

Journal of Chromatography, 164 (1979) 319-329

Biomedical Applications

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 392

ÜBER DAS AUFTREten α -ALKYL-SUBSTITUIERTER ÄPFELSÄUREN
UND β -HYDROXY- β -ALKYL-SUBSTITUIERTER DICARBON- UND
TRICARBONSÄUREDERIVATE ALS NORMALE STOFFWECHSEL-
PRODUKTE

MICHAEL SPITELLER und GERHARD SPITELLER

*Lehrstuhl für Organische Chemie I, Universität Bayreuth, Universitätsstrasse 30, 8580
Bayreuth (B.R.D.)*

(Eingegangen am 23. April 1979)

SUMMARY

Occurrence of α -alkyl-substituted malic acids, and β -hydroxy- β -alkyl-substituted dicarboxylic and tricarboxylic acid derivatives in normal urine

Urine contains a number of α -hydroxy acids so far unknown to occur in biological liquids. Besides the already as urine constituent known methylmalic acid, also the ethyl, isopropyl and butyl derivatives of malic acid were found. Further metabolites in urine are a β -propyl-substituted β -hydroxyglutaric acid, a β -hydroxy- β -[methyl-carbomethoxy]-adipinic acid and two isomeric α -methylcitric acids.

EINLEITUNG

Im Zuge eingehender Studien [1] über die in der sauren Fraktion menschlichen Harns enthaltenen Säuren mit Hilfe der Kombination Glaskapillargas-chromatographie—Massenspektrometrie (GC—MS) stiessen wir auf eine Gruppe von Hydroxycarbonsäuren, von denen neben der Citronensäure bisher nur die α -Methyläpfelsäure und die β -Hydroxy- β -methylglutarsäure als normale Harn-inhaltsstoffe bekannt waren.

ISOLIERUNG UND GEWINNUNG

Durch präparative Dünnschichtchromatographie wurde die Gesamtsäurefraktion des Harns nach Veresterung mit Diazomethan in acht Zonen zerlegt [1]. Die Eluate dieser Zonen wurden mit der Kombination GC—MS untersucht. Die Hydroxysäuren waren — wie die Massenspektren zeigten — vorzugsweise in den Zonen DC 2, DC 3 und DC 4 (Ausschnitte der Glaskapillargaschromatogramme Fig. 1, 2 und 3) enthalten.

Die Eluate dieser Zonen wurden einer präparativen gaschromatographischen

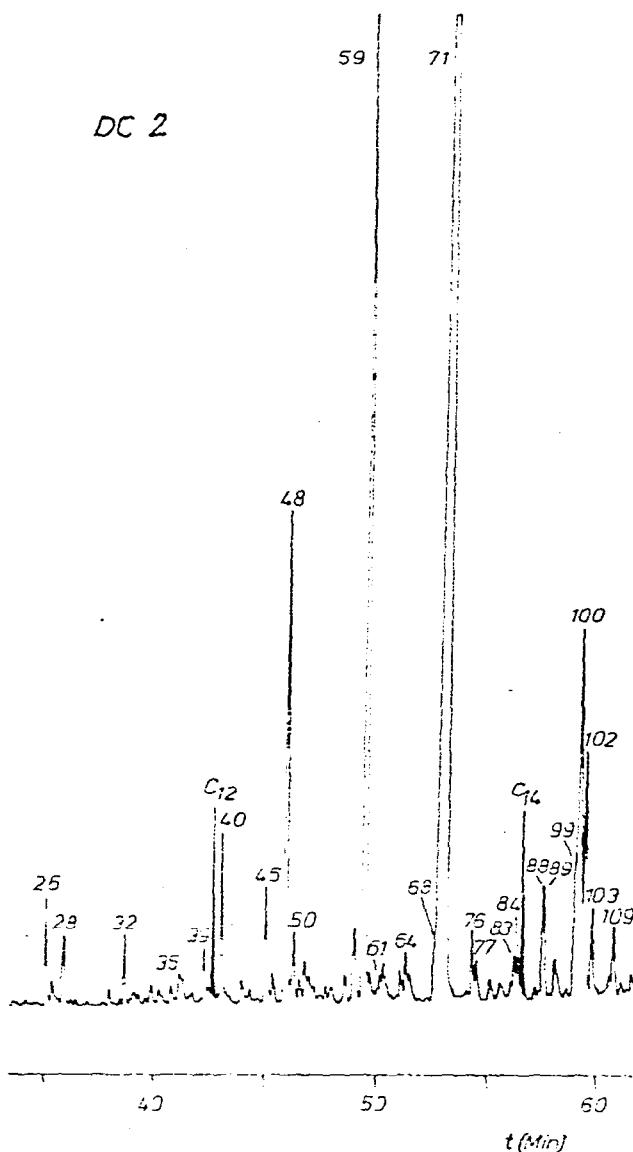


Fig. 1. Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm der aus der Zone DC 2 isolierten Säuren, die durch Zahlen gekennzeichnet sind. Die zur Messung von Retentionsindices beigemengten Kohlenwasserstoffe sind als C_9 , C_{10} , etc. markiert.

