

CHROM. 4150

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE DER α -KETOSÄUREN

HANS-JÜRGEN STAN UND JOSEF SCHORMÜLLER

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität, 1 Berlin 12 (B.R.D.)

(Eingegangen am 4. April 1969; geänderte Fassung am 29. April 1969)

SUMMARY

Thin-layer chromatography of α -keto acids

A method is described for the qualitative and quantitative estimation of α -keto acids as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by thin-layer chromatography on silica gel. The solvent system is composed of ethyl formate, petroleum ether, and glacial acetic acid. The method is suitable for the separation of six keto acids of biological interest, *viz.* oxaloacetic acid, α -ketoglutaric acid, glyoxylic acid, pyruvic acid, α -keto-butyric acid, and α -ketoisovaleric acid. The quantitative assay is carried out spectrophotometrically at 380 nm after elution of the separated substances from the thin-layer plates.

EINLEITUNG

Für die Untersuchung der α -Ketosäuren stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Eine Übersicht über die Analyse der Ketosäuren unter besonderer Berücksichtigung der chromatographischen Methoden gibt NEISH¹. In den letzten Jahren sind für einige biologisch besonders interessante α -Ketosäuren enzymatische Verfahren entwickelt worden². Diese gestatten häufig eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner α -Ketosäuren direkt im Extrakt des Untersuchungsmaterials. Für die Analyse von Ketosäuregemischen jedoch hat sich die Überführung der Ketosäuren in die 2,4-Dinitrophenylhydrazone und die anschließende Auftrennung mit Hilfe der Papierchromatographie oder Dünnschichtchromatographie bewährt³⁻¹². Die Dünnschichtchromatographie der DNP-Ketosäuren wurde zuerst von RONKAINEN⁴ auf mit niederen Fettsäuren imprägniertem Kieselgel G durchgeführt. Die beschriebenen dünnschichtchromatographischen Methoden lieferten dabei allerdings keine befriedigende Trennung der bei Stoffwechseluntersuchungen besonders interessierenden Oxalessig-, α -Ketoglutar-, Glyoxyl- und Brenztraubensäure. Lediglich eine kürzlich erschienene Arbeit berichtete über eine Trennung durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie¹². Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode, die eine Modifikation des von RONKAINEN⁴ angegebenen Systems darstellt.

Sie gestattet eine gute Trennung, Identifizierung und eine quantitative Bestimmung der genannten α -Ketosäuren durch Dünnschichtchromatographie in einer Richtung.

EXPERIMENTELLES

Material

Die verwendeten Ketosäuren und Äthylformiat (puriss.) wurden von Fluka, Aluminiumoxid von Woelm und die übrigen Chemikalien von Merck bezogen. Zur Dünnschichtchromatographie diente die Standardausrüstung von Desaga.

Herstellung der DNP-Ketosäuren

Als Reagenz dient eine frisch bereitete gesättigte Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 3%iger Perchlorsäure. Dazu wird 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 500 ml der Perchlorsäure 1–2 Std. intensiv geschüttelt und anschliessend der ungelöste Rückstand abfiltriert. Gleiche Volumina des neutralen Extraktes und des Reagenzes werden gemischt und 1 Std. bei Zimmertemperatur, anschliessend 16 Std. bei 3° gehalten. Danach wird die Lösung mehrmals mit kleinen Portionen Äthylacetat ausgeschüttelt, bis die wässrige Phase farblos zurückbleibt. Dabei werden die DNP-Ketosäuren, andere DNP-Carbonylverbindungen und überschüssiges Reagenz extrahiert. Die organische Phase wird nun mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und über Al_2O_3 chromatographiert (wie unten beschrieben) oder dreimal mit 10%iger NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, diese vorsichtig mit HCl angesäuert und mit Äthylacetat extrahiert. Die orangefarbene Lösung der DNP-Ketosäuren in Äthylacetat wird mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit einem definierten Volumen Äthylacetat gelöst und steht zur qualitativen und quantitativen Analyse zur Verfügung.

