

CHROM. 21 029

BESTIMMUNG VON TAURIN: EINFLUSS DER COILTEMPERATUR AUF DIE PEAKREINHEIT DES TAURINS

D. BALSCHUKAT* und H. KUNESCH

Degussa AG, GB Industrie- und Feinchemikalien Anwendungstechnik AV, Postfach 1345, D-6450 Hanau 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 20. Juli 1988; geänderte Fassung eingegangen am 24. August 1988)

SUMMARY

Determination of taurine: influence of the coil temperature on the taurine peak purity

A method is described for the determination of taurine, as well as other supplementary amino acids, using an amino acid analyzer with a coil temperature well above 100°C. The method is reproducible and the recovery is good even though the sample preparation is simple. As higher coil temperatures increase the yield of the ninhydrin reaction product, temperatures above 100°C are nowadays often used. However, this affects the taurine determination in hydrolysates as some compounds that interfere with the taurine determination will also react with ninhydrin at temperatures above 100°C.

The retention behaviour of these substances is similar to that of taurine on a cation-exchange column. The major interfering substance is levulinic acid, which is formed during the acidic treatment of hexoses. The absorption (at 440 and 570 nm) of the products of the reaction between the interfering substances and ninhydrin differs from that of primary and secondary amino acids.

These interfering substances occur mainly in plants, but also (in smaller amounts) in animal products. Therefore, the determination of taurine in hydrolysates is not reliable if a high coil temperature is used.

EINLEITUNG

Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) ist ein Endprodukt des Katabolismus von Cystein^{1,2}. Katzen sind, im Gegensatz zum Beispiel zu Ratten, nicht in der Lage, Taurin aus Cystein aufzubauen, so dass Katzen für eine optimale Ernährung auf Taurin angewiesen sind³. Weiterhin laufen Katzen bei Taurinmangel Gefahr, zu erblinden oder an Herzmuskelschwäche zu erkranken⁴. Deshalb kommt insbesondere dem Taurin-Gehalt von Rohstoffen und Mischfuttern eine nicht unerhebliche Bedeutung zukommt.

Verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung des Taurins sind beschrieben. Praktisch ausnahmslos handelt es sich um chromatographische Methoden,

wie z.B. die Gaschromatographie⁵, die Ionenaustauschchromatographie^{6,7} und die Hochleistung-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Bei der HPLC findet durchgängig die Vorsäulenderivatisierung statt. Verwendet werden insbesondere *o*-Phthaldialdehyd (OPA)⁸⁻¹² und 5-Dimethylaminonaphthalinsulfonylchlorid (Dns-Cl)¹³, und die Derivate werden anschliessend an Umkehr-Phasen getrennt.

Bestimmt man die Aminosäurezusammensetzung eines Rohstoffes bzw. die eines Mischfutters mit Hilfe eines Aminosäureanalysators, so lassen sich ebenfalls Bedingungen einstellen, unter denen man Taurin quantifizieren kann. Eine Methode, die zur quantitativen Bestimmung des Taurins breite Anwendung findet. Schwierigkeiten, den Taurin-Gehalt von Hydrolysaten von Mischfuttern mit Aminosäureanalysatoren zu bestimmen, die ein Hochtemperaturcoil besitzen, führten zur vorliegenden Arbeit. Darin wird aufgezeigt, worin diese Schwierigkeiten begründet liegen, und es werden Bedingungen entwickelt, die diese Unzulänglichkeiten umgehen.

EXPERIMENTELLES

Materialien

Taurin wurde von Serva (Heidelberg, B.R.D.) und Norleucin von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Alle weiteren Substanzen waren von Merck (Darmstadt, B.R.D.).

