# Eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von Methionin und Lysin in Futtermitteln

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

Objekttyp: **Article**

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

Band (Jahr): **66 (1975)**

Heft 4

PDF erstellt am: **25.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982682

**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.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

**http://www.e-periodica.ch**

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **66**, 413—425 (1975)
Eingegangen 5. Mai 1975. Angenommen 19. Juli 1975

# Eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von Methionin und Lysin in Futtermitteln

*Rosemarie Gerstl* und *K. Ranfft*
Bayer. Hauptversuchsanstalt für Landwirtschaft,
Freising-Weihenstephan

## Einleitung

Für die Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen stehen eine Reihe von Bestimmungsmethoden zur Verfügung, alle sind jedoch wegen der chemischen Aehnlichkeit der Aminosäuren sehr aufwendig und zeitraubend. Peptidgemische können nach teilweiser Spaltung der Proteine mit Hilfe der Elektrophorese oder der Gelfiltration untersucht werden. Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Aminosäuren sind diese Methoden jedoch nicht geeignet, hierzu sind allein chromatographische Auftrennungsverfahren, verbunden mit spezifischen Nachweisreaktionen, verwendbar.

Zum qualitativen Nachweis der Aminosäuren wurde schon vor vielen Jahren die Papierchromatographie verwendet. Sie ist wegen der viel einfacheren Handhabung, der schnelleren Entwicklung der Chromatogramme und der Möglichkeit, durch Eluierung der Flecken eine quantitative Aussage machen zu können, durch die Dünnschichtchromatographie überholt worden. Zur Identifizierung der Aminosäure dient neben einer Reihe spezifischer Reagenzien für den Nachweis einzelner Aminosäuren das in der Eiweißchemie weit verbreitete Ninhydrin. Die bei der Reaktion mit Aminosäuren auftretende Blaufärbung kann für quantitative Messungen herangezogen werden. Diese Reaktion benützt auch die heute in der Hauptsache angewandte Methode der automatisierten Ionenaustauscherchromatographie nach *Spackmann* und Mitarbeitern (1). Nach Reaktion mit den Aminosäuren wird die auftretende Blaufärbung im Absorptionsmaximum gemessen und die Farbintensität in Form von Peaks aufgezeigt. Anschließend wird das Chromatogramm quantitativ ausgewertet. Die dafür benötigten Geräte werden laufend verbessert.

In den letzten Jahren hat sich die Gaschromatographie zu einer universellen Arbeitsmethode entwickelt. Durch dieses Verfahren kann man Stoffe vieler Substanzklassen auch in den geringsten Mengen auftrennen und nachweisen. Die Gaschromatographie wurde deshalb auch zur Aminosäurebestimmung eingesetzt. Da

die Aminosäuren aufgrund ihres polaren Charakters schwer flüchtig sind, müssen sie vor der gaschromatographischen Bestimmung in thermostabile und flüchtige Substanzen umgewandelt werden. Die dabei erhaltenen Derivate lassen sich in zwei Gruppen einteilen. In einem Fall bleibt das Aminosäuremolekül erhalten und es werden nur die funktionellen Gruppen derivatisiert. Dieses Verfahren ist das weitaus gebräuchlichere. Bei den selteneren Methoden wird das Aminosäuremolekül verändert. Hierbei werden entweder die funktionellen Gruppen durch weniger polare Gruppen ersetzt (2, 3, 4) oder das Aminosäuremolekül wird völlig verändert (5, 6, 7, 8).

Bei den ersten in der Literatur erwähnten Veresterungen von Aminosäuren wurden Reaktionen nur an der Carboxylgruppe durchgeführt (9, 10). Bessere Auftrennungen im Gaschromatographen erreichte man jedoch mit Derivaten einiger Aminosäuren, bei denen beide funktionelle Gruppen, d. h. die Aminogruppe durch Acetyl-, Formyl- oder Dinitrophenylreste und die Carboxylgruppe durch einen aliphatischen Rest verestert wurden (11, 12, 13, 14, 15). Wesentliche Verbesserungen erreichte man mit Derivaten, bei denen die Aminogruppen durch den Trifluoracetylrest geschützt wurden, während die Veresterung der Carboxylgruppe mit verschiedensten Alkoholen durchgeführt wurde (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25). Während fast alle bisher erwähnten Autoren nur mit reinen Aminosäuregemischen arbeiteten, wurden von *Gehrke* und Mitarbeitern (26) erstmals die Hydrolysate von reinen Proteinen untersucht, indem N-Trifluoracetylaminosäurebutylester hergestellt und gaschromatographisch aufgetrennt wurden. Eine weitere Verbesserung war die Einführung des Trimethylsilylrestes, da dieser die Aminosäuren schnell und vollständig derivatisierte. Eine Trimethylsilylierung gelingt am besten mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (27). Mit diesem Reagens (BSA) lassen sich die meisten Aminosäuren leicht zu flüchtigen Derivaten umsetzen. Noch günstigere Eigenschaften zeigte das N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) (28, 29, 30).

