

Ausscheidungsprodukte von Hydroxyanthrachinonen im Harn bei Ratten

Von B. MÄHNER und H.-J. DULCE

*Aus dem Institut für Angewandte Physiologische Chemie und Klinische Chemie der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce)*

(Eingegangen am 29. Juni 1967)

Bei Ratten lässt sich nach Alizarinverfütterung aus dem Harn eine Fraktion isolieren, die zu etwa 85% aus Alizarinmonoglucuronid besteht. Das Alizarinmonoglucuronid wurde durch quantitativen Nachweis der Hydroxyanthrachinon- und Glucuronsäurekomponente und durch chromatographischen Nachweis der Spaltung mit β -Glucuronidase identifiziert.

Ruberythrinsäure wird bei Ratten nach oraler Gabe ebenso wie Alizarin als Alizarinmonoglucuronid im Harn ausgeschieden. Dies konnte durch den Nachweis der Identität der beiden nach Alizarin- und nach Ruberythrinsäureverfütterung aus dem Harn isolierten Hydroxyanthrachinonderviate bewiesen werden.

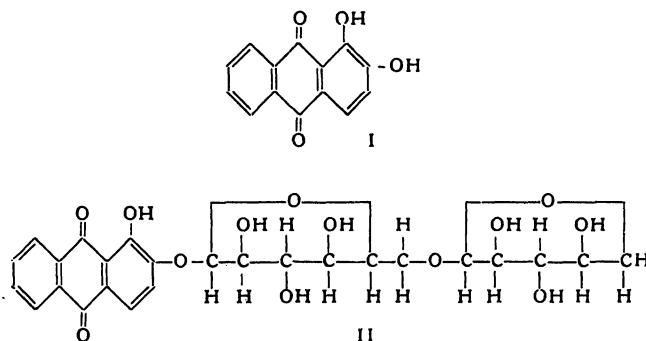
Innerhalb von 24 Std. findet man bei Ratten etwa 10% der zugeführten Alizarinmenge als Glucuronid im Harn wieder, bei Ruberythrinsäurezufuhr etwa 8%. Das Maximum der Ausscheidung der beiden Substanzen liegt etwa 6 Std. nach einmaliger oraler Zufuhr.

After feeding alizarin to rats, a fraction was isolated from the urine, which consisted of about 85% alizarin monoglucuronide. The alizarin monoglucuronide was identified by the identification and determination of the hydroxyanthraquinone and the glucuronic acid components, and by the chromatographic demonstration of the cleavage with β -glucuronidase.

Ruberythric acid is also excreted in the urine as alizarin monoglucuronide after its oral administration to rats; this was evident from the identity of the isolated hydroxyanthraquinone after feeding either alizarin or ruberythric acid.

Within 24 hr of administering alizarin or ruberythric acid to rats, 10% or 8% respectively can be recovered from the urine as alizarin glucuronide. The maximum excretion from both compounds occurs at about 6 hr after a single oral dose.

Die Hydroxyanthrachinone Alizarin (I) und Ruberythrinsäure (II) vermindern *in vitro* in einem Bereich oberhalb pH 6,8 die Kristallisation von Calciumoxalat und Calciumphosphat (1). Beide Hydroxyanthrachinone sind neben anderen substituierten Anthrachinonen aus der Krappwurzel (Wurzel der Färberrote, *Rubia tinctoria*) darstellbar.



Krappwurzelextrakt verringert *in vivo* nach oraler Gabe die Bildung von calciumhaltigen Harnsteinen (2, 3).

Unklarheiten herrschten bisher über die Ausscheidungsprodukte der beiden Hydroxyanthrachinone. Alizarin könnte als Glucuronid ausgeschieden werden, wie dies bei Phenolen häufig der Fall ist. Für die Ruberythrinsäure nahm BAUER (4, 5) an, daß sie unverändert eliminiert wird und dadurch eine Säuerung des Harnes hervorruft.

Wir prüften deshalb im Tierversuch, in welcher Form Alizarin und Ruberythrinsäure nach oraler Zufuhr tatsächlich ausgeschieden und welche Menge an Stoffwechselprodukten der Hydroxyanthrachinone nach einmaliger oraler Gabe innerhalb von 24 Std. im Harn wiedergefunden werden.

