

## DIE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE DER KETOSÄUREN

PENTTI RONKAINEN

*Forschungslaboratorien des Staatlichen Alkoholmonopols (Alko),  
Helsinki (Finnland)*

(Eingegangen den 29. Oktober 1962)

## EINLEITUNG

Zur Trennung der Ketosäuren wurden eine Anzahl von papierchromatographischen Methoden entwickelt<sup>1</sup>. Infolge der Labilität einiger Ketosäuren kommen die zur Trennung freier Säuren angewandten Methoden<sup>2,3</sup> nicht mehr stark in Frage, sondern die Ketosäuren werden zur Papierchromatographie in Abkömmlinge, üblicherweise in 2,4-Dinitrophenylhydrazone (DNP), umgewandelt. Als mobile Phasen werden entweder neutrale oder alkalische, alkoholhaltige Lösungsmittel angewendet<sup>4-7</sup>. Da die DNP-Abkömmlinge der Ketosäuren in zwei isomeren Formen auftreten können, die bei der Papierchromatographie als getrennte Flecken in Erscheinung treten, wirkt dies auf die Identifizierung der Verbindungen erschwerend. Einige Autoren haben aus den DNP-Abkömmlingen der Ketosäuren durch Hydrierung die entsprechenden Aminosäuren hergestellt und die so erhaltenen Aminosäuren identifiziert<sup>1</sup>.

In den der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurde die Entwicklung passender Lösungsmittelsysteme und Chromatographiermethoden für die dünnenschichtchromatographische Trennung der DNP-Abkömmlinge folgender Ketosäuren angestrebt:  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure,  $\alpha$ -Ketoisocaprinsäure,  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure,  $\alpha$ -Ketobuttersäure, Brenztraubensäure, Lävulinsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Oxallessigsäure.

*Material*

## EXPERIMENTELLES

$\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure wurde aus Isoleucin und  $\alpha$ -Ketoisocaprinsäure aus Leucin durch Oxydation dargestellt<sup>8</sup>. Die übrigen Ketosäuren wurden fertig bezogen und entsprachen dem geforderten Reinheitsgrad. Zur Herstellung der DNP-Abkömmlinge wurde zur wässrigen Lösung jeder Ketosäure 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (DN-Lösung) im Überschuss zugefügt; die DN-Lösung enthielt 2.5 g DN/1000 ml 2 N HCl. Nach der Reagenszugabe liess man bei Zimmertemperatur über Nacht stehen. Der DNP-Niederschlag wurde abfiltriert, mit 2 N HCl und Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxyd im Exsiccator getrocknet.

*Aufarbeitung des Materials*

Die Löslichkeit der DNP-Abkömmlinge der Ketosäuren in 2 N HCl ist derart gross, dass aus Lösungen mit nur kleinen Ketosäurekonzentrationen überhaupt kein DNP-Niederschlag erhalten werden kann. Zur Isolierung der Hydrazone der Ketosäuren wurden diverse Extraktionsverfahren entwickelt<sup>9-11</sup>. Da in den meisten Fällen die

Extraktionsverfahren besonders bei der Untersuchung der Ketosäuren von Naturprodukten eingesetzt werden müssen, wurde der DNP-Niederschlag jeder Ketosäure mit den gleichen Lösungsmitteln und nach dem gleichen Verfahren behandelt wie bei der Extraktion<sup>11</sup>. Aus den so behandelten DNP-Niederschlägen wurden Lösungen hergestellt, bei denen als Lösungsmittel ein Gemisch von Dioxan (E. Merck, pro anal.) und 0.067 M Phosphatpufferlösung (pH 7.2) im Volumenverhältnis 1:1 diente. Die Konzentration der Lösungen betrug 5 mg DNP-Niederschlag/5 ml Lösungsmittel. ALTMANN *et al.*<sup>12</sup> haben als Lösungsmittel für die DNP-Abkömmlinge der Ketosäuren — beim Auftragen der Startflecken auf das Papier — 0.2 M Phosphatpufferlösung (pH 7.2) gebraucht. Nach ihren Beobachtungen verursachen organische Lösungsmittel einen Abbau der DNP-Abkömmlinge der Ketosäuren, insbesondere ein Decarboxylieren derselben. Da jedoch die DNP-Abkömmlinge einiger Ketosäuren in blosser Phosphatpufferlösung schwer löslich sind, wurde von uns als Lösungsmittel für die Niederschläge das vorgenannte Gemisch von Dioxan und Phosphatpufferlösung angewandt.