Trennung unterworfen. Die Anreicherung wurde durch Aufnahme von Glaskapillargaschromatogrammen überprüft. Die so erzielte weitgehende Anreicherung reichte aus, um von den wichtigsten Schlüsselbruchstücken durch die peak-matching Technik mit hochauflösender Massenspektrometrie Bruttoformeln zu bestimmen.

DC 3

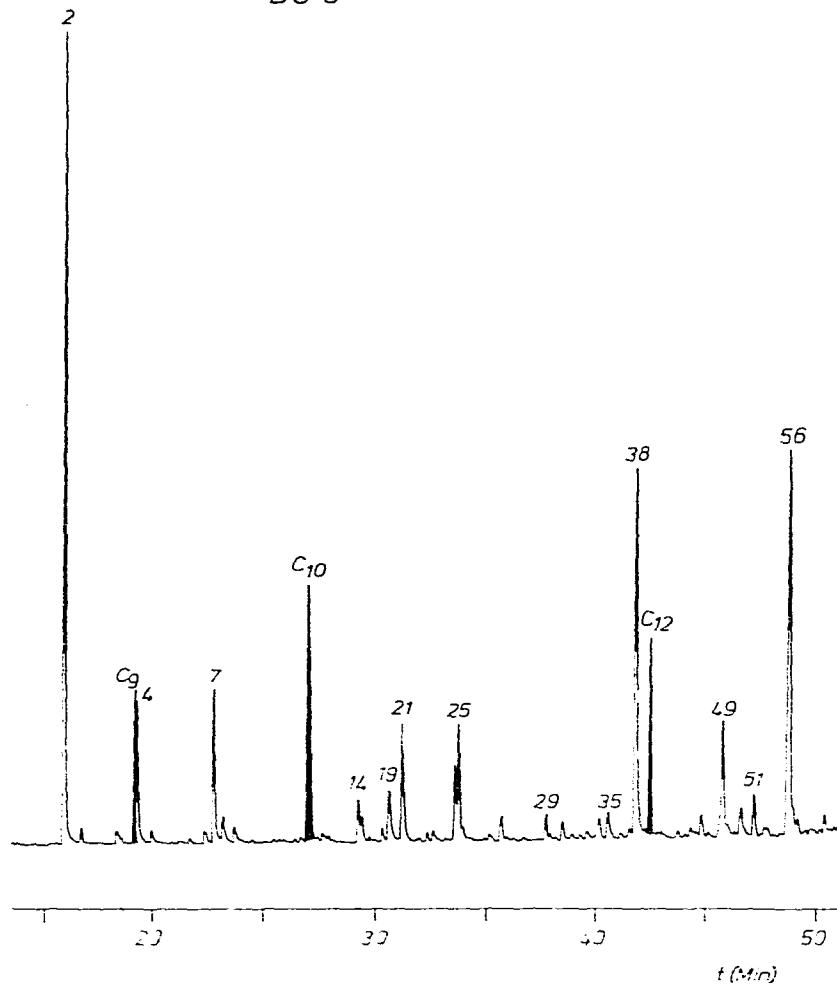


Fig. 2. Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm der aus der Zone DC 3 isolierten Säuren.

DARSTELLUNG DER VERGLEICHСVERBINDUNGEN

2-Methyläpfelsäuredimethylester wurde aus Acetessigsäuredimethylester durch Cyanhydrinsynthese nach Barker [2] [$F = 115^\circ$ (Essigester)], 2-Ethyläpfelsäure aus Propionylessigsäuremethylester und NaCN nach Strassmann und Ceci [3] [$F = 117^\circ$ (Essigester)], Isopropyläpfelsäure aus Isobutylessigester und NaCN nach Yamashita [4] [$F = 145-147^\circ$] und *n*-Butyläpfelsäure nach der selben Vorschrift dargestellt und ohne weitere Reinigung für die Vergleichsmessungen eingesetzt.

