

Afdeling Technometrie 1982-06-24
Verslag 82.49 pr.nr. 505.2090

Onderwerp: Ringtest totaal en verteer-
baar zetmeel NNI Commissie
370-10-005

Bijlage: 1 analysevoorschrift.

Verzendlijst: directeur, directeur VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Akkerbouw, afdeling Technometrie; De Ruig, afdeling
Normalisatie (Humme), projectleider, projektbeheer,
secretaris NNI Commissie 370.10, secr. werkgroep
370.10.005 (14x)

Afdeling Technometrie

Datum: 1982-06-24

Pr.nr. 505.2090

VERSLAG 82.49

Projekt: Normalisatie/harmonisatie van onderzoekmethoden voor diervoeders.

Onderwerp: Ringtest totaal en verteerbaar zetmeel NNI Commissie
370-10-005

Bijlage: 1 analysevoorschrift

Doel:

Normalisatie van methoden voor het bepalen van het totaal en het verteerbaar ruw zetmeel in diervoeders.

Samenvatting:

Het concept normvoorschrift doc. 370.10/81/36 is getest door middel van een ringonderzoek waaraan 9 laboratoria hun medewerking hebben verleend.

Uit de analyseresultaten van mais, ontsloten mais, hondebok en biggenfokkorrel, is de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid van de analysemethoden berekend.

Conclusie:

Met uitzondering van verteerbaar ruw zetmeel en de overeenkomstige vitro verteringscoëfficiënt in natieve mais is de totale standaardafwijking voor elk van de analyses in de onderzochte produkten circa 3 tot 5%. De absolute reproduceerbaarheid is dan 8 tot 14%.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse en dr W.G. de Ruig

Samensteller: mw G.A. Werdmuller

Projectleider: ir P. Hollman

Inleiding

Door de NNI Commissie 370-10-005 is een concept-voorschrift opgesteld voor de bepaling van de vitro verteerbaarheid van ruw zetmeel.

Dit voorschrift is opgenomen in de bijlage I.

Voor het ringonderzoek zijn de volgende produkten gekozen:

mais

ontsloten mais

hondebrok

biggenfokkorrel

De monsters zijn door de CLO ("De Schothorst") naar de deelnemende instellingen verstuurd.

Aan het ringonderzoek hebben de volgende instellingen meegedaan:

Coöp. Centr. lab. - Veghel

CIVO - Zeist

IGMB - Wageningen

IVVO - Lelysad

Granaria - Amersfoort

Koopmans Meelfa. - Leeuwarden

Provimi - Rotterdam

RIKILT - Wageningen

De Schothorst - Lelystad

In elk laboratorium hebben 1 of 2 analisten van de vier monsters het totaal ruw zetmeel en het verteerbaar ruw zetmeel in enkelvoud, duplo of triplo bepaald, berekend op het oorspronkelijke materiaal.

De analyseresultaten zijn vermeld in de tabellen 1 en 2.

In tabel 3 staan de in vitro verteringscoëfficiënten, welke per analist berekend zijn uit de verhouding van het verteerbaar en het totaal ruw zetmeelgehalte.

Statistische verwerking

1. Per produkt zijn de standaardafwijkingen tussen laboratoria en binnen laboratoria (ongeacht of de analyses door één of twee analisten gedaan zijn) berekend.

Indien in één laboratorium één analyse wordt gedaan, dan is de totale spreiding:

$$s_R = \sqrt{s_b^2 + s_1^2}$$

s_b = standaardafwijking binnen laboratoria

s_1 = standaardafwijking tussen laboratoria.

De spreidingen zijn vaak afhankelijk van het gehalte. Daarom zijn niet alleen de absolute standaardafwijkingen berekend, maar ook de relatieve standaardafwijkingen, uitgedrukt in % van de gehalten, ook wel genoemd variatiecoëfficiënt.

In de tabellen 4 en 5 zijn van de gehalten vermeld in de tabellen 1 en 2 per produkt verzameld:

$\bar{x}$ = het totale gemiddelde

s_b = standaardafwijking binnen laboratoria

s_1 = standaardafwijking tussen laboratoria

s_R = totale standaardafwijking

V_b = variatiecoëfficiënt binnen laboratoria

V_1 = variatiecoëfficiënt tussen laboratoria

V_R = totale variatiecoëfficiënt

relatieve

standaard afwijkingen

in %

2. Uit de analyseresultaten van de laboratoria, waarvan 2 analisten de monsters elk in duplo geanalyseerd hebben is berekend:

$\bar{x}$ = het totale gemiddelde

s_r = standaardafwijking herhaling binnen analisten

s_a = standaardafwijking tussen analisten binnen laboratoria

s_1 = standaardafwijking tussen laboratoria

s_R = totale standaardafwijking

V_r = variatiecoëfficiënt herhaling binnen analisten

V_a = variatiecoëfficiënt tussen analisten binnen laboratoria

V_1 = variatiecoëfficiënt tussen laboratoria

V_R = totale variatiecoëfficiënt

$$s_R = \sqrt{s_r^2 + s_a^2 + s_1^2}$$

Deze waarden zijn voor de tabellen 1 en 2 verzameld in de tabellen 4a en 5a.

