



## Bestemmelse af aminosyrer i foderstoffer

### Hydrolysemetode

*S. Bech-Andersen og V. C. Mason*

*Afdelingen for dyrefysiologi, biokemi og analytisk kemi*

og

*M. Rudemo*

*Institut for matematik og statistik K.V.L.*

Der beskrives en forenklet metode til fremstilling af hydrolysater af foderstoffer til bestemmelse af syrestabile aminosyrer. Metoden bygger på, at alle aminosyrerne – undtagen tyrosin – er stabile ved oxydation med en permyrsyre/brintoverilte-blanding, og at dannelsen af halogen-tyrosin kan undertrykkes ved at tilsætte fenol til blandingen. Oxydation og hydrolyse foretages i samme kolbe, metoden har ingen inddampningstrin og kun 1–2 ml hydrolysat skal filtreres inden kromatograferingen. Metoden giver resultater, der er i overensstemmelse med dem, som fås med de traditionelle metoder. Tyrosin kan bestemmes i uoxyderet prøve.

### Indledning

I tidligere hydrolysemetoder (f.eks. *Jakobsen et al.* 1963, *Weidner & Eggum* 1966) bestemmes de svovlholdige aminosyrer i oxyderet og de resterende i uoxyderet prøve, som hydrolyseredes i et stort overskud af saltsyre. Hertil medgik meget

arbejde og meget udstyr. Vi har vist, (I) at de i protein fundne aminosyrer, med få undtagelser, kan bestemmes nøjagtigt i en oxyderet prøve (*Mason et al.* 1979, *Rudemo et al.* 1979), når oxydations-reagenset er tilsat fenol (*Mason et al.*

1980a,b), og når gennembobling med inaktiv luftart under hydrolysen er udeladt (Mason *et al.* 1980b); (II) at saltsyre:kvælstof-forholdet kun har lille praktisk betydning for de fundne aminosyre-koncentrationer (Bech-Andersen *et al.* 1979a, Rudemo *et al.* 1979); (III) at en hydrolysetid på ca. 24 timer er passende for de fleste aminosyrer ved kogning under reflux (Rudemo *et al.* 1980); og (IV) at koncentrationerne af de fleste aminosyrer giver lineært respons ved blandinger, d.v.s. at den fundne koncentration i en blanding svarer til den, der beregnes ud fra de i komponenterne fundne værdier (Bech-Andersen *et al.* 1979b).

Ved at sammenbygge disse observationer til en metode, hvor det tids- og arbejdskrævende filtrerings- og inddampningstrin er udeladt, er der opnået en mere rationel hydrolysemetode (Mason *et al.* 1980b). Her gives en kort beskrivelse af metoden, idet der henvises til den citerede litteratur.

#### Materiale og metode

##### *Oxydations- og hydrolysemetode: A.*

1. Til bestemmelse af de almindelige syrestabile aminosyrer, undtagen tyrosin, afvejes 0.1–1.0 g finformalet prøve svarende til ca. 10 mg kvælstof og med et vandindhold på max. 100 mg.
2. Oxydationsreagenset fremstilles i et lille bægerglas ved at blande 0.5 ml 30% brintoverilte (Perhydrol, Merck) med 4.5 ml 88% myresyre indeholdende 25 mg fenol. Ved at lade blandingen reagere ved 30°C i 1 time, omdannes den delvist til permyresyre. Bægerglasset med oxydationsreagenset og kolben med prøven afkøles på is-vandbad i 15 min. inden reagenset hældes over prøven.
3. Reagenset og prøven blandes omhyggeligt med en glasspatel med bøjet spatelblad, hvorefter kolben (med spatel) lukkes med parafilm. Henstand ved 0°C i køleskab i 16 timer.
4. Oxydationen standses ved at nedbryde overskud af peroxid ved tilsætning af ca. 0.84 g natriumdisulfid med en glasmåleske.
5. Til hydrolysen anvendes i alt 50 ml 6 N salt-syre med 0.1% fenol og 3 glaskugler. Prøve siddende på siden af kolben vaskes og skra-

bes omhyggeligt ned samtidig med tilsætningen af hydrolysereagenset. Spatlen fjernes efter vaskning med nogle få ml hydrolyse-reagens. Der koges under reflux med en Liebig-svaler i 23 timer ved ca. 110°C, idet starttiden tages fra kogningens begyndelse.