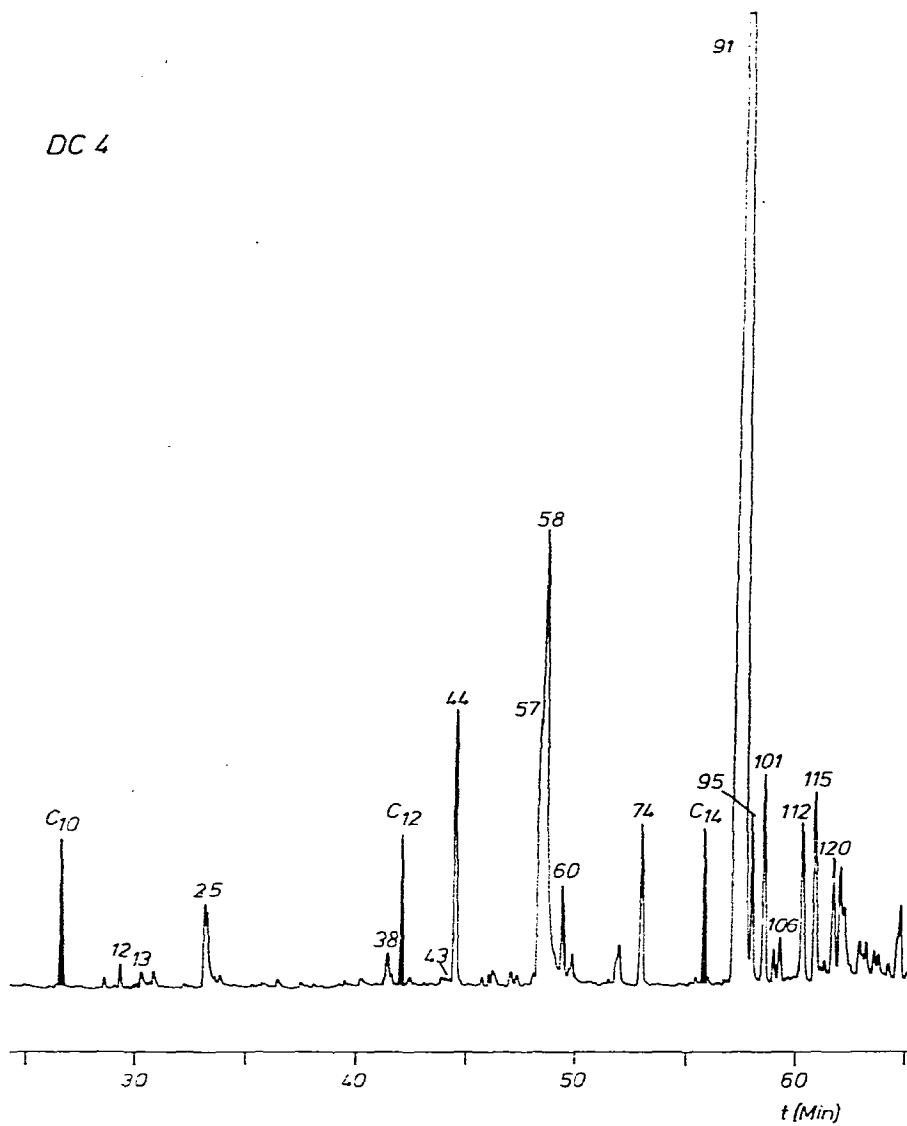


Fig. 3. Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm der aus der Zone DC 4 isolierten Säuren.

AUFPNAHMEBEDINGUNGEN DER MASSENSPEKTREN UND GASCHROMATOGRAMME

Massenspektrometer-Gaschromatograph

LKB-2091 Gerät mit getrennten Oldiffusionspumpen (150 l/sec Saugleistung) für Quelle und Einlass.

E.I.-Ionenquelle: 250°, Elektronenenergie 70 eV, Beschleunigungsspannung 3.5 kV, TIC-Signal bei 20 eV registriert. 20 m SE-30 Dünnfilmglaskapillarsäule mit Platinkapillarenanschluss. Injizierte Menge: 0.2–0.8 μ l, Injektor-Tempera-

tur: 275° , Detektor-Temperatur: 275° , Ofen-Temperatur: 75° , 7 min isotherm, Temperaturprogramm: $2^\circ/\text{min}$ bis 280° , Splitverhältnis: 1:20, Abschwächer (Attenuator): 32.

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

Gaschromatograph: Pye-Unicam Ein-Säulengerät, Temperaturprogramm: $2^\circ/\text{min}$. Säule: Dünnschicht-Glaskapillarsäule: 25 m, Trägergas: Helium (2 ml/min).

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

Präparativer Gaschromatograph

Carlo Erba Fractovap 2400 T. Säule: 1.5 m, 6 mm Durchmesser, gefüllt mit 3% SE-30 auf Supelcoport (80–100 mesh). Injizierte Menge: 30 μl , Injektor-Temperatur: 275° , Detektor-Temperatur: 275° , Ofen-Temperatur: 100° , Temperaturprogramm: 100° , 7 min isotherm $2^\circ/\text{min}$ bis 280° , Splitverhältnis: 1:100. Abschwächer (Attenuator): 64.

