

Stof/product	Aminozuren
Type methode	ionenwisselaarschromatografie
Te onderzoeken in	Mengvoeder; voormengsels
Minimum bepaalbaarheidsgrens	0,5 gram/kg (500 ppm)
Herhaalbaarheid	wordt nog ingevuld
Reproduceerbaarheid	wordt nog ingevuld
Categorie	A
Titel	Bepaling van aminozuren (zie verder ook onder 1. Doel en toepassingsgebied). Richtlijn 98/64/EG van 3-9-1998; Publicatieblad L257/14-23 van 19-9-1998

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van de vrije (synthetische en natuurlijke) aminozuren en de totale hoeveelheid (vrije en in peptiden gebonden) aminozuren in diervoeders, waarbij gebruik wordt gemaakt van een aminozuuranalysator. De methode kan worden gebruikt voor bepaling van de volgende aminozuren: cyst(e)ine, methionine, lysine, threonine, alanine, arginine, asparaginezuur, glutaminezuur, glycine, histidine, isoleucine, leucine, fenylalanine, proline, serine, tyrosine en valine.

Deze methode maakt geen onderscheid tussen het aminozuur zelf en zijn zouten, en kan niet differentiëren tussen de D- en L-vorm van aminozuren. De methode kan niet worden gebruikt voor de bepaling van tryptofaan of van hydroxyanalogen van aminozuren.

2. Principe

2.1 Vrije aminozuren

De vrije aminozuren worden met verdund zoutzuur geëxtraheerd. Stikstofhoudende macromoleculen die meegaan bij de extractie worden geprecipiteerd met sulfosalicylzuur en verwijderd door filtratie. De pH van de gefiltreerde oplossing wordt op 2,20 gebracht. De aminozuren worden gescheiden door ionenwisselingschromatografie, en na reactie met ninhydrine bepaald door fotometrische detectie bij 570 nm.

2.2 Totaal aminozuurgehalte

De gekozen werkwijze is afhankelijk van de te onderzoeken aminozuren. Cyst(e)ine en methionine moeten vóór hydrolyse tot resp. cysteïnezuur en methioninesulfon worden geoxideerd. Tyrosine moet worden bepaald in hydrolysaten van niet-geoxideerde monsters. Alle andere aminozuren die in punt 1 zijn genoemd kunnen zowel in geoxideerde als in niet-geoxideerde monsters worden bepaald.

De oxidatie wordt uitgevoerd bij 0 °C met een mengsel van permierenzuur en fenol. Overmaat oxidatiemiddel wordt ontleed met natriumbisulfiet. Het geoxideerde of niet-geoxideerde monster wordt gehydrolyseerd met zoutzuur (c = 6 mol/l) gedurende 23 uur. De pH van het hydrolysaat wordt op 2,20 gebracht. De aminozuren worden door ionenwisselingschromatografie van elkaar gescheiden, en worden bepaald door reactie met ninhydrine gevolgd door fotometrische detectie bij 570 nm (440 nm voor proline).

3. Reagentia

Er moet dubbel gedestilleerd water of water van vergelijkbare kwaliteit worden gebruikt (geleidbaarheid <10 µS).

3.1. Waterstofperoxide, w = 30 %.

3.2. Mierenzuur, w = 98-100 %.

- 3.3. Fenol.
- 3.4. Natriumbisulfiet.
- 3.5. Natriumhydroxide.
- 3.6. 5-Sulfosalicylzuurdihydraat.
- 3.7. Zoutzuur, dichtheid ca. 1,18 g/ml.
- 3.8. Trinatriumcitraatdihydraat.
- 3.9. 2,2'-Thiodiethanol (thiodiglycol).
- 3.10. Natriumchloride.
- 3.11. Ninhydrine.
- 3.12. Petroleumether, kooktraject 40-60 °C
- 3.13. Norleucine, of een andere verbinding die kan dienen als interne standaard.
- 3.14. Stikstofgas (< 10 ppm zuurstof).
- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Amino-zuren.
 - 3.16.1. Standaardverbindingen als genoemd in punt 1. Zuivere verbindingen, zonder kristalwater. Vóór gebruik gedurende een week drogen in vacuüm boven P₂O₅ of H₂SO₄.
 - 3.16.2. Cysteïnezuur.
 - 3.16.3. Methioninesulfon.
- 3.17. Natriumhydroxideoplossing, c = 7,5 mol/l:
Los 300 g NaOH (3.5) op in water en vul aan tot 1 liter.
- 3.18. Natriumhydroxideoplossing, c = 1 mol/l:
Los 40 g NaOH (3.5) op in water en vul aan tot 1 liter.
- 3.19. Mierenzuur-fenoloplossing:
Meng 889 g mierenzuur (3.2) met 111 g water en voeg 4,73 g fenol (3.3) toe.
- 3.20. Hydrolysemengsel, c = 6 mol HCl/l met 1 g fenol/l:
Voeg 1 g fenol (3.3) toe aan 492 ml HCl (3.7) en vul aan met water tot 1 liter.
- 3.21. Extractiemengsel, c = 0,1 mol HCl/l met 2 % thiodiglycol: Neem 8,2 ml HCl (3.7), meng met circa 900 ml water, voeg 20 ml thiodiglycol (3.9) toe en vul aan met water tot 1 liter (meng 3.7 en 3.9 niet direct).
- 3.22. 5-Sulfosalicylzuuroplossing, β = 6 %:
Los 60 g 5-sulfosalicylzuur (3.6) op in water en vul aan met water tot 1 liter.

