

# **Eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von zugesetztem oder freiem Methionin und Lysin in Mischfuttermitteln, Vormischungen und physiologischen Flüssigkeiten**

Autor(en): **Gerstl, Rosemarie / Ranfft, K.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **65 (1974)**

Heft 4

PDF erstellt am: **21.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983695>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von zugesetztem oder freiem Methionin und Lysin in Mischfuttermitteln, Vormischungen und physiologischen Flüssigkeiten

*Rosemarie Gerstl und K. Ranfft*

Bayer. Hauptversuchsanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan

### *Einleitung*

Zur Fütterung der Nutztiere werden einerseits pflanzliche Produkte, andererseits aber auch tierische Futtermittel sowie Rückstände, die bei der Verarbeitung von Pflanzen und Tieren zu Lebensmitteln anfallen, verwendet. In den vergangenen Jahren kam es auf dem Weltmarkt zu Versorgungsschwierigkeiten bei Futtermitteln mit hohem Eiweißgehalt, besonders bei Fischmehlen. Um diesen in nächster Zeit kaum zu behebbenden Mangel an tierischem Protein durch Ersatz von pflanzlichem Eiweiß auszugleichen, ist es notwendig, einige der in den Pflanzen häufig nur in geringen Mengen vorkommenden essentiellen Aminosäuren zu supplementieren. Besonders DL-Methionin und L-Lysin werden heute zur Erhöhung der biologischen Wertigkeit des pflanzlichen Proteins den Mischfuttermitteln zugesetzt. Bei Hühnern und Schweinen muß z. B. mindestens 50 % des Bedarfs an schwefelhaltigen Aminosäuren durch Methionin geliefert werden. Die Supplementierung dieser Aminosäuren ist nach dem Futtermittelrecht in vielen Ländern möglich; zur Ueberprüfung des Aminosäurezusatzes bedarf es daher entsprechender Methoden.

### *Bisherige Nachweismethoden*

Zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren sind eine Vielzahl von Methoden entwickelt und beschrieben worden, die zumeist auf der chromatographischen Auftrennung der Aminosäuren beruhen. Für qualitative Untersuchungen liegen papier- und dünnschichtchromatographische (1, 2) sowie elektrophoretische Verfahren (3, 4) vor, die jedoch für eine quantitative Bestimmung nicht geeignet sind. Mikrobiologische Verfahren sind zu arbeitsaufwendig und nicht sehr genau.

Zur quantitativen Bestimmung von supplementiertem Methionin und Lysin wurden colorimetrische Methoden beschrieben (5, 6). Nach Reaktion mit Natrium-Nitroferricyanid kann das Methionin photometrisch bestimmt werden und das

Lysin wird nach Farbreaktion beider Aminosäuren mit Ninhydrin durch Abzug des Methionins rechnerisch ermittelt. Ein anderes Verfahren zur Bestimmung des Lysins bedient sich der Komplexbildung mit Kupfer und anschließender Reaktion mit 1-Fluor-2,3-dinitrobenzol. Diese colorimetrischen Verfahren sind jedoch häufig nicht anwendbar, da als Blindprobe das gleiche Futtermittel ohne Supplementierung parallel untersucht werden müßte, das nicht zur Verfügung steht. Das heute gebräuchliche Verfahren zur Bestimmung der Aminosäuren bedient sich der automatischen Ionenaustausch-Chromatographie nach *Spackman* (7). Diese Geräte, die jedoch nur für Aminosäureuntersuchungen eingesetzt werden können, erbringen in relativ kurzer Zeit sehr gute Ergebnisse (8).

Die Gaschromatographie hat sich in den vergangenen Jahren zu einem sehr universellen Verfahren entwickelt und auch die Aminosäureanalytik bedient sich dieser Bestimmungsmethode (9). Hierzu müssen die Aminosäuren jedoch, da sie wegen ihrer zwitterionischen Struktur schwer flüchtig sind, durch Veresterung in leicht verdampfbare Derivate überführt werden. Zur Derivatisierung und anschließenden gaschromatographischen Auftrennung sind viele Methoden beschrieben worden (10, 11). Diese Verfahren eignen sich nur bedingt zur Bestimmung des kompletten Aminosäuremusters, liefern jedoch für einzelne Aminosäuren und gewisse Probleme sehr gute Ergebnisse.

