von ihrem *p*-Methoxy- (Peak-Nr. 205) und 3,4-Dimethoxyderivat (Peak-Nr. 223) sowie verschieden methylierten Derivaten der Harnsäure (Peak-Nr. 192, 201 und 226). Daneben enthält diese Zone noch Coffein (Peak-Nr. 185), das Glycinkonjugat der α -Furancarbonsäure (Peak-Nr. 110) und das Glutaminsäurekonjugat der Phenylelessigsäure (Peak-Nr. 220). Die Massenspektren der Peaks 191 und 208 entsprechen dem bisher als Harninhaltsstoffe unbekannten Mono-Glycylderivat der 2,5-Furandicarbonsäure und dem Konjugat von Phenylelessigsäure mit der Pyroglutaminsäure (die entsprechend der Aufarbeitung als Methyl-ester gefaßt werden).

In der Zone DC 5 (Abb. 2), die noch große Mengen an Hippursäure (Peak-Nr. 162) enthält, ist neben Hydroxysäuren wie Citronensäure und ihren Isomeren (Peak-Nr. 91, 94, 105) das bisher unbekannte Konjugat der Picolinsäure mit Glycin (ebenfalls als Methyl-ester, Peak-Nr. 157) enthalten.

Ergebnisse und Diskussion

Ableitung der Struktur des Methyl-esters des Konjugates von Glycin mit Picolinsäure

Unmittelbar vor der Hippursäure wird eine Verbindung mit Molekulargewicht (MG) 194 (Peak-Nr. 157) eluiert, in deren Massenspektrum die wichtigsten Schlüsselionen gegenüber dem Spektrum des Methyl-esters der Hippursäure (1) (Abb. 3)³ um eine Masseneinheit zu höheren Massen verschoben sind (Abb. 4), so daß sich der *Biemann-*

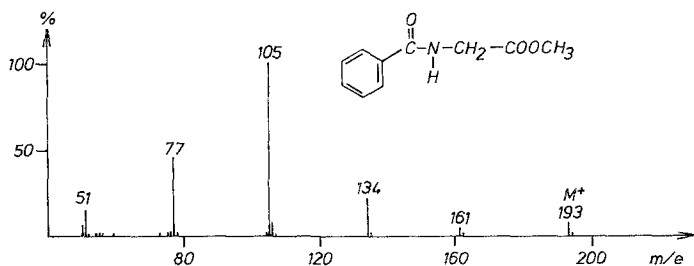


Abb. 3. Massenspektrum des Hippursäuremethylesters

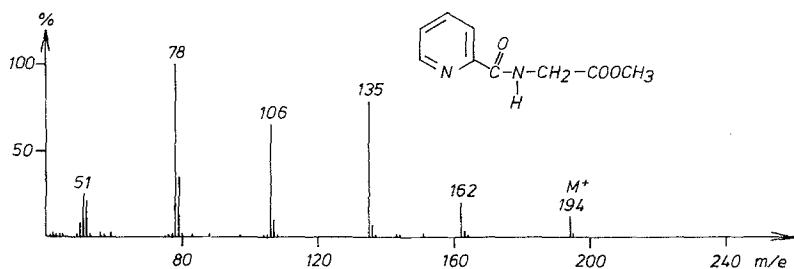


Abb. 4. Massenspektrum des Methylesters des Konjugates von Picolinsäure und Glycin

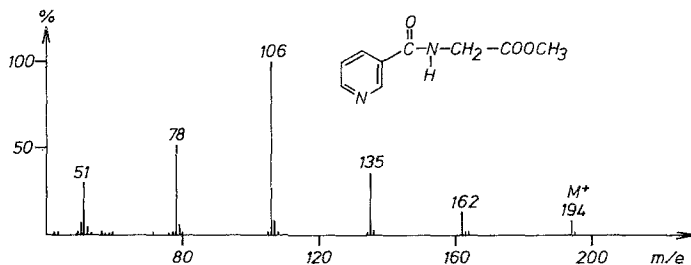
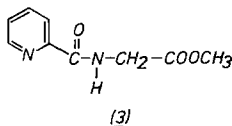
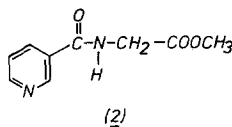
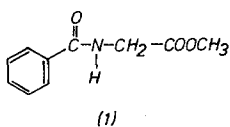