3.23. Oxidatiemengsel (permierenzuur-fenol):
Meng in een klein bekeerglas 0,5 ml waterstofperoxide (3.1) met 4,5 ml mierenzuur-fenoloplossing (3.19). Incubeer gedurende 1 uur bij 20-30 °C zodat er permierenzuur wordt gevormd, en koel vervolgens in een ijsbad met smeltend ijs (15 minuten) voordat de vloeistof aan het monster wordt toegevoegd.

Voorzichtig: vermijd aanraking met de huid en draag beschermende kleding.

3.24. Citraatbuffer, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+ / \text{l}$, pH 2,20:
Los 19,61 g natriumcitraat (3.8), 5 ml thiodiglycol (3.9), 1 g fenol (3.3) en 16,50 ml HCl (3.7) op in ongeveer 800 ml water. Stel de pH in op 2,20. Vul aan met water tot 1 liter.

3.25. Elutiebuffers, bereid overeenkomstig de voorschriften voor de gebruikte analysator (4.9).

3.26. Ninhydrinereagens, bereid overeenkomstig de voorschriften voor de gebruikte analysator (4.9).

3.27. Standaardaminozuuroplossingen. Deze oplossingen moeten worden bewaard bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

3.27.1. Standaardstockoplossing van aminozuren (3.16.1). $c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ van ieder aminozuur in zoutzuur. Commercieel verkrijgbaar.

3.27.2. Standaardstockoplossing van cysteïnezuur en methioninesulfon, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$.

Los 0,2115 g cysteïnezuur (3.16.2) en 0,2265 g methioninesulfon (3.16.3) op in citraatbuffer (3.24) in een maatkolf van 1 liter, en vul aan tot de maatstreep met citraatbuffer. Bewaar, niet langer dan twaalf maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C. Deze oplossing wordt niet gebruikt wanneer de standaardstockoplossing (3.27.1) cysteïnezuur en methioninesulfon bevat.

3.27.3. Standaardstockoplossing van de interne standaard, bijv. norleucine, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

Los 0,6560 g norleucine (3.13) op in citraatbuffer (3.24) in een maatkolf van 250 ml en vul aan tot de maatstreep met citraatbuffer. Bewaar, niet langer dan zes maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

3.27.4. Standaardaminozuurrijke oplossing voor gebruik bij hydrolysaten, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ cysteïnezuur en methioninesulfon, en $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ van de andere aminozuren.

Los 2,2 g natriumchloride (3.10) op in een 100 ml bekeerglas met 30 ml citraatbuffer (3.24). Voeg 4,00 ml standaardstockoplossing van aminozuren (3.27.1) toe, 4,00 ml standaardstockoplossing van cysteïnezuur en methioninesulfon (3.27.2), en - indien van toepassing - 0,50 ml standaardstockoplossing van de interne standaard (3.27.3). Stel de pH in op 2,20 met natriumhydroxideoplossing (3.18).

Breng kwantitatief over in een 50 ml maatkolf, vul aan tot de maatstreep met citraatbuffer (3.24) en meng.

Bewaar, niet langer dan drie maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5°C.

Zie ook opmerking 9.1.

3.27.5. Standaardaminozuurijkoplossing voor gebruik bij hydrolysaten, bereid volgens punt 5.3.3.1, en voor gebruik bij extracten (5.2). De ijkoplossing wordt bereid als beschreven in 3.27.4, met weglating van natriumchloride.

