

Fukuyama-Hochschule in Fukuyama  
720-Fukuyama-shi, Honjo-cho 1750  
Hiroshima-ken (Japan)

## Gaschromatographische Analyse von Aminosäuren in Nahrungsmitteln

M. Suzuki

Mit 2 Abbildungen und 5 Tabellen

(Eingegangen am 26. April 1976)

Zur quantitativen Analyse von Aminosäuren finden verschiedene Chromatographieverfahren Anwendung, die jedoch alle sehr zeitraubend sind und den Nachteil haben, daß sehr viel Substanz gebraucht wird. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren die Gaschromatographie als eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren untersucht, da bei dieser Methode eine hohe Trennbarkeit gegeben ist und überdies die Analyse mit wenig Substanz in kürzester Zeit und mit hoher Genauig-

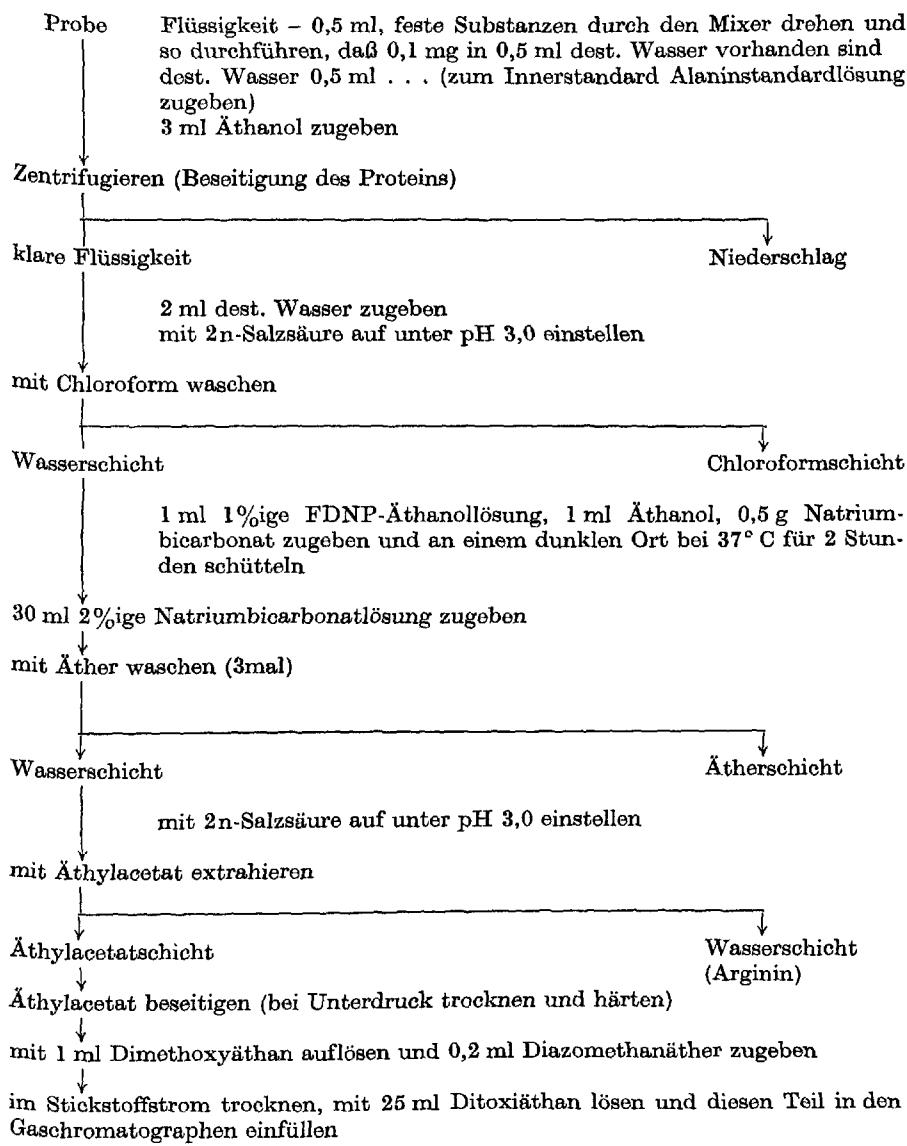
Tab. 1. DNP-sierte Aminosäurestandardproben.