Die Bestimmung von supplementiertem und freiem Lysin und Methionin mittels Gaschromatographie hat gegenüber den Ionenaustauscher-Methoden den Vorteil, daß die entsprechenden Geräte, die heute in jedem modernen Labor zur Verfügung stehen, universell auch zur Lösung anderer Probleme eingesetzt werden können. Aus diesem Grunde haben wir die vorliegende Methode entwickelt und an Hand von Beleganalysen überprüft.

### *Prinzip der Methode*

Die Aminosäuren werden mit verdünnter Salzsäure extrahiert. Durch eine evtl. vorgeschaltete Soxhletextraktion werden im Mischfutter enthaltene Fette, die eine gleichmäßige Benetzung der Probe verhindern würden, entfernt, so daß die Aminosäuren in Salzsäure vollständig gelöst werden. Ein Aliquotteil des Extraktes wird zur Trockene eingedampft, anschließend werden die Aminosäuren mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid in Acetonitril silyliert und die Reaktionsprodukte gaschromatographisch bestimmt.

### *Beschreibung der Methode*

#### *Geräte*

Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (Perkin-Elmer F 900\*); Vakuumrotationsverdampfer; Soxhletapparatur; Oelbad mit Thermostat; Silylierungsgefäße, die mit einem Septum fest verschlossen werden können (z. B. Reaktionsröhrchen, Fa. Serva, Heidelberg); diverse Glasgeräte.

\* Für die Bereitstellung des Gerätes danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

## Reagenzien

Petroläther Sp. 40—60 ° C; 0,1 n Salzsäure; N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA); Acetonitril p. a., über Calciumchlorid aufbewahrt; Methylenchlorid dest.: Methylenchlorid p. a. wird 30 min am Rückflußkühler über CaCl<sub>2</sub> gekocht und anschließend abdestilliert; Flüssige Phasen: OV 7 und OV 22; Chromosorb G, high performance, acid washed 100—120 mesh; L-Lysin p. a.; DL-Methionin p. a.: Eichlösungen: zum Beispiel 5 mg Aminosäure/ml (in 0,1 n Salzsäure).

## Gaschromatographische Bedingungen

Detektor: Flammenionisationsdetektor.

Injektortemperatur: 275 °.

Detektortemperatur: 235 °.

Säulentemperatur:

- a) für die Bestimmung von Methionin allein: 140 ° isotherm;
- b) für die Bestimmung von Methionin und Lysin: programmiert, von 120 ° bis 225 ° C mit 4 ° C/min;
- c) für die Bestimmung von Lysin allein: 180 ° isotherm oder programmiert, von 150 ° bis 225 ° mit 2,5 ° C/min.

Trägergas: Stickstoff, Durchflußgeschwindigkeit 40 ml/min.

Luft: 500 ml/min.

Brenngas: Wasserstoff. Der Durchfluß wird optimiert.

Herstellung des Säulenmaterials (3 % OV 7 und 1,5 % OV 22 auf Chromosorb G):

Zur Herstellung von 30 g Säulenmaterial 0,9 g OV 7 in einen kleinen Erlenmeyer-Kolben und 0,45 g OV 22 in einen zweiten einwiegen und jeweils mit 20—30 ml Methylenchlorid lösen. In einem 500 ml-Rundkolben zu 28,65 g Chromosorb G soviel Methylenchlorid geben, daß der Flüssigkeitsspiegel einige Zentimeter über dem Chromosorb G steht. Daraufhin die beiden Lösungen der flüssigen Phasen (OV 7 und OV 22) quantitativ mit der Chromosorb G-Aufschlämmung vereinigen und den gesamten Kolbeninhalt am Rotationsverdampfer bei max. 60 ° C zur Trockene eindampfen. Die Säule füllen und mindestens 24 Stunden bei 235 ° ± 5 ° C konditionieren.

