

Projectnr.: 71.314.01  
Operationeel maken van methoden ten behoeve van Onderzoekstaken

Projectleider: R. Frankhuizen

Rapport 2005.012

maart 2006

## **Verbetering EU analysemethode voor fosfolipiden in melkpoeders**

M.A.H. Baltussen

Business Unit: Analyse en Ontwikkeling  
Cluster: Authenticiteit & Identiteit

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Tel: 0317-475422  
Fax: 0317-417717  
Internet: [www.rikilt.wur.nl](http://www.rikilt.wur.nl)

Copyright 2006, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

*Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:*

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

## VERZENDLIJST

### EXTERN:

Directie Internationale Zaken (mr. J.P. Hoogeveen, ir. J. Schotanus, mw. M. Tulp C.B.,  
drs. G.R. Driegen)

Dienst Regelingen Ministerie LNV (ing. M.G.A. Grooten, ing. W.H. Lanckohr,  
mw. H.J.M. Schapendonk-Willems)

Voedsel en Waren Autoriteit (drs. J.H.G. Goebels, dr. G.A. Lam, drs. P. Van der Wal)

Algemene Inspectiedienst (ing. A.R.M. Pruijn, mr. J.A.H. Urlings, drs. J.L.H.D. Eyck, dhr. M. Kooij)

Centraal Orgaan voor Kwaliteitsaangelegenheden in de Zuivel, Leusden (dr. I.L. Freriks)

Produktschap Diervoeders (dhr. J.J. van der Weyden)

INHOUDSOPGAVE	blz
<b>SAMENVATTING</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>4</b>
<b>1 INLEIDING</b>	<b>5</b>
<b>2 METHODE</b>	<b>7</b>
2.1 Analyse	7
2.1.1 Principe	7
2.1.2 Materialen	7
2.1.3 Opwerken standaard	7
2.1.4 Opwerken monsters	7
2.1.5 HPLC analyse	7
2.2 Prestatiekenmerken	8
2.2.1 Robuustheid	8
2.2.2 Herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid	8
2.2.3 Stabiliteit	8
2.3 Normaalwaarden	8
<b>3 RESULTATEN</b>	<b>9</b>
3.1 Prestatiekenmerken	9
3.1.1 Robuustheid	9
3.1.2 Herhaalbaarheid (r) en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (R <sub>I</sub> )	12
3.1.3 Stabiliteit	13
3.2 Normaalwaarden	14
<b>4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN</b>	<b>18</b>
4.1 Prestatiekenmerken	18
4.1.1 Robuustheid	18
4.1.2 Herhaalbaarheid en (binnenlaboratoriumreproduceerbaarheid	18
4.1.3 Stabiliteit	19
4.2 Normaalwaarden	19
4.3 Aanbevelingen	19
<b>5 LITERATUUR</b>	<b>20</b>
<b>BIJLAGEN</b>	
Bijlage 1	Prestatiekenmerken
Bijlage 2	De invloed van mengen op fosfolipiden gehalten
Bijlage 3	Het fosfolipidengehalte, vetgehalte en eiwitgehalte van de monsters melkpoeder voor normaalwaarden
Bijlage 4	Data stabiliteitsexperiment



## SAMENVATTING

In dit rapport staan de resultaten van het onderzoek naar een verbeterde methode voor de analyse van fosfolipiden in magere melkpoeder (MMP), karnemelkpoeder (KMP) en volle melkpoeder (VMP) volgens de methode beschreven in bijlage XX van verordening (EG) nr. 213/2001. Het betreft een methode voor de controle op de aanwezigheid van KMP in MMP monsters die genomen worden door de AID in het kader van interventie maatregelen. Het fosfolipiden gehalte in MMP, uitgedrukt in fosfatidylethanolamine dipalmitoyl (PEDP), mag niet meer dan 69,31 mg PEDP/100g zijn volgens verordening (EG) nr 214/2001.

De EU methode gaf in het verleden problemen en is daarom verbeterd. De verbeterde methode heeft, t.o.v. van de methode die in de verordening wordt beschreven, een wijziging ondergaan; het derivatiseren van de componenten gebeurt niet on-column maar pre-column. Verder werden er aanpassingen in de methode verricht om knelpunten te verhelpen. De knelpunten kwamen aan het licht door toetsing van de robuustheid van een aantal aspecten van de methode. De invloed van de verbeteringen van de methode werd in kaart gebracht door de bepaling van prestatiekenmerken; de relatieve standaard deviatie (RSD) en de relatieve herhaalbaarheid (VCr).

De prestatiekenmerken zijn bepaald vóór en nadat de methode was gewijzigd en aangepast t.a.v. de knelpunten. Het blijkt dat de resultaten een stuk verbeterd zijn. Dit wordt vooral duidelijk door de gemiddelde RSD en VCr van de onderzochte melkpoeders te vergelijken; deze waren resp. 11,5 % en 32,2 % en zijn nu resp. 2,3 % en 6,4 %.

De prestatiekenmerken van MMP voldeden nog net niet aan de eisen die in bijlage XX van verordening (EG) nr. 213/2001 worden gesteld. De verwachting is dat de prestatiekenmerken van MMP in de loop van de tijd zullen verbeteren aangezien de prestatiekenmerken van KMP en VMP wel voldeden.

Er is een onderzoek gedaan naar de normaalwaarden van interventiemonsters MMP omdat hiervan alleen data uit een onderzoek van Resmini (1988) beschikbaar zijn. Uit dit onderzoek blijkt het gemiddelde fosfolipidengehalte van de MMP monsters (58,0 mg/100g), significant hoger te liggen dan in de literatuur vermeld (47,6 mg/100g, Resmini et al. 1988). Dit betekent dat er een grotere kans is op een overschrijding van de norm van interventiemonsters MMP, al dan niet terecht. Er zal een uitgebreider onderzoek naar normaalwaarden moeten plaats vinden om deze bevindingen te bevestigen, eventuele nieuwe normaalwaarden vast te stellen en de norm die door de EU is vastgesteld te herzien.

Verder is er een stabiliteitsexperiment uitgevoerd. Het blijkt dat de fosfolipiden in de melkpoeders instabiel zijn bij kamertemperatuur, 6 °C en -27 °C. De melkpoeders moeten bij -70 °C worden opgeslagen wanneer ze gedurende langere tijd (> een maand) bewaard moeten worden.

## SUMMARY

The results of the investigation of phospholipids in SMP (skimmed milk powder), BMP (buttermilk powder) and whole milk powder (WMP) according to the method described in annex XX of Regulation (EC) no. 213/2001 are represented in this report. It concerns a method to determine solids of BMP in SMP samples that are taken by the AID in the framework of intervention. The phospholipid content of SMP, expressed in phosphatidylethanolamine dipalmitoyl (PEDP), should be less than 69.31 mg PEDP/100 g according to Regulation (EC) no. 214/2001.

In the past, there were problems with the EC method and therefore improvements were made. The improved method has been altered compared to the EC method; derivatization of the phospholipids takes place pre-column instead of on-column. Also some adjustments of the method were done to solve bottlenecks of the method. These bottlenecks became clear when checking the ruggedness of some aspects of the method. The influence of the improvements on the performance of the method was checked. For this purpose, the relative standard deviation (RSD) and relative repeatability (V<sub>Cr</sub>) were determined.

The method has improved a great deal after the alteration and adjustment of some crucial points. This is especially clear when comparing the average RSD and V<sub>Cr</sub> of the investigated milk powders, who were resp. 11.5 % and 32.2 % and are now resp. 2.3 % en 6.4 %.

The performance of SMP did not meet entirely the criteria in annex XX of Regulation (EC) no. 213/2001. However, the performance of BMP and WMP did meet the criteria and therefore it is to be expected that the performance of SMP will improve.

An investigation has done to obtain regular values of intervention samples SMP. Until now, the only known data are from Resmini et al. 1988. From the investigation it appears that the average phospholipid content of SMP samples was higher (58.0 mg/100g) than mentioned in literature (47.6 mg/100 g, Resmini et al. 1988). More research has to be done on regular values to affirm these findings and, if necessary, to establish new regular values and re-evaluate the EC standard.

Furthermore, from storage tests, it turned out that the phospholipids in the milk powders are not stable at 6 °C en -27 °C. Samples should be kept at -70 °C when they are to be preserved for a longer period (> one month).