3. De vitro verteringscoëfficiënten van tabel 3 zijn per analist niet gelijkwaardig. Elke waarde is het gemiddelde van 1, 2 of 3 verteerbaar ruw zetmeelanalyses gedeeld door het gemiddelde van 1, 2 of 3 totaal ruw zetmeel analyses.

Om een indruk te krijgen van de diverse spreidingen zijn - hoewel niet geheel conform statistische normen - berekend:

$\bar{x}$ = het totale gemiddelde

s_a = standaardafwijking tussen analisten binnen laboratoria

s_l = standaardafwijking tussen laboratoria

s_R = totale standaardafwijking

V_a = variatiecoëfficiënt tussen analisten binnen laboratoria

V_l = variatiecoëfficiënt tussen laboratoria

V_R = totale variatiecoëfficiënt

Deze waarden zijn voor alle laboratoria verzameld in tabel 6 en voor de laboratoria 3, 5, 7 en 9 in tabel 6a.

Opmerking

Het komt voor dat laboratoria die zowel met het verteerbaar als met het totaal zetmeelgehalte een naar beide zijden toe enigszins afwijkende waarde vinden, een "normaal" verteringscoëfficiënt vinden.

Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid (Engels repeatability r) is de waarde waaronder het verschil tussen twee bepalingen onder dezelfde omstandigheden uitgevoerd (dezelfde analist, dezelfde reagentia, toestellen, glaswerk, gelijktijdig of kort na elkaar) kan verwacht worden te liggen met een waarschijnlijkheid van 95%.

$r = 2\sqrt{2} s_r = 2\sqrt{2}$ maal de standaardafwijking "binnen analisten".

De herhaalbaarheid is gebaseerd op de allerkleinste statistische spreiding van de analyse.

Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid (Engels reproducibility R) is de waarde waaronder het verschil tussen twee bepalingen onder verschillende omstandigheden uitgevoerd (verschillende analisten, verschillende reagentia, toestellen, glaswerk, laboratoria en/of verschillende tijden) kan verwacht worden te liggen met een waarschijnlijkheid van 95%.

$R = 2\sqrt{2} s_r = 2\sqrt{2}$ maal de totale standaardafwijking.

De reproduceerbaarheid is gebaseerd op de allergrootste statistische spreiding van de analyse.

Conclusie

Uitdrukkelijk zij gesteld dat de in dit verslag besproken ringtest een momentopname is, waaruit geen conclusies getrokken mogen worden over de nauwkeurigheid of de juistheid van de resultaten van de individuele laboratoria. Er kunnen alleen globale conclusies getrokken worden over de nauwkeurigheid van de analysemethoden in de onderzochte produkten. Het beste is dit laatste te doen door gebruik te maken van de totale standaardafwijking s_R en of van de totale variatiecoëfficiënt V_R .

Hieronder staan de s_R en V_R uit de tabellen 4, 5 en 6 in alle produkten nog eens extra vermeld. Hieruit blijkt dat met uitzondering van (natieve) mais de totale standaardafwijking voor elk van de analyses 3 tot 5% is. Dit komt overeen met een absolute reproduceerbaarheid van 8 tot 14% nl. $2\sqrt{2} s_R$.

	s_R	V_R
<u>Totaal ruw zetmeel</u>	%	%
Mais	5,2	8,0
Ontsloten mais	4,9	7,7
Hondebrok	2,9	7,8
Biggenfokkorrel	3,2	6,7

Verteerbaar ruw zetmeel

Mais	10,8	25,8
Ontsloten mais	5,3	8,7
Hondebrok	3,1	9,1
Biggenfokkorrel	3,2	7,0

Verteringscoëfficiënt

Mais	14,3	22,3
Ontsloten mais	2,9	3,1
Hondebrok	3,8	4,2
Biggenfokkorrel	3,5	3,5

Tabel 1. Totaal ruw zetmeel in %. (Oorspronkelijk materiaal)