Bei den DNP-Abkömmlingen der Ketosäuren können auch durch pH-Änderungen, die das Extrahieren mit sich bringt, gewisse Komplikationen verursacht werden, so z.B. das Isomerisieren bestimmter Komponenten<sup>13</sup>. Aus diesem Grunde wurden für vergleichende Untersuchungen auch Lösungen von nicht mit den Extraktionslösungsmitteln behandelten DNP-Niederschlägen angefertigt; als deren Lösungsmittel kam das früher erwähnte Dioxan-Phosphatpuffer-Gemisch zur Anwendung.

#### *Die Dünnschichtmethode*

Die Glasplatte (20 × 20 cm) wird mit Kieselgel G (E. Merck, für Dünnschichtchromatographie nach Stahl) beschichtet. Zur Beschichtung werden 30 Kieselgel G in 65 ml Wasser suspendiert. Bei einigen Versuchen wurde an Stelle von Wasser eine Lösung verwendet, die 5 ml Propionsäure und 60 ml Wasser enthielt. Bei der Beschichtung der Platten wurden zwei verschiedene Schichtdicken gewählt. Die beschichteten Platten wurden während ca. 30 Min. bei 110–120° aktiviert. In einem Abstand von 11.5 cm vom unteren Plattenrand ritzten wir in die Kieselgelschicht eine Querlinie. Die zu untersuchenden Verbindungen wurden auf die noch heißen Platten aufgetragen, die Platten liess man darauf abkühlen und während ca. 30 Min. in einer geschlossenen, mobile Phase enthaltenden, Kammer sättigen; während dieser Zeit ruhten die Platten auf speziellen gläsernen Unterlagen. Wenn darauf die Kammer schräg gestellt wurde, kam die Platte mit der mobilen Phase in Berührung und man liess diese bis zur Querlinie aufsteigen. Die Laufdauer betrug zwischen 35 und 40 Min. Bei einigen Versuchen, auf deren Platten keine Querlinien gezogen worden waren, liess man die mobile Phase bis zum oberen Plattenrand aufsteigen, die Laufzeit betrug dann beinahe zwei Stunden.

#### *Lösungsmittelsysteme und Durchführung der Dünnschichtchromatographie*

Von den erprobten Lösungsmitteln wurde das Gemisch aus Petroläther (BDH, Sdp. 60–80°) und Äthylformiat (Fluka, puriss.) im Volumenverhältnis von 13:7 einer näheren Untersuchung unterworfen. Mit diesem Lösungsmittelgemisch liefen alle zu untersuchenden Komponenten, doch zeigte es sich, dass der Gehalt des verwendeten Äthylformiates an freier Säure bei verschiedenen Lieferungen unterschiedlich war

und dies somit die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse ungünstig beeinflusste. Als das Lösungsmittelgemisch zwecks Neutralisierung mit  $\text{NaHCO}_3$  geschüttelt wurde, hatte das zur Folge, dass die Komponenten überhaupt nicht mehr liefen. Das Lösungsmittel muss also freie Säure enthalten. Aus diesem Grunde wurde eine Versuchsserie angesetzt, bei der zu je 100 ml neutralisiertem Lösungsmittelgemisch vor der Dünnschichtchromatographie verschieden grosse Ameisensäuremengen (E. Merck, pro anal.) zugesetzt wurden. An Stelle von Ameisensäure nahmen wir auch Essigsäure (Fluka, puriss.), Buttersäure (Fluka, puriss.), Propionsäure (Fluka, puriss.) und Valeriansäure (Fluka, puriss.).

Da bei der Extraktion der Hydrazone oft kleine Mengen freies Dinitrophenylhydrazin mit extrahiert werden, wurde bei allen Dünnschichtentwicklungen als Vergleichssubstanz eine Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in einem Gemisch von Dioxan und Phosphatpuffer (pH 7.2) im Verhältnis 1:1 verwendet. Bei den fertigen Chromatogrammen wurden die zurückgelegten Laufstrecken der Hydrazon- und der Hydrazinflecken ausgemessen. In Tabelle I werden die Verhältnisse der Laufstrecken — berechnet in Bezug auf diejenige des 2,4-Dinitrophenylhydrazins — oder  $R_B$ -Werte dargestellt. Beim Auftreten von Isomeren wurde nur die dominierende Komponente für die Berechnung in Betracht gezogen. In die Tabelle I sind ebenfalls die verwendeten mobilen Phasen und die mit einem Cord-Meter an sechs verschiedenen Stellen der Platte gemessenen Mittelwerte der Schichtdicke aufgenommen. Die durchschnittliche Abweichung von der mittleren Schichtdicke war bei jeder einzelnen Platte kleiner als  $\pm 0.01$  mm, jedoch war der Unterschied in der Schichtdicke erheblich grösser in Bezug auf die nach gleicher Art hergestellten Platten untereinander, wie aus Tabelle I hervorgeht. Die Fig. 1 und 2 zeigen zwei Chromatogramme der Tabelle I.

