

SHORT COMMUNICATION

ZWEI PROGRAMME AUF LITHIUMCITRAT- UND NATRIUM-LITHIUMCITRAT BASIS FÜR DIE ANALYSE DER FREIEN AMINOSÄUREN IN PFLANZENMATERIAL

H. LORENZ

Institut für Pflanzenernährung der Technischen Universität
Hannover, Germany

(Received 13 February 1970)

Abstract—Two programmes are described for the analysis of free amino acids from plant material. The first programme is based on lithium citrate-buffers and can be used to separate acidic and neutral amino acids upto phenylalanine. Basic amino acids are separated using the second programme, which is based on a buffer system composed of lithium and natrium citrate.

BEI DEN bisher für die automatische Aminosäureanalyse eingesetzten Na-Citratpuffern war die Trennung der Säureamide von Threonin und Serin in einem 6-Stundenchromatogramm mit Gradientenelution, zumal in einem Mehssäulenanalysator, nicht möglich. Daher mußte ein zusätzliches Chromatogramm entwickelt werden, in dem die Säureamide in relativ kurzer Zeit in einem 'peak' eluiert wurden.¹ In Einsäulengeräten wurden Glutamin + Asparagin von Threonin und Serin durch Temperaturprogrammierung getrennt.^{2,3}

Neuerdings zeigte sich, daß bei Ersatz des Natriums durch Lithium die Trennleistung im Bereich der Säureamide außerordentlich verbessert wird.⁴⁻⁶ Im folgenden soll über die Anwendung der Li-Puffer, sowie von Kombinationen aus Li- und Na-Citrat bei der Analyse der freien Aminosäuren aus Pflanzenmaterial, wo die Säureamide einen erheblichen Anteil ausmachen können, berichtet werden.

Zum Einsatz kam der automatische Aminosäureanalysator BC-200 der Firma Bio-Cal, München. Folgende Puffer wurden für die Ermittlung der sauren und neutralen Aminosäuren (bis in Höhe des Phenylalanins) verwendet:

Puffer A₁ pH 2,8 0,2 N bezogen auf Li 0,067 M bezogen auf Citronensäure

Puffer B₁ pH 3,0 0,2 N bezogen auf Li 0,067 M bezogen auf Citronensäure

Puffer C₁ pH 3,4 0,2 N bezogen auf Li 0,067 M bezogen auf Citronensäure

Puffer D₁ pH 4,15 0,2 N bezogen auf Li 0,067 M bezogen auf Citronensäure

LiOH 0,2 N

Puffer A₁-C₁, enthalten 8,39g LiOH·H₂O + 14,08g Citronensäure je Liter

Puffer D₁ enthält 10,5 g LiOH + 14,08 g Citronensäure je Liter

¹ H. LORENZ, *J. Chromatog.* **27**, 267, (1967).

² J. L. MANGAN, *4th Amino acid Colloq.* S. 42, Technicon Instr. Co. Ltd. (1966).

³ J. ORESKES, F. CANTOR, S. KUPFER, *Anal. Chem.* **37**, 1720-1723 (1965).

⁴ J. V. BENSON JR., M. J. GORDON und J. A. PATTERSON, *Anal. Biochem.* **18**, 228 (1967).

⁵ F. J. SOWDEN und K. C. IVARSON, *Can. J. Soil Sci.* **48**, 349 (1968).

⁶ P. B. NUNN A. *Vega 6 Amino acid Colloq.* S. 80 Technicon Monograph 3 (1968).

Zur Herstellung der Puffer wurde $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ der Firma Riedel de Haen und Citronensäure p.A. eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit ca 5 N HCl (p.A. Qualität destiliert) mit einem Präzisions-pH-Meter eingestellt. Puffer A_1 enthält 2 Prozent Isopropanol, das sich zur Verbesserung der Trennung der Säureamide von Threonin und Serin besser eignet als andere Alkohole.⁷ Puffer A_1 , B_1 , und C_1 enthalten 0,5 Prozent Thiodiglycol. Zu allen Puffern werden 4 ml/l einer 25 Prozentigen Brij-35-Lösung gegeben.

Abbildung 1 zeigt ein Chromatogramm einer Aminosäuretestmischung. Außerdem sind die Pufferwechsel und die Änderung der Säulentemperatur zu erkennen.

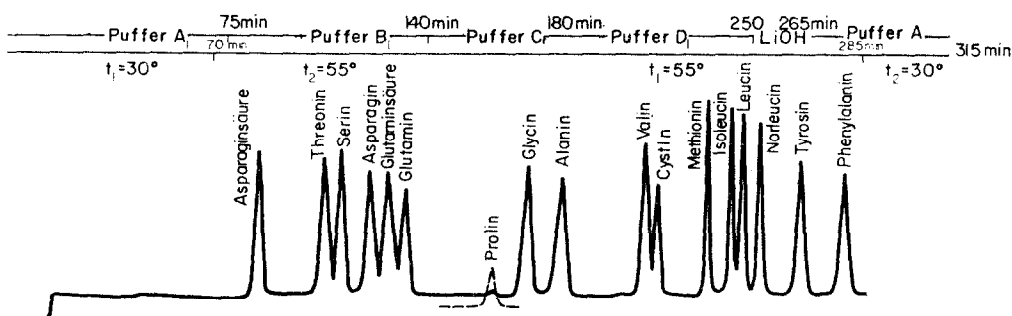


ABB. 1. STANDARDCHROMATOGRAMM, SAURE UND NEUTRALE AMINOSÄUREN ($0,25 \mu \text{ Mol/AMINOSÄURE}$) MIT PUFFER- UND SÄULENBADTEMPERATUR-PROGRAMM. PUFFERDURCHSATZ 70 ml/hr NINHYDRIN-DURCHSATZ 35 ml/hr.

Abbildung 2 ist das Diagramm einer typischen Pflanzenanalyse. Die ausgezeichnete Auftrennung im Bereich der Säureamide, aber auch einiger saurer Komponenten vor der Asparaginsäure ist bemerkenswert.

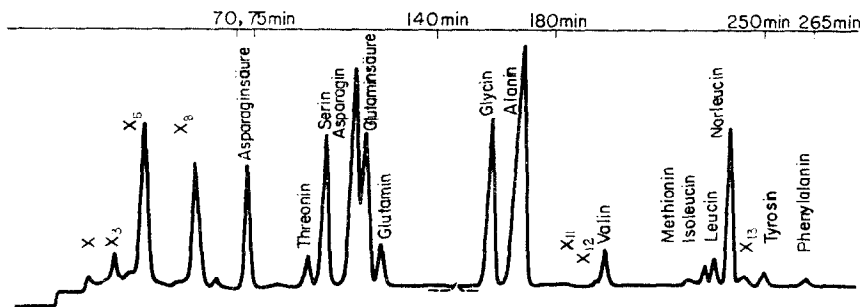


ABB. 2. CHROMATOGRAMM EINES PFLANZENEXTRAKTES, SAURE UND NEUTRALE NINHYDRIN POSITIVE KOMPONENTEN $X_1 - X_{13}$ SIND BISHER NICHT IDENTIFIZIERTE SUBSTANZEN. NORLEUCIN DIENT ALS INTERNER STANDARD.

Mit den vier Puffern, die das verwendete Gerät einzusetzen erlaubte, können die Aminosäuren bis zum Phenylalanin in vernünftiger Zeit eluiert werden (5 Stunden).

Es erscheint nicht ratsam, die Konzentration von Puffer D_1 noch höher zu wählen. Außerdem nimmt die Trennleistung des Li-Systems im Bereich der basischen Aminosäuren

⁷F. SCHEFFER und H. LORENZ, *Phytochem.* 7, 1279 (1968).

ab. Es wurde also erforderlich ein zweites Programm für die Erfassung der basischen Aminosäuren zu entwickeln.

Die Forderung nach möglichst kurzer Zeitdauer und gleichzeitig guter Trennleistung wurde am besten von einer Kombination von Li- und Na-Citrat erfüllt.

Die unterschiedliche Trennleistung der verwendeten Kationen beruht offensichtlich auf deren Hydrathülle, die in der lyotropen Reihe von $\text{Li} > \text{Na} > \text{K}$ abnimmt.

Daraus resultiert ein zunehmendes Eintauschpotential in derselben Reihenfolge. In Vorversuchen nahm bei Verwendung der genannten Kationen die Elutionsgeschwindigkeit der Aminosäuren in der oben erwähnten Reihenfolge zu.