Reinigung der DNP-Ketosäuren

Zur Entfernung unvollständig abgetrennter neutraler DNP-Carbonylverbindungen und des überschüssigen Reagenzes von der Klasse der DNP-Ketosäuren hat sich das folgende Verfahren bewährt. Die Lösung der DNP-Derivate in Äthylacetat wird an einer mit Al_2O_3 (Aktivitätsstufe III nach Brockmann) gefüllten Säule chromatographiert. Dazu werden 10 g Al_2O_3 mit 0.6 ml dest. Wasser in einem verschlossenen Kolben solange geschüttelt, bis ein frei fließendes homogenes Pulver entstanden ist. Dieses wird in trockenem Äthylacetat suspendiert und in eine Säule von 1 cm Durchmesser gefüllt. Nach Aufgabe der Lösung wird mit Äthylacetat so lange eluiert, bis die erste geschlossene orangefarbene Zone, die das Reagenz und die neutralen DNP-Carbonylverbindungen enthält, vollständig aus der Säule ausgetreten ist. Die DNP-Ketosäuren bleiben als geschlossene Zone am oberen Säulenende fixiert. Anschliessend wird mit 20 ml 96%igem Äthanol nachgewaschen und dann die DNP-Ketosäuren mit 0.5%iger NaHCO_3 -Lösung eluiert.

Dünnschichtchromatographie der DNP-Ketosäuren

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Glasplatten (20 × 20 cm), die in üblicher Weise in einer Schichtdicke von 0.25 oder 0.5 mm mit Kieselgel G beschichtet waren, durchgeführt. Die Schicht wurde nicht durch Erhitzen aktiviert, sondern einfach an der Luft getrocknet. Als Laufmittel diente das Gemisch Äthylformiat–Petrol-

benzin (Sdp. 60–80°)–Eisessig (50:50:7). Die Chromatographie wird ohne Kammer-sättigung durchgeführt, nach 1 Std. hat die Laufmittelfront 16.5 cm zurückgelegt.

Quantitative Bestimmung der DNP-Ketosäuren

Zur quantitativen Bestimmung der DNP-Ketosäuren werden definierte Mengen der Äthylacetat-Lösung punktförmig oder als Band von dicht nebeneinander liegenden Punkten aufgetragen. Wir verwendeten dafür eine graduierte Hamilton-Spritze von 10 μ l Gesamtvolumen. Das Chromatogramm wird nach beendeter Entwicklung im kalten Luftstrom gut getrocknet; danach werden die einzelnen Flecken ausgeschabt, mit 3 ml 3%iger NaHCO_3 -Lösung gut durchgerührt und zentrifugiert. Die überstehende klare Lösung wird zur Extinktionsmessung mit dem Spektralphotometer bei 380 nm eingesetzt. Einen Leerwert gewinnt man in gleicher Weise aus substanzfreier Kieselgelschicht der gleichen Platte.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der quantitativen Bestimmung wurden Gemische von je 10 μ mol α -Ketoglutar-, Glyoxyl-, Brenztrauben-, α -Ketobutter- und α -Ketoisovaleriansäure in 50 ml gelöst und mit 50 ml Reagenz versetzt. Nach der Reinigung über die Al_2O_3 -Säule wurde der getrocknete Rückstand der DNP-Ketosäuren in 2.5 ml Äthylacetat aufgenommen und davon Startflecke von je 5, 10, 20, 30 und 40 μ l aufgetragen und wie oben angegeben quantitativ bestimmt.

Der mittlere Fehler der Einzelmessung* lag für die gesamte Analyse bei der Auswertung von vier parallelen Aufarbeitungen im Durchschnitt bei 4%. Der mittlere Fehler des Mittelwertes* dieser Bestimmungen lag im Durchschnitt bei 2%. Diese Fehlerabschätzungen gelten nicht für die quantitative Bestimmung der labileren DNP-Oxalessigsäure. Die Genauigkeit der eigentlichen dünn-schichtchromatographischen Methode (Auftragen mit der 10 μ l-Spritze, Chromatographie, Abkratzen der Flecke, Elution, spektrophotometrische Messung) ist wesentlich grösser wie aus Fig. 2 ersichtlich ist. Der durch Regressionsrechnung ermittelte Anstieg der in Fig. 2 dargestellten Geraden war mit einer Standardabweichung* von 0.25% behaftet.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Das in Fig. 1 dargestellte Chromatogramm zeigt eine gute Auftrennung der vier bei Stoffwechseluntersuchungen besonders interessierenden α -Ketosäuren Oxal-essig-, α -Ketoglutar-, Glyoxyl- und Brenztraubensäure. Diese vier DNP-Ketosäuren treten im Chromatogramm vorzugsweise als Einzelflecke auf. Die Unterdrückung der Auftrennung in Isomere in Abhängigkeit von der Konzentration und Art der Säure im Laufmittel diskutierte schon RONKAINEN⁴. Er fand, dass Essigsäure und Propion-säure die Auftrennung in zwei Flecke weniger begünstigen als Ameisensäure. Ab-hängig von den Aufarbeitungsbedingungen finden wir manchmal bei DNP-Glyoxyl-