Bewaar, niet langer dan drie maanden, bij een temperatuur van ten hoogste 5°C.

4. Apparatuur

4.1. Rondbodempkolf, 100 of 250 ml, met refluxkoeler.

4.2. Fles van borosilicaatglas, 100 ml, met schroefdop voorzien van rubber/teflon inlay (bijv. Duran, Schott) voor gebruik in de oven.

4.3. Oven met geforceerde ventilatie en temperatuurregulering, nauwkeuriger dan $\pm 2^\circ\text{C}$.

4.4. pH-meter (in drie decimalen afleesbaar).

4.5. Membraanfilter (0,2 μm).

4.6. Centrifuge.

4.7. Rotatievacuümverdamer.

4.8. Mechanische schud- of roerapparatuur.

4.9. Aminozuuranalysator of HPLC-apparatuur met ionenuitwisselaar (kolom), onderdeel voor de ninhydrinereactie (verkrijgen van aminozuurderivaten na de scheiding) en fotometrische detector.

De kolom wordt gevuld met gesulfoneerd polystyreenhars waarop aminozuren van elkaar en van ander ninhydrinepositief materiaal worden gescheiden. De stroomsnelheid van buffer en ninhydrine wordt gereguleerd door pompen met een nauwkeurigheid van $\pm 0,5\%$, zowel tijdens de standaardijking als tijdens de analyse van het monster.

Bij sommige aminozuuranalysatoren kunnen hydrolysemethoden worden gebruikt waarbij het hydrolysaat een natriumconcentratie bevat van $c = 0,8 \text{ mol/l}$, terwijl ook alle mierenzuur overgebleven uit de oxidatiestap nog aanwezig is. Andere analysatoren geven geen goede scheiding van bepaalde aminozuren in hydrolysaten met een overmaat mierenzuur en/of een hoge natriumconcentratie. In zulke gevallen wordt het volume zuur gereduceerd door verdamping tot ca.5 ml na hydrolyse en voor instelling van de juiste pH. De verdamping gebeurt onder vacuüm bij ten hoogste 40 °C.

5. Werkwijze

5.1. Bereiding van het monster

Het monster wordt zó fijn gemalen dat de deeltjes een zeef met openingen van 0,5 mm passeren. Monsters met een hoog vochtgehalte moeten voor het malen eerst worden gevriesdroogd, of worden aan de lucht gedroogd bij ten hoogste 50 °C. Monsters met een hoog vetgehalte moeten voor het malen worden geëxtraheerd met petroleumether (3.12).

5.2. Bepaling van vrije aminozuren in diervoeders in voormengsels

Weeg een geschikte hoeveelheid (1-5 g) van het voorbereide monster (5.1) op 0,2 mg nauwkeurig af in een erlenmeyer en voeg 100,0 ml extractiemengsel (3.21) toe. Schud of roer het mengsel gedurende 60 minuten in een mechanische schudmachine of met een magnetische roerder (4.8). Laat het neerslag bezinken, en pipetteer 10,0 ml van de bovenstaande vloeistof in een bekersglas van 100 ml.

Voeg onder aanhoudend roeren 5,0 ml sulfosalicylzuuroplossing (3.22) toe, en roer nog vijf minuten door op de magnetische roerder. Filtreer of centrifugeer het supernatant om eventueel aanwezig neerslag te verwijderen. Breng 10,0 ml van de verkregen oplossing in een bekersglas van 100 ml op pH 2,20 met behulp van natriumhydroxideoplossing (3.18), spoel de oplossing met behulp van citraatbuffer (3.24) in een maatkolf van geschikt volume, en vul tot de maatstreep aan met de bufferoplossing (3.24).

Voeg, als er een interne standaard wordt gebruikt, 1,00 ml interne standaard (3.27.3) toe per 100 ml eindoplossing en vul tot de maatstreep aan met de bufferoplossing (3.24).

Ga verder met de chromatografiestap als beschreven onder punt 5.4.

Als chromatografie van de extracten niet dezelfde dag mogelijk is, moeten zij worden bewaard bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

5.3. Bepaling van de totale hoeveelheid aminozuren

5.3.1. Oxidatie

Weeg een hoeveelheid (0,1-1 g) van het voorbereide monster (5.1) op 0,2 mg nauwkeurig af in:

- een rondbodemkolf van 100 ml (4.1) in geval van open hydrolyse (5.3.2.3) of
- een rondbodemkolf van 250 ml (4.1) als een lage natriumconcentratie vereist wordt (5.3.3.1) of
- een fles van 100 ml met schroefdop (4.2) voor gesloten hydrolyse (5.3.2.4).