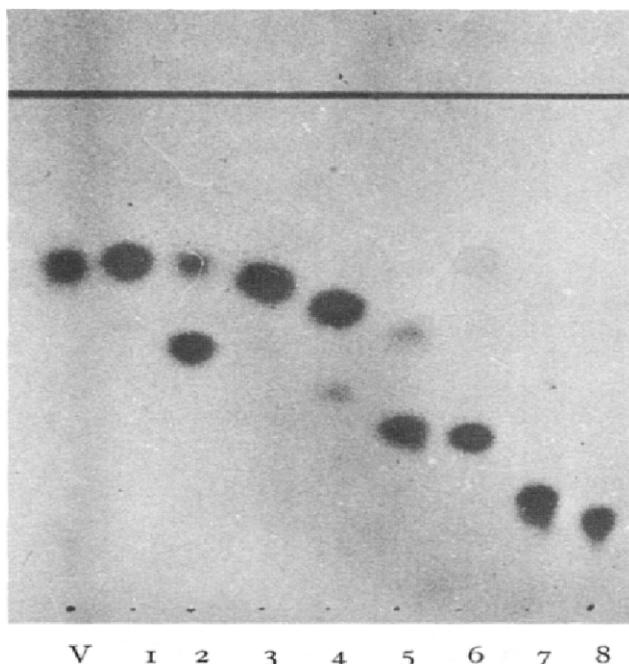


Fig. 1. Das mit Petroläther-Äthylformiat/Ameisensäure (100 ml/0.052 mol.) als mobile Phase von den DNP-Komponenten der Ketosäuren erhaltene Dünnschichtchromatogramm. Substanzmenge in den Startflecken 2  $\mu\text{g}$ . Komponenten: (1)  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure; (2)  $\alpha$ -Ketoisocaproensäure; (3)  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure; (4)  $\alpha$ -Ketobuttersäure; (5) Brenztraubensäure; (6) Lävulinsäure; (7)  $\alpha$ -Ketoglutarsäure; (8) Oxallessigsäure. V: 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

TABELLE I

$R_F$ -WERTE\* DER DNP-KOMPONENTEN DER KETOSÄUREN ERHALTEN BEI DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE MIT DER MOBILEN PHASE PETROLÄTHER-ÄTHYLFORMIAT/SÄURE

Komponenten: (1)  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure; (2)  $\alpha$ -Ketoisocaproonsäure; (3)  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure; (4)  $\alpha$ -Ketobuttersäure; (5) Brenztraubensäure; (6) Lävulinsäure; (7)  $\alpha$ -Ketoglutarsäure; (8) Oxalessigsäure. Die Bezeichnung † nach dem  $R_F$ -Wert besagt, dass der Flecken des schwächeren Isomers *oberhalb* des dominierenden Fleckens und die Bezeichnung +, dass der Flecken des schwächeren Isomers *unterhalb* des dominierenden Fleckens auftrat.

Lösungsmittel/Säure/Schichtdicke	$R_F$ -Werte							
	1	2	3	4	5	6	7	8
100 ml/0.013 mol. Ameisensäure	0.84	0.58†	0.74	0.64+	0.34†	0.31	0.07	0.03
100 ml/0.026 mol. Ameisensäure	0.95	0.64†	0.85	0.75+	0.39†	0.34	0.15	0.08
100 ml/0.052 mol. Ameisensäure	1.02	0.76†	0.95	0.88+	0.52†	0.50	0.32	0.25
100 ml/0.104 mol. Ameisensäure	1.00+	0.79†	0.95+	0.89+	0.55†	0.57	0.42	0.37
100 ml/0.026 mol. Essigsäure	0.51	0.49	0.43	0.34	0.24	0.43	0.03	0.01
100 ml/0.052 mol. Essigsäure	0.74	0.69†	0.65	0.56	0.41†	0.55	0.08	0.03
100 ml/0.103 mol. Essigsäure	0.83	0.81†	0.79	0.68+	0.51†	0.66	0.20	0.05
100 ml/0.206 mol. Essigsäure	0.93	0.89†	0.83	0.76+	0.57†	0.68	0.28	0.13
100 ml/0.026 mol. Propionsäure	0.26	0.30	0.20	0.15	0.13	0.36	0.02	0.01
100 ml/0.052 mol. Propionsäure	0.42	0.44	0.35	0.26	0.22	0.48	0.02	0.01
100 ml/0.104 mol. Propionsäure	0.70	0.67	0.57	0.44	0.30	0.58	0.06	0.02
100 ml/0.207 mol. Propionsäure	0.86	0.83†	0.75	0.66+	0.50†	0.71	0.18	0.04
100 ml/0.104 mol. Buttersäure	0.48	0.49	0.41	0.32	0.24	0.53	0.03	0.02
100 ml/0.208 mol. Buttersäure	0.85	0.77†	0.71	0.59	0.45†	0.65	0.07	0.04
100 ml/0.416 mol. Buttersäure	0.86	0.78†	0.75	0.64	0.44†	0.73	0.18	0.07
100 ml/0.104 mol. Valeriansäure	0.44	0.44	0.35	0.25	0.18	0.48	0.03	0.02
100 ml/0.208 mol. Valeriansäure	0.65	0.59†	0.55	0.45+	0.29†	0.61	0.06	0.02
100 ml/0.416 mol. Valeriansäure	0.64	0.68†	0.58	0.45+	0.34†	0.68	0.11	0.04