## Arbeitsvorschrift

### Extraktionen aus Vormischungen und Mischfuttern

Eine bestimmte Menge (z. B. 5—10 g) abwiegen, in ein Faltenfilter geben und ca. 3—4 Stunden mit Petroläther in der Soxhletapparatur extrahieren. Anschließend den Extraktionsrückstand quantitativ in einen Meßkolben (z. B. 50 ml) überführen und in 0,1 n HCl aufschlämmen. Unter häufigem Umschütteln 10—15 min stehen lassen, zur Marke auffüllen und filtrieren.

## *Silylierung*

Einen Aliquotteil des Extraktes oder des Pansensaftes (0,25—0,50 ml) in ein Silylierungsgefäß pipettieren (Pansensaft mit 1—2 Tropfen konz. Salzsäure zur Ueberführung der Aminosäuren in die Hydrochloride versetzen) und direkt am Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum bei ca. 60 °C Badtemperatur zur Trockene bringen. Zum Abdampfen der letzten Wasserreste werden 0,5 ml dest. Methylenchlorid in das Gefäß gegeben und nochmals am Rotationsverdampfer abgedampft. Nach vollständiger Trocknung des Rückstandes genau 0,5 ml N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) und 0,5 ml Acetonitril zupipettieren, das Gefäß mit dem Septum verschließen und gut umschütteln. Schwer lösliche Rückstände kurz mit Ultraschall behandeln. Anschließend das Gefäß in ein Oelbad von 135 °C stellen. Nach 15 min ist das Methionin vollständig silyliert. Das Gefäß aus dem Oelbad nehmen, kurz unter fließendem Wasser abkühlen und 1—5 µl aus dem geschlossenen Gefäß durch das Septum entnehmen und in den Gaschromatographen einspritzen. Soll auch Lysin bestimmt werden, das Reaktionsgefäß erneut für 3 Stunden im Oelbad auf 135 °C erhitzen. Danach abkühlen und, wie oben beschrieben, 1—5 µl zur Injektion entnehmen.

## *Auswertung*

Die Auswertung der Gaschromatogramme erfolgt über Eichkurven. Die Eichlösungen enthalten 0,5 oder 1,0 mg/ml Aminosäure. Davon wird die entsprechende Menge eingespritzt, nachdem, wie bei den Untersuchungsproben beschrieben, derivatisiert wurde.

Die Auswertung des Chromatogrammes kann von Hand oder mit einem elektronischen Integrator erfolgen. Ergeben sich für Lysin zwei Peaks, die meist nicht vollständig getrennt sind, so müssen die Höhen oder Flächenwerte beider Peaks addiert werden. Dies muß in gleicher Weise bei Probe und Eichlösung geschehen.

## *Diskussion der Methode*

Zur Derivatisierung von Aminosäuren werden meist die Amino- und die Carboxylgruppe nacheinander mit verschiedenen Reagenzien verestert. Die von *Gehrke* (7) vorgeschlagene Methode der Silylierung mit BSTFA ist eine erhebliche Verbesserung. Es wird nur ein Reagenz benötigt, das einfach zu handhaben ist und mit fast allen Aminosäuren sehr gut reagiert.

Bei der Silylierung lagert sich jeweils eine Trimethylsilylgruppe an die Carboxyl- und die Aminogruppe. Außerdem findet diese Reaktion aber auch an Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Iminogruppen und bei basischen Aminosäuren an der zweiten Aminogruppe statt. Aus dem BSTFA entsteht immer das Mono-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid. Andere Substanzen, die zusammen mit den Aminosäuren durch die Salzsäure extrahiert werden, beeinträchtigen die Bestimmung nicht, da sich diese Verbindungen, insbesondere die Zucker, gaschromatographisch von den Aminosäuren gut abtrennen lassen (siehe Abb. 1 und 2). Es sollte aber stets berücksichtigt werden, daß störende Verbindungen ebenfalls Silylierungs-