# 1 INLEIDING

Fosfolipiden in melkpoeders worden binnen het RIKILT bepaald met een HPLC methode welke wordt beschreven in bijlage XX van EG verordening Nr. 213/2001 en is in eerste instantie bedoeld voor het opsporen van KMP in MMP in. MMP monsters worden door de AID genomen in het kader van interventie maatregelen en bij het RIKILT aangeboden voor analyse.

De methode is gebaseerd op een publicatie van Resmini et al 1988. Fosfolipiden worden geëxtraheerd uit gereconstitueerde melkpoeder met behulp van methanol. Voor de detectie worden PEDP, PE en PS on-column gederivatiseerd met o-phthaldialdehyde wat een fluorescerend derivaat oplevert. De detectie gebeurt met een fluorescentie detector. De gehalten fosfatidylethanolamine (PE) en fosfatidylserine (PS) worden berekend aan de hand van een externe standaard, fosfatidylethanolamine dipalmitoyl (PEDP). De gehalten worden daarom uitgedrukt in mg PEDP/ 100g melkpoeder.

In de verordening staan de waarden van de relatieve standaard deviatie, relatieve herhaalbaarheid en relatieve reproduceerbaarheid van de methode genoemd;

RSD = 2%

VCr = 6%

VCR = 11%

Er is een natuurlijke variatie van het gehalte aan fosfolipiden in de melkpoeders. Om een norm vaste te stellen waaraan de het fosfolipidengehalte in magere melkpoeder moet voldoen, is het belangrijk normaalwaarden vast te stellen. In het artikel van Resmini worden normaalwaarden genoemd van fosfolipiden, uitgedrukt in mg PEDP/ 100g melkpoeder, in MMP en KMP (tabel 1.1). Door de EC is een norm gesteld aan het maximum PEDP gehalte in MMP van **69,31 mg/100g** (verordening (EU) No 214/2001). Deze norm is gebaseerd op normaalwaarden die door Resmini et al. 1988 zijn vastgesteld. In de literatuur zijn geen andere data bekend van normaalwaarden die met deze methode zijn bepaald dan die door Resmini zijn opgegeven. Het is voor het RIKILT belangrijk te weten waar de normaalwaarden liggen van de monsters die met de reguliere monsterstroom binnen komen. Wanneer de normaalwaarden anders zijn dan die door Resmini vastgesteld, zal dit invloed hebben op de kans op overschrijding van de norm.

Tabel 1.1 Fosfolipidengehalten in mg PEDP/100 g melkpoeder (Resmini et al 1988)

	MMP	KMP
<b>gemiddelde ± sd</b>	47,6 ± 5,1	386,1 ± 86,9
<b>minimum</b>	36,7	241,3
<b>maximum</b>	57,3	544,6

In KMP zit bijna het 10-voudige aan fosfolipiden t.o.v. MMP. Vermengingen vanaf 10% KMP met MMP zijn met deze methode aantoonbaar.

Aangezien de economische waarde van KMP groter is geworden, is er ook een ander type vervalsing mogelijk. Het betreft mengsels van (gesubsidieerde, uit Oost Europa geïmporteerde) MMP met VMP die door moeten gaan voor KMP. Het vetgehalte ligt binnen de norm (door de bijmenging van VMP) maar het fosfolipiden gehalte zal veel lager zijn dan in KMP.

De methode voor de analyse van PE en PS met behulp van de HPLC volgens de verordening was al operationeel binnen het RIKILT maar is aangepast t.a.v. de derivatisatie van de fosfolipiden, i.p.v. oncolumn wordt er precolumn gederivatiseerd. In de methode die beschreven is in de verordening, worden het monster en het OPA reagens op de kolom bij elkaar gebracht en daar moet de reactie tussen de stoffen plaats vinden. Dit is geen ideale situatie aangezien de top van de kolom aan veranderingen onderhevig is tijdens gebruik en er is kans dat niet alle fosfolipiden worden gederivatiseerd. Verder zijn de moderne autosamplers wel in staat om precolumn derivatisatie uit te voeren maar niet meer oncolumn. De aanpassingen worden getoetst door de prestatiekenmerken te onderzoeken, zoals herhaalbaarheid (r) en relatieve standaard deviatie (RSD). Deze moeten minimaal voldoen aan de waarden in de verordening.

Er zijn vaker problemen met de analyse geweest en er wordt uitgezocht waar de knelpunten van de methode zitten. Stabiliteit en robuustheid worden getoetst om eventuele knelpunten te kunnen verhelpen en om meer inzicht in de methode te krijgen.



## 2 METHODE

### 2.1 Analyse

#### 2.1.1 Principe

Fosfolipiden bevatten primaire amine-groepen en kunnen daarom met o-phthaldehaldehyde (OPA) gederivatiseerd worden bij een hoge pH (Simons and Johnson 1978). Derivatisering vindt in de autosampler plaats bij 10°C door monster met OPA-reagens te mengen in een leeg vaatje. Na goed mengen wordt het gederivatiseerde monster geïnjecteerd. Het derivaat wordt gemeten met een fluorescentie detector met excitatie bij 330 nm en emissie bij 440 nm. Zie voor een uitgebreide beschrijving van de methode RSV A0605

#### 2.1.2 Materialen

- MMP, VMP en KMP uit het reguliere monster aanbod van het RIKILT.
- Externe standaard; fosfatidylethanolamine-dipalmitoyl (PEDP)
- Interne standaard; tryptamine
- OPA reagens, in boorzuur, pH 10
- HPLC opstelling met een autosampler, die precolumn het OPA-reagens met de standaard c.q. monster kan mengen en een fluorescentie detector.

#### 2.1.3 Opwerken standaard

- De interne standaard is tryptamine. Er wordt een stockoplossing gemaakt van 24,0 mg in 100 ml methanol. De stockoplossing wordt verdund tot 0,24 mg in 10 ml methanol.
- De externe standaard is fosfatidylethanolamine-dipalmitoyl (PEDP). Er wordt een stock oplossing gemaakt van 55,4 mg PEDP in 50% chloroform en 50% methanol. Van de stock opl. wordt 1 ml verdund met methanol in een 100 ml maatkolff. Respectievelijk 0,5, 1 en 2 ml werkoplossing worden in 10 ml maatkolffjes overgebracht. Hieraan wordt 100 µl interne standaard toegevoegd en de maatkolffjes worden aangevuld met methanol.

#### 2.1.4 Opwerken monsters

Er wordt een 10% oplossing van de melkpoeders gemaakt door 20 g water van 50°C aan 2 g melkpoeder toe te voegen. Nadat de melkpoeder gereconstitueerd is, wordt 100 µl, in geval van KMP, of 200 µl, in geval van MMP, in een maatkolffje van 10 ml gebracht. Hieraan wordt 100 µl interne standaard, toegevoegd en de maatkolffjes worden aangevuld met methanol. Nadat de kolffjes 10 min. in een trilbad hebben gestaan, worden ze gecentrifugeerd (15000 g). Het supernatant wordt gefiltreerd en is klaar voor analyse.

#### 2.1.5 HPLC analyse

De analyse gebeurt met behulp van HPLC. Een analyse reeks start met methanol, gevolgd door een ijkreeks en vervolgens de monsters. Na 10 monsters wordt de ijkreeks opnieuw geanalyseerd. De autosampler brengt 200 µl monster of standaard en 200µl OPA reagens bij elkaar in een leeg vaatje waarna wordt gemengd. Het monster is dan klaar om geïnjecteerd te worden. De sampleloop van 100 µl moet tussen elke injectie zorgvuldig gespoeld worden met 100% methanol om carry-over te voorkomen. De fluorescentiedetector is ingesteld op 330 nm excitatie en 440 nm emissie.

## 2.2 Prestatiekenmerken

### 2.2.1 Robuustheid

Parameters die zijn getoetst op robuustheid;

- het mengen van OPA-reagens met monster door de autosampler.
- wachttijd tussen mengen en injectie.
- het gebruik van vers OPA-reagens en reagens dat minimaal 24 uur heeft gestaan.
- fabrieks OPA-reagens.

Een standaard-additie experiment werd uitgevoerd om na te gaan in hoeverre PEDP terug te vinden is in de matrix (zg. recovery). Hiertoe werd 0,5, 1 en 2 ml standaard toegevoegd aan het 10 ml maatkolffje waarin 200 µl gereconstitueerde MMP en tryptamine was gepipetteerd. Er werd niet voor gekozen om de PEDP oplossing aan de gereconstitueerde melk toe te voegen omdat melk coaguleert wanneer methanol eraan wordt toegevoegd.