Abb. 5. Massenspektrum des Methylesters des Konjugates von Nicotinsäure und Glycin

sche Verschiebungssatz zur Strukturableitung anwenden läßt⁴: Aus der Geradzahligkeit des Molekülions ergibt sich das Vorhandensein von 2 Stickstoffatomen. Schlüsselionen bei $M-32$ ($M-\text{CH}_3\text{OH}$), $M-59$ ($M-\text{COOCH}_3$), $M-88$ ($M-\text{HNCH}_2\text{COOCH}_3$) und $M-116$ ($M-\text{CONHCH}_2\text{COOCH}_3$) legen nahe, daß in der Verbindung die gleiche Seitenkette wie in der Hippursäure vorliegt, aber eine Ring-CH-Gruppe durch Stickstoff ersetzt ist.

Aus dem Spektrum läßt sich allerdings nicht unmittelbar schließen, ob die Verbindung ein Derivat der Nicotinsäure, der Isonicotinsäure oder der Picolinsäure darstellt. Zunächst lag die Annahme nahe, daß es sich bei der Verbindung um das Glycinkonjugat der Nicotinsäure (**2**) handeln könne, da eine solche Verbindung nach Literaturangaben⁵ bereits früher in Harnproben identifiziert worden ist.

Um die Struktur der Verbindung sicherzustellen, wurde das Konjugat der Nicotinsäure synthetisiert. Das Massenspektrum (Abb. 5) zeigte jedoch erhebliche Unterschiede in den Intensitätswerten und auch das gaschromatographische Retentionsverhalten war unterschiedlich. Daraufhin wurden die Glycinkonjugate der isomeren Isonicotinsäure und Picolinsäure hergestellt. Der Methylester des Glycinkonjugates der Picolinsäure (**3**) zeigte dasselbe Massenspektrum wie das Naturprodukt, der Retentionsindex stimmte überein. Die Identität von Naturstoff- und Syntheseprodukt wurde schließlich durch Koinjektionsprobe vollends sichergestellt.



Trotz vieler Mühe gelang es uns nicht, das als Harninhaltsstoff früher beschriebene Konjugat der Nicotinsäure mit Glycin aufzufinden, während wir in allen Proben immer wieder das Glycinkonjugat der Picolinsäure nachweisen konnten.

Ableitung der Struktur des Methylesters des Konjugates von Glycin mit 2,5-Furandicarbonsäure

Der Peak Nr. 191 im Gaschromatogramm der Startfraktion (Abb. 1) zeigte im Massenspektrum (Abb. 6) Ionen bei *M*-59 und *M*-88, die für die meisten Glycinderivate aromatischer oder heterocyclischer Säuren charakteristisch sind (siehe dazu auch Abb. 3—5). Ein Schlüsselion der Masse 153 überragender Intensität ist für den 2,5-Furandicarbonsäure-dimethylester typisch². Da die 2,5-Furandicarbonsäure bereits früher als Harnausscheidungsprodukt erkannt wurde⁶, lag die Vermutung

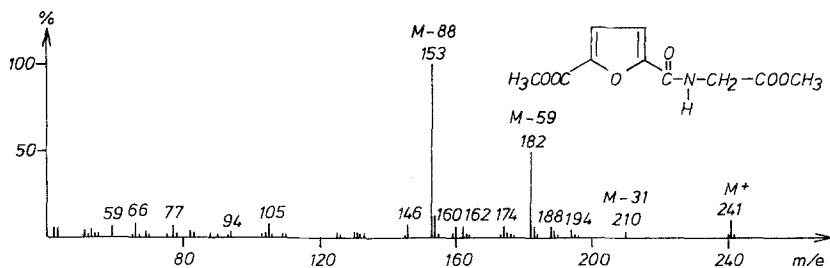
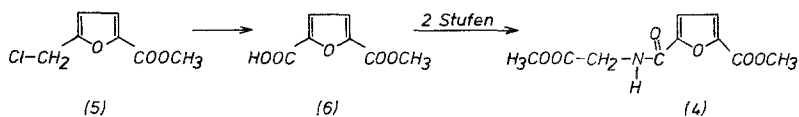


Abb. 6. Massenspektrum des Methylsters des Konjugates von 2,5-Furandicarbonsäure und Glycin

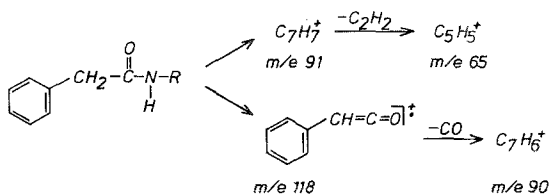
nahe, daß es sich bei der Verbindung (Abb. 6) um das Monoglycyl-derivat der 2,5-Furandicarbonsäure (**4**) handeln könne. Daher wurde **4** durch Oxidation von 5-Chlormethyl-2-furancarbonsäuremethylester⁷ (**5**) zum 2,5-Furandicarbonsäuremonomethylester (**6**), nachfolgenden Umsatz zum Säurechlorid und Reaktion mit Glycin dargestellt.