Reagenzlösungen

(i) Extraktionslösung: 200 mg Norleucin werden in 1000 ml 0,1 *M* Chlorwasserstoffsäure gelöst. (ii) Elutionslösungen: wie in Tabelle I beschrieben. (iii) Ninhydrin-

TABELLE I

PUFFERZUSAMMENSETZUNGEN UND CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

<i>Puffer-Bezeichnung</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>Verdünnungspuffer</i>	<i>Regenerierungslösung</i>
pH	3,54	3,86	4,31	2,20	—
Na ⁺ (<i>M</i>)	0,1	0,1	0,17	0,1	0,3
Natriumcitrat · 2H ₂ O (g)	9,8	9,8	9,8	9,8	—
Chlorwasserstoffsäure (37% ig) (ml)	1,0	—	—	—	—
Citronensäure · H ₂ O (g)	14,0	14,0	9,8	14,0	—
Borsäure (g)	—	1,0	1,0	—	—
Natriumchlorid (g)	—	—	4,3	—	—
Methylenglycolmonomethylether (ml)	80,0	—	—	—	—
Thiodiglycol (ml)	—	—	—	20,0	—
Phenol (g)	—	—	—	0,1	—
Natriumhydroxid (g)	—	—	—	—	12,0
Endvolumen (ml)	1000	1000	1000	1000	1000
Pufferdurchflusszeit (min)	19	10	16	—	7

Temperatur 43°C

Harztyp BTC 2710

Trennsäule 400 nm × 3,2 mm I.D.

Pufferdurchfluss 0,27 ml/min

Reagenzdurchfluss 0,153 ml/min

lösung: 20 g Ninhydrin werden in 750 ml Ethylenglycolmonomethylether und 250 ml Natriumacetatpuffer (4 M; pH 5,51) gelöst und mit 5 ml Titan(III)chlorid-Lösung versetzt.

Chromatographische Bedingungen

Für die Taurin-Analytik wurde der Aminosäureanalysator LC5001 von Biotronik (München, B.R.D.) eingesetzt (variabel einstellbare Coiltemperatur). Die Absorptionen bei 440 und 570 nm wurden von einem Spectra-Physics-Integrator SP4270 aufgezeichnet und an die Labordaten-Station Labnet® zur weiteren Verarbeitung weitergesandt.

Probenvorbereitung

Proben von etwa 4 g, genau gewogen, werden in einem 100-ml Becherglas mit 20,0 ml Extraktionslösung und 40 ml 0,1 M Chlorwasserstoffsäure versetzt und etwa 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

Quantitative Analyse

Zunächst wird der Responsfaktor des Taurins mit einer Eichlösung ermittelt. Hierzu werden 5 ml einer Eichlösung in einem 100-ml Messkolben mit Verdünnungspuffer pH 2,20 zur Marke aufgefüllt und der pH-Wert auf 2,20 eingestellt. Anschließend wird chromatographiert.

Zur Bestimmung des Taurins in der Probe werden etwa 8 ml der Probesuspension mit 22 ml Verdünnungspuffer versetzt, der pH-Wert gegebenenfalls nachgestellt, und man filtriert über ein Faltenfilter. Nach weiterer Filtration über ein 0,22- μ m Membranfilter wird chromatographiert. Der Gehalt an Taurin ergibt sich dann aus dem Responsfaktor, der Einwaage der Probe und der Einwaage an internem Standard.

Isolierung der Interferenzfraktion

Eine Menge von 50 g Mais wurde 24 h in 6 M Chlorwasserstoffsäure unter Rückfluss erhitzt. Man saugte über eine Glasfritte ab, verdampfte die Chlorwasserstoffsäure am Rotationsverdampfer und verdünnte den Rückstand mit 100 ml 0,01 M Chlorwasserstoffsäure. Man gab diese Lösung auf einen Kationenaustauscher Lewatit S 100 (Säulendimensionen 40 cm \times 2 cm) und eluierte mit 500 ml 0,01 M Chlorwasserstoffsäure. Das bräunliche Eluat wurde am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingengt und für Vergleichsversuche verwendet. Eine Aminosäureanalyse zeigte, dass das Eluat frei von Aminosäuren war und nur den Interferenzpeak aufwies. Die HPLC-Analyse ergab, dass das Eluat aus mindestens 50 Komponenten bestand (Detektionswellenlänge 210 nm). Auf eine weitere Reinigung wurde verzichtet, da das Aminosäurechromatogramm nur die Interferenz als ninhydrinpositive Verbindung aufwies.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Chromatogramm des Maishydrolysates (Fig. 1), das mit einer Coiltemperatur von 125°C aufgenommen worden ist, zeigt, dass die Absorptionen bei 440 nm und 570 nm in Taurin-Bereich ähnlich hohe Werte aufweisen. Misst man jedoch