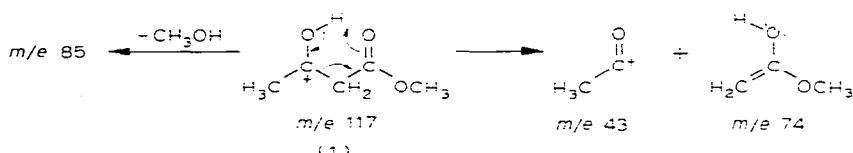
Gaschromatograph

Carlo Erba 2301 Doppelsäulengerät mit Flammenionisationsdetektor, Trägergas: Wasserstoff (2 ml/min).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

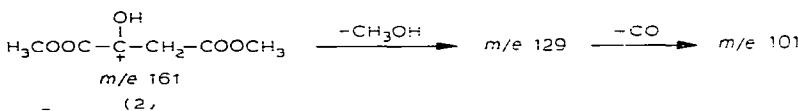
Das Massenspektrum der einfachsten Verbindung zeigt Schlüsselionen der Masse 15, 43, 85 und 117, die in den höheren Homologen (Verbindungen mit den Nummern von 35, 48 und 68) jeweils um 14, 28 bzw. 42 Masseneinheiten zu höheren Massen verschoben sind.

Das Schlüsselion der Masse 117 im Massenspektrum der mit Nr. 25 in dem Gaschromatogramm gekennzeichneten Verbindung (Fig. 4) hat die Summenformel $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3$ (1) und wird wie folgt abgebaut:



Die höheren Homologen müssen anstelle des Methylrestes eine Ethylgruppe (Verbindung Nr. 35), bzw. einen C_3H_7 - (Verbindung Nr. 48) oder einen C_4H_9 -Rest (Verbindung Nr. 68) tragen (Fig. 5–7), da die Schlüsselionen um eine entsprechende Zahl von Masseneinheiten verschoben sind.

Die Ionen der Masse 161 (2) entstehen durch Abspaltung des Alkylrestes. Sie werden nach dem folgenden Schema weitergespalten:



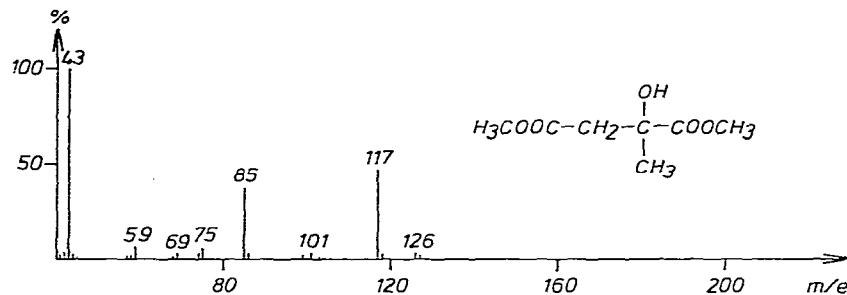


Fig. 4. Massenspektrum des Methyläpfelsäuredimethylesters.

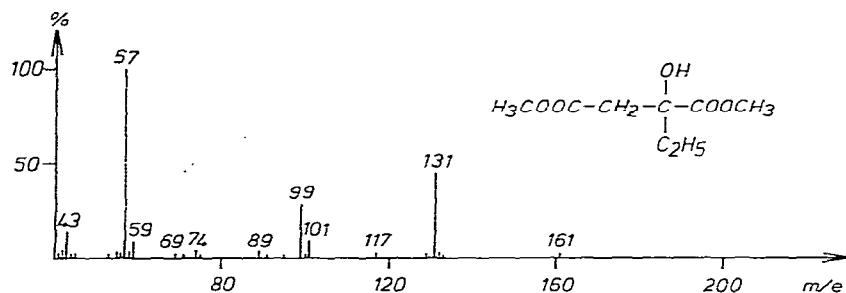


Fig. 5. Massenspektrum des Ethyläpfelsäuredimethylesters.

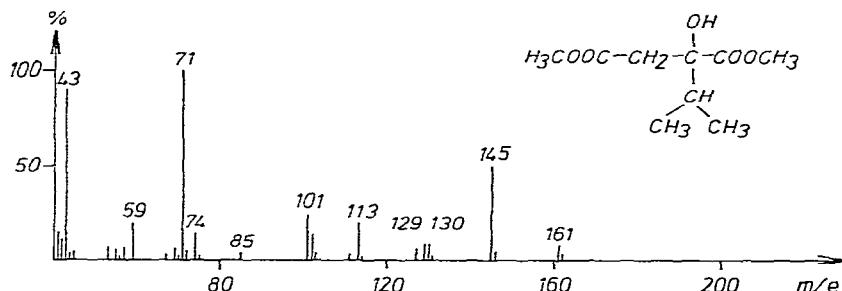


Fig. 6. Massenspektrum des Isopropyläpfelsäuredimethylesters.

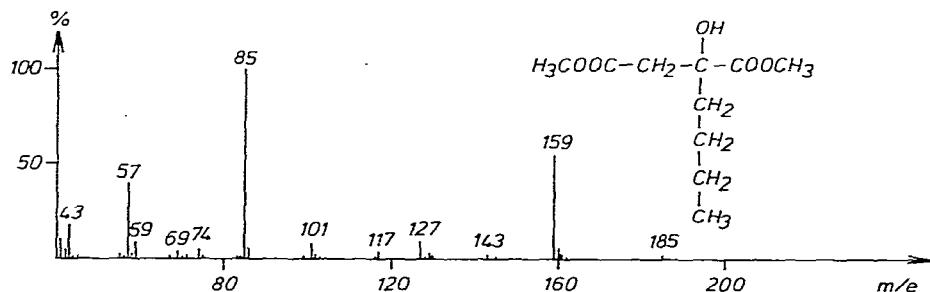


Fig. 7. Massenspektrum des Butyläpfelsäuredimethylesters.