### 2.2.2 Herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid

Er worden 2 MMP, 2 VMP en 2 KMP monsters, 8 keer in duplo gemeten, door verschillende analisten. Uit de gegevens die uit de analyses komen, worden de prestatie kenmerken berekend, zoals standaard deviatie (sr), herhaalbaarheid (r) en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (RI).

De MMP en de KMP monsters zijn betrokken uit de reguliere monsterstroom van het RIKILT. Eén VMP monster is een referentiemonster, komt van het NIZO. Eén VMP monster komt uit ringonderzoeken.

### 2.2.3 Stabiliteit

Uit resultaten van analyse van monsters die ouder dan een jaar waren bleek het fosfolipidengehalte vrij laag te zijn. Het vermoeden bestond dat het fosfolipidengehalte terug loopt tijdens opslag bij kamertemperatuur. Een stabiliteitsexperiment werd opgezet om vast te stellen of dit inderdaad het geval is. Hiertoe werd KMP en MMP bij kamertemperatuur (KT), 6°C en -27°C weg gezet. Met tussenpozen van 5 à 8 weken werd het fosfolipidengehalte bepaald van deze monsters.

## 2.3 Normaalwaarden

Er wordt naar gestreefd gemiddelde gehalten PE en PS in MMP en KMP over een heel jaar te verkrijgen. Hiertoe worden 5 monsters MMP en 5 monsters KMP per maand verzameld en geanalyseerd. De monsters worden betrokken uit de reguliere monsterstroom van het RIKILT. MMP en KMP monsters werden verzameld van 1 jaar. De monsters waren ten minste een jaar oud toen ze geanalyseerd werden. Al snel werd duidelijk dat de gehalten erg laag waren. Vervolgens is er toe besloten om betrekkelijk nieuwe MMP en KMP monsters te nemen voor het vaststellen van de normaalwaarden (max. 2 maanden oud).

## 3 RESULTATEN

### 3.1 Prestatiekenmerken

#### 3.1.1 Robuustheid

Van het OPA reagens is bekend dat het ervaring en een grote nauwkeurigheid vereist om mee te werken. Het lijkt alsof het de ene keer ‘beter’ reageert dan de andere keer. In Handbook of HPLC (Schoenmakers et al 1998), waarbij OPA reagens gebruikt werd voor aminozuur analyse, werd aangegeven dat het reagens 24 uur moet rijpen in de koelkast voordat het gebruikt wordt. Dit zou stabiliserend werken op de reactie van het reagens. In de koelkast blijkt er echter een neerslag te ontstaan in het reagens en wordt het daarom 24 uur bij kamertemperatuur weggezet. Het gerijpte OPA zou een positieve invloed op de prestatiekenmerken kunnen hebben.

In tabel 3.2 staan de resultaten van het onderzoek naar de invloed van rijpen op het OPA reagens en het mengen van het OPA reagens met het monster op het fosfolipidengehalte. De resultaten staan uitgedrukt in piekoppervlak om de fouten die kunnen ontstaan door berekening met PEDP uit te sluiten.

Hoewel de methode gevoeliger is wanneer er niet gemengd wordt in de autosampler, is de herhaalbaarheid een stuk slechter. Er is een redelijke kans dat wanneer er niet gemengd wordt, er concentratieverschillen zijn in het monster wat het grotere piekoppervlak kan verklaren.

De rijping van het OPA reagens heeft een significante invloed op de resultaten. Met OPA reagens dat 24 uur oud is, worden hogere gehalten gemeten en de herhaalbaarheid is verbeterd voor zowel de fosfolipiden als de tryptamine.

Tabel 3.2 *Invloed van OPA reagens en mengen van OPA reagens met monster op tryptamine, PE en PS, n=3.*

	tryptamine piekoppervlak		
	gemiddelde	$s_r$	RSD
<b>gerijpte OPA, niet mengen</b>	3875536	171663	4,4
<b>gerijpte OPA, 3x mengen</b>	2836518	61081	2,1
<b>verse OPA, niet mengen</b>	2578328	204035	7,9
<b>verse OPA, 3x mengen</b>	1308506	45443	3,5

	PS piekoppervlak		
	gemiddelde	$s_r$	RSD
<b>gerijpte OPA, niet mengen</b>	4372703	391602	9,0
<b>gerijpte OPA, 3x mengen</b>	3185055	57996	1,8
<b>verse OPA, niet mengen</b>	3148818	280220	8,9
<b>verse OPA, 3x mengen</b>	1550106	63042	4,1

Vervolg tabel 3.2

	PE piekoppervlak		
	gemiddelde	$s_r$	RSD
<b>gerijpte OPA, niet mengen</b>	14410589	901132	6,3
<b>gerijpte OPA, 3x mengen</b>	10730397	314494	2,9
<b>verse OPA, niet mengen</b>	9007223	897632	10,0
<b>verse OPA, 3x mengen</b>	4433866	196812	4,4

Om de stabiliteit van het derivaat te toetsen werd de autosampler zodanig afgesteld dat na het mengen van het monster met het OPA reagens, het 0, 1, 3 of 8 minuten duurde voordat het monster op de kolom werd gebracht. In tabel 3.3 is te zien dat een minuut wachten niet veel invloed heeft op de piekoppervlakken maar na 3 minuten zijn de piekoppervlakken een stuk kleiner, de gevoeligheid neemt af. 8 minuten wachten heeft relatief weer een veel kleiner effect.

Achteruitgang in gevoeligheid is het gevolg van het uiteen vallen van het derivaat na een bepaalde tijd. Hoe langer het duurt voordat het monster geïnjecteerd wordt, hoe groter dit effect.

Tabel 3.3 Invloed van de wachttijd voor injectie,  $n=5$ .

wachttijd voor injectie	tryptamine piekoppervlak	PEDP piekoppervlak
<b>0 min.</b>	3764799	3848947
<b>1 min.</b>	3607074	3633941
<b>3 min.</b>	1970778	1701390
<b>8 min.</b>	1542498	1300376

In tabel 3.4 staan de resultaten van een onderzoek naar de invloed van het mengen in de autosampler op het fosfolipidengehalte in een KMP monster en de standaard. De analyse is 2 keer uitgevoerd, met enkele dagen ertussen, om de reproduceerbaarheid te toetsen. In de eerste serie werden standaarden st 1 en st 2 meegenomen, in de tweede serie alleen st 1. Er wordt niet óf 1x óf 3x gemengd.

Uit de piekoppervlakken blijkt de  $VC_r$  bij 3x mengen het grootst. Niet mengen geeft de kleinste  $VC_r$ . Na berekening van de gehalten uit de piekoppervlakken blijken de  $VC_r$  waarden voor niet, 1x en 3x mengen dicht bij elkaar te liggen. Door 3x te mengen wordt de fout van de injectie groter maar wordt dit weer gecorrigeerd door de interne standaard tryptamine (de verhouding tussen component en tryptamine blijft dezelfde).

Opvallend is dat in het KMP monster zowel de tryptamine als de PS en PE piekoppervlakken groter zijn na niet en 3x mengen van het monster, dan na 1x mengen. Bij 1x mengen kan de reactietijd van het OPA met de componenten te kort zijn wat de kleinere piekoppervlakken kan verklaren. Bij niet mengen van het monster met OPA reagens kan een deel van het monster en OPA reagens onvermengd blijven.

Plaatselijk is de concentratie van het monster groter terwijl door de overmaat aan OPA een groot deel van de componenten al gederiviseerd is. Dit kan de verklaring zijn voor de grotere piekoppervlakken. Bij de PEDP standaard lijkt dit effect voor zowel tryptamine als PEDP juist tegenovergesteld te zijn. De grootste piekoppervlakken worden nu gevonden na 1x mengen. Het kan zijn dat het derivaat met PEDP sneller uiteen valt dan het derivaat met PE en PS. Of dit werkelijk zo is, is echter niet duidelijk uit de resultaten te halen.

