

CHROM. 5306

TRENNUNG UND BESTIMMUNG BIOLOGISCH WICHTIGER  
 $\alpha$ -KETOCARBONSÄUREN

H. BAYZER

*Biologische Forschung\* der Österreichischen Stickstoffwerke AG., Linz/Donau (Österreich)*

(Eingegangen am 13. Januar 1971)

## SUMMARY

*Separation and determination of biologically important  $\alpha$ -keto acids*

A method for the separation and quantitative determination of  $\alpha$ -keto acids extracted from biological material is described. 2,4-Dinitrophenylhydrazones of the keto acids are separated from excess reagent and from DNPH-derivatives of neutral carbonyl compounds by thin-layer electrophoresis. For isolation of DNPH-keto acids two-dimensional separation by combination of thin-layer electrophoresis and chromatography on cellulose layers is recommended.

## EINLEITUNG

Von den verschiedenen Methoden, die zur Isolierung und Trennung von  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren zur Verfügung stehen<sup>1,2</sup>, wird am häufigsten die Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit nachfolgender papier- oder dünnschichtchromatographischer Auftrennung der gebildeten 2,4-Dinitrophenylhydrazone (DNPH) angewendet<sup>3-12</sup>. Die vor der chromatographischen Trennung meist notwendige Entfernung von überschüssigem 2,4-Dinitrophenylhydrazin und DNPH-Derivaten der in biologischem Material vorhandenen neutralen Carbonylverbindungen bildet dabei allerdings für die nachfolgende quantitative Bestimmung der DNPH-Ketosäuren eine Fehlerquelle, auf die später noch näher eingegangen werden wird. Schwierigkeiten ergeben sich oft auch daraus, dass die einzelnen  $\alpha$ -Ketosäuren in sehr unterschiedlichen Mengen nebeneinander vorkommen und aus diesem Grunde eindimensionale Chromatogramme in vielen Fällen keine zufriedenstellenden Auftrennungen geben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Ausarbeitung einer Methode, die wohl auf der Umsetzung der  $\alpha$ -Ketosäuren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin basiert, die jedoch die genannten Fehlerquellen und Schwierigkeiten ausschaltet. Im Zusammenhang mit Stoffwechseluntersuchungen an höheren Pflanzen galt dabei unser besonderes Interesse der quantitativen Erfassung von Glyoxylsäure, Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketoglutar Säure und Oxalessigsäure.

\* Leiter: Doz. Dr. H. H. MAYR.

TRENNUNG DER  $\alpha$ -KETOCARBONSÄUREN ALS 2,4-DINITROPHENYLHYDRAZONE AUF CELLULOSESCHICHTEN

Von den verschiedenen für die Auftrennung der DNPH-Ketosäuren in Frage kommenden Trägermaterialien wählten wir für unsere Arbeiten Celluloseschichten aus. Glasplatten vom Format  $20 \times 20$  cm wurden mit Cellulose MN 300 der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren, mit einem Streichgerät auf die übliche Art und Weise beschichtet.

Die DNPH-Derivate der  $\alpha$ -Ketosäuren wurden nach Standardmethoden hergestellt<sup>4,6</sup>. Dabei ist zu beachten, dass die meisten DNPH-Ketosäuren in zwei *cis-trans*-isomeren Formen vorkommen, die sich ineinander umwandeln können<sup>1</sup> und die sowohl bei der dünn-schichtchromatographischen als auch der elektrophoretischen Auftrennung unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten zeigen. Beide Isomeren sind gelb gefärbt, lassen sich aber durch Farbreaktionen, die sie mit verschiedenen Reagentien geben, leicht identifizieren<sup>13</sup>. So zeigen nach dem Besprühen der Celluloseschicht mit einer gesättigten äthanolischen KOH-Lösung die *cis*-Isomeren eine bräunlichgelbe Färbung während die *trans*-Isomeren dunkelbraun gefärbt sind. Die Verwendung von gesättigter wässriger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung als Sprühreagens führt zu einer Rotfärbung der *trans*-Isomeren, die *cis*-Isomeren geben dagegen keine Farb-reaktion. Schliesslich bilden die *cis*-Isomeren einen roten Nickelkomplex, wenn man sie mit 70%-Äthanol aus der Celluloseschicht eluiert, die äthanolische Lösung in einem kleinen Proberöhrchen mit etwas Zinkstaub versetzt und nachdem man einige Sekunden geschüttelt hat, einen Tropfen 5%ige wässrige  $\text{NiCl}_2$ -Lösung zusetzt. Für diese Nachweisreaktion sind allerdings mindestens  $5 \mu\text{g}$  eines *cis*-Isomeren notwendig. *trans*-Isomere geben mit Nickelchlorid keine Reaktion.

