

# Bestimmung quaternärer Amine in Naturextrakten durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie

Autor(en): **Merbach, A.E. / Chastellain, F. / Hirsbrunner, P.**

Objektyp: **Article**

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

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

Heft 2

PDF erstellt am: **10.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982672>

## **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.

## Bestimmung quaternärer Amine in Naturextrakten durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie

*A. E. Merbach*

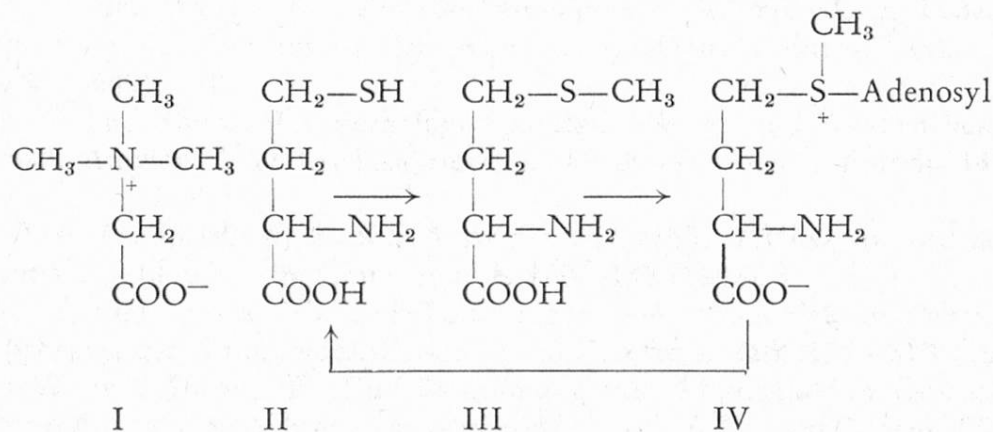
Institut de chimie minérale et analytique de l'Université, Lausanne

*F. Chastellain und P. Hirsbrunner*

Société d'Assistance Technique pour Produits Nestlé SA, Lausanne

### Betain in Melassen und ihren Derivaten

Betain (I) wurde früher ausschließlich wegen seiner therapeutischen Eigenschaften verwendet; sein Anwendungsbereich ist aber in den letzten Jahren als Futtermittelzusatz interessant geworden (1). Durch Transmethylierung auf Homocystein (II) nimmt Betain am Zyklus Methionin (III) — S-Adenosyl Methionin (IV) — Homocystein teil und erlaubt dabei in wichtigem Maße eine Einsparung von Methionin. Das in der Diät vorhandene Methionin ist so für andere metabolistische Vorgänge völlig verfügbar.



Daher werden neue Bestimmungsmethoden für Betain entwickelt. Bekannte gravimetrische Trennungen (2), insbesondere jene, die die geringe Löslichkeit des Reineckatkomplexes (3) ausnützen, haben aber den Nachteil, bei Anwesenheit quaternärer Amine unspezifisch zu sein. Andere Methoden, chromatographische beispielsweise (4—8), unterscheiden quaternäre Amine, sind aber zeitraubend (Ionenaustauschchromatographie) oder bei komplizierten Gemischen in der Ausführung nicht einfach (Dünnschichtchromatographie). Wir schlagen eine neue Me-

thode, die kernmagnetische Protonenresonanz ( $^1\text{H-NMR}$ ) vor. Diese erlaubt die Nebeneinanderbestimmung der quaternären Amine in saurem Milieu.

In dieser einleitenden Veröffentlichung zeigen wir die erhaltenen Resultate einer einfachen Methode zur Bestimmung des Betaingehaltes in Zuckerrübenmelassen und Melasse-Schlempen\*.

Die  $^1\text{H-NMR}$  Spektren von Naturextrakten sind äußerst kompliziert; die Signale der Fette, Zucker usw. überdecken diejenigen von Betain. Somit ist es notwendig, die Störstoffe durch geeignete Behandlung zu entfernen (siehe Abb. 1). Die Probenzubereitung basiert auf der großen Stabilität von Betain-hydrochlorid gegenüber konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; diese Chemikalien vermögen einen großen Teil der organischen Stoffe in den geprüften Naturextrakten\*\* zu zerstören. Die