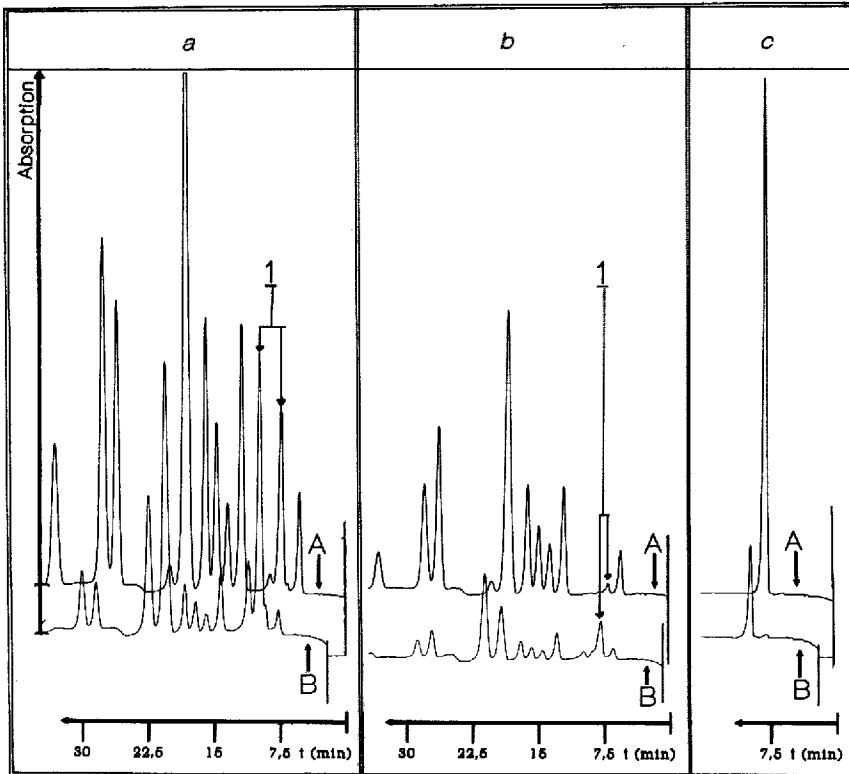


Fig. 1. Ionenchromatogramme eines Maishydrolysates, gemessen bei Coilttemperaturen von 100 (a) und 125°C (b); Vergleich: Taurin bei 125°C (c). Reagens: Ninhydrin; Detektionswellenlängen, A: 570 nm, B: 440 nm. Der interne Standard Norleucin erscheint bei *ca.* 45 min. 1 = Lävulinsäure. Diese Position entspricht auch der Retentionszeit des Taurins.

reines Taurin, so ist das Verhältnis der Absorptionshöhen etwa 1:6 (Fig. 1c). Fig. 1b zeigt das gleiche Maishydrolysat bei einer Coilttemperaturen von 100°C.

Fig. 2 zeigt den Einfluss der Coilttemperaturen auf die Absorption der Taurin-Interferenz. Man erkennt sehr deutlich, dass insbesondere die Interferenz erheblich sensibler bei beiden Wellenlängen auf die Reaktionstemperatur reagiert als z.B. das Taurin. Das Absorptionsverhalten des Taurins ist aber charakteristisch für primäre Aminosäuren.