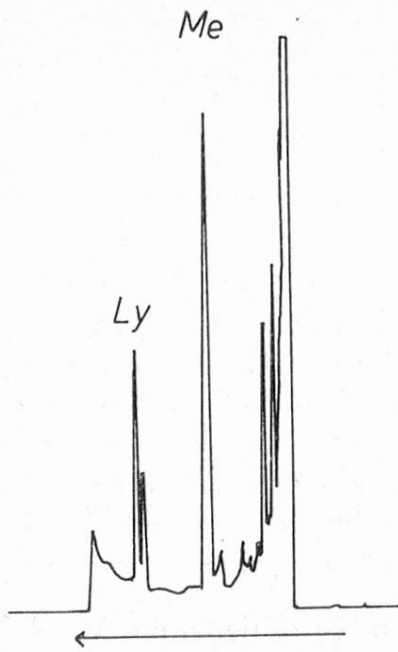


Abb. 1. Chromatogramm einer Lysin- und Methionineichlösung (jeweils 1,5  $\mu\text{g}$ ).

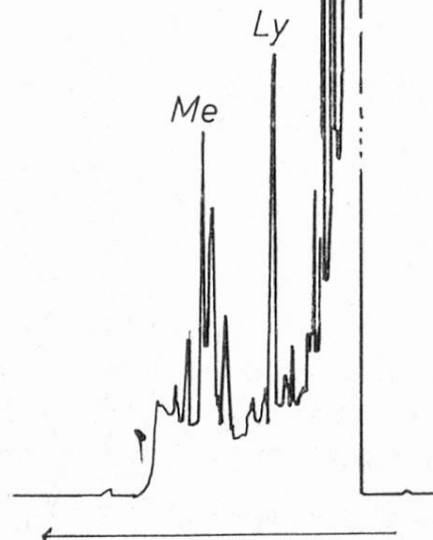


Abb. 2. Chromatogramm des Extraktes eines Eiweißkonzentrates mit supplementierten Aminosäuren.

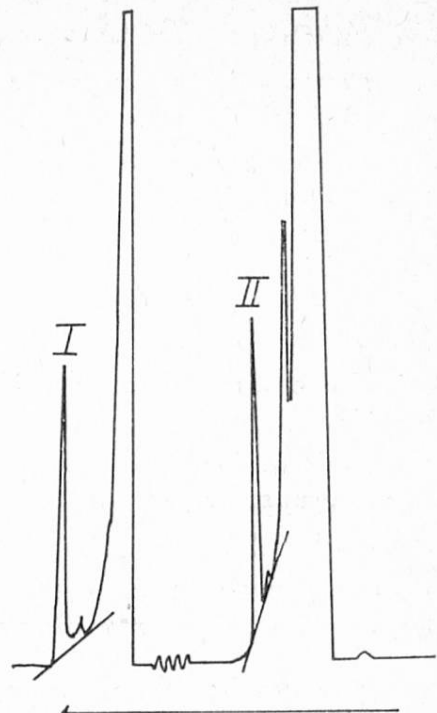


Abb. 3. Methionin-Eichlösung (I), entsprechend 2,5  $\mu\text{g}$  Methionin und Pansen-saft (II).

reagenz verbrauchen und daß dieses in genügender Menge zur Probe gegeben werden muß.

Ein Vorteil der gaschromatographischen Bestimmung liegt in der Wahl der Säulenofentemperaturen, die je nach Problemstellung (Lysin, Methionin oder beide) variiert werden.

Da zur Bestimmung von Lysin und Methionin nebeneinander wegen der unterschiedlichen Reaktionszeiten zwei Injektionen je Probe durchgeführt werden müssen, wurde versucht, Methionin zusammen mit dem Lysin nach 3 Stunden Reaktionszeit zu bestimmen. Es zeigte sich jedoch, daß die Methioninwerte etwas niedriger lagen als nach 15 min, d. h. bei längerer Temperatureinwirkung ist möglicherweise mit weiteren Reaktionen des Di-(trimethylsilyl)-Methionins zu rechnen. Die lange Silylierungszeit für das Lysin ist aus dem Molekülaufbau zu erklären; es besitzt in der  $\epsilon$ -Aminogruppe zwei weitere Stellen zur Veresterung, da beide H-Atome der  $\epsilon$ -Aminogruppe durch den Trimethylsilylrest ersetzbar sind. Die Reaktion an der Carboxylgruppe und der Ersatz je eines Wasserstoffatoms an der  $\alpha$ - und der  $\epsilon$ -Aminogruppe verläuft relativ schnell, das zweite Wasserstoffatom der  $\epsilon$ -Aminogruppe wird erst nach längerer Reaktionszeit ersetzt.

