

ZUR METHODIK DER ANALYSE VON PFLANZLICHEN ZELLSAFT-STOFFEN, MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER ORGANISCHEN SÄUREN

HELMUT KINZEL

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität,
Wien (Österreich)*

(Eingegangen den 29. Juli 1961)

EINLEITUNG

Für die Trennung organischer Säuren stehen heute hauptsächlich zwei Verfahren zur Verfügung: (1) die säulenchromatographische Trennung über Kieselgel- oder Ionenaustauschersäulen und (2) die papierchromatographische Trennung. Bei Arbeiten über die Zusammensetzung der Zellsäfte verschiedener Pflanzen, in denen die organischen Säuren bzw. deren Salze eine wichtige Rolle spielen, benützte der Verfasser das zweitgenannte Verfahren. Über die papierchromatographische Analyse organischer Säuren existieren bereits zwei sehr brauchbare zusammenfassende Darstellungen (RANSON¹ und SCHWEPPE²).

Im Laufe der nach diesen Anweisungen begonnenen Arbeiten wurden dann einige Erfahrungen gesammelt, die geeignet sind, die genannten Darstellungen in einigen Punkten zu ergänzen.

HERSTELLUNG DER EXTRAKTE

In der allgemeinen biochemischen Methodik wird zu diesem Zwecke empfohlen, die Pflanzenteile schonend zu trocknen, zu pulverisieren und mit verschiedenen Lösungsmitteln zu extrahieren. Falls es sich darum handelt, die im Zellsaft gelösten Stoffe zu erfassen, erscheint dieses Verfahren nicht zweckmässig. Dies gilt ganz besonders für die organischen Säuren, wie die Abb. 25 in LINSKENS³ schön illustriert. Dort sieht man, dass die Extraktion der organischen Säuren aus Maissprossen mit 80 % Äthanol erst nach 72 Stunden einigermassen komplett ist, während Zucker und Aminosäuren viel rascher in Lösung gehen. Der Grund hierfür ist leicht einzusehen: Die organischen Säuren liegen im Zellsaft sehr oft zum grossen Teil in Form ihrer Ca-Salze vor, die in Alkohol nur schwer löslich sind.

Das vielfach empfohlene Ausäthern der organischen Säuren aus der mit Schwefelsäure befeuchteten Trockensubstanz kann die sehr wichtige Oxalsäure nicht befriedigend erfassen und ist natürlich nicht anwendbar, wenn eine Gesamt-Analyse des Zellsaftes beabsichtigt ist.

ILJIN⁴, einer der wenigen Biochemiker, die sich speziell mit der Analyse des

Zellsaftes befasst haben, hält in solchen Fällen die Gewinnung eines Pressaftes für wünschenswert. Nach WALTER⁵ muss einem Abpressen von Pflanzenteilen eine Tötung derselben vorausgehen. Lebende Pflanzenzellen geben infolge der Semipermeabilität des Protoplasmas (vgl. z.B. BANCHER UND HÖFLER⁶, S. 79 ff.) beim Pressen zunächst fast reines Wasser ab, während die gelösten Substanzen im Protoplasten zurückgehalten werden. Nach WALTER's Methode geschieht das Abtöten durch Erhitzen in einem geschlossenem Gefäss. ILJIN hat nun darauf aufmerksam gemacht, dass dieses Verfahren bei biochemischen Analysen unter Umständen fehlerhafte Resultate zur Folge haben kann. In Zellsäften sind nämlich oft grosse Mengen von Calcium-Citrat gelöst, das dazu neigt, übersättigte Lösungen zu bilden, aus denen in der Hitze ein Teil des Salzes ausfällt und damit im Pressaft nicht aufscheidet. ILJIN hat daher die von ihm analysierten Pflanzenteile durch Chloroform-Dämpfe getötet und dann gepresst. Dies ist ein durchaus empfehlenswertes Verfahren. Immerhin werden sich wohl "wilde" enzymatische Reaktionen in der Zeit zwischen Töten und Abpressen nicht ganz, wenn auch durch rasches Arbeiten grösstenteils, vermeiden lassen. Ferner kann bei diesem Verfahren die Tötung erst im Laboratorium erfolgen und bei längerdauernden Exkursionen im Zuge der Untersuchung von Freilandpflanzen besteht die Gefahr, dass die Pflanzenteile während des Transportes chemische Veränderungen erleiden. Auf Grund dieser Bedenken hat der Verfasser im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Methode benützt: 25 g frische Blätter wurden in etwa 175 ml siedendes dest. Wasser eingeworfen. Nach Erkaltenlassen wurde entweder gleich weiterverarbeitet oder, wenn dies nicht möglich war, in einer Tiefkühltruhe eingefroren. Die Weiterverarbeitung geschah durch Homogenisieren mit einem handelsüblichen Eintauch-Mixer (Bamix) und Auffüllen der Suspension in einem Messkolben auf 250 ml. War eine Bestimmung des Gesamt-Oxalates vorgesehen, dann wurde von dieser Suspension nach gutem Umschütteln ein aliquoter Teil entnommen und darin das Gesamt-Oxalat nach der Methode von BAKER, angegeben bei WOLF⁷ (S. 497), bestimmt. Der Rest wurde filtriert oder zentrifugiert, die erhaltene Lösung für die weitere Analyse verwendet. Nach diesem Verfahren werden wohl alle im Zellsaft gelösten Stoffe in einer Lösung von etwa der zehnfachen Verdünnung des Zellsaftes erhalten; zusätzlich gehen natürlich noch einige Bestandteile des Protoplasmas sowie eventuell in der Vakuole ungelöst vorliegende Stoffe zum Teil in Lösung. Einige besonders empfindliche Ketosäuren, wie z.B. Oxalessigsäure, werden in den so hergestellten Extrakten wohl nicht erfasst werden können. Phenolderivate, wie z.B. Chlorogensäure, dürften die Prozedur im allgemeinen gut überstehen (vgl. dazu die Angaben von ZUCKER UND AHRENS⁸, die zu Chlorogensäurebestimmungen in ähnlicher Weise extrahieren).