Demnach ergibt sich für den einfachsten Vertreter der Reihe, für die Verbindung Nr. 25, die Struktur eines α -Methyläpfelsäuremethylesters [Retentionsindex (RI) 1075], für das nächst höhere Homologe die eines Ethyläpfelsäuremethylesters (RI 1181) und für die beiden anderen eines C_3H_7 - bzw. C_4H_9 -substituierten Äpfelsäuremethylesters (RI 1247, RI 1351).

Um die Struktur sicherzustellen, wurde α -Methyläpfelsäure nach Yamashita [4] aus Acetessigester und Acetylchlorid synthetisiert. Das Massenspektrum des Syntheseproduktes erwies sich identisch mit der aus Harn isolierten Verbindung. Auch die Retentionsindices von Natur- und Syntheseprodukten stimmen überein. Bei der Koinjektion beider Verbindungen in den Gaschromatographen erhielt man nur einen Peak, womit ihre Identität erwiesen ist.

In gleicher Weise wurde die Ethyläpfelsäure hergestellt [3], die sich mit dem Naturprodukt identisch erwies.

Das Massenspektrum der dritten homologen Verbindung Nr. 48, (Fig. 6) ist mit der Struktur einer Propyl- oder Isopropyläpfelsäure vereinbar. Im Vergleich zur Methyl- und Ethyläpfelsäure ist der Retentionsindex relativ erniedrigt, was bei Vorliegen einer Propyläpfelsäure nicht zu erwarten wäre. Der Verbindung sollte daher die Struktur einer Isopropyläpfelsäure zukommen. Die Synthese von Propyl- und Isopropyläpfelsäure [4] und nachfolgende Vergleichsmessungen von Massenspektren und Retentionsindices sowie die Koinjektionsprobe bestätigen diese Vermutung.

Das Spektrum der vierten Verbindung (Nr. 68) dieser Reihe entspricht dem *n*-Butyläpfelsäuredimethylester, wie durch Synthese und Vergleichsmessungen sichergestellt wurde.

Während bereits 1966 Dalgliesh et al. [5] über das Auftreten von Methyläpfelsäure im Harn berichtete, wurden homologe Verbindungen bisher nur in Mikroorganismen, Wein und Obst nachgewiesen [3, 6-18]. Das Auftreten der Isopropyläpfelsäure als Zwischenprodukt bei der Synthese von Leucin wurde von Strassmann und Mitarbeitern [19,20] postuliert, Isopropyläpfelsäure wurde unseres Wissens aber noch nicht in Körperflüssigkeiten nachgewiesen. Über Butyläpfelsäure als Naturprodukt liegen keinerlei Angaben vor.

Eine zweite Gruppe von Verbindungen (Nr. 38, 76) ist durch analoge Abbaureaktionen im Massenspektrometer wie der α -Alkyläpfelsäuren charakterisiert. Das Massenspektrum der ersten Verbindung dieser Reihe (Nr. 38, Fig. 8) ist wie das des Methyläpfelsäuremethylesters durch Schlüsselionen der Massen

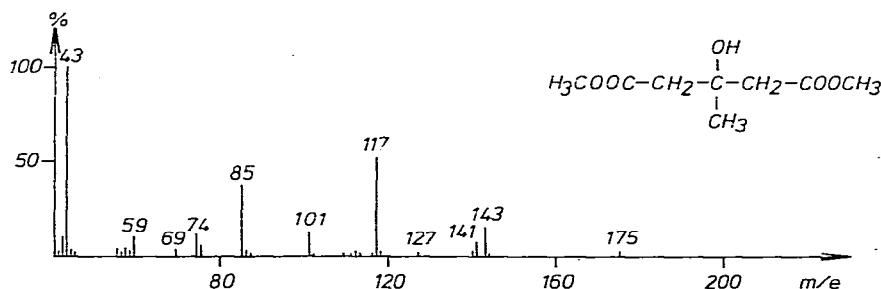
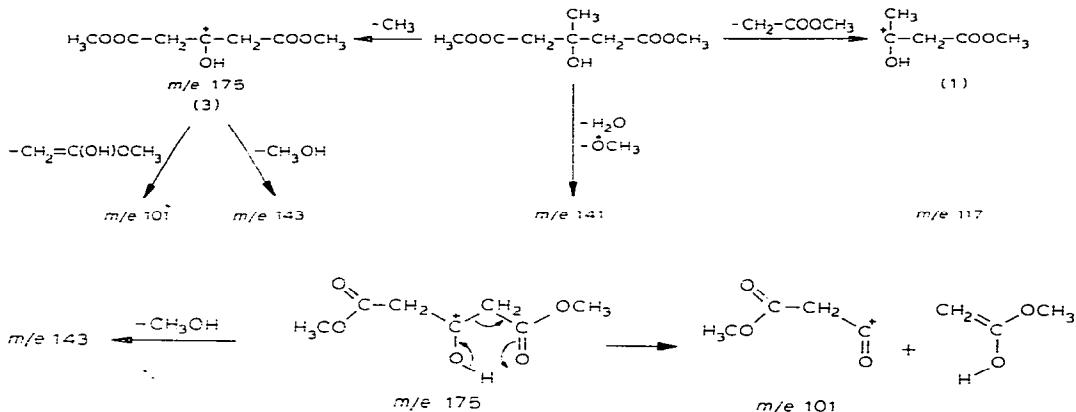


