

The co-occurrence of the glucosidic progenitors of isopropyl (I), 2-butyl (III), and 2-methylbutyl isothiocyanate (II) in *Putranjiva* and *Dentaria* probably reflects a common or related biosynthetic pathway of thioglycosides with branched side-chains. Since there is strong evidence that amino acids, or their keto acid analogues, may serve as precursors for the mustard oil glucosides,^{4,5} it appears likely that valine, or 2-oxo-isovaleric acid, functions as a natural precursor of glucoputranjivin. Likewise, isoleucine, or the corresponding keto-acid, can easily be visualized as progenitors of glucocochlearin, producing 2-butyl isothiocyanate on enzymic hydrolysis.

The biosynthesis of leucine from valine in higher plants has recently been shown to follow essentially the same path as in microorganisms, involving the participation of an acetate unit and proceeding through transformations similar to those operating in the citric acid cycle.^{6,7} Hence, it is surprising that a thioglucoside with the isobutyl side-chain has not yet been encountered in nature. Still, however, the formation of glucojiaputin from 2-amino-4-methylhexanoic acid, or the corresponding keto-acid, which, in its turn, may arise from the keto acid corresponding to isoleucine by a formally similar series of reactions, appears to be an attractive biogenetic hypothesis.

The technical assistance of lic.med. G. Lindstedt is gratefully acknowledged. The authors are thankful to Professor Freymann (Faculté des Sciences, Paris) for measuring the NMR spectra.

1. Delaveau, P. G. and Fromageot, F. *Phytochem.* **2** (1963) 237.
2. Kjær, A. *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **18** (1960) 122.
3. Kjær, A. and Friis, P. *Acta Chem. Scand.* **16** (1962) 936.
4. Benn, M. H. *Chem. Ind. (London)* **1962** 1907.
5. Underhill, E. W., Chisholm, M. D. and Wetter, L. R. *Can. J. Biochem. Physiol.* **40** (1962) 1505.
6. Satyanarayana, T. and Radhakrishnan, A. N. *Biochim. Biophys. Acta* **56** (1962) 197.
7. Butler, G. W. and Shen, L. *Biochim. Biophys. Acta* **71** (1963) 456.

Received November 6, 1963.

Acta Chem. Scand. **17** (1963) No. 9

Isolierung und Synthese von γ -Hydroxy-L-glutamin

GERHARD BRANDNER und
ARTTURI I. VIRTANEN

*Laboratorium der Stiftung für Chemische
Forschung, Biochemisches Forschungsinstitut,
Helsinki, Finnland*

γ -Hydroxy-L-glutaminsäure ($\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}_2\text{H}$; I) wurde in diesem Laboratorium zum erstenmal aus *Phlox decussata* isoliert und chemisch charakterisiert.¹ Das Amid dieser neuen Aminosäure, γ -Hydroxy-L-glutamin ($\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}_2\text{H}$; II), wurde von Fowden² in einer unbekanntenen Verbindung aus einer *Hemerocallis*-Art vermutet, da sie leicht zu (I) hydrolysiert wurde. Wir haben jetzt das Amid aus *Phlox* isoliert und aus (I) synthetisiert.

Auf Papierchromatogrammen von Extrakten frischer Pflanzen von *Phlox decussata* wurde in diesem Laboratorium vor einiger Zeit eine neue Aminosäure entdeckt,

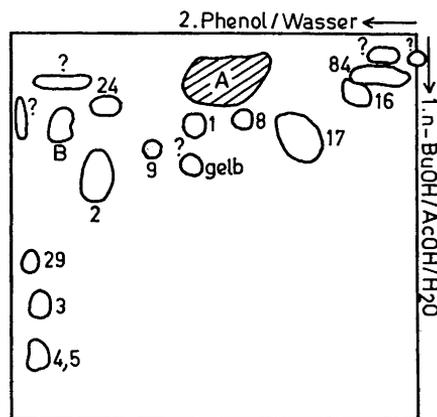


Abb. 1. Mit Ninhydrin nachweisbare Substanzen auf einem zweidimensionalen Papierchromatogramm eines Extraktes aus Samen von *Phlox decussata*.

A. γ -Hydroxy-L-glutamin

B. $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ (4)

- | | |
|---------|------------------------------|
| 1. Gly | 9. Thre |
| 2. Ala | 16. Asp |
| 3. Val | 17. Glu |
| 4. Ileu | 24. Glu-NH ₂ |
| 5. Leu | 29. NH ₂ -Butters |
| 8. Ser | 84. γ -HO-Glu |

die mit Ninhydrin die übliche Violettfärbung gab und mit HCl leicht in (I) zerfiel.³ Aus dem chromatographischen Verhalten wurde auf das Amid von (I) geschlossen (Abb. 1).