Bereits Krysciak und Nitecka¹⁴ haben darauf hingewiesen, dass im Aminosäurechromatogramm vor der Asparaginsäure Substanzen eluieren, die eine untypische Farbe bei der Reaktion mit Ninhydrin ergeben. Eine Substanz, die identifiziert wurde, ist die Lävulinsäure, die bei der sauren Behandlung von Hexosen entsteht.

Ältere Modelle von Aminosäureanalysatoren arbeiten mit einer Coilttemperaturen von 100°C. Da hier nie Probleme bei der Bestimmung des Taurins aufgetaucht waren, wurde der Einfluss der Coilttemperaturen auf das Absorptionsverhalten der Taurin-Interferenz untersucht.

Lävulinsäure eluiert unter den oben angegebenen Chromatographiebedingun-

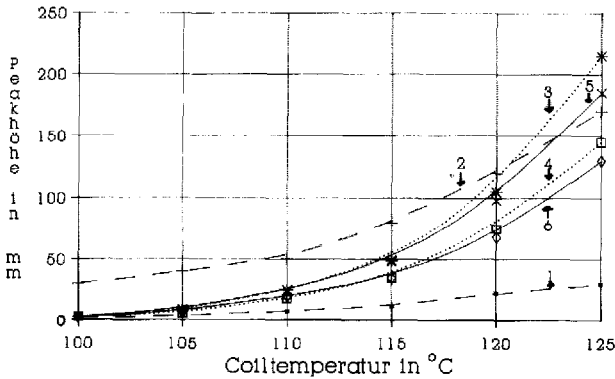


Fig. 2. Abhängigkeit der Absorption bei 440 und 570 nm von der Coiltemperatur für Taurin, Lävulinsäure und Taurin-Interferenz. 1 = Taurin (440 nm); 2 = Taurin (570 nm); 3 = Taurin-Interferenz (440 nm); 4 = Taurin-Interferenz (570 nm); 5 = Lävulinsäure (440 nm); 6 = Lävulinsäure (570 nm). Reagens: Ninhydrin. Nur das relative Absorptionsverhalten ist dargestellt.

gen zur gleichen Zeit wie die Interferenz. Der Fig. 2 kann man entnehmen, dass auch die Kinetik der Anfärbung ähnlich ist. Besonders auffallend ist, dass die Reaktion so sehr stark abhängig ist von der Temperatur des Coils. Dass sich die Interferenz besonders bei pflanzlichen Produkten bemerkbar macht, liegt daran, dass diese bekanntermassen auch über den höchsten Anteil an Hexosen verfügen. Im HPLC lässt sich zeigen, dass die Interferenz auch unter verschiedenen Bedingungen ein identisches Elutionsverhalten aufweist wie Lävulinsäure. Somit ist sicher, dass es die aus Hexosen gebildete Lävulinsäure ist, die die Taurinbestimmung stört.

Fig. 3 zeigt das Absorptions- und Chromatographieverhalten der Taurin-Interferenz und Lävulinsäure in Abhängigkeit von der Coiltemperatur.

Auch Erbersdobler *et al.*⁷ haben darauf hingewiesen, dass bei Arbeiten mit Hochtemperaturcoils Schwierigkeiten auftreten. Geht es bei ihnen jedoch insbesondere um Probleme der Abtrennung von Harnstoff und Phosphoethanolamin, so sind die Probleme bei Hydrolysaten gänzlich anders gelagert.

Phosphoethanolamin und Harnstoff verhalten sich bei der Reaktion mit Ninhydrin wie Aminosäuren. Die Interferenz jedoch zeigt das Anfärbeverhalten, wie es in Fig. 2 dargestellt ist. Dies bedeutet, dass man Taurin mit den gängigen Pufferprogrammen *nicht* aus den Hydrolysaten bestimmen darf, wenn man Aminosäureanalytoren verwendet, deren Coiltemperatur über 100°C beträgt. Unter diesen Bedingungen stört die bei der Hydrolyse entstehende Lävulinsäure so stark, dass keine exakten Taurin-Werte mehr ermittelt werden können.