Fig. 8. Massenspektrum des β -Hydroxy- β -Methylglutarsäuredimethylesters.

117, 85 und 43 gekennzeichnet. Die Verbindung sollte demnach ebenfalls das Strukturelement (1) enthalten.



Aus dem Auftreten eines Schlüsselions der Masse 175, das offensichtlich dem Verlust einer Methylgruppe entspricht, lässt sich das Molekulargewicht 190 ermitteln. Der weitere Abbau des so charakterisierten β -Hydroxy- β -methylglutarsäuredimethylesters (RI 1191) geht aus den Spaltschemata hervor.

β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure wird bei der β -Hydroxy-methyl-glutarsäure-acidurie [21–26] in vermehrter Menge im Harn ausgeschieden, sie konnte aber auch von Dalglesch et al. [5] und anderen [27, 28] im Urin Gesunder nachgewiesen werden.

Die zweite Verbindung dieser Klasse (Nr. 76, Fig. 9) hat in ihrem Massenspektrum ebenfalls ein Schlüsselion der Masse 175 (3). Aus dem Auftreten eines Ions der Masse 145 (4), das weiter zerfällt unter Verlust von Methanol

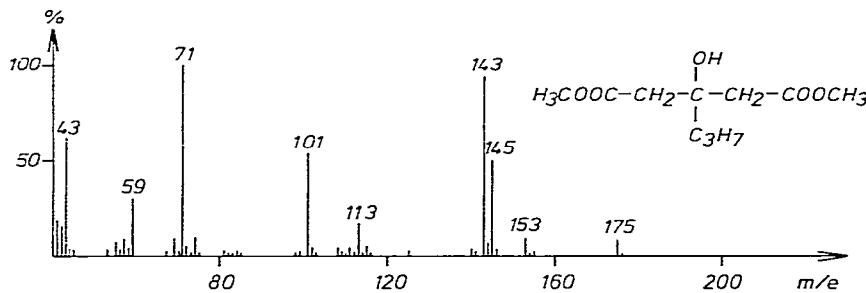
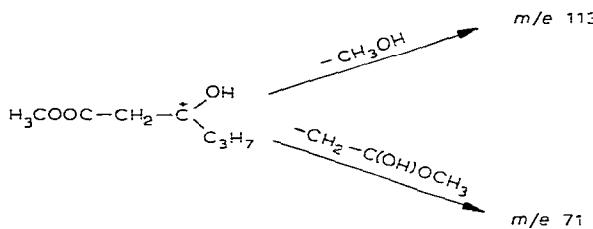


Fig. 9. Massenspektrum des β -Hydroxy- β -Propylglutarsäuredimethylesters.

und $\text{CH}_2=\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3$ lässt sich schliessen, dass das Molekül das Molekulargewicht $145 + 73$ ($\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) = 218 hat, so dass es sich hierbei entweder um den β -Hydroxy- β -isopropyl-glutarsäuredimethylester oder β -Hydroxy-propyl-glutarsäuredimethylester handelt (RI 1367).



Bei der dritten Verbindung dieser Reihe (Nr. 112, Fig. 10) tritt als Schlüsselion im oberen Massenbereich das Fragment der Masse 189 der Bruttoformel $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5$ (5) auf.