Methodik

Isolierung der im Harn ausgeschiedenen Hydroxyanthrachinone

Etwa 260 g schweren männlichen Ratten wurde Alizarin bzw. Ruberythrinsäure (etwa 100 mg/kg, pH 8,0) mittels Schlundsonde verfüttert. Jeweils 10 Ratten hielten wir in einem Stoffwechsel-Käfig, sammelten den Harn stdl. 6 Std. lang und bewahrten ihn bei -18° auf. Der Harn wurde nach Filtrieren mit 0,1N HCl auf pH 4 angesäuert, anschließend zentrifugiert und zur präparativen Trennung der Überstand auf Chromatographiepapier Schleicher und Schüll 2043b aufgetragen. Als Fließmittel verwendeten wir n-Propanol/Äthylacetat/H₂O 4:3:2 (v/v) (6). Die Laufzeit der Chromatogramme betrug 10 Std. Die sich abgrenzende gelb-rote Bande wurde mit Wasser eluiert, das Eluat im Rotationsverdampfer eingedampft und mit absolutem, unvergälltem Alkohol ausgeschüttet. Dabei ergaben sich zwei Fraktionen, eine in Alkohol unlösliche rot gefärbte Substanz und ein in Alkohol gelöster Anteil. Die unlösliche Fraktion wurde abzentrifugiert, in Wasser erneut gelöst, abermals im Rotationsverdampfer getrocknet, und mit Alkohol ausgeschüttet. Der nunmehr unlösliche Teil ergab nach Abzentrifugieren und Verdunsten des Alkohols die Fraktion I. Der im Alkohol lösliche Anteil ergab mehrfach mit Aktivkohle gereinigt und im Rotationsverdampfer eingeengt die Fraktion II.

Identifizierung der ausgeschiedenen Hydroxyanthrachinone

Photometrischer Glucuronsäure- und Alizarin-Nachweis

Fraktion I und II, gewonnen nach Alizaringabe, sowie Fraktion I, gewonnen nach Ruberythrinsäuregabe, wurden auf ihren Gehalt an Glucuronsäure und Alizarin untersucht. Glucuronsäure bestimmten wir mit Carbazol nach DISCHE (7) und Alizarin nach Spaltung der Fraktionen mit β -Glucuronidase (E. C. 3.2.1.31, β -D-Glucuronid Glucuronohydrolase) und Verdünnen mit 0,1M Glycin-Puffer nach SÖRENSEN pH 11 photometrisch bei 578 nm. Eichkurven erhielten wir durch Messen der Verdünnungsreihen von Glucuronsäurelacton und Alizarin.

Spaltung von Fraktion I mit β -Glucuronidase

Die nach Alizarin- wie auch Ruberythrinsäuregabe isolierte Fraktion I (11,4 mg) wurde in 30 ml/0,2M Acetatpuffer pH 5 gelöst und mit je 0,2 m/ Ketodase (β -Glucuronidase Goedecke 50000 E/ml)

in 10 Einzelansätzen von 3,0 ml bei 37° inkubiert. In Abständen von je 1 Min. wurde in je einem Ansatz durch Zugabe von 0,3 ml/ 2N NaOH die Spaltung unterbrochen und nach Zugabe von 3 ml/ 0,1M Glycin-Puffer pH 11 das freigesetzte Alizarin wie oben bestimmt. Als Kontrollversuch diente ein Ansatz mit Enzym und Ruberythrinsäure.

Absorptionsspektren

Alizarin und Ruberythrinsäure, deren Ausscheidungsprodukte vor und nach Spaltung mit β -Glucuronidase und Ruberythrinsäure nach Behandlung mit β -Glucuronidase wurden in 0,1M Glycin-Puffer pH 11 gelöst und die Absorptionsspektren mit dem Spektralphotometer RPQ 20 A Zeiss im Bereich zwischen 800 nm und 450 nm geschrieben.

Chromatographie

1,5 mg Alizarin, 2,0 mg Ruberythrinsäure und 1,9 mg Fraktion I wurden in je 5 ml/ 0,1M Glycin-Puffer pH 11,0 gelöst. Davon trugen wir je 0,02 ml/, von den nach Spaltung mit β -Glucuronidase und Glycin-Pufferzugabe erhaltenen Lösungen 0,04 ml/ auf Schleicher-Schüllpapier 2043 b auf. Wir chromatographierten in dem oben angegebenen Fließmittel mit einer Laufzeit von 12 Std.