DNP-DL-Alanin	DNP-L-Isoleucin
$\alpha$ -DNP-L-Arginin	DNP-L-Leucin
$\alpha$ -DNP-DL-Asparagin	diDNP-Ricin
DNP-L-Asparaginsäure	DNP-DL-Methionin
diDNP-L-Cystin	DNP-L-Phenylalanin
DNP-L-Glutaminsäure	DNP-L-Prolin
$\alpha$ -DNP-Glutamin	DNP-L-Serin
DNP-Glycin	DNP-DL-Threonin
diDNP-L-Histidin	DNP-DL-Tryptophan
DNP-L-Oxyprolin	diDNP-L-Tyrosin
	DNP-L-Valin
	(Proben der Chemisch-Pharm. Werke, Wako-AG)
DNP- $\beta$ -Alanin	(Proben der Mann Forschungslaboratorien)
diDNP-L-Ornithin	
DNP-Sarkosin	

Tab. 2. Meßbedingungen.

Column:	SE-30 1,5% Coating 60 mesh 4 mm × 1,5
Columnnwärme:	Wärmeanstieg (2° C/min)
Wärme der Probenkammer:	260 ~ 280° C
Trägergas:	Menge N <sub>2</sub> : 40 ml/min
Luftmenge:	0,7 l/min

Tab. 3. Behandlung der in Nahrungsmitteln enthaltenen Aminosäuren.



keit durchgeführt werden kann. Das heißt, eine Methode, bei der die Aminosäuren, die einen amphoteren Charakter haben, nach Überführung in ein flüchtiges Derivat analysiert werden (1). In letzter wurde nun ein Analyseverfahren, die sogenannte Schnellflüssigkeits-Chromatographie, entwickelt, mit dem in kürzester Zeit die Analyse durchgeführt werden

kann. Diese Abhandlung berichtet über ein Experiment, bei dem nach der Yoshinori-Methode (2) Aminosäuren in Standardproben und Nahrungsmittel auf dem gaschromatographischen Wege analysiert wurden.

### Methodik

#### 1. Probesubstanz

Als Probesubstanz wurden, wie in Tab. 1 gezeigt, 24 Arten von Aminosäureverbindungen verwendet (Herst. Chemisch-Pharm. Werke, Wako-AG).

Als Extraktionslösung verwendete man Äther und Äthylacetat, die wiederholt destilliert wurden. Die Herstellung der Diazo-methanätherlösung erfolgte wie folgend: 1,2 g Ätzkalk wurden in 2 ml Wasser gelöst, 7 ml 2-(2-Aethoxy-2-aethoxy)-äthanol sowie 2 ml Äther dazugegeben, eine Aetherdestillation bei 70° C im Wasserbad durchgeführt, die 30 ml Ätherlösung, in der 4,3 g N-Methyl-N-nitro-toluolsulfonamid gelöst wurde, über 30 min stark geschüttelt und durch Abtropfen erhalten (3).

#### 2. Meßbedingungen

Die Messung erfolgte mit dem Gaschromatographen 900 der Firma Parkinellma und wurde nach den in Tab. 2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

#### 3. Herstellung der Probe

Das DNP-Derivat der Aminosäure wurde in Dimethoxyäthan gelöst, mit der Diazomethanätherlösung versetzt und methylverestert. (4). Darauf im Stickstoffstrom getrocknet und gehärtet und in Dimethoxyäthan wiederum gelöst. Da Serin, Threonin und Oxyprolin Hydroxylgruppen haben, wurde die Probe nach der Methylierung mit Trimethylchlorsilan in Ortho-trimethylsilan übergeführt (5).

#### 4. Behandlung der in Nahrungsmitteln enthaltenen Aminosäuren

Die Aminosäuren in Nahrungsmitteln wurden gemäß dem Verfahren in Tab. 3 behandelt. Um alle Verunreinigungen, außer DNP-Aminosäuren, zu entfernen,

Tab. 4. Peakfläche der DNP-Aminosäuren.

