

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER AMINOSÄUREN, ZUCKER UND EINIGER PFLANZENWUCHSSTOFFE

V. JIRÁČEK

*Biochemisches Institut, Naturwissenschaftliche Fakultät der Karls Universität, Prag
(Tschechoslowakei)*

SUMMARY

Quantitative estimation of amino acids, sugars and some plant growth substances

For the quantitative estimation of amino acids, sugars and some indoleglucosinolates (glucobrassicin and neoglucobrassicin) in plant material, modified analytical procedures have been developed, which are based on chromatographic resolution of the substances to be estimated and spectrophotometric determination of these substances in the eluates from the paper chromatograms. Amino acids were determined by spectrophotometric estimation of the relatively stable cadmium complexes of their reaction products with ninhydrin. For the determination of sugars (mono- and oligosaccharides) a modified anthrone reagent was used.

For the quantitative estimation of glucobrassicin and neoglucobrassicin the reaction of these substances with *p*-dimethylaminobenzaldehyde in acid solution which leads to a fluorescent product, was used with success.

Mit der Bestimmung der freien und gebundenen Aminosäuren in biologischem Material hat sich schon eine Reihe von Autoren befasst. Die ausgearbeiteten Methoden haben aber verschiedene grössere oder kleinere Nachteile und entsprechen sehr häufig, besonders bei der Arbeit mit pflanzlichem Material, nicht den an sie gestellten Anforderungen. Aus diesem Grunde entwickelten wir eine einfache und zugleich hinreichend genaue Methode zur Bestimmung von Aminosäuren in biologischem und insbesondere pflanzlichem Material. Wir gingen von dem Befund aus, dass die Reaktion der Aminosäuren mit Ninhydrin nicht stöchiometrisch verläuft und dass die farbigen Reaktionsprodukte unbeständig sind. Unser Verfahren¹ beruht darauf, dass der Extrakt oder das Hydrolysat des biologischen Materials mit Hilfe der ein- oder zweidimensionalen Papierchromatographie je nach Menge und Anzahl der Aminosäuren auf den Gehalt an Aminosäuren untersucht wird. Eindimensionale Trennung der Aminosäuren wird mittels des mehrfachen Entwickelns in dem Lösungsmittelsystem *n*-Butylalkohol-Essigsäure-Wasser (10:1:3) durchgeführt. Bei der zweidimensionalen Technik wird in der I. Richtung in der Lösungsmittelmischung Phenol-Äthylalkohol-Chloroform (2:1:1) mit Zugabe von 0,1% 8-Oxychinolin in einer Atmosphäre von 3% Ammoniak entwickelt und dann in der II. Richtung zweimal in der Mischung *n*-Butyl-

alkohol-Essigsäure-Wasser (10:1:3) entwickelt. Der Nachweis der Aminosäuren auf dem Chromatogramm erfolgt mit einer 0.2%igen Lösung von Ninhydrin in Azeton bei 60° während der Dauer von 10 Min. Dann wird der entstandene Farbstoff gemeinsam mit den Überresten der durch die Reaktion nicht erfassten Aminosäuren mehrmals mit Methylalkohol ausgewaschen. Die Eluate werden dann einer weiteren Reaktion mit 2.5% Ninhydrin in Methylalkohol bei 65° während der Dauer von 20 bis 40 Min. (je nach der Art der Aminosäuren) unterworfen. Das violette Reaktionsprodukt wird dann mit Cadmiumazetat in orangerote Komplexe übergeführt. Diese Komplexverbindungen sind mindestens 72 Std. stabil. Die so gefärbten Lösungen verdünnen wir eventuell mit Methylalkohol und messen die Extinktion bei 500 nm. Wir verfolgten die Eichkurven von 22 Aminosäuren im Konzentrationsbereich von 25 bis 500 µg. In allen Fällen wurde eine lineare Abhängigkeit der Extinktion von der analysierten Menge gefunden. Die Genauigkeit der Bestimmung liegt bei dieser Methode in der Regel im Bereich von ± 4 bis 6%.

