

CHROM. 7446

Note

Ein verbessertes Einsäulenprogramm zur Analyse der freien Aminosäuren und Säureamide in Pflanzenextrakten

J. OULÉVEY und R. HEITEFUSS

Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Universität Göttingen, Grisebachstr. 6, Göttingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1973; geänderte Fassung eingegangen am 12. März 1974)

Bei der automatischen Analyse von Aminosäuren mit Hilfe von Natriumcitratpuffern ergibt sich im Einsäulenverfahren eine schlechte Trennung der Säureamide von Threonin und Serin¹. Eine Verbesserung ist durch ein zusätzliches Chromatogramm möglich, bei dem die schneller eluierten Säureamide jedoch gleichfalls nicht getrennt werden².

Der Ersatz des Natriums durch Lithium als Bestandteil des Puffergradienten ergibt eine wesentlich bessere Trennung im Bereich der Säureamide³. Die Anwendung des Lithium hat aber den Nachteil einer Verschlechterung der Resolution der basischen Aminosäuren. Dies machte wiederum die Entwicklung von zwei verschiedenen Programmen notwendig, mit deren Hilfe für alle Aminosäuren und Amide gute Trennungen erzielt werden konnten⁴. In dem ersten Programm wird Lithium als Kation eines pH-Gradienten für die sauren und neutralen Aminosäuren, im zweiten Programm werden Lithium und Natrium für die Trennung der basischen Aminosäuren verwendet. Die Notwendigkeit zweier getrennter Säulenprogramme mit Elutionszeiten von 315 bzw. 250 min stellt jedoch als zusätzlicher Aufwand einen erheblichen Nachteil dar.

Wir kombinierten daher die beiden von Lorenz⁴ entwickelten Programme mit dem Ziel, folgende Bedingungen zu erfüllen:

(1) Alle in Pflanzenextrakten vorhandenen Aminosäuren, Säureamide und NH_3 an einer Säule zu trennen.

(2) Einen geeigneten Gradienten mit höchstens vier Puffern im Rahmen der technischen Konzeption des Analysengerätes zu erreichen.

(3) Die Trennung des Extraktes in weniger als 8 Std. zu ermöglichen, um drei Proben je Tag analysieren zu können.

Die Analysen wurden mit dem automatischen Aminosäurenanalysator BC 200 der Firma Biocal (München, B.R.D.) durchgeführt. Die Kapazität der Blasenfangkammer des Gerätes wurde auf 35 ml Flüssigkeitsvolumen vergrößert, um eine Diskontinuität des Gradienten beim Übergang zwischen verschiedenen Puffern zu vermeiden.

Die Zusammensetzung und Eigenschaften der im Einsäulenprogramm (Austauscher Aminex A-6) verwendeten Puffer sind in Tabelle I angegeben. Die pH-Werte sind nicht als absolut feststehend aufzufassen. Da verschiedene Lieferungen des

TABELLE I

ZUSAMMENSETZUNG (g bzw. ml/l) UND CHARAKTERISTIKA DER PUFFER

	<i>Puffer</i>			
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
LiOH	4.8	4.8	6.25	14.4
NaOH	---	4.0	---	---
Zitronensäure	14.1	14.1	17.65	---
NaCl	---	---	14.9	17.5
Na ₃ -Citrat	---	---	---	29.4
Isopropanol	20.0	20.0	---	---
Caprylsäure	0.4	0.4	0.4	0.4
Thiodiglykol	5.0	5.0	5.0	---
25% Brij-35	4.0	4.0	4.0	4.0
18.5% HCl	26.0	35.0	19.0	104.0
pH	2.77	3.1	4.18	5.0
Molarität Li ⁺	0.2	0.2	0.26	0.6
Molarität Na ⁺	---	0.1	0.23	0.6
Molarität Citrat	0.067	0.067	0.084	0.1

TABELLE II

EINFLUSS DER VERMINDERUNG DES pH-WERTES DER PUFFER AUF DIE TRENNLEISTUNG DER SÄULE FÜR VERSCHIEDENE AMINOSÄUREN

<i>pH Verminderung van Puffer</i>	<i>Trennung der angegebenen Aminosäuren und Amide</i>	
	<i>Verbessert</i>	<i>Verschlechtert</i>
<i>A</i>	Asn-Gln	Gly-Ala
<i>B</i>	Val-Cys	Met- <i>allo</i> -Ile
<i>C</i>	Phe- <i>β</i> -Ala	Orn-Lys
<i>D</i>	Orn-Lys	Lys-NH ₂

Austauscherharzes leicht unterschiedliche Trennungen liefern. müssen diese jeweils durch geringe Veränderungen im pH der Puffer durch Einstellung mit HCl oder LiOH bzw. NaOH ausgeglichen werden. Tabelle II gibt einen Überblick über die dadurch zu erzielenden Veränderungen in der Trennleistung der Säule auf Grund unserer entsprechenden Erfahrungen.

Zur schnelleren Regeneration der Säulen nach der Analyse wurde die Molarität des dazu verwendeten LiOH von 0.4 auf 1.0 M erhöht.