DNP-Aminosäuren <sup>a)</sup>	Peakfläche von 5 µg der entsprechenden Aminosäure <sup>a)</sup> (cm <sup>2</sup> )	Entsprechende Peakfläche
Alanin	4,80 ± 0,27	1,00
Glycin	2,32 ± 0,35	0,52
Barin	5,72 ± 0,18	1,38
Leucin	4,50 ± 0,28	1,10
Isoleucin	5,10 ± 0,30	1,13
Prolin	5,30 ± 0,28	1,12
Asparaginsäure	2,51 ± 0,28	0,62
Glutaminsäure	2,40 ± 0,20	0,54
Methionin	3,00 ± 0,38	0,60
Phenylalanin	3,65 ± 0,34	0,85

A.) Meßbedingungen Column: 1,5% SE-30 1,5 m; Temp. der Meßgeräte: 260° C; Wärme der Probenkammer: 260° C; Wärmeanstieg: 2° C/min; Columnwärme: Mit beginnendem Wärmeanstieg bei 190° C wird bei 200° C die N<sub>2</sub>-Menge auf 40 ml/min eingestellt und die Probe eingegossen.

B.) Methylesterderivat

C.) Durchschnittliche Abweichung vom Standardwert (jede Probe wurde 3mal gemessen)

Tab. 5. Aminosäuregehalt in Nahrungsmitteln (Werte in g pro 16 g N).

Substanz	Leu	Iso	Val	Met	Phe
Hühnervollei	7,2	5,1	5,0	3,3	4,2
Eieralbumin	9,5	5,8	7,2	5,8	7,0
Eigelb	6,3	4,8	4,2	1,2	4,2
Vollmilch (Kuh)	7,8	3,5	4,2	1,0	8,2
Casein (Kuh)	12,0	7,2	6,2	3,8	3,4
Lactalbumin	11,0	6,7	5,3	2,9	3,8
Gelatine	4,0	0,8	0,9	2,0	2,0
Herz (Rind)	7,0	3,2	8,9	1,8	5,0
Leber (Rind)	7,5	3,8	10,4	1,2	3,2
Niere (Rind)	5,1	3,2	7,5	2,1	4,3
Kartoffeln	5,8	5,0	4,3	3,5	6,5
Bohnen (Erbosen)	6,5	5,1	3,8	0,8	7,8
Erdnuß	6,0	4,9	2,8	0,1	4,3
Sojabohnen	7,0	3,2	7,5	0,9	2,8
Mehl (Hafer)	7,2	3,6	5,2	2,0	2,1
Mehl (Mais)	10,3	6,0	5,8	1,8	3,9
Mehl (Gerste)	6,2	2,3	4,6	1,8	2,9
Mehl (Reis)	5,1	4,2	4,2	1,4	6,0
Weizen (Korn)	6,9	4,4	4,3	1,0	5,4
Tomaten	7,2	1,8	4,4	0,3	2,1

wurde die Probe mit Chloroform behandelt. Mit 2n-Salzsäure wurde dann der Säurewert auf einen pH-Wert unter pH 3 eingestellt und danach mit 15 ml Chloroform gewaschen.

1 ml 5%ige FDNB-Äthanollösung wurden mit 5 ml Äthanol versetzt und an einem dunklen Ort in die DNP-Derivate übergeführt. Das DNP-Aminosäuregemisch ging zum Schluß in ein gelbes Gemisch über.

### 5. Quantitative Analyse

Die Messung der Peakfläche erfolgt trigonometrisch, der Innerstandard wurde nach der Additionsmethode errechnet, wobei zu je 0,5 ml Nahrungsmittelprobe 0,5 ml einer Alaninstandardlösung (50 m/100 ml Lösung) zugegeben wurden. Des weiteren wurden bei den Nahrungsmittelproben die jeweiligen Ausgangs- und Endpunkte der Aminosäuren in den jeweiligen Proben verbunden und als Grundlinie errechnet.

### Ergebnisse

Sarkosin, Alanin, Glycin, Valin,  $\beta$ -Alanin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Methionin und Phenylalanin zeigten bei den Standardproben einen Einzelpeak und konnten nachgewiesen werden.

