

Side 1  
**ARBEIDSBESKRIVELSE**  
**Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, NMBU**

---

Metodenavn: **Tryptofan**  
BIOVIT-nr: Arb1051

---

### 1. Innledning/hensikt

Metoden bestemmer totalinnholdet av tryptofan i fôr og faeces, ved basisk hydrolyse, separasjon på HPLC kolonne og fluorometrisk deteksjon. Metoden skiller ikke D og L-tryptofan.

### 2. Reagenser

- 10,5 M NaOH: 420 gram NaOH løses i H<sub>2</sub>O (MilliQ) til totalt 1 liter
- 6 M HCl: 498,94 mL HCl (37 %, fuming) fortynnes i H<sub>2</sub>O (MilliQ) til totalt 2 liter
- 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (x 2H<sub>2</sub>O): 44,5 gram løses i 1 M HCl til totalt 500 mL
- Metanol m/ 1% (w/v) 1,1,1-trichlor-2-methyl-2-propanol (TCMP): 10 gram TCMP løses i metanol til totalt 1 liter
- 0,5 M orto-fosforsyre (w=85%): 34 mL fortynnes med H<sub>2</sub>O (MilliQ) til totalt 1 liter

#### Buffer til HPLC:

**1 liter:** 3 gram eddiksyre (100 %), 900 mL H<sub>2</sub>O (MilliQ), 50 mL metanol med 1% TCMP, innstill pH til 5,00 med ethanolamin, fyll opp til 1000 mL med H<sub>2</sub>O (MilliQ) og filtrer med membranfilter (589 whatman black ribbon) vha vannsug.

**2 liter:** 6 gram eddiksyre, 1800 mL MilliQ-H<sub>2</sub>O, 100 mL metanol med 1% TCMP, innstill pH til 5,00 med ethanolamin, fyll opp til 2000 mL med H<sub>2</sub>O (MilliQ) og filtrer med membranfilter (589 whatman black ribbon) vha vannsug.

Mobilfasen skal bestå av 92 % buffer og 8 % metanol.

- Alternativ 1: Mobilfasen forhåndsblandes og settes på kanal A. Sjekk at metoden er stilt inn på 100% A.
- Alternativ 2: Det settes en flaske med 100% buffer på kanal A og en flaske med 100 % metanol på kanal B. Sjekk at metoden er stilt inn på 92% på A og 8 % på B.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet: Elin Follum Johnsen	Godkjent: Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra: 01.2016	Revisjon: 03.2020	Erstatter: 06.2018	Dokumentnavn: Arb 1051 Tryptofan.docx	Side 1-6

2,50 mM D,L-tryptofanløsning

100 mL:  
 51,06 mg D,L.-tryptofan (på kjemikalierom)  
 70 mL 0,1 M NaOH  
 2 mL 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-løsning  
 5,6 g NaCl  
 Innstill pH til 6,2 med HCl  
 Fyll opp til 100 mL med H<sub>2</sub>O (MilliQ)  
 Fryser ned i -80 °C i porsjoner (for eksempel 4-5 mL)

2,50 mM intern standardløsning

100 mL:  
 54,56 mg α-methyltryptofan (i kjøleskap på AA rommet)  
 70 mL 0,1 M NaOH  
 2 mL 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-løsning  
 5,6 g NaCl  
 Innstill pH til 6,2 med HCl  
 Fyll opp til 100 mL med H<sub>2</sub>O (MilliQ)  
 Fryser ned i -80 °C i porsjoner (for eksempel 4-5 mL)

Tillaging av Standard 1-2-3 (med tryptofan og intern standard)

	<b>STD 1 25 µM</b>	<b>STD 2 50 µM</b>	<b>STD 3 75 µM</b>
	50 mL:	50 mL:	50 mL:
NaCl	3,25 g	3,25 g	3,25 g
H <sub>2</sub> O (MilliQ)	35 mL	35 mL	35 mL
0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -løsning	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
2-propanol	5 mL	5 mL	5 mL
2,5 mM-tryptofanløsning	0,5 mL	1 mL	2 mL
2,5 mM intern standard løsning	0,5 mL	1 mL	2 mL

Innstill pH til 6,2 med NaOH  
 Fyll opp til 50 mL med H<sub>2</sub>O (MilliQ)  
 Fryser ned i -80 °C i porsjoner (for eksempel 0,5 mL)

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet: Elin Follum Johnsen	Godkjent: Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra: 01.2016	Revisjon: 03.2020	Erstatter: 06.2018	Dokumentnavn: Arb 1051 Tryptofan.docx	Side 2-6

### 3. Risikovurdering

Bruk lab frakk, vernebriller og hansker (nitrile) når HCl- og NaOH-løsninger lages. Konsentrert HCl damper. Hvis du får konsentrert HCl eller NaOH på huden, skyl med store mengder vann. Vei inn barium hydroksid octa-hydrat i avtrekkskap med hansker (fare for etsning på hud). Giftig ved innånding: bruk ansiktsmaske med P3 filter ved åpning av varmeskap.