Das beschriebene Verfahren kann bei Untersuchungen an Freilandpflanzen unmittelbar am Standort durchgeführt werden. In diesem Falle werden die Blätter (oder anderen Pflanzenteile) auf einer Handwaage möglichst genau abgewogen, in ein geeignetes Glasgefäss (Kolben) eingebracht, mit der mittels eines tragbaren Benzin- oder Gaskochers erhitzten Wassermenge übergossen und kurz aufgekocht. In diesem Zustande können die Proben dann zum Laboratorium transportiert werden,

ohne dass chemische Veränderungen befürchtet werden müssen. Dauert der Transport zum Labor länger als etwa 24 Stunden, dann muss die Probe mit einem Wattepfropfen verschlossen und fraktioniert sterilisiert werden.

Will man in dem erhaltenen Extrakt quantitative Bestimmungen durchführen, dann besteht das Problem einer geeigneten Bezugsgrösse. Als solche dient oft das Trockengewicht, auch der Proteingehalt oder eine andere Grösse (vgl. PAECH⁹). Besteht, wie in der vorliegenden Arbeit, die Absicht, die Konzentration der im Zellsaft gelösten Stoffe zu bestimmen, dann erscheint als Bezugsgrösse der Frischwassergehalt der betreffenden Pflanzenteile empfehlenswert. In diesem Falle muss an einer Parallelprobe der zu analysierenden Pflanzenteile deren Wassergehalt bestimmt werden. Ist nun F das Frischgewicht der (nach oben gegebener Vorschrift) zur Analyse verwendeten Pflanzenprobe und T das in einem Parallelversuch ermittelte Trockengewicht einer gleichen Gewichtsmenge, V das Volumen, auf das die Suspension der homogenisierten Pflanzenteile aufgefüllt wurde und S das spezifische Gewicht der Trockensubstanz, dann entspricht 1 ml filtrierter Extrakt:

$$\frac{F - T}{V - \frac{T}{S}}$$

ml Frischwasser.

Der gegebene Ausdruck entsteht dadurch, dass der Frischwassergehalt der Probe ($F - T$) durch die Zahl der ml Wasser, die in dem Volumen V der Suspension enthalten sind, dividiert wird. Diese letztere Wassermenge entspricht natürlich dem Volumen V , vermindert um das Volumen der bei der Filtration zurückbleibenden ungelösten Anteile. Dieses letztere Volumen wurde als identisch mit dem Volumen der Trockensubstanz (T/S) angenommen. Dadurch entsteht ein kleiner Fehler, da ja bei der Bestimmung der Trockensubstanz auch die Trockensubstanz des Zellsaftes mitgewogen wird und bei der Bereitung des Extraktes wiederum Stoffe in Lösung gehen, die in der lebenden Zelle nicht im Zellsaft, sondern im Protoplasma enthalten waren. Der Fehler dürfte jedoch vernachlässigbar klein sein, da ja $V \gg T/S$. Bezüglich des Zahlenwertes von S erscheint es dem Verfasser zulässig, ihn mit dem spezifischen Gewicht eines Hauptbestandteiles der Trockensubstanz, nämlich der Cellulose ($d = 1.6$) gleichzusetzen.

DIE VORREINIGUNG UND FRAKTIONIERUNG DER EXTRAKTE

Zur Abtrennung einer Fraktion der organischen Säuren aus Pflanzenextrakten haben BRYANT UND OVERELL¹⁰ die Verwendung eines Anionenaustauschers vorgeschlagen. Will man nicht nur die Säuren erfassen, sondern einen weiteren Überblick über die Zusammensetzung des Extraktes (bzw. des Zellsaftes) erhalten, dann lässt sich das Verfahren zu einem allgemeinen Trennungsgang ausbauen.

Der Verfasser verwendete Merck-Ionenaustauscher I und III (stark saurer und stark basischer Austauscher), die in Portionen zu 5 g in Röhren eingefüllt wurden, die

in Fig. 1 dargestellt sind. Im Raum A (innen 8×150 mm) befindet sich der Austauscher über einem Bausch Glaswolle, der Raum E (Fassungsvermögen 250 oder 500 ml) dient zur Aufnahme des durchlaufenden Extraktes bzw. des Elutionsmittels. Die mit Schlauch und Quetschhahn H angeschlossene 2 mm-Kapillare K verhindert ein Trockenlaufen der Säule, das ja vermieden werden soll (vgl. DAECHE¹¹). Die Vorrichtung kann daher auch bei langdauernden Elutionsvorgängen ohne dauernde

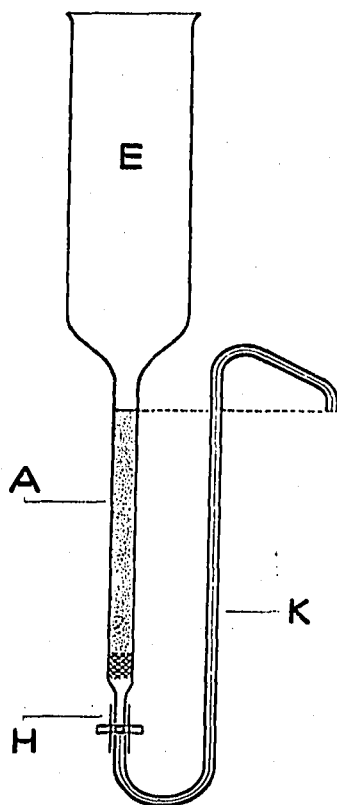


Fig. 1. Gefäß zur Aufnahme der Ionenaustauscher-Säule. Erklärung im Text.

Aufsicht bleiben. Haben sich in der Säule dennoch Luftblasen eingestellt, dann können sie leicht durch Rückspülung entfernt werden: An das freie Ende der Kapillare K wird ein Schlauch angeschlossen, der mit einem höhergestellten Wassergefäß verbunden ist. Das Wasser drückt die Austauschermasse in den Raum E, von wo sie sich nach Aufhören der Rückspülung wieder luftblasenfrei nach A absetzt. Der Glaswollbausch am Grunde von A ändert hierbei seine Lage nicht, wenn er einigermaßen festgedrückt ist.