Bei den Aminosäuren mit Hydroxylgruppen konnten die o-Trimethylsilylderivate (o-Trimethylsilylthreonin, o-Trimethylsilylserin, o-Trimethylsilyloxyprolin) gaschromatographisch nachgewiesen werden. Serin sowie Threonin zeigten jedoch zwischen Prolin und Asparaginsäure einen Peak, und Oxyprolin lag zwischen Asparaginsäure und Phenylalanin.

Als weiteres wurde bei 10 verschiedenen Arten von Aminosäuren, Alanin, Glycin, Barin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Asparaginsäure, Glut-

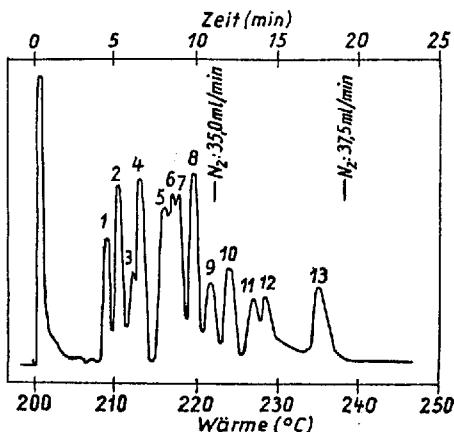


Abb. 1. Gaschromatogramm des DNP-Aminosäuremethylestergemischs. 1. Sarcosin, 2. Alanin, 3. Glycin, 4. Valin, 5. Leucin, 6. Isoleucin, 7. Prolin, 8. Trimethylsilylthreonin, 9. Asparaginsäure, 10. Trimethylsilyloxyprolin, 11. Glutaminsäure, 12. Methionin, 13. Phenylalanin. A. Meßbedingungen: Column: 1,5 % SE-30 1,5 m, Temperatur der Meßgeräte: 260° C, Wärme der Probenkammer: 260° C, Wärmeanstieg: 2° C/min, Columnwärme: Mit beginnendem Wärmeanstieg bei 190° C wird bei 200° C die N<sub>2</sub>-Menge auf 40 ml/min eingestellt und die Probe eingegossen. B. 5 µg von jeder Aminosäure wird in 5 ml Aceton aufgelöst und eingegossen.

amino-säure, Methionin, Phenylalanin, der Flächeninhalt von je 5 µg ihrer Standardprobe gemessen und mit dem Flächeninhalt von Alanin verglichen.

Beim Meßvorgang wurden so weit wie möglich die Columnwärme und der Trägergasdurchfluß gleichbleibend gehalten. Bei DNP-Lysin im Bereich von 0~15 µg (Leucin 0~5.5 µg) stieg der Flächeninhalt proportional zur Menge an. Auf diese Weise wurde eine Analyse der Aminosäuren in Nahrungsmitteln angestellt, und dabei konnten die in Nahrungsmitteln häufig anzutreffenden Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin, Phenylalanin gaschromatographisch analysiert werden.

Bis vor kurzem überführte man noch Aminosäuren in flüchtige Derivate, oxydierte sie mit Ninhidrin und analysierte den um einen Kohlenstoff kleineren Aldehyd. In letzter Zeit wird jedoch ausschließlich die Methode angewandt, bei der man die Aminosäuren einfach verestert. Da in diesem Fall jedoch bei der Veresterung der Hydroxylgruppen keine gute Trennung gegeben ist, müssen die Aminogruppen behandelt werden. Im allgemeinen werden sie als Acetate (6) oder Trifluoracetate analysiert (7-11), können jedoch auch mit Hilfe der DNP-sierung analysiert werden. Die Gaschromatographie mit Hilfe der DNP-sierung wurde erstmals von Pisano (1) durchgeführt, seitdem gibt es jedoch verschiedene Berichte darüber. Der Verfasser dieser Abhandlung wendete die DNP-sierung zur gaschromatographischen Analyse von Aminosäuren in Nahrungsmitteln an. Dabei ergab sich eine verhältnismäßig kurze Behandlungszeit der Probe von nur etwa 4 Std., die anschließende

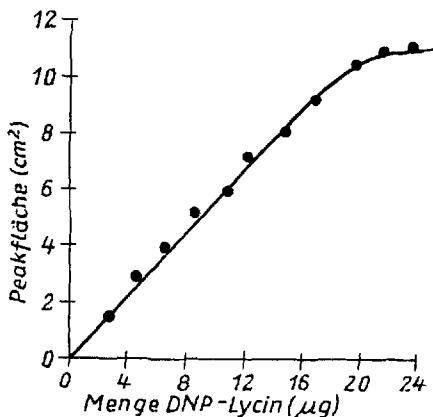


Abb. 2. Menge DNP-Leucin und Peakfläche. Menge DNP-Leucin ( $\mu\text{g}$ ). Die Peakfläche wird trigonometrisch errechnet.