Tabel 3.4 Tryptamine en totaal fosfolipiden, piekoppervlak en gehalten in mg PEDP/100g

KMP	eerste serie			
	tryptamine	gem.	s <sub>r</sub>	RSD
<b>piekoppervlak</b>				
niet gemengd	4119926	14229254	266882.1	1.88
1x gemengd	2989566	8898090	315684.9	3.55
3x gemengd	3334282	11791461	626347.5	5.31
<b>gehalte in KMP</b>				
niet gemengd		533,6	5,28	1,6
1x gemengd		459,8	6,45	1,6
3x gemengd		546,1	4,96	1,3
<b>st 1</b>				
niet gemengd	4086740	2933984	36635.49	1.25
1x gemengd	4164486	3371868	108116.8	3.21
3x gemengd	3028506	2147070	271122	12.63
<b>st 2</b>				
niet gemengd	3827033	5875205	117014.3	1.99
1x gemengd	4228526	6983753	220533.4	3.16
3x gemengd	3010208	4362119	420574.1	9.64
<b>tweede serie</b>				
KMP	tryptamine	gem.	s <sub>r</sub>	RSD
<b>piekoppervlak</b>				
niet gemengd	3228102	13759756	401270.6	2.92
1x gemengd	2188883	8422607	403988.4	4.80
3x gemengd	2893576	11476422	722864.8	6.30
<b>gehalte in KMP</b>				
niet gemengd		523,0	4,14	0,8
1x gemengd		472,2	6,57	1,5
3x gemengd		486,5	3,77	0,8
<b>st 1</b>				
niet gemengd	2968053	3127423	82508.94	2,64
1x gemengd	3501619	3456099	72143.29	2,09
3x gemengd	2481728	2112994	414748.4	19,63

Wanneer de piekoppervlakken van de eerste en de tweede serie met elkaar vergeleken worden, blijkt dat deze voor de monsters en de PEDP standaard vrij dicht bij elkaar liggen. De berekende gehalten liggen met name voor 3x mengen echter verder uit elkaar.

De aanname dat de resultaten wat betreft r en R<sub>1</sub> kunnen verbeteren door het OPA reagens 24 uur bij KT te laten staan blijkt door deze experimenten niet bevestigd te kunnen worden.

Standaard-additie van PEDP aan MMP geeft een lineair verband;  $y = 50,0 \cdot x + 25,7$ , correlatie coëfficiënt = 0,9999. Door de recovery van ongeveer 90% voor alle geteste niveaus lijkt PEDP stabiel te zijn in de matrix.

Tabel 3.5 *Additie van PEDP standaard aan een MMP monster in mg/100 g, n=5.*

	totaal fosfolipiden			PS			PE		
	gehalte	s <sub>r</sub>	RSD	gehalte	s <sub>r</sub>	RSD	gehalte	s <sub>r</sub>	RSD
<b>MMP</b>	34,8	1,34	3,9	9,3	0,47	5,1	25,5	0,87	3,4
<b>MMP + st 0,5</b>	60,5	1,86	3,1	9,4	0,46	4,9	51,2	1,43	2,8
<b>MMP + st 1</b>	84,2	1,47	1,8	8,9	0,36	4,1	75,3	1,20	1,6
<b>MMP + st 2</b>	134,8	4,08	3,0	9,1	0,33	3,6	125,7	3,75	3,0

	toegevoegde PEDP standaard (mg/100g)	gemeten PEDP (mg/100g ± s <sub>r</sub> )	Recovery (% ± s <sub>r</sub> )
<b>PE (st 0,5)</b>	27,7	25,7 ± 1,43	92,8 ± 5,2
<b>PE (st 1)</b>	55,4	49,8 ± 1,20	89,9 ± 2,2
<b>PE (st 2)</b>	110,8	100,2 ± 3,75	90,5 ± 3,7

Tijdens de experimenten voor de robuustheid zijn nog een aantal knelpunten aan het licht gekomen. De volgende aanpassingen en/of opmerkingen komen voort uit het robuustheidsonderzoek:

- Het piekoppervlak van de PEDP pieken in het chromatogram kan per analysereeks vrij sterk wisselen. Het oplossen van de PEDP bleek niet goed te gaan en moet daarom zeer zorgvuldig gebeuren.
- Wanneer een standaard met het OPA reagens gemengd was, bleek er een neerslag te ontstaan na verloop van een paar uur. Dit deed vermoeden dat het derivaat in de oplossing niet stabiel is. Er is daarom een nieuwe autosampler in gebruik genomen welke het mengsel direct na het mengen injecteert. Door de experimenten waarbij de wachttijd voor injectie werd getest, werd bevestigd dat het derivaat niet stabiel is. Er moet 3x worden gemengd vóór injectie.
- De autosampler heeft de mogelijkheid om de sample tray te koelen (10°C) en de kolom op 30°C te houden. Wanneer de sample tray bij een lagere temperatuur dan 10°C wordt gekoeld, wordt er een neerslag gevormd in het OPA reagens.
- De houdbaarheid van de oplossingen die voor het maken van het OPA reagens en het HPLC-eluens worden gebruikt bleek zeer beperkt. Voor elke analyse moeten daarom verse oplossingen gemaakt worden.
- Het OPA reagens moet 24 uur bij kamertemperatuur rijpen voordat het wordt gebruikt.

### 3.1.2 Herhaalbaarheid (r) en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (R<sub>i</sub>)

In 2001 is de eerste serie analyses gedaan voor de prestatiekenmerken. De prestatiekenmerken bleken niet te voldoen aan de gestelde eisen van de EC (zie tabel 3.1). Na deze analyses werd naar de robuustheid van een aantal parameters gekeken (3.1.1) en werden een aantal knelpunten verholpen.

Met deze aanpassingen werd er in 2002 een nieuwe serie analyses gestart voor een het vast stellen van nieuwe kengetallen.

De resultaten van het totale fosfolipidgehalte in mg PEDP/100 g melkpoeder van de validaties in 2001 en 2002 zijn uitgezet in tabel 3.1. De gegevens van PE en PS afzonderlijk staan in bijlage 1 getabelleerd.

De prestatiekenmerken van 2002 zijn duidelijk verbeterd t.o.v. 2001. De gemiddelde RSD en VC<sub>r</sub> van MMP (resp. 3,0 % en 8,5 %) zijn groter dan de norm die opgenomen is in EG Vo 213/2001, bijlage XX

(2 % c.q. 6%). Daarentegen zien we dat de RSD/VCr voor KMP en VMP (resp. 1,8 % \ 5,0 % en 2,0% \ 5,6 %), hoewel hier geen eis aan is gesteld, wel binnen deze norm vallen. Aangezien KMP en VMP het hetzelfde type materiaal is als MMP, mag aangenomen worden dat de normen voor MMP ook voor KMP en VMP mogen gelden.

De relatieve binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (VCR<sub>i</sub>) van MMP staan niet vermeld in bijlage XX van Vo 213/2001 en van de relatieve reproduceerbaarheid (VCR) wordt aangegeven dat het een schatting is.

Tabel 3.1 *Het totaal fosfolipidengehalte. prestatiekenmerken; sr, RSD, r, VCr, sR<sub>i</sub>, R<sub>i</sub> en VCR<sub>i</sub>. Gebaseerd op 8 metingen in duplo.*

2001	totaal fosfolipidengehalte (mg PEDP/100 g)							
	gehalte	s <sub>r</sub>	RSD	r	VCr	sR <sub>i</sub>	R <sub>i</sub>	VCR <sub>i</sub>
MMP-1	59,66	12,31	20,63	34,47	57,77	19,03	53,28	89,31
MMP-2	53,13	8,14	15,32	22,80	42,90	10,98	30,75	57,88
VMP-1	98,73	7,76	7,86	21,72	22,00	17,57	49,19	49,82
VMP-2	137,32	3,40	2,48	9,53	6,94	23,06	64,58	47,03
KMP-1	493,66	55,61	11,26	155,70	31,54	106,18	297,30	60,22
KMP-2	459,86	52,29	11,37	146,41	31,84	90,57	253,61	55,15
<b>Gem.</b>			11,5		32,2			59,9
2002								
MMP-1	55,46	1,46	2,64	4,09	7,38	3,39	9,48	17,09
MMP-2	64,10	2,19	3,42	6,14	9,58	4,00	11,19	17,46
VMP-1	87,41	1,40	1,60	3,91	4,48	4,75	13,30	15,22
VMP-2	69,56	1,37	1,97	3,85	5,53	3,60	10,07	14,47
KMP-1	376,24	9,52	2,53	26,67	7,09	15,71	44,00	11,69
KMP-2	359,58	5,44	1,51	15,24	4,24	20,24	56,66	15,76
<b>Gem.</b>			2,3		6,4			15,3