Produkt		Mais			Ontsloten mais			Hordebrok			Biggenfokkorrel		
Lab.	An.	An. gem.	Lab. gem.		An. gem.	Lab. gem.		An. gem.	Lab. gem.		An. gem.	Lab. gem.	
1	A	66,5 65,3 65,6	65,8	65,8	67,7 66,2 67,1	67,0	67,0	39,4 38,9 39,9	39,4	39,4	48,9 49,5 48,8	49,1	49,1
	B												
2	A	62,7	62,7	62,7	63,0	63,0	63,0	36,8	36,8	36,8	47,9	47,9	47,9
	B												
3	A	67,5 62,1	64,8	64,2	64,8 65,2	65,0	64,5	41,0 41,5	41,2	41,3	47,9 49,0	48,4	48,2
	B	66,6 60,8	63,7		63,2 64,6	63,9		41,2 41,4	41,3		47,9 48,2	48,0	
4	A	73,5 73,8	73,7	73,7	72,7 72,7	72,7	72,7*	41,0 40,8	40,9	40,9	53,1 53,1	53,1	53,1*
	B												
5	A	55,4 55,8	55,6	55,4*	54,7 55,6	55,2	55,2*	33,7 33,7	33,7	33,1	42,2 42,0	42,1	42,1**
	B	56,1 54,4	55,2		55,6 54,9	55,2		32,2 32,7	32,4		42,0 42,3	42,1	
6	A	64,1	64,1	64,2	63,9	63,9	64,0	37,5	37,5	37,6	46,6	46,6	46,8
	B	64,4	64,4		64,2	64,2		37,8	37,8		47,1	47,1	
7	A	68,8 67,5	68,1	67,6	67,5 66,5	67,0	66,8	38,1 35,2	36,6	37,1	46,7 48,6	47,7	48,2
	B	66,8 67,4	67,1		66,5 66,8	66,6		37,6 37,7	37,6		48,4 49,1	48,8	
8	A	65,1	65,1	65,1	63,0	63,0	63,0	35,8	35,8	35,8	47,1	47,1	47,1
	B												
9	A	66,0 65,2	65,6	65,5	65,2 65,0	65,1	64,8	36,3 37,4	36,8	36,4 ¹⁾	48,7 49,6	49,2	49,2
	B	65,9 64,8	65,4		64,7 64,3	64,5		37,7 35,7 34,8	36,1				

1) gemiddelde van 5 waarnemingen

* iets te hoge of te lage waarde $\alpha < 0,05$ Dixons uitbijtertest

** te lage waarde $\alpha < 0,01$

Tabel 2. Verteerbaar ruw zetmeel in %. (Oorspronkelijk materiaal)

Produkt		Mais			Ontsloten mais			Hondebrok			Biggenfokkorrel		
lab.	An.	An. gem.	Lab. gem.		An. gem.	Lab. gem.		An. gem.	Lab. gem.		An. gem.	Lab. gem.	
1	A	38,9	39,2	39,2	59,8	59,8	59,8	33,2	33,3	33,3	43,6	43,4	43,4
		39,2			59,4			33,4			42,4		
	B	39,4			60,1			33,2			44,2		
2	A	30,3	30,3	35,1	60,9	60,9	61,0	33,4	33,4	33,4	46,0	46,0	46,4
	B	39,9	39,9		61,0	61,0		33,4	33,4		46,8	46,8	
3	A	59,0	59,0	59,3	63,1	63,5	63,3	38,1	38,0	37,5	47,9	47,8	47,4
		59,0			64,0			37,9			47,8		
	B	59,7	59,5		63,0	63,1		37,1	36,9		46,9	47,0	
		59,3			63,2			36,7			47,1		
4	A	49,8	49,9	49,9	70,0	70,5	70,5	38,4	38,2	38,2	51,8	52,1	52,1
	B	49,9			71,0			38,0			52,3		
5	A	31,1	31,4	30,8	51,2	50,7	51,5*	29,0	28,7	28,5	41,9	41,9	41,8
		31,7			50,2			28,4			41,9		
	B	29,0	30,2		52,3	52,2		27,8	28,3		41,8	41,6	
		31,4			52,2			28,8			41,4		
6	A	41,6	41,6	41,8	61,5	61,5	61,6	33,5	33,5	33,6	47,2	47,2	47,2
	B	42,0	42,0		61,7	61,7		33,8	33,8		47,1	47,1	
7	A	47,4	47,5	48,1	64,3	64,7	64,6	36,4	36,2	35,7	49,1	49,1	49,0
		47,5			65,2			36,0			49,1		
	B	49,6	48,8		64,2	64,5		34,4	35,3		48,7	48,9	
		48,0			64,8			36,2			49,2		
8	A	38,3	38,3	38,3	61,9	61,9	61,9	33,7	33,7	33,7	47,1	47,1	47,1
	B												
9	A	33,4	33,4	31,1	60,4	60,8	59,6	34,5	34,6	33,8 ¹⁾	47,7	48,3	48,3
		33,3			61,3			34,7			48,9		
	B	28,2	28,9		58,8	58,4		33,5	33,2				
		29,6			58,1			32,9					
								33,3					

1) gemiddelde van 5 waarnemingen

* iets te lage waarde $\alpha < 0,05$ Dixons uitbijtertest

Tabel 3. In vitro verteringscoëfficiënt in %.

