

In analoger Weise wurde aus 8-Nitro-9-chlor-acridin<sup>1)</sup> das 8-Nitro-9-[( $\delta$ -diäthylamino- $\alpha$ -methyl-butyl)-amino]-acridin erhalten und als Dipikrat isoliert. Zers.-P. 245° (aus Aceton-Äthanol).



2-Methoxy-8-nitro-9-phenoxy-acridin: 1 g III wird mit 5 ccm frisch dest. Phenol 1 Stde. auf 110° erhitzt und das erkaltete Reaktionsgemisch in eine 10-proz. Natriumhydroxydlösung gegeben. Das sich dabei ausscheidende Reaktionsprodukt wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert. Schwach gelbe Nadeln, Schmp. 185°.



Entsprechend wurde aus 8-Nitro-9-chlor-acridin das 8-Nitro-9-phenoxy-acridin erhalten. Schmp. 214° (aus verd. Äthanol), schwach gelbe Nadeln.



2-Methoxy-8-nitro-9-amino-acridin: 1 g III wird in 5 ccm Phenol heiß gelöst, 0.2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  zugefügt, das Gemisch 1 Stde. auf 110° erhitzt und wie oben aufgearbeitet. Braunes, kristallines Pulver; Schmp. 295° (aus Äthanol).



Hydrochlorid, Schmp. über 300°.



In analoger Weise wurde aus 8-Nitro-9-chlor-acridin das Hydrochlorid des 8-Nitro-9-amino-acridins bereitet. Zers.-P. 292°.



BURCHARD FRANCK und JÜRGEN KNOKE\*)

## $\alpha$ -KETOSÄUREN IN PROTEINHYDROLYSATEN

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 26. Juli 1957)

Die Untersuchung von Proteinhydrolysaten auf  $\alpha$ -Ketosäuren ergab, daß weitere  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren außer Serin und Threonin als Proteinbausteine mengenmäßig auch dann nicht in Betracht kommen, wenn man deren Hydrolysenempfindlichkeit berücksichtigt. In den Hydrolysaten von Seidenfibroin, Zein, Gelatine, Casein, Blutalbumin und Eialbumin wurden nur Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketobuttersäure, die Umwandlungsprodukte von Serin und Threonin, nachgewiesen.

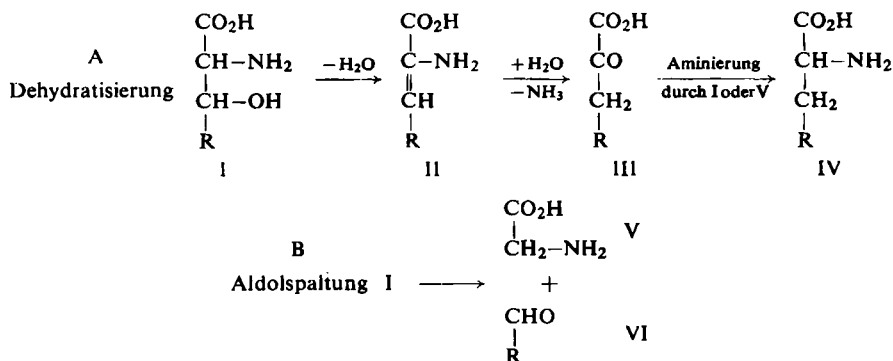
Unter den natürlichen Aminosäuren nehmen die Hydroxy-aminosäuren wegen ihres trifunktionellen Charakters und als Verknüpfungsstelle für Phosphorsäure<sup>1)</sup> eine wichtige Stellung ein. Von den 23 bisher in biologischem Material nachgewiesenen Hydroxy-aminosäuren wurden 5 aus Proteinen isoliert. An  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäu-

\*) Diplomarbeit Univ. Göttingen 1957.

<sup>1)</sup> C. RIMINGTON, Biochem. J. **21**, 1179 [1927]; F. A. LIPMANN und P. A. LEVENE, J. biol. Chemistry **98**, 109 [1932].

ren, die hydrolysenempfindlich sind, wurden in Proteinhydrolysaten bisher nur *Serin* und *Threonin* nachgewiesen. Zahlreiche Angaben über das Auftreten weiterer  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren, wie *Hydroxy-glutaminsäure*<sup>2)</sup>, *Hydroxy-asparaginsäure*<sup>3)</sup>, *Hydroxy-tryptophan*<sup>4)</sup>, *Hydroxy-valin*<sup>5)</sup> und *Hydroxy-leucin*<sup>6)</sup> ließen sich in der Folgezeit nicht bestätigen<sup>7-11)</sup>. Es erscheint bemerkenswert, daß das Auftreten von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren auf die beiden einfachsten Vertreter, Serin und Threonin, beschränkt sein soll, und man legt sich die Frage vor, ob nicht möglicherweise doch kompliziertere Vertreter dieses Verbindungstyps in Proteine eingebaut sind. Daß sie sich im Hydrolysat nicht nachweisen ließen, könnte auf ihre geringe Menge und Zersetzlichkeit bei der Hydrolyse zurückführbar sein.

