

Projectnr.: 71.314.01

Operationeel maken van methoden ten behoeve van Wettelijke en Dienstverlenende Taken.

Projectleider: N.J.G. Broex

Rapport 2001.012

Mei 2001

IMPLEMENTATIE VAN DE DUMASMETHODE ALS SCREENINGSMETHODE VOOR HET EIWITGEHALTE VAN MELKPRODUCTEN

E.A.M. Boers, M.A.H. Baltussen

Afdeling: Kwaliteitsbewaking, cluster Samenstellingsonderzoek (KB so)

Medewerkers: S.E. Brouwer, A. de Koning, A.H. Koot, M. Rozijn

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717
E-Mail: postkamer@rikilt.wag-ur.nl

Copyright 2001, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

Directeur

Programmaleiders

Projectleiders: N.J.G. Broex, J.F. Labriijn, J. de Jong, J.J.M. Driessen

Auteur(s) en medewerkers

Cluster Samenstellingsonderzoek

Afdeling PRMC

Bibliotheek (3x)

EXTERN:

Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (Dr. D. van Zaane).

AID (lr. A.W.A. Erkens, W. Nooy)

LNV - DWK (lr. J.A. Cornelese)

LNV - Directie Industrie en Handel (Mr. J.R. Gatsonides)

LNV - Directie Internationale Zaken (lr. M.Y. Brouwer)

INHOUD	blz.
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL	6
3 METHODEN	7
3.1 Principe Kjeldahl	7
3.2 Principe Dumas	7
3.3 Calibratie	8
3.4 Procedure	8
4 RESULTATEN	9
4.1 Lineariteit	10
4.2 Caseïne en caseïnaat	10
4.3 Magere melkpoeder	12
4.4 Volle melkpoeder	13
5 CONCLUSIES	14
6 LITERATUUR	16
BIJLAGEN	
A Schematisch overzicht LECO FP2000	
B Resultaten gehalte eiwit in caseïne / caseïnaat t.b.v. herhaalbaarheid (r) en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (R_L)	
C Resultaten caseïne / caseïnaat Dumas versus Kjeldahl	
D Resultaten gehalte eiwit in magere melkpoeder t.b.v. herhaalbaarheid (r) en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (R_L)	
E Resultaten magere melkpoeder Dumas versus Kjeldahl	
F Resultaten volle melkpoeder Dumas versus Kjeldahl	

SAMENVATTING

Het eiwitonderzoek dat door het RIKILT wordt uitgevoerd vindt plaats in grondstoffen en eindproducten van diervoeders en levensmiddelen die moeten voldoen aan, in EG verordeningen, vastgelegde eisen. Zowel een minimaal eiwitgehalte als analysemethode (referentie, Kjeldahl) staan hierin beschreven. Onderzocht is of de stikstofanalyser van LECO, de FP-2000 ingezet kan worden als screeningsmethode voor het bepalen van het eiwitgehalte in genoemde producten. Productspecifieke verbrandingscondities werden bepaald en vastgelegd in één 'methode'. In het toegepaste meetbereik van 15 tot 50 mg stikstof bleek lineair gemeten te kunnen worden. Toegepast als screeningsmethode zijn nieuwe beslissinggrenzen vastgesteld: een ondergrens voor het eiwitgehalte bepaald met de methode Dumas waarbij wordt overgegaan tot bevestiging met de referentiemethode. Slechts 5 van de 50 vergeleken monsters caseïneproduct moesten bevestigd worden met de Kjeldahlmethode. In alle overige gevallen kon een eiwitresultaat gerapporteerd worden dat met 99% zekerheid groter is dan het minimale eiwitgehalte van 88,00% als beschreven in de EG verordening.

Voor magere melkpoeder werd op gelijke wijze een beslissinggrens vastgesteld. Echter de eisen voor het eiwitgehalte die gesteld zijn aan dit product gelden in de 'vetvrije droge stof'. Hier zullen eerst een vocht- en vetgehalte bekend moeten zijn voordat een uitspraak gedaan kan worden of er overgegaan moet worden tot bevestiging van het resultaat.

Prestatiekenmerken als herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid werden vastgesteld voor zowel magere melkpoeder als caseïnaatproducten. Voor magere melkpoeder werd, met $r = 0,02\%$ stikstof, ruim voldaan aan de gestelde criteria ($0,05\%$ in draft ISO/DIS 14891). De herhaalbaarheid voor de caseïnaatproducten bleef hierbij iets achter ($0,050\%$ tegen $0,031\%$ vereist). Oorzaak hiervoor is het feit dat de analyses werden uitgevoerd op mengmonsters van verschillende caseïnaatproducten en niet op één type product als natriumcaseïnaat waarvoor deze herhaalbaarheidseis is vastgesteld.

