

Stofnaam	Tryptofaan	
Type methode	HPLC	
Te onderzoeken in	Diervoeders	
minimum bepaalbaarheidsgrens		
Herhaalbaarheid	Bundel Onderzoekmethoden	Gemiddelde KDLL ringtesten
	Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen mag niet meer dan 10% van het hoogste resultaat bedragen.	1,9%
Reproduceerbaarheid	zie tabel in hoofdstuk 8	16,1%
Categorie	A	
Titel	Bepaling van tryptofaan	
EEG-methode	Richtlijn 2000/45/EG van de Commissie van 6 juli 2000 tot vaststelling van communautaire analysemethoden voor de bepaling van het gehalte aan vitamine A, Vitamine E en tryptofaan, Bijlage. Publicatieblad L 174 van 13 juli 2000	

BEPALING VAN TRYPTOFAAN

1. Doel en toepassingsgebied

De methode dient voor de bepaling van de totale hoeveelheid tryptofaan en de hoeveelheid vrij tryptofaan in diervoeders. Ze maakt geen onderscheid tussen de D- en de L-vorm.

2. Principe

Voor de bepaling van de totale hoeveelheid tryptofaan wordt het monster onder basische condities gehydrolyseerd met een verzadigde bariumhydroxideoplossing en gedurende 20 uur tot 110°C verhit. Na de hydrolyse wordt er een interne standaard toegevoegd.

Voor de bepaling van de hoeveelheid vrij tryptofaan wordt het monster onder licht zure condities geëxtraheerd in aanwezigheid van een interne standaard.

Het tryptofaan en de interne standaard in het hydrolysaat of extract worden bepaald door HPLC met fluorescentiedetectie.

3. Reagentia

- 3.1 Er dient dubbel gedestilleerd water of water van soortgelijke kwaliteit te worden gebruikt (conductiviteit < 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
- 3.2 Standaardstof: tryptofaan (zuiverheid/gehalte $\geq 99\%$), gedroogd onder vacuüm boven fosforpentoxide
- 3.3 Interne-standaardstof: α -methyl-tryptofaan (zuiverheid/gehalte $\geq 99\%$), gedroogd onder vacuüm boven fosforpentoxide
- 3.4 Bariumhydroxide (octahydraat) (er dient op te worden toegezien dat $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ niet langdurig aan lucht wordt blootgesteld om de vorming van BaCO_3 te voorkomen; dit zou de bepaling kunnen verstoren) (zie opmerking 9.3).
- 3.5 Natriumhydroxide
- 3.6 Orthofosforzuur, w = 85%.
- 3.7 Zoutzuur, ρ_{20} 1,19 g/ml
- 3.8 Methanol, HPLC-kwaliteit
- 3.9 Lichtpetroleum, kooktraject 40-60°C.
- 3.10 Natriumhydroxideoplossing, c = 1 mol/l:
Los 40,0 g NaOH (3.5) op in water en vul met water aan tot 1 liter (3.1).
- 3.11 Zoutzuur, c = 6 mol/l:
Neem 492 ml HCl (3.7) en vul met water aan tot 1 liter.
- 3.12 Zoutzuur, c = 1 mol/l:
Neem 82 ml HCl (3.7) en vul met water aan tot 1 liter.
- 3.13 Zoutzuur, c = 0,1 mol/l:
Neem 8,2 ml HCl (3.7) en vul met water aan tot 1 liter.
- 3.14 Orthofosforzuur, c = 0,5 mol/l:
Neem 34 ml orthofosforzuur (3.6) en vul met water aan tot 1 liter (3.1)
- 3.15 Geconcentreerde oplossing van tryptofaan (3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$:
Los 0,2553 g tryptofaan (3.2) in een volumetrische maatkolf van 500 ml op in zoutzuur (3.13) en vul tot de maatstreep aan met zoutzuur (3.13). Gedurende maximaal 4 weken bewaren bij -18°C .
- 3.16 Geconcentreerde interne-standaardoplossing, c = 2,50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$:

Los 0,2728 g α -methyl-tryptofaan (3.3) in een volumetrische maatkolf van 500 ml op in zoutzuur (3.13) en vul tot de maatstreep aan met zoutzuur (3.13). Gedurende maximaal 4 weken bewaren bij -18°C .