Die Veresterung der Aminosäuren mit BSTFA erscheint uns als die z. Zt. brauchbarste Methode, weil man auf diese Weise in relativ kurzer Zeit gut flüchtige, gaschromatographisch trennbare Derivate erhält. Für einzelne Aminosäuren liefert dieses Verfahren sehr gute Ergebnisse, andere dagegen lassen sich bisher nur unbefriedigend oder gar nicht bestimmen. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, daß bei der Verbrennung im Flammenionisationsdetektor hauptsächlich Siliciumtetrafluorid entsteht. Bei der Verbrennung der mit BSA erhaltenen Produkte bildet sich dagegen Siliciumdioxid, das den Detektor nach wenigen Einspritzungen stark verschmutzt und dadurch die Empfindlichkeit herabsetzt.

Der Bestimmung der Aminosäuren Methionin und Lysin, die am ehesten in den zur Verfütterung verwendeten Proteinen limitiert sind, kommt deshalb große Bedeutung zu, und sie sollte in möglichst vielen Laboratorien durchgeführt werden können. Da Gaschromatographen heute in der Analytik für sehr viele Probleme eingesetzt werden, zeigt diese Analysenmethode gegenüber der Ionenaustauscherchromatographie einige Vorteile. Die für letztere Methode notwendigen Geräte sind nicht universell verwendbar und können deshalb nur dort rentabel eingesetzt werden, wo größere Mengen an Aminosäureuntersuchungen anfallen.

Alle derzeitig verfügbaren gaschromatographischen Bestimmungsmethoden für Aminosäuren waren nur für die Analyse von reinen Proteinen einsetzbar. Es sollte nun versucht werden, dieses Verfahren auch zur Untersuchung von Futtermitteln, wie z. B. Mischfutter, anzuwenden. Vor einiger Zeit haben wir eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von zugesetztem Methionin und Lysin veröffentlicht (31). Um Mischfuttermittel auch auf ihren Gesamtgehalt an Lysin und Methionin untersuchen zu können, haben wir die vorliegende Methode ausgearbeitet.

## Prinzip der Methode

Das Untersuchungsmaterial wird zur Entfernung von Fetten und Pflanzenfarbstoffen mit Petroläther am Soxhlet extrahiert und nach Perameisensäureoxydation mit 6 n-Salzsäure hydrolysiert. Das Hydrolysat wird mit Hilfe eines Kationenaustauschers gereinigt. Ein Aliquotteil des Eluats wird mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid in Acetonitril silyliert. Nach der gaschromatographischen Auftrennung auf einer Säule, gefüllt mit 3% OV 7 und 1,5% OV 22 auf Chromosorb G, erfolgt die Auswertung über eine Eichkurve.

## Beschreibung der Methode

### *Geräte*

Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor — Vakuumrotationsverdampfer — Soxhletapparatur — Eisbad — Glassäulen zur Ionenaustauscherchromatographie (14 cm × 1 cm) — Oelbad mit Thermostat — Silylierungsgefäße, die mit einem Septum fest verschlossen werden können (z. B. Reaktionsröhrchen, Fa. Serva, Heidelberg) — diverse Glasgeräte.

### *Reagenzien*

R 1 Petroläther Sp. 40—60°C

R 2 6 n-HCl: 491 ml HCl p. a. (37%) mit Wasser zu einem Liter auffüllen

R 3 Perameisensäure: 10 ml 30% Wasserstoffperoxid in einen 100-ml-Meßkolben geben und mit Ameisensäure p. a. 98% zur Marke auffüllen. Diese Mischung 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen und vor Gebrauch 10 min in ein Eisbad stellen.

R 4 Kationenaustauscherharz Dowex 50 WX 8 (50—100 mesh)

R 5 3 n-Ammoniaklösung

R 6 3 n-Salzsäure

R 7 N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA)

R 8 Acetonitril p. a. über $CaCl_2$ aufbewahrt

R 9 n/10-Salzsäure
R 10 flüssige Phasen für die Gaschromatographie: OV 7 und OV 22
R 11 Trägermaterial: Chromosorb G; h. p., 100—200 mesh
R 12 DL-Methionin p. a.
R 13 L-Lysin-HCl p. a.
R 14 Methioninsulfon p. a.
R 15 Aethanol abs. p. a.
R 16 Eichlösungen der Aminosäuren (R 13, R 14) 5 mg/ml in n/10 HCl
R 17 1 n-Salzsäure
R 18 Methylenchlorid p. a.

### *Gaschromatographische Bedingungen*

Detektor: Flammenionisationsdetektor — Injektortemperatur: 275°C — Detektortemperatur: 235°C — Säulenofentemperatur: Initialtemperatur 150°C, 7 min, dann 2°C/min bis 225°C — Trägergas: Stickstoff, 40 ml/min — Luft: 500 ml/min — Brenngas: Wasserstoff, der Durchfluß wird optimiert.

### *Herstellung des Säulenmaterials*

Zur Herstellung von 30 g Säulenmaterial jeweils 0,9 g OV 7 (R 10) und 0,45 g OV 22 (R 10) in einen kleinen Erlenmeyerkolben einwiegen und in 20—30 ml Methylenchlorid (R 18) lösen. In einem 500-ml-Rundkolben zu 28,65 g Chromosorb G (R 11) soviel Methylenchlorid (R 18) zufügen, daß der Flüssigkeitsspiegel einige Zentimeter über dem Chromosorb steht. Daraufhin die beiden Lösungen der flüssigen Phasen (OV 7 und OV 22) quantitativ mit der Aufschlämmung des Trägermaterials vereinigen und den gesamten Kolbeninhalt am Rotationsverdampfer bis max. 60°C zur Trockene bringen. Das fertige Säulenmaterial in eine Glassäule (1,8 m×0,6 cm) füllen und mindestens 24 Stunden bei 235°C konditionieren.