Ausscheidungsversuch

Drei Gruppen zu je zwölf männlichen Ratten, von denen immer zwei in einem Stoffwechselkäfig saßen, erhielten mit einer Schlundsonde je 6 ml/ Humanamilchzubereitung (14 g Humanapulver Stufe I in 90 ml dest. Wasser gelöst). Zwei Std. später gaben wir mit der Schlundsonde der

- Gruppe A: 6 ml/ Humana / Tier (Kontrolle)
- Gruppe B: 6 ml/ Humana mit 9,6 mg Alizarin / Tier
- Gruppe C: 6 ml/ Humana mit 21,3 mg Ruberythrinsäure (Alizarinäquivalent).

Vier und acht Std. nach der Hydroxyanthrachinongabe erhielten alle Tiere weitere 6 ml/ Humana oral. In zweistündigen Abständen wurde 14 Std. lang der Harn gesammelt und gruppenweise zur Analyse vereinigt. Eine letzte Harnportion fingen wir 24 Std. nach der Hydroxyanthrachinongabe auf. In den einzelnen Harnportionen der drei verschiedenen Gruppen wurden Glucuronsäure- und nach β -Glucuronidasespaltung Alizarinbestimmungen durchgeführt.

Ergebnisse

Identifizierung der im Harn ausgeschiedenen Hydroxyanthrachinone

Alizarin- und Glucuronsäurenachweis

a) Fraktion I nach Verfütterung von Alizarin

Fraktion I ist ein ziegelrotes amorphes Pulver, das im sauren Bereich mit gelber Farbe, im neutralen mit roter Farbe gut löslich ist. Alizarin und Glucuronsäure konnten im Verhältnis 1:1 nachgewiesen werden. Verglichen mit reinem Alizarin-glucuronid haftete der gereinigten Fraktion I noch eine Verunreinigung von etwa 15% an. Eine nur einmal mit Alkohol gereinigte Fraktion I enthielt noch etwa 48% anthrachinonfreie Verunreinigungen.

b) Fraktion II nach Verfütterung von Alizarin

Es handelt sich um eine sirupartige Masse von schwach gelblicher Farbe. Sie besteht nur zu etwa 1% aus Alizarin und Glucuronsäure im Verhältnis 1:1. Nach Zusatz von 3N NaOH entwichen stechende ammoniaka-lische Dämpfe.

c) Fraktion I nach Verfütterung von Ruberythrinsäure

Es handelt sich ebenfalls um ein ziegelrotes amorphes Pulver, das gleiche Löslichkeit zeigt wie Fraktion I nach

Verfütterung von Alizarin. In der nach einmaliger Alkoholbehandlung isolierten Fraktion I fanden wir 23% Glucuronsäure und 25% Alizarin entsprechend einem 1:1-Glucuronid. Die Verunreinigung betrug etwa 52%.

Spaltung mit β -Glucuronidase

Aus beiden Harnfraktionen I wurde innerhalb von sieben Min. das gesamte Alizarin mit gleicher Geschwindigkeit freigesetzt (Abb. 1). Aus reiner Ruberythrinsäure wurde in der gleichen Zeit kein Alizarin frei.

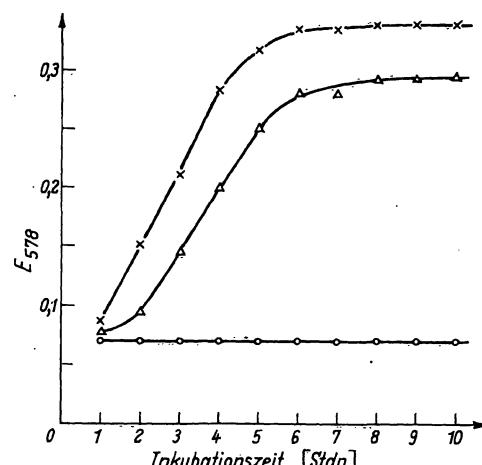


Abb. 1

Spaltung von Harnfraktion I bzw. Ruberythrinsäure durch β -Glucuronidase bei 37°. Gemessen wurde die Extinktion freigesetzten Alizarins

$\times - \times$ Harnfraktion I 158,3 $\mu\text{g}/6,5 \text{ ml}$ isoliert nach Alizaringabe
 $\Delta - \Delta$ Harnfraktion I 223,4 $\mu\text{g}/6,5 \text{ ml}$ isoliert nach Ruberythrinsäuregabe
 $\circ - \circ$ Ruberythrinsäure 127,7 $\mu\text{g}/6,5 \text{ ml}$

Absorptionsspektren der verschiedenen Substanzen

Beide Harnfraktionen I und Ruberythrinsäure zeigen identische Spektren mit einem Maximum bei 490 nm (Abb. 2, 4, 5).