### 4. Utstyr

- Ultimate 3000 HPLC med autoinjektor og fluorescens detektor
- pH-meter
- Varmeskap (110 °C)
- Whirlmixer
- Bordsentrifuge
- Polypropylene (PP) flaske, 125 ml, bred hals og skrulokk
- Sintilasjonsglass
- 150 mL begerglass
- 100 mL målekolbe
- Trakt
- 2 mL GC-vials
- 300 µL GC-vials
- 0,45 µm membranfilter
- 2 mL engangssprøyte

### 5. Spesielle merknader

Beskytt standardløsning og hydrolysater mot direkte sollys.

Prøver med høyt fettinnhold (>40 %) må ekstraheres med petroleumseter (kp 40-60) før hydrolysen.

De ferdige hydrolyserte prøvene har kort holdbarhet og må analyseres i løpet av 3 dager. Frys derfor ned en liten del av prøven ved -80 °C til eventuell re-analyse.

### 6. Prøvemateriale

Mengde prøvemateriale beregnes ut ifra nitrogenmengden i prøvene. Dette bestemmes først med Kjeldahl-N metoden (alternativt dumas-N).

$$\frac{10 \text{ mg}}{\text{mengde nitrogen (g/kg)}} \times 1000 \text{ (g/kg)} = \text{prøve som skal veies ut (mg)}$$

Prøvemengde: 100 - 1000 mg homogen prøve (prøvene må inneholde ca. 10 mg nitrogen).  
Malingsgrad: 0,5 mm.

Faeces: 1 parallell

Fôr: 3 paralleller (anbefalt)

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet: Elin Follum Johnsen	Godkjent: Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra: 01.2016	Revisjon: 03.2020	Erstatter: 06.2018	Dokumentnavn: Arb 1051 Tryptofan.docx	Side 3-6

**7. Arbeidsbeskrivelse**

1. Vei ut prøve (prøvene må inneholde ca. 10 mg nitrogen) i en PP-hydrolyseflaske
2. Tilsett 8,4 g barium hydroksid octa-hydrat
3. Tilsett 8 mL degasset H<sub>2</sub>O (MilliQ)
4. Mix på en vortex eller magnetrører. Behold en teflon-belagt magnet i løsningen
5. Tilsett 2,00 mL (2,5 mM) internstandard ( $\alpha$ -methyl-tryptofan)
6. Vask ned eventuell prøve fra veggene i flasken med 4 mL vann
7. Sett lokket løst på og sett flasken i et forvarmet varmeskap (110° C)
8. Inkuber 1 time, skru igjen lokket godt og hydrolyser videre i 19 timer (110°C)
9. Sett prøvene i et avtrekkskap og skru forsiktig av korkene. Begynner det å boble i flasken- skru korken på igjen og vent et par sekunder slik at det ikke bobler over. Ikke vent for lenge med å ta av korken- da vil flaskene klappe sammen.
10. Tilsett 30 mL oppvarmet H<sub>2</sub>O (MilliQ) og skru på korken igjen
11. Rist eller rør lett
12. Avkjøl flaskene på vann/isbad i 15 min
13. Tilsett 5 mL orto-fosforsyre (0,5 M)
14. Overfør hydrolysatet til et merket begerglass -hold begerglasset på is
15. Skyld flasken med ca 20 mL H<sub>2</sub>O (MilliQ)
16. Tilsett 20 mL metanol
17. Titrer vha pH-meter til pH 6.2 med 6 M HCl
18. Overfør til en målekolbe og fortynn til 100,0 mL
19. Behold en liten del (10 mL) av prøven i kjøleskap til analyse (max 3 dager)
20. Frys ned en liten del av prøven ved -80 °C
21. Filtrer hydrolysatet (0,45  $\mu$ m membranfilter + engangssprøyte), forkast de 10 første dråpene og fyll deretter opp en 2mL glass-vial til HPLC analysen og sett på kork.
22. Ta ut standard 1-2-3 fra fryser og overfør til 300  $\mu$ L GC-vialer.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet: Elin Follum Johnsen	Godkjent: Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra: 01.2016	Revisjon: 03.2020	Erstatter: 06.2018	Dokumentnavn: Arb 1051 Tryptofan.docx	Side 4-6