### *Arbeitsvorschrift*

*Fettextraktion*

5—10 g der fein gemahlenen Probe (1 mm) in der Soxhletapparatur mit Petroläther (R 1) 2—3 Stunden extrahieren. Das extrahierte Fett quantitativ bestimmen. Bei der endgültigen Berechnung des Analysenergebnisses den ermittelten Fettgehalt berücksichtigen.

*Perameisensäureoxydation*

500 mg des entfetteten Untersuchungsmaterials in einen 500-ml-Rundkolben mit Schliff einwiegen, 100 ml kalte Perameisensäure (R 3) zugeben, den Kolben

mit einem Glasstopfen verschließen und gut umschütteln. Parallel kann zur Ueberprüfung der Wiederfindung in einem weiteren Kolben eine Probe mit Zulage von Methionin und Lysin angesetzt werden. Hierzu die in der Einwaage etwa zu erwartenden Mengen an Lysin und Methionin in Form ihrer Eichlösungen (R 16) pipettieren, am Rotationsverdampfer trocknen und, wie oben beschrieben, mit Perameisensäure versetzen (R 3). Die Kolben bei etwa 4°C für 15 Stunden im Kühlschrank lagern. Nach der Oxydation die Perameisensäure am Vakuumrotationsverdampfer bei ca. 25°C abdestillieren. Sobald noch etwa 1—2 ml im Kolben sind, den Rückstand mit ca. 50 ml dest. Wasser versetzen und am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C zur Trockene einengen.

*Hydrolyse*

Den Rückstand mit 350 ml 6 n-Salzsäure (R 2) versetzen, auf den Kolben einen Kugelkühler setzen durch den ein Gaseinleitungsrohr auf den Boden des Kolbens führt und 25 Stunden unter Stickstoffdurchfluß (1—2 Blasen je Sekunde) leicht sieden lassen. Den noch heißen Kolbeninhalt durch eine Glasfilternutsche 3 G 3 filtrieren. Kolben und Nutsche mit heißem dest. Wasser nachwaschen. Anschließend das Filtrat bei 45°C Badtemperatur am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml einengen. Nach Belüftung unter Stickstoff mit ca. 70 ml Aethanol (R 15) versetzen und wie vorgehend beschrieben, zur Trockene eindampfen. Den Rückstand in genau 5 ml n/10 Salzsäure (R 9) aufnehmen. Falls die Lösung trüb ist, durch Filtration klären.

*Kationenaustauscherreinigung*

1. Vorbereitung der Säule

   Je Säule 2 g Dowex 50 WX 8 (R 4) abwiegen und in 3 n-Ammoniak (R 5) in einem Becherglas aufschlämmen. Ueber eine Glasfilternutsche absaugen und den Rückstand ebenso noch 2mal in 3 n-$NH_4OH$ aufschlämmen, anschließend in der Nutsche neutral waschen. Dann 3mal in 3 n-HCl (R 6) aufschlämmen, absaugen und neutral waschen. Den Ionenaustauscher quantitativ mit dest. Wasser in ein Becherglas überführen. Anschließend in eine Chromatographiesäule, die unten mit Glaswolle verschlossen ist, eingießen und das Wasser so weit ablaufen lassen, daß die Flüssigkeit gerade über dem Ionenaustauscher steht.

2. Ionenaustauscherreinigung

   2 ml des salzsauren Hydrolysats auf die Säule geben und mit einer Auslaufgeschwindigkeit von 20—30 Tropfen/min einsickern lassen. Die Säule 2mal mit 2 ml n/10 HCl (R 9) und anschließend 3mal mit 3 ml Wasser waschen. Bis hierher alle Eluate verwerfen. Die Aminosäuren dann 4mal mit 3 ml

3 n-$NH_4OH$ (R 5) eluieren und 3mal mit 3 ml Wasser nachwaschen. Dieses Eluat in einem 100-ml-Rundkolben auffangen.
Das Eluat am Rotationsverdampfer bei ca. 30°C auf ca. 1 ml einengen, mit 15 ml Aethanol (R 15) versetzen und zur Trockene eindampfen. Unter Stickstoffatmosphäre belüften und den Rückstand in genau 1 ml 1 n-Salzsäure (R 17) aufnehmen.

*Silylierung*

Bei Proteingehalten bis ca. 40% 0,5 ml, bei höheren Gehalten 0,25 ml des salzsauren Eluats in ein Reaktionsröhrchen pipettieren, mit etwa 0,5 ml Aethanol (R 15) versetzen und am Rotationsverdampfer zur Trockene einengen. Dabei darf das Gefäß bis zum vollständigen Entgasen der Lösung nicht beheizt werden (ca. 15 min), da sonst leicht Siedeverzüge auftreten können. Anschließend das Gefäß in ein Wasserbad von Zimmertemperatur bringen und langsam auf ca. 45°C aufheizen. Den Rückstand mit Stickstoff begasen, mit ca. 1 ml Aethanol (R 15) versetzen und nochmals zur Trockene einengen. Zu jeder Probe 0,5 ml Acetonitril (R 8) und 0,5 ml BSTFA (R 7) geben und nach Verschluß mit einem Septum für 3 Stunden (± 15 min) im Oelbad bei 135°C silylieren. Anschließend 1—5 µl dieser Lösung in den Gaschromatographen einspritzen.