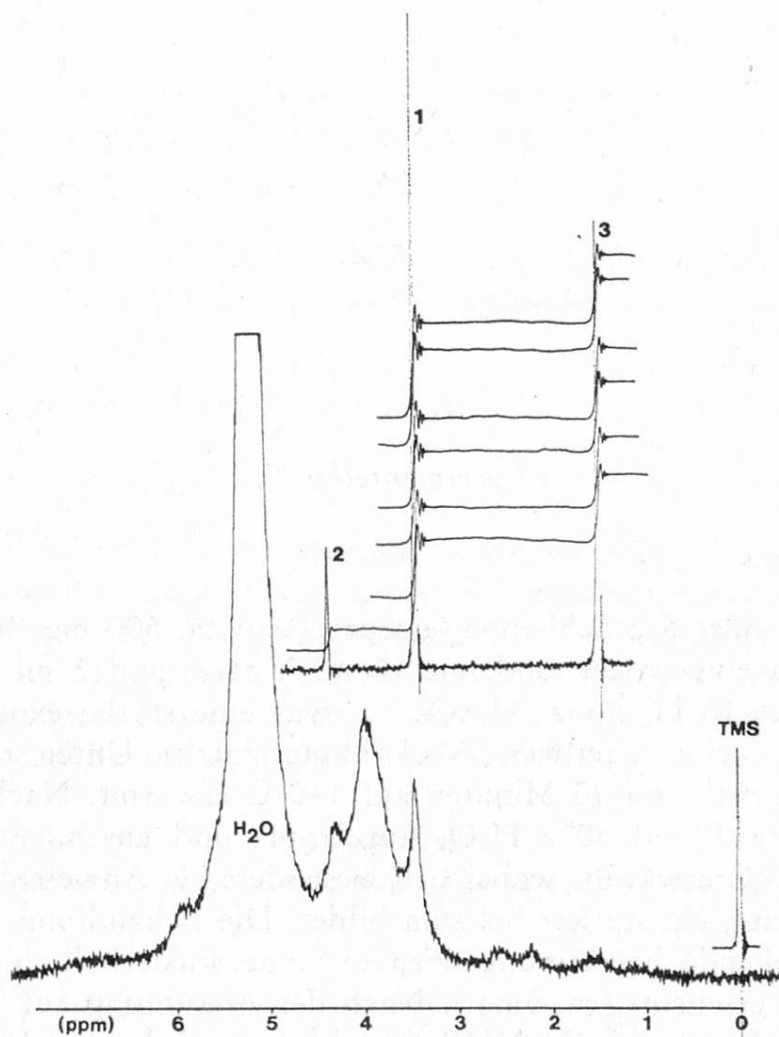


Abb. 1.  $^1\text{H-NMR}$  Spektren von Melasse vor (unten) und nach (oben) der Behandlung mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1:  $\text{CH}_3$ -Protonen von Betain, 2:  $\text{CH}_2$ -Protonen von Betain, 3:  $\text{CH}_3$ -Protonen von tert.-Butylammonium).

\* Die bei der industriellen Zuckerabtrennung aus Melasse anfallenden Mutterlaugen werden als Schlempen bezeichnet (9).

\*\* Cholin, das in andern Produkten enthalten sein kann, wird durch diese Behandlung teilweise in Betain übergeführt.

Tabelle 1 zeigt die Wiederauffindung von Betain und Betain · HCl nach Erwärmung auf verschiedene Temperaturen in Anwesenheit von konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Messungen ergeben, daß das Betain diese Behandlung nicht schadlos übersteht, wogegen das Betain · HCl (Betain + HCl) auch bei erhöhter Temperatur unverändert bleibt. Tert.-Butylamin · HCl als interner Standard für die <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie weist in diesem Milieu bei Raumtemperatur keinen Zerfall auf.

*Tabelle 1*  
*Wiederauffindung von Betain nach Erwärmung (1 Stunde)*  
*mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Temperatur °C	Betain %	Betain · HCl %
20	97	—
140	94	99
160	—	100
180	77	100

### *Experimenteller Teil*

#### *Probenzubereitung*

10 g Melasse oder 5 g Schlempe (entsprechend ca. 500 mg Betain) werden in einen 1-l-Kolben eingewogen und mit 10 ml Wasser und 2 ml konz. HCl vermischt. Man fügt 10 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu, was eine starke exotherme Reaktion zur Folge hat, wobei eine teilweise Verkohlung eintritt. Unter ständigem Rühren wird die Lösung während 20 Minuten auf 140°C erwärmt. Nach dem Abkühlen werden vorsichtig 10 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugetropft und anschließend während 30 Minuten auf 140°C erwärmt, wobei sich, besonders bei Anwesenheit großer Mengen Kohlenhydrate, ein starker Schaum bildet. Die Behandlung mit 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und die anschließende Erwärmung wird so lange wiederholt, bis die Probe klar und fast farblos erscheint (ca. 5mal). Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Probe als interner <sup>1</sup>H-NMR Standard eine bekannte Menge tert.-Butylamin · HCl (ca. 500 mg) zugefügt.