Sollen nun mittels einer Anionenaustauscher-Säule die organischen Säuren aus einem Pflanzenextrakt herausgeholt werden, dann ist es zunächst empfehlenswert, ein richtiges Verhältnis zwischen der Kapazität des Ionenaustauschers und dem Säuregehalt des Extraktes herzustellen. Wenn, wie im vorliegenden Falle, eine quantitative Abtrennung der Anionen (bzw. gegebenenfalls auch der Kationen) durch einen Ionenaustauscher notwendig ist, dann darf der Extrakt, der die Säule passiert, natürlich nur einen Bruchteil derjenigen Menge der betreffenden Ionengattung ent-

halten, die der vollen Austauschkapazität der Säule entspricht. Nach Literaturangaben sollte die durchlaufende Extraktmenge möglichst nicht mehr als etwa 10 % der Austauschkapazität der verwendeten Säule entsprechen. Die Austauschkapazität einer 5 g-Säule von Merck-Ionenaustauscher I (Kationenaustauscher) beträgt 12.5–13 mval (bestimmt durch Passage von 25 ml *N* KCl durch die Säule in H-Form und Titration der austretenden HCl). Die Kapazität einer 5 g-Säule von Merck-Ionenaustauscher III (Anionenaustauscher) beträgt 15.8 mval (bestimmt durch Passage von 200 ml *N/10* Oxalsäure durch eine Säule in Carbonatform und manganometrische Titration des durchlaufenden Oxalates).

Die durch die Anionenaustauscher-Säule laufende Extraktmenge sollte also nicht mehr als etwa 1.5 mval Säuren enthalten. Die Gesamt-Säure im Extrakt, deren Menge ja auch in anderer Hinsicht interessant ist, wird in einem Vorversuch dadurch bestimmt, dass man eine gewisse Menge (z.B. 5 ml) desselben durch eine Kationenaustauscher-Säule in der H-Form schickt, mit 30–40 ml Wasser portionsweise nachspült und in der durchgelaufenen Flüssigkeit die Säure in üblicher Weise titriert (vgl. z.B. WOLF⁷, S. 484 f.). Einige durchgeführte Versuche ergaben zum Beispiel folgende Werte für den Gehalt an Gesamt-Säure in Extrakten, die nach der weiter oben gegebenen Vorschrift hergestellt worden waren:

<i>Viscaria vulgaris</i>	28 mval/l
<i>Sedum maximum</i>	19 mval/l
<i>Echium vulgare</i>	33 mval/l.

Die für eine 5 g-Säule von Anionenaustauscher (Merck III) tragbare Menge von Extrakt beträgt also bei *Viscaria* etwa 50–55 ml, bei *Sedum* etwa 80 ml, bei *Echium* etwa 45 ml.

In welcher Form soll nun der Anionenaustauscher verwendet werden? BRYANT UND OVERELL¹⁰ haben die Carbonat-Form vorgeschlagen, weil bei Verwendung der OH-Form in zuckerhaltigen Extrakten durch Abbau der Zucker neue Säuren entstehen können (z.B. Milchsäure und Glykolsäure, vgl. RANSON¹, S. 541 und die dort zitierte Literatur). Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde vor allem mit der Carbonat-Form des Merck-Ionenaustauschers III gearbeitet.

In der zusammenfassenden Darstellung von RANSON wird vorgeschlagen, den Anionenaustauscher nach der Aufnahme der Säuren mit HCl, Na₂CO₃, (NH₄)₂CO₃ oder NH₄OH zu eluieren und den Überschuss des Elutionsmittels gegebenenfalls durch nachträgliche Passage eines Kationenaustauschers in H-Form zu eliminieren. SCHWEPPE² schlägt zur Elution nur (NH₄)₂CO₃, sonst gleiche Behandlung vor. Dazu ist nach eigenen Erfahrungen folgendes zu sagen: Um das Na⁺ bzw. NH₄⁺ aus 250 ml *N* Carbonat-Lösung (wie für die Elution empfohlen) nachträglich zu eliminieren, wären nicht 10 g Kationenaustauscher in H-Form (wie RANSON angibt), sondern — bei Verwendung von Merck I — mindestens 100 g nötig. Ausserdem entstehen bei der Passage von Carbonat-Lösung durch einen Kationenaustauscher in H-Form grosse Mengen CO₂ (aus 250 ml *N* Lösung theoretisch etwa 2.5 l), wodurch die Säule an

zahlreichen Stellen durch Gasblasen unterbrochen wird. Dies lässt schliesslich den Durchlauf fast zum Stillstand kommen. Infolgedessen ist Na_2CO_3 als Elutionsmittel nicht empfehlenswert. Bei $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ hingegen lässt sich der Überschuss leicht wegkochen (am besten im Vakuum). Die danach vorliegenden NH_4 -Salze der organischen Säuren lassen sich mit Hilfe von Kationenaustauscher in H-Form als freie Säuren gewinnen. Von den anderen bei RANSON vorgeschlagenen Elutionsmitteln ist auch HCl weniger empfehlenswert. Da bei der Adsorption der organischen Säuren am Anionenaustauscher nur ein kleiner Teil der Kapazität ausgenützt wird, liegt der Rest des Ionenaustauschers noch immer in Carbonat-Form vor. Würde man eine solche Säule mit HCl zu eluieren versuchen, dann würde auch hier wieder viel CO_2 entstehen und die Säule unterbrechen. NH_4OH käme als Elutionsmittel in Frage, doch ist zu bedenken, dass die Lösung nachher eingedampft werden muss, was bei dem immerhin recht hohen pH-Wert des NH_4OH für empfindlichere organische Säuren gefährlich werden könnte. So bleibt von den vier vorgeschlagenen Elutionsmitteln nur das Ammoniumcarbonat wirklich empfehlenswert.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich folgende *Grundoperation* für die Isolierung organischer Säuren aus einem Pflanzenextrakt:

1. Aktivieren des Anionenaustauschers (5 g Merck III) durch Passage von 500 ml *N* Na_2CO_3 (über Nacht)*.
2. Waschen mit etwa 50 ml H_2O (portionsweise) bis zu neutraler Reaktion des Waschwassers.
3. Durchlauf der berechneten Menge des Extraktes. Geschwindigkeit etwa 30 bis 60 Tropfen pro Minute (vgl. dazu aber S. 501, Fussnote).
4. Waschen.
5. Elution durch Passage von 250 ml *N* $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.
6. Waschen (das Waschwasser wird mit dem Eluat vereinigt).
7. Eindampfen des Eluates im Vakuum.
8. Aufnehmen mit etwa 20 ml H_2O .
9. Durchlaufenlassen durch eine 5 g-Säule Kationenaustauscher (Merck I) in H-Form (erhalten durch Passage von 50 ml *N* HCl und nachträgliches Waschen).
10. Waschen der Kationenaustauschersäule (das Waschwasser wird mit dem Durchgelaufenen vereinigt).

