

CHROM. 12,086

Note

Zum Problem der Haltbarkeit tiefgefrorener Pflanzenextrakte in der Aminosäureanalyse

A. WÜNSCH

Lehrstuhl für Pflanzenernährung, Technische Universität München, 8050 Freising-Weihenstephan (B.R.D.)

(Eingegangen am 6. Juni 1979)

Die Bestimmung der freien Aminosäuren hat sich heute dank der modernen, teils voll automatisierten Bestimmungsverfahren ein weites Feld in der Pflanzenanalyse erobert. Trotz leistungsfähiger und schnell arbeitender Trennapparaturen, stellen diese häufig den Engpass der Untersuchungen dar und es erhebt sich die Frage, wie fertige Pflanzenextrakte am besten zu fixieren sind. Meist wird die Aufbewahrung in tiefgefrorenem Zustand empfohlen¹. Manchmal wählt man eine höhere Äthanolkonzentration, um damit eine Konservierung zu erreichen². Erfahrungsgemäss muss man gelegentlich auf die Extrakte bereits untersuchter Proben nach Wochen wieder zurückgreifen, um evtl. Zweifel auszuräumen bzw. Ergebnisse zu erhärten. Es erschien uns daher von Interesse, die Haltbarkeit von Pflanzenextrakten im tiefgefrorenen Zustand zu prüfen und die Aussagekraft von Wiederholungsanalysen zu testen.

EXPERIMENTELLES

Ein Pflanzenextrakt aus grünen Maisstengeln wurde sofort nach beendeter Extraktion untersucht und der Rest tiefgefroren (-30°). Dasselbe Probe wurde nach 1-5 Tagen, mehreren Wochen bzw. Monaten, bis zu 1 Jahr jeweils (insgesamt mindestens 10 mal) aufgetaut, davon ein aliquoter Anteil analysiert und der Rest jeweils erneut eingefroren. Als Analysator diente das Gerät der Firma Biotronik mit automatischer Auswertung.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Prolin und Phenylalanin liegen in so geringen Mengen vor, dass nur eine qualitative Angabe möglich ist. Eine prozentuale Standardabweichung von 3-5% ist in der Aminosäureanalyse durchaus üblich. In die Reproduzierbarkeit der Einzelwerte gehen auch die Fehler der Bestimmung ein, die für die einzelnen Aminosäuren unterschiedlich sind. Aus der Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert erkennt man die Vermehrung oder Verminderung der Gehalte. Über die gesamte Laufzeit (450 Tage) bleiben demnach die meisten Aminosäuren in den Fehlergrenzen der Methode konstant.

Die Empfindlichkeit der Amide Glutamin (Gln) und Asparagin (Asn) zeigt

TABELLE I

AMINOSÄUREN BZW. AMIDE IM PFLANZENEXTRAKT

Werte sind $\mu\text{mol/g}$ gefriergetr. Substanz.

Amino- säuren bzw. Amide	Untersuchung nach Tagen										Fehlerabweichung*		
	0	1	2	7	14	30	70	135	210	450	\bar{x}	S.D.	C.V. (%)
Asp	7.20	7.18	7.35	7.23	7.31	7.09	7.40	7.04	7.63	7.76	7.31	0.228	3.12
Asn	13.30	12.58	12.64	12.95	12.94	11.50	11.96	10.99	10.51	10.03	11.94	1.131	9.47
Glu	3.47	3.50	3.71	3.48	3.66	3.58	3.58	4.11	3.73	3.98	3.68	0.215	5.84
Gln	10.62	10.51	10.85	10.63	10.89	9.87	9.88	9.26	9.80	8.66	10.10	0.736	7.28
Thr	2.67	2.54	2.43	2.56	2.62	2.59	2.65	2.52	2.42	2.46	2.55	0.088	3.45
Ser	7.60	7.62	7.99	7.70	7.60	7.48	7.78	7.60	7.92	7.30	7.66	0.202	2.64
Gly	1.99	2.01	2.00	1.92	2.07	2.11	2.09	2.17	2.10	2.07	2.05	0.072	3.51
Ala	17.36	17.23	17.69	17.29	18.01	16.71	17.20	17.20	17.47	17.30	17.35	0.340	1.96
Val	1.83	1.77	1.68	1.56	1.87	1.98	2.02	1.65	2.02	1.70	1.81	0.163	9.00
Ile	0.98	0.96	1.01	1.01	1.04	0.99	1.03	0.99	0.99	0.94	0.99	0.030	3.03
Leu	1.07	1.04	1.12	1.10	1.13	1.06	1.07	1.06	0.95	0.90	1.05	0.072	6.86
Tyr	0.88	0.86	0.89	0.88	0.89	0.85	0.85	0.86	0.84	0.80	0.86	0.026	3.02
β -Ala	1.38	1.26	1.19	1.34	1.32	1.30	1.27	1.34	1.20	1.20	1.28	0.067	5.23
GABA	2.38	2.37	2.38	2.47	2.41	2.31	2.39	2.25	2.41	2.22	2.36	0.077	3.26
NH ₃	10.46	11.01	11.20	11.00	10.90	10.59	12.26	12.81	15.08	15.97	12.13	1.944	16.02
Orn	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.10	0.11	0.10	0.12	0.11	0.09	0.017	18.88
Lys	1.03	1.04	1.01	1.05	1.08	1.04	1.06	1.03	1.09	1.05	1.05	0.022	2.09
1-Me-His	0.37	0.40	0.34	0.38	0.40	0.38	0.37	0.36	0.36	0.36	0.37	0.017	4.59
His	0.51	0.50	0.50	0.51	0.52	0.52	0.52	0.50	0.54	0.46	0.51	0.020	3.92
Arg	1.26	1.12	1.16	1.29	1.20	1.21	1.24	1.27	1.33	1.26	1.23	0.062	5.04

* \bar{x} = Mittelwert; S.D. = Standardabweichung; C.V. = relative Standardabweichung.

sich spätestens nach 14 Tagen recht deutlich. Bis zum Endpunkt der Lagerung nehmen Asn um 24.5%, Gln um 18.5% ab, was nicht mit der Angabe von Meister³ übereinstimmt, nach der die Amidgruppe von Asn relativ stabiler als die von Gln sein soll.

Offensichtlich als Folge des Amidabbaues nehmen Asp um 7.7 bzw. Glu um 14.7, sowie der NH₃-Gehalt um über 50% zu. Diese erneut bestätigte Empfindlichkeit der Amide hat schon früher dazu geführt, dass Eichlösungen die Amide erst jeweils kurz vor der Verwendung zugesetzt werden. Die Werte für Val schwanken über das Mass der Fehlerabweichung hinaus recht stark (1–9%) ohne eine Tendenz zu Ab- oder Zunahme erkennen zu lassen. Der Grund liegt wahrscheinlich in der schlecht reproduzierbaren Bestimmung des Val. Ähnliches muss für Leu angenommen werden. Für die starke Veränderung des Orn-Gehaltes (Zunahme um 35%) kann zunächst keine Erklärung gefunden werden. Alle übrigen Werte der Aminosäuren (ausgenommen Asp und Glu) liegen innerhalb der Fehlergrenze der Aminosäurebestimmung (3–5%), was einmal für eine grosse Stabilität der Aminosäuren, zum anderen für eine gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens spricht.

Zur Klärung der Frage, ob die festgestellten Änderungen ein Effekt der Dauer der Lagerung oder des mehrmaligen Auftauens und Wiedereinfrierens darstellen, wurden zwei Proben Maisblätter anderer Herkunft geprüft. Die erste Untersuchung erfolgte nach der Herstellung des Extraktes, die zweite nach einer Tiefkühlagerung des Extraktes von 250 Tagen. In der Tabelle II werden die Werte wiedergegeben, die

TABELLE II

ABWEICHUNGEN IM AMINOSÄURE- UND AMIDGEGHALT VON PFLANZENEXTRAKTEN

Aminosäure	Probe 1			Probe 2		
	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Abweichung (%)	1. Untersuchung	2. Untersuchung	Abweichung (%)
Asp	2.90	3.86	+33	13.28	15.65	+18
Ser	5.75	6.26	+ 9	10.36	11.86	+14
Glu	5.19	4.46	-14	19.27	18.45	- 4
Val	4.80	4.63	- 4.5	1.53	1.53	± 0
Leu	2.69	2.88	+ 7	0.84	1.02	+21
Asn	36.43	30.19	-17	17.72	15.28	-14
Gln	7.58	7.11	- 6	10.00	9.25	- 7
NH ₃	15.77	24.00	+52	13.91	23.35	+67

über das Mass der Fehlergrenze (5%) hinaus sich verändert haben bzw. sich als problematisch (schlecht reproduzierbar) erwiesen haben.

Mit den Untersuchungen in Tabelle I deckt sich, dass NH₃ deutlich (52 bzw. 67%) zunimmt und die Amide merklich abnehmen, Gln wiederum weniger als Asn. Entsprechend der starken Abnahme von Asn nimmt Asp mehr zu. Val bleibt entgegen den früheren Erfahrungen im Bereich des Fehlers konstant, während sich Leu ähnlich wie bisher verhält. Die Zunahme von Ser ebenso wie die Abnahme von Glu sind nicht erklärlich und müssen wohl von der Art des Probematerials abhängen. Jedenfalls wird die Stabilisierung eines Aminosäure-Extraktes durch Tiefgefrieren nicht vollständig gewährleistet, wenn auch die meisten Aminosäuren sowohl durch mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren wie auch nach längerer Lagerung und einmaligem Auftauen reproduzierbar zu bestimmen sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten freien Aminosäuren sich trotz mehrmaligen Auftauens und Wiedereinfrierens über einen Zeitraum von 450 Tagen als recht beständig erwiesen haben, die Säureamide (besonders Asn) sich bereits nach einigen Tagen aber verändern und folglich die Werte ihrer Stammsäuren Asp und Glu zunehmen.

Mit Ausnahme einiger als problematisch anzusehender Aminosäuren (Ser, Leu, Val) kann auch nach längerer Lagerung eine Wiederholung der Analyse zur Überprüfung früherer Werte durchgeführt werden.

LITERATUR

- 1 E. Welte, E. Przemeczek und M. C. Nuh, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 128 (1971) 243.
- 2 E. A. Talley, T. J. Fitzpatrick und W. L. Porter, *J. Food. Sci.*, 26 (1961) 351.
- 3 A. Meister, *Biochemistry of Amino Acids*, Academic Press, New York, London, 2. Aufl., 1965.