### 3.1.3 Stabiliteit

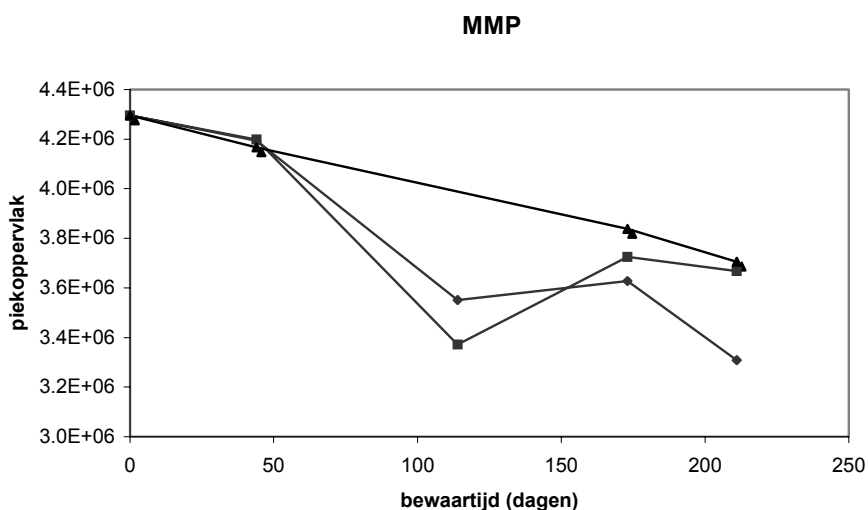
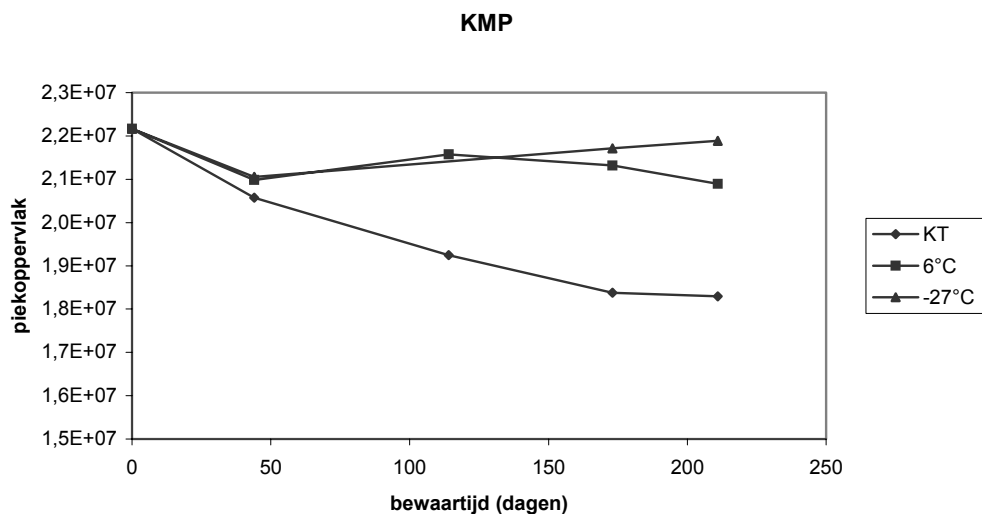
De resultaten van het stabiliteitsexperiment zijn weergegeven in grafieken 3.3 en 3.4.

Er is voor gekozen om de piekoppervlakken tegen de bewaartijd uit te zetten zodat eventuele fouten door berekening met een PEDP ijklijn uitgesloten worden.

In geval van KMP is duidelijk dat bij kamertemperatuur er een afname van het totale fosfolipidengehalte is. Bij 6°C is er een geringere afname en bij -27°C lijkt het gehalte stabiel.

In geval van MMP is het temperatuurseffect wat minder duidelijk maar lijken de fosfolipiden bij -27°C het meest stabiel te zijn.

De monsters worden bewaard met lucht in de potjes en dus ook zuurstof. Oxidatie van de fosfolipiden kan een andere oorzaak van de afname van het fosfolipiden gehalte in de tijd zijn. Hier is geen verder onderzoek naar verricht.



Grafiek 3.3 en 3.4, Piekoppervlak van totaal fosfolipiden tegen de bewaartijd in KMP en MMP

### 3.2 Normaalwaarden

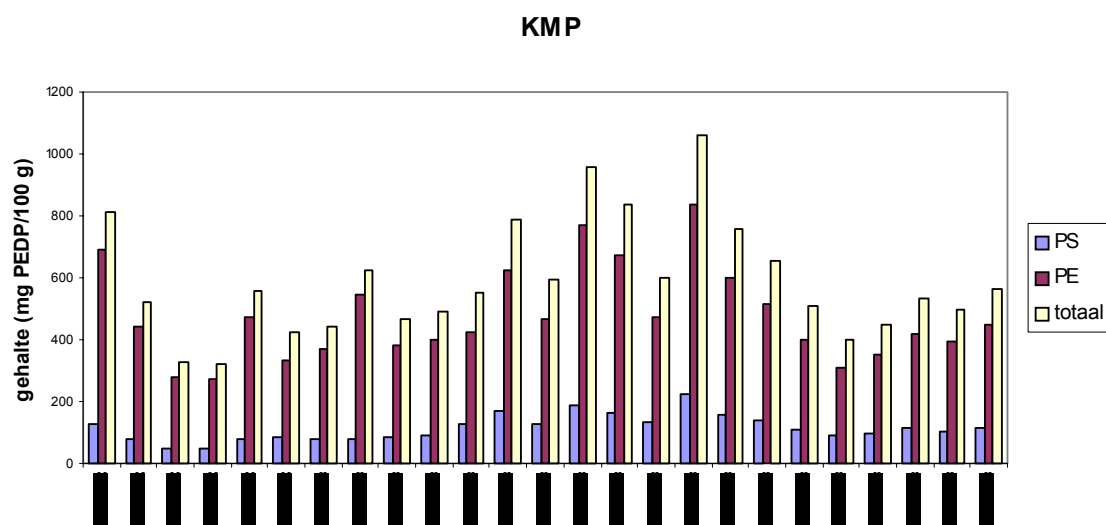
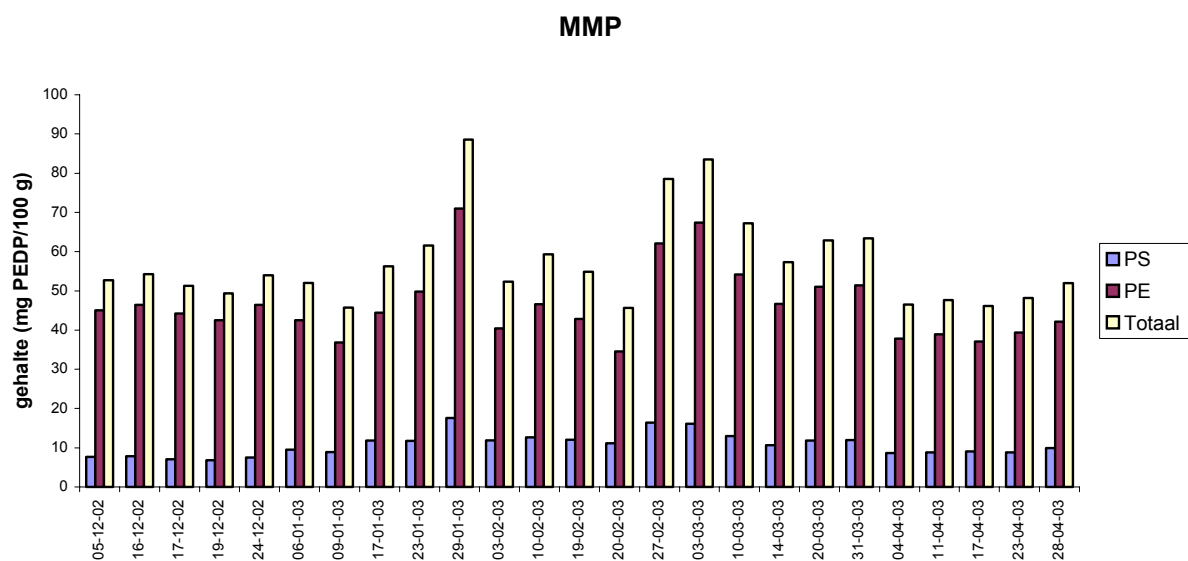
Er zijn gedurende 5 maanden, 5 willekeurige KMP en MMP monsters per maand geanalyseerd. De data staan in bijlage 3 en in grafieken 3.1 en 3.2. Het is opvallend dat er MMP monsters zijn waarbij het fosfolipidengehalte boven de gestelde norm van 69,31 mg PEDP/100 g (EG Vo 214/2001) zit. Verhoging van het gehalte kan te wijten zijn aan toevoeging van KMP aan MMP.