*Dünn-schichtchromatographische Trennung*

Von den zahlreichen verwendeten Fließmitteln erwies sich für die dünn-schichtchromatographische Auftrennung der DNPH-Ketosäuren auf Celluloseschichten das schon bei der papierchromatographischen Trennung dieser Verbindungen<sup>4</sup> bewährte System *n*-Butanol-Äthanol-0.5 *N* Ammoniak (7:1:2) als am besten geeignet. Während die DNPH- $\alpha$ -Ketoglutar-säure als einheitlicher Spot wandert, trennen sich die DNPH-Derivate von Glyoxylsäure, Brenztraubensäure und Oxalessig-säure in die beiden isomeren Formen auf (Fig. 1). Gemische, die ungefähr gleiche Mengen der verschiedenen Ketosäuren enthalten, lassen sich in dem genannten Fließ-mittel vollkommen in ihre Komponenten auftrennen, wobei noch etwa  $0.2 \mu\text{g}$  der einzelnen DNPH-Ketosäuren durch ihre gelbe Eigenfarbe erkennbar sind und sich noch  $0.1 \mu\text{g}$  nach Besprühen der Celluloseschicht mit gesättigter äthanolischer KOH-Lösung nachweisen lassen. Die Trenndauer beträgt etwa 4 Std.

*Dünn-schichtelektrophoretische Trennung*

Für die elektrophoretische Trennung der DNPH-Ketosäuren auf Cellulose-schichten ist die Verwendung einer Elektrophoreseapparatur zu empfehlen, die eine kühlbare Auflagefläche für das Trägermaterial besitzt und das Anlegen von Span-nungen bis etwa 1000 V gestattet. Die besten Trennergebnisse wurden mit einer Pufferlösung pH 6.2 erzielt, die sich aus Pyridin-Eisessig-Wasser (10:1:89) zusam-mensetzt. Die DNPH-Ketosäuren wandern von der Kathode zur Anode und die

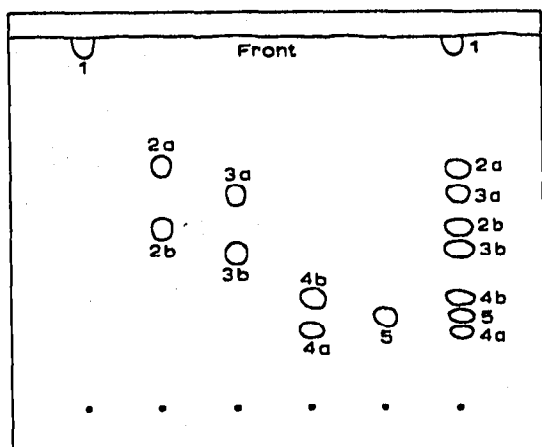


Fig. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung von DNPH-Ketosäuren auf Celluloseschichten in *n*-Butanol-Äthanol-0.5 *N* Ammoniak (7:1:2). 1 = 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 2a = *cis*-DNPH-Brenztraubensäure, 2b = *trans*-DNPH-Brenztraubensäure, 3a = *cis*-DNPH-Glyoxylsäure, 3b = *trans*-DNPH-Glyoxylsäure, 4a = *cis*-DNPH-Oxalessigsäure, 4b = *trans*-DNPH-Oxalessigsäure, 5 = DNPH- $\alpha$ -Ketoglutarsäure.

Trenndauer beträgt bei einem Spannungsgefälle von 45–50 V/cm etwa 2 Std. Während sich unter diesen Bedingungen DNPH- $\alpha$ -Ketoglutarsäure und die beiden isomeren Formen der DNPH-Oxalessigsäure gut voneinander trennen lassen, zeigen sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Formen von DNPH-Brenztraubensäure und DNPH-Glyoxylsäure ungefähr die gleichen Wanderungsgeschwindigkeiten und man erhält dementsprechend keine oder nur sehr mangelhafte Auftrennungen zwischen diesen beiden Säuren (Fig. 2). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt man, wenn man an Stelle des Pyridinacetatpuffers pH 6.2 eine 0.05 *M* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung verwendet, doch ist nach unseren Erfahrungen der Pyridinacetatpuffer wegen der schärferen Abgrenzung der einzelnen Spots vorzuziehen.