Wie TH. WIELAND<sup>11)</sup> für den alkalischen und K. HEYNS<sup>12)</sup> für den sauren Bereich nachgewiesen haben, werden  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren bei der Proteinhydrolyse auf zwei verschiedenen Reaktionswegen abgebaut. Der Weg A, von einer Dehydratisierung eingeleitet, führt unter Abspaltung von Ammoniak zur  $\alpha$ -Ketosäure sowie zur hydroxylfreien Aminosäure gleicher Kettenlänge. Dabei könnte, wie wir im Falle des Threonins fanden, die Umwandlung in  $\alpha$ -Aminobuttersäure außer auf dem Weg I–IV auch als Reduktion durch den



nach Reaktionsweg B gebildeten Acetaldehyd erfolgen (vgl. Versuchsteil). Der Reaktionsweg B entspricht einer Aldolspaltung und führt zu Glycin und einem Aldehyd. Obwohl beide Reaktionen grundsätzlich nebeneinander ablaufen, hängt es doch von der Art des Restes R ab, ob A oder B bevorzugt ist. So tritt beim Threonin A gegenüber der Glycinbildung, verglichen

<sup>2)</sup> H. D. DAKIN, *Biochem. J.* **12**, 290 [1918]; *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **130**, 159 [1923].

<sup>3)</sup> Z. H. SKRAUP, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **42**, 274 [1904].

<sup>4)</sup> E. ABDERHALDEN und M. KEMPE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **52**, 207 [1907].

<sup>5)</sup> M. A. B. BRAZIER, *Biochem. J.* **24**, 1188 [1930]; E. J. CZARNETZKY und C. L. A. SCHMIDT, *J. biol. Chemistry* **92**, 453 [1931].

<sup>6)</sup> H. D. DAKIN, *J. biol. Chemistry* **154**, 549 [1944].

<sup>7)</sup> C. E. DENT und D. I. FOWLER, *Biochem. J.* **56**, 54 [1954]; H. BAILEY, A. C. CHIBNALL, M. W. REES und E. F. WILLIAMS, *Biochem. J.* **37**, 360 [1943].

<sup>8)</sup> E. ABDERHALDEN und H. SICKEL, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **138**, 108 [1924]; **144**, 80 [1925].

<sup>9)</sup> E. ABDERHALDEN und K. HEYNS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **229**, 236 [1934].

<sup>10)</sup> E. ABDERHALDEN und K. HEYNS, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **67**, 530 [1934].

<sup>11)</sup> TH. WIELAND und L. WIRTH, *Chem. Ber.* **82**, 468 [1949].

<sup>12)</sup> K. HEYNS und W. WALTER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **294**, 111 [1953].

mit Serin, zurück, während bei synthetischem  $\beta$ -Hydroxy-valin<sup>13)</sup> unter alkalischen Hydrolysenbedingungen nur Reaktion B und kein nach A gebildetes Valin nachgewiesen werden konnte. Serin und Threonin werden unter den Bedingungen normaler Proteinhydrolysen nur unvollständig gespalten und sind noch im Hydrolysat nachweisbar. Für kompliziertere  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren muß ein weitgehender Abbau in Betracht gezogen werden (Tab. 1).

Tab. 1. Zersetzung von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren bei der Hydrolyse

Hydroxy-aminosäure	Hydrolysenbedingungen Reagenz	Temp.	Zeit. Std.	Quantitativ bestimmte Reaktionsprodukte	Zer- setzungs- grad
Serin <sup>11)</sup>	Heißgesätt. Ba(OH) <sub>2</sub>	110°	15	Alanin, Glycin	95 %
Threonin <sup>14)</sup>	5 n NaOH	105°	24	$\alpha$ -Aminobuttersäure, Glycin	70 %
Threonin <sup>15)</sup>	13 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160°	3	$\alpha$ -Ketobuttersäure (Propionsäure)	23 %
Threonin <sup>15)</sup>	13 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160°	4.5	$\alpha$ -Ketobuttersäure (Propionsäure)	59 %
Threonin im Actinomycin C <sup>15)</sup>	13 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100°	3	$\alpha$ -Ketobuttersäure (Propionsäure)	5 %
Threonin im Actinomycin C <sup>15)</sup>	13 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160°	3	$\alpha$ -Ketobuttersäure (Propionsäure)	45 %
$\beta$ -Hydroxy- glutaminsäure <sup>16)</sup>	5.5 n HCl	110°	24	$\beta$ -Hydroxy-glutaminsäure (Ausgangsprod.)	44 %
$\beta$ -Hydroxy- glutaminsäure <sup>17)</sup>	6 n HCl	100°	10	Ammoniak	10 %
$\beta$ -Hydroxy- glutaminsäure <sup>17)</sup>	5 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100°	16.5	Ammoniak	13 %
$\beta$ -Hydroxy- glutaminsäure <sup>17)</sup>	5 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100°	31.5	Ammoniak	22 %
$\beta$ -Hydroxy- glutaminsäure <sup>17)</sup>	6 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	135°	9	Ammoniak	97 %

Es sollte jedoch möglich sein, die Existenz empfindlicher  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren dadurch nachzuweisen, daß man ein charakteristisches Abbauprodukt aus dem Hydrolysat isoliert, von dem aus sich die Konstitution der ursprünglich vorhandenen Hydroxy-aminosäure ableiten läßt. Für diesen Zweck kommt von den nach A und B gebildeten ninhydrinpositiven und ninhydrinnegativen Umwandlungsprodukten nur die  $\alpha$ -Ketosäure in Betracht, denn Glycin und die hydroxylfreie Aminosäure gleicher Kettenlänge können mit schon vorhandenen Bestandteilen des Hydrolysates identisch sein; Ammoniak ist unspezifisch, und Aldehyde lassen sich in Gegenwart von Aminosäuren nicht ohne weiteres nachweisen.