* Der mittlere Fehler der Einzelmessung (die Standardabweichung) wurde nach der Formel

$$m = \pm \sqrt{\frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

der mittlere Fehler des Mittelwertes nach der Formel

$$m_M = \pm \sqrt{\frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n(n - 1)}} \text{ berechnet}^{13}.$$

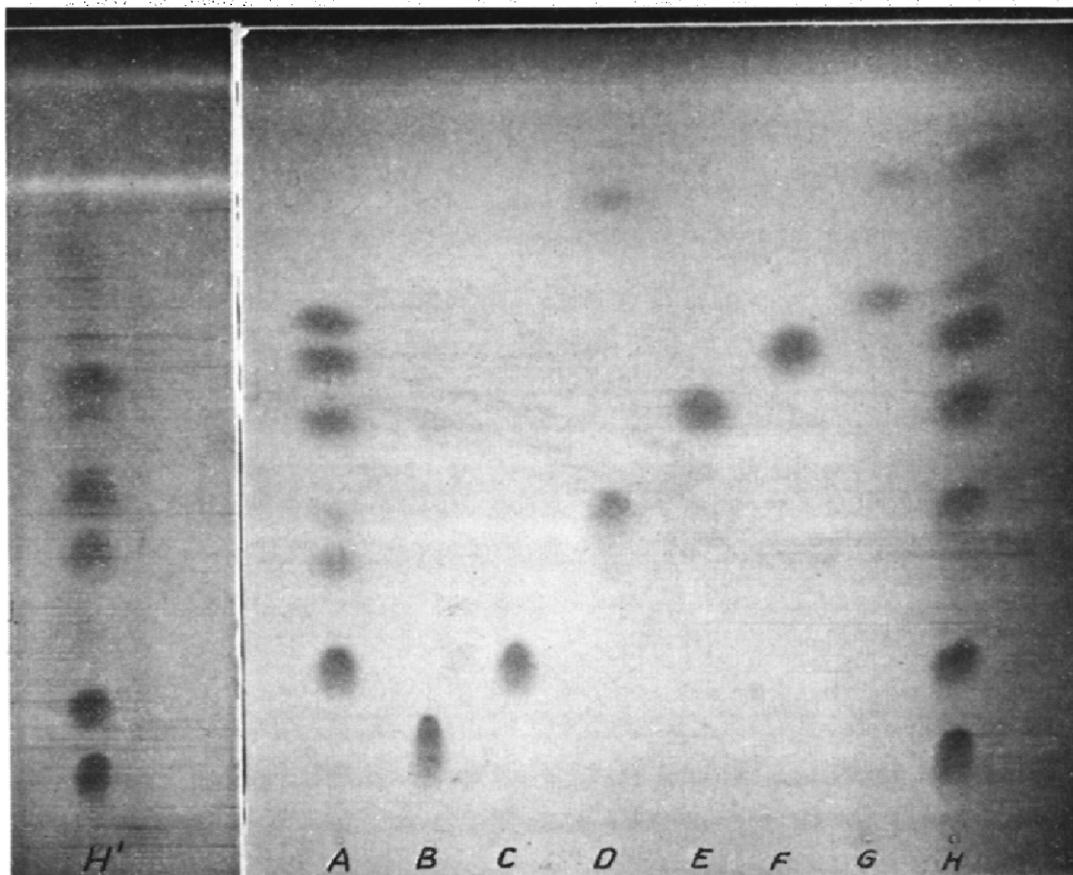


Fig. 1. Dünnschichtchromatographie der DNP-Ketosäuren auf Kieselgel G, Laufmittel: Petrolbenzin (Sdp. 60–80°)–Äthylformiat–Essigsäure (50:50:7) für die Substanzflecke A bis H (rechte Seite des Chromatogramms); Petrolbenzin (Sdp. 60–80°)–Äthylformiat–Essigsäure (65:35:7) für den Substanzfleck H' (linke Seite des Chromatogramms). Substanzen: je 10 μg Oxallessigsäure (B), α -Ketoglutar säure (C), Glyoxylsäure (D), Brenztraubensäure (E), α -Ketobuttersäure (F), α -Ketoisovaleriansäure (G). H und H' sind ein Gemisch aus B bis G. A ist ein Gemisch aus je 32 nmol C bis G, das über Al_2O_3 gereinigt und für die quantitativen Analysen verwendet wurde. Schicht: Kieselgel G (Merck), lufttrocken. Laufstrecke der Front: 16.7 cm.

säure und selten bei DNP-Brenztraubensäure Doppelflecke, die bei quantitativen Bestimmungen dann zusammengefasst werden. Diese möglicherweise auftretende Aufspaltung in zwei Isomere macht sich aber bei unserem System nicht störend bemerkbar, da die zusätzlich auftretenden Isomerenflecke in ihren R_F -Werten nicht mit anderen DNP-Ketosäuren interferieren. In Fig. 1A zeigt die DNP-Glyoxylsäure im über Al_2O_3 gereinigten Gemisch von fünf DNP-Ketosäuren eine Aufspaltung in zwei Flecke. Interessanterweise ist der Fleck des zusätzlich auftretenden Isomeren grösser als der der Ausgangssubstanz. Das könnte unter Umständen zu der Vermutung führen, dass es sich um eine andere DNP-Ketosäure als DNP-Glyoxylsäure handelt. Die einzigen uns bekannten DNP-Derivate, die ähnliche R_F -Werte wie DNP-Glyoxylsäure aufweisen, sind DNP-Phenylglyoxyl- und