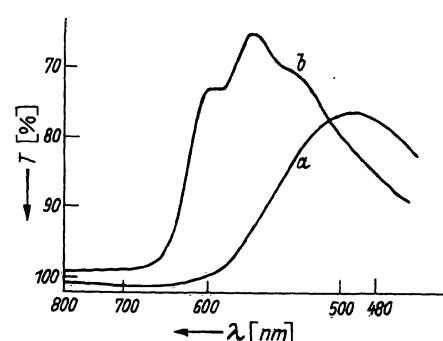


Abb. 2

Absorptionsspektren von Harnfraktion I und Alizarin

a: Harnfraktion I, isoliert nach Alizaringabe. 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
b: Alizarin, 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Alizarin besitzt dagegen ein typisches Maximum bei 578 nm (Abb. 2). Spaltet man die Harnfraktion I mit β -Glucuronidase, so erhält man wieder das typische Alizarinspektrum mit dem Maximum bei 578 nm (Abb. 3). Spaltet man Harnfraktion I, die nach Rub-

erythrinsäuregabe isoliert wurde, mit β -Glucuronidase, so erhält man ebenfalls das Absorptionsspektrum des Alizarins (Abb. 4).

Inkubiert man Ruberythrinsäure mit β -Glucuronidase, so ändert sich das Maximum bei 490 nm während der Inkubationszeit von 10 Min. nicht (Abb. 5).

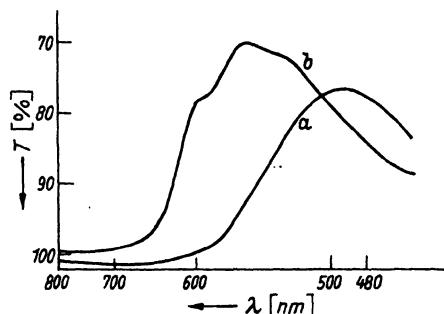


Abb. 3

Absorptionsspektren von Harnfraktion I vor und nach Inkubation mit β -Glucuronidase

a: Harnfraktion I, isoliert nach Alizaringabe 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
b: Harnfraktion I, isoliert nach Alizaringabe, nach Inkubation mit β -Glucuronidase

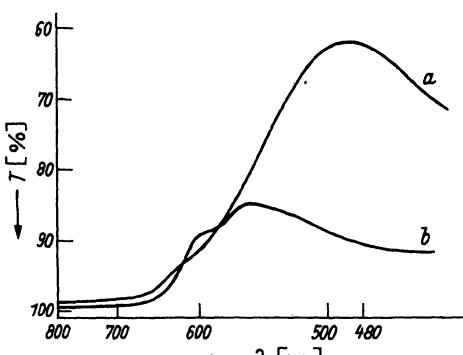


Abb. 4

Absorptionsspektren von Harnfraktion I vor und nach Spaltung mit β -Glucuronidase

a: Harnfraktion I, isoliert nach Ruberythrinsäuregabe 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
b: Harnfraktion I, isoliert nach Ruberythrinsäuregabe nach Spaltung mit β -Glucuronidase

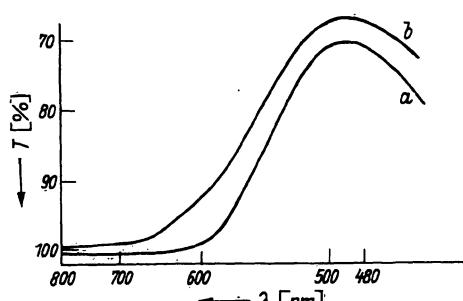


Abb. 5

Absorptionsspektren von Ruberythrinsäure vor und nach Inkubation mit β -Glucuronidase

a: Ruberythrinsäure 1,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
b: Ruberythrinsäure nach Inkubation mit β -Glucuronidase

Chromatographie

Die nach Alizarin- wie auch nach Ruberythrinsäuregabe isolierten Harnfraktionen I haben identische R_F -Werte von 0,64. Ruberythrinsäure besitzt den R_F -Wert von 0,83. Spaltet man diese drei Stoffe 10 Min. lang mit β -Glucuronidase, so wird aus den beiden Harnfraktionen I Alizarin, das im Chromatogramm mit der Front läuft, freigesetzt. In der gleichen Inkubationszeit ändert sich der R_F -Wert von Ruberythrinsäure nicht.