Um jedoch weiterhin Taurin mit dem Aminosäureanalytator quantifizieren zu können, wurde die Probenvorbereitung modifiziert. Diese unterscheidet sich nur unwesentlich von der früher⁷ beschriebenen Probenvorbereitung. Grundlage der Änderung ist die Tatsache, dass Taurin als Stoffwechselprodukt nicht gebunden in der Matrix vorliegt, wie dies z.B. auch für supplementierte Aminosäuren gilt. Dies gilt jedoch nicht für Taurin in Darminhalten. Hier kann das Taurin so stark gebunden sein, dass sich diese Verbindungen nicht mit 0,1 M Chlorwasserstoffsäure spalten lassen. Demzufolge ist es logisch, die Probenvorbereitung für die Taurin-Bestimmung

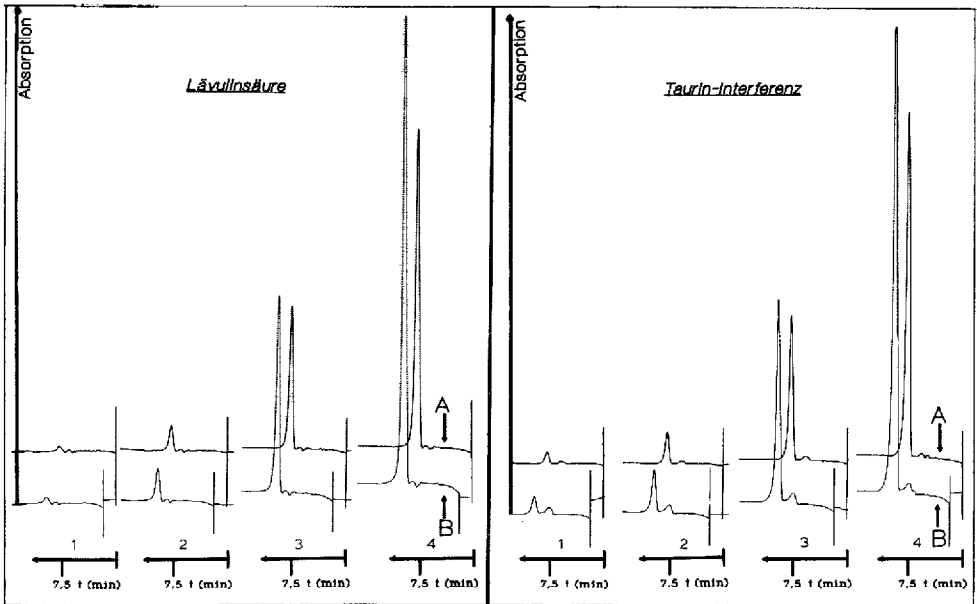


Fig. 3. Ionenchromatogramme des Absorptions- und Chromatographie-Verhaltens der Taurin-Interferenz und Lävulinsäure in Abhängigkeit von der Coilttemperatur. 1 = 100°C; 2 = 110°C; 3 = 120°C; 4 = 125°C. Reagens: Ninhydrin; Detektionswellenlängen, A: 570 nm, B: 440 nm.

dervonsupplementierten Aminosäuren anzugleichen. Will man jedoch gebundenes Taurin quantifizieren, so muss man drastisch hydrolysieren (6 M Chlorwasserstoffsäure, 24 h am Rückfluss). Die Coilttemperatur darf dann aber 100°C nicht überschreiten.