De Dumasmethode blijkt als screeningsmethode een geschikt alternatief te zijn voor het vaststellen van het eiwitgehalte van caseïnaatproducten en magere melkpoeder. Deze techniek is sneller, schoner en naar verwachting goedkoper dan de Kjeldahlmethode.

Voorwaarde is wel dat door middel van een voortgaande validatie het verschil met de referentiemethode bewaakt blijft.

1 INLEIDING

Een bepalende factor voor de economische waarde van diverse levensmiddelen en grondstoffen is het gehalte aan ruw eiwit. Dit eiwitgehalte wordt bepaald volgens de Kjeldahlmethode.

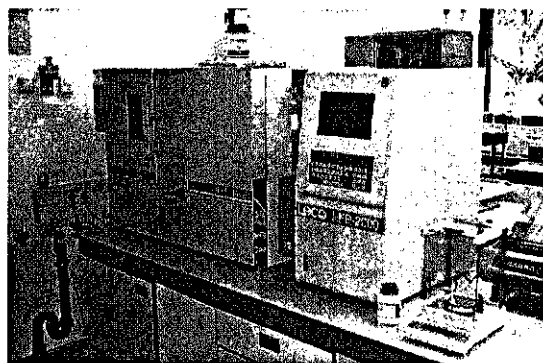
Met deze analysemethode wordt het gehalte aan stikstof bepaald waarmee, na vermenigvuldiging met een stikstof - eiwit factor, het gehalte aan ruw eiwit berekend wordt.

Een verkregen resultaat volgens Kjeldahl geldt tot op heden nog steeds als de referentiewaarde indien het gaat om het vaststellen van het eiwitgehalte van levensmiddelen en grondstoffen.

Deze analysemethode is echter arbeidsintensief en is door een groot verbruik aan chemicaliën belastend voor het milieu.

Een alternatief voor deze methode is die volgens het principe van Dumas. Deze analysetechniek is schoner, sneller en zal naar verwachting op termijn goedkoper worden gezien de stijgende kosten voor de verwerking van chemisch afval. In 1998 is bij het RIKILT onderzoek gedaan naar de mogelijkheden of de Dumastechniek een geschikt alternatief zou zijn voor de Kjeldahl methode. Dit onderzoek heeft geleid tot een RIKILT rapport [98.012] en heeft mede bijgedragen aan het besluit bij het RIKILT om een stikstofanalyse apparaat volgens het Dumas-principe aan te schaffen. In de in juli 1999 verschenen (draft) International Standard ISO / DIS 14891 is een stikstofanalyse volgens Dumas beschreven. Hiermee werd duidelijk dat deze techniek ook internationaal geaccepteerd is en toepasbaar voor melk en melkproducten.

Onderzocht is of de Dumasmethode toegepast kan worden als screeningsmethode waarbij de in gebruik zijnde apparatuur voor de Kjeldahlanalyse ontlast kan worden. Het eiwitonderzoek bestaat voornamelijk uit monsters grondstoffen en eindproducten van diervoeders en levensmiddelen. Deze producten worden ingezonden door met name de Algemene Inspectie Dienst (AID) en moeten voldoen aan, in EU-verordeningen vastgelegde, eisen voor het eiwitgehalte. In deze verordeningen wordt ook verwezen naar methoden van onderzoek. Voor het ruweiwitgehalte gaat het hierbij om referentie (Kjeldahl) methoden.



In de periode van 1998 tot medio 1999 bestond het monsteraanbod voor de eiwitanalyses voornamelijk uit caseïne/caseïnaat-, kunstmelkvoeder-, magere melkpoeder- en gras/lucernemeel-

monsters. Besloten werd om het onderzoek te starten voor caseïne/caseïnaat en magere melkpoeder. Er is een volle melkpoeder gebruikt als intern kwaliteitscontrolemonster. Voor caseïnaat en magere melkpoeder gelden, in EU verordeningen, vastgelegde minimale eisen waaraan het eiwitgehalte moet voldoen.

In EG verordening nr. 2921/90 en nr. 2799/1999 staan de kwaliteitseisen beschreven voor respectievelijk caseïnaatproducten en magere melkpoeder. Voor wat betreft het eiwitgehalte is dit een ondergrens van 88,00% voor caseïnaatproducten en voor magere melkpoeder is dit 31,4% in de vetvrije droge stof.