Der Methylester dieser Verbindung **4** erwies sich bezüglich Massenspektrum und Retentionsindex als identisch mit dem Naturprodukt.

Ableitung der Struktur des Methylsters des Konjugates von Phenyllessigsäure mit Pyroglutaminsäure

Das Massenspektrum des GC-Peaks Nr. 208 (Abb. 7) ist gekennzeichnet durch Schlüsselionen der Masse 65, 90, 91 und 118. Solche Schlüsselionen werden bevorzugt aus Aminosäurekonjugaten der Phenyllessigsäure gebildet:



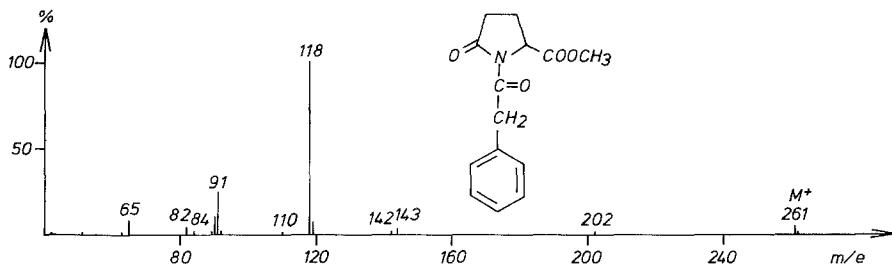


Abb. 7. Massenspektrum des Methylsters des Konjugates von Phenyllessigsäure mit Pyroglutaminsäure

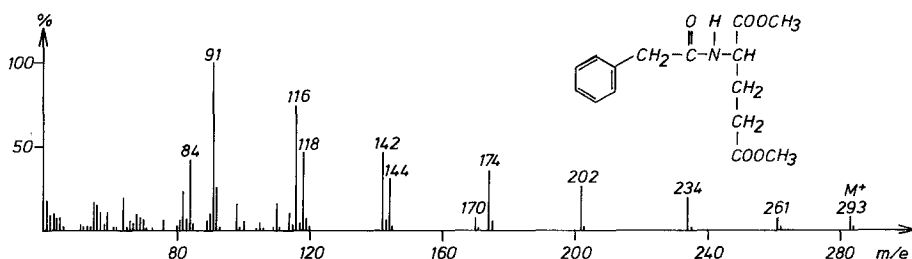
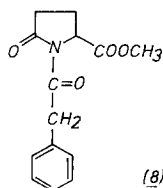
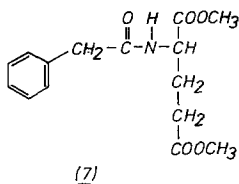


Abb. 8. Massenspektrum des Methylsters von Phenyllessigsäure mit Glutaminsäure

Ein Schlüsselion bei $M-59$ legte die Vermutung nahe, daß im restlichen Molekülteil noch eine Carbomethoxygruppe enthalten sein könnte. Da bei m/e 142 und m/e 144 sowie m/e 82 und m/e 84 Ionen auftreten, die auch im Massenspektrum des Phenyllessigsäurekonjugates der Glutaminsäure (7) (Abb. 8) zu finden sind¹⁰, schien eine gewisse Verwandtschaft mit dieser Verbindung möglich zu sein. Aus dem Mindergehalt von 32 Masseneinheiten (ME) gegenüber 7 wurde vermutet, daß das Konjugat der Pyroglutaminsäure (8) vorliegen könnte.



Die Vermutung wurde durch Synthese von 8 aus Phenyllessigsäurechlorid und Pyrrolidon-5-carbonsäure-2-methylester und durch

Vergleich von Retentionsindex und Massenspektren sowie Koinjektionsprobe bestätigt.