- 3.17 IJK-standaardoplossing tryptofaan en interne standaard:
Neem 2,00 ml geconcentreerde tryptofaanoplossing (3.15) en 2,00 ml geconcentreerde interne-standaardoplossing (α -methyl-tryptofaanoplossing) (3.16). Verdun met water (3.1) en methanol (3.8) tot ongeveer hetzelfde volume en ongeveer dezelfde methanolconcentratie (10-30%) als het eindhydrolysaat. Deze oplossing moet vóór gebruik vers worden bereid. Bescherm tijdens de bereiding tegen direct zonlicht.
- 3.18 Azijnzuur
- 3.19 1,1,1-trichloor-2-methyl-2-propanol
- 3.20 Ethanolamine > 98%
- 3.21. Oplossing van 1 g 1,1,1-trichloor-2-methyl-2-propanol (3.19) in 100 ml methanol (3.8)
- 3.22 Mobiele fase voor HPLC: 3,00 g azijnzuur (3.18) + 900 ml water (3.1) + 50,0 ml oplossing (3.21) van 1,1,1-trichloor-2-methyl-2-propanol (3.19) in methanol (3.8) (1 g/100 ml). Breng de pH op 5,00 met behulp van ethanolamine (3.20). Vul tot 1000 ml aan met water (3.1).

4 Apparatuur

- 4.1 HPLC-apparatuur met een spectrofluorimetrische detector
- 4.2 HPLC-kolom, 125 mm x 4 mm, C18, 3 μm vulling, of een soortgelijke kolom
- 4.3 pH-meter
- 4.4 Polypropyleenmaatkolf, inhoud 125 ml, met brede hals en schroefdop.
- 4.5 Membraanfilter, 0,45 μm
- 4.6 Drukvat, 110 (± 2) $^{\circ}\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) bar
- 4.7 Mechanisch schudapparaat of magneetroerder
- 4.8 Wervelmenger

5 Werkwijze

- 5.1 Bereiding van monsters
Het monster wordt gemalen tot het een zeef van 0,5 mm kan passeren. Monsters met een hoge vochtigheidsgraad moeten ofwel aan lucht met een temperatuur van hoogstens 50°C worden gedroogd, ofwel voorafgaand aan het malen worden gevriesdroogd. Monsters met een hoog vetgehalte dienen voorafgaand aan het malen te worden geëxtraheerd met lichtpetroleum (3.9).
- 5.2. Bepaling van de hoeveelheid vrij tryptofaan (extract)
Weeg op 1 mg nauwkeurig een geschikte hoeveelheid (1 à 5 g) van het bereide monster (5.1) af in een erlenmeyer. Voeg 100,0 ml zoutzuur, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (3.13) en 5,00 ml geconcentreerde interne-standaardoplossing (3.16) toe. Schud of meng gedurende 60 minuten met behulp van een mechanisch schudapparaat of een magneetroerder (4.7). Laat het bezinksel neerslaan en pipetteer 10,0 ml van de bovenstaande oplossing in een bekerglas. Voeg 5 ml orthofosforzuur, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14) toe. Breng de pH op 3 met behulp van natriumhydroxide, $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (3.10). Voeg voldoende methanol (3.8) toe om een methanolconcentratie tussen 10 en 30% in het eindvolume te verkrijgen. Breng over in een volumetrische maatkolf met een geschikte inhoud en verdun met water tot een volume dat is vereist voor de chromatografie (bij benadering hetzelfde volume als de ijk-standaardoplossing (3.17)).

Filtreer een paar ml van de oplossing door een membraanfilter van 0,45 µm (4.5) vóór injectie in de HPLC-kolom. Ga verder met de chromatografiestap volgens 5.4. Bescherm de standaardoplossing en extracten tegen direct zonlicht. Als het niet mogelijk is de extracten dezelfde dag te analyseren, kunnen ze gedurende maximaal 3 dagen bij 5°C worden bewaard.