Während die ninhydrinpositiven Umwandlungsprodukte der  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren schon eingehend untersucht worden sind, liegen über die Bildung von  $\alpha$ -Ketosäuren unter Hydrolysenbedingungen erst wenige Angaben vor. F. BETTZICHE<sup>18)</sup> erhielt Brenztrauben-

<sup>13)</sup> TH. WIELAND, H. CORDS und E. KECK, Chem. Ber. **87**, 1312 [1954].

<sup>14)</sup> J. M. BREMNER, Nature [London] **168**, 518 [1951].

<sup>15)</sup> H. BROCKMANN und B. FRANCK, Naturwissenschaften **42**, 180 [1955].

<sup>16)</sup> B. NICOLET und L. SHINN, J. biol. Chemistry **142**, 609 [1942].

<sup>17)</sup> F. KNOOP, F. DITT, W. HECKSTEDEN, J. MAIER, W. MERZ und R. HÄRLE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **239**, 30 [1936].

<sup>18)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **150**, 177 [1925].

säure durch Einwirkung von 15-proz. Schwefelsäure auf Serin. Ferner hatte sich gezeigt, daß beim Erhitzen des Chromopeptides *Actinomycin C* mit verd. Schwefelsäure das darin enthaltene Threonin zu 45 % in  $\alpha$ -Ketobuttersäure bzw. deren Folgeprodukt Propionsäure übergeführt wird<sup>15)</sup> und daß die  $\alpha$ -Ketobuttersäure Urheber des nur in Hydrolysaten threoninhaltiger Peptide beobachteten Bouillon-Geruches ist<sup>19,20)</sup>. Über den Nachweis von  $\alpha$ -Ketosäuren bei der alkalischen Hydrolyse von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren war nichts bekannt.

Um durch Isolierung von  $\alpha$ -Ketosäuren aus den Hydrolysaten etwas über die in Proteinen enthaltenen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren aussagen zu können, war es notwendig, empfindliche Nachweisverfahren für  $\alpha$ -Ketosäuren zu haben, ferner Hydrolysenbedingungen ausfindig zu machen, die folgende Forderungen erfüllen:

1. Möglichst weitgehende Umwandlung der  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren in  $\alpha$ -Ketosäuren.
2. Geringe Zersetzung der  $\alpha$ -Ketosäuren.
3. Geringe Aminierung der  $\alpha$ -Ketosäuren.

#### NACHWEIS DER $\alpha$ -KETOSÄUREN

Die zu Vergleichszwecken benötigten  $\alpha$ -Ketosäuren (Tab. 2) wurden nach der Oxal-ester-Methode<sup>21)</sup> dargestellt. Eine quantitative Isolierung dieser  $\alpha$ -Ketosäuren aus den Hydrolysaten war, wie sich zeigte, nur durch Ätherextraktion möglich. Die Flüchtigkeit mit Wasserdampf war nur bei der  $\alpha$ -Ketoisocaprönsäure für ein Isolierungsverfahren ausreichend. Nachweis und Bestimmung der  $\alpha$ -Ketosäuren wurden papierchromatographisch nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt. Und zwar wurden die  $\alpha$ -Ketosäuren einmal als solche chromatographiert und auf dem Papier durch Umsetzung mit *o*-Phenylendiamin in die Chinoxalino-le übergeführt<sup>22)</sup>, die im UV-Licht intensiv gelbgrün fluoreszieren. Zweitens wurden sie durch Chromatographieren der 2.4-Dinitrophenylhydrazone auf gepuffertem Papier<sup>23)</sup> bestimmt. Als dritte, unabhängige Methode wurden die  $\alpha$ -Ketosäuren durch Umsetzung mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin und anschließende katalytische Hydrierung in Aminosäuren übergeführt<sup>24)</sup> und diese papierchromatographisch identifiziert. Das letztere Verfahren ist neben seiner größeren Empfindlichkeit der direkten Bestimmung von 2.4-Dinitrophenylhydrazonen deswegen überlegen, weil einige 2.4-Dinitrophenylhydrazone von  $\alpha$ -Ketosäuren im Chromatogramm zwei Zonen ausbilden, die der *cis*- bzw. *trans*-Form zuzuschreiben sind<sup>25)</sup>. Die untere Nachweisgrenze für  $\alpha$ -Ketosäuren beträgt bei den drei Verfahren 10, 20 bzw. 15  $\gamma$ .

#### BILDUNG DER $\alpha$ -KETOSÄUREN

Zur Ermittlung der für die Bildung von  $\alpha$ -Ketosäuren günstigsten Hydrolysenbedingungen wurden synthetische  $\alpha$ -Ketosäuren, Threonin, ein Threoninpeptid und

19) H. BROCKMANN und B. FRANCK, *Angew. Chem.* **67**, 303 [1955].

20) TH. WIELAND und H. WIEGANDT, *Angew. Chem.* **67**, 399 [1955].

21) F. ADICKES und G. ANDRESEN, *Liebigs Ann. Chem.* **555**, 41 [1944]; E. VOGEL und H. SCHINZ, *Helv. chim. Acta* **33**, 116 [1950].

22) TH. WIELAND und E. FISCHER, *Naturwissenschaften* **36**, 219 [1949].

23) S. M. ALTMANN, E. M. CROOK und S. P. DATTA, *Biochem. J.* **49**, LXIII [1951].

24) A. MEISTER und P. A. ABENDSCHEIN, *Analytic. Chem.* **28**, 171 [1956].

25) F. A. ISHERWOOD und D. H. CRUICKSHANK, *Nature [London]* **173**, 121 [1954]; F. A. ISHERWOOD und R. L. JONES, *Nature [London]* **175**, 419 [1955].