Aangezien de Dumasmethode 1-3% hogere stikstofresultaten levert dan de Kjeldahlmethode (Ellen en Mahulette, 1997), dient onderzoek plaats te vinden naar de juiste beslisgrens voor ieder product.

Een minimale eiwitwaarde, verkregen volgens Dumas, moet worden vastgesteld zodat bij overschrijding van deze waarde het analyseresultaat met de Kjeldahl (referentie) methode bevestigd moet worden. Zodoende zullen resultaten gerapporteerd worden die met voldoende zekerheid voldoen aan de gestelde (Kjeldahl) normen.

Voor de Dumasmethode werden voor beide producten relevante prestatiekenmerken (herhaalbaarheid en de binnenlaboratorium reproduceerbaarheid) bepaald. Ook werd, per product, gekeken naar een verschil (bias) in resultaat tussen de Dumas- en de Kjeldahlmethode. Op basis van deze gegevens kan per product de eerder genoemde 'beslisgrens' worden vastgesteld.

2 MATERIAAL

Het monstermateriaal werd voor beide producten betrokken uit het reguliere monsteraanbod. Voor de magere melkpoeders werden hiervoor willekeurige monsters uit het aanbod genomen. De monsters caseïne en caseïnaat waren, voor het merendeel, mengmonsters van verschillende caseïnaat-producten. Uit het aanbod van deze mengmonsters werd een zoveel mogelijk representatieve groep monsters geselecteerd.

Als standaardmateriaal voor de Dumasanalyse zijn verschillende stikstofverbindingen toepasbaar. Gekozen werd voor het natriumzout van EDTA, 2H₂O. (AnalaR, art.nr. 100933T). Gecorrigeerd voor zuiverheid bevat deze stof 7,52% stikstof.

Een intern referentiemonster caseïnaat of magere melkpoeder was bij de uitvoering van dit onderzoek nog niet beschikbaar. Daarom werd het interne QC monster volle melkpoeder (code KB00/so8) toegevoegd aan de analyseseries.

3 METHODEN

3.1 Kjeldahl

Bij de Kjeldahlmethode wordt een monsterportie onder toevoeging van zwavelzuur, kaliumsulfaat en als katalysator kopersulfaat in een destructiebuis tot circa 420 °C. verhit. Gedurende deze destructie verdwijnen alle organische materialen als CO₂ en wordt organisch gebonden stikstof omgezet in ammoniumsulfaat. Anorganische stikstofverbindingen zoals nitraat of nitriet worden maar voor een deel of in zijn geheel niet meebepaald maar verdwijnen tijdens de destructie als NO₂.

Na afkoelen wordt het mengsel verdund en basisch gemaakt en wordt de zo gevormde ammoniak door middel van stoomdestillatie overgebracht in een overmaat boorzuur. Met een zoutzuuroplossing van bekende concentratie wordt deze oplossing getitreerd tot pH = 4,6. Het verbruik aan zoutzuur is een maat voor het gehalte stikstof.

3.2 Dumas

In tegenstelling tot bij de Kjeldahlmethode wordt volgens het principe Dumas al het aanwezige stikstof bepaald: het monstermateriaal wordt, bij hoge temperatuur en onder aanwezigheid van voldoende zuurstof, volledig verbrand. De hierbij ontstane verbrandingsgassen (O₂, CO₂, N₂, NO_x, waterdamp en mogelijk ook nog SO₂ of HCl) worden door verschillende voorzieningen in het apparaat gezuiverd. Uiteindelijk bevindt zich nog uitsluitend N₂ en Helium in het gasmengsel. De aanwezigheid van stikstof in dit mengsel wordt gemeten ten opzichte van een stroom Helium in een thermische geleidbaarheids detectiecel.

Tussen de hoeveelheid N₂ en het detectorsignaal bestaat een lineair verband dat wordt verkregen door van de standaardstof (Na-EDTA) een reeks van toenemende hoeveelheden te analyseren. Uit deze resultaten wordt een ijklijn berekend waarmee het stikstofgehalte van gemeten monsters berekend wordt.

Voor de Dumasanalyse werd gebruik gemaakt van de LECO FP-2000. Voor een schematische overzicht van dit apparaat, zie bijlage A.

Vooraf werden de verbrandingscondities van het monster zodanig ingesteld dat er sprake was van volledige verbranding. Deze condities worden bepaald door de temperatuur in de verbrandingsbuis en de aanvoer van het zuurstof. Voor zowel caseïne/caseïnaatproducten,

magere- als volle melkpoedermonsters en het standaardmateriaal zijn hetzelfde verbrandingscondities geschikt gebleken.