#### *Messung der kernmagnetischen Resonanz*

Die Aufnahmen der <sup>1</sup>H-NMR Signale wurden auf einem Varian A-60D ausgeführt. Die Integration erfolgte sowohl auf elektronischem Wege wie planimetrisch. Jede Messung wurde aus mind. 5 Durchgängen ermittelt.

## Resultate

### Betainbestimmung durch $^1\text{H-NMR}$ :

Die Gehaltsbestimmung fußt auf der Integration des Signales der 9 magnetisch äquivalenten Methylprotonen des Betains und des Methylsignals vom tert.-Butylammonium. Die Berechnung der Betainmenge in der Probe erfolgt nach der Gleichung:

$$a = \frac{\text{PM}_1}{\text{PM}_2} \cdot \frac{r}{p} \cdot b$$

a: g Betain in der Probe.

b: g interner Standard (tert.-Butylamin · HCl).

PM<sub>1</sub>: Molekulargewicht von Betain (117,15).

PM<sub>2</sub>: Molekulargewicht vom internen Standard (109,6).

r: Verhältnis des Flächenintegrals der Betainmethylprotonen zum Flächenintegral der tert.-Butylammoniummethylprotonen.

p: Verhältnis der Anzahl Methylprotonen im Betain zur Anzahl Methylprotonen im tert.-Butylammonium (p = 1).

### Betainbestimmung in Melassen

In der Tabelle 2 sind die erhaltenen Resultate einer künstlich hergestellten Melasse mit einem Betaingehalt von genau 5% zusammengestellt. Die gute Reproduzierbarkeit und die Übereinstimmung der Betaingehalte (relative Fehler zwischen 2 und 3,4%) wurden erreicht, trotz der durch eine hohe Viskosität erschwerten Spektrenauswertung. Drei Proben einer natürlichen Melasse ergaben folgende Gehalte an Betain: 4,14, 4,37 und 4,30%. Der Betaingehalt dieser Me-

Tabelle 2  
Wiederauffindung von Betain in einer künstlich hergestellten Melasse <sup>a)</sup>

Probe	Melasse g	Betaingehalt	
		g	%
1A	9,90	0,505	5,10
2A	9,80	0,502	5,12
3A	9,92	0,503	5,07
4A	9,86	0,510	5,17

a) Zusammensetzung: Saccharose 50%, Wasser 35%, Pyrrolidoncarbonsäure 5%, Mineralsalze 5% und Betain 5%.

lasse wurde anschließend mit einer genau bestimmten Menge erhöht. Die Tabelle 3 zeigt die gefundenen und berechneten Betaingehalte (Proben 1B—4B). Der relative Fehler beträgt weniger als 2,5%.

*Tabelle 3*  
*Wiederauffindung von zugefügtem Betain in einer natürlichen Melasse*  
*(ursprünglicher Betaingehalt 4,3%)*

Probe	Melasse g	Betain		
		Zugefügt g	Gefunden g	Berechnet g
1B	9,700	0,200	0,604	0,617
2B	9,750	0,200	0,604	0,619
3B	10,090	0,200	0,639	0,634
4B	9,770	0,200	0,613	0,620

*Betainbestimmung in Schlempen*

Die Analyse von 2 Proben einer Schlempe ergab Betaingehalte von 11,54 und 11,51%. Auch hier wurde der Betaingehalt mit einer genau bestimmten Menge heraufgesetzt (Resultatzusammenstellung auf Tabelle 4). Die gefundenen

*Tabelle 4*  
*Wiederauffindung von zugefügtem Betain in einer Schlempe*  
*(ursprünglicher Betaingehalt 11,5%)*

Probe	Schlempe g	Betain		
		Zugefügt g	Gefunden g	Berechnet g
1C	5,040	0,500	1,094	1,081
2C	5,100	0,500	1,098	1,088
3C	5,090	0,500	1,103	1,087
4C	5,100	0,500	1,102	1,088
5C	5,070	0,500	1,090	1,084

und die berechneten Werte stimmen in bemerkenswerter Weise überein, die Standardabweichung liegt unterhalb 1,5% (Proben 1C—5C). Die Tabelle 5 führt die Betaingehalte von 10 Proben einer andern Schlempe auf (1D—10 D). Der Mittelwert liegt hier bei 10,4%  $\pm$  0,1% (Vertrauensgrenze 95%). Die Standardabweichung von  $\pm$  1% unterstreicht die gute Reproduzierbarkeit der Methode.