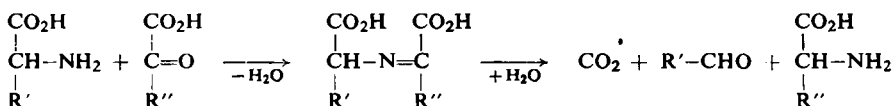
Eieralbumin sauren und alkalischen Hydrolysenbedingungen ausgesetzt. In den alkalischen Hydrolysaten ließen sich in keinem Fall  $\alpha$ -Ketosäuren nachweisen. Im sauren Bereich, beim Erhitzen mit 6 *n* HCl während 14 Stdn., waren die untersuchten  $\alpha$ -Ketosäuren bis 140° beständig. Oberhalb dieser Temperatur nahm deren Menge fortlaufend ab, bis schließlich im Hydrolysat von 170° praktisch keine  $\alpha$ -Ketosäuren mehr nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu erhöht sich die aus Threonin, Threoninpeptid und Protein gebildete Menge an  $\alpha$ -Ketosäure mit steigender Temperatur (Tab. 2). Unter Berücksichtigung dieser gegenläufigen Temperaturabhängigkeit von Bildung und Zersetzung der  $\alpha$ -Ketosäuren bei sauren Hydrolysenbedingungen war der Temperaturbereich von 140° für eine gute Ausbeute an  $\alpha$ -Ketosäuren optimal.

Tab. 2. Beständigkeit und Bildung von  $\alpha$ -Ketosäuren bei der sauren Hydrolyse mit 6 *n* HCl während 14 Stdn.

(Relative Mengenangaben nach dem Ergebnis vergleichbarer, papierchromatographischer Untersuchungen im Anschluß an die Hydrolyse: ++ = intensiv, + = noch erkennbar, — = nicht erkennbar)

Untersuchte Substanz	Hydrolysentemperatur				
	110°	130°	140°	150°	170°
$\alpha$ -Ketoglutar säure	++	++	++	+	—
Brenztraubensäure	++	++	++	+	—
$\alpha$ -Ketobuttersäure	++	++	++	+	—
$\alpha$ -Ketovaleriansäure	++	++	++	+	—
$\alpha$ -Ketoisocapro nsäure	++	++	++	++	+
Threonin		+	++	++	
Carbobenzoxy-threonyl- isoleucin-methylester	—	+	++	++	
Eieralbumin	—	+	+	+	

Außer Bildung und Zersetzung der  $\alpha$ -Ketosäuren war auch deren Aminierung zu berücksichtigen. Bei dieser Aminierung durch eine andere Aminosäure wird die Ausbeute an  $\alpha$ -Ketosäure verringert. Eine neue  $\alpha$ -Ketosäure entsteht nach R. M. HERBST<sup>26)</sup> nicht, weil die Aminosäure, die mit der  $\alpha$ -Ketosäure unter Umaminierung reagiert, dabei decarboxyliert:



Um den Grad der Umaminierung zu untersuchen, wurden in getrennten Ansätzen Glycin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Threonin und ein Threonylpeptid mit Brenztraubensäure in 6 *n* HCl 14 Stdn. auf 140° erhitzt. Anschließend ließ sich in allen Fällen noch Brenztraubensäure und nur eine geringe Menge des durch Umaminierung gebildeten Alanins nachweisen. Somit war gezeigt, daß unter den zur Umwandlung von  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino säuren in  $\alpha$ -Ketosäuren günstigsten Bedingungen der sauren Hydrolyse Aminierung von  $\alpha$ -Ketosäuren nur in geringem Maße eintritt. Bei der alkalischen Hydrolyse (40-proz. Ba(OH)<sub>2</sub>, 14 Stdn. 140°) dagegen zeigte ein mit Glycin und  $\alpha$ -Ketobuttersäure durchgeführter Versuch,

<sup>26)</sup> J. Amer. chem. Soc. **58**, 2239 [1936].

daß Umaminierung nahezu quantitativ eingetreten war<sup>27)</sup>. Die Aminierung der  $\alpha$ -Ketosäure verläuft im alkalischen Bereich also noch schneller als deren Zersetzung.

#### PROTEINHYDROLYSEN

Seidenfibroin, Zein, Gelatine, Casein, Blotalbumin und Eialbumin wurden unter den genannten Bedingungen hydrolysiert und die Hydrolysate auf  $\alpha$ -Ketosäuren untersucht. In allen Fällen konnten nur Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketobuttersäure nachgewiesen werden (Tab. 3), die aus Serin und Threonin entstanden sind. Beim Eialbumin wurde das Mengenverhältnis der beiden  $\alpha$ -Ketosäuren im Hydrolysat gravimetrisch und kolorimetrisch bestimmt. Es entspricht wegen der größeren Hydrolysenempfindlichkeit des Serins gegenüber Threonin nicht dem Mengenverhältnis der beiden  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren im Protein.