Zur Ueberprüfung der Methode haben wir vor allem Methionin in sehr unterschiedlichen Produkten untersucht. Zahlreiche Versuche haben wir an Pansen-säften durchgeführt, denen für in vitro-Verdauungsversuche steigende Methionin-mengen zugesetzt wurden (Abb. 3).

Weiterhin wurden Vormischungen sowie Mischfutter unterschiedlicher Art untersucht, denen die Aminosäuren in Form der Hydrochloride zugesetzt waren. Einige Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

Tabelle 1. Bestimmung von freiem Methionin in verschiedenen Materialien

Probenart	Einzelwerte (%)		Mittelwert (%)
Pansensaft	0,374	0,362	0,368
	0,165	0,175	0,170
	0,250	0,245	0,248
	0,290	0,300	0,295
	0,908	0,910	0,909
Eiweißkonzentrat	0,720	0,730	0,725
	0,700	0,700	0,70
	0,630	0,610	0,62
Vormischungen	40,0	40,75	40,38
	62,5	61,75	62,13
	38,25	38,50	38,38

Zur statistischen Bewertung der Methode wurden zu verschiedenen Mischfuttermitteln Methionin- und Lysinulagen (als Hydrochloride) gemacht (siehe Tabelle 2). Wie aus dieser Zusammenstellung ersichtlich, wurden zwischen 94,3 und 105,0 % des zugefügten Methionins, sowie zwischen 100 und 102,3 % des Lysins wiedergefunden.

Tabelle 2. Recoveryversuche mit supplementiertem Methionin und Lysin

Probenart	Methionin %				Lysin %			Recovery
	Werte ohne Zulage	Zulage	Werte mit Zulage	Recovery	Werte ohne Zulage	Zulage	Werte mit Zulage	
Vormischung	0,50	0,2	0,67	95,7				
	0,44	0,2	0,63	98,5				
	0,20	0,2	0,42	105,0				
	0,48	0,2	0,70	102,9				
Eiweißkonzentrat	0	0,7	0,66	94,3	0	1,3	1,32	101,5
	0	0,7	0,71	101,4	0	1,3	1,30	100,0
	0	0,7	0,66	94,3	0	1,3	1,30	100,0
	0	0,7	0,72	102,9	0	1,3	1,33	102,3
	0	0,7	0,70	100,0				

Die Auswertung von 9 untersuchten Proben ergab somit für das Methionin eine durchschnittliche Wiederfindung von 99,5 %, für das Lysin betrug dieser Wert, an 4 Proben ermittelt, 100,9 %. Die Untersuchung eines Eiweißkonzentrates, dem Lysin und Methionin zugesetzt wurde, ergab bei 7 Parallelen für Methionin, bei einem Sollgehalt von 7 g/kg, einen Mittelwert von 7,06 g/kg, eine Standardabweichung von 0,24 g/kg und einen Variationskoeffizienten von 3,39 %.