\*  $R_F$  = Laufstrecke des DNP-Fleckens der Ketosäure/Laufstrecke des Dinitrophenylhydrazinfleckens.

Bei den Dünnschichtchromatogrammen der Tabelle I wurde neben den einzelnen Komponenten immer auch ein Gemisch aller acht Komponenten gleichzeitig chromatographiert. Eine befriedigende Trennung konnte jedoch nicht erreicht werden. Aus diesem Grunde wurden Versuche angestellt, bei denen eine Änderung der Ad-

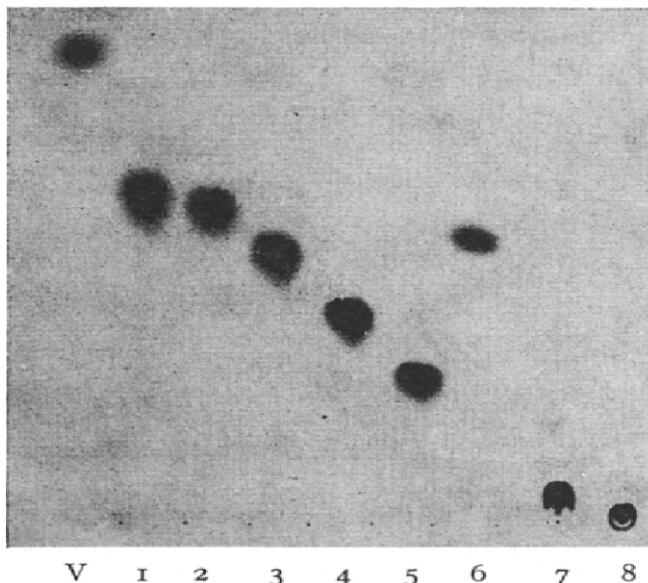


Fig. 2. Das mit Petroläther-Äthylformiat/Propionsäure (100 ml/0.104 mol.) als mobile Phase von den DNP-Komponenten der Ketosäuren erhaltene Dünnschichtchromatogramm. Substanzmenge in den Startflecken 2  $\mu$ g. Komponenten: (1)  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure; (2)  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure; (3)  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure; (4)  $\alpha$ -Ketobuttersäure; (5) Brenztraubensäure; (6) Lävulinsäure; (7)  $\alpha$ -Ketoglutarsäure; (8) Oxalessigsäure. V: 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

sorbtiions-Eigenschaften des Kieselgel G durch Veränderung der Schichtdicke und durch Zusatz von Säure zur Streichmasse angestrebt wurde. In Tabelle II werden die  $R_B$ -Werte der DNP-Komponenten der Ketosäuren — berechnet in Bezug auf das 2,4-Dinitrophenylhydrazin — der Versuche wiedergegeben, bei denen sowohl neutrale

TABELLE II

$R_B$ -WERTE\* DER DNP-KOMPONENTEN DER KETOSÄUREN ERHALTEN BEI DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE MIT PETROLÄTHER-ÄTHYLFORMIAT/PROPIONSÄURE (100 ml/0.104 mol.) ALS MOBILE PHASE UND MIT NEUTRALER, SOWIE SAURER STREICHMASSE BEI VERSCHIEDENEN SCHICHTDICKEN

Komponenten: (1)  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure; (2)  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure; (3)  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure; (4)  $\alpha$ -Ketobuttersäure; (5) Brenztraubensäure; (6) Lävulinsäure; (7)  $\alpha$ -Ketoglutarsäure; (8) Oxalessigsäure

Schichtdicke (mm)	Streichmasse	$R_B$ -Werte							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0.10	neutral	0.58	0.56	0.59	0.48	0.28	0.56	0.05	0.02
0.10	sauer	0.48	0.48	0.39	0.29	0.20	0.49	0.02	0.02
0.16	neutral	0.50	0.51	0.43	0.35	0.24	0.55	0.04	0.01
0.17	sauer	0.45	0.42	0.37	0.30	0.20	0.52	0.02	0.00

\*  $R_B$  = Laufstrecke des DNP-Fleckens der Ketosäure/Laufstrecke des Dinitrophenylhydrazinfleckens.