*Auswertung*

Die Auswertung erfolgt über eine Eichkurve. Hierzu werden z. B. je 0,2 ml Aminosäureeichlösung (entsprechend je 1 mg Methioninsulfon und Lysin-HCl) in ein Reaktionsröhrchen pipettiert und wie beschrieben eingedampft und silyliert. Von dieser Eichlösung werden 1—5 µl in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Auswertung des Chromatogrammes kann über die Peakhöhen oder mit einem elektronischen Integrator erfolgen. Ergeben sich für Lysin zwei Peaks, die dann 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

Futtermittel haben unterschiedlich hohe Fettgehalte. Diese setzen die Benetzbarkeit des Probenmaterials herab und bringen eine zusätzliche Verunreinigung des Hydrolysates. Deshalb werden alle ätherlöslichen Substanzen vor der Hydrolyse beseitigt. Bei der salzsauren Hydrolyse und der nachfolgenden Aufarbeitung des Hydrolysats wird Methionin, selbst unter Stickstoffbegasung, teilweise zu Methioninsulfoxid oxydiert (32). Letzteres ist zwar gaschromatographisch bestimmbar und zusammen mit dem nicht oxydierten Anteil könnte das Methionin

nach Derivatisierung quantitativ bestimmt werden. Wir haben uns jedoch für die von *Heese* (33) vorgeschlagene Methode der Perameisensäureoxydation entschieden. Das so einheitlich aus dem Methionin entstehende Methioninsulfon erscheint, gut von den anderen Aminosäuren abgetrennt, im Chromatogramm als ein einziger Peak. Die überschüssige Perameisensäure, die das Methioninsulfon evtl. weiter oxydieren könnte, wird nach der Methode von *Heese* nicht, wie von *Weidener* (34) vorgeschlagen, mit Natriumpyrosulfit, sondern mit Bromwasserstoff zerstört. Das dabei entstehende Brom, überschüssiger Bromwasserstoff und Ameisensäure werden abdestilliert.

Wir konnten jedoch nachweisen, daß die arbeitsaufwendige Behandlung mit Bromwasserstoff entfallen kann. Das Methioninsulfon ist nämlich stabil, wenn die Perameisensäure, wie von *Hüni* (35) vorgeschlagen, bei niederer Temperatur abdestilliert wird. Bei Untersuchung eines Schweinemastalleinfutters mit und ohne Bromwasserstoffbehandlung und jeweils 3 Parallelen wurden folgende Mittelwerte festgestellt: Bei HBr-Behandlung fanden wir einen Lysingehalt von 1,1% und einen Methioningehalt von 0,44%, ohne HBr-Behandlung lag der Lysingehalt bei 1,1% und der Methioningehalt bei 0,50%.

Die Hydrolyse führen wir nach der heute allgemein üblichen Methode mit 6 n-Salzsäure für eine Dauer von 24 Stunden bei 110°C und unter Stickstoffbegasung durch (36, 37, 38). Die seltener durchgeführte Hydrolyse in Ampullen (40, 41) wurde von uns nicht geprüft. Die von *Gehrke* (39) für reine Proteine vorgeschlagene Hydrolyse in verschlossenen Reaktionsgefäßen mit 6 n-HCl bei 145°C für 4 Stunden ergab selbst bei einer verminderten Einwaage von 15 mg Futtermittel schlecht reproduzierbare Ergebnisse. Dies ist wahrscheinlich auf Reaktion der Aminosäuren mit Zuckern nach Art der Maillard-Reaktion (42) und auf eine bei derartig niedrigen Einwaagen sich zwangsläufig ergebende Inhomogenität der Probe zurückzuführen. Ein Zusatz von Zinn-II-Chlorid (34) zeigte ebenfalls keine Verbesserung gegenüber der Begasung mit Stickstoff. Der Zusatz von Phenol (43), der Verluste durch Reaktion mit den vorhandenen Kohlenhydraten vermeiden soll, wurde nicht überprüft.

In der Literatur wird häufig über Verluste an frei vorliegenden Aminosäuren während der Hydrolyse berichtet (36). Dies konnte von uns nicht bestätigt werden. Bei Untersuchung von Maisproben, denen Lysin und Methionin in Form der Hydrochloride zugesetzt wurde, traten keine Verluste auf (siehe Tabelle 1).