Tab. 3.  $\alpha$ -Ketosäuren im Hydrolysat verschiedener Proteine (6*n* HCl, 14 Std., 140°)

Protein	Serin	Threonin	$\alpha$ -Ketosäuren im Hydrolysat		
			Brenz- traubensäure	$\alpha$ -Keto- buttersäure	Sonstige $\alpha$ -Ketosäuren
Seidenfibroin	16.2 %	1.6 %	++	+	—
Zein	7.1 %	3.5 %	++	+	—
Gelatine	3.2 %	2.2 %	++	+	—
Casein	6.3 %	4.9 %	++	+	—
Blotalbumin	4.2 %	5.8 %	++	+	—
100 g Eialbumin	8.2 %	4.0 %	98.5 mg	7.3 mg	—

Das Gesamtergebnis dieser Befunde ist, daß in den untersuchten Proteinen die Menge an anderen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren außer Serin und Threonin nicht größer sein kann als höchstens 0.5 %. Bei dieser Angabe ist vorausgesetzt, daß sich die höheren  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren in etwa gleichem Umfang wie Serin und Threonin in beständige  $\alpha$ -Ketosäuren umwandeln. Da jedoch deren Zersetzlichkeit wahrscheinlich größer ist, wird die Grenze, bis zu der sich ihr Vorhandensein ausschließen läßt, vermutlich noch tiefer liegen als 0.5 %. Somit können, auch wenn man annimmt, daß die höheren  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren bei der Hydrolyse vollständig zersetzt werden, Hydroxy-glutaminsäure, Hydroxy-asparaginsäure, Hydroxy-tryptophan, Hydroxy-valin und Hydroxy-leucin als Proteinbausteine mengenmäßig keine Bedeutung haben. Über *Hydroxy-asparaginsäure* läßt sich keine Entscheidung treffen, weil die hieraus gebildete Oxalessigsäure unter sauren Hydrolysenbedingungen unbeständig ist.

Herrn Prof. Dr. H. BROCKMANN danken wir herzlich für wertvolle Anregungen.

<sup>27)</sup> Die Angabe von R. M. HERBST<sup>26)</sup>, wonach Umaminierung zwischen  $\alpha$ -Ketosäuren und  $\alpha$ -Aminosäuren durch Laugezusatz verhindert wird, muß somit korrigiert werden. Alkalische Bedingungen scheinen vielmehr besonders günstig für die Umaminierung zu sein (vgl. l. c.<sup>20)</sup>).

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Lösungsmittelsysteme zur Verteilungschromatographie auf Papier und an Cellulosepulver:*

1) Propionsäure, Wasser, n-Butanol, n-Dibutyläther 3:5:4:6; 2) tert. Amylalkohol, Äthanol, Wasser 5:1:4<sup>23)</sup>; 3) Boratpuffer  $p_H$  9.2, Butylacetat, tert. Amylalkohol 2:1:1; 4) n-Butanol, Essigsäure, Wasser 5:1:4.

*Modellsubstanzen:* Die  $\alpha$ -Ketosäuren wurden nach bekannten Verfahren<sup>21)</sup> dargestellt, durch fraktionierte Destillation bzw. Umkristallisieren gereinigt und zur Charakterisierung in die 2,4-Dinitrophenylhydrazone, sowie nach D. C. MORRISON<sup>28)</sup> in die Chinoxalinole übergeführt. Als Ausgangsmaterial für die Proteinhydrolysen wurden gereinigte Handelspräparate verwendet. Über die Darstellung des noch nicht beschriebenen Carbobenzoxy-threonyl-isoleucin-methylesters soll in anderem Zusammenhang<sup>29)</sup> berichtet werden.

### Papierchromatographische Bestimmung der $\alpha$ -Ketosäuren

a) *Freie  $\alpha$ -Ketosäuren:* Die freien  $\alpha$ -Ketosäuren wurden als 1-proz. wäßrige Lösung auf den Startkreis eines Ringpapierchromatogrammes (SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b) aufgetragen. Nach Entwickeln des Chromatogrammes mit Phasenpaar 1 wurden die  $\alpha$ -Ketosäuren nach TH. WIELAND und E. FISCHER<sup>22)</sup> durch Besprühen mit einer Lösung von 0.05 % *o*-Phenylendiamin in 10-proz. wäßriger Trichloressigsäure und 3 Min. Erhitzen auf 100° in Chinoxalinole übergeführt, die durch ihre intensive, gelbgrüne Fluoreszenz im UV-Licht sichtbar sind. Untere Nachweisgrenze 10 $\gamma$ . Die Erhitzungsdauer kann nach unseren Befunden auch überschritten werden. Die gelbgrüne Fluoreszenz der Zonen ist im Dunkeln 2 Tage, im Tageslicht nur wenige Stunden haltbar. Mit dem Phasenpaar 1 werden die langsam und die schnell laufenden  $\alpha$ -Ketosäuren gut voneinander getrennt (Tab. 4).

b) *2,4-Dinitrophenylhydrazone:* Die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der  $\alpha$ -Ketosäuren wurden eindimensional, absteigend auf Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b), das mit Boratpuffer  $p_H$  9.2 imprägniert war, chromatographiert (Phasenpaar 2, 40 Stdn. Laufzeit). Die Empfindlichkeit dieser Bestimmungsmethode läßt sich durch Auswertung im UV-Licht, wobei auch sehr schwache Zonen durch ihre hellbraune Fluoreszenz deutlich sichtbar werden, noch erhöhen. Untere Nachweisgrenze 15–20 $\gamma$  (Tab. 4).

Tab. 4. Papierchromatographische Bestimmung der  $\alpha$ -Ketosäuren

Ketosäure	Nachweismethode und $R_F$ -Werte	
	Freie $\alpha$ -Ketosäure *)	2,4-Dinitrophenylhydrazon der $\alpha$ -Ketosäure **)
$\alpha$ -Ketoglutar säure	0.36	0.10
Brenztraubensäure	0.43	0.41 und 0.62
$\alpha$ -Ketobuttersäure	0.64	0.71
$\alpha$ -Ketovaleriansäure	0.86	0.79
$\alpha$ -Ketoisocaproensäure	0.95	
Untere Nachweisgrenze	10 $\gamma$	20 $\gamma$

\*) Ringpapierchromatogramm, Phasenpaar 1.