(65 ml Wasser/30 g Kieselgel G) als auch saure Streichmasse (60 ml Wasser/5 ml Propionsäure/30 g Kieselgel G) bei zwei verschiedenen Schichtdicken verwendet wurden. Die Schichtdicken wurden an sechs verschiedenen Stellen jeder Platte gemessen. Die in Tabelle II mitgeteilten Schichtdicken stellen Mittelwerte der Messungen dar. Der mittlere Fehler des Schichtdickenmittelwertes bei den dünneren Schichten war kleiner als  $\pm 0.01$  mm, bei den dickeren Schichten jedoch bewegte er sich in der Grössenordnung von  $\pm 0.01$  mm. Als mobile Phase wurde das beim Chromatogramm der Fig. 2 verwendete Lösungsmittelgemisch gebraucht, da dabei das Fehlen von Isomeren die Trennung vereinfacht. Es sei in diesem Zusammenhang bemerkt, dass das erwähnte Lösungsmittelgemisch auch zur Trennung einiger anderer DNP-Komponenten angewendet werden kann und man z.B. von den DNP-Abkömmlingen des Furfurals bei Anwendung dieses Lösungsmittels als mobile Phase bei der Dünnschichtchromatographie nur einen einzigen Flecken erhält, während sich mit einigen anderen Lösungsmitteln sowohl bei der Dünnschicht-, wie auch bei der Papierchromatographie zwei zueinander isomere Flecken ausbilden<sup>14</sup>.

Aus dem Gemisch der Komponenten 1–8 trennten sich die einzelnen Komponenten am besten bei der letzten Entwicklung der Tabelle II, bei der also die Schichtdicke vergrössert und die Streichmasse sauer war. Dabei liefen die Komponenten 1

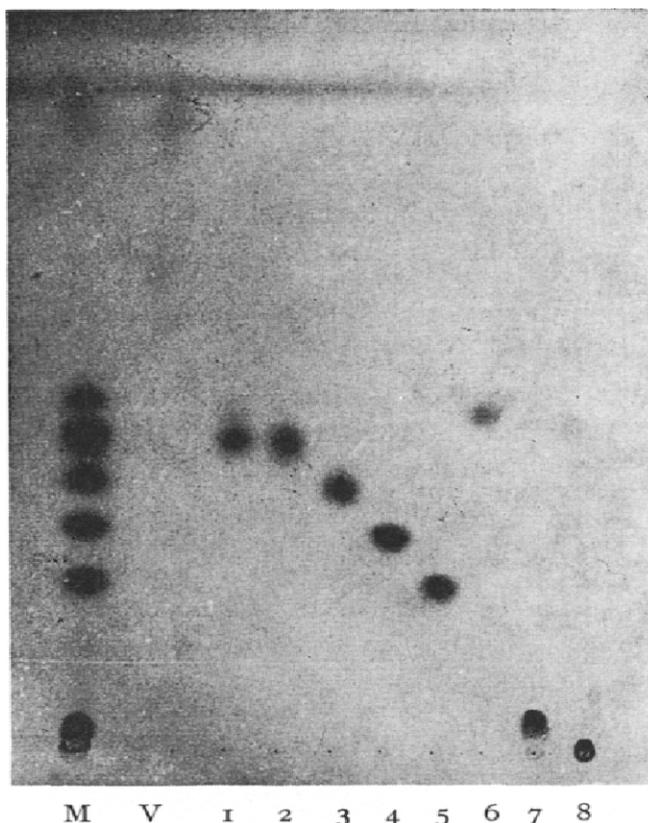


Fig. 3. Das mit Petroläther-Äthylformiat/Propionsäure (100 ml/0.104 mol.) als mobile Phase von den DNP-Komponenten der Ketosäuren erhaltene Dünnschichtchromatogramm. Die Substanzmenge jeder Komponente im Startflecken betrug  $1 \mu\text{g}$ , die Streichmasse war sauer und die Schichtdicke betrug  $0.17 \pm 0.01$  mm. Komponenten: (1)  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure; (2)  $\alpha$ -Ketoisocaproensäure; (3)  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure; (4)  $\alpha$ -Ketobuttersäure; (5) Brenztraubensäure; (6) Lävulinsäure; (7)  $\alpha$ -Ketoglutarsäure; (8) Oxallessigsäure. V: 2,4-Dinitrophenylhydrazin. M: Gemisch der Komponenten plus V.

und 2 gleichartig, jedoch trennte sich die einzige  $\gamma$ -Ketosäure des Gemisches, die Lävulinsäure, aus dem Gemisch als separater Flecken. Hingegen trennte sie sich bei den übrigen Entwicklungen der Tabelle II nicht als separater Flecken, obwohl auf Grund der  $R_B$ -Werte erwartet werden konnte, dass sie vor den anderen auch in der zweitletzten Entwicklung der Tabelle II laufen würde. Fig. 3 zeigt das der letzten Entwicklung der Tabelle II entsprechende Dünnschichtchromatogramm. Auf der Kieselgelschicht wurde keine Querlinie gezogen, sondern man liess das Lösungsmittel bis zum oberen Plattenrand aufsteigen.