Für die Quantifizierung freien Taurins wird die feingemahlene Probe (0,25 mm)

TABELLE II

VERGLEICH DER TAURIN-WERTE ERMITTELT AUS DER OXIDATION BZW. DER EXTRAKTION AM BEISPIEL VON FISCHMEHL

Probe-Nr.	Gehalt aus Oxidation (%)	Gehalt aus Extraktion mit 0,1 M Chlorwasserstoffsäure (%)	Differenz Oxidation/Extraktion (%)
1	0,721	0,632	+ 14,3
2	0,689	0,565	+ 22,0
3	0,266	0,250	+ 6,4
4	0,700	0,633	+ 10,6
5	0,167	0,159	+ 5,0
6	0,318	0,254	+ 25,2
7	0,886	0,738	+ 20,1
8	0,916	0,789	+ 16,1
9	0,591	0,474	+ 24,7
10	0,411	0,323	+ 27,2

TABELLE III
WIEDERFINDUNG AN SUPPLEMENTIERTEM TAURIN IM MISCHFUTTER

<i>Supplementierungsrate (%)</i>	<i>Gehalt aus Extraktion mit 0,1 M Chlorwasserstoffsäure (%)</i>	<i>Wiederfindung (%)</i>
0,005	0,0044	88
0,01	0,009	90
0,02	0,019	95
0,05	0,049	98
0,1	0,099	99
0,2	0,201	100,5

mit 0,1 M Chlorwasserstoffsäure 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und nach Filtration analysiert (Extraktion). Als interner Standard wird Norleucin (bereits in der Chlorwasserstoffsäure gelöst) verwendet. Versuche, Cysteinsäure als internen Standard zu verwenden, um die Analysenzeit drastisch zu senken, scheiterten daran, dass die Region der Cysteinsäure im Chromatogramm nicht interferenzfrei ist.

Der Erfahrung nach sind die grössten Interferenzen bei pflanzlichen Rohstoffen zu erwarten (siehe auch Fig. 1a). Aber auch tierische Produkte sind nicht interferenzfrei, wie Tabelle II zeigt.

Bei der Oxidation wird die zu untersuchende Probe zunächst mit Perameisensäure oxidiert und nach Zersetzung der überschüssigen Perameisensäure mit Bromwasserstoffsäure 24 h in 6 M Chlorwasserstoffsäure unter Rückfluss erhitzt. Die Oxidation dient dazu, die hydrolyselabilen Aminosäuren Methionin und Cystin in die stabilen Derivate Methioninsulfon und Cysteinsäure zu überführen.

Wie man jedoch unschwer der Spalte Differenz in Tabelle II entnehmen kann, muss man unter den gewählten Pufferbedingungen auch auf den Taurin-Wert aus den Hydrolysaten tierischer Produkte verzichten. Fischmehl wurde hier als Repräsentant

TABELLE IV
TAURINGEHALTE VERSCHIEDENER ROHSTOFFE

<i>Probe</i>	<i>Gehalt (%) an Taurin aus Extraktion mit 0,1 M Chlorwasserstoffsäure</i>
Weizen	n.n.*
Mais	n.n.
Gerste	n.n.
Sojaextraktionsschrot	n.n.
Seidenraupen	n.n.
Blutmehl	n.n.
Fleischknochenmehl	0,061
Federmehl	0,048
Fischmehl	0,555
Geflügelabfallmehl	0,154
Lachsfutter	0,121

* n.n., ≤ 0.001 .