$\frac{\text{Verteerbaar ruw zetmeel in duplo}}{\text{Totaal ruw zetmeel in duplo}} \times 100$

Produkt		Mais			Ontsloten mais			Hondebrok			Biggenfokkorrel		
Lab.	An.	Lab. gen.			Lab. gen.			Lab. gen.			Lab. gen.		
1	A B	59,5	(3)	59,5	89,2	(3)	89,2	84,4	(3)	84,4	88,4	(3)	88,4**
2	A B	48,3 63,6	(1) (1)	56,0	96,6 96,8	(1) (1)	96,7	90,8 90,8	(1) (1)	90,8	96,0 97,7	(1) (1)	96,8
3	A B	91,0 93,5	(2) (2)	92,2*	97,7 98,7	(2) (2)	98,2	92,2 89,3	(2) (2)	90,7	98,8 97,8	(2) (2)	98,3
4	A B	67,7	(2)	67,7	97,0	(2)	97,0	93,4	(2)	93,4	98,1	(2)	98,1
5	A B	56,5 54,7	(2) (2)	55,6	91,9 94,5	(2) (2)	93,2	85,2 87,2	(2) (2)	86,2	99,5 98,8	(2) (2)	99,1
6	A B	64,8 65,2	(1) (1)	65,0	96,2 96,1	(1) (1)	96,2	89,3 89,4	(1) (1)	89,4	101,2 100,0	(1) (1)	100,6
7	A B	69,7 72,8	(2) (2)	71,2	96,6 96,8	(2) (2)	96,7	98,7 93,7	(2) (2)	96,2	103,1 100,4	(2) (2)	101,7
8	A B	58,9	(1)	58,9	98,3	(1)	98,3	94,1	(1)	94,1	100,0	(1)	100,0
9	A B	50,8 44,2	(2) (2)	47,5	93,5 90,6	(2) (2)	92,0	93,9 92,1	(2) (3)	93,0	98,2	(2)	98,2

* iets te hoge waarde $\alpha < 0,05$

** te lage waarde $\alpha < 0,01$ Dixons uitbijtertest

Lab 3, 4, 5, 7 en 9 2 ruw zetmeel en 2 totaal zetmeelanalyses per analist

Lab 1 3 ruw zetmeel en 3 totaal zetmeelanalyses per analist

Lab 2, 6 en 8 1 ruw zetmeel en 1 totaal zetmeelanalyses per analist

Tabel 4. Spreidingen in totaal ruw zetmeel voor alle laboratoria in %.

monster	Aantal labs	Gemidd. gehalte	Standaardafwijking			Variatiecoëfficiënt		
			binnen lab.	tussen lab.	totaal	binnen lab.	tussen lab.	totaal
		$\bar{x}$	s_b	s_l	s_R	V_b	V_l	V_R
Mais	9	64,5	1,5	4,9	5,2	2,4	7,7	8,0
Ontsloten mais	9	64,2	0,6	4,9	4,9	0,9	7,6	7,7
Hondebrok	9	37,5	0,9	2,8	2,9	2,4	7,4	7,8
Biggenfokkorrel	9	47,6	0,6	3,1	3,2	1,2	6,5	6,7
<u>Zonder lab 5</u>								
Mais	8	66,2	1,7	2,8	3,3	2,5	4,2	4,9
Ontsloten mais	8	65,9	0,6	2,7	2,8	0,9	4,2	4,3
Hondebrok	8	38,3	0,9	2,1	2,3	2,4	5,4	5,9
Biggenfokkorrel	8	48,7	0,7	1,7	1,9	1,4	3,5	3,8
<u>Zonder lab 4 en 5</u>								
Mais	7	65,4	1,7	1,1	2,0	2,7	1,6	3,1
Ontsloten mais	7	65,2	0,6	1,5	1,6	0,9	2,2	2,4
Biggenfokkorrel	7	48,2	0,7	0,7	1,0	1,4	1,4	2,0

Tabel 4a. Spreidingen in totaal ruw zetmeel voor de laboratoria 3, 5, 7 en 9 in %.

monster	Aantal labs	Gemidd. gehalte	Standaardafwijking				Variatiecoëfficiënt			
			binnen anal.	tussen anal.	tussen lab.	totaal	binnen anal.	tussen anal.	tussen lab.	totaal
		$\bar{x}$	s_r	s_a	s_l	s_R	V_r	V_a	V_l	V_R
Mais	4	63,2	1,8	afwezig	5,3	5,6	2,8	afwezig	8,4	8,8
Ontsloten mais	4	62,8	0,5	0,3	5,2	5,2	0,8	0,4	8,2	8,3
Hondebrok	4	37,0	1,0	afwezig	3,3	3,5	2,7	afwezig	9,0	9,4
1) Biggenfokkorrel	3	46,2	0,7	afwezig	3,5	3,6	1,5	afwezig	7,6	7,7
<u>zonder lab 5</u>										
Mais	3	65,7	1,9	afwezig	1,4	2,4	3,0	afwezig	2,1	3,7
Ontsloten mais	3	65,4	0,5	0,4	1,2	1,4	0,8	0,6	1,9	2,1
Hondebrok	3	38,3	1,1	afwezig	2,5	2,7	2,8	afwezig	6,6	7,1
1) Biggenfokkorrel	2	48,2	0,8	0,1	afwezig	0,8	1,7	0,1	afwezig	1,7