5.3 Bepaling van de totale hoeveelheid tryptofaan (hydrolysaat)

Weeg op 0,2 mg nauwkeurig 0,1 à 1 g van het bereide monster (5.1) af in de polypropyleenmaatkolf (4.4). De gewogen monsterfractie dient een stikstofgehalte van ongeveer 10 mg te hebben. Voeg 8,4 g bariumhydroxide (octahydraat) (3.4) en 10 ml water toe. Meng in een wervelmenger (4.8) of magneetroerder (4.7). Laat de magneet met tefloncoating in het mengsel zitten. Was de wanden van het vat met 4 ml water. Plaats de schroefdop erop en sluit de maatkolf losjes. Breng over in een drukvat (4.6) met kokend water en laat het geheel 30-60 minuten stomen. Sluit het drukvat en laat het gedurende 20 uur dicht bij 110 (±2) °C. Breng de temperatuur terug tot iets onder 100°C alvorens het drukvat te openen. Voeg 30 ml water op kamertemperatuur toe aan het warme mengsel om uitkristalliseren van Ba(OH)₂ · 8 H₂O tegen te gaan. Schud of roer voorzichtig. Voeg 2,00 ml geconcentreerde interne-standaardoplossing (α-methyl-tryptofaanoplossing) (3.16) toe. Laat de vaten gedurende 15 minuten in een water/ijsbad afkoelen. Voeg vervolgens 5 ml orthofosforzuur, c = 0,5 mol/l (3.14) toe. Laat het vat in het koelbad, neutraliseer al roerend met HCl, c = 6 mol/l (3.11) en breng de pH op 3,0 met behulp van HCl, c = 1 mol/l (3.12). Voeg voldoende methanol toe om een methanolconcentratie tussen 10 en 30% in het eindvolume te verkrijgen. Breng over in een volumetrische maatkolf met een geschikte inhoud en verdun met water tot het bepaalde volume dat vereist is voor de chromatografie (bijv. 100 ml). Toevoeging van methanol zou geen bezinksel mogen veroorzaken. Filtreer een paar ml van de oplossing door een membraanfilter van 0,45 µm (4.5) vóór injectie in de HPLC-kolom. Ga verder met de chromatografiestap volgens 5.4. Bescherm de standaardoplossing en de hydrolysaten tegen direct zonlicht. Als het niet mogelijk is de hydrolysaten dezelfde dag te analyseren, kunnen ze gedurende maximaal 3 dagen bij 5°C worden bewaard.

5.4 HPLC-bepaling

De volgende condities voor isocratische elutie worden als leidraad aangegeven; er mogen andere parameters worden gebruikt op voorwaarde dat hiermee vergelijkbare resultaten worden verkregen (zie ook de opmerkingen 9.1 en 9.2):

HPLC-kolom (4.2): 125 mm x 4 mm, C18, 3 µm vulling, of een soortgelijke kolom

Kolomtemperatuur: Kamertemperatuur

Mobiele fase (3.22): 3,00 g azijnzuur (3.18) + 900 ml water (3.1) + 50,0 ml oplossing (3.21) van 1,1,1-trichloor-2-methyl-2-propanol (3.19) in methanol (3.8) (1 g/100 ml). Breng de pH op 5,00 met behulp van ethanolamine (3.20). Vul tot 1000 ml aan met water (3.1)

Elutiesnelheid: 1 ml/min

Benodigde tijd: circa 34 minuten

Detectiegolflengte: excitatie: 280 nm, emissie: 356 nm.

Injectievolume 20 µl

6 Berekening van de resultaten

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10000 \times W} = \text{g tryptofaan per 100 g monster}$$

- A = piekoppervlakte van interne standaard, ijk-standaardoplossing (3.17)
B = piekoppervlakte van tryptofaan, extract (5.2) of hydrolysaat (5.3)
C = volume in ml (2 ml) van geconcentreerde tryptofaanoplossing (3.15) toegevoegd aan de ijkoplossing (3.17)
D = concentratie in $\mu\text{mol/ml}$ (= 2,50) van geconcentreerde tryptofaanoplossing (3.15) toegevoegd aan de ijkoplossing (3.17)
E = volume in ml van geconcentreerde interne-standaardoplossing (3.16) toegevoegd aan de extractie (5.2) (= 5,00 ml) of aan het hydrolysaat (5.3) (= 2,00 ml)
F = piekoppervlakte van interne standaard, extract (5.2) of hydrolysaat (5.3)
G = piekoppervlakte van tryptofaan, ijk-standaardoplossing (3.17)
H = volume in ml (= 2,00 ml) van geconcentreerde interne-standaardoplossing (3.16) toegevoegd aan de ijk-standaardoplossing (3.17)
W = monstergewicht in g (gecorrigeerd tot het oorspronkelijke gewicht indien gedroogd en/of ontvet)
MW= molecuulgewicht van tryptofaan (= 204,23)

7. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen mag niet meer dan 10% van het hoogste resultaat bedragen.

8 Resultaten van een ringonderzoek

In EG-verband is een ringonderzoek verricht (de 4^e vergelijkende studie) waarbij drie monsters werden geanalyseerd door maximaal 12 laboratoria om de hydrolysemethode te certificeren. De analyses werden voor elk monster vijfmaal herhaald. De resultaten staan in de volgende tabel:

	Monster 1 Varkensvoer	Monster 2 Varkensvoer met L-tryptofaan- supplement	Monster 3 Voederconcentraat voor varkens
L	12	12	12
N	50	55	50
Gemiddeld [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
Cv_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
Cv_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = aantal laboratoria dat resultaten heeft gepresenteerd
 n = aantal afzonderlijke resultaten na eliminatie van uitschieters (opgespoord met de uitschietertest van Cochran en Dixon)
 s_r = standaardafwijking van de herhaalbaarheid
 S_R = standaardafwijking van de reproduceerbaarheid
 r = herhaalbaarheid
 R = reproduceerbaarheid
 CV_r = variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid, %
 CV_R = variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid, %