DNP-*p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure. Beide DNP-Ketosäuren liessen sich bei einer Laufstrecke von 32 cm (Dauer: 3.5 Std.) abtrennen. Eine Prüfung auf Abwesenheit dieser beiden Säuren ist spektrophotometrisch möglich, da die Absorptionsspektren der DNP-Glyoxylsäure und der beiden anderen DNP-Ketosäuren unterschiedlich sind. Alle DNP-Ketosäuren besitzen unter den angegebenen Versuchsbedingungen ein breites Absorptionsmaximum

TABELLE I

 R_F -WERTE DER DNP-KETOSÄUREN

Die Dünnschichtchromatographie wurde unter den bei Fig. 1 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

2,4-Dinitrophenylhydrazon der	R_F -Wert
Oxalessigsäure	0.12
α -Ketoglutarsäure	0.22
Glyoxylsäure	0.40
Brenztraubensäure	0.52
α -Ketobuttersäure	0.60
α -Ketoisovaleriansäure	0.66

bei 370–380 nm. Es empfiehlt sich daher zur Prüfung auf Reinheit der DNP-Glyoxylsäure nicht nur das Maximum der Extinktion zu suchen, sondern die Extinktion bei drei Wellenlängen zu messen. Wir ermittelten die Extinktion bei 360 nm, im Maximum (370 nm für DNP-Glyoxylsäure, die beiden anderen Maxima lagen bei 380 und 386 nm) und bei 400 nm. Die Verhältniszahlen E_{360}/E_{\max} und E_{400}/E_{\max} erwiesen sich als zuverlässige Reinheitskriterien. Es sei darauf hingewiesen, dass DANCIS *et al.*³ eine quantitative Bestimmung der DNP-Brenztraubensäure und der verzweigt-kettigen α -Ketosäuren, die von Valin, Leucin und Isoleucin abgeleitet werden können, angegeben haben. Sie eluierten die DNP-Ketosäuren mit 0.1 N NaOH von der Kieselgelschicht und bestimmten die Absorptionsspektren in 0.5 N NaOH. Unter diesen Bedingungen wird das Proton vom Stickstoff der Hydrazongruppierung abgelöst und das Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen (440–450 nm) verschoben. Wir bestimmten die Extinktion dagegen in NaHCO_3 -Lösung; das Spektrum entspricht dem der 2,4-Dinitrophenylhydrazone im sauren und neutralen Bereich mit undissoziiertem Proton an der Hydrazongruppe.