De resultaten van de analyses wat betreft de gemiddelde, maximum en minimum waarden voor PE, PS en het totaal fosfolipiden gehalte staan samengevat in tabel 3.6. De gehalten vallen zowel voor MMP als voor KMP significant hoger uit dan in de literatuur wordt beschreven (zie inleiding). Dat geldt zowel voor het gemiddelde als de uiterste waarden.



Tabel 3.6 Gemiddelde, maximum en minimum van de normaalwaarden analyse in mg PEDP/100 g  
 Gehalten uit de literatuur staan tussen haakjes.

KMP	PS	PE	totaal
gemiddeld	113.98	475.32	589.36 (386,1)
minimum	46.52	272.98	319.50
maximum	226.53	833.49	1060.01
MMP	PS	PE	totaal
gemiddeld	10.78	46.47	57.25 (47,6)
minimum	6.80	34.51	45.68
maximum	17.57	71.00	88.57



Grafiek 3.1 en 3.2, Fosfolipidengehalte in MMP en KMP monsters uitgezet tegen de datum van ontvangst, uitgedrukt in mg PEDP/100 g

Voor controle op binnenlaboratoriumreproduceerbaarheid werd bij elke serie analyses één MMP en/of KMP monster van de vorige serie opnieuw geanalyseerd. Resultaten staan in tabel 3.7. In de tabel staan de piekoppervlakken van de pieken en de hieruit berekende gehalten uitgezet.

Bij deze resultaten is te zien dat de berekende gehalten relatief meer van elkaar verschillen dan de piekoppervlakken. Dit wil zeggen dat berekening van gehalten met de ijklijn van PEDP een grotere spreiding veroorzaakt.

Tabel 3.7 *Piekoppervlak en fosfolipidengehalte van controlemonsters, KMP en MMP, eerste en tweede analyse*

MMP	piekoppervlak	gehalte mg PEDP/100 g	KMP	piekoppervlak	gehalte
<b>A-1</b>	3624250	46.9	<b>E-1</b>	20188571	554.9
<b>A-2</b>	4651961	58.3	<b>E-2</b>	20177308	502.8
<b>B-1</b>	7203562	88.6	<b>F-1</b>	20046457	490.1
<b>B-2</b>	6617151	92.7	<b>F-2</b>	19918053	551.4
<b>C-1</b>	6140501	78.5	<b>G-1</b>	36759813	1060.0
<b>C-2</b>	6024503	63.0	<b>G-2</b>	36802545	952.9
<b>D-1</b>	4392411	63.4	<b>H-1</b>	26525979	755.1
<b>D-2</b>	4042772	47.4	<b>H-2</b>	27253438	688.1
			<b>J-1</b>	20584739	527.8
			<b>J-2</b>	19363834	470.1

In 3.1.2, waar het onderzoek naar de robuustheid van de methode staat beschreven, werd aangetoond dat de oppervlakken van PEDP na 3x mengen kleiner zijn dan na 1x mengen. Er is toen besloten om voortaan 3x te mengen. De oorzaak van de relatief hoge gehalten van de normaalwaarden kan te wijten zijn aan de toename aan gevoeligheid van de monsters en de afname aan gevoeligheid van PEDP, na 3x mengen,

Om een beter inzicht te krijgen in de ware normaalwaarden, zijn er 11 monsters geanalyseerd die onder EG verordening 1255/1999, artikel 7 vallen (interventiemonsters) en die moeten voldoen aan de eis van maximaal 69,31 mg PEDP/100g MMP (EG Vo 214/2001). De resultaten hiervan staan in tabel 3.8. Het gemiddelde gehalte van deze monsters is duidelijk hoger dan in de publicatie van Resmini wordt genoemd (Resmini et al 1988).

Tabel 3.8 Fosfolipiden gehalte van 11 MMP monsters in mg PEDP/100g MMP

<b>RIKILT nr</b>	<b>PS mg/100g</b>	<b>PE mg/100g</b>	<b>totaal</b>
<b>A</b>	8.19	49.68	57.87
<b>B</b>	8.43	53.74	62.17
<b>C</b>	9.04	54.65	63.69
<b>D</b>	8.57	50.48	59.05
<b>E</b>	9.06	49.64	58.70
<b>F</b>	8.94	49.23	58.17
<b>G</b>	9.34	51.35	60.69
<b>H</b>	8.80	54.05	62.86
<b>I</b>	8.27	49.15	57.42
<b>J</b>	7.24	33.04	40.28
<b>K</b>	8.51	48.60	57.11
<b>gem</b>			58.00

## 4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

In dit rapport is verslag gemaakt van onderzoek naar knelpunten van de analyse van fosfolipiden volgens bijlage XX van EG verordening Nr. 213/2001. Verder is er een initiële validatie uitgevoerd, zoals beschreven in het validatiedossier van RSV A0613.

De belangrijkste verandering in de methode is pre-column derivatisatie i.p.v. on-column derivatisatie.

### 4.1 Prestatiekenmerken

#### 4.1.1 Robuustheid

Uit het onderzoek naar de knelpunten van de methode komen de volgende conclusies:

- Het derivaat van fosfolipide -OPA is duidelijk niet stabiel, het valt uit elkaar na verloop van tijd.
- Het mengen van het monster met het OPA-reagens blijkt cruciaal te zijn in de analyse. Aangezien niet mengen geen optie is en 1x mengen als nadeel heeft dat de piekoppervlakken van de fosfolipiden in het monster kleiner zijn, is 3x mengen het optimum.
- Het PEDP-OPA derivaat is minder stabiel dan de PE-OPA en PS-OPA derivaten.
- De rijpheid van het OPA reagens blijkt van invloed op de analyse, reagens dat 24 uur heeft gestaan bij kamertemperatuur werkt beter.
- PEDP is zeer slecht oplosbaar.
- Oplossingen die gebruikt worden voor OPA reagens en eluens zijn niet houdbaar.
- Berekende fosfolipidengehalten hebben een grotere afwijking dan de gemeten piekoppervlakken.

Aanpassingen van de methode t.a.v. de knelpunten

- Het OPA-reagens moet 24 uur bij kamertemperatuur staan voor gebruik.
- PEDP zeer zorgvuldig oplossen.
- Autosampler koelen op 10°C.
- Het monster met het OPA reagens 3x in de autosampler mengen vóór injectie.
- Na mengen het monster direct op de kolom brengen.
- Bij elke analyse verse oplossingen gebruiken.

Het verhelpen en aanpassen van de knelpunten in de methode resulteerde in een verbetering van de RSD en VCr. Voordat de knelpunten waren aangepakt bleek de gemiddelde RSD en VCr van MMP, KMP en VMP; resp. 11,5 % en 32,2 %. Nu zijn deze resp. 2,3 en 6,4 %

De recovery van PEDP in de matrix is ~90 % en voor alle niveaus gelijk.

#### 4.1.2 Herhaalbaarheid en (binnenlaboratorium)reproduceerbaarheid

De relatieve standaard deviatie (RSD = 3,0) en herhaalbaarheid (VCr = 8,5) van MMP in de initiële validatie voldoen nog steeds niet aan de eisen die in het EEG voorschrift vermeld staan, hoewel ze een stuk verbeterd zijn. Daarentegen voldoen de RSD en de VCr van KMP en VMP wel aan deze eis; RSD / VCr resp. 1,8 / 5,0 en 2,0 / 5,5. Reden voor de afwijking voor MMP is niet duidelijk. Uit analyse van meer MMP monsters en voortgaande validatie zal duidelijk moeten worden of dit incidenteel is of dat de afwijking structureel is.