*Über den Abbau der DNP-Komponenten der Ketosäuren in Dioxan-Phosphatpuffer-Lösung*

Bei den vorher beschriebenen Versuchen wurden die DNP-Niederschläge der Ketosäuren zuerst mit Extraktionslösungsmittel<sup>11</sup> behandelt und danach — zwecks Auftragung auf die Dünnschichtplatte — in einem 1:1-Gemisch von Dioxan und 0.067 M Phosphatpufferlösung (pH 7.2) aufgelöst. Wenn die Chromatographie mit frischen, höchstens während zwei Tagen bei Raumtemperatur gestandenen Lösungen der DNP-Niederschläge durchgeführt wurde, konnte einzig oberhalb des Lävulinsäureflecken ein sehr schwacher weiterer Flecken erkannt werden (in den Fig. 1 und 2 mit Kreisen markiert). Wenn der in Fig. 2 gezeigte Versuch mit Lösungen der DNP-Niederschläge, die während einer Woche bei Raumtemperatur gestanden hatten, wiederholt wurde, trat ein weiterer Flecken auch oberhalb des Oxalessigsäureflecken auf, wie aus Fig. 4 ersehen werden kann. Es tritt offenbar eine Zersetzung der genannten Substanzen ein.

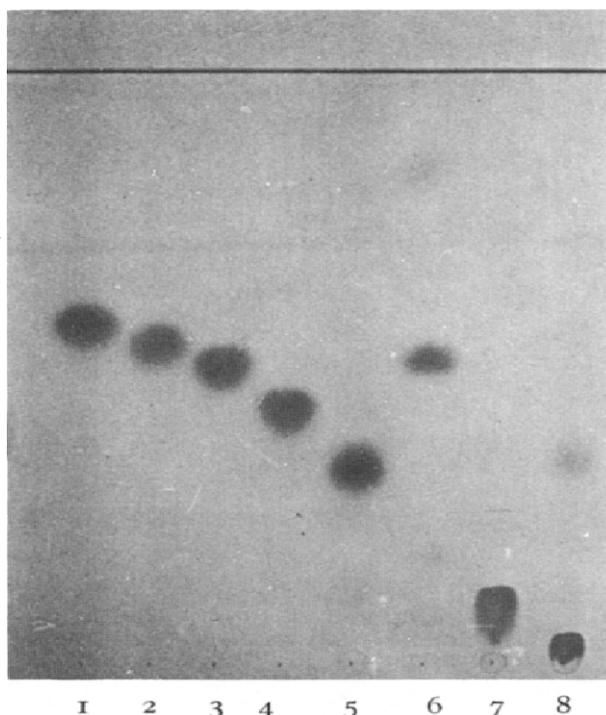


Fig. 4. Wiederholung des in Fig. 2 gezeigten Versuches, nachdem die Lösungen der DNP-Komponenten der Ketosäuren während einer Woche bei Raumtemperatur gestanden hatten. DNP-Komponenten der Ketosäuren: (1)  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure; (2)  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure; (3)  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure; (4)  $\alpha$ -Ketobuttersäure; (5) Brenztraubensäure; (6) Lävulinsäure; (7)  $\alpha$ -Ketoglutarsäure; (8) Oxalessigsäure.

Aus Fig. 4 kann ersehen werden, dass das sich aus dem DNP-Abkömmling der Oxalessigsäure gebildete Abbauprodukt auf gleiche Weise wandert, wie der DNP-Abkömmling der Brenztraubensäure. Die gleiche Beobachtung konnte auch bei anderen, in Tabelle I erwähnten mobilen Phasen gemacht werden. Es ist demnach offensichtlich, dass der DNP-Abkömmling der Oxalessigsäure in der Dioxan-Phosphatpuffer-Lösung langsam decarboxyliert. Als vergleichende Versuche mit solchen DNP-Niederschlägen der Ketosäuren angestellt wurden, die nach der Fällung nicht mit Extraktionslösungsmittel behandelt worden waren, und als Lösungsmittel zur Auftragung der Niederschläge auf die Platten wiederum ein Gemisch von Dioxan und Phosphatpuffer zur Anwendung kam, zeigten sich keine — auch nach Stehenlassen der Lösung — der aus Fig. 4 ersichtlichen Abbauprodukte der Komponenten. Dies weist darauf hin, dass der Grund für den Abbau bei der Extraktionsbehandlung gesucht werden muss.