1) zonder laboratorium 9, slechts één analist

Tabel 5. Spreidingen in verteerbaar ruw zetmeel voor alle laboratoria in %.

monster	Aantal labs	Gemidd. gehalte	Standaardafwijking			Variatiecoëfficiënt		
			binnen lab.	tussen lab.	totaal	binnen lab.	tussen lab.	totaal
		$\bar{x}$	s_b	s_l	s_R	V_b	V_l	V_R
Mais	9	41,8	2,1	10,6	10,8	5,0	25,3	25,8
Ontsloten mais	9	60,9	0,8	5,3	5,3	1,3	8,6	8,7
Hondebrok	9	34,1	0,6	3,0	3,1	1,9	8,9	9,1
Biggenfokkorrel	9	46,6	0,5	3,2	3,2	1,1	6,9	7,0
<u>zonder lab 3</u>								
Mais	8	38,6	2,3	7,6	8,0	6,0	19,7	20,6
<u>zonder lab 5</u>								
Ontsloten mais	8	62,6	0,8	3,3	3,4	1,2	5,3	5,4
Hondebrok	8	35,0	0,7	1,9	2,0	1,9	5,4	5,7
Biggenfokkorrel	8	47,5	0,6	2,5	2,5	1,2	5,2	5,3
<u>zonder lab 4 en 5</u>								
Ontsloten mais	7	61,8	0,8	2,0	2,2	1,3	3,3	3,5
Biggenfokkorrel	7	47,0	0,6	2,0	2,1	1,2	4,2	4,4

Tabel 5a. Spreidingen in verteerbaar ruw zetmeel voor de laboratoria 3, 5, 7 en 9 in %.

monster	Aantal labs	Gemidd. gehalte	Standaardafwijking				Variatiecoëfficiënt			
			binnen anal.	tussen anal.	tussen lab.	totaal	binnen anal.	tussen anal.	tussen lab.	totaal
		$\bar{x}$	s_r	s_a	s_l	s_R	V_r	V_a	V_l	V_R
Mais	4	42,3	0,8	1,6	13,8	13,9	1,9	3,8	32,7	33,0
Ontsloten mais	4	59,8	0,5	1,0	5,9	6,0	0,9	1,6	9,8	10,0
Hondebrok	4	33,9	0,6	0,6	3,8	3,9	1,7	1,7	11,3	11,6
1) Biggenfokkorrel	3	46,1	0,2	0,3	3,8	3,8	0,4	0,8	8,3	8,3
<u>zonder lab 3</u>										
Mais	3	36,7	0,9	1,8	9,8	10,0	2,6	5,0	26,8	27,3
<u>zonder lab 5</u>										
Ontsloten mais	3	62,5	0,5	0,9	2,5	2,7	0,8	1,5	4,0	4,3
Hondebrok	3	35,7	0,6	0,7	1,7	1,9	1,6	2,0	4,7	5,4
1) Biggenfokkorrel	2	48,2	0,2	0,4	1,1	1,2	0,4	0,8	2,3	2,4

1) zonder laboratorium 9, slechts één analist

Tabel 6. Spreidingen in vitro verteringscoëfficiënt voor alle laboratoria in %.

monster	Aantal labs	Gemidd. gehalte	Standaardafwijking			Variatiecoëfficiënt		
			tussen anal.	tussen lab.	totaal	tussen anal.	tussen lab.	totaal
		$\bar{x}$	s_a	s_l	s_R	V_a	V_l	V_R
Mais	9	64,1	5,0	13,4	14,3	7,8	21,0	22,3
Ontsloten mais	9	95,4	1,2	2,7	2,9	1,2	2,8	3,1
Hondebrok	9	91,0	1,8	3,3	3,8	2,0	3,7	4,2
Biggenfokkorrel	9	98,4	1,1	3,3	3,5	1,2	3,3	3,5
Mais								
zonder lab 2	8	65,3	2,5	14,6	14,8	3,8	22,3	22,6
zonder lab 3	8	59,7	5,4	7,0	8,8	9,0	11,6	14,7
zonder lab 2 en 3	7	60,4	2,7	8,5	8,9	4,4	14,1	14,7
Ontsloten mais	8	95,8	1,3	2,1	2,4	1,2	2,2	2,5
zonder lab 1								
Biggenfokkorrel	8	99,2	1,1	1,4	1,8	1,2	1,5	1,9
zonder lab 1								

Opmerking: de analisten hebben het totaal en het verteerbaar ruw zetmeel in enkelvoud, duplo of triplo bepaald.