11. Durchgelaufenes + Waschwasser im Vakuum einengen.

Nach diesen Operationen ist die Säurefraktion des Extraktes fertig zum Auftragen auf das Papier. Will man eine Trennung von Citronensäure und Isocitronensäure nach CHEFTEL, MUNIER UND MACHEBOEUF¹² bzw. nach der verbesserten Methode von RANSON (Ref.¹, S. 556) durchführen, dann verändert sich das Verfahren, wie folgt:

11. Durchgelaufenes und Waschwasser wird im Vakuum eingedampft und eine Stunde lang im Vakuum auf 100° erhitzt.

* Bezüglich der Vorbehandlung fabrikneuer Ionenaustauscher vgl. RANSON¹, S. 543 bzw. DAECKE¹¹, S. 22. Die an der letztgenannten Stelle angegebenen Lösungsmengen zur Regeneration erscheinen allerdings etwas klein. BRYANT UND OVERELL¹⁰ verbrauchen zur Aktivierung 2×500 ml *N* Na_2CO_3 .

12. Der Rückstand wird in einer geringen Menge konzentrierter Ammoniaklösung aufgenommen und auf das Papier aufgetragen.

Will man sich über die vorhandene Gewichtsmenge an Säure informieren — was empfehlenswert ist — so kann das Eindampfen in einem vorher gewogenen Kolben geschehen, der nachher wieder gewogen wird. Man setzt dann zweckmässig soviel Lösungsmittel zu, dass eine etwa 1% Lösung der Säuren entsteht.

In gewissen Fällen treten allerdings bei diesem Verfahren Komplikationen auf, so namentlich bei Extrakten, die grössere Mengen von Phenol-Säuren (Chlorogensäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure o.dgl.) enthalten. In diesem Falle färbt sich die (vorher gelbe) Säule des Anionenaustauschers während der Elution mit $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ dunkelbraun, weil diese Säuren im alkalischen Bereich autoxydabel sind. Die Oxydationsprodukte bleiben in der Säule und die ablaufende Lösung ist farblos und frei von den genannten Säuren. Dies ist einerseits ein Nachteil, weil die betreffenden Säuren im Chromatogramm fehlen und die Ionenaustauscher-Säule verunreinigt, vielleicht sogar unbrauchbar geworden ist*. Andererseits liegt darin aber auch ein Vorteil, weil die Phenolderivate auch bei der Trennung von Citronensäure und Isocitronensäure stark stören. Sie verfärben sich schon beim Erhitzen im Vakuum auf 100° , mehr noch beim nachträglichen Aufnehmen in Ammoniak. Die erhaltene braune Lösung liefert Chromatogramme mit braunen Schwänzen, welche die Flecken der anderen Säuren überlagern. Kann man die Verunreinigung einer Anionenaustauscher-Säule in Kauf nehmen, dann eignet sich das Verfahren gut dazu, aus phenolhaltigen Extrakten die Phenolderivate abzuscheiden und saubere Trennungen von Citronensäure und Isocitronensäure zu erhalten.

Wie lassen sich nun die Phenolsäuren selbst chromatographisch erfassen? Hier besteht zunächst die Möglichkeit, den rohen Extrakt durch einen Kationenaustauscher in der H-Form laufen zu lassen, wodurch die zumeist vorliegenden Salze in die freien Säuren verwandelt werden, die so erhaltene Lösung ohne weiteres auf das Papier zu bringen und mit einem sauren Lösungsmittel zu entwickeln. Dieses Verfahren ist natürlich nur dann erfolversprechend, wenn neben den Säuren keine allzu grossen Mengen von anderen Verbindungen (Zucker o.dgl.) vorliegen, hat aber dann den Vorteil, dass mit den üblichen Phenolreaktionen (Fluoreszenz, FeCl_3 -Reaktion u.s.w., vgl. LINSKENS¹³, S. 333 f.) nicht nur die Phenolsäuren, sondern auch andere Verbindungen mit Phenolgruppen am Chromatogramm erscheinen.

Eine Möglichkeit, die Phenolsäuren in einer Säurefraktion zu erhalten, besteht darin, dass man den Anionenaustauscher nicht in der Carbonat-Form, sondern in der Formiat-Form verwendet. Bezüglich dieser Möglichkeit sei vor allem auf die Arbeit von REINBOTHE¹⁴ hingewiesen. Die Arbeit ist zwar vor allem der Gradientenelutionstechnik gewidmet, doch lassen sich auch für die Papierchromatographie wertvolle Anregungen aus ihr entnehmen. Hier ist vor allem zu beachten, dass die Elution leider nicht mit Ammoniumformiat durchgeführt werden kann, weil dieses beim nachträglichen Eindampfen viel weniger flüchtig ist als das Ammoniumcarbonat.

* Ob der verfärbte Anionenaustauscher nach gutem Waschen mit Säure und Lauge wieder für analytische Zwecke verwendbar ist, bleibt zu prüfen.

Man muss vielmehr starke (6 *N*) Ameisensäure zur Elution verwenden, die aber infolge ihres geringen Dissoziationsgrades bei dieser Konzentration nur relativ wenige HCOO^- -Ionen enthält, die ja wohl allein für den Austausch in Frage kommen. So braucht man (nach eigenen orientierenden Versuchen) grosse Mengen dieser Lösung (250–500 ml), um quantitative Elutionen zu erhalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist nicht mit Formiat-Säulen gearbeitet worden, weil in dem später zu besprechenden Trennungsgang das Formiat bei der Zuckerbestimmung gestört hätte.