Bei der Analyse von reinen Proteinen, wie z. B. gereinigtem Sojaprotein, können Aliquotteile des Hydrolysates ohne ionenaustauscherchromatographische Reinigung direkt silyliert werden. Bei der Analyse von Mischfuttermitteln z. B. ist jedoch das Gaschromatogramm sehr unübersichtlich und schlecht auszuwerten. Die bei diesen Futtermitteln notwendige Ionenaustauscherchromatographie wurde auf Verluste an den entsprechenden Aminosäuren überprüft. Hierzu wurden zu einem Tiermehl, dessen Gehalt an Methionin wir mit 0,47% bestimmten, steigende Mengen, d. h. 2, 5 und 15 mg Methionin zugefügt und das Hydrolysat über einem Kationenaustauscher gereinigt. Die Wiederfindung bei diesen Versuchen betrug 105%, 102% und 108%. Damit konnten wir nachweisen, daß bei Einhaltung der in der Methodenvorschrift angegebenen Arbeitsbedingungen keine Ami-

*Tabelle 1. Wiederfindung von zugesetztem Methionin und Lysin*

| Material | Lysin | | | | Methionin | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ohne Zulage % | Zulage % | gefunden % | Recovery % | Ohne Zulage % | Zulage % | gefunden % | Recovery % |
| Mais | 0,24 | 0,81 | 1,15 | 109 | 0,50 | 1,00 | 1,43 | 95 |
| Tiermehl | 2,50 | 1,00 | 3,40 | 97 | 0,98 | 1,00 | 2,08 | 105 |
| Mischfutter | 0,93 | 0,29 | 1,20 | 98 | — | — | — | — |
| Eiweißkonzentrat | 3,72 | 0,75 | 4,60 | 103 | 1,65 | 0,28 | 1,93 | 100 |

nosäureverluste durch die Ionenaustauscherchromatographie auftreten. Eine zusätzliche Reinigung über einen Anionenaustauscher war nicht notwendig, da die Gaschromatogramme, selbst von Mischfuttermitteln, nach der Kationenaustauscherreinigung gut auswertbar waren (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2).

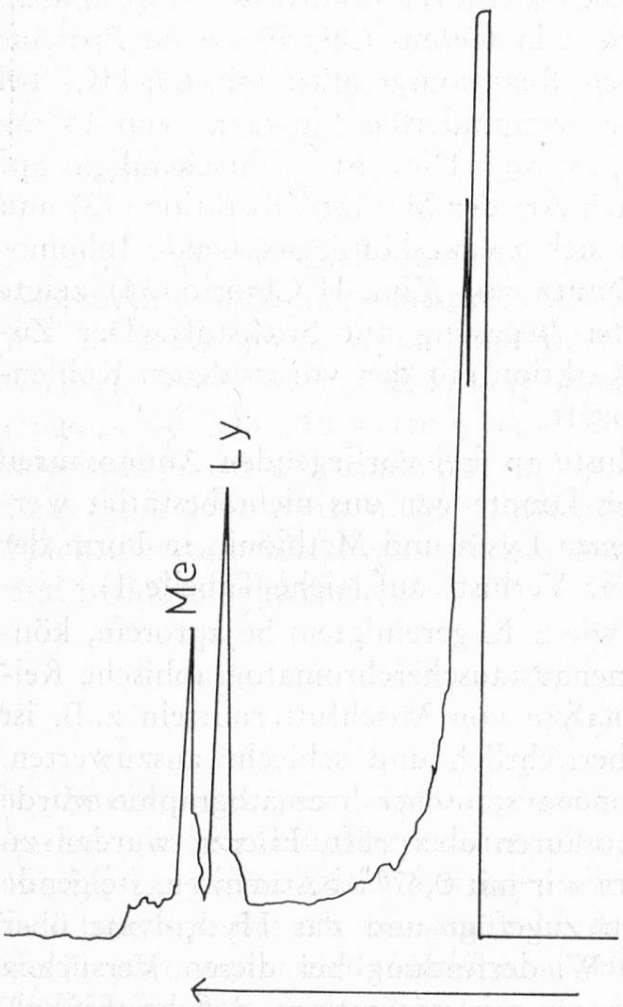


Abb. 1. Gaschromatogramm einer Lysin- und Methionineichlösung.