Om gegevens te verkrijgen over de reproduceerbaarheid en juistheid is het aan te bevelen aan ringonderzoekers deel te nemen voor zover deze georganiseerd worden.

#### 4.1.3 Stabiliteit

De stabiliteit van de fosfolipiden in de monsters is het grootste bij  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , maar vooral in het MMP monster is er toch achteruitgang vast te stellen.

## 4.2 Normaalwaarden

Uit het normaalwaarden onderzoek blijkt dat 4 MMP monsters fosfolipidgehalten hebben boven de gestelde norm. De onderzochte monsters blijken echter te vallen onder EEG verordening nr. 2799/99 waarbij KMP gelijk wordt gesteld aan MMP. De norm van 69.31 mg PEDP /100g melkpoeder geldt voor deze monsters dus niet.

Van de MMP monsters die wel onder de interventieregeling van Vo 1255/1999 vallen, is het gemiddelde fosfolipidgehalte duidelijk hoger dan de waarden uit de literatuur. Er zijn geen normaalwaarden bekend van MMP en KMP monsters uit eerdere metingen. Het is dan ook niet duidelijk of de oorzaak van deze verhoogde waarden in de methode of in de monsters gezocht moet worden. Er zal meer onderzoek naar de normaalwaarden gedaan moeten worden.

## 4.3 Aanbevelingen

- Gezien de nadelen van PEDP, zou deze vervangen moeten worden door een fosfolipide die commercieel verkrijgbaar is en dezelfde eigenschappen heeft t.a.v. de derivatisering als de fosfolipiden die in de melk zitten.
- De analyse van fosfolipiden is zeer geschikt om uitsluitel te geven of een KMP monster een mengsel van MMP en VMP is. Bij verdachte monsters kan deze methode gebruikt worden.
- Het is belangrijk om normaalwaarden vast te stellen van monsters waar zeker van is dat het zuivere MMP en/of KMP monsters zijn. Dit kan bereikt worden door o.a. monsters uit het reguliere monsteraanbod, die onder de interventieregeling van Vo 1255/1999 vallen, te analyseren.
- De methode welke wordt beschreven in bijlage XX van EG verordening Nr. 213/2001 is een referentiemethode. Gezien de vele knelpunten van methode is het te overwegen om, in geval van een groot monsteraanbod, een routinemethode te ontwikkelen die eenvoudiger en robuuster is. Methoden die hiervoor in aanmerking komen zijn:
  - o  $^{31}\text{P}$ -NMR (Murgia et al. 2003)
  - o MALDI-TOF (Schiller et al. 2004)
  - o TLC (Helmerich et al. 2003)
- Het zou goed zijn de aanpassingen van de methode door te voeren in de methode die door de EU wordt voorgeschreven.
- Monsters die langer dan 1 maand bewaard moeten worden, moeten bij  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  opgeslagen worden. Andere bewaarcondities zoals het uitsluiten van zuurstof, door monsters onder stikstof te bewaren, zouden getest moeten worden.

## 5 LITERATUUR

Helmerich, G. and Hoehler, P., Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers., **J. Agric. Food Chem.** 2003, *vol. 51*, p. 6645-6651

Murgia S., Mele S., Monduzzi M., Quantitative characterization of phospholipids in milk fat via <sup>31</sup>P NMR using a monophasic solvent mixture., **Lipids**, 2003, *vol. 38*, p. 585-91.

Resmini P., Pelligrino L., Hogenboom J. A., Sadini V., Rampilli M., Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids., **Scienza e tecnica lattiero-casearia**, 1988, *vol 39 (6)*, p. 395-412

Schiller et al., Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research., **Progress in Lipid Research**, 2004, *vol. 43*, p. 449-488

Schoenmakers P., Katz S.E.,Katz E., Eksteen R., **Handbook of HPLC**, 1998, *ISBN 0824794443*, p. 715

Simons S.S., Johnson D.F., Reaction of o-phthaldialdehyde and thiols with primary amines: fluorescentie properties of 1-alkyl (and acryl) thio-2-alkyl-isoindoles. **Anal. Biochem.**, 1978, *vol. 90.*, p. 705.

Walstra P., van Boekel M.A.J.S., Melkkunde Een inleiding in samenstelling, structuur en eigenschappen van melk, collegedictaat 1991.

## BIJLAGE 1 Prestatiekenmerken

*PE gehalte. prestatiekenmerken; sr, r, VCr, sRI, RI en VCRI.*

fosfatidylethanolamine (mg PEDP/100 g)								
2001	gem.	sr	RSD	r	VCr	sRI	RI	VCRI
MMP-1	48,29	12,03	24,90	33,67	24,9	17,02	47,66	98,69
MMP-2	42,86	6,56	15,31	18,38	15,3	7,52	21,05	49,11
VMP-1	80,25	5,25	6,54	14,70	6,5	9,32	26,11	32,53
VMP-2	113,11	3,23	2,85	9,04	2,9	13,74	38,48	34,02
KMP-1	413,67	47,67	11,04	133,48	11,5	37,20	104,15	24,13
KMP-2	401,39	64,57	16,09	180,79	16,1	83,25	233,11	58,08
<b>2002</b>								
MMP-1	43,65	1,11	2,53	3,10	7,09	3,25	9,11	20,87
MMP-2	49,32	1,88	3,81	5,26	10,66	3,46	9,70	19,67
VMP-1	65,32	0,98	1,49	2,73	4,18	3,12	8,74	13,37
VMP-2	52,98	1,07	2,01	2,99	5,64	2,95	8,26	15,59
KMP-1	280,99	6,48	2,31	18,15	6,46	10,87	30,44	10,83
KMP-2	275,77	4,39	1,59	12,30	4,46	13,79	38,61	14,00

*PS gehalte. prestatiekenmerken; sr, r, VCr, sRI, RI en VCRI*

fosfatidylserine (mg PEDP/100 g)								
2001	gem.	sr	RSD	r	VCr	sRI	RI	VCRI
MMP-1	14,93	0,99	6,67	2,79	6,6	4,24	11,87	79,53
MMP-2	13,76	2,26	16,41	6,32	16,4	3,03	8,47	61,59
VMP-1	24,64	2,66	10,80	7,45	10,8	3,86	10,74	43,58
VMP-2	33,12	1,09	3,30	3,06	3,3	5,41	15,16	45,76
KMP-1	145,31	22,03	15,16	61,69	15,2	24,33	68,12	46,88
KMP-2	125,36	8,70	6,95	24,86	6,9	12,85	35,97	28,69
<b>2002</b>								
MMP-1	11,03	0,66	6,00	1,85	16,81	1,72	4,81	43,65
MMP-2	13,31	1,05	7,89	2,94	22,10	2,45	6,87	51,57
VMP-1	19,98	0,93	4,63	2,59	12,97	2,77	7,75	38,80
VMP-2	14,68	0,58	3,94	1,62	11,02	2,02	5,65	38,49
KMP-1	88,50	3,93	4,44	11,00	12,43	9,86	27,62	31,21
KMP-2	84,34	2,84	3,36	7,94	9,42	11,52	32,27	38,26

## BIJLAGE 2 De invloed van mengen op fosfolipiden gehalten

Eerste analyseserie

tryptamine	gem.	sr	RSD
<b>st 1</b>			
niet gemengd	4086740	168047	4,1
1x gemengd	4164486	162355	3,9
3x gemengd	3028506	236566	7,8
<b>st 2</b>			
niet gemengd	3827033	34973	0,9
1x gemengd	4164486	92269	2,2
3x gemengd	3010208	169766	5,6
<b>KMP</b>			
niet gemengd	4119926	76363	1,9
1x gemengd	2989566	91140	3,0
3x gemengd	3334282	129921	3,9

*De invloed van het mengen op PE en PS in KMP*

	PE			PS		
	gem.	sr	RSD	gem.	sr	RSD
<b>area</b>						
niet gemengd	10902873	235500	2,2	3326381	39305	1,2
1x gemengd	6577072	245874	3,7	2321018	71168	3,1
3x gemengd	8680164	483243	5,6	3111297	144553	4,6
<b>PE/tryptamine</b>						
niet gemengd	2,646	0,037	1,4	0,808	0,011	1,5
1x gemengd	2,200	0,039	1,8	0,776	0,010	1,2
3x gemengd	2,602	0,051	1,9	0,933	0,009	1,0