Eine weitere Komplikation ergibt sich bei Extrakten, die Oxalsäure enthalten. Diese Säure stört bekanntlich die papierchromatographische Trennung der anderen Säuren durch Schwanzbildung und es wird empfohlen, sie vorher abzutrennen. Der Verfasser verwendete zur Fällung des Ca-Oxalates eine Lösung, die je 2 *N* an Ca-Acetat und Essigsäure war. Die oben angeführte Grundoperation ändert sich in diesem Falle, wie folgt:

1. Eine Extrakt-Menge, die etwa 1.5 bis 2 mval Gesamtsäure enthält, wird mit 1 ml der oben angeführten Ca-Lösung (entsprechend 2 mval Ca) versetzt. Der pH-Wert der Lösung soll nun etwa zwischen 4 und 5 liegen. Enthält der Extrakt grosse Mengen von Oxalsäure neben geringen Mengen der anderen Säuren, dann empfiehlt es sich, vorher ausser der Gesamtsäurebestimmung noch eine Oxalsäurebestimmung durchzuführen (vgl. WOLF⁷, S. 495 ff.). Die Extrakt-Menge wird dann so bemessen, dass die neben Oxalsäure noch vorhandenen Säuren der dem Anionenaustauscher zuzuführenden Menge (1.5 mval) entsprechen. Es wird dann so viel Ca-Lösung hinzugesetzt, dass gegenüber der anwesenden Menge von Oxalsäure ein Überschuss an Ca vorliegt. Man stellt die Lösung über Nacht in den Kühlschrank und filtriert dann durch ein dichtes Filter vom Niederschlag ab.

2. Die Lösung wird zur Entfernung des Ca-Überschusses durch eine 5 g-Säule Kationenaustauscher in der H-Form geschickt. Die durchlaufende Lösung wird (an einem entnommenen kleinen Teil) durch Zusatz von Ammoniumoxalat-Lösung auf Ca-Freiheit geprüft. Nötigenfalls wird die Lösung noch durch eine zweite Säule Kationenaustauscher geschickt. Säulen nachwaschen und das Waschwasser mit dem Durchgelaufenen vereinigen.

3. Zur Entfernung der überschüssigen Essigsäure wird im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit etwas H_2O aufgenommen und ist nun fertig für die weiteren Operationen (entweder direktes Auftragen auf Papier und Chromatographieren mit saurem Lösungsmittel — vgl. S. 499 — oder, wenn eine Trennung der aliphatischen Carbonsäuren von Phenolsäuren, Zuckern u.dgl. erwünscht ist, eine weitere Behandlung nach S. 498, Punkt 1 ff.).

Wenn nicht nur die organischen Säuren, sondern auch andere Bestandteile des Zellsaftes analysiert werden sollen, dann lässt sich mit Hilfe von Ionenaustauschern leicht eine gruppenweise Trennung verschiedener Verbindungen durchführen, etwa in folgender Weise:

1. Passage des Extraktes durch eine Säule Kationenaustauscher in H-Form. Nachwaschen mit Wasser. Die Säule enthält die im Extrakt enthaltenen Kationen, das Durchgelaufene die Säuren und Nichtelektrolyte.

1a. Die Säule wird mit N HCl (p.A.) eluiert. Leider ist das zur quantitativen Elution von Ca und Mg nötige Volumen ziemlich gross (1000 ml und mehr). Es wäre zu prüfen, ob ein schwach saurer Austauscher (Merck IV) bessere Resultate gibt.

2. Das Durchgelaufene von 1. wird durch eine Säule Anionenaustauscher in Carbonat-Form geschickt. Mit dem Waschwasser von 1. und einer weiteren Portion Wasser wird nachgespült*. Die Säule enthält die Anionen, das Durchgelaufene die Nichtelektrolyte.

2a. Die Säule wird eluiert und weiterbehandelt wie auf S. 498, Punkt 5 ff. beschrieben. Das Eluat enthält die Säuren (mit Ausnahme der im Alkalischen autoxydablen).

3. Das Durchgelaufene von 2. wird im Vakuum eingeeengt und zur Bestimmung von Zuckern u.dgl. verwendet. Disaccharide werden bei (1) z.T. gespalten.

Die freien Aminosäuren werden bei diesem Trennungsgang je nach ihren chemischen Eigenschaften in verschiedenen Fraktionen auftauchen. Eine Anwendung des beschriebenen Trennungsganges für die Analyse von Aminosäuren ist wohl nicht empfehlenswert, zumal es ja für diesen Zweck gut ausgearbeitete andere Verfahren gibt.

DIE PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG

Als Papier wurde Schleicher & Schüll ("Selecta") Nr. 2043 b, normal und "ausgewaschen" (letzteres bevorzugt) verwendet. Die Säurefraktionen der Extrakte wurden in Mengen von 10–60 μ l einprozentiger Lösung (entsprechend 100–600 γ reiner Säuren) aufgetragen. Hat man mehr als 10 μ l einer Lösung aufzutragen, dann muss dies natürlich portionsweise (etwa je 10 μ l) geschehen, wobei nach jeder Portion mit Warmluft getrocknet wird. In diesem Zusammenhang ist ein Kunstgriff beherzigenswert, den BASSHAM UND CALVIN¹⁵ (S. 892) angeben: Nach dem Auftragen der einzelnen Portionen des Extraktes wird nur leicht mit Warmluft behandelt, nicht scharf getrocknet. Nach dem Auftragen der letzten Portion wird nicht mehr mit Warmluft behandelt, sondern feucht belassen und so in den Chromatographierkasten gehängt. Wird nämlich eine grössere Extraktmenge ganz eingetrocknet, dann bildet sie eine kompakte und mit den Papierfasern verklebte Masse, die dann von der darüber schreitenden Lösungsmittelfront nicht gleich mitgenommen wird. So ergeben sich Schwänze, Überlappungen und verringerte R_F -Werte.