Tabelle 5. Betaingehalt einer Schlempe

Probe	Schlempe g	Betaingehalt	
		g	%
1D	4,970	0,521	10,48
2D	4,966	0,530	10,67
3D	5,314	0,542	10,20
4D	5,056	0,524	10,36
5D	5,125	0,532	10,38
6D	5,342	0,566	10,59
7D	4,865	0,509	10,46
8D	4,793	0,488	10,18
9D	5,163	0,535	10,36
10D	5,276	0,551	10,44

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß aufgrund der gefundenen Resultate diese Methode, basierend auf der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie, mit Erfolg zur Bestimmung des Betaingehaltes in Melassen und Schlempen verwendet werden kann. Wir verfolgen diese Studien weiter, um schlußendlich eine allgemeine Methode zu finden, die die Bestimmung quaternärer Amine in andern Naturprodukten erlaubt.

#### Dank

Unser besonderer Dank gilt Herrn Dr. *H. Moll* für seine wertvollen Ratschläge sowie Herrn *T. Beyeler* für seine geschätzte Mitarbeit.

#### Zusammenfassung

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Signal der Trimethylammoniumgruppe wird verwendet zur Bestimmung von Betain. Die Unterscheidung quaternärer Amine wird möglich durch die ungleiche chemische Verschiebung ihrer Methylgruppen in saurem Milieu. Diese neuartige Methode zur Betainbestimmung wurde angewandt auf Melassen und Melasse-Schlempen mit einer relativen Standardabweichung von weniger als  $\pm 2\%$ .

#### Résumé

Le signal du groupe triméthylammonium obtenu par la résonance magnétique nucléaire est utilisé pour le dosage de la bétaine. La discrimination des amines quaternaires est rendue possible par les déplacements chimiques différents de leurs groupes méthyles en milieu acide. Cette nouvelle méthode est appliquée sur des échantillons de mélasses et de dérivés de betteraves sucrières avec une déviation standard relative inférieure à  $\pm 2\%$ .

## Summary

The signal of the trimethylammonium group obtained by the nuclear magnetic resonance is used for the determination of the betaine. The quaternary amines are discriminated by the different chemical shifts of their methyl groups in acid solution. This new method is applied to samples of molasses and some derivatives of sugar beets with a relative standard deviation lower than  $\pm 2\%$ .

## Literatur

1. Steinmetzer, W.: Beitrag zur Biochemie und Verwendung des Rübeninhaltsstoffs Betain. *Zucker* **25**, 48—57 (1972).
2. Görög, S. und Ezer, E.: The determination of betaine in the vinasses of beet molasses. *Analyst* **89**, 282—285 (1964).
3. Simenauer, A.: Remarques sur le dosage de la bétaine à l'état de reineckate. *Bull. soc. chim. France* 294—297 (1958).
4. Carruthers, A., Oldfield, J. F. T. and Teague, H. J.: The removal of interfering ions in the determination of betaine in sugar-beet juices and plant material. *Analyst* **85**, 272—275 (1960).
5. Christianson, D. D., Wall, J. S., Dimler, R. J. and Senti, F. R.: Separation and determination of quaternary nitrogen compounds and other nitrogenous substances by ion exchange chromatography. *Anal. Chem.* **32**, 874—878 (1960).
6. Bayzer, H.: Dünnschichtelektrophoretische Trennung quaternärer Ammoniumverbindungen. *J. Chromatog.* **24**, 372—375 (1966).
7. Devillers, P. et Loilier, M.: Note sur le dosage de la bétaine. *Sucr. franç.* **111**, 349 (1970).
8. Massa, V., Pellecuer, J. et Andary, C.: Dosage photodensitométrique de la bétaine et de la choline après chromatographie sur couche mince. *Trav. soc. pharm. Montpellier* **30**, 113—120 (1970).
9. Baud, P.: *Traité de chimie industrielle*, 4ème éd., tome III, p. 437. Masson et Cie, Paris 1951.

Prof. Dr. A. E. Merbach  
Institut de chimie minérale  
et analytique  
Université de Lausanne  
Place de Château 3  
CH-1005 Lausanne

Dr. F. Chastellain\*  
Dr. P. Hirsbrunner  
Société d'Assistance Technique  
pour Produits Nestlé S. A.  
CH-1000 Lausanne

\* Adresse für Korrespondenz