Bij een ander ringonderzoek in EG-verband (de 3^e vergelijkende studie) werden twee monsters geanalyseerd door maximaal 13 laboratoria om de methode voor extractie van vrij tryptofaan te certificeren. De analyses werden voor elk monster vijfmaal herhaald. De resultaten staan in de volgende tabel:

	Monster 4 Tarwe-sojamengsel	Monster 5 Tarwe-sojamengsel (= monster 4) waaraan toegevoegd tryptofaan (0,457g/kg1)
L	12	12
n	55	60
Gemiddeld [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
Cv_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L = aantal laboratoria dat resultaten heeft gepresenteerd
 n = aantal afzonderlijke resultaten na eliminatie van uitschieters (opgespoord met de uitschietertest van Cochran en Dixon)
 s_r = standaardafwijking van de herhaalbaarheid
 S_R = standaardafwijking van de reproduceerbaarheid
 r = herhaalbaarheid
 R = reproduceerbaarheid
 CV_r = variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid, %
 CV_R = variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid, %

Bij een ander ringonderzoek in EG-verband werden vier monsters geanalyseerd door maximaal 7 laboratoria met als doel een tryptofaancertificatie voor hydrolyse. De resultaten staan in onderstaande tabel. De analyses werden voor elk monster vijfmaal herhaald.

	Monster 1 Gemengd varkensvoer (CRM 117)	Monster 2 Vismaaltijd met weinig vet (CRM 118)	Monster 3 Sojabonen- maaltijd (CRM 119)	Monster 4 Tapmelk-poeder (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Gem. [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = aantal laboratoria dat resultaten heeft gepresenteerd

n = aantal afzonderlijke resultaten na eliminatie van uitschieters (opgespoord met de uitschietertest van Cochran en Dixon)

s_r = standaardafwijking van de herhaalbaarheid

S_R = standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

r = herhaalbaarheid

R = reproduceerbaarheid

CV_r = variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid, %

CV_R = variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid, %

9. Opmerkingen

- 9.1 Onder de volgende speciale chromatografische condities kan een betere scheiding tussen tryptofaan en α -methyl-tryptofaan worden verkregen.

Isocratische elutie gevolgd door gradiëntreiniging van de kolom:

HPLC-

kolom: 125 mm x 4 mm, C18, 5 μ m vulling, of een soortgelijke kolom

Kolomtemperatuur: 32°C

Mobiele fase: A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /methanol, 95+5 (V+V).

B: methanol

Gradiëntprogramma:

0 min	100% A	0% B
15 min	100% A	0% B
17 min	60% A	40% B
19 min	60% A	40% B
21 min	100% A	0% B
33 min	100% A	0% B

Elutiesnelheid: 1,2 ml/min

Benodigde tijd: circa 33 minuten

- 9.2 De chromatografie varieert afhankelijk van het type HPLC en kolomvullingsmateriaal. Met het gekozen systeem moet een basislijnscheiding tussen het tryptofaan en de interne standaard tot stand gebracht kunnen worden. Verder is het van belang dat afbraakproducten goed worden gescheiden van het tryptofaan en de interne standaard. Hydrolysaten zonder interne standaard dienen te worden gebruikt om de basislijn onder de interne standaard te controleren op verontreinigingen. Het is van belang dat de uitvoeringstijd lang genoeg is voor de elutie van alle afbraakproducten,

daar anders traag eluerende pieken de volgende chromatografische bepalingen kunnen verstoren.

Binnen het bewerkingsgebied dient het chromatografische systeem een lineaire respons te geven. De lineaire respons dient te worden gemeten bij een constante (de normale) concentratie van de interne standaard en bij verschillende tryptofaanconcentraties. Het is van belang dat de piekgrootte zowel voor het tryptofaan als voor de interne standaard binnen het lineaire gebied van het HPLC/fluorescentiesysteem liggen. Als de piek(en) van het tryptofaan en/of de interne standaard te klein of te groot is (zijn), dient de analyse te worden herhaald met een andere monstergrootte en/of een gewijzigd eindvolume.

9.3 Bariumhydroxide

De oplosbaarheid van bariumhydroxide neemt mettertijd steeds verder af. Dit resulteert in een troebele oplossing voor de HPLC-bepaling, die lage waarden voor tryptofaan kan opleveren.