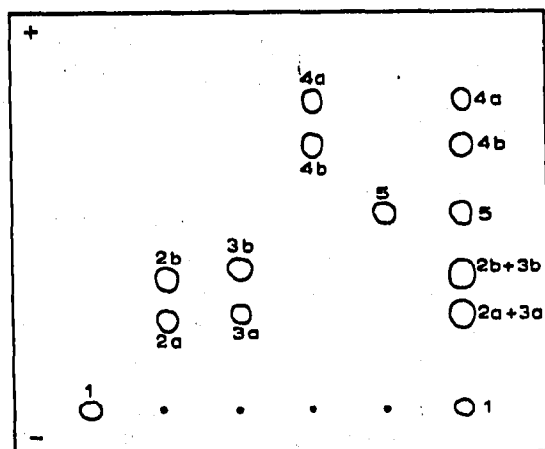


Fig. 2. Dünnschichtelektrophoretische Trennung von DNPH-Ketosäuren auf Celluloseschichten. Pyridin-Eisessig-Wasser (10:1:89), pH 6.2, 45 V/cm. 1 = 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 2a = *cis*-DNPH-Brenztraubensäure, 2b = *trans*-DNPH-Brenztraubensäure, 3a = *cis*-DNPH-Glyoxylsäure, 3b = *trans*-DNPH-Glyoxylsäure, 4a = *cis*-DNPH-Oxalessigsäure, 4b = *trans*-DNPH-Oxalessigsäure, 5 = DNPH- $\alpha$ -Ketoglutarsäure.

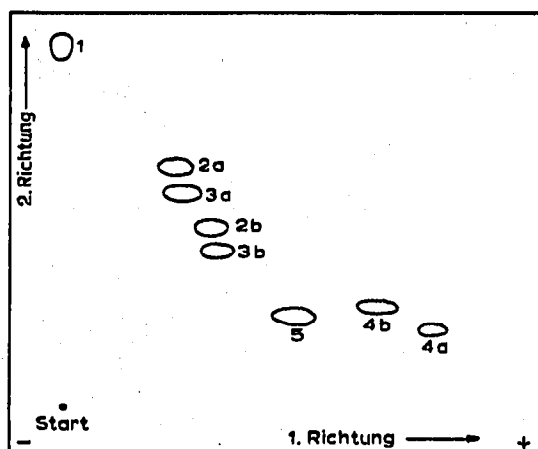


Fig. 3. Zweidimensionale Trennung von DNPH-Ketosäuren auf Celluloseschichten. 1. Richtung: Dünnschichtelektrophorese, Pyridin-Eisessig-Wasser (10:1:89), pH 6.2, 45 V/cm. 2. Richtung: Dünnschichtchromatographie in *n*-Butanol-Äthanol-0.5 *N* Ammoniak (7:1:2). 1 = 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 2a = *cis*-DNPH-Brenztraubensäure, 2b = *trans*-DNPH-Brenztraubensäure, 3a = *cis*-DNPH-Glyoxylsäure, 3b = *trans*-DNPH-Glyoxylsäure, 4a = *cis*-DNPH-Oxalessigsäure, 4b = *trans*-DNPH-Oxalessigsäure, 5 = DNPH- $\alpha$ -Ketoglutarensäure.

### Zweidimensionale Trennung

Für die Auftrennung von  $\alpha$ -Ketosäuregemischen, die sehr unterschiedliche Mengen der einzelnen Säuren enthalten, hat sich die zweidimensionale Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese auf Celluloseschichten sehr gut bewährt. Dabei ist es empfehlenswert, zuerst die elektrophoretische Trennung durchzuführen und dann die Chromatographie anzuschliessen, da man auf diese Art und Weise eine schärfere Auftrennung der DNPH-Ketosäuren erhält (Fig. 3). Für die zweidimensionale Trennung liegt die untere Nachweisgrenze bei etwa 1  $\mu$ g je Säure.

### QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER $\alpha$ -KETOCARBONSÄUREN IN BIOLOGISCHEM MATERIAL

Die Extraktion der  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren aus Pflanzenmaterial wurde nach ISHERWOOD UND NIAVIS<sup>14</sup> in der Kälte mittels 0.6 *M* Metaphosphorsäure vorgenommen. Nach dem Zentrifugieren wird der Extrakt 2 Std. lang bei 35° mit einer 0.2%-igen Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 *N* Salzsäure zur Reaktion gebracht, wobei der Reagensüberschuss bezogen auf die Gesamtmenge an vorhandenen Carbonylverbindungen etwa 50% betragen soll. Die Umsetzung verläuft unter diesen Bedingungen quantitativ. Hierauf wird das Reaktionsgemisch mehrmals mit kleinen Portionen Äthylacetat ausgeschüttelt. In die organische Phase gehen neben den DNPH-Ketosäuren auch die DNPH-Derivate der im biologischen Material vorhandenen neutralen Carbonylverbindungen sowie das überschüssige 2,4-Dinitrophenylhydrazin über.