Auf Grund der Verfolgung des chromatographischen Verhaltens von 300 Farbstoffen in dem Lösungsmittelsystem *n*-Butylalkohol-Essigsäure-Wasser (10:1:3) fanden wir die Farbindikatoren der Lage der meisten Aminosäuren auf den Chromatogrammen, die in diesem Lösungsmittelsystem entwickelt wurden. Die Verfolgung der Trennung des Farbstoffgemisches, in dem jeder Farbstoff durch sein chromatographisches Verhalten eine bestimmte Aminosäure simuliert, ermöglicht, gleichzeitig den Verlauf der Aminosäurentrennung in der Probe zu beobachten, die parallel auf dem gleichen Chromatogramm aufgetragen wurde, und zwar bei der Anwendung der Technik des mehrfachen eindimensionalen Entwickelns. Als Lageindikatoren der Aminosäuren auf dem eindimensionalen, mit dem oben angeführten Lösungsmittelgemisch entwickelten Chromatogramm eignen sich nachstehende Farbstoffe (beziehungsweise ihre Bestandteile): Orthocyanin 6 G (Cysteinsäure), Thiazinrot (Lysin), Anthracyaninviolett 3 B (Histidin), Dunkelgrün G (Arginin), Karmoisine S (Glutaminsäure und Oxyprolin), Anthosinviolett BBM (Threonin), Nerol VL (Alanin), Nerol B (Prolin), Thionin (Tyrosin und γ -Aminobuttersäure), Phenolrot (Phenylalanin), Helianthin (Isoleucin), Tropeolin OO oder Acridingelb R (Leucin).

Zur Bestimmung der Zucker im biologischen, insbesondere pflanzlichen Material wurde eine abgeänderte kolorimetrische Anthronmethode angewandt². Die Zucker (Mono- sowie Oligosaccharide) im analysierten Extrakt werden papierchromatographisch eindimensional in dem Lösungsmittelgemisch *n*-Butylalkohol-Essigsäure-Wasser (10:1:3) mittels mehrfacher Entwicklung (bis zu fünfmal) getrennt. Die entsprechenden Flächen des chromatographischen Papiers, die die einzelnen Zucker enthalten, werden ohne Detektion ausgeschnitten, in kleine Stückchen zerschnitten und schliesslich mit destilliertem Wasser dreimal unter ständigem Schütteln eluiert. Zum aliquoten Teil des Eluats (höchstens 3 ml von 10 ml des Gesamteluats) wird 0.5 ml einer 2% Anthron-Lösung im Äthylazetat zugefügt und dann unter ständigem Durchschütteln mit konzentrierter Schwefelsäure zu 11 ml aufgefüllt. Die Reaktion der Zucker mit dem Anthronreagens verläuft demgemäss im Milieu von etwa 70% Schwefelsäure; zum Reaktionsverlauf genügt die Wärme, die sich beim Vermischen der konzentrierter Schwefelsäure mit der wässrigen Zuckerlösung entwickelt. Die nötige Reaktionszeit zur maximalen Entwicklung des grünen Reaktionsproduktes der Zucker mit Anthron beträgt 30 Min. Die Verfärbung ist (bei 620 nm) ungefähr 1 Std. nach Beginn der Reaktion beständig. Nach längerer Zeit verschwächt sich die Ver-

färbung nur allmählich. Der mittlere relative Fehler der Bestimmung liegt im Bereich von ± 3 bis 8% .

Zur Bestimmung der wachstumsaktiven Indolglukosinolate Glukobrassicin und Neoglukobrassicin haben wir erfolgreich eine von uns modifizierte fluorimetrische Methode nach KUTÁČEK und Mitarbeiter benutzt³. Glukobrassicin und Neoglukobrassicin wurden aus den Versuchspflanzen, z.B. Raps, mit siedendem Methylalkohol zweimal wiederholt extrahiert, die vereinigten Extrakte im Vakuum im Wasserbad eingedampft und der Rückstand mit Methylalkohol auf 5 ml aufgefüllt. 100 μ l des konzentrierten Extrakts wurden auf das chromatographische Papier Whatman Nr. 1 aufgestrichen und dann im Lösungsmittelsystem *n*-Butylalkohol–Essigsäure–Wasser (10:1:3) 48 Std. lang entwickelt. Auf den beiden Seiten des Chromatogramms wurden Streifen mit den Markierproben abgeschnitten und mit dem PROCHÁZKA-Reagenz (Formaldehyd–Salzsäure–Wasser, 1:1:2) die Lage der beiden getrennten Indolglukosinolate sichtbar gemacht. Auf dem Rest des Chromatogramms wurden die Flächen mit den erwähnten Stoffen ohne Nachweis ausgeschnitten und in kleine Viertel zerschnitten. In Reagenzgläsern wurden dann Glukobrassicin sowie Neoglukobrassicin zweimal wiederholt je 30 Min. mit heissem Wasser ausgewaschen und das Eluat auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt. Im Eluat wurden dann beide Indolderivate nach der Reaktion mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd im saueren Milieu fluorimetrisch bestimmt.