*De invloed van het mengen op PEDP*

	area			PEDP/tryptamine		
	gem.	sr	RSD	gem.	sr	RSD
<b>st 1</b>						
niet gemengd	2933984	36635	1,2	0,719	0,036	5,0
1x gemengd	3371868	108117	3,2	0,810	0,009	1,1
3x gemengd	2147070	271122	12,6	0,707	0,034	4,8
<b>st 2</b>						
niet gemengd	5875205	117014	2,0	1,533	0,021	1,4
1x gemengd	6983753	220533	3,2	1,651	0,024	1,5
3x gemengd	4362119	420574	9,6	1,446	0,060	4,1



Tweede analyseserie

*De invloed van het mengen op tryptamine*

	<b>gem.</b>	<b>sr</b>	<b>VC</b>
<b>st 1</b>			
niet gemengd	2968053	76447	2,6
1x gemengd	3501619	65643	1,9
3x gemengd	2481728	132439	5,3
<b>KMP</b>			
niet gemengd	3228102	83783	2,6
1x gemengd	2188883	105035	4,8
3x gemengd	2893576	153979	5,3

*De invloed van het mengen op PE en PS in KMP*

	<b>PE</b>			<b>PS</b>		
	<b>gem.</b>	<b>sr</b>	<b>RSD</b>	<b>gem.</b>	<b>sr</b>	<b>RSD</b>
<b>area</b>						
niet gemengd	10943493	325222	3,0	2816263	103662	3,7
1x gemengd	6284007	339552	5,4	2138600	68550	3,2
3x gemengd	8436727	534337	6,3	3039695	191429	6,3
<b>PE/tryptamine</b>						
niet gemengd	3,390	0,030	0,9	0,872	0,022	2,5
1x gemengd	2,870	0,032	1,1	0,978	0,024	2,5
3x gemengd	2,914	0,046	1,6	1,050	0,017	1,7

<b>PEDP</b>	<b>area</b>			<b>PEDP/tryptamine</b>		
	<b>gem.</b>	<b>sr</b>	<b>RSD</b>	<b>gem.</b>	<b>sr</b>	<b>RSD</b>
niet gemengd	3127423	82509	2,6	1,052	0,016	1,5
1x gemengd	3456099	72143	2,1	0,987	0,007	0,7
3x gemengd	2239258	119017	5,3	0,902	0,013	1,4

**BIJLAGE 3 Het fosfolipidengehalte, vetgehalte en eiwitgehalte van de monsters melkpoeder voor normaalwaarden**

Normaalwaarden KMP

KMP

monster nr	datum	fosfolipidengehalte (mg PEDP/100 G)			vetgehalte (%)	eiwitgehalte (%)
		PS	PE	totaal		
80348	05-12-02	126.01	688.32	814.33	6.5	33.2
81416	18-12-02	77.15	445.13	522.28	7.3	34.1
81523	19-12-02	50.49	279.74	330.23	9.6	32.6
81524	19-12-02	46.52	272.98	319.50	6.2	35
81867	30-12-02	81.12	473.74	554.87	8	33.6
81913	31-12-02	87.61	333.74	421.35	6.1	34.2
82055	06-01-03	75.85	366.72	442.56	7.6	34
82213	08-01-03	78.21	546.95	625.16	6.3	33.4
83419	17-01-03	87.64	381.93	469.57	6.4	33.6
83813	23-01-03	89.13	400.97	490.10	6.9	33.7
84818	03/02/03	126.64	424.99	551.62	7.2	33.7
84862	04-02-03	166.97	622.91	789.88	8.8	33
85590	07-02-03	128.79	465.80	594.59	7.9	33.7
85639	10-02-03	186.28	771.02	957.29	8	33
86760	19-02-03	163.53	673.34	836.87	7.6	33.3
87352	27-02-03	131.68	470.38	602.06	8.1	33.2
87868	06-03-03	226.53	833.49	1060.01	6.6	33.1
88133	12-03-03	154.96	600.15	755.10	7.1	33.3
90154	24-03-03	138.40	514.67	653.07	9.5	32.1
90527	31-03-03	110.39	398.58	510.46	6	33.6
90778	03-04-03	88.55	308.55	397.09	6.1	32.8
91344	11-04-03	94.13	351.56	445.69	6	33.3
91471	14-04-03	113.56	417.76	531.32	6.2	33.4
91704	17-04-03	101.89	393.22	495.10	6.3	34
92219	23-04-03	117.50	446.39	563.89	6.9	32.2
	<b>gemiddeld</b>	113.98	475.32	589.36		
	<b>min</b>	46.52	272.98	319.50		
	<b>max</b>	226.53	833.49	1060.01		

## MMP

monster nr	datum	fosfolipidengehalte (mg PEDP/100 G)			vetgehalte (%)	eiwitgehalte (%)
		PS	PE	Totaal		
80350	05-12-02	7.69	45.07	52.76	0.8	37.5
81081	16-12-02	7.87	46.42	54.29	0.7	35.4
81189	17-12-02	7.03	44.21	51.24	0.6	35.5
81518	19-12-02	6.80	42.55	49.34	0.7	36.7
81791	24-12-02	7.52	46.44	53.96	0.6	36.7
82041	06-01-03	9.51	42.52	52.02	0.7	36.8
82309	09-01-03	8.87	36.86	45.73	0.6	37.5
83421	17-01-03	11.85	44.43	56.27	0.7	36.8
83807	23-01-03	11.73	49.80	61.52	0.7	37.2
84449	29-01-03	17.57	71.00	88.57	0.9	37.3
84814	03-02-03	11.91	40.43	52.34	0.6	36.9
85639	10-02-03	12.68	46.62	59.30	0.6	36
86762	19-02-03	12.02	42.86	54.88	0.6	36.6
86851	20-02-03	11.17	34.51	45.68	0.7	37.9
87351	27-02-03	16.41	62.08	78.49	0.8	36.8
87565	03-03-03	16.12	67.42	83.54	0.8	36.3
88007	10-03-03	13.00	54.21	67.20	0.6	37
88360	14-03-03	10.70	46.65	57.35	0.9	36.1
89244	20-03-03	11.79	51.07	62.87	0.9	36.4
90534	31-03-03	11.96	51.43	63.38	0.7	36.5
90828	04-04-03	8.70	37.83	46.52	0.6	36.5
91343	11-04-03	8.79	38.90	47.69	0.6	35.9
91703	17-04-03	9.07	37.04	46.11	0.7	37.4
92284	23-04-03	8.86	39.38	48.23	0.6	36.2
92661	28-04-03	9.87	42.11	51.98	0.7	36.3
	<b>gemiddeld</b>	10.78	46.47	57.25		
	<b>min</b>	6.80	34.51	45.68		
	<b>max</b>	17.57	71.00	88.57		

**BIJLAGE 4 Data stabiliteitsexperiment**

Resultaten van het stabiliteitsexperiment

<b>PE</b> <b>bewaartijd</b> <b>(dagen)</b>	<b>MMP</b>			<b>KMP</b>		
	<b>KT</b>	<b>6°C</b>	<b>-27°C</b>	<b>KT</b>	<b>6°C</b>	<b>-27°C</b>
<b>0</b>	3385793	3385793	3385793	17301152	17301152	17301152
<b>44</b>	3172017	3204506	3168551	15662818	16137813	16330893
<b>114</b>	2881677	2630782	2852305	14632306	16636488	15823113
<b>173</b>	2773537	2827579	2859391	13911595	16359030	16976593
<b>211</b>	2425862	2790514	2798305	13550330	16151477	16935645
<b>PS</b>						
<b>0</b>	910168.1	910168.1	910168.1	4862197	4862197	4295961
<b>44</b>	1022025	993946.3	997784.7	4914265	4848332	4166336
<b>114</b>	669503	740704.7		4612475	4940861	
<b>173</b>	854555	897041.3	978521.3	4467474	4961377	3837912
<b>211</b>	882796	877337.3	906845.7	4741624	4741368	3705151
<b>totaal</b>						
<b>0</b>	4295961	4295961	4862197	22163349	22163349	22163349
<b>44</b>	4194042	4198452	4722532	20577084	20986145	21053424
<b>114</b>	3551180	3371486		19244781	21577349	
<b>173</b>	3628092	3724621	4737282	18379069	21320407	21713875
<b>211</b>	3308658	3667852	4952619	18291955	20892845	21888264