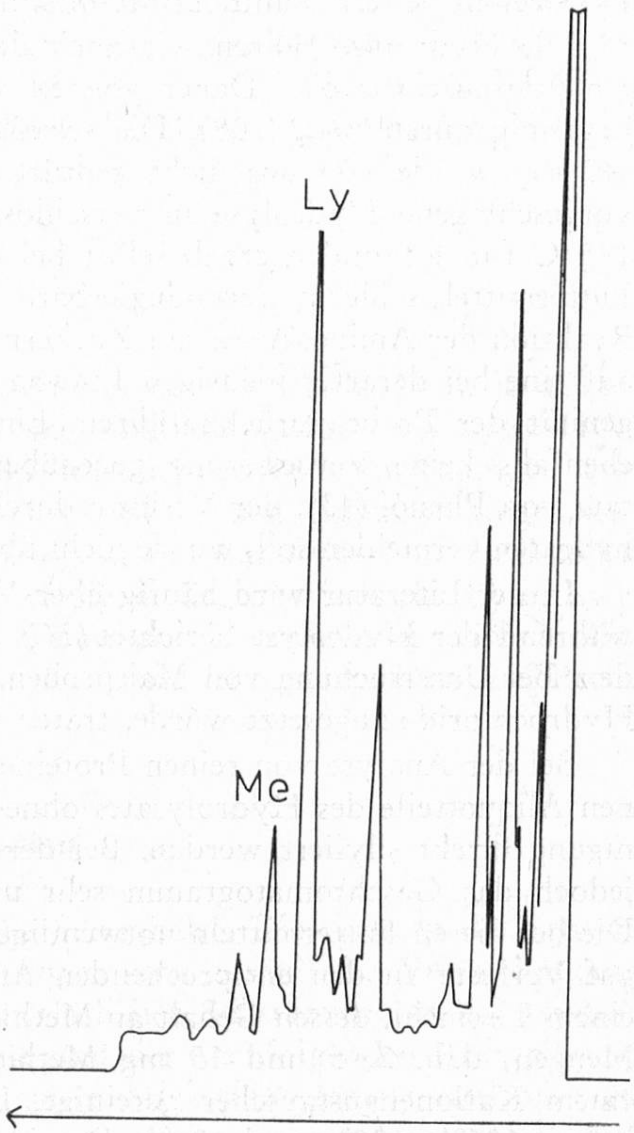


Abb. 2. Gaschromatogramm eines Mischfuttermittels

Bei der Derivatisierung der Aminosäuren ist darauf zu achten, daß die in der Methodenvorschrift angegebene Menge BSTFA zur Probe gegeben wird, damit eine vollständige Silylierung erreicht wird (44).

Zur Ueberprüfung der Richtigkeit des Verfahrens haben wir den Lysin- und Methioningehalt von Lysozym, einem in seiner Aminosäurezusammensetzung genau bekannten Protein, untersucht. Nach der Literatur beträgt der Gehalt für Lysin 6,1% und für Methionin 2,1%. In unseren Versuchen fanden wir ohne Ionenaustauscherchromatographie für Lysin 6,13% und für Methionin 2,30%. Bei Reinigung über einen Kationenaustauscher betrugen die Werte 5,9% bzw. 2,31%. Die Richtigkeit des Verfahrens kann somit als zufriedenstellend bezeichnet werden. In einer weiteren Richtigkeitsprüfung haben wir Mischungen aus Mais (M) und Fischmehl (F), deren Gehalte wir vorher bestimmten, untersucht. Die entsprechenden Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

*Tabelle 2. Untersuchung von Mais mit steigenden Fischmehlzusätzen*

| | Lysin | | | Methionin | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mais | 0,24% | | | 0,50% | | |
| Fischmehl | 5,0 % | | | 0,96% | | |
| | gefunden | Soll | Recovery | gefunden | Soll | Recovery |
| M : F = 2 : 1 | 1,68% | 1,83% | 91,8% | 0,69% | 0,63% | 106,2% |
| M : F = 1 : 1 | 2,84% | 2,62% | 108,4% | 0,73% | 0,73% | 100,0% |
| M : F = 1 : 2 | 3,51% | 3,41% | 102,9% | 0,82% | 0,81% | 101,2% |
| M : F = 1 : 4 | 3,75% | 4,05% | 92,6% | 0,90% | 0,87% | 103,4% |

Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, wurden zwischen 91,8 und 108,4% des Fischmehl-Lysins wiedergefunden und zwischen 100,0 und 106,2% des Methionins. Zur Ueberprüfung der Richtigkeit des Verfahrens haben wir in diesem Fall die Aminosäuren nicht in Form ihrer Hydrochloride zugelegt, sondern in Form eines Fischmehlproteins, da wir der Meinung sind, daß nur so Fehler, die bei der Untersuchung von kohlehydratreichem Material auftreten können, besser aufgedeckt werden. Bezeichnet man mit X den Sollwert nach Mischung beider Komponenten und mit Y den gefundenen Wert, so errechnet sich für den Lysingehalt bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,96 und einem Bestimmtheitsmaß von 92% eine Regressionsgleichung von $Y = 0{,}16 + 0{,}93\,X$. Für den Methioningehalt lautet diese Gleichung bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,97 und einem Bestimmtheitsmaß von 94% $Y = 0{,}05 + 0{,}94\,X$. Aus beiden Gleichungen ersieht man, daß die aus den Einzelkomponenten errechneten Sollgehalte mit hinreichender Genauigkeit wiedergefunden werden.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens untersuchten wir ein Maisschrot. Für 7 Parallelen ergab sich für das Lysin ein Mittelwert von 0,24% und eine Standardabweichung von 0,017%. Damit beträgt der Variationskoeffizient 7,25%. Für das Methionin errechnete sich bei einem Mittelwert von 0,47% eine Standardabweichung von 0,046% und ein Variationskoeffizient von 9,85%. Weiterhin untersuchten wir ein Mischfutter mit 10 Parallelen. Hierbei errechnete sich für das Lysin ein Mittelwert von 0,98%, eine Standardabweichung von 0,043% und ein Variationskoeffizient von 4,46%. Diese Ergebnisse decken sich mit den von *Heese* (36) angegebenen Zahlen für das Verfahren der Ionenaustauscherchromatographie. Die Nachweisgrenzen lagen für Methioninsulfon und Lysin bei 0,1 µg (31). Mit Hilfe der beschriebenen Methode können nun auch zwei der wichtigsten essentiellen Aminosäuren mit hinreichender Genauigkeit in Labors bestimmt werden, die nicht über automatische Aminosäureanalysatoren verfügen.