3.3 Calibratie

Door analyse van een reeks oplopende hoeveelheden standaardstof werd een ijklijn verkregen met een bereik van ca. 10 tot 50 mg stikstof. Beschikbare software in het apparaat is in staat een lineaire-, kwadratische- of kubische calibratiecurve te berekenen.

3.4 Procedure

Dagelijks werden blanco analyses uitgevoerd tot er sprake was van een stabiel niveau. Zodra drie achtereenvolgende blanco resultaten binnen 0,005% N lagen, werden deze drie resultaten geselecteerd ten behoeve van een blancocorrectie.

Na de blancocorrectie werden een aantal analyses uitgevoerd op het standaardmateriaal tot een stabiel gehalte werd gevonden. Hierna volgden 3 analyses in enkelvoud van het standaard materiaal met oplopende inweeg overeenkomend met ca. 22 mg, 30 mg en 38 mg stikstof. Deze reeks werd geselecteerd ten behoeve van de 'driftcorrectie' om de helling van de calibratielijn te corrigeren voor mogelijk kleine variaties in het analysesysteem.

Een analyseportie werd aangepast aan het stikstofgehalte zodat per analyse ca. 30 mg stikstof in bewerking was. Voor caseïne- en caseïnaatproducten, magere melkpoeder en (interne referentie) volle melkpoeder betekent dit dat er respectievelijk ca. 200 mg, 550 mg en 700 mg van deze producten moet worden afgewogen. De analyse van de monsters werd uitgevoerd in een vaste analysevolgorde. Maximaal 10 analyses achtereen (5 monsters in duplo, inclusief referentiemonster) waarna, eveneens in duplo, een standaardmonster (NaEDTA) geanalyseerd werd.

Met dit standaardmonster werd gecontroleerd in hoeverre het systeem stabiel bleef. Eventuele drift tijdens de analyseserie werd gecorrigeerd door de resultaten van de monsters ten opzichte van de standaardresultaten vóór en na de monsters te corrigeren.

Validatie van de Dumasmethode werd uitgevoerd voor de producten caseïnes / caseïnat en magere melkpoeder volgens intern beschreven voorschriften.

Relevante prestatiekenmerken zijn juistheid, herhaalbaarheid, binnenlaboratorium reproduceerbaarheid, reproduceerbaarheid en lineariteit.

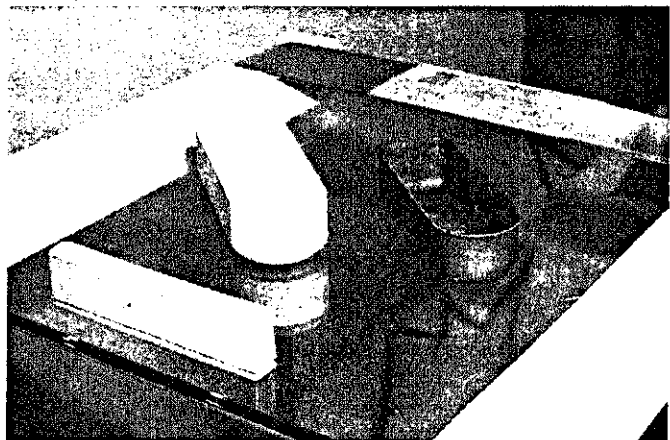
Herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid werden bepaald op basis van een initieel validatie experiment door van beide producten 8 monsters op 8 verschillende dagen in duplo te analyseren volgens bovenstaande procedure. De bias tussen beide methoden zal blijken uit resultaten van routinemonsters die gelijktijdig werden geanalyseerd met zowel de Dumas- als de Kjeldahlmethode.

Met ingang van 2001 zal deelgenomen gaan worden aan ringtesten waarmee de overige validatiegegevens (reproduceerbaarheid, juistheid) beschikbaar komen.

4 RESULTATEN

De eerste aanzet van dit onderzoek leverde onbevredigende resultaten. De herhaalbaarheid en de binnenlaboratorium reproduceerbaarheid van zowel het standaard- als het monstermateriaal waren onvoldoende. De monsters werden hierbij in, door de leverancier geadviseerde, keramische monstercups (boats) geanalyseerd.