Die Programmierung der Puffer und der Säulentemperatur ist in Tabelle III zusammengefasst. Die Ninhydrinpumpe und der Schreiber liefen über einen Zeitraum

TABELLE III

PROGRAMMIERUNG DER PUFFER UND TEMPERATUREN

<i>Zeit (Min)</i>	<i>0</i>	<i>70</i>	<i>140</i>	<i>200</i>	<i>270</i>	<i>340</i>	<i>360</i>	<i>400</i>	<i>450</i>
<i>Puffer</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>OH⁻</i>	<i>A</i>	<i>A</i>
<i>Temperatur, C</i>	30	55	30	30	55	55	55	55	30

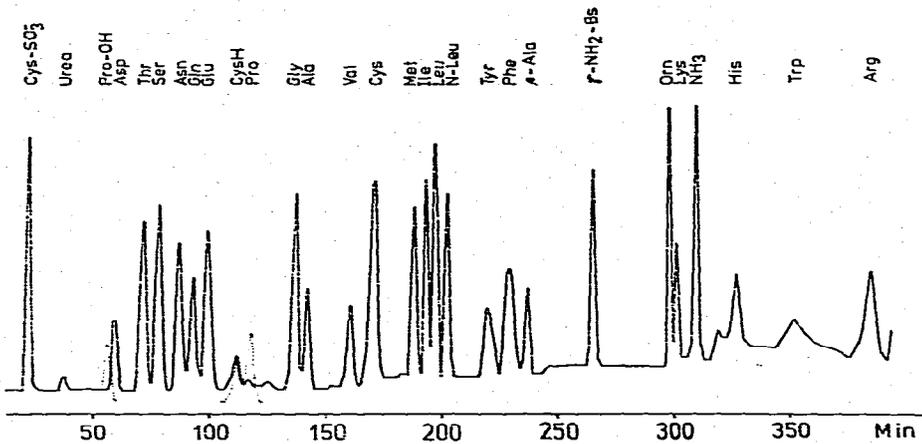


Fig. 1. Trennung der Aminosäuren aus einem Testgemisch. Bs = Buttersäure.

von 400 min. In weiteren 50 min wurde die Säule durch Equilibrieren mit Puffer A von Na^+ -Ionen befreit.

Fig. 1 zeigt das Elutionsprofil eines Testgemisches von Aminosäuren und Säureamiden, Fig. 2 das Elutionsprofil eines Extraktes aus Weizenblättern. Der Pflanzenextrakt wurde durch wiederholte Extraktion des Blattmaterials mit 80%igem Methanol gewonnen, nach Entfernen des Chlorophylls durch Ausschütteln mit Petroläther über einen Kationenaustauscher (Dowex 50, H^+ -Form) von löslichen

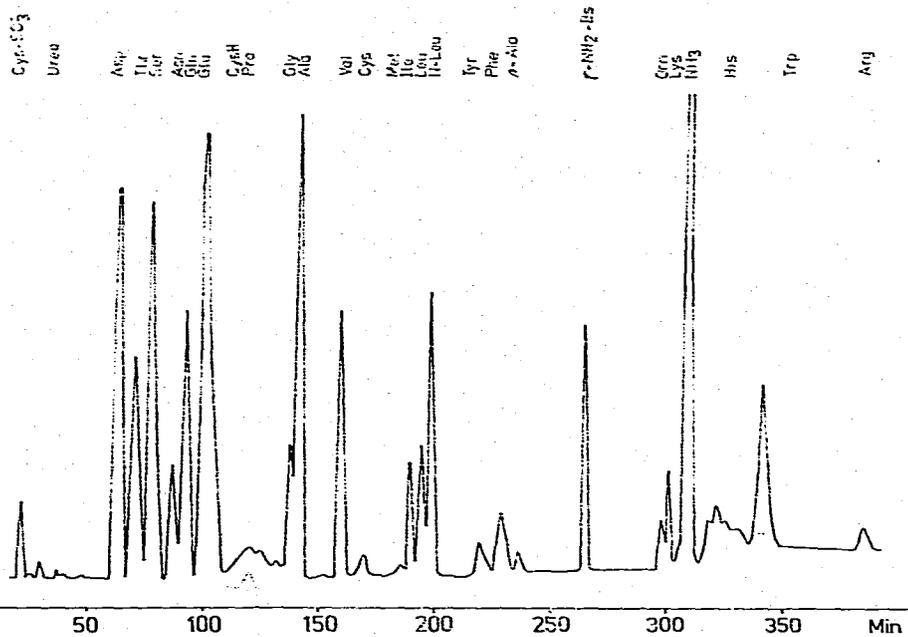


Fig. 2. Trennung der Aminosäuren aus einem gereinigten Pflanzenextrakt (Norleucin als interner Standard).

neutralen Verbindungen getrennt und vom Austauscher mit einer 12%igen NH_3 -Lösung eluiert. Das bis zur Trockne eingeeengte Eluat wurde in Wasser aufgenommen, aliquote Teile, enthaltend 0.25–0.4 mg N mit dem Einspritzpuffer A auf 4 ml aufgefüllt und davon 0.5–1 ml auf die Säule aufgetragen. Der hohe Peak für NH_3 im Chromatogramm des Pflanzenextraktes geht auf die Vorreinigung des Extraktes zurück.

Fig. 2 zeigt die gute Trennung aller im Pflanzenextrakt vorhandenen Aminosäuren und Amide in einem Chromatogramm. Das hier vorliegende Einsäulenprogramm stellt eine wesentliche Vereinfachung der Analyse dieser Verbindungen in nur einem Arbeitsgang dar.

LITERATUR

- 1 S. Blackburn, *Amino acid determination. Methods and Techniques*, Marcel Dekker, New York, 1968.
- 2 H. Lorenz, *J. Chromatogr.*, 27 (1967) 267
- 3 J. V. Benson, M. J. Gordon and J. A. Patterson, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 228.
- 4 H. Lorenz, *Phytochemistry*, 10 (1971) 63.