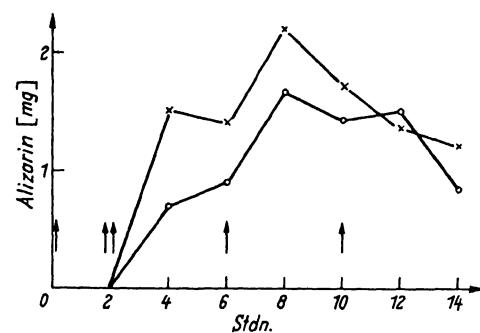


Abb. 6

Hydroxyanthrachinonausscheidung (als Alizarin) im Harn bei Ratten

—×— Alizarin 115,1 mg/12 Ratten
—○— Ruberythrinsäure 256 mg/12 Ratten

↑: 6 ml Humana

↑↑: 6 ml Humana + Hydroxyanthrachinone

Ausscheidungsversuche

Nach Verfütterung von insgesamt 115,2 mg Alizarin an 12 Ratten wurden im Harn nach Hydrolyse innerhalb von 12 Stdn. 9,49 mg wiedergefunden (Abb. 6). Dies entspricht 8,24%. Nach weiteren 12 Stdn. wurden noch 2,44 mg ausgeschieden, so daß innerhalb von 24 Stdn. 10,38% der oral zugeführten Menge an Alizarin im Harn wiedergefunden wurde. Nach Gabe einer äquivalenten Menge Ruberythrinsäure wurden im Harn innerhalb von 12 Stdn. 7,15 mg Alizarin gefunden. Dies entspricht 6,2% der verabfolgten Dosis. In den nächsten 12 Stdn. wurden weitere 1,87 mg Alizarin ausgeschieden, so daß von der Gesamtmenge innerhalb von 24 Stdn. 7,82% ausgeschieden wurden. Das Maximum der Glucuronsäure- (Abb. 7) wie auch der Alizarinausscheidung ist 6 Stdn. nach der Hydroxyanthrachinongabe erreicht.

Diskussion

Glucuronsäure spielt bei der Elimination von körpereigenen wie auch körperfremden Substanzen eine wichtige Rolle. Die von uns nach Alizarinverfütterung als Fraktion I isolierte Substanz enthält Glucuronsäure und Alizarin im Verhältnis 1:1. Wir nehmen ein Alizarinmonoglucuronid an. Chromatographisch und mit Hilfe von Absorptionsspektren konnte bewiesen werden, daß durch Inkubation mit β -Glucuronidase aus der Fraktion I tatsächlich Alizarin freigesetzt wird.

Da das Alizarinmonoglucuronid das gleiche Absorptionsspektrum wie die Ruberythrinsäure aufweist, deren Kohlenhydrat-Komponente in Position 2 steht, darf man

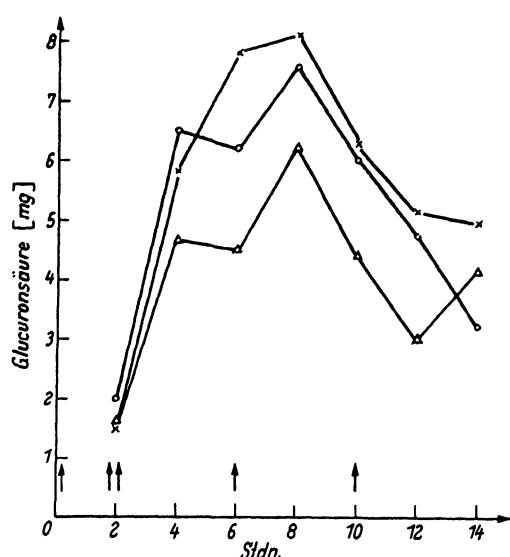


Abb. 7

Glucuronsäureausscheidung im Harn nach Hydroxyanthrachinongabe bei Ratten

- x — Alizarin 115,1 mg/12 Ratten
- o — Ruberythrinsäure 256,3 mg/12 Ratten
- L — Kontrolle 12 Ratten
- ↑: 6 ml Humana
- ↑↑: 6 ml Humana + Hydroxyanthrachinone