Da nicht auszuschließen war, daß das Konjugat durch thermische Methanoleliminierung aus **7** im Einspritzblock des Gaschromatographen gebildet wird, wurde auch **7** synthetisiert und in der Kombination GC-MS untersucht. Es wurde nur *ein* Peak erhalten, der **7** entsprach. Demnach ist das Phenylelessigsäurekonjugat der Glutaminsäure ein natürliches Stoffwechselprodukt.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Dr. *Robert Pfleger*-Stiftung für Sachbeihilfen. Herrn Dr. *G. Remberg* danken wir für die Bestimmung der Hochauflösungswerte und Herrn Dr. *J. Reiner* für die Herstellung der Glaskapillarsäulen. Herrn *W. Kern* danken wir für die tatkräftige experimentelle Mitarbeit.

Experimenteller Teil

Massenspektrometer-Gaschromatograph

LKB 2091 Gerät mit getrennten Öldiffusionspumpen (150 l/s Saugleistung) für Quelle und Einlaß. E.I. Ionenquelle, 250 °C, Elektronenenergie 70 eV, Beschleunigungsspannung 3,5 kV, TIC-Signal bei 20 eV registriert.

Separator: 2stufiger Molekül-Jet-Separator (nach *Becker-Ryhage*) und „sliding valve“ zur Trennung von GC- und MS-Teil, Temperatur 250 °C.

Gaschromatograph

Pye-Unicam Ein-Säulengerät, Injektortemperatur 275 °C, Temperaturprogramm: 80 °C, 7 min isotherm 2 °C/min → 275 °C. Säule: Dünnschicht-Glaskapillarsäule 25 m, OV 101. Trägergas: Helium, 2 ml/min.

Datensystem

LKB 2130, PDP-11 Rechner (16 bit Memory) mit Disk-System der Firma Digital Equipment Corporation, Sichtschirm Tektronix 4012 und Versatec-Plotter.

Zur Ermittlung der Peakflächen und der Retentionszeiten wurde ein Integrator der Firma Spectra Physics (System I) eingesetzt.

Aufarbeitung und Gewinnung der Dünnschicht-Zonen siehe².

N-Phenacetyl-pyrrolidon-5-carbonsäuremethylester

1,43 g (0,1 mol) Pyrrolidoncarbonsäuremethylester und 2,00 g (0,13 mol) Phenylelessigsäurechlorid wurden unter Feuchtigkeitsausschluß 3 h unter Rückfluß gekocht. Das Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Auftrennung in der Kombination GC-MS untersucht (Massenspektrum Abb. 7).

Pyridin- α -carboxy-glycinmethylester (α -Pyridinursäure) wurde nach⁹ hergestellt (Massenspektrum Abb. 5).

5-Carbomethoxy-2-furoyl-glycinmethylester

1,56 g 5-Carboxy-furan-2-carbonsäure-methylester (dargestellt nach⁷; Schmp. 200°) wurden mit 1,5 g Thionylchlorid 3 h auf dem Wasserbad erhitzt. Überschüssiges Thionylchlorid wurde abdestilliert und der Rückstand unter Eiskühlung mit 1 g Glycinmethylesterhydrochlorid — in 10 ml Pyridin gelöst — versetzt und 2 h auf 80 °C erhitzt. Der größte Teil wurde abdestilliert und das Reaktionsprodukt im GC-MS untersucht (Massenspektrum Abb. 6).

Literatur

- ¹ C. F. van Sumere, H. Teuchy, H. Pé, R. Verbeke und J. Bekaert, Clin. Chim. Acta **26**, 85 (1969).
- ² M. Spiteller und G. Spiteller, J. Chromatogr., im Druck.
- ³ S. P. Markey, W. G. Urban und S. P. Levine, Mass Spectra of Compounds of Biological Interest, National Technical Information Service, U.S. Dept. Commerce, Virginia 1975, Bd. II, 179.
- ⁴ K. Biemann, Tetrahedron Letters **15**, 9 (1960).
- ⁵ K. K. Reddi und E. Kodicek, Biochem. J. **53**, 286 (1953).
- ⁶ J. E. Mrochek und W. T. Rainey, jr., Clin. Chem. **18**, 821 (1972).
- ⁷ R. Andrisano, Annali di Chimica **40**, 30 (1950).
- ⁸ E. Fischer und R. Boehner, Chem. Ber. **44**, 1332 (1911).
- ⁹ Sendju, J. Biochem. Tokyo **7**, 273 (1927).
- ¹⁰ G. K. Brown, O. Stokke und E. Jellum, J. Chromatogr. **145**, 273 (1978).