Zu 3 ml des Eluats wurden 2 ml einer 1% *p*-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung in konzentrierter Salzsäure zugefügt und mit destilliertem Wasser auf 8 ml gebracht. Dann wurden die Reagenzgläser mit den Proben im siedenden Wasserbad 12 Min. lang erwärmt. Schliesslich wurden die Reagenzgläser in kaltem Wasser abgekühlt und die Fluoreszenz nach 15 Min. höchstens, aber binnen einer Stunde mit Hilfe eines Hilger–Watts Fluorimeters gemessen (Eintrittsfilter Woods OX 1 mit höchster Durchlässigkeit bei 325 nm, Austrittsfilter Kodak R 558/6 mit höchster Durchlässigkeit bei 400 nm). Der Gehalt an beiden Stoffen wurde dann von der Eichkurve für Glukobrassicin abgelesen. Im Bereich von 0 bis 25 μ g ist die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Menge des Glukobrassicins linear. Der Neoglukobrassicin-Gehalt wurde in Glukobrassicin-Einheiten angegeben. Die Streuung der Ergebnisse betrug bei den Standardproben des Glukobrassicins höchstens $\pm 6\%$, bei dem Pflanzenmaterial höchstens $\pm 9\%$.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die quantitative Bestimmung von Aminosäuren, Zuckern und einigen Indolglukosinolaten (Glukobrassicin und Neoglukobrassicin) im pflanzlichen Material wurden einige modifizierte analytische Verfahren entwickelt. Sie beruhen auf einer chromatographischen Trennung der zu bestimmenden Substanzen und ihrer spektralphotometrischen Bestimmung in den Eluaten dieser Papierchromatogramme. Bei Aminosäuren wurde die spektralphotometrische Bestimmung des relativ stabilen Kadmiumkomplexes des Produktes einer Reaktion der Aminosäuren mit Ninhydrin benutzt. Bei der Bestimmung von Zuckern (Mono- sowie Oligosaccharide) fand ein modifiziertes Anthronreagens Anwendung.

Bei der quantitativen Bestimmung von Glukobrassicin und Neoglukobrassicin

wurde mit Erfolg die Reaktion dieser Substanzen mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in saurer Lösung, die zu einem fluoreszierenden Produkt führt, angewandt.

LITERATUR

- 1 V. JIRÁČEK, J. KOŠTÍK UND B. JIRSÍKOVÁ, *Rostlinná Výroba*, 13 (1967) 165.
- 2 V. JIRÁČEK, A. JINDRA UND V. NAVRÁTIL, *Rostlinná Výroba*, 13 (1967) 1003.
- 3 V. JIRÁČEK, H. FRIDRICHOVÁ, J. KOCOUREK UND M. KUTÁČEK, noch nicht veröffentlicht.

DISCUSSION

Hais: Most, if not all, of the artificial dyes are aromatic compounds and some are "constitutive" in the sense of being strongly adsorbed on cellulose. Thus if among the variables there are some which affect the adsorptive properties of cellulose, the respective positions of dyes and aliphatic compounds (mostly amino acids) are changed. Maybe that under Dr. JIRÁČEK's conditions no such variables were operating. We saw this phenomenon, not only in the positional relationship of dyes and amino acids, but even in that of the aliphatic and aromatic group (tyrosine, phenylalanine, tryptophan) of amino acids. The use of a set of 14 artificial dyes as markers on butanol-acetic acid-water chromatograms of colourless substances has also been reported by CHEBOTAREV*.

We have also used** the ninhydrin colour elution procedure, namely the alternative with copper instead of cadmium***, for the estimation of γ -aminobutyric acid in brain. In this case, the elution of the coloured product was insufficient and erratic if copper was not in excess. We also obtained linear absorbance curves between 1 and 10 μ g; this has permitted us to employ only one level of γ -aminobutyric acid standard (close to the amount expected in the sample), on each one-dimensional sheet. If 10 identical samples of brain extract were applied on different sheets together with the respective standards, the results obtained exhibited a coefficient of variation

$$[\sum (x - \bar{x})^2 / (n - 1)]^{1/2} / \bar{x}$$

of only 1.2%. This would support the good quantitative reproducibility reported by Dr. JIRÁČEK for a similar technique.

* A. I. CHEBOTAREV, *Tr. Vologodsk. Molochn. Inst.*, No 44 (1961) 370; *C.A.*, 58 (1963) 9401f.

** V. CHMELÁK, I. M. Hais AND M. HODÁŇOVÁ, *Acta Biochim. Polon.*, 11 (1964) 327.

*** K. V. GIRI, A. N. RADHAKRISHNAN AND C. S. VAIDYANATHAN, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1677; *J. Indian Inst. Sci.*, 33 (1953) 145.