Auf zweidimensionalen Papierchromatogrammen (1. Butanol/Essigsäure/Wasser 63:10:27, 2. wasserges. Phenol) von Extrakten aus *Phlox*-Samen war mit Ninhydrin noch eine andere Substanz nachweisbar, deren R_F -Werte mit einer von Steward und Pollard⁴ isolierten Verbindung der Summenformel $C_{10}H_{16}N_2O_6$ übereinstimmen. Die Verbindung hatte bei Hydrolyse γ -Hydroxy-L-glutaminsäure, Ammoniak und einen nicht identifizierten Teil $C_5H_8O_3$ ergeben.

Zur Isolierung des Amids wurden 100 g Samen von *Phlox decussata* (Hortus A.B., Helsinki) 4 Stunden mit Petroläther (Kp. 40–60°) im Extraktionsapparat gewaschen und dann grob gemahlen. Das Produkt wurde 6 × mit je 100 ml 80 % igem Äthanol bei Zimmertemperatur extrahiert und mit Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der Schrot zu feinem Pulver gemahlen und im Mixergerät 12 × mit je 150 ml 80 % igem Äthanol einige Minuten durchgerührt. Die Äthanol-Extrakte wurden bei 30° auf 1 l eingengt und bei 4° auf eine Säule aus Amberlite IR 120, H⁺-Form, 400 ml, gegeben. Die Aminosäuren wurden mit 2,5 l 1 N NH₃ eluiert, nach dem Eindunsten in wassergesättigtem Phenol aufgenommen und an einer Säule (7 × 80 cm) aus Cellulosepulver (Whatman) mit wassergesättigtem Phenol entwickelt. Das Eluat 3,3–4,2 l, enthielt das Amid zusammen mit Glutamin und (I). Es wurde mit Äther versetzt und mit Wasser extrahiert. Nach dem Eindunsten wurde der Rückstand ein zweitesmal wie oben beschrieben chromatographiert. Die Amid-Fractionen enthielten noch (I) und eine unbekannte Verbindung, die mit Pikrinsäure einen in Wasser schwer löslichen Niederschlag der Zusammensetzung 29,27 % C, 2,45 % H, 23,22 % N und 45,06 % O ergab. Das Pikrat bildete gelbe, doppelbrechende Kristalle, die ab 190° stark sublimierten und sich aus der Gasphase bei 230–245° wieder zu Kristallen kondensierten, deren Doppelbrechung bei höherer Temperatur verschwand. Ab 250–260° wieder starke Sublimation und Abscheidung brauner Tröpfchen.

Das Amid wurde durch eine dritte Säulenchromatographie an Cellulosepulver mit Wasser/Isopropanol/Butanol (7:3:2)

bei 4° in den Fraktionen 27–37 (30 ml) in chromatographisch reiner Form (Ninhydrin) erhalten. Nach sechsmaligem Umkristallisieren aus Wasser/Äthanol/Aceton wurden 26 mg Amid erhalten, Fp. 163–4° (unkorr., Schmelzpunktmikroskop Reichert). [Gef. (4 × umkrist.): C 35,64; H 6,02; O 40,81; N 17,84; (6 × umkrist.): C 36,62; H 6,08. Ber. für $C_8H_{10}O_4N_2$: C 37,03; H 6,21; O 39,47; N 17,28]. Als Verunreinigung, welche die Reindarstellung des Amids erschwert, wird die als Pikrat isolierte Stickstoff-Verbindung vermutet.

Das Amid gab bei Kjeldahl-Bestimmungen doppelt so viel NH₃ wie bei Hydrolyse mit 1 N HCl (1 Std, 100°; Bestimmung mit der Mikrodiffusionsmethode nach Conway). Bei 100° wurde es von 1 N HCl in 5 Min fast vollständig hydrolysiert, bei 66° schneller als Glutamin. Bei diesen Bestimmungen wurden 0,2 bis 0,4 mg der Amide in 1 N HCl (0,5 mg/0,1 ml) hydrolysiert. Die Produkte wurden auf Cellulose-Dünnschichtplatten (Cellulosepulver MN 300, Macherey, Nagel & Co., Düren, Deutschland) mit wasserges. Phenol aufgetrennt (Hydroxyglutamin $R_F = 0,3$; Hydroxyglutaminsäure $R_F = 0,2$) und als Ninhydrin-Cu-Komplexe photometriert⁵ oder nach Behandlung des Hydrolysates mit Dinitrofluorbenzol als DNP-Derivate⁶ auf Celluloseplatten mit 1,5 M Phosphatpuffer (1 M NaH₂PO₄ + 0,5 M Na₂HPO₄) entwickelt (DNP-Hydroxyglutamin $R_F = 0,3$; DNP-Hydroxyglutaminsäure $R_F = 0,4$) und nach Extraktion mit Wasser bei 360 μ photometriert:

Hydrolysenzeit (Min)	Hydrolysengrad	
	Hydroxyglutamin	Glutamin
5	0,4	0,2
20	0,6	0,5
60	0,9	0,8

Synthese des Amids aus natürlicher γ -Hydroxy-L-glutaminsäure. Aus 5 mg (I) (aus *Phlox decussata*) und 25 μ l SOCl₂-Methanol-Gemisch wurde nach der Thionylchloridmethode⁷ Hydroxyglutaminsäure-4-methylesterchlorid dargestellt und nach dem Abdunsten von SOCl₂ und Methanol in 1 ml Wasser auf 0,5 ml IR-45-Anionenaustauscher (Cl⁻-Form) gegeben. Durchlauf und Waschwasser (4 ml) wurden eingedunstet. Durch Behandeln des Rückstands mit 4 μ l Hydrazinmonohydrat und

25 μ l Äthanol wurde das Hydrazid erhalten. Es wurde ohne Isolierung mit Raney-Nickel zum 3-Hydroxy-L-glutamin gespalten.⁸ Das Filtrat wurde zur Abscheidung von Ni²⁺ mit alkoholischer Dimethylglyoximlösung versetzt, filtriert und eingedunstet (23°). Der Rückstand wurde mit Äther gewaschen und dann durch Papier- und Dünnschichtchromatographie in Butanol/Essigsäure/Wasser und Phenol/Wasser ein- und zweidimensional aufgetrennt. Neben nicht umgesetzter Hydroxyglutaminsäure und einem unbekanntem, mit Ninhydrin reagierendem Produkt wurde Hydroxyglutamin durch Vergleich mit der natürlichen Verbindung identifiziert.

1. Virtanen, A. I. und Hietala, P. K. *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 175.
2. Fowden, L. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* **33** (1958) 398.
3. Späre, C.-G. und Virtanen, A. I. *Suomen Kemistilehti* **B 36** (1963) 191.
4. Steward, F. C. und Pollard, J. K. in Holden, J. T. (Hrg.), *Amino Acid Pools*, Amsterdam, New York 1962, p. 40; *Plant Physiol. Suppl.* **31 IX** (1956).
5. vgl. Cramer, F. *Papierchromatographie*, 5. Aufl. Weinheim 1962, p. 101.
6. Levy, A. L. *Nature* **174** (1954) 126.
7. Boissonnas, R. A., Guttmann, St., Jaquenoud, P.-A. und Waller, J.-P. *Helv. Chim. Acta* **38** (1955) 1491.
8. vgl. Greenstein, J. P. und Winitz, M. *Chemistry of the Amino Acids*, New York, London 1961, p. 1260.

Eingegangen am 14. November 1963.

Continuous Detection of Fractions in Effluents of Silicic Acid Chromatography*

E. HAAHTI** and T. NIKKARI**

Department of Medical Chemistry, University of Turku, Finland

The detection of fractions in chromatographic effluents forms a tedious everyday problem particularly in lipid work. Several methods are used for this purpose and these include (i) gravimetric estimation after evaporation of solvents, (ii) application of specific colour reactions, (iii) spot tests on glass-filter paper, followed by charring,¹ (iv) intermittent gas-phase detection,² and (v) refractometric monitoring.³ From these methods only the last one can be applied for continuous detection. However, gradient elution and/or stepwise elution are usually employed in chromatographic separations; these techniques complicate the refractometric method.

The detection principle described here is based on the difference in volatility of the solvent and the eluted material; and the use of a hydrogen flame ionization cell for the detection of the higher boiling material. Continuity of operation is achieved through a running chain arrangement. In the course of the work it has been revealed that the same principle has been under consideration also in other laboratories.^{4,5}

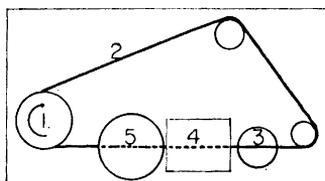


Fig. 1. Schematic diagram of the detector. For interpretation, see text.

* This work was supported by the PHS research grant HE-06818-02 from the *National Heart Institute*, Bethesda, Md., U.S.A.

** Preliminarily presented at the *Societas Biochemica et Biophysica Fennica*, Turku, Finland, April 17th 1963.

** Established Investigator of the *Finnish Medical Research Council*.