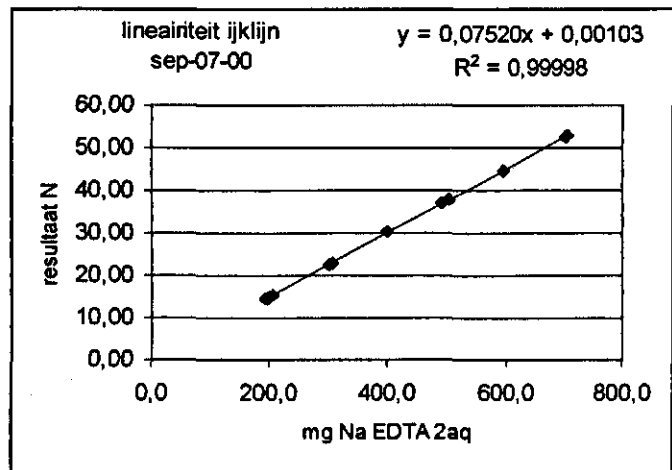
Op advies van andere gebruikers (NIZO, Ede en BLGG, Oosterbeek) is een herhaalbaarheids-onderzoek uitgevoerd in metalen monstercups. Resultaten van het NIZO werden bevestigd: Keramische schuitjes gaven een iets hogere blanco dan de metalen. Met name een grotere spreiding ($s_{\text{keram}} > 3s_{\text{metaal}}$) in de blanco-resultaten was aanleiding om de analyses ook uit te voeren in de metalen bakjes.



Met deze aanpassing werd een nieuwe ijklijn gemaakt. Analyse van 200 mg Na-EDTA in 7-voud en 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg en 700 mg in 2-voud leverden bruikbare resultaten. Twee resultaten werden uitgesloten bij de berekeningen: 1 maal 200 mg en 1 maal 400 mg. De afwijking van deze resultaten was groter dan 2 maal de standaardafwijking. Voor de resterende 15 ijkpunten werd gemiddeld 7,5205% stikstof gevonden met een standaardafwijking van 0,0148 en een variatiecoëfficiënt van 0,196%. Alle resultaten van deze lijn lagen binnen 2s.

4.1 Lineairiteit

Door het stikstofresultaat in mg uit te zetten tegen de ingewogen massa Na-EDTA.2aq werd de lineairiteit berekend. Kwadratische- of kubische regressieberekeningen leverden geen noemenswaardige meerwaarde ten opzichte van lineaire berekening waarna gekozen is voor de eenvoudigste variant.



4.2 Caseïne en caseïnaatmonsters

In bijlage B staan de resultaten weergegeven van de acht monsters caseïne / caseïnaat geanalyseerd op acht verschillende dagen volgens de methode Dumas.

Het duplo resultaat van één monster caseïnaat (16555) was op de 7^e analysedag dermate afwijkend dat deze als uitbijter buiten de berekeningen is gehouden. Deze uitbijter werd met de Grubb's test bevestigd.

De herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid staan voor de individuele monsters weer- gegeven in tabel 1.

tabel 1:
Herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid van het eiwitgehalte van caseïnaat

monster	gem	herhaalbaarheid		Binnenlaboratorium reproduceerbaarheid		VC (%)
		s _r	r	s _{RL}	R _L	
16035	91,19	0,1762	0,493	0,3608	1,010	0,19
16050	91,57	0,1427	0,399	0,2929	0,820	0,16
16062	92,41	0,1353	0,379	0,2935	0,822	0,15
16063	91,56	0,0813	0,228	0,3322	0,930	0,09
16555	88,65	0,0835	0,234	0,1035	0,290	0,09
16750	90,87	0,0813	0,228	0,2778	0,778	0,09
16761	91,73	0,0902	0,253	0,3743	1,048	0,10
16803	89,53	0,0888	0,249	0,1432	0,401	0,10
pooled		0,1151	0,32	0,2874	0,80	

Door de individuele s_r en s_{RL} te poolen kan een gemiddelde voor deze prestatie- kenmerken verkregen worden.

Opvallend is het lage eiwitgehalte en de lage R_L voor de monsters 16555 en 16803. Dit zijn beide 100% zuurcaseïnes.

Individuele resultaten van 50 routine monsters caseïne en caseïnaat van verschillende samenstelling, geanalyseerd volgens zowel de Dumas- als de Kjeldahlmethode, staan in bijlage C. Uit de duploverschillen van deze resultaten werd een herhaalbaarheid berekend voor zowel methode Dumas als methode Kjeldahl.

(zie tabel 2)

De herhaalbaarheid van de Dumas-methode op basis van deze 50 routinemonsters komt overeen met de r die eerder is verkregen uit de initiële validatie.

Voor de set van 50 monsters die in dit onderzoek waren betrokken was het

verschil tussen de Dumas- en de Kjeldahlmethode 0,91% met een standaardafwijking van de verschillen (s_{D-K}) van 0,1964. De verschillen gaven een 'normale' verdeling dus kunnen uit deze gegevens betrouwbaarheidsintervallen berekend worden. Voor het vaststellen van een ondergrens van het eiwitgