

Zur Biogenese von Homovanilloyl-glycin bei der Rattenleberperfusion

VON HELMUT THOMAS, FRANZ-JOSEF GANZ und ERIKA BÜSCHEMANN

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Bonn* (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl)

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. August 1968)

Zusammenfassung: Nach Perfusion von isolierten Rattenlebern mit Homovanillinsäure, einem Abbauprodukt von DOPA und 2-[3,4-Dihydroxyphenyl]-äthylamin, ließ sich im Perfusatextrakt außer dem Substrat ein Metabolit nachweisen, der sich papier- und dünnstichtchromatographisch in verschiedenen Lösungsmittelsystemen wie Homovanilloyl-glycin (3-Methoxy-4-hydroxy-phenacetursäure) verhielt. Die Substanz wurde säulenchroma-

tographisch an Amberlite CG-50 II isoliert und anhand des UV- und IR-Spektrums sowie des Mikroschmelzpunktes identifiziert. Die quantitative Bestimmung des nach einmaliger Leberpassage entstandenen Metaboliten erfolgte spektrophotometrisch nach Kupplung mit diazotiertem [β -Diäthylamino-äthyl]-[p -amino-phenyl]-sulfon.

Die Synthese von Homovanilloyl-glycin wird beschrieben.

Summary: *Biosynthesis of homovanilloylglycine during the perfusion of rat liver.* Isolated rat liver was perfused with homovanillic acid, a degradation product of DOPA and 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethylamine. An extract of the perfusate contained the substrate and a metabolite which behaved as homovanilloylglycine (3-methoxy-4-hydroxyphen-acetic acid) in paper and thin layer chromatography. The substance was isolated by column

chromatography on Amberlite CG-50 II and identified by its UV- and IR-spectra, and micro melting point. After a single perfusion through the liver, the resulting metabolite was coupled with diazotised (β -diethylaminoethyl)-(p -aminophenyl)-sulfone and determined quantitatively by spectrophotometric assay.

The synthesis of homovanilloylglycine is described.

Homovanillinsäure (3-Methoxy-4-hydroxy-phenyl-essigsäure) wurde 1956 erstmals im menschlichen Harn nachgewiesen¹. Nach SHAW et al.² ist diese Phenolcarbonsäure ein normaler Bestandteil des Harns von Mensch und Ratte, ihre Ausscheidung diätetisch nicht beeinflussbar und daher als endogen bedingt aufzufassen. Die Autoren haben gezeigt, daß die Homovanillinsäure (als Abbauprodukt) aus 3,4-Dihydroxy-phenylalanin (DOPA) vermutlich über 3,4-Dihydroxy-phenylbrenztraubensäure und -phenylessigsäure entstehen kann. Auch 2-[3,4-Dihydroxy-phenyl]-äthylamin (3-Hydroxy-tyramin,

Dopamin) stellt eine endogene Vorstufe der Homovanillinsäure dar³. Der Abbau des 2-[3,4-Dihydroxy-phenyl]-äthylamins führt auf zwei Stoffwechselwegen zur Homovanillinsäure, wobei entweder die Methylierung am Hydroxyl in Stellung 3 oder die oxydative Desaminierung der Seitenkette zeitlich bevorzugt werden kann⁴. Ein Stoffwechselweg führt durch oxydative Desaminierung primär zur 3,4-Dihydroxy-phenylessigsäure, die dann an der m -Hydroxyl-Gruppe zur Homovanillinsäure methyliert wird, der andere zunächst zum 2-[3-Methoxy-4-hydroxy-phenyl]-äthylamin (3-Methoxy-tyramin), das seinerseits in die 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylessigsäure, also die Homovanillinsäure übergeht.

* Postanschrift: Priv.-Doz. Dr. H. THOMAS, D-53 Bonn, Nußallee 11.

¹ M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW u. P. E. WALL, J. biol. Chemistry **218**, 293 [1956].

² K. N. F. SHAW, A. McMILLAN u. M. D. ARMSTRONG, J. biol. Chemistry **226**, 255 [1957].

³ J. AXELROD, S. SENO u. B. WITKOP, J. biol. Chemistry **233**, 697 [1958].

⁴ C. M. WILLIAMS, A. A. BABUSCIO u. R. WATSON, Amer. J. Physiol. **199**, 722 [1960].

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die Rattenleber imstande ist, Homovanillinsäure teilweise in ein Glycinkonjugat, nämlich Homovanilloyl-glycin(3-Methoxy-4-hydroxy-phenacetursäure) überzuführen.

Material und Methoden

Homovanillinsäure (3-Methoxy-4-hydroxy-phenylessigsäure) wurde von Calbiochem., Los Angeles, bezogen.

Synthese von Homovanilloyl-glycin

Die Synthese von Homovanilloyl-glycin wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von ITO und NEILANDS⁵ durchgeführt, die sich für die Darstellung von 2,3-Dihydroxy-benzoylglycin der Dicyclohexyl-carbodiimid-Methode⁶ bedienten.

1,0 g Homovanillinsäure und 0,8 g Glycin-äthylester, in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, werden mit einer Lösung von 1,5 g Dicyclohexyl-carbodiimid in 5 ml Tetrahydrofuran versetzt und über Nacht unter Stickstoff bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 1 ml Eisessig wird vom ausgefallenen Harnstoffderivat abfiltriert, das Filtrat im Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 30 ml Essigsäure-äthylester gelöst, mit 2 ml 6N HCl gewaschen und erneut zur Trockne gebracht. Der Trockenrückstand (Homovanilloyl-glycin-äthylester) wird in 30 ml 1N NaOH gelöst, 4 Std. unter Stickstoff gerührt und vom Ungelösten abfiltriert. Das mit 5 ml H₂SO₄ angesäuerte Filtrat wird 3mal mit 20 ml Essigsäure-äthylester extrahiert. Der Extrakttrockenrückstand wird in 1,5 ml verd. NH₄OH gelöst und bei 0°C mit 0,5 ml 6N HCl versetzt. Der Niederschlag wird auf der Nutsche mit Äther gewaschen, 2mal aus heißem Wasser umkristallisiert und über Phosphorpentoxid im Vak. getrocknet. Schmp.: 161—163°C.

C₁₁H₁₃NO₅ (239,2) Ber. C 55,23 H 5,48 N 5,86 O 33,44
Gef. C 55,11 H 5,54 N 5,72 O 33,63

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 12—19 Wochen alte männliche Sprague-Dawley-Ratten, die mit dem Standardfutter „Altromin“ und Trinkwasser ad libitum ernährt worden waren.

Leberperfusion

Wir bedienten uns der von SCHRIEFERS und KORUS⁷ ausgearbeiteten Apparatur und Technik. Das Perfusionsmedium bestand aus einer von SCHIMASSEK⁸ angegebene-

nen, nach SCHOLZ⁹ modifizierten Salzlösung, der 0,5mm Glycin zugesetzt waren: 137,0mm NaCl, 3,0mm KCl, 0,7mm NaH₂PO₄, 0,5mm CaCl₂, 0,5mm MgCl₂, 24,0mm NaHCO₃ und 0,5mm Glycin. 500ml Perfusionsmedium mit 50 mg Homovanillinsäure als Substrat wurden in 10 Durchgängen perfundiert. Die mittlere Durchflußgeschwindigkeit betrug 2,4 ml/Min. · g.

Aufarbeitung des Perfusates

Das Perfusat wurde mit 2 ml konz. HCl angesäuert, mit NaCl gesättigt und 8mal mit 500 ml Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Der Extrakttrockenrückstand wurde papier-, dünn- und säulenchromatographisch aufgetrennt.

Chromatographie

Die papierchromatographischen Analysen wurden absteigend auf Whatman-Papier Nr. 1 mit den folgenden Lösungsmittelsystemen durchgeführt:

Benzol/Eisessig/Wasser 125:72:3 (System I)¹⁰,

Methyläthylketon/Aceton/Ameisensäure/Wasser 40:2:1:6 (System II)¹¹ und

Methyläthylketon/Diäthylamin/Wasser 921:2:77 (System III)¹¹.

Für die dünn- und säulenchromatographische Analyse wurde Kieselgel G nach STAHL und als Fließmittel Toluol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure 5:4:1 (System IV)¹² verwendet.

Die säulenchromatographische Auftrennung von Homogenatextrakten erfolgte wie früher angegeben¹³ an Amberlite CG-50 II. Als mobile Phase diente das Lösungsmittelgemisch Methyläthylketon/Aceton/0,2N HCl 2:1:9¹⁴. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionen von je 32 Tropfen aufzufangen (Laufgeschwindigkeit: 32 Tropfen/8 Min.).

Als Sprühreagentien für die Lokalisation von Substanzen auf Papier- und Dünn- und säulenchromatogrammen dienten diazotiertes [β-Diäthylamino-äthyl]-[p-amino-phenyl]-sulfon (ROSES Reagenz)¹⁵, diazotierte Sulfanilsäure

⁹ R. SCHOLZ in W. STAIB u. R. SCHOLZ, Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, 3. Konf. d. Ges. f. Biol. Chem., April 1967, S. 25, Springer-Verlag, Berlin 1968.

¹⁰ W. STECK u. S. H. WENDER, J. Chromatogr. [Amsterdam] **19**, 564 [1965].

¹¹ L. REIO, J. Chromatogr. [Amsterdam] **4**, 458 [1960].

¹² C. F. VAN SUMERE, G. WOLF, H. TEUCHY u. J. KINT, J. Chromatogr. [Amsterdam] **20**, 48 [1965].

¹³ H. THOMAS, J. Chromatogr. [Amsterdam] **34**, 106 [1968].

¹⁴ T. SEKI, K. INAMORI u. K. SANO, J. Biochemistry [Tokyo] **46**, 1653 [1959].

¹⁵ R. J. BOSCOIT u. W. T. COOKE, Quart. J. Med. **23**, 307 [1954].

¹⁶ H. G. BRAY, W. V. THORPE u. K. WHITE, Biochem. J. **46**, 271 [1950].

⁵ T. ITO u. J. B. NEILANDS, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4645 [1958].

⁶ J. C. SHEEHAN u. G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 [1955].

⁷ H. SCHRIEFERS u. W. KORUS, diese Z. **318**, 239 [1960].

⁸ H. SCHIMASSEK, Life Sci. **11**, 629 [1962].

und diazotiertes *p*-Nitranilin¹⁶ sowie eine Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in Essigsäureanhydrid¹⁷. Bei einigen Papierchromatogrammen wurde die UV-Kontaktphotographie nach BUSH¹⁸ angewandt.

Identifizierung

Die Identifizierung des biogenen Homovanilloyl-glycins erfolgte außer durch Papier- und Dünnschichtchromatographie nach säulenchromatographischer Isolierung mit Hilfe der folgenden Methoden: UV-Spektroskopie (220–350 m μ), IR-Spektroskopie (2–16 μ ; KBr-Mikrotechnik) und Mikroschmelzpunktbestimmung (Mikroskop-Heiztisch).

Quantitative Bestimmung

Das durch UV-Kontaktphotographie lokalisierte Homovanilloyl-glycin wurde aus dem Papier eluiert¹⁹ und nach Kupplung mit diazotiertem [β -Diäthylamino-äthyl]-[*p*-amino-phenyl]-sulfon²⁰ unter Berücksichtigung entsprechender Papierleerwerte durch spektrophotometrische Messung bei 360 m μ quantitativ bestimmt.

Ergebnisse

Im Anschluß an die Perfusion wurden aliquote Teile (0,02 ml) des in 0,2 ml Aceton* gelösten Perfusatextrakt-Trockenrückstandes in den Systemen I, II und III bzw. IV papier- und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Mit Hilfe der erwähnten Diazoreagentien ließ sich auf den Chromatogrammen außer dem Substrat jeweils eine Substanz nachweisen, die sich auch mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in Essigsäureanhydrid, einem nach GAFFNEY und Mitarbeitern¹⁷ für Hippursäuren spezifischen Reagenz, anfärbte; sie verhielt sich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit wie authentisches Homovanilloyl-glycin (s. Tab. 1 und 2).

Säulenchromatographisch ließ sich ein Gemisch von je 5 μ Mol Homovanillinsäure und Homovanilloyl-glycin an Amberlite CG-50 II gut auftrennen (Abb. 1).

* Wurde der Extraktrockenrückstand in Methanol gelöst und papierchromatographisch aufgetrennt, so ließ sich als Artefakt auf den Chromatogrammen zusätzlich eine Substanz nachweisen, deren R_F -Werte in verschiedenen Systemen mit denen des Methylesters der Homovanillinsäure übereinstimmten.

¹⁷ G. W. GAFFNEY, K. SCHRIER, N. DiFERRANTE u. K. I. ALTMAN, J. biol. Chemistry **206**, 695 [1954].

¹⁸ I. E. BUSH, Biochem. J. **50**, 370 [1952].

¹⁹ H. SCHRIEFERS, H. THOMAS u. F. POHL, Clin. chim. Acta [Amsterdam] **8**, 744 [1963].

²⁰ H. THOMAS u. W. DIRSCHERL, Arzneimittel-Forsch. **12**, 429 [1962].

Tab. 1. Papier- und dünnschichtchromatographische Identifizierung der nach Rattenleberperfusion mit Homovanillinsäure nachgewiesenen Substanz. Papierchromatographie: absteigend auf Whatman-Papier Nr. 1. Lösungsmittelsysteme: Benzol/Eisessig/Wasser 125:72:3 (I), Methyläthylketon/Aceton/Ameisensäure/Wasser 40:2:1:6 (II) und Methyläthylketon/Wasser/Diäthylamin 921:77:2 (III). Dünnschichtchromatographie: aufsteigend auf Kieselgel G nach STAHL. Lösungsmittelsystem: Toluol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure 5:4:1 (IV).

Lösungsmittel-system	Laufzeit (25°C)	R_F -Werte		
		Authent. Homovanilloyl-glycin	Biogene Substanz	Mischchromatogramm
I	5 Std.	0,63	0,60	0,60
II	4 Std.	0,81	0,81	0,81
III	4 Std., 20 Min.	0,04	0,03	0,03
IV	30 Min.	0,10	0,10	

Für die Isolierung des Metaboliten wurden die Perfusatextrakt-Trockenrückstände von insgesamt 4 Leberperfusionen herangezogen. Nach jeder Perfusion ließ sich der in jeweils 0,5 ml Aceton gelöste Extraktrockenrückstand strichförmig auf 3 Papierstreifen (17 $\times$ 50 cm) verteilen und im System I chromatographisch auftrennen. Die durch UV-Kontaktphotographie außer dem Substrat lokalisierbare Substanz, deren Wanderungstrecke mit der von authentischem Homovanilloyl-glycin übereinstimmte, ließ sich vom Papier eluieren¹⁹. Der Trockenrückstand der vereinigten Eluate wurde, in 2 ml mobiler Phase gelöst, auf eine Amberlite-Säule gegeben und unter den angegebenen Bedingungen chromatographiert. Aus den Fraktionen 83 bis 88 konnte durch Extraktion mit Essigsäure-äthylester eine Substanz kristallin isoliert werden, deren IR-Spektrum mit dem von authentischem Homovanilloyl-glycin identisch ist. Die UV-Absorptionskurve der isolierten Substanz hat wie die des authentischen Homovanilloyl-glycins ein Maximum bei 280 m μ (s. Abb. 2). Die Kristalle zeigten unter dem Mikroskop einen Schmelzpunkt von 161–163 °C, der mit dem von authentischer Vergleichssubstanz (161–162 °C) übereinstimmt.

Die quantitative Bestimmung von biogenem Homovanilloyl-glycin in Eluaten aus Papierchromatogrammen erfolgte spektrophotometrisch nach Kupplung mit diazotiertem Roses Reagenz²⁰. Das

Kupplungsprodukt von diazotiertem ROSES Reagenz mit Homovanilloyl-glycin weist 2 Extinktionsmaxima (360 mμ und 512 mμ) auf (s. Abb. 3). Die Farbindensität der Azoverbindung, bei 360 mμ

gemessen, nimmt wie die des Reagentienleerwertes in Abhängigkeit von der Zeit zunächst zu und erreicht nach etwa 50 Min. konstant bleibende Werte (Abb. 4).

Tab. 2. Farbreaktionen der nach Rattenleberperfusion mit Homovanillinsäure papierchromatographisch nachgewiesenen Substanz im Vergleich zu denen des Homovanilloyl-glycins.

	Farbreaktionen nach Behandlung mit			
	<i>p</i> -Dimethylamino- benzaldehyd in Essigsäureanhydrid	Diazot. ROSES Reagenz	Diazot. Sulfanilsäure	Diazot. <i>p</i> -Nitranilin
Authent. Homovanilloyl-glycin	gelb	rot bis violett	lachsrot	blaugrau
Biogene Substanz	gelb	rot bis violett	lachsrot	blaugrau

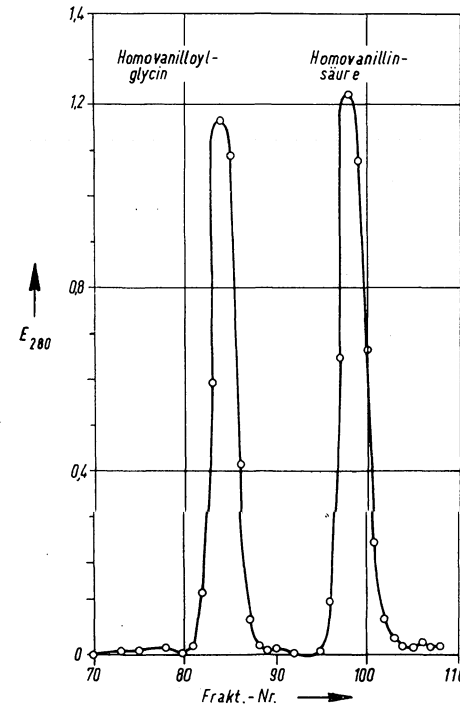


Abb. 1. Säulenchromatogramm eines Gemisches von je 5 μMol Homovanillinsäure und Homovanilloyl-glycin (authent. Substanzen). Amberlite CG-50 II, p. a., 200 bis 400 Mesh, H⁺-Form. Mobile Phase: Methyläthylketon/Aceton/0,2N HCl 2:1:9. Fraktionierung: 32 Tropfen/Fraktion; Durchflußgeschwindigkeit: 32 Tropfen pro 8 Min. (Fraktionen nach Abdampfen des organischen Lösungsmittelanteils mit 0,5N Natriumacetat auf 3,5 ml aufgefüllt. Extinktionen bei 280 mμ spektrophotometrisch gemessen).

Wiederfindung: Homovanillinsäure 98 %,
Homovanilloyl-glycin 100 %.

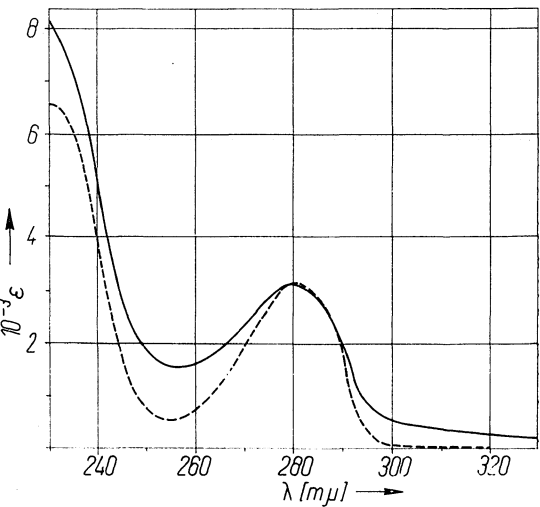


Abb. 2. UV-Spektren des authent. Homovanilloyl-glycins (gestrichelt) und der biogenen Substanz (ausgezogen).

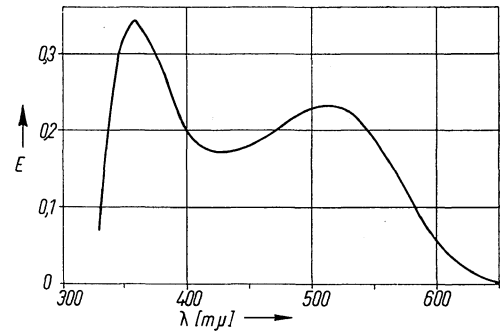


Abb. 3. Absorptionsspektrum des Kupplungsproduktes von diazotiertem ROSES Reagenz mit 40 μg Homovanilloyl-glycin.

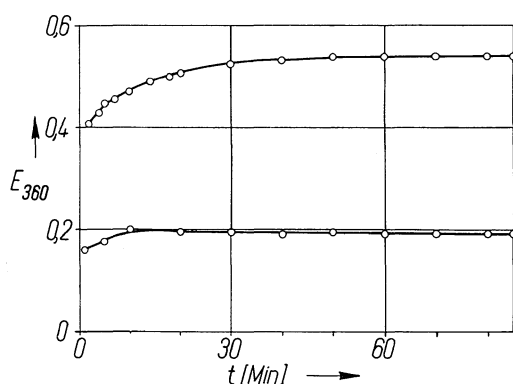


Abb. 4. Extinktion des mit diazotiertem ROSES Reagenz gekuppelten Homovanilloyl-glycins (40 µg; obere Kurve) und des Reagentienleerwertes in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Eichkurve, 60 Min. nach Beginn der Reaktion aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen unter Abzug des Reagentienleerwertes aufgestellt, verläuft im Bereich von 0–40 µg Homovanilloyl-glycin linear.

Zur quantitativen Bestimmung des biogenen Homovanilloyl-glycins wurde eine Rattenleber in einem Durchgang (Durchflußgeschwindigkeit 0,9 ml · Min⁻¹ · g⁻¹) mit 50 mg Homovanillinsäure in dem oben beschriebenen Perfusionsmedium, dem diesmal jedoch kein Glycin zugesetzt war, durchströmt. Von dem in 1 m/ Aceton gelösten Perfusatextrakt-Trockenrückstand wurden 4mal je 0,05 m/ papierchromatographisch aufgetrennt. Die quantitative Analyse der jeweils das biogene Homovanilloyl-glycin enthaltenden 4 Eluate ergab im Mittel 15,5 µg Substanz, das sind 310 µg bezogen auf 500 ml Perfusat.

Diskussion

Von den Brenzkatechinaminen und ihren Metaboliten ist eine ganze Reihe nicht nur in freier Form, sondern auch als Konjugate im Harn des Menschen und der Ratte nachgewiesen worden. So können beispielsweise Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxy-tyramin teilweise mit Glucuronsäure gepaart und als Glucuronide ausgeschieden wer-

den³. Adrenalin kommt im menschlichen Urin auch als Adrenalinsulfat vor (RICHTER et al.²¹). Vanillinsäure kann in der Rattenleber in Vanilloylglycin übergehen²². Das Konjugat wurde von ARMSTRONG und Mitarbeitern¹ im menschlichen Harn gefunden. Schon aus Untersuchungen von SHAW und Mitarbeitern² geht hervor, daß ein Teil der im Harn des Menschen ausgeschiedenen Homovanillinsäure ebenfalls in konjugierter Form vorliegen muß; denn in Harnproben, aus denen die freien Säuren vollständig extrahiert worden waren, konnte nach Säurehydrolyse noch Homovanillinsäure nachgewiesen werden. Es ist zu erwarten, daß auch die menschliche Leber imstande ist, Homovanillinsäure mit Glycin zu konjugieren und daß somit auch im menschlichen Harn ein Teil der Homovanillinsäure als Glycinkonjugat vorliegt.

Die quantitative Bestimmung der Homovanillinsäure, die im Urin in wesentlich höherer Konzentration als die endogene Muttersubstanz 2-[3,4-Dihydroxy-phenyl]-äthylamin ausgeschieden wird², ist von Bedeutung im Hinblick auf die Diagnose von 2-[3,4-Dihydroxy-phenyl]-äthylamin-sezernierenden Tumoren. Vor allem die bei Kindern und Jugendlichen vorkommenden Neuroblastome können eine erhöhte Homovanillinsäure-Ausscheidung verursachen^{23–25}. Im Harn einiger Phäochromocytom-Patienten ist ebenfalls eine über die Norm gesteigerte Homovanillinsäure-Konzentration festgestellt worden^{25–27}. In solchen Fällen könnte eine Ausscheidung von Homovanilloyl-glycin ins Gewicht fallen.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

²¹ D. RICHTER u. F. C. MACINTOSH, Amer. J. Physiol. **135**, 1 [1941].

²² W. DIRSCHERL u. H. THOMAS, Acta endocrinol. [Copenhagen] **44**, 101 [1963].

²³ R. E. GREENBERG u. L. I. GARDNER, J. clin. Invest. **39**, 1729 [1960].

²⁴ W. v. STUDNITZ, Klin. Wschr. **40**, 163 [1962].

²⁵ C. R. J. RUTHVEN u. M. SANDLER, Analyt. Biochem. [New York] **8**, 282 [1964].

²⁶ R. ROBINSON in H. VARLEY u. A. H. GOWENLOCK, The Clinical Chemistry of Monoamines, S. 63, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam 1963.

²⁷ H. THOMAS, Fortschr. Med. **86**, 383 [1968].