## *Zusammenfassung*

Es wird eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von Lysin und Methionin in Futtermitteln beschrieben. Das Untersuchungsmaterial wird nach einer Petrolätherextraktion und anschließender Perameisensäureoxydation mit Salzsäure hydrolysiert. Das Hydrolysat wird mit Hilfe eines Kationenaustauschers gereinigt und mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid 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 werden an Hand von Beleganalysen diskutiert.

## *Résumé*

Une méthode d'identification et de dosage par chromatographie en phase gazeuse de la lysine et de la méthionine dans les fourrages est décrite. Le fourrage est hydrolysé avec de l'acide chlorhydrique après une extraction à l'éther de pétrol et une oxydation à l'acide performique. L'hydrolysat est purifié à l'aide d'un échangeur d'ions cationique, puis silylé avec de la N,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoracétamide dans l'acétonitrile. Pour la séparation par chromatographie en phase gazeuse, il est utilisé 3% de OV 7 et 1,5% de OV 22 sur chromosorb G, h. p. La teneur est déterminée par courbe d'étalonnage. La précision et l'exactitude de la méthode sont discutées.

## *Summary*

A method for gaschromatographic determination of lysine and methionine in feedstuffs is described. The material is hydrolysed with hydrochloric acid after extraction with petrolether and oxidation by performic acid. The extract is cleaned by a cation-exchangechromatography and silylated by N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamide. 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 are discussed.

## *Literatur*


1. *Spackmann, D. H., Stein, W. H.* and *Moore, S.:* Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. **30**, 1190—1206 (1958).
2. *Wagner, J.* und *Rausch, R.:* Gaschromatographische Trennung und Bestimmung von Aminosäuren. Z. anal. Chem. **194**, 350—356 (1963).
3. *Liberti, A.* and *Desty, D. H.:* Gaschromatography, S. 341. Academic Press Inc., New York 1958.
4. *Melamed, N.* et *Renard, R.:* Analyse de mélange d'acides aminés par chromatographie gazeuse. J. Chromatog. **4**, 339—346 (1960).
5. *Bayer, E.:* Gaschromatography. Academic Press Inc., New York 1958.
6. *Stevenson, J. M.* and *Luck, J. W.:* The bromodecarboxylation of amino acids. J. Biol. Chem. **236**, 715—717 (1961).
7. *Hunter, J. R., Dimick, K. P.* and *Corse, J. W.:* Chem. and Ind. (London) **294**, (1956) cit. in: Baumann, F.: Gaschromatography of amino acids. Varian research notes 1967, Varian Aerograph.
8. *Attrill, J. E., Butts, W. C.* and *Rainey, W. T.:* Gaschromatography of methyl thiohydantoins of amino acids. Anal. letters **3** (2), 59—65 (1970).
9. *Bayer, E., Reuther, K. H.* und *Born, F.:* Analyse von Aminosäuregemischen mittels Gas-Verteilungschromatographie. Angew. Chem. **69**, 640 (1957).
10. *Saroff, H. A.* and *Karmen, A.:* Gaschromatography of the amino acid esters in ammonia. J. Chromatog. **9**, 122—123 (1962).
11. *Thenot, J. P.* and *Horning, E. C.:* Amino acid N-dimethylaminomethylene alkyl esters. New derivatives for GC and GC-MS studies. Anal. lettres **5** (8), 519—529 (1972).
12. *Graft, J., Wein, J. P.* and *Wienitz, M.:* Federation Proc. **22**, Nr. 1, 244 (1963) cit. in: Coulter, J. R. and Hann, C. S.: A practical quantitative gaschromatographic analysis of amino acids using the n-propyl N-acetylesters. J. Chromatog. **36**, 42—49 (1968).
13. *Losse, G., Losse, A.* und *Stöck, J.:* Gaschromatographische Trennung von N-Formylaminosäuremethylestern. Z. Naturforsch. **176**, 785—786 (1962).
14. *Pisano, J. J., van den Heuvel, W. J. A.* and *Horning, E. C.:* Biochem. Biophys. Res. Commun. **7**, 82 (1962) cit. in: Zumwalt, R. W., Kuo, K. and Gehrke, C. W.: A nanogram and picogram method for amino acid analysis by gaschromatography. J. Chromatog. **57**, 193—208 (1971).
15. *Landowne, R. A.* and *Lipsky, S. R.:* Nature **199**, 141 (1963) cit. in: Blackburn, S.: Amino acid determination. Verlag E. Arnold Ltd., London 1968.
16. *Thom, B.* and *Parsons, J. W.:* Gas-liquid chromatography of N-trifluoracetyl n-butylesters of amino acids. J. Chromatog. **90**, 370—375 (1974).
17. *Weygand, F., Kolb B., Prox A.* and *Tilak, M. A.:* Gaschromatographische Trennung von N-TFA-Dipeptid-methylestern. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **322**, 38—51 (1960).
18. *Saroff, H. A.* and *Karmen, A.:* Anal. Biochem. **1**, 344 (1960) cit. in: Zumwalt, R. W., Kuo, K. and Gehrke, C. W.: A nanogram and picogram method for amino acid analysis by gaschromatography. J. Chromatog. **57**, 193—208 (1971).
19. *Cruickshank, P. A.* and *Sheehand, J. C.:* Gaschromatographic analysis of amino acids as N-trifluoracetyl-methyl esters. Anal. Chem. **36**, 1191 (1964).
20. *Zumwalt, R. W., Roach, D.* and *Gehrke, C. W.:* Gas-liquid chromatography of amino acids in biological substances. J. Chromatog. **53**, 171—193 (1970).