Tabel 6a. Spreidingen in vitro verteringscoëfficiënt, voor de laboratoria 3, 5, 7 en 9 in %.

monster	Aantal labs	Gemidd. gehalte	Standaardafwijking			Variatiecoëfficiënt		
			tussen anal.	tussen lab.	totaal	tussen anal.	tussen lab.	totaal
		$\bar{x}$	s_a	s_l	s_R	V_a	V_l	V_R
Mais	4	66,5	2,8	19,6	19,8	4,2	29,4	29,7
Ontsloten mais	4	95,0	1,4	2,7	3,1	1,5	2,9	3,2
Hondebrok	4	91,5	2,3	3,9	4,5	2,5	4,2	4,9
1) Biggenfokkorrel	3	99,7	1,2	1,6	2,0	1,2	1,6	2,0

1) zonder laboratorium 9, slechts één analist.

Opmerking: Elke analist heeft zowel het totaal als het verteerbaar ruw zetmeel in duplo bepaald.

Bijlage I

BEPALING VAN DE IN VITRO VERTEERBAARHEID VAN RUW ZETMEEL

1. Onderwerp

Deze norm beschrijft een methode voor de bepaling van de in vitro verteerbaarheid van ruw zetmeel in diervoeders en in plantaardige diervoedergrondstoffen.

2. Toepassingsgebied

Deze norm is van toepassing bij het onderzoek van enkelvoudige en samengestelde voeders voor dieren.

3. Definitie

Gehalte aan in vitro verteerbaar ruw zetmeel: de hoeveelheid zetmeel en hoogmoleculaire afbraakprodukten hiervan die - zonder voorbewerking - door α -amylase uit pancreatine wateroplosbaar gemaakt kunnen worden, plus de reducerende suikers, bepaald als glukose en omgerekend tot zetmeel, uitgedrukt in procenten van het in behandeling genomen monster. De in vitro verteerbaarheid is het gehalte in vitro verteerbaar ruw zetmeel gedeeld door het gehalte totaal ruw zetmeel en vermenigvuldigd met 100 %.

4. Beginsel

Het monster wordt geïncubeerd met pancreaspoeder. Het daarin aanwezige enzym amylase breekt het aantastbare zetmeel af tot water-oplosbare maltose en dextrinen. Na onteiwitting met Carrez-oplossingen worden maltose en dextrinen gehydrolyseerd door koken met zoutzuur en het gevormde glukose bepaald volgens de methode Luff-Schoorl. Dezelfde bepaling, maar dan na ontsluiting van alle zetmeel onder druk, wordt toegepast voor totaal ruw zetmeel.

5. Monstervoorbereiding

Bereid het analysemonster door eerst vóór te breken in een kruisslagmolen zonder zeef en vervolgens te malen over een 1 mm zeef. Dit om warmte-ontwikkeling tijdens het malen zoveel mogelijk te vermijden.

6. Reagentia en hulpstoffen

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Gebruik gedestilleerd water of water van tenminste gelijke zuiverheid.

- 6.1. Buffer/zoutoplossing, pH 6,8. Los daartoe 7,262 g kaliumdiwaterstof-fosfaat (KH_2PO_4), 9,500 g dinatriumwaterstoffosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 1,868 g NaCl op en vul aan tot 1 l water.
- 6.2. Klaringsoplossingen volgens Carrez:
- 6.2.1. Carrez-I: Los 21,9 g zinkacetaat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 3 g ijsazijn op in water en vul aan tot 100 ml.
- 6.2.2. Carrez-II: Los 10,6 g kaliumhexacyanoferraat (II) ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) op in water en vul aan tot 100 ml.
- 6.3. NaOH 4 m en 10 m.
- 6.4. HCl 25 % en 4 m.
- 6.5. Fenolftaleïne-oplossing 1 g per l, volgens NEN 3102 onder 7.1.
- 6.6. Zetmeel vlgs. Zulkowski.
- 6.7. Pancreaspoeder of pancreatine, tenminste 40 E per mg.
- 6.7.1. Bepaling van de aktiviteit van amylase in pancreaspoeder.
- Weeg 200 mg pancreaspoeder af in een maatkolf van 1 l. Voeg gedestilleerd water toe en homogeniseer. Vul verder aan tot de maatstreep en homogeniseer de suspensie opnieuw.
- Verdun een deel van de buffer-zoutoplossing met water in een verhouding 1 : 1. Plaats de verdunde buffer-zoutoplossing in een waterbad van 40°C . Maak een oplossing van zetmeel volgens Zulkowski (3 g/100 ml). Plaats deze eveneens in het waterbad.
- Breng in een maatkolf van 100 ml achtereenvolgens 10 ml vóórverwarmde zetmeeloplossing en 50 ml voorverwarmde buffer-zoutoplossing. Pipetteer daarin 1 ml pancreatine-oplossing, na de suspensie nog eens omgeschud te hebben. Druk de stopwatch direkt na het pipetteren in, schud de kolf krachtig om, plaats hem in het waterbad en incubeer onder voortdurende beweging, zodat de suspensie juist niet uitzakt. Stop de reactie na precies 30 min. door toevoeging van 5 ml Carrez-I-oplossing. Schud krachtig gedurende 1 min. Voeg daarna 5 ml Carrez-II-oplossing toe. Schud weer 1 min. Breng de kolf over in een koud waterbad. Laat de oplossing afkoelen en neutraliseer daarna met 4 m NaOH op fenolftaleïne tot lichtrose. Voeg druppels-gewijs 25 % HCl-oplossing toe tot omslag naar kleurloos en dan nog twee druppels extra. Vul de maatkolf aan tot de maatstreep, homogeniseer de