#### BESPRECHUNG DER RESULTATE

Mit neutralisiertem Gemisch von Petroläther-Äthylformiat (13:7) als mobile Phase blieben die DNP-Komponenten der Ketosäuren am Startflecken. Art und Menge der der mobilen Phase zugesetzten Säuren beeinflusst sowohl die in Bezug auf das 2,4-Dinitrophenylhydrazin berechneten  $R_B$ -Werte wie auch die sich während der Entwicklung aus den Komponenten bildenden Flecken (Tabelle I). Mit der Zunahme der Säurekonzentration der mobilen Phase wachsen auch die  $R_B$ -Werte, bei gleicher molarer Konzentration aber wachsendem Molgewicht der Säuren vermindern sich jedoch die  $R_B$ -Werte (Tabelle I). Wenn die mobile Phase auch nur geringe Mengen an Ameisensäure enthält, trennen sich von den meisten Komponenten während der Entwicklung zwei aufeinanderfolgende Flecken ab — sie stellen zwei einander isomere Verbindungen dar (Tabelle I, Fig. 1). Wenn an Stelle von Ameisensäure deren höhere Homologen verwendet wurden, geschah bei geringen Säurekonzentrationen keine Abtrennung von Isomeren (Tabelle I, Fig. 2). Im Allgemeinen kann beobachtet werden, dass mit der Erhöhung der Säurekonzentration der mobilen Phase auch die Anzahl der Komponenten zunimmt, aus denen sich Isomere bilden. Demnach ist es möglich, dass die in der mobilen Phase enthaltene Säure, sofern deren Konzentration und Stärke ausreichend sind, im Verlaufe der Entwicklung eine Isomerisierung einzelner Komponenten verursacht. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Extraktionsbehandlung der DNP-Abkömmlinge mit der damit verbundenen pH-Änderung — wie einige Autoren beobachten konnten<sup>13</sup> — oder das bei der Auflösung der Niederschläge gebrauchte Lösungsmittel eine Isomerisierung der Komponenten verursachen kann. Bei bestimmten Komponenten wären dabei beide Isomere schon im Startflecken vorhanden, aber mit mobilen Phasen, durch welche die Isomere nicht getrennt werden, bliebe ihre Wanderungsgeschwindigkeit die gleiche. Von den Isomeren ist immer eine Komponente die dominierende. Die dominierende Komponente der Brenztraubensäure und der  $\alpha$ -Ketoisocaproensäure wandert langsamer, diejenige der  $\alpha$ -Ketobuttersäure,  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure und der  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure dagegen schneller als ihr Isomer (Tabelle I, Fig. 1).

Oberhalb des Lävulinsäurefleckens erscheint in den Fig. 1 und 2 ein sehr schwacher Flecken (in den Figuren mit Kreisen markiert). Da das Auftreten des Fleckens von der Art der mobilen Phase unabhängig ist, scheint nicht ein Flecken des Isomers, sondern der eines Abbauproduktes in Frage zu stehen. Wenn man die

Lösungen der DNP-Niederschläge bei Raumtemperatur während einer Woche stehen lässt, zeigt sich bei der Dünnschichtentwicklung ein Flecken eines Abbauproduktes ebenfalls oberhalb des Fleckens der Oxalessigsäure (Fig. 4). Dieses Abbauprodukt wandert bei der Dünnschichtentwicklung auf gleiche Weise wie der DNP-Abkömmling der Brenztraubensäure und wurde demnach als Folge der Decarboxylierung der Oxalessigsäure gebildet. Falls die DNP-Niederschläge der Ketosäuren nicht mit Extraktionslösungsmittel behandelt wurden und man zwecks Auftragung auf die Platte als Lösungsmittel für die Niederschläge, wie bei den anderen Versuchen, ein Gemisch von Dioxan und Phosphatpuffer anwendet, können bei der Dünnschichtentwicklung keine der vorher erwähnten Abbauprodukte festgestellt werden, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass die Extraktionsbehandlung auf den Abbau der DNP-Komponenten der Lävulin- und der Oxalessigsäure einen bestimmten Einfluss ausübt.