\*\*) Absteigendes Chromatogramm, Phasenpaar 2.

*Identifizierung der beiden Zonen des Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazons als cis- und trans-Form:* Auf die Startlinie eines Chromatogrammbogens (40  $\times$  50 cm) wurden 0.1 cm 2-proz. methanol. Lösung von Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazon aufgetragen und

<sup>28)</sup> J. Amer. chem. Soc. **76**, 4483 [1954].

<sup>29)</sup> H. BROCKMANN und B. FRANCK, unveröffentlicht.

in der beschriebenen Weise mit Phasenpaar 2 entwickelt. Anschließend schnitt man die getrennten Zonen heraus, eluierte jeweils mit 10 ccm 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung — wobei die Temperatur der Lösung unterhalb von 20° gehalten wurde —, säuerte mit  $n$  HCl auf  $p_H$  3 an, extrahierte mit Chloroform-Äther 9:1, trocknete mit Natriumsulfat und zog das Lösungsmittel unter Wasserkühlung bei 15° i. Vak. ab. Die Rückstände der beiden Eluate wurden bei 20° i. Hochvak. getrocknet. Mengenverhältnis *trans*- zu *cis*-Form = 3:1. Die beiden Rückstände wurden nach der Isolierung sofort spektroskopisch untersucht. Sie stimmen in ihren Eigenschaften mit den von F. A. ISHERWOOD<sup>25)</sup> beschriebenen *cis*- und *trans*-Formen überein. *Fraktion I (cis-Form)*:  $R_F$  0.62, schwache Rotfärbung mit 1.5  $n$  NaOH,  $\lambda_{\max}$  378  $m\mu$  (Pufferlösung  $p_H$  8.6),  $\nu_{C=O}$  1739 und 1705  $cm^{-1}$  (KBr). *Fraktion II (trans-Form)*:  $R_F$  0.41, deutliche Rotfärbung mit 1.5  $n$  NaOH,  $\lambda_{\max}$  368  $m\mu$  (Pufferlösung  $p_H$  8.6),  $\nu_{C=O}$  1730  $cm^{-1}$  (KBr).

*Identifizierung von  $\alpha$ -Ketosäure-2.4-dinitrophenylhydrazonen durch katalytische Hydrierung*: Eine Suspension von 20 mg  $PtO_2$ -Katalysator (Degussa) in 10 ccm Wasser wurde in einem 50-ccm-Schüttelautoklaven vorhydriert (1 Stde., 5 at  $H_2$ -Druck), mit einer Lösung von je 10 mg der 2.4-Dinitrophenylhydrazone von Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketobuttersäure in 10 ccm Methanol versetzt und 16 Stdn. bei 20° unter demselben Wasserstoffdruck geschüttelt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. extrahierte man den Rückstand zur Abtrennung des entstandenen Triaminobenzols und von nicht umgesetztem 2.4-Dinitrophenylhydrazon mit 10 ccm Tetrachlorkohlenstoff, kochte ihn darauf mit 3 ccm absol. Methanol aus, dampfte den Methanolauszug ein und untersuchte ihn im Papierchromatogramm auf Aminosäuren (System 4). Es wurden Alanin und  $\alpha$ -Aminobuttersäure nachgewiesen. Untere Nachweisgrenze 15  $\gamma$ .

*Wasserdampfdestillation der  $\alpha$ -Ketosäuren*: Aus einer Lösung von je 100 mg  $\alpha$ -Ketoglutar-säure, Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketobuttersäure,  $\alpha$ -Ketovaleriansäure und  $\alpha$ -Ketoisocapron-säure in 6 ccm Wasser wurden unter mehrmaligem Nachgeben von Wasser insgesamt 25 ccm abdestilliert. Anschließend extrahierte man das Destillat sechsmal mit 25 ccm Äther und dampfte die Ätherauszüge ein. Die papierchromatographische Untersuchung des wäßrigen Destillationsrückstandes und des Rückstandes vom Ätherauszug ergab, daß alle  $\alpha$ -Ketosäuren mit Ausnahme der zu etwa 50 % übergegangenen  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure im Rückstand der Wasserdampfdestillation verblieben waren.

*Ätherextraktion der  $\alpha$ -Ketosäuren*: Eine Lösung von je 60 mg  $\alpha$ -Ketobuttersäure,  $\alpha$ -Ketoglutar-säure, Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketovaleriansäure und  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure in 6 ccm Wasser wurde sechsmal mit je 20 ccm Äther extrahiert. Nach dem Ergebnis einer papierchromatographischen Untersuchung der wäßrigen Phase und des Ätherauszuges befanden sich die  $\alpha$ -Ketoglutar-säure zu ca. 70 %, die anderen  $\alpha$ -Ketosäuren quantitativ in der ätherischen Phase.