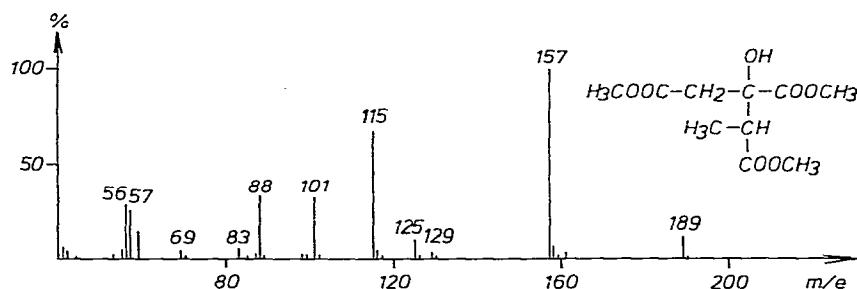
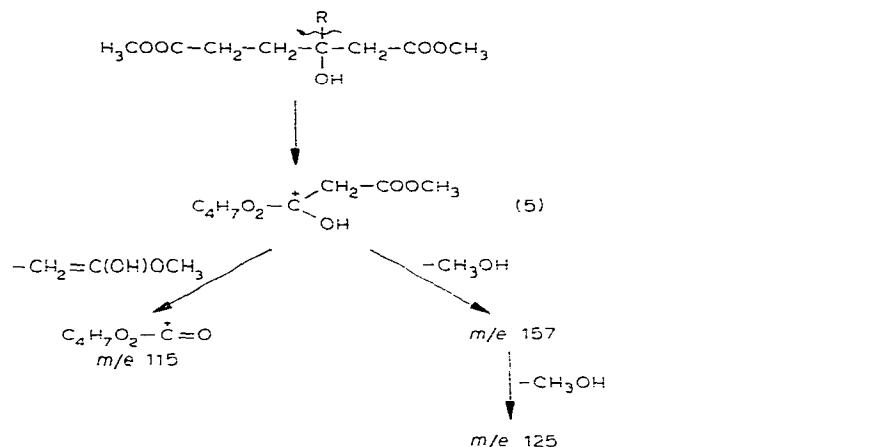


Fig. 10. Massenspektrum des α -Methyl-citronensäuretrimethylesters.

Der $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$ -Teil ist durch das für α -Methylcarbonsäuremethylester typische Auftreten des Ions der Masse 88 erkennbar:



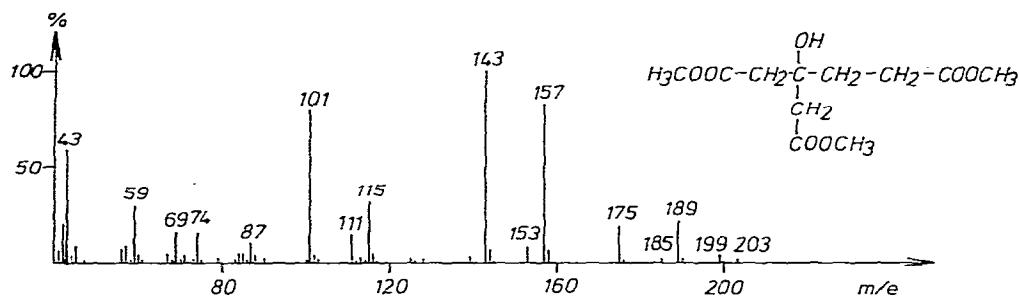


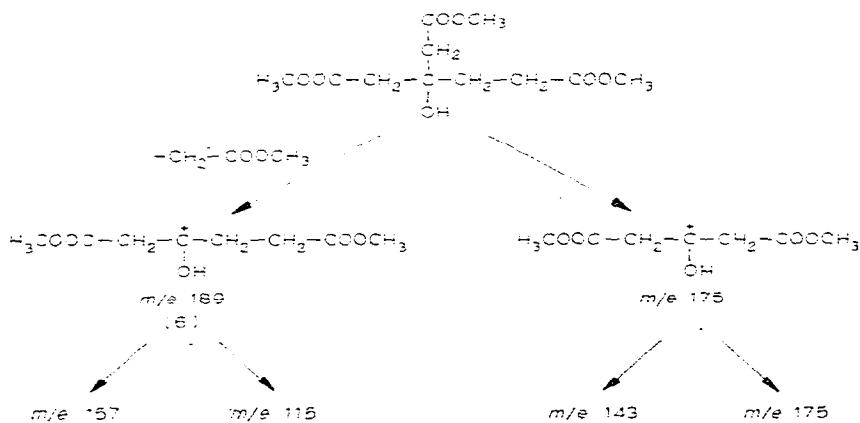
Fig. 11. Massenspektrum des β -Hydroxy- β -[carbomethoxy-methyl]-adipinsäuretrimethyl-esters.

Damit ergibt sich für die Verbindung die Struktur eines α -Methyl-citronensäuretrimethylesters (RI 1473).

Eine zweite Verbindung (Nr. 115), die ein völlig gleiches Massenspektrum, jedoch einen höheren Retentionsindex zeigt, muss eine zur Verbindung 112 diastereomere Struktur haben (RI 1482).

Eine Ausscheidung von α -Methylcitronensäure wurde bei Propionsäureacidurie beobachtet. Sie soll für diese Krankheit typisch sein. Als natürliches Stoffwechselprodukt konnte man α -Methylcitronensäure bisher nicht nachweisen [29, 30].