Gaschromatographie ließ sich in kürzester Zeit von nur 30 min durchführen. Wenn man den erhaltenen Bestimmungswert mit den Werten aus der chemischen Literatur (12) darüber vergleicht, ergibt sich ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis. Der Innerstandard wurde nach der Additionsmethode von Yoshinori (2), bei der Alanin herangezogen wird, errechnet. Da mit dieser Methode jedoch nicht alle Aminosäuren analysiert werden können (basische Aminosäuren lassen sich nicht nachweisen), ist zu deren Nachweis weitere Substanz notwendig. Cruickshank (13) gebrauchte ein Methylesterderivat der N-Trifluoracetylaminosäure und konnte in Standardproben fast alle Aminosäuren nachweisen. Wenn man sich dies vergegenwärtigt und die Möglichkeit einbezieht, daß mit dieser Methode eines Tages viele Aminosäuren in Nahrungsmitteln nachgewiesen werden können, sind diese Daten, nach Meinung des Verfassers, von großem Interesse.

#### Zusammenfassung

- Das Methylesterderivat der DNP-Aminosäure wurde auf gaschromatographischem Wege untersucht und die in Abb. 1 angeführten Aminosäuren nachgewiesen.
- Die Gaschromatographie ist zwar im Vergleich zur Ionenaustausch-Chromatographie viel empfindlicher, zeigt aber nur wenige Peaks, die sich zum Nachweis eignen. Es müssen daher erneute Nachweise durchgeführt werden.
- Der gemessene Wert der 5 Aminosäurearten in den Nahrungsmitteln zeigte eine ziemlich genaue Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Ionenaustauschwerten.

#### Summary

- The methylester derivative of DNP-amino acid was examined by gas-chromatography and amino acid shown in fig. 1 was detected.
- The gaschromatography was more sensitive than the ion-exchange chromatography, but detectable peaks were few, and it must be further studied.
- The measurements of five amino acids in food were almost coincident with those obtained by the ion-exchange method in literatures.

### Literatur

1. Pisano, J. J., W. J. A. Van der Heuvel, E. C. Horning, Biochem. Biophys. Res. Commun. **7**, 82 (1962). — 2. Yoshinori, Y., H. Oda, J. J. Biochem. **38**, 193 (1966).
- 3. De Boer, T. J., H. J. Backer, Rec. Trav. Chim. **73**, 229 (1954) Organic Syntheses **36**, 18 (1956). — 4. Wagner, J., G. Winkler, Z. Anal. Chem. **183**, 1 (1961). — 5. Chamberlain, J., B. A. Knights, G. H. Thomas, J. Endocri. **26**, 367 (1963). — 6. Johnson, D. E., S. J. Scott, A. Meister, Anal. Chem. **31**, 1019 (1959). — 7. Saroff, H. A., A. Karmen, Anal. Biochem. **1**, 344 (1960). — 8. Weygand, F., B. Kolb, A. Prox, M. A. Tilak, I. Tomida, Z. Hoppe-Seyler, Physiol. Chem. **322**, 38 (1960). — 9. Ikekawa, N., J. Biochem. **54**, 279 (1963). — 10. Ishii, S., B. Witkop, J. Am. Chem. Soc. **85**, 1832 (1963). — 11. Lamkin, W. M., C. W. Gehrke, Anal. Chem. **37**, 383 (1965). — 12. Schormüller, J., Lehrbuch der Lebensmittelchemie **1**, 41 (1961). — 13. Cruickshank, P. A., J. C. Sheehan, Anal. Chem. **36**, 1191 (1964).

### Anschrift des Verfassers:

Frau Dr. M. Suzuki, Fukuyama-Hochschule in Fukuyama,  
720-Fukuyama-shi, Honjo-cho 1750, Hiroshima-Ken (Japan)