#### *Beständigkeit und Bildung von $\alpha$ -Ketosäuren bei der Hydrolyse*

a) *Sauer*: In Reihenversuchen wurden Gemische der  $\alpha$ -Ketosäuren (je 50 mg), ferner Threonin (50 mg), Carbobenzoxymethionin-isoleucin-methylester (100 mg) und Eialbumin (1 g) mit je 5 ccm 6  $n$  HCl im Einschlußrohr mit Hilfe eines regelbaren, elektrischen Heizofens während 14 Stdn. auf 110°, 130°, 140°, 150° und 170° erhitzt. Nach beendeter Hydrolyse verdünnte man den Rohrinhalt mit demselben Volumen Wasser, extrahierte fünfmal mit 20 ccm Äther, dampfte den über Natriumsulfat getrockneten Ätherauszug ein und untersuchte den Rückstand papierchromatographisch auf  $\alpha$ -Ketosäuren (vgl. Tab. 2). Ein Teil der Substanzen wurde außerdem in gleicher Weise mit 20-proz. Schwefelsäure hydrolysiert. Bei diesen Versuchen zeigte sich kein Unterschied gegenüber der Salzsäure-Hydrolyse.

b) *Alkalisch*: Wie für die saure Hydrolyse beschrieben, wurden dieselben Substanzen mit 5 ccm einer heißgesättigten 40-proz. Bariumhydroxydlösung jeweils 14 Stdn. auf 140° erhitzt. Anschließend neutralisierte man den Rohrinhalt mit 2*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, säuerte nach Abfiltrieren des Bariumsulfates mit Salzsäure auf *p*<sub>H</sub> 1 an, extrahierte wie oben mit Äther und untersuchte den Rückstand papierchromatographisch auf  $\alpha$ -Ketosäuren (vgl. Tab. 2).

#### *Aminierung von $\alpha$ -Ketosäuren bei der Hydrolyse*

a) *Sauer*: In Reihenversuchen wurden je 50 mg Glycin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Leucin, Glutaminsäure und Asparaginsäure mit je 100 mg Brenztraubensäure und 1 ccm 6*n* HCl im Einschlußrohr 14 Stdn. auf 140° erhitzt. Anschließend verdünnte man das Hydrolysat mit 10 ccm Wasser, ätherte aus, untersuchte den Rückstand des Ätherauszuges papierchromatographisch auf  $\alpha$ -Ketosäuren und den der wäßrigen Phase auf Aminosäuren. In allen Versuchsansätzen ließ sich an  $\alpha$ -Ketosäuren nur Brenztraubensäure, an Aminosäuren neben den Ausgangsaminosäuren eine deutlich sichtbare Alanin-Zone und außerdem in allen Fällen eine schwache Zone noch ungeklärter Herkunft, die im *R<sub>F</sub>*-Wert etwa dem Glycin entspricht, nachweisen.

Eine Lösung von je 100 mg Glycin und  $\alpha$ -Ketobuttersäure in 1 ccm 6*n* HCl wurde im Einschlußrohr 14 Stdn. auf 140° erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde in der beschriebenen Weise aufgearbeitet und auf Aminosäuren, sowie auf  $\alpha$ -Ketosäuren untersucht. In den Papierchromatogrammen fand sich neben Glycin und  $\alpha$ -Ketobuttersäure eine schmale Zone der durch Umaminierung gebildeten  $\alpha$ -Aminobuttersäure.

b) *Alkalisch*: 100 mg Glycin und 100 mg  $\alpha$ -Ketobuttersäure wurden mit 1 ccm einer heißgesättigten 40-proz. Bariumhydroxydlösung 14 Stdn. auf 140° erhitzt. Die Aufarbeitung und Untersuchung auf  $\alpha$ -Ketosäuren wie auf Aminosäuren ergab, daß keine  $\alpha$ -Ketobuttersäure mehr vorhanden und daß nur noch eine schwache Glycin-Zone neben viel  $\alpha$ -Aminobuttersäure zu erkennen war.

*Reduktion von Threonin durch Acetaldehyd*: 50 mg Threonin, gelöst in 3 ccm Wasser, wurden mit 50 mg Acetaldehyd im Einschlußrohr 16 Stdn. auf 140° erhitzt, der Rohrinhalt eingedampft und der Rückstand auf Aminosäuren untersucht. Im Papierchromatogramm war neben Threonin eine Zone von  $\alpha$ -Aminobuttersäure zu erkennen.

#### *Hydrolyse verschiedener Proteine*

a) *Sauer*: In einer Reihe von Ansätzen wurden je 1 g Eialbumin, Seidenfibroin, Zein, Gelatine, Casein und Blutalbumin mit 5 ccm 6*n* HCl 14 Stdn. bei 140° hydrolysiert. Anschließend verdünnte man mit 10 ccm Wasser, extrahierte 5 mal mit 50 ccm Äther und dampfte die vereinigten, über Natriumsulfat getrockneten Ätherauszüge ein. Das Ergebnis der papierchromatographischen Untersuchung auf  $\alpha$ -Ketosäuren ist in Tab. 3 zusammengefaßt.

b) *Alkalisch*: In einer zweiten Versuchsreihe wurden je 1 g der genannten Proteine mit 5 ccm heißgesättigter, 40-proz. Bariumhydroxydlösung im Einschlußrohr 14 Stdn. auf 140° erhitzt. Nach der Aufarbeitung ließen sich in keinem der Ansätze  $\alpha$ -Ketosäuren nachweisen.