Eine weitere isomere Säure, deren Massenspektrum (Fig. 11) allerdings sehr unterschiedlich aussieht, ist die Verbindung Nr. 120. Aus dem Auftreten des Ions der Masse 189 und den dazugehörigen Abbauprodukten lässt sich das Vorliegen des Strukturelements (6) erkennen. Aus den übrigen Ionen lässt sich die Struktur eines β -Hydroxy- β -[carbomethoxy-methyl]-adipinsäuredimethylesters (RI 1496) ableiten:



ZUSAMMENFASSUNG

Harn enthält eine Reihe α -hydroxylierter Dicarbonsäuren, deren Vorkommen in biologischen Flüssigkeiten bisher nicht bekannt war. So finden sich

neben der als normales Stoffwechselprodukt bereits bekannten Methyläpfelsäure auch die Ethyl-, Isopropyl- und Butyläpfelsäure. Als weitere, offenbar bisher unbekannte Stoffwechselprodukte wurden eine β -propyl-substituierte β -Hydroxyglutarsäure, die β -Hydroxy- β -[methyl-carbomethoxy]-adipinsäure und zwei Isomere der α -Methylcitronensäure entdeckt.

DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Doktor Robert Pfleger-Stiftung für die Unterstützung durch Sachmittel. Herrn Dr. G. Remberg danken wir für die Messung der Hochauflösungswerte, Herrn Dr. J. Reiner für die Herstellung der Glaskapillarsäulen und Herrn W. Kern für seine tatkräftige Mitarbeit bei der experimentellen Arbeit.

LITERATUR

- 1 M. Spiteller und G. Spiteller, *J. Chromatogr.*, 164 (1979) 253.
- 2 H.A. Barker, *Biochem. Prep.*, 9 (1962) 25.
- 3 M. Strassmann und L.N. Ceci, *Arch. Biochem. Biophys.*, 119 (1967) 420.
- 4 M. Yamashita, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 835.
- 5 C.E. Dalglesich, E.C. Horning, M.G. Horning, K.L. Knox und K. Yarger, *Biochem. J.*, 101 (1966) 792.
- 6 A.C. Hulme, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 36.
- 7 T. Sai und M. Amaha, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13 (1967) 15.
- 8 F.C. Steward, A.C. Hulme, S.R. Freiberg, M.P. Hegarty, J.K. Pollard, R. Rabson und R.A. Barr, *Ann. Bot. (London)*, 24 (1960) 83.
- 9 M. Castino, *Riv. Viticolt. Enol.*, 22 (1969) 347.
- 10 M. Bourzeix, J. Guitraud, F. Champagnol und N. Heredia, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 83.
- 11 M. Castino, *Riv. Viticolt. Enol.*, 22 (1969) 197.
- 12 J. Carles, M. Talieu-Rousseau und C. Montand, *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 265 (1967) 1183.
- 13 R. Rabin, I.I. Salamon, A.S. Bleiweis, J. Carlin und S.J. Ajl, *Biochemistry*, 7 (1968) 377.
- 14 J.M. Calvo, M.G. Kalyanpur und C.M. Stevens, *Biochemistry*, 1 (1962) 1157.
- 15 F.E. Cole, M.G. Kalyanpur und C.M. Stevens, *Biochemistry*, 12 (1973) 3346.
- 16 J.M. Calvo und S.R. Gross, *Methods Enzymol.*, 17 (1970) 791.
- 17 T. Sai, *Bull. Brew. Sci.*, 16 (1970) 21.
- 18 Y. Mikami, H. Takahara, H. Limura, A. Suzuki und S. Tamura, *Agr. Biol. Chem.*, 34 (1970) 977.
- 19 M. Strassmann und S. Weinhouse, *J. Amer. Chem. Soc.*, 75 (1953) 1680.
- 20 M. Strassmann, L.A. Nocke, A.J. Thomas und S. Weinhouse, *J. Amer. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1599.
- 21 N. Gregersen, J. Ingerslev und K. Rasmussen, *Acta Paediat. Scand.*, 66 (1977) 85.
- 22 S.J. Wysocki, S.P. Wilkinson, R. Hahnel, C.Y.B. Wong und P.K. Panegyres, *Clin. Chim. Acta*, 70 (1976) 399.
- 23 S.J. Wysocki und R. Hahnel, *Clin. Chim. Acta*, 73 (1976) 373.
- 24 K.F. Faull, P.D. Bolton, B. Halpern, J. Hammond und D.M. Danks, *Clin. Chim. Acta*, 73 (1976) 553.
- 25 Z.H. Beg und M. Siddiqui, *Experientia*, 23 (1967) 380.
- 26 S.J. Wysocki und R. Hahnel, *Clin. Chim. Acta*, 71 (1976) 349.
- 27 C.M. Hinse und P.J. Lupien, *Anal. Biochem.*, 19 (1967) 392.
- 28 C.C. Sweeley, N.D. Young, J.F. Holland und S.C. Gates, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 507.
- 29 T. Ando, K. Rasmussen, J.M. Wright und W.J. Nyhan, *J. Biol. Chem.*, (1972) 2200.
- 30 M. Duran, D. Gompertz, L. Bruinvis, D. Ketting und S.K. Wadman, *Clin. Chim. Acta*, 82 (1978) 93.