Aus Tabelle I ist weiterhin zu ersehen, dass die höheren Homologen der DNP-Brenztraubensäure grössere R_F -Werte als die uns in erster Linie interessierenden vier

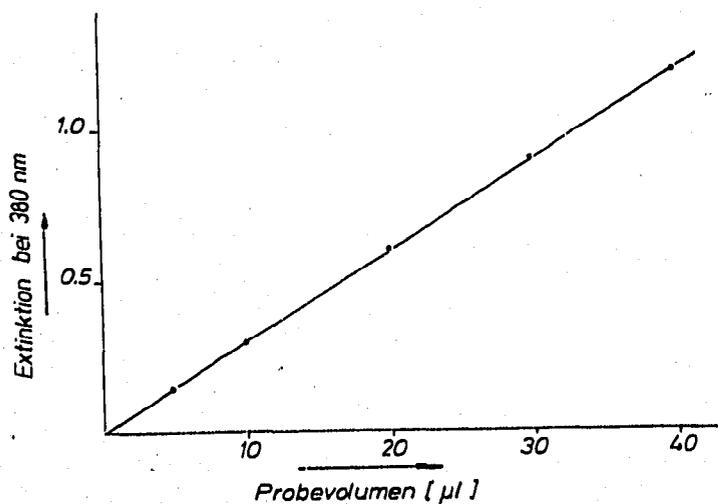


Fig. 2. Quantitative Analyse der Dünnschichtchromatographie von DNP-Ketosäuren. Es wurden die angegebenen Volumina des Gemisches A (Fig. 1) auf die Kieselgelschicht aufgetragen. Nach der Entwicklung wurde jeweils die DNP-Ketoglutarsäure mit 3% NaHCO_3 eluiert und die Extinktion bei 380 nm bestimmt. Das Gemisch enthielt von jeder DNP-Ketosäure 4 nmol/ μl .

Ketosäuren besitzen. In unserem System ist auch die Trennung von α -Ketobutter- und α -Ketovaleriansäure gut; α -Ketovalerian- und α -Ketoisovaleriansäure ergeben allerdings einen gemeinsamen Fleck. In biologischem Material ist ausserdem die Anwesenheit von Lävulinsäure zu berücksichtigen. Die DNP-Lävulinsäure besitzt einen dem Reagenz ähnlichen R_F -Wert und interferiert daher nicht mit den DNP- α -Ketosäuren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, das angegebene Laufmittelsystem durch Veränderung des Volumenverhältnisses von Äthylformiat zu Petrolbenzin bei konstantem Essigsäureanteil an spezielle Trennaufgaben anzupassen. Wir erhielten bei allen Variationen bis zu einem Verhältnis Petrolbenzin-Äthylformiat (70:30) Chromatogramme von guter Qualität, wie beispielsweise in Fig. 1 (H') zu sehen ist.