6. Efter hydrolysen vaskes svaleren med 5 ml pH 2.20/0.2 N Na<sup>+</sup> citratbuffer inden systemet adskilles. Hydrolysatsat afkøles på is-vandbad.
7. pH indstilles til 2.2 ved at tildryppe 7.5 N natriumhydroxidopløsning fra en sprøjte eller burette under omrøring med magnet. Temperaturen må herved ikke overstige 40°C; dette kan undgås ved at kolben under neutraliseringen forbliver i is-vandbadet.
8. Hydrolysatsat overføres kvantitativt til en 200 ml målekolbe, idet glaskuglerne tilbageholdes. Målekolben fyldes op til 200 ml med pH 2.20/0.2 N Na<sup>+</sup> citratbuffer med 0.1% fenol.
9. Inden kromatograferingen fjernes partikler fra nogle få ml hydrolysat ved centrifugering eller membranfiltrering. Et veldefineret volumen af det klare hydrolysat påsættes kationkolonnen til kromatografering.
10. Tyrosin bestemmes i uoxyderet prøve, idet punkt 2 til 4 overspringes. På hydrolysatet af uoxyderet prøve kan de i protein fundne aminosyrer bestemmes – undtagen cystin, methionin og tryptofan.

##### *Modifikation B*

Som A, men det meste af myresyren afdampes inden punkt 5. Der anvendes vakuumrotations-inddampning (max. 40°C); 2 dråber oktan-1-ol tilsættes som skumdæmpende middel. Myresyren skal afdampes, hvis den virker forstyrrende på separeringen.

##### *Modifikation C*

Som modifikation B, men 25 ml hydrolysereagens afdampes inden punkt 7, med vacuumrotationsfordamper (max. 40°C). Anvendes hvor kolonnen ikke har tilstrækkelig kapacitet til at give tilfredsstillende separering med hydrolysat med høj natriumion-koncentration. Ved moderne analysatorer med fotometer/kurveskriver af høj

kvalitet, kan en god separering opnås ved at sætte et mindre hydrolysatvolumen på kolonnen, samtidig med at følsomheden sættes op.

### Konklusion

(I) Metoden er kun beregnet til kogning under reflux og ikke til hydrolyse i ampuller. Foruden andre problemer kan tilstedeværelsen af selv en mindre mængde myresyre i en lukket glasampul forårsage eksplosion ved opvarmning.

(II) Metoden giver værdier af samme størrelse som de traditionelle metoder eller højere – undtagen for tyrosin. Ligeledes kan cystein og histidin give lavere værdier, men forskellene er mindre end ca. 3%. Den fundne værdi – målt som cystein-syre – kan endda være mere korrekt, hvis tilstedeværelsen af fenol forhindrer eller formindsker dannelsen af artefakter, som elueres med bufferfronten. Tabet af histidin hænger sandsynligvis sammen med det anvendte overskud af oxydationsreagens.

(III) Metoden er mindre arbejdskrævende og der anvendes mindre laboratorieudstyr end ved de traditionelle metoder, især hvis metoden udføres uden modifikationer. Specielt udeladelse af inddampnings- og filtreringstrin sparer udstyr og arbejdstid.

(IV) Da der ikke er fundet signifikant interaktion mellem hydrolysetid og fodertype for isoleucin, valin og serin, kan værdierne for disse hæves med 6%, for at korrigere for et systematisk tab, opstået på grund af den valgte hydrolysetid.

### Litteratur

- Bech-Andersen, S., Rudemo, M. og Mason, V. C.* 1979a. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 41:248–253.
- Bech-Andersen, S., Mason, V. C. og Rudemo, M.* 1979b. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 41:265–274.
- Bech-Andersen, S., Rudemo, M. og Mason, V. C.* 1980. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 43:57–65.
- Jakobsen, P. E., Mason, V. C. og Weidner, K.* 1963. *Nordisk Jordbrugsforskning* 45:220–233.
- Mason, V. C., Bech-Andersen, S. og Rudemo, M.* 1979. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 41:226–235.
- Mason, V. C., Rudemo, M. og Bech-Andersen, S.* 1980a. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 43:35–48.
- Mason, V. C., Bech-Andersen, S. og Rudemo, M.* 1980b. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 43:146–164.
- Mason, V. C., Bech-Andersen, S. og Rudemo, M.* 1981. I: Oslage, H. J. & Rohr, K. (eds.): *Protein Metabolism and Nutrition. Proc. of the 3rd EAAP Symp. Braunschweig 1980.* 351–356.
- Rudemo, M., Mason, V. C. og Bech-Andersen, S.* 1979. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 41:254–264.
- Rudemo, M., Bech-Andersen, S. og Mason, V. C.* 1980. *Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde* 43:27–34.
- Weidner, K. og Eggum, B. O.* 1966. *Acta Agric. Scand.* 16:115–119.