inhoud en filtreer over een vouwfilter. Verwerp het eerste deel van het filtraat en pipetteer vervolgens uit het heldere filtraat 25 ml voor een Luff-Schoorl-bepaling. Voer de complete bepaling in duplo uit. Voer tevens een blanco uit met zetmeel vlgs. Zulkowski en geïnactiveerd enzym na ca. 50 ml pancreatine-oplossing gedurende 10 min. gekookt te hebben (zowel het enzym als het zetmeel vlgs. Zulkowski kan reducerende equivalenten bevatten). Gebruik voor de Luff-Schoorl titratie de maltose-tabel.

6.7.2. Tabel voor 25 ml reagens volgens Luff-Schoorl 0,1 N - 2 N en 10 minuten kooktijd.

thiosulfaat 0,1 N	maltose	
	mg	verschil
1	3,9	
2	7,8	3,9
3	11,7	3,9
4	15,6	3,9
5	19,6	4,0
6	23,5	3,9
7	27,5	4,0
8	31,5	4,0
9	35,5	4,0
10	39,5	4,0
11	43,5	4,0
12	47,5	4,0
13	51,6	4,1
14	55,7	4,1
15	59,8	4,1
16	63,9	4,1
17	68,0	4,1
18	72,2	4,2
19	76,5	4,3
20	80,9	4,4
21	85,4	4,5
22	90,0	4,6
23	94,6	4,6

6.7.3. Berekening

Een eenheid pancreatine is die hoeveelheid enzymmengsel, die bij de proefomstandigheden (temperatuur 40°C, pH = 6,8) en gemeten over 30 min. gemiddeld per minuut 1 μ mol maltose-equivalenten uit zetmeel volgens Zulkowski vrijmaakt.

Het aantal eenheden per mg enzym is:

$$\frac{c \cdot m_1}{m_0 \cdot M \cdot t}, \text{ waarin}$$

m_1 = het aantal mg maltose volgens de Luff-Schoorl tabel, overeenkomend met (b - a) ml, als b het aantal ml verbruikte thiosulfaat 0,1 N bij de blanco-bepaling en a het aantal ml bij de bepaling van het monster is;

m_0 = de massa van het afgewogen pancreaspoeder in mg; - - - - -

M = het molekulgewicht van maltose;

t = de incubatietijd in minuten;

c = $4 \cdot 10^6$;

7. Toestellen en hulpmiddelen

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

- balans met een nauwkeurigheid van 1 mg.
- schudwaterbad of een waterbad in combinatie met een magnetisch roerapparaat.
- autoclaaf of hogedrukpan voor verhitting tot tenminste 120°C.

8. Uitvoering

8.1. Verdun een deel van de buffer-zoutoplossing (6.1) met water in een verhouding 1 : 1. Laat de verdunde buffer-zoutoplossing in een waterbad van 40°C $\pm$ 1°C in ca. 20 min. op temperatuur komen.

Weeg af 1,0 g van het monster op 1 mg nauwkeurig en 400 mg pancreatine in een maatkolf van 100 ml. Voeg hieraan 50 ml van de voorverwarmede buffer-zoutoplossing toe.