21. *Ikekawa, N.:* J. Biochem. (Japan) **54**, 279—282 (1963) cit. in: Fernandez-Flores, E., Kline, D. A. and Johnson, A. R.: Quantitative and qualitative GLC-analysis of free amino acids in fruits and fruit juices. J. Assoc. Offic. Analyt. Chem. **53**, 1203—1208 (1970).
22. *Hagen, P.* and *Black, W.:* Federation Proc. **23**, 371 (1964) cit. in: Roach, D. and Gehrke, C. W.: Direct esterification of the protein amino acids. J. Chromatog. **44**, 269—278 (1969).
23. *Zomeley, C., Marco, G* and *Emmery, E.:* Gaschromatography of the n-butyl-N-trifluoracetyl derivatives of amino acids. Anal. Chem. **34**, 1414 (1962).
24. *Gehrke, C. W., Zumwalt, R. W.* und *Kuo, K.:* Die quantitative gaschromatographische Aminosäureanalyse. J. Agr. Food Chem. **19**, 605—618 (1971).
25. *Darbre, A.* and *Blau, K.:* Gaschromatography of volatile amino acid derivatives. J. Chromatog. **17**, 31—49 (1965).
26. *Gehrke, C. W., Roach, D.* and *Zumwalt, R. W.:* Quantitative gas-liquid chromatography of amino acids in proteins and biological substances. Anal. Biochem. Lab., Jackson, Columbia 1968.
27. *Klebe, J. R., Finkbeiner, H.* and *White, D. M.:* Silylation with Bis-trimethylsilyl-acetamid, a highly reactive silyl donor. J. Am. Chem. Soc. **88**, 3390—3395 (1966).
28. *Stalling, D. L., Gehrke, C. W.* and *Zumwalt, R. W.:* A new silylatin reagent for amino acids: Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid. Biochem. Biophys. Res. Commun. **31**, 616—622 (1968).
29. *Hardy, J. P.* and *Kerrin, S. L.:* Rapid determination of twenty amino acids by gas-chromatography. Anal. Chem. **44**, 1497—1499 (1972).
30. *Gehrke, C. W.* and *Leimer, K.:* Trimethylsilylation of amino acids. J. Chromatog. **53**, 201—208 (1970).
31. *Gerstl, R.* und *Ranfft, K.:* Eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von zugesetztem oder freiem Methionin und Lysin in Mischfuttermitteln, Vormischungen und physiologischen Flüssigkeiten. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **65**, 399—406 (1974).
32. *Hirs, C. H. W., Stein, W. H.* and *Moore S.:* The amino acid composition of ribonuclease. J. Biol. Chem. **211**, 941—950 (1954).
33. *Heese, J.* und *Fahnenstich, R.:* Gleichzeitige Bestimmung von Methionin und Cystin. Z. Tierphys. Tierern. Futtermittelk. **28**, 161—171 (1971).
34. *Weidner, K.* and *Eggum, B. O.:* Proteinhydrolysis: A description of the method used at the departement of animal physiology in Copenhagen. Acta Agr. Scand. **16**, 115—199 (1966).
35. *Hüni, K.:* Zur Aminosäureanalyse von Futtermitteln. Schweiz. Landw. Forsch. **11**, 347—352 (1972).
36. *Heese, J., Jahn, G.* und *Fahnenstich, R.:* Bestimmung von Reinprotein und Aminosäuren in Futtermitteln. Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelk. **28**, 307—320 (1971).
37. *Mondino, A.* and *Bongiovanni, G.:* An experimental study of amino acid degradation under open flask hydrolytic conditions. J. Chromatog. **52**, 405—413 (1970).
38. *Moore, S.* and *Stein, W. H.:* Methods in enzymology. Vol. 4, S. 819. Acad. Press, New York 1963
39. *Roach, D.* and *Gehrke, C. W.:* The hydrolysis of proteins. J. Chromatog. **52**, 393—404 (1970).
40. *Maravalhas, N.:* A new technique of protein hydrolysis of the amino acids on an autoanalyzer. J. Chromatog. **50**, 413—418 (1970).
41. *Hoppe, W.:* Aminosäureanalysen in biologischem Material. Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch. **147**, 13—20 (1971).

42. *Maillard, L. C.:* Ann. Chim. (Paris) (9) **5**, 1258 (1916) cit. in: Hoppe, W.: Aminosäurenanalysen in biologischem Material. Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch. **147**, 13—20 (1971).
43. *Drawert, F.* and *Reuther, K.H.:* Phenol als Inhibitor der Huminbildung bei der Proteinhydrolyse. Angew. Chem. **75**, 169 (1963).
44. *Gehrke, C. W., Nakomoto, H.* and *Zumwalt, R. W.:* Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives. J. Chromatog. **45**, 24—51 (1969).

Rosemarie Gerstl
Dr. Klaus Ranfft
Bayer. Hauptversuchsanstalt
für Landwirtschaft
*D-8050 Freising 12 - Weihenstephan*