Als Lösungsmittel wurde vor allem das Gemisch verwendet, das von RANSON¹ (S. 556) für die Trennung von Citronensäure und Isocitronensäure vorgeschlagen wurde: n -Propanol + konz. Ammoniak 6:4. Zunächst wurden die Angaben von RANSON nachgeprüft und voll bestätigt. Das Gemisch lieferte dann auch mit vielen

* Es ist übrigens auch bei einer nur auf die organischen Säuren gerichteten Analyse empfehlenswert, vor dem Passieren der Anionenaustauschersäule (S. 498, Punkt 3 ff.) in der hier (Punkt 1) beschriebenen Weise die Kationen zu entfernen. Wenn nämlich der Extrakt grössere Mengen von Ca und Mg enthält und durch einen Anionenaustauscher in Carbonatform geschickt wird, dann wird die Lösung in der Säule alkalisch und es besteht die Gefahr, dass Ca- bzw. Mg-Salze organischer Säuren in unlöslicher Form abgelagert und der nachträglichen Elution entzogen werden. Ausserdem kann sich in diesem Falle CaCO_3 und MgCO_3 in der Säule ansammeln.

anderen Säuren so gute Trennungen und so schöne, gerundete Flecken, dass es bei der weiteren Arbeit in erster Linie eingesetzt wurde. Für Substanzen, die im alkalischen Bereich autoxydabel sind (z.B. Phenolverbindungen), ist das alkalische Lösungsmittel natürlich nicht verwendbar. Bezüglich der Trennung dieser Verbindungen sei auf LINSKENS¹³ verwiesen. Die R_F -Werte einiger Säuren liegen im Propanol-Ammoniak-Gemisch einander so nahe, dass eine Trennung kaum möglich erscheint (z.B. Weinsäure und Isocitronensäure). Besteht der Verdacht, dass zwei solche Säuren nebeneinander vorliegen, dann wird man Parallelversuche mit einem anderen, etwa einem sauren Lösungsmittel durchführen oder zweidimensional arbeiten. Ausserdem sei auf die Möglichkeit hingewiesen, den Trenneffekt durch Anlage eines Durchlaufchromatogrammes zu verstärken (vgl. LINSKENS¹⁶, S. 13). In diesem Falle ist es günstig, eine gefärbte Markiersubstanz zur Verfügung zu haben, deren Vorrücken auf dem Papier verfolgt werden kann. Als solche hat sich für das Propanol-Ammoniak-Gemisch das Phenolrot (R_F 0.67) gut bewährt. Da die R_F -Werte der geprüften Säuren sämtlich unter diesem Wert liegen, so kann man unbesorgt warten, bis das Phenolrot am unteren Rande des Papiers angelangt ist. Der Trenneffekt

TABELLE I

R_F -WERTE EINIGER SÄUREN FÜR DAS LÖSUNGSMITTEL *n*-PROPANOL/AMMONIAK 6:4 (v/v)
Papier: Schleicher & Schüll (Selecta) 2043 b. Temperatur: 18–23°. Absteigende Methode.

Säure	Einzelwerte (vgl. Text)							
<i>cis</i> -Aconitsäure	0.23	0.20	0.19					
<i>trans</i> -Aconitsäure	0.17							
Äpfelsäure	0.31	0.31	0.315	0.28	0.305			
Ascorbinsäure	0.39	(+ schwacher Fleck 0.20. Dehydro-AS.?)						
Bernsteinsäure	0.35	0.355	0.345	0.31				
Chinasäure	0.40	0.39	0.42					
Chlorid	0.54							
Citronensäure	0.19	0.20	0.18	0.125	0.15	0.16	0.17	
Fumarsäure	0.39	0.315	0.34					
Ferulasäure	0.41	0.46	0.44	0.44				
Galacturonsäure	Schwanz 0.21 bis 0.31							
Gluconsäurelacton	0.32							
Glycerinsäure	0.45	0.495	0.47	0.41	0.465	0.47		
Glykolsäure	0.51	0.47						
Glyoxylsäure	Schwanz 0.20 bis 0.35							
Isocitronensäurelacton-NH ₃ -Verbindung, hergestellt nach RANSON	0.24	0.20	0.20	0.24	0.23	0.27	0.235	0.255
Itaconsäure	0.37							
Ketoglutarinsäure	0.31							
Malonsäure	0.27							
Mesoxalsäure	0.17							
Mevalonsäurelacton	0.62							
Milchsäure	0.54	0.56	0.55					
Nitrat	0.60							
Oxalsäure	Schwanz 0.09 bis 0.23							
Shikimisäure	0.33							
Tartronsäure	0.28	0.25						
Tricarballoisäure	0.15							
Weinsäure	0.27	0.25	0.24	0.245	0.25	0.22		

(D-Weinsäure, L-Weinsäure und *meso*-Weinsäure verhielten sich gleich)

wird so um 50 % verbessert. Die Tabelle I bringt die R_F -Werte für eine Reihe von Säuren bei Verwendung des zumeist angewandten alkalischen Lösungsmittels. Die Tabelle enthält keine Durchschnittswerte, sondern die bei den einzelnen Versuchen tatsächlich erhaltenen Werte, sodass die auftretende Streuung ersehen werden kann. Letztere ist für manche Säuren verhältnismässig gross. Es könnte sein, dass bei dem pH-Wert des Lösungsmittels bestimmte Säuren gerade im Übergangsbereich von einer Dissoziationsstufe zur anderen vorliegen und deshalb gegen minimale Veränderungen in der Zusammensetzung des Lösungsmittels besonders empfindlich sind. Die Tabellen II und III geben die beobachteten R_F -Werte einiger Säuren in sauren Gemischen wieder.

TABELLE II

R_F -WERTE EINIGER SÄUREN FÜR DAS LÖSUNGSMITTEL:
CHLOROFORM-95 % ALKOHOL-AMEISENSÄURE (50:50:2, v/v/v)

Papier: Schleicher & Schüll (Selecta) 2043 b. Temperatur: 18–23°. Aufsteigende Methode.