De ingewogen hoeveelheid monster moet een stikstofgehalte bevatten van ca. 10 mg en mag niet meer dan 100 mg vocht bevatten.

Breng de kolf/fles in een ijsbad met smeltend ijs op 0 °C, voeg 5 ml oxidatiemengsel (3.23) toe en meng met een gebogen glazen spatel. Sluit de kolf/fles met de spatel erin luchtdicht af met parafilm, en zet het ijsbad met het gesloten vat gedurende 16 uur in een koelkast bij 0 °C. Neem de kolf/fles na 16 uur uit de koelkast en ontleed de overmaat oxidatiereagens door 0,84 g natriumbisulfiet (3.4) toe te voegen.

Ga verder met 5.3.2.1.

5.3.2. Hydrolyse

5.3.2.1. Hydrolyse van geoxideerde monsters

Voeg aan het volgens 5.3.1 geoxideerde monster 25 ml hydrolysemengsel (3.20) toe, waarbij zorgvuldig alle sporen van het mengsel van de wand van het vat en van de spatel worden gespoeld. Ga, afhankelijk van de gebruikte hydrolyseprocedure, verder met 5.3.2.3 of 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hydrolyse van niet-geoxideerde monsters

Weeg op 0,2 mg nauwkeurig een hoeveelheid van 0,1 tot 1 g van het voorbereide monster (5.1) af in een 100 ml of 250 ml rondbodemkolf (4.1), of in een 100 ml fles met schroefdop (4.2). De ingewogen hoeveelheid monster moet een stikstofgehalte bevatten van ca. 10 mg. Voeg voorzichtig 25 ml hydrolysemengsel (3.20) toe en meng met het monster. Ga verder met punt 5.3.2.3 of punt 5.3.2.4.

5.3.2.3. Open hydrolyse

Doe drie glasparels bij het mengsel (bereid volgens 5.3.2.1 of 5.3.2.2) en kook gedurende 23 uur in een kolf voorzien van refluxkoeler. Spoel, na beëindiging van de hydrolyse, de koeler schoon met 5 ml citraatbuffer (3.24). Neem de koeler van de kolf en plaats de kolf in een ijsbad. Ga verder met 5.3.3.

5.3.2.4. Gesloten hydrolyse

Zet de fles met het volgens punt 5.3.2.1 of 5.3.2.2 bereide mengsel in een oven (4.3) bij 110 °C. Laat gedurende het eerste uur de schroefdop los op de fles staan, om te voorkomen dat zich spanning opbouwt als gevolg van gasvorming en om explosies te voorkomen. *Sluit de fles niet af met de dop.* Draai de dop na een uur op de fles en laat deze gedurende 23 uur in de oven (4.3) staan. Neem de fles uit de oven als de hydrolyse is voltooid, draai de dop voorzichtig van de fles en zet deze in een bad met smeltend ijs. Laat afkoelen.

Breng, afhankelijk van de manier waarop de pH wordt ingesteld (5.3.3), de inhoud van de fles kwantitatief over in een bekersglas of een rondbodemkolf van 250 ml met behulp van citraatbuffer (3.24).

Ga verder met 5.3.3.

5.3.3. Instelling van de pH

Ga verder met instelling van de pH volgens 5.3.3.1 of 5.3.3.2, afhankelijk van de natriumtolerantie van de aminozuuranalysator (4.9).

5.3.3.1. Voor chromatografiesystemen (4.9) die een lage natriumconcentratie vereisen

Bij aminozuuranalysatoren die een lage natriumconcentratie vereisen (en waarbij het volume zuur wordt ingedampt) wordt aanbevolen een standaardstockoplossing van de interne standaard (3.27.3) te gebruiken.

Voeg in dit geval 2,00 ml van de stockoplossing van de interne standaard (3.27.3) toe aan het hydrolysaat, voor af na verdamping.

Voeg twee druppels 1-octanol (3.15) toe aan het hydrolysaat, verkregen volgens punt 5.3.2.3 of 5.3.2.4.

Breng met behulp van een rotatieverdamer (4.7) onder vacuüm bij 40 °C het volume terug tot 5-10 ml. Wordt het eindvolume per ongeluk kleiner dan 5 ml, dan moet het hydrolysaat worden weggegooid en de analyse opnieuw worden ingezet.