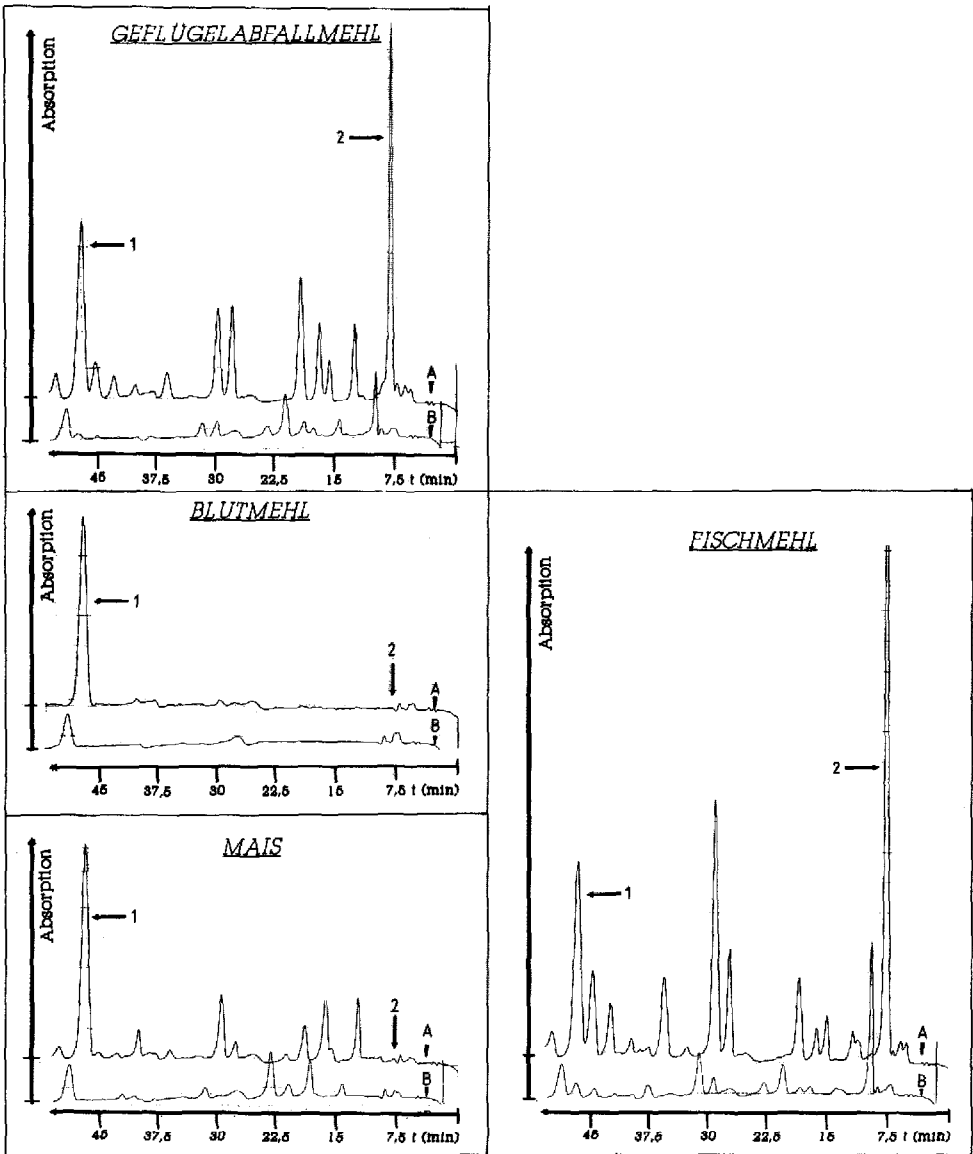


Fig. 4. Ionenchromatogramme der Extraktionen von Rohstoffen: Mais (3,8 g), Blutmehl (3,5 g), Fischmehl (1,56 g), Geflügelabfallmehl (1,86 g) (Einwaage an Rohstoff). 1 = Norleucine; 2 = Taurin. Reagens: Ninhydrin; Detektionswellenlängen, A: 570 nm, B: 440 nm.

tierischer Produkte gewählt, da dieses über recht hohe Gehalte an Taurin verfügt. Die Konsequenz kann an sich nur lauten: Auch tierische Produkte sind bei der Taurin-Bestimmung der Extraktion zu unterwerfen. Die Reproduzierbarkeit der Taurin-Bestimmung nach der Extraktionsmethode wurde an Sojaextraktionsschrot ermittelt, der mit 0,05% Taurin supplementiert war. Die relative Standardabweichung betrug $\pm 1,65\%$ bei einer Wiederfindung von 98–100% Taurin.

Die nach der vorliegenden Methode ermittelten Wiederfindungsraten verschiedener Supplementierungen sind in Tabelle III zusammengefasst. Weiterhin wurden nach dieser Methode verschiedene Rohstoffe auf ihren Tauringehalt untersucht. Die Ergebnisse sind der Tabelle IV zu entnehmen, und die Chromatogramme sind in Fig. 4 dargestellt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode beschrieben, die es erlaubt, Taurin neben anderen supplementierten Aminosäuren auf einem Aminosäureanalysator zu analysieren, dessen Coiltemperatur wesentlich über 100°C beträgt. Die Methode zeichnet sich durch eine einfache Probenvorbereitung, sehr gute Reproduzierbarkeit und sehr gute Wiederfindungsraten aus. Die Methode ist insbesondere geeignet für Laboratorien, die die Aminosäureanalytik mit Aminosäureanalysatoren betreiben, deren Coiltemperatur über 100°C beträgt. Höhere Coiltemperaturen erhöhen die Farbausbeute, so dass sich dieses Prinzip immer mehr durchsetzt. Die Taurin-Bestimmung aus Hydrolysaten wird jedoch damit fragwürdig.

Es wird weiterhin gezeigt, dass es sich bei den die Taurin-Bestimmung störenden Substanzen um Stoffe handelt, die erst bei Temperaturen ab 100°C mit Ninhydrin reagieren und ein ähnliches Retentionsverhalten am Kationenaustauscher aufweisen wie Taurin. Hauptstörschubstanz ist die Lävulinsäure, die bei der sauren Behandlung von Hexosen entsteht. Das Absorptionsverhalten der Reaktionsprodukte der Störschubstanz mit Ninhydrin bei 440 und 570 nm ist jedoch gänzlich verschieden von dem Verhalten, wie man es von primären und sekundären Aminosäuren her kennt. Diese Störschubstanz tritt insbesondere bei pflanzlichen, in untergeordnetem Mass jedoch auch bei tierischen Produkten auf, weshalb generell die Taurin-Bestimmung nicht aus den Hydrolysaten erfolgen sollte, wenn mit einem Hochtemperaturcoil gearbeitet wird.

LITERATUR

- 1 T. P. Singer, in D. M. Greenberg (Herausgeber), *Metabolism of Sulfur Compounds, Metabolic Pathways*, Vol. 7, Academic Press, New York, 1975, S. 535.
- 2 A. J. L. Cooper, *Ann. Rev. Biochem.*, 52 (1983) 187.
- 3 K. Knopf, J. A. Sturman, M. Armstrong und K. C. Hayes, *J. Nutr.*, 108 (1978) 773.
- 4 P. D. Pion, M. D. Kittleson, Q. R. Rogers und J. G. Morris, *Science (Washington, D.C.)*, 237 (1987) 764.
- 5 H. Kataoka, S. Yamamoto und M. Makita, *J. Chromatogr.*, 306 (1984) 61.
- 6 H. F. Erbersdobler, H.-G. Greulich, A.-B. Holstein und E. Trautwein, *Landwirtsch. Forsch. Sonderh.*, 38 (1981) 449.
- 7 H. F. Erbersdobler, H.-G. Greulich und E. Trautwein, *J. Chromatogr.*, 254 (1983) 332.
- 8 J. D. Stuart, T. D. Wilson, D. W. Hill, F. H. Walters und S. Y. Feng, *J. Liq. Chromatogr.*, 2 (1979) 809.
- 9 B. R. Larsen, D. S. Grosso und S. Y. Chang, *J. Chromatogr. Sci.*, 18 (1980) 233.
- 10 G. H. T. Wheler und J. T. Russel, *J. Liq. Chromatogr.*, 4 (1981) 1281.
- 11 M. Eslami und J. D. Stuart, *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (1984) 1117.
- 12 L. L. Hirschberger, J. De La Rosa und M. H. Stipanuk, *J. Chromatogr.*, 343 (1985) 303.
- 13 B. A. Biondi, A. Negri und A. Ioppollo, *J. Chromatogr.*, 369 (1986) 431.
- 14 J. Krysiak und E. Nitecka, *Acta Aliment. Pol.*, 11 (1985) 369.