Säure	Einzelwerte			
Äpfelsäure	0.47	0.445	0.40	
Bernsteinsäure	0.71	0.76	0.72	
Citronensäure	0.39	0.32		
Chinasäure	0.22	0.18	0.17	0.18
Fumarsäure	0.80			
Galacturonsäure	0.05			
Glykolsäure	0.56			
Milchsäure	0.70	0.80	0.74	
Weinsäure	0.23			

TABELLE III

R_F -WERTE EINIGER SÄUREN FÜR DAS LÖSUNGSMITTEL:
WASSERGESÄTTIGTES *n*-BUTANOL-AMEISENSÄURE (95:5, v/v)

Papier: Schleicher & Schüll 2043 b. Temperatur: 18–23°. Absteigende Methode.

Säure	Einzelwerte	
Chlorogensäure	0.68	0.57
Kaffeesäure	0.80	0.74

DER NACHWEIS DER SÄUREFLECKEN AUF DEM PAPIER

Zunächst sei festgestellt, dass die Flecken der Ammoniumsalze der Dicarbon- und Oxycarbonsäuren nach mehrstündigem Trocknen beim Besprühen mit Indikatoren als saure Flecken erscheinen (im Gegensatz zu den Ammoniumsalzen der Fettsäuren, die nach Literaturangaben – vgl. SCHWEPPE² – alkalisch reagieren). Die Hydrolyse ist also unter diesen Bedingungen ziemlich weitgehend. Unter den Nachweis-Reagenzien sind diejenigen vorzuziehen, die dunkle Flecken auf hellem Grunde liefern. Im umgekehrten Falle kann es nämlich gelegentlich zu Zweifeln darüber kommen, ob eine hellere Stelle am besprühten Chromatogramm auf ungleichmässige Besprühung zurückgeht oder einen schwachen Fleck repräsentiert. Dieser Umstand

belastet leider u.a. die Verfahren, die mit AgNO_3 arbeiten, obwohl sie im optimalen Fall eine viel höhere Empfindlichkeit besitzen als die Indikatormethoden (vgl. LÖFFLER UND REICHL¹⁷). Beachtenswert ist das Glucose-Anilin-Verfahren von SCHWEPPE² (S. 120), das dunkle Flecken auf hellem Grunde gibt. Seine Anwendung ist jedoch wegen der giftigen Anilin-Dämpfe wohl nur bei sehr guter Abzugsmöglichkeit während des Besprühens ratsam.

Die vielfach verwendeten Farb-Indikatoren haben den Vorteil, dass das Ergebnis schon während des Sprühens sichtbar wird und eventuelle Unregelmässigkeiten sofort korrigiert werden können. Unter den gebräuchlichen Indikatoren liefert nur das Methylrot dunkle (rote) Säureflecken auf hellem (gelbem) Grunde. Einige orientierende eigene Versuche mit diesem Indikator wurden jedoch stark durch eine Komplikation behindert, mit der andere Autoren offenbar weniger zu kämpfen hatten: Beim Besprühen mit einer Methylrot-Lösung, die durch Zusatz von etwas NaOH auf den alkalischen Farbton (gelb) gebracht worden war, zeigte das Papier wohl zunächst gelbe Farbe, diese schlug jedoch schon nach wenigen Sekunden mehr und mehr nach Rot um. Die Säureflecken waren daher nur wenige Sekunden lang sichtbar, dann verschwanden sie im Untergrund. Ähnlich verhielten sich Bromkresolgrün und Phenolrot. Nur das Bromphenolblau behielt auch auf dem Papier die alkalische Farbe (blau) bei und die Säureflecken erschienen gelb. Ein Vergleich der Umschlagsbereiche der erwähnten Indikatoren zeigt, dass die erstgenannten drei Farbstoffe ihre Halbwertsstufen über pH 4 haben (Methylrot 4.88, Bromkresolgrün 4.67, Phenolrot 7.74). Bromphenolblau hingegen hat seine Halbwertsstufe bei pH 3.67. Das Papier scheint also irgendwelche sauren Substanzen zu enthalten. Da andere Autoren (z.B. BRYANT UND OVERELL¹⁰) mit Bromkresolgrün gute Ergebnisse erzielt haben, erhebt sich die Frage, inwieweit der "pH-Wert" des Papiers von der Papiersorte, vom verwendeten Lösungsmittel oder anderen Faktoren abhängt. Man könnte z.B. an einen Gehalt des Papiers an Oxycellulose (Carboxylgruppen!) denken bzw. an deren Neubildung bei längerer Berührung mit alkalischem Lösungsmittel und Luftsauerstoff. Vielleicht spielt in diesem Zusammenhang auch die Kohlensäure der Luft eine gewisse Rolle. Der ganze Fragenkomplex ist indessen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden.

Von den einfachen Indikatoren ist nach dem oben Ausgeführten das Bromphenolblau am effektivsten. Leider gibt es helle (gelbe) Säureflecken auf dunklem (blauem) Grunde. Ich folgte daher einem Vorschlag von KUNITAKE, STITT UND SALTMAN¹⁸ und verwendete ein Gemisch von Bromphenolblau und Methylrot. Dadurch unterscheiden sich die Säureflecken im Farbton so stark vom Untergrund, dass eine Verwechslung mit Stellen ungleichmässiger Besprühung nicht mehr möglich ist. Die genannten Autoren empfehlen 3 g Bromphenolblau und 1 g Methylrot, in 1 l 95 % Alkohol gelöst. Der letztere Farbstoff gibt, wie erwähnt, rote Säureflecken auf gelbem Grunde, der sehr bald rot wird. Nach Besprühen mit dem Gemisch erscheinen daher zunächst rote Flecken auf blaugrünem Grunde, später rötliche Flecken auf violetterem Grunde. Man darf keinesfalls das oben angegebene Verhältnis zugunsten des Methylrot ändern. Hat man nämlich zu viel Methylrot genommen, dann erscheint der ganze Papier-

bogen schliesslich mehr oder weniger intensiv violett mit ungenügend differenzierten Säureflecken.