Vor der weiteren Aufarbeitung werden die Äthylacetatextrakte eingengt. Die Mengenverhältnisse, in denen die einzelnen Ketosäuren sowie überschüssiges Reagens und andere Carbonylverbindungen darin vorkommen, lassen sich leicht durch ein Dünnschichtchromatogramm oder eine zweidimensionale Trennung mittels Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese feststellen. Danach richtet sich dann

die Art der Auftrennung für die quantitative Bestimmung. Sind keine grossen Konzentrationsunterschiede und wenig überschüssiges Reagens vorhanden, wird man vielfach mit einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung in Streifenform auskommen. In *n*-Butanol-Äthanol-0.5 *N* Ammoniak (7:1:2) wandert 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit der Front und stört in kleinen Mengen nicht. Da in biologischem Material die  $\alpha$ -Ketosäuren aber meist in sehr unterschiedlichen Mengen nebeneinander vorkommen und vielfach auch noch neutrale Carbonylverbindungen vorhanden sind, ist oft eine zweidimensionale Auftrennung der DNPH-Derivate mittels Dünnschichtelektrophorese und Dünnschichtchromatographie vorteilhafter, da sich die einzelnen Spots dann besser auftrennen und leichter zuordnen lassen.

Zur quantitativen Bestimmung der DNPH-Ketosäuren werden die gelb gefärbten Spots von der Platte geschabt, das Cellulosepulver mit 0.2 *M* NaHCO<sub>3</sub>-Lösung eluiert, die Aufschlämmung zentrifugiert und die überstehende klare Lösung, die 1–3  $\mu$ g Ketosäure pro ml enthalten soll, spektrophotometrisch vermessen. Das Absorptionsmaximum der DNPH- $\alpha$ -Ketocarbonsäuren liegt zwischen 370 und 380 nm. Die *cis*- und *trans*-Formen der einzelnen DNPH-Ketosäuren können gemeinsam eluiert und gemessen werden.

Ist der bei der Umsetzung der Carbonylverbindungen verwendete Überschuss an 2,4-Dinitrophenylhydrazin so gross, dass bei der Auftrennung der für die quantitative Bestimmung notwendigen Mengen von DNPH-Ketosäuren Störungen auftreten, muss zuerst eine Abtrennung der DNPH-Ketosäuren von nicht umgesetztem Reagens vorgenommen werden. Neben einer säulenchromatographischen Methode<sup>12</sup> sind hierfür in der Literatur verschiedene Ausschüttelungsoperationen beschrieben. Letztere haben nach unseren Erfahrungen jedoch alle den Nachteil, dass dabei mehr oder minder grosse Verluste an DNPH-Ketosäuren auftreten. Mit Hilfe der oben beschriebenen dünnschichtelektrophoretischen Trennung, bei der 2,4-Dinitrophenylhydrazin und neutrale DNPH-Verbindungen am Start bleiben, ist dagegen eine quantitative Entfernung der unerwünschten Begleitsubstanzen möglich ohne dass die Gefahr besteht, dass dabei DNPH-Ketosäuren verloren gehen. Es wird dazu auf eine Celluloseschicht eine entsprechende Menge der Äthylacetatlösung streifenförmig aufgetragen und unter Verwendung des Pyridinacetatpuffers pH 6.2 eine elektrophoretische Trennung durchgeführt. Die gelbe Eigenfarbe der DNPH-Verbindungen erlaubt ein direktes Verfolgen des Trennvorganges, sodass hierfür die ganze Plattenlänge ausgenützt werden kann. Die gelb gefärbten Zonen der DNPH-Ketosäuren werden von der Platte geschabt, mit 0.2 *M* NaHCO<sub>3</sub>-Lösung eluiert, das Eluat mit konz. Salzsäure versetzt bis kein CO<sub>2</sub> mehr entweicht und hierauf die DNPH-Ketosäuren mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die eingeeengte Äthylacetatlösung wird für die weiteren Auftrennungen verwendet.