Für die Trennung der basischen Aminosäuren wurden folgende Puffer verwendet:

Puffer A ₂ pH 3,80	0,10 N Li	0,067 M Citronensäure
	0,10 N Na	
Puffer B ₂ pH 4,26	0,19 N Li	0,127 M Citronensäure
	0,19 N Na	
Puffer C ₂ pH 4,26	0,21 N Li	0,144 M Citronensäure
	0,22 N Na	
Puffer D ₂ pH 6,10	0,60 N Li	0,200 M Citronensäure
	0,60 N Na	
LiOH/NaOH	0,10 N Li	
	0,10 N Na	

Die Puffer enthielten je l.:

	tri-Natriumcitrat-2 Hydrat	LiOH·H ₂ O	Citronensäure	NaCl
Puffer A ₂	9,80 g	4,20 g	7,00 g	—
Puffer B ₂	18,65 g	7,97 g	13,30 g	—
Puffer C ₂	21,60 g	8,80 g	14,00 g	—
Puffer D ₂	29,40 g	25,20 g	—	17,53 g

Abbildung 3 zeigt das Diagramm einer Mischung bekannter Aminosäuren. Außerdem ist die zeitliche Abfolge der oben genannten Puffer zu erkennen und die Temperaturprogrammierung. Das zwischenzeitliche Absenken der Temperatur auf 30° ist erforderlich, um das Tryptophan vor dem Ornithin zu eluieren.

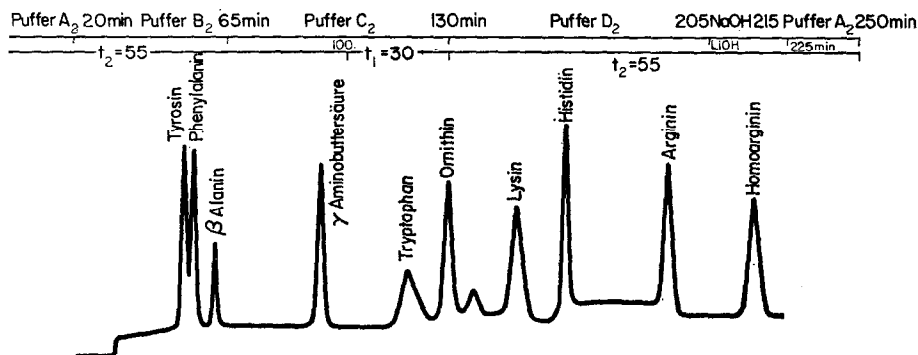


ABB. 3. STANDARDCHROMATOGRAMM, BASISCHE AMINOSÄUREN (0,25 μ Mol/AMINOSÄURE) MIT PUFFER- UND SÄULENBADTEMPERATURPROGRAMM. PUFFERDURCHSATZ 85 ml/hr, NINHYDRIN-DURCHSATZ 42,5 ml/hr.

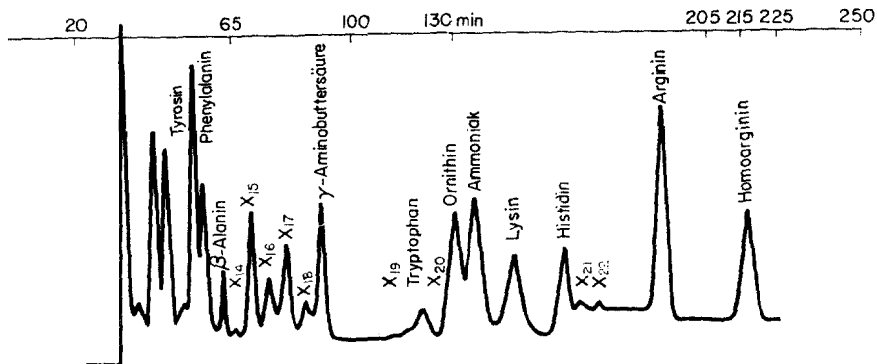


ABB. 4. CHROMATOGRAMM EINES PFLANZENEXTRAKTES, BASISCHE AMINOSÄUREN; $X_{14} - X_{24}$ SIND BISHER NICHT IDENTIFIZIERTE SUBSTANZEN. HOMOARGININ ($0,3 \mu \text{ Mol}$) DIENT ALS INTERNER STANDARD.

Abbildung 4 zeigt eine Pflanzenanalyse. Der Einsatz eines relativ sauren Puffers zu Anfang ist erforderlich, um eine Trennung des β -Alanins von Tyrosin und Phenylalanin zu erreichen, das in den untersuchten Pflanzen vorkommt. Dieser Puffer könnte gegebenenfalls ausgelassen werden.