Das Sprühreagens muss vor jeder Benützung durch Zusatz von einigen Tropfen N NaOH auf den richtigen pH-Wert eingestellt werden. Es ist am besten, auf ein Probeblatt oder auf eine leere Randstelle des Chromatogramms den Indikator versuchsweise aufzusprühen. Wenn die Umfärbung des Untergrundes von blaugrün nach violett zu rasch erfolgt, muss weitere NaOH zugesetzt werden, bis der blaugrüne Ton einige Minuten lang erhalten bleibt. Unter diesen Umständen erscheinen die Säureflecken rot auf blaugrünem Untergrund und sind so lange beständig, dass sie bequem markiert werden können. Eine Markierung durch Umranden mit Bleistift ist jedenfalls empfehlenswert, weil die Schärfe der Flecken mit der Zeit nachlässt. Es sei aber darauf hingewiesen, dass bei einer anderen Papiersorte diese Operationen möglicherweise modifiziert werden müssen.

Als Säureflecken erscheinen so nicht nur die reinen Carbonsäuren (sowie evtl. vorhandene anorganische Säuren), sondern auch manche Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) sowie Phosphorsäure-Ester von Zuckern u.dgl. Erstere können nach bekannten Methoden (vgl. DÖRFEL¹⁹), an Parallel-Chromatogrammen nachgewiesen werden, letztere mit der Molybdat-Methode von HANES UND ISHERWOOD²⁰, beschrieben bei STANGE²¹ (S. 104) sowie bei RANSON¹ (S. 533), bzw. mittels der Modifikation von BANDURSKI UND AXELROD²² (beschrieben ebenda). Die Molybdat-Methode liefert jedoch nach eigenen Erfahrungen nur dann befriedigende Resultate, wenn ein Kunstgriff angewandt wird, der zwar in der Originalarbeit von BANDURSKI UND AXELROD, nicht aber in den zusammenfassenden Darstellungen erwähnt wird: Die blaue Farbe, die auch der Untergrund annimmt, verschwindet bei Behandlung mit NH_3 -Dämpfen und man erhält blaue Flecken auf farblosem Grunde.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird eine Methode zur Gewinnung von Pflanzenextrakten beschrieben, die darauf ausgerichtet ist, dass einerseits alle im Zellsaft gelösten Stoffe erfasst werden, andererseits eine Durchführung während einer Exkursion unabhängig vom Laboratorium möglich ist.

2. Es werden Arbeitsvorschriften zur Abtrennung einer Säurefraktion aus dem Extrakt mit Hilfe von Ionenaustauschern sowie zu einer Reinigung dieser Fraktion von störenden Substanzen, wie Phenolderivaten und Oxalsäure, angegeben. Ferner wird auf die Möglichkeit hingewiesen, mit Hilfe von Ionenaustauschern einen Pflanzenextrakt in eine Fraktion der Kationen, eine Fraktion der Säuren und eine Fraktion der Nichtelektrolyte aufzutrennen.

3. Es werden die R_F -Werte einer Anzahl von Säuren, hauptsächlich für ein Propanol-Ammoniak-Gemisch als Lösungsmittel, mitgeteilt.

4. Als befriedigendste Methode für den Nachweis von Säuren auf dem Papier hat sich die Verwendung eines Misch-Indikators aus Bromphenolblau und Methylrot erwiesen.

SUMMARY

1. A method is described for the preparation of plant extracts so that while the extracts contain all substances dissolved in the cell sap, it is also suitable for field work and is thus independent of laboratory facilities.

2. Techniques are described for the separation of an acid fraction from the extract by means of ion exchangers, and for the purification of the fraction thus obtained from interfering substances, such as phenol derivatives and oxalic acid. The possibility of separating the plant extract by means of ion exchangers into a cationic, an acid and a non-electrolyte fraction is also indicated.

3. The R_F values of a number of acids are reported, obtained chiefly with a propanol-ammonia mixture as solvent.

4. The detection of acids on paper chromatograms was found to be most satisfactory when a mixture of bromophenol blue and methyl red was used as indicator.

LITERATUR

- ¹ S. L. RANSON, in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. 2, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 539-582.
- ² H. SCHWEPPE, in H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 110-134.
- ³ H. F. LINSKENS, in H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 31-35.
- ⁴ W. S. ILJIN, *Bull. assoc. russe recherches sci. à Prague*, 9 (1939) 48.
- ⁵ H. WALTER, *Ber. deut. botan. Ges.*, 46 (1928) 539.
- ⁶ E. BANCHER UND K. HÖFLER, in H. LINSER, *Grundlagen der allgemeinen Vitalchemie*, Bd. VI, Verlag Urban & Schwarzenberg, Wien-Innsbruck, 1959.
- ⁷ J. WOLF, in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. 2, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 478-538.
- ⁸ K. ZUCKER UND J. F. AHRENS, *Plant Physiol.*, 33 (1958) 246.
- ⁹ K. PAECH, in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. 1, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, S. 1-25.
- ¹⁰ F. BRYANT UND B. T. OVERELL, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 471.
- ¹¹ H. DAECHE, in H. LÜTHJE UND R. BÖSE, *Schriftenreihe zur Chemie*, Heft 3, Otto Salle-Verlag, Frankfurt a. M.-Hamburg, 1959.
- ¹² R. I. CHEFTEL, R. MUNIER UND M. MACHEBOEUF, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 1095.
- ¹³ H. F. LINSKENS, in H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 330-337.
- ¹⁴ H. REINBOTHE, *Pharmazie*, 12 (1957) 732.
- ¹⁵ J. A. BASSHAM UND M. CALVIN, in W. RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Band V/1, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1960, S. 884-922.
- ¹⁶ H. F. LINSKENS, in H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 12-24.
- ¹⁷ J. E. LÖFFLER UND E. R. REICHL, *Mikrochim. Acta*, (1953) 79.
- ¹⁸ G. KUNITAKE, C. STITT UND P. SALTMAN, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 123.
- ¹⁹ H. DÖRFEL, in H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 148-179.
- ²⁰ C. S. HANES UND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- ²¹ L. STANGE, in H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 81-110.
- ²² R. S. BANDURSKI UND B. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 405.