Haben Oxalessigsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure bei der Elektrophorese bereits das andere Plattenende erreicht ehe noch zwischen dem *cis*-Isomeren der DNPH-Brenztraubensäure und dem überschüssigen 2,4-Dinitrophenylhydrazin eine Auftrennung stattgefunden hat, ist entweder der Reagensüberschuss sehr gross oder es wurde zuviel Äthylacetatlösung auf die Platte aufgetragen. Abhilfe bringt eine geringere Beladung der Platte oder die Kombination von Elektrophorese und Chromatographie zur Reagensabtrennung. Bei der Dünnschichtchromatographie erlaubt ein grosser Reagensüberschuss infolge Schwanzbildung keine saubere Abtrennung von Brenztraubensäure und Glyoxylsäure. Sehr gut abgetrennt werden dagegen  $\alpha$ -

Ketoglutarsäure und Oxalessigsäure, da sie relativ langsam wandern. Mann kann nun gleiche Mengen der Äthylacetatlösung auf zwei Platten streifenförmig auftragen, eine Platte in *n*-Butanol-Äthanol-0.5 *N* Ammoniak (7:1:2) chromatographisch auftrennen und daraus  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Oxalessigsäure mit 0.2 *M* NaHCO<sub>3</sub>-Lösung eluieren, während man mit der anderen Platte eine Elektrophorese in Pyridinacetatpuffer pH 6.2 durchführt,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure und Oxalessigsäure am positiven Pol auswandern lässt und dadurch eine scharfe Abtrennung von Brenztraubensäure und Glyoxylsäure erhält, die man aus dieser Platte eluiert. Nach Vereinigung der beiden NaHCO<sub>3</sub>-Lösungen und Ansäuern derselben, können die DNPH-Ketosäuren mit Äthylacetat ausgeschüttelt und wie oben beschrieben aufgetrennt und quantitativ bestimmt werden.

Zur Erstellung der Eichkurven für die spektrophotometrische Bestimmung werden die einzelnen Ketosäuren unter den oben angeführten Bedingungen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt, die DNPH-Ketosäuren mit Äthylacetat ausgeschüttelt, überschüssiges 2,4-Dinitrophenylhydrazin mittels Dünnschichtelektrophorese abgetrennt und die DNPH-Ketosäuren mit 0.2 *M* NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aus der Celluloseschicht eluiert und spektrophotometrisch vermessen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung biologisch wichtiger  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren beschrieben, die den unterschiedlichen Mengenverhältnissen, in denen diese Verbindungen nebeneinander vorkommen können, Rechnung trägt.

Die aus biologischem Material extrahierten  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren werden in ihre 2,4-Dinitrophenylhydrazone übergeführt, überschüssiges Reagens und DNPH-Derivate neutraler Carbonylverbindungen mittels Dünnschichtelektrophorese abgetrennt und die DNPH-Ketosäuren durch Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese zweidimensional auf einer Celluloseschicht aufgetrennt. Die quantitative Bestimmung der mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung eluierten DNPH-Ketosäuren erfolgt spektrophotometrisch.

#### LITERATUR

- 1 W. J. P. NEISH, in D. GLICK (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Band 5, Interscience, New York, 1957, S. 107.
- 2 G. SIEST, E. PANEK, S. CASTRO, A. BAGREL, L. LALLOZ, F. ROOS, M. PIERSON UND G. DEBRY, *Pharm. Biol.*, 5 (1968) 599.
- 3 D. CAVALLINI, N. FRONTALI UND G. TOSCHI, *Nature*, 163 (1949) 568.
- 4 M. F. S. EL HAWARY UND R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 340.
- 5 D. CAVALLINI UND N. FRONTALI, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 439.
- 6 P. RONKAINEN, *J. Chromatogr.*, 11 (1963) 228.
- 7 G. A. BYRNE, *J. Chromatogr.*, 20 (1965) 528.
- 8 H. S. BACHELARD, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 8.
- 9 P. RONKAINEN, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 263.
- 10 D. CHIARI UND M. RÖHR, *Microchim. Acta*, (1967) 140.
- 11 H. H. BERLET, *Anal. Biochem.*, 22 (1968) 525.
- 12 H.-J. STAN UND J. SCHORMÜLLER, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 103.
- 13 H. KATSUKI, T. YOSHIDA, C. TANEGASHIMA UND S. TANAKA, *Anal. Biochem.*, 24 (1968) 112.
- 14 F. A. ISHERWOOD UND C. A. NIAVIS, *Biochem. J.*, 64 (1956) 549.