HPLC analyse

- Kolonne: Supelcosil LC-18 (4.6 mm, 15 cm, 5 µm)
- Kolonne-temperatur: romtemperatur
- Mobilfase: 92% buffer: 8% metanol (Se detaljer under «reagenser»)
- HPLC system: Ultimate 3000 UHPLC system med autosampler (Thermo Scientific)
- Detektor: RF-535 fluorescens detector (Shimadzu)
- Flow rate: 1 mL/min
- Total analysetid: ca 25 min per prøve
- Bølgelengder: excitation: 280 nm, emission: 356 nm
- Injeksjonsvolum 30 µL
- Software: Chromeleon

23. Åpne chromeleon og finn instrumentsiden til ultimate 3000.
24. Purge alle de fire kanalene (ellers kan det være luft i systemet)
25. Sett flow til 1mL/min på kanal A og skru på UVlampa (brukes ikke, men må være på)
26. Skru på fluorecence detector (to knapper på venstre side)
27. Vent ca 30 min
28. Nullstill fluorecence detektoren manuelt (hjul foran) og sjekke at grunnlinjen er stabil.
29. Sett vialene med standarder og prøver i autosampler.
  - a. Husk en vial med metanol til blank prøve.

Sett opp sekvens i Chromeleon

30. Åpne Chromeleon – IHA-SUMMIT\ChromeleonLocal – Instrument data – Ultimate 3000 – sequence – tryptophan – rekv
31. Kopier en tidligere sekvens (høyreklikk + copy, og lim inn under ønsket mappe)
32. Lag sekvensen slik at den ser slik ut (tilpass til antall prøver):
  - Blank (metanol)
  - Standarder 1-3
  - Soyakontroll
  - Prøver
  - Standarder 1-3
33. Fyll inn riktig navn og type (unknown = prøver, calibration standard = standard)
34. Sett inn level «2» for std1, level «3» for std2 og level «4» for std 3
35. Sjekk at metoden heter «tryptophan\_hanne\_std»
36. Skriv inn samme posisjon som prøvene står i autosamplern (for eksempel BA1 for første hull til venstre i rack B(lå)).

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet: Elin Follum Johnsen	Godkjent: Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra: 01.2016	Revisjon: 03.2020	Erstatter: 06.2018	Dokumentnavn: Arb 1051 Tryptofan.docx	Side 5-6

37. Marker alle prøvene i sekvensen (alt skal bli svart).
38. Trykk Ctrl+c / Ctrl+v – (går fra «finished» til «idle»).
39. Gi sekvensen følgende navn; *ÅÅMMDD\_rekvisisjonsnr\_etternavn*.
40. Trykk «start»
41. Om analysen skal gå over natt kan det legges inn en linje med «shutdown» metode til slutt. Husk å sette posisjon til et hull med vial (for eksempel blankprøven), ellers vil analysen bli avbrutt og pumpa vil fortsette og gå = vil gå tomt for mobilfase og trekke inn luft!!

## 8. Utregning

- Åpne kromatogrammene og kontroller at grunnlinjene er lagt riktig og at toppene har kommet inn under riktig «tagg» (TRP eller Met-TRP)
- Sjekk kalibreringskurven for standardene til TRP og Met-TRP
- Gå inn på «interactive results» og hent ut resultatene under «amount fluorescence TRP» og «amount fluorescence Met-TRP».
- Lim disse tallene inn i excel-arket «beregningsark» som ligger under:
  - o labmal- diverse analyser – tryptofan
- Sjekk at korrigeringen er riktig for intern standarden (sjekk dato for IS)
- Legg inn vekter, nitrogeninnhold og navn for alle prøvene
- Arket beregner nå automatisk
- Husk å lagre excel-arket på formen; *ÅÅMMDD\_rekvisisjonsnr\_etternavn*

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet: Elin Follum Johnsen	Godkjent: Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra: 01.2016	Revisjon: 03.2020	Erstatter: 06.2018	Dokumentnavn: Arb 1051 Tryptofan.docx	Side 6-6