Das breite Absorptionsmaximum der DNP-Ketosäuren bei 370–380 nm gestattet auch die Verwendung eines Filterphotometers mit den Hg-Linien bei 366 oder 405 nm für die routinemässige quantitative Bestimmung der Ketosäuren. Die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung wird durch die Herstellung der DNP-Derivate und durch den Aufarbeitungsgang zur Abtrennung der Klasse der DNP-Ketosäuren begrenzt. Der entscheidende Faktor ist die Erreichung einer vollständigen Umsetzung der Ketosäuren mit dem Reagenz. Aus diesem Grund wählten wir die relativ langen Reaktionszeiten. In der Praxis empfiehlt es sich, bei unbekannter Zusammensetzung des Extraktes zwei Parallelproben mit einem unterschiedlich grossen Überschuss an Reagenz umzusetzen. Für die quantitative Bestimmung der labilen Oxalessigsäure verwendeten wir diese Methode nicht, sondern die leicht durchführbare enzymatische Bestimmungsmethode mit Hilfe von Malatdehydrogenase². Wir können deshalb keine Angaben über die Reproduzierbarkeit der dünnschichtchromatographischen Methode bei Oxalessigsäure machen. Dagegen war die Dünnschichtchromatographie gut geeignet für den Nachweis von Oxalessigsäure als Reaktionsprodukt der Pyruvatcarboxylase-Reaktion in zellfreien Extrakten aus *Penicillium camemberti*. Wir bestimmten dabei den Einbau von mit ¹⁴C markiertem CO₂ in Gegenwart von Brenztraubensäure, ATP, Mg²⁺ und zellfreiem Extrakt in die Oxalessigsäure. Der Nachweis der Radioaktivitätsverteilung auf dem entwickelten Chromatogramm erfolgte mit einem Dünnschichtscanner¹⁴.

Die Frage, ob sich eine Reinigung über Al₂O₃ empfiehlt, muss von Fall zu Fall entschieden werden. Sie ist im allgemeinen nicht notwendig, da das überschüssige Reagenz und die meisten neutralen DNP-Carbonylverbindungen, die bei der Extraktionsmethode mit in die Fraktion der DNP-Ketosäuren gelangen können, in dem angegebenen chromatographischen System grössere R_F -Werte als die DNP-Ketosäuren besitzen. Auf der anderen Seite erfordert die Chromatographie über Al₂O₃ nur einen unerheblich grösseren Zeitaufwand. Die gesamten neutralen DNP-Carbonylverbindungen und das überschüssige Reagenz werden abgetrennt. Bei einer Charge des Reagenzes trat bei uns ein unbekannter Substanzfleck in der Nähe der DNP-Ketoglutarsäure auf; diese störende Substanz aus dem Reagenz liess sich über Al₂O₃ abtrennen.

Abschliessend sei noch darauf hingewiesen, dass die angegebene Methode auch auf handelsüblichen Fertigplatten gute Trennungen bei verlängerter Laufzeit liefert. In unserem Fall handelte es sich um DC-Karten SI F, Kieselgel mit Fluoreszenzindikator der Fa. Riedel-De Haen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von α -Ketosäuren durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel beschrieben. Die Methode eignet sich besonders gut zur Trennung und Identifizierung der in biologischem Material vorkommenden Oxalessig-, α -Ketoglutar-, Glyoxyl-, Brenztrauben-, α -Ketobutter- und α -Ketoisovaleriansäure. Das angegebene Laufmittel lässt sich durch Variation der Zusammensetzung an verschiedene Trennprobleme anpassen. Die quantitative Bestimmung erfolgt spektrophotometrisch bei 380 nm nach Elution der getrennten Substanzen von der Kieselgelschicht.

LITERATUR

- 1 W. J. P. NEISH, in D. GLICK (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Bd. V, Interscience, New York, 1957, S. 107.
- 2 H.-U. BERGMAYER (Herausgeber), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962.
- 3 J. DANCIS, J. HUTZLER UND M. LEVITZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 78 (1963) 85.
- 4 P. RONKAINEN, *J. Chromatog.*, 11 (1963) 228.
- 5 P. RONKAINEN, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 403.
- 6 A. E. WHITFIELD, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 401.
- 7 H. S. BACHELARD, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 8.
- 8 I. E. BUSH UND T. D. R. HOCKADAY, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 433.
- 9 D. CHIARI UND M. RÖHR, *Microchim. Acta*, (1967) 140.
- 10 P. RONKAINEN, *J. Chromatog.*, 28 (1967) 440.
- 11 P. RONKAINEN, *J. Chromatog.*, 28 (1967) 263.
- 12 H. H. BERLET, *Anal. Biochem.*, 22 (1968) 525.
- 13 K. DOERFFEL, *Beurteilung von Analyseverfahren und -Ergebnissen*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.
- 14 J. SCHORMÜLLER UND H.-J. STAN, *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch.*, im Druck.

J. Chromatog., 43 (1969) 103-109