Incubeer het mengsel in het waterbad onder voortdurende beweging, zodat de suspensie juist niet uitzakt. Stop de reactie na 60 minuten, gerekend vanaf het moment van toevoeging van de buffer-zoutoplossing, door toevoeging van 5 ml Carrez-I-oplossing. Schud krachtig gedurende 1 minuut. Voeg daarna 5 ml Carrez-II-oplossing toe. Schud weer 1 minuut. Breng de kolf over in een koud waterbad en laat de oplossing afkoelen. Neutraliseer met 4 m NaOH op fenolftaleïne tot licht-rose. Voeg druppelsgewijs 25 % HCl-oplossing toe tot omslag naar kleurloos en dan nog 2 druppels extra. Vul de maatkolf met water tot de maatstreep en homogeniseer de inhoud. Filtreer door een vouwfilter. Controleer bij de bepaling van

1)
 totaal zetmeel, of al het zetmeel is omgezet. Verwerp het eerste deel van het filtraat en pipetteer vervolgens uit het heldere filtraat 25 ml in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg 3 ml 25 % HCl-oplossing toe en kook gedurende $1\frac{1}{2}$ uur aan een terugvloei koeler. Laat de oplossing afkoelen, neutraliseer met 10 m NaOH tot licht-rose en vervolgens met 4 m HCl tot kleurloos. Spoel de inhoud van de erlenmeyer kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml en vul met water aan tot de maatstreep. Homogeniseer en bepaal de hoeveelheid glukose volgens Luff-Schoorl in 25 ml, zoals beschreven in NEN 3574. Voer een blanco bepaling uit door aan 400 mg pancreatine 50 ml voorverwarmde buffer/zoutoplossing toe te voegen en verder te werken volgens bovenbeschreven wijze.

8.2. Tabel voor 25 ml reagens volgens Luff-Schoorl 0,1 N- 2 N en 10 minuten kooktijd.

thiosulfaat	glukose	
0,1 N		
ml	mg	verschil
1	2,4	2,4
2	4,8	2,4
3	7,2	2,5
4	9,7	2,5
5	12,2	2,5
6	14,7	2,5
7	17,2	2,6
8	19,8	2,6
9	22,4	2,6
10	25,0	2,6
11	27,6	2,7
12	30,3	2,7
13	33,0	2,7
14	35,7	2,8
15	38,5	2,8
16	41,3	2,9
17	44,2	2,9
18	47,1	2,9
19	50,0	3,0
20	53,0	3,0
21	56,0	3,1
22	59,1	3,1
23	62,2	

1)
 Indien de oplossing blauw kleurt of blauw gekleurde stukjes bevat, begin de bepaling dan opnieuw. Ga in het eerste geval na, of de activiteit van de enzymoplossing juist is en in het tweede geval of de ontsluiting volgens voorschrift is uitgevoerd. Incubeer en /of ontsluit eventueel een uur langer

8.3. Bepaling van totaal ruw zetmeel

8.3.1. Ontsluiting van het zetmeel

Weeg 1,0 g monster op 1 mg nauwkeurig af in een maatkolf van 100 ml. Voeg 30 ml water toe. Schud, om een zo regelmatig mogelijke verdeling van het monster te verkrijgen, de kolf krachtig om. Plaats de kolf ca. 5 min. in een kokend waterbad en houd daarbij de inhoud voortdurend in beweging. Zet, nadat een zo goed mogelijke verdeling van het monster is bereikt, de maatkolf in een autoclaaf of hogedrukpan en verhit gedurende 2 uur bij 120°C en een overdruk van 100 kPa (≈ 1 atm.) of 1 uur bij ca. 130°C en een overdruk van 180 kPa ($\approx 1,8$ atm.).

8.3.2. Hydrolyse en titratie

Neem de maatkolf uit de autoclaaf. Koel af en voeg 400 mg pancreatine toe. Voeg 30 ml onverdunde op 40°C voorverwarmde buffer/zoutoplossing toe (6.1), op zodanige wijze, dat eventueel zich in de hals van de kolf bevindende pancreatine naar beneden wordt gespoeld. Voer de bepaling verder uit zoals beschreven onder 8.1 vanaf "Incubeer het mengsel".

9. Berekening

Bereken het gehalte aan in vitro verteerbaar ruw zetmeel uit:

$$W = \frac{c \cdot m_1}{V \cdot m_0}, \text{ waarin}$$

W = het gehalte aan in vitro verteerbaar ruw zetmeel, in % (m/m);

m_1 = het aantal mg glukose volgens de Luff-Schoorl tabel, overeenkomend met (b - a) ml, als b het aantal ml verbruikte thiosulfaat 0,1 N bij de blanco bepaling en a het aantal ml bij de bepaling van het monster is;

m_0 = de massa van het analysemateriaal, in g;

V = het voor de titratie gepipetteerde volume, in ml;

c = 36 ml;

Bereken op dezelfde wijze het gehalte aan totaal ruw zetmeel, waarbij dezelfde blanco waarde gebruikt kan worden.

Als W het gehalte aan in vitro verteerbaar zetmeel en T dat aan totaal zetmeel is, dan is $\frac{W}{T} \times 100$ de in vitro verteringscoëfficiënt.