Eine Vergrößerung der Schichtdicke verkleinert den  $R_B$ -Wert aller Komponenten. Der  $R_B$ -Wert der einzigen  $\gamma$ -Ketosäure, der Lävulinsäure, verändert sich bei der Vergrößerung der Schichtdicke prozentual am wenigsten (Tabelle II). Falls der Streichmasse Propionsäure zugegeben wird, wirkt dieser Zusatz auf die  $R_B$ -Werte verkleinernd. Der Vorteil eines Zusatzes von Propionsäure zur Streichmasse und einer grösseren Schichtdicke besteht darin, dass die einzelnen Komponenten aus dem Gemisch besser getrennt werden (Fig. 3). Dabei wandern nur die DNP-Abkömmlinge der  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvaleriansäure und der  $\alpha$ -Ketoisocaproensäure zusammen, während die Trennung der anderen befriedigend verläuft.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Zur Trennung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von acht Ketosäuren wurde eine dünnschichtchromatographische Methode entwickelt. Bei Verwendung der mobilen Phase Petroläther-Äthylformiat/Monocarbonsäure nahmen die  $R_B$ -Werte der Komponenten — berechnet in Bezug auf das 2,4-Dinitrophenylhydrazin — zu, wenn die Säurekonzentration der mobilen Phase grösser, oder das Molekulargewicht der der mobilen Phase zugesetzten Säure kleiner wurde. Falls die mobile Phase auch nur in geringem Masse Ameisensäure enthielt, trennten sich bei einigen Komponenten im Verlaufe der Entwicklung zwei aufeinanderfolgende Isomerenflecken ab. Mit den höheren Homologen der Ameisensäure konnte bei geringen Säurekonzentrationen aus den Komponenten keine Abtrennung von Isomeren konstatiert werden. Bei Vergrößerung der Säurekonzentration der mobilen Phase nahm auch die Anzahl der Komponenten zu, die zwei Flecken lieferten. Als Folge der Extraktionsbehandlung der Niederschläge waren einige Komponenten in ihren Lösungen nicht stabil. Die Vergrößerung der Schichtdicke wie auch ein Zusatz von Säure zur Streichmasse haben ein Absinken der  $R_B$ -Werte zur Folge. Durch Ansäuern der Streichmasse und mit einer dickeren Schicht von Kieselgel G konnte die Trennung der einzelnen Komponenten aus dem Gemisch verbessert werden.

#### SUMMARY

A method of thin-layer chromatography was developed for the separation of the 2,4-dinitrophenylhydrazones of eight keto-acids. When petroleum ether-ethyl formate/

monocarboxylic acid was used as the solvent system higher  $R_B$  values of the components—measured with reference to 2,4-dinitrophenylhydrazine—were obtained with increasing acid concentration or with decreasing molecular weight of the acid in the solvent system. If the mobile phase contained even small amounts of formic acid, some of the compounds gave two successive spots due to isomers. With higher homologues of formic acid no separation of isomers could be observed when the acid concentration was low. When the concentration was raised, the number of components that gave two spots also increased. Owing to the extraction procedure to which the precipitates were subjected some of the compounds were not stable in solution. A thicker layer of Kieselgel G and also addition of acid to the adsorbent-water mixture before coating caused the  $R_B$  values to decrease. The separation of the individual keto-acids from the mixture could be improved by acidifying the spreading mixture and using a thicker layer.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> I. M. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. I, Veb Gustav Fischer Verlag, Jena, 1958, S. 255.
- <sup>2</sup> T. WIELAND UND E. FISCHER, *Naturwiss.*, 36 (1949) 219.
- <sup>3</sup> B. MAGASANIK UND H. E. UMBARGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 2308.
- <sup>4</sup> D. CAVALLINI, N. FRONTALI UND G. TOSCHI, *Nature*, 163 (1949) 586.
- <sup>5</sup> F. A. ISHERWOOD UND R. L. JONES, *Nature*, 175 (1955) 419.
- <sup>6</sup> M. F. S. EL HAWARY UND R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 340.
- <sup>7</sup> F. ZAPPI, *Ric. Sci.*, 23 (1953) 1432.
- <sup>8</sup> A. MEISTER, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 269; 197 (1952) 309.
- <sup>9</sup> H. KATSUKI, H. KANAYUKI, T. YOSHIDA, C. KAWANO UND S. TANAKA, *Anal. Biochem.*, 2 (1961) 421.
- <sup>10</sup> H. KATSUKI, T. KAWANO, H. KANAYUKI UND S. TANAKA, *Anal. Biochem.*, 2 (1961) 433.
- <sup>11</sup> A. C. HULME, *Advan. Appl. Microbiol.*, 3 (1961) 370.
- <sup>12</sup> S. M. ALTMANN, E. M. CROOK UND S. P. DATTA, *Biochem. J.*, 49 (1951) lxiii.
- <sup>13</sup> D. CAVALLINI UND N. FRONTALI, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 349.
- <sup>14</sup> P. RONKAINEN, T. SALO UND H. SUOMALAINEN, *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch.*, 117 (1962) 281.