*Isolierung der  $\alpha$ -Ketosäuren aus dem Eialbumin-Hydrolysat*: Eine Suspension von 100 g gepulvertem Eialbumin in 270 ccm 6*n* HCl wurde in 4 dickwandigen Einschlußrohren (50 × 2 cm) 14 Stdn. auf 140° erhitzt. Den Rohrinhalt verdünnte man anschließend mit 200 ccm Wasser, extrahierte achtmal mit 400 ccm Äther, dampfte die vereinigten, getrockneten Ätherauszüge ein, nahm den gelb gefärbten, öligen Rückstand in 10 ccm Wasser auf, trennte ungelöste, schleimige Anteile durch Filtrieren ab, erhitze das Filtrat nach Zusatz einer Lösung von 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 20 ccm *n* HCl 1 Min. zum Sieden, saugte das auskristallisierte, zitronengelbe 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Gemisch nach 3 Stdn. ab,

wusch mit Wasser nach und trocknete i. Vak. über KOH. 422 mg Ausbeute. Das Gemisch zeigte im absteigenden Papierchromatogramm mit Phasenpaar 2 die beiden Zonen von *cis*- und *trans*-Brenztraubensäure-2.4-dinitrophenylhydrazon und eine schwächere Zone des 2.4-Dinitrophenylhydrazons von  $\alpha$ -Ketobuttersäure. Im Papierchromatogramm der nach katalytischer Hydrierung erhaltenen Aminosäuren waren Alanin und  $\alpha$ -Aminobuttersäure zu erkennen.

*Quantitative kolorimetrische Bestimmung der  $\alpha$ -Ketosäure-2.4-dinitrophenylhydrazone aus Eialbumin-Hydrolysat nach papierchromatographischer Trennung:* In einem Vorversuch wurde ermittelt, daß Lösungen von 4–40  $\gamma$  der synthetischen 2.4-Dinitrophenylhydrazone von Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketobuttersäure in 5 ccm Boratpufferlösung  $p_H$  8.6 bei 400  $m\mu$  und 15 mm Schichtdicke im Photometer „Eppendorf“ gut meßbare Extinktionen ergaben. Dann trug man zur Aufstellung der Eichkurve auf die Startlinie eines gepufferten Chromatographiepapiers mit einer Mikropipette 40, 20, 10 und 4 cmm einer Lösung von 3.5 mg Brenztraubensäure-2.4-dinitrophenylhydrazon an vier Punkten auf, tat dasselbe mit 35, 21, 10 und 5 cmm einer Lösung von 2.8 mg  $\alpha$ -Ketobuttersäure-2.4-dinitrophenylhydrazon in 1 ccm Methanol und chromatographierte absteigend mit Phasenpaar 2. Die herausgeschnittenen Flecken eluierte man mit Pufferlösung  $p_H$  8.6, füllte die Eluate auf 5 ccm auf und bestimmte deren Extinktion als Differenz gegenüber dem Eluat eines reinen Papierschnittzels gleicher Flächengröße. In Abhängigkeit von der chromatographierten Substanzmenge in ein Diagramm eingetragen, ergaben die Extinktionsdifferenzen eine lineare Eichkurve. An vier Punkten der Startlinie eines absteigenden Papierchromatogrammes wurden nun je 40 cmm einer Lösung von 3.5 mg/1 ccm Methanol des aus Eialbumin-Hydrolysat isolierten rohen 2.4-Dinitrophenylhydrazon-Gemisches aufgetragen. Nach Entwickeln mit Phasenpaar 2 schnitt man die getrennten Zonen heraus und bestimmte wie oben die Extinktion der Eluate. Mittelwert der vier Bestimmungen: 71.5 % Brenztraubensäure-2.4-dinitrophenylhydrazon, 4.8 %  $\alpha$ -Ketobuttersäure-2.4-dinitrophenylhydrazon.

*Trennung des Gemisches der 2.4-Dinitrophenylhydrazone aus dem Eialbumin-Hydrolysat an der Cellulosesäule:* Auf eine Cellulosesäule, die durch Einschlämmen von 100 g Cellulosepulver (Schleicher & Schüll Nr. 123) mit der Unterphase des Systems 3 in eine Säule (d = 4.5 cm), leichtes Andrücken und Verdrängen nicht aufgesogener Unterphase durch Nachwaschen mit Oberphase bereitet worden war, gab man eine Lösung von 270 mg des 2.4-Dinitrophenylhydrazon-Gemisches in 40 ccm Oberphase. Beim Entwickeln des Chromatogrammes mit der Oberphase bildeten sich innerhalb von 7 Stdn. neben zwei rasch laufenden schmalen Vorzonen zwei Hauptzonen aus. Man zerlegte die Säule den Zonen entsprechend, suspendierte die einzelnen Abschnitte in je 200 ccm  $n$  HCl, saugte ab, extrahierte Filterkuchen und Eluat mit jeweils 400 ccm Essigester und untersuchte den Rückstand des über Natriumsulfat getrockneten Essigester-Auszuges im Papierchromatogramm. Wie sich dabei zeigte, enthielten die beiden schmalen Vorzonen 2.4-Dinitrophenylhydrazin. Die langsamere der beiden Hauptzonen bestand aus *trans*-Brenztraubensäure-2.4-dinitrophenylhydrazon. Die schnellere, welche die entsprechende *cis*-Form und das 2.4-Dinitrophenylhydrazon der  $\alpha$ -Ketobuttersäure enthielt, wurde durch erneutes Chromatographieren an einer kleinen Säule (2.5  $\times$  45 cm) in ihre Komponenten zerlegt. Die Zonen der Brenztraubensäure-Derivate wurden vereinigt und ebenso wie das  $\alpha$ -Ketobuttersäure-2.4-dinitrophenylhydrazon aus Benzol umkristallisiert bzw. umgefällt. 154 mg gelbe Nadeln, die nach  $R_F$ -Wert und IR-Spektrum exakt mit synthetischem Brenztraubensäure-2.4-dinitrophenylhydrazon übereinstimmen. 12 mg amorphes  $\alpha$ -Ketobuttersäure-2.4-dinitrophenylhydrazon, das nach  $R_F$ -Wert und IR-Spektrum mit der synthetischen Modellsubstanz genau übereinstimmt.