Stel de pH in op 2,20 met natriumhydroxideoplossing (3.18) en ga verder met punt 5.3.4.

5.3.3.2. Voor alle andere aminozuuranalysatoren (4.9)

Neem het volgens 5.3.2.3 of 5.3.2.4 verkregen hydrolysaat en neutraliseer het ten dele door voorzichtig, onder roeren, 17 ml natriumhydroxideoplossing (3.17) toe te voegen; let op dat de temperatuur niet hoger wordt dan 40 °C.

Stel de pH in op 2,20 bij kamertemperatuur met behulp van natriumhydroxideoplossing (3.17) en natriumhydroxideoplossing (3.18). Ga verder met 5.3.4.

5.3.4. Monsteroplossing voor chromatografie

Breng het op pH gebrachte hydrolysaat (5.3.3.1 of 5.3.3.2) met behulp van citraatbuffer (3.24) kwantitatief over in een 200 ml maatkolf en vul aan tot de maatstreep met buffer (3.24).

Als er nog geen interne standaard is gebruikt, voeg dan nu 2,00 ml interne standaard (3.27.3) toe en vul tot de maatstreep aan met citraatbuffer (3.24). Meng goed.

Ga verder met de chromatografiestap (5.4).

Als chromatografie van de monsteroplossingen niet dezelfde dag mogelijk is, moeten zij worden bewaard bij een temperatuur van ten hoogste 5 °C.

5.4. Chromatografie

Laat het extract (5.2) of hydrolysaat (5.3.4) voor de chromatografische bepaling op kamertemperatuur komen. Schud het mengsel en filtreer een geschikte hoeveelheid door een 0,2 µm membraanfilter (4.5). De resulterende heldere oplossing wordt gebruikt voor ionenwisselingschromatografie met behulp van een aminozuuranalysator (4.9).

Injectie kan met de hand worden gedaan of automatisch. Het is van belang dat steeds dezelfde hoeveelheid oplossing ± 0,5 % op de kolom wordt gebracht voor analyse van standaarden en monsters - tenzij er een interne standaard wordt

gebruikt - en dat de ratio's natrium/aminozuur in standaard- en monsteroplossingen onderling zo veel mogelijk overeenkomen.

Hoe vaak er ijkbepalingen nodig zijn is afhankelijk van de stabiliteit van het ninhydrinereagens en van het analytische systeem in het algemeen. Standaarden en monsters worden zodanig met citraatbuffer (3.24) verdund dat de standaard een piekoppervlak levert dat 30-200 % bedraagt van het piekoppervlak van het monster.

Er zal een zekere variabiliteit zitten in de chromatografie van aminozuren, afhankelijk van het type analysator en de gebruikte soort hars. Het systeem waarvoor wordt gekozen moet de aminozuren van elkaar kunnen scheiden, en van andere ninhydrinepositieve stoffen. Binnen het bepaling bereik moet het chromatografiesysteem een lineaire respons geven op veranderingen in de hoeveelheid aminozuren die op de kolom worden gebracht.

Er moeten bij de chromatografische analyse van een equimolaire oplossing van de te bepalen aminozuren dal/piekratio's worden verkregen die overeenkomen met de hieronder genoemde. Deze equimolaire oplossing moet ten minste 30 % bevatten van de maximale hoeveelheid van elk aminozuur die nog nauwkeurig kan worden bepaald met het aminozuuranalysesysteem (4.9).

Voor scheiding van threonine en serine mag de dal/piekratio voor de kleinste piek van de twee overlappende aminozuren op het chromatogram niet meer bedragen dan 2:10. (Als alleen cyst(e)ine, methionine, threonine en lysine worden bepaald, wordt de nauwkeurigheid van de bepaling ongunstig beïnvloed door onvoldoende scheiding van aangrenzende pieken). Voor alle andere aminozuren moet de scheiding beter zijn dan 1:10.

Het systeem moet lysine, van "lysine artefacten" en van ornithine kunnen scheiden.

6. Berekening van de resultaten

Het piekoppervlak van monster en standaard wordt voor elk individueel aminozuur bepaald en het gehalte, uitgedrukt als g aminozuur per kg monster, wordt berekend.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{g aminozuur per kg monster}$$

Vermenigvuldig bij gebruik van een interne standaard met: $\frac{D}{C}$

A = piekoppervlak van hydrolysaat of extract

B = piekoppervlak van standaardoplossing

C = piekoppervlak van interne standaard in hydrolysaat of extract

D = piekoppervlak van interne standaard, standaardoplossing

MW = molecuulgewicht

E = concentratie standaard in $\mu\text{mol/ml}$

W = gewicht monster (g) (gecorrigeerd tot oorspronkelijk gewicht indien gedroogd of ontvet)

F = ml totaal hydrolysaat (5.3.4) of ml berekend totaal verdunningsvolume van het extract (6.1).

Cystine en cysteïne worden beide in hydrolysaten van geoxideerde monsters bepaald als cysteïnezuur, maar berekend als cystine (C₆H₁₂N₂O₄S₂, MW 240,30) door gebruik te maken van MW 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Methionine wordt in hydrolysaten van geoxideerd monster bepaald als methioninesulfon, maar berekend als methionine met behulp van het MW van methionine: 149,21.

Toegevoegd vrij methionine wordt na extractie bepaald als methionine; voor de berekening wordt hetzelfde MW gebruikt.

- 6.1 Het totale verdunningsvolume van extracten (F) voor de bepaling van vrije aminozuren (5.2) wordt als volgt berekend:

$$F = 100 \text{ ml} \times \frac{(10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V_{\text{ml}}}{10 \text{ ml}}$$

V = eindvolume van het extract.

7. Evaluatie van de methode

De methode is in 1990 getest in een internationaal ringonderzoek, waarvoor vier soorten voer zijn gebruikt (mengvoer voor varkens, slachtkuikenvoer, eiwitconcentraat, voormengsel). De waarden, na eliminatie van de uitschieters, van gemiddelde en standaardafwijking worden gegeven in onderstaande tabel:

Gemiddelden in g/kg

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Slachtkuikenvoer	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Eiwitconcentraat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Voormengsel	58,42 n = 16	-	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria

7.1 Herhaalbaarheid

Herhaalbaarheidswaarden voor de onderzochte aminozuren. De herhaalbaarheid, uitgedrukt als "standaardafwijking binnen het laboratorium" van bovengenoemd ringonderzoek wordt weergegeven in onderstaande tabellen:

Standaardafwijking binnen het laboratorium (S_i) in g/kg

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Slachtkuikenvoer	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Eiwitconcentraat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Voormengsel	1,30 n = 16	-	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria

Variatiecoëfficiënt (%) voor de standaardafwijking binnen het laboratorium (S_i)

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Slachtkuikenvoer	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Eiwitconcentraat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Voormengsel	2,2 n = 16	-	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria

7.2. Reproduceerbaarheid

De waarden van de standaardafwijking tussen laboratoria onderling, verkregen in bovengenoemd ringonderzoek worden weergegeven in onderstaande tabel:

Standaardafwijking tussen laboratoria (S_R) in g/kg

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvoer	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Slachtkuikenvoer	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Eiwitconcentraat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Voormengsel	2,49 n = 16	-	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria

Variatiecoëfficiënt (%) van de standaardafwijking tussen laboratoria (S,)

Referentiemateriaal	Aminozuur			
	Threonine	Cyst(e)ine	Methionine	Lysine
Varkensmengvo er	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Slachtkuikenvoer	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Eiwitconcentraat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Voormengsel	4,3 n = 16	-	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = aantal deelnemende laboratoria

8. Gebruik van referentiematerialen

Of de methode op de juiste manier is toegepast dient te worden geverifieerd door duplobepaling van gecertificeerde referentiematerialen, voorzover beschikbaar. Aanbevolen wordt de calibratie uit te voeren met gecertificeerde aminozuurijkoplossingen.

9. Opmerkingen

9.1 Op grond van de verschillen tussen aminozuuranalysatoren moeten de eindconcentraties van de ijkoplossingen van standaardaminozuren (3.27.4 en 3.27.5) en van het hydrolysaat (5.3.4) als richtlijn worden beschouwd.

Het lineaire meetbereik van het apparaat moet voor alle aminozuren worden gecontroleerd.

De standaardoplossing wordt verdund met een citraatbuffer om pieken te geven in het midden van het bereik.

9.2 Indien HPLC-apparatuur wordt gebruikt voor de analyse van de hydrolysataten dienen de proefomstandigheden te worden geoptimaliseerd in overeenstemming met de aanbevelingen van de leverancier.

9.3 Bij toepassing van de methode op diervoeders die meer dan 1 % chloride bevatten (krachtvoer, minerale voeders, voedingssupplementen) is het mogelijk dat voor methionine een te lage waarde wordt gemeten en is een speciale behandeling vereist.