Für Lysin errechnete sich bei einem Sollgehalt von 13 g/kg ein Mittelwert von 13,02 g/kg, eine Standardabweichung von 0,72 und ein Variationskoeffizient von 5,52 %. Für das Lysin lag der Vertrauensbereich der Einzelwerte ( $t[95\%; n = 9] \cdot s$ ) bei 1,63 g/kg und der Vertrauensbereich des Mittelwertes aus 2 Parallelen ( $t[95\%; n = 9] \cdot s/\sqrt{2}$ ) bei 1,15 g/kg. Für das Methionin betrug ersterer Wert 0,54 g/kg und der letztere 0,38 g/kg. Damit schwankten alle in Tabelle 1 aufgeführten Einzelwerte innerhalb des Vertrauensbereiches der Mittelwerte. Die Nachweisgrenzen lagen für das Methionin bei 0,025 µg und für Lysin bei 0,1 µg. Der Zeitbedarf beträgt zur Bestimmung einer Aminosäure ca. 12 min, wenn beide Aminosäuren enthalten sind benötigt man ca. 25 min. Die Präzision des beschriebenen Verfahrens ist damit, gemessen an anderen Aminosäurebestimmungsmethoden als gut anzusehen, denn die von *Fabnenstich* (8) geforderte Genauigkeit der Aminosäureanalytik wird durch die beschriebene Methode hinreichend erfüllt. Damit können in jedem Untersuchungslaboratorium, das über Gaschromatographen verfügt, Kontrollanalysen auf 2 der wichtigsten supplementierten essentiellen Aminosäuren durchgeführt werden.

### Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von supplementiertem oder freiem Methionin und Lysin in Mischfuttern, Vormischungen und physiologischen Flüssigkeiten beschrieben. Die Aminosäuren werden mit verdünnter Salzsäure aus der Untersuchungssubstanz herausgelöst. Ein Aliquotteil davon wird ohne weitere Reinigung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und anschließend mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) in Acetonitril silyliert. Zur gaschromatographischen Trennung wird 3 % OV 7 und 1,5 % OV 22 auf Chromosorb G, h. p. verwendet. Die Auswertung erfolgt über Eichkurven. Genauigkeit und Richtigkeit des Verfahrens sowie dessen Vorteil gegenüber anderen Methoden wird an Hand von Beleganalysen diskutiert.

### Summary

A method for gaschromatographic determination of added or free methionin and lysin in feedstuffs, premixes and physiological liquids is described. The amino-acids are extracted by diluted hydrochloric acid. An aliquot is dried by evaporation and then silylated with N,O-Bis-(trimethylsilyl) acetamid (BSTFA). 3 % OV 7 and 1,5 % OV 22 on Chromosorb G h. p. is used for gaschromatographic separation. The content is calculated by standard curves. Precision and accuracy of the method and its advantages are discussed.

### Literatur

1. *Pakati, G.*: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie. Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin 1966.
2. *Blackburn, S.*: Amino acid determination. Verlag Edward Arnold Ltd., London 1968.



3. *Michl, H.*: Monatsh. Chem. **83**, 737 (1952).
4. *Gross, D.*: Nature **176**, 72 (1955).
5. *Ferrel, R. E., Fellers, D. A.*: Determination of free lysine and methionine in amino acid-fortified wheat. Cereal Chem. **46**, 614—620 (1969).
6. *Finley, J. W., Ferrel, R. E.*: Determination of added lysine in fortified wheat and bulgur. Cereal Chem. **49**, 514—521 (1972).
7. *Spackman, D. H., Stein, W. H., Moore, S.*: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. **30**, 1190—1206 (1958).
8. *Fahnenstich, R.*: Bestimmung von Aminosäuren in Futtermitteln und Mischfuttern: Landwirtsch. Forsch. 26/II. Sonderheft XXI, S. 107—112 (1958).
9. *Gehrke, C. W., Don Roach, Zumwalt, R. W.*: Quantitative gas-liquid chromatography of amino acids in proteins and biological substances. Analytical Biochemistry Laboratories, Inc., Jackson, USA (1968).
10. *Gehrke, C. W., Nakamoto, H., Zumwalt, R.*: Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives. J. Chromatog. **45**, 24—51 (1969).
11. *Gehrke, C. W., Leimer, K.*: Trimethylsilylation of amino acids, derivation and chromatography. J. Chromatog. **57**, 219—238 (1971).

Rosemarie Gerstl  
Dr. Klaus Ranfft  
Bayer. Hauptversuchsanstalt  
für Landwirtschaft  
D-8050 Freising-Weihenstephan