annehmen, daß auch die Glucuronsäure ätherartig an die OH-Gruppe in Stellung 2 gebunden ist. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß die OH-Gruppe in Stellung 1 eine starke Nebenvalenzbindung zu der benachbarten Oxogruppe besitzt (6).

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es sicher, daß auch die Ruberythrinsäure nach oraler Gabe als Alizarinmonoglucuronid im Harn erscheint. Aus Ruberythrinsäure läßt sich innerhalb von 10 Min. durch Inkubation mit β -Glucuronidase kein Alizarin freisetzen, während dies bei der Fraktion I, isoliert nach Ruberythrinsäure-

gabe, der Fall ist. Es kann sich also bei der verfütterten Ruberythrinsäure und ihrem Ausscheidungsprodukt nicht um die gleiche Substanz handeln. Beide Substanzen haben einen verschiedenen R_F -Wert. Die Fraktion I, gewonnen nach Ruberythrinsäuregabe, ist dagegen mit der Fraktion I, isoliert nach Alizarinverfütterung, identisch. Beide Harn-Fraktionen I zeigen gleiche Eigenschaften gegenüber der Behandlung mit β -Glucuronidase, beide besitzen identische R_F -Werte. Das Verhältnis von Glucuronsäure zu Alizarin wurde in der nach Ruberythrinsäuregabe isolierten Fraktion I zu 1:0.9 bestimmt. Die nur einmal mit Alkohol aus Harn extrahierte Substanz ist wie nach Alizingabe etwa 50% rein.

Bei der Harn-Fraktion II handelt es sich wahrscheinlich um ein nicht völlig von Alizinglucuronid gereinigtes primäres Amin. Derartige Amine, z. B. Methylamin, sind im Rattenharn als basensparendes Prinzip bekannt.

Daß rund 10% der Hydroxyanthrachinone nach Alizarin und rund 8% nach Ruberythrinsäureverfütterung innerhalb von 24 Std. im Harn wiedererscheinen, deckt sich mit Ergebnissen von BODE (8), die nach Applikation von Hydroxybenzoësäuren eine Erhöhung der Glucuronsäureausscheidung um rund 10 bis 15% gegenüber den Kontrollen beobachtete. Die restlichen 90% der Hydroxyanthrachinone könnten entweder nicht resorbiert worden, teilweise im Knochen fixiert oder mit der Galle ausgeschieden sein. ERBRING und Mitarbeiter (9) haben chromatographisch bestätigt, daß auch beim Menschen nach oraler Gabe von Alizarin und Ruberythrinsäure im Harn Alizinglucuronid erscheint. Rohe Ruberythrinsäurepräparationen führen zu stärkerer Alizinglucuronidausscheidung als reines Alizarin. Ruberythrinsäure tritt im Harn des Menschen nach Belastung mit Hydroxyanthrachinonen ebenfalls nicht auf (9).

Wir danken der Fa. Dr. Madaus für die freundliche Überlassung chromatographisch einheitlicher Ruberythrinsäure.

Literatur

- DULCE, H.-J., Unveröffentl. Mitteilung. — 2. MADAUS, G. und E. KOCH, Zschr. Exp. Med. 109, 517 (1941). — 3. KELLER, J. und B. GÖRLICH, Zschr. Urol. 38, 1 (1944). — 4. BAUER, A., Zschr. Urol. 14, 175 (1920). — 5. BAUER, A., Zschr. Urol. 17, 274 (1923). — 6. HAIS, I. M. und K. MAČEK, Handb. der Papierchromatographie, Bd. I, S. 329 (1963) VEB Gustav Fischer Verlag Jena. — 7. DISCHE, Z., J. biol. Chemistry 167, 191 (1947). — 8. BODE, E., Inaug. Dissert. Berlin (1961). — 9. ERBRING, H., Persönl. Mitteilung.

Prof. Dr. H.-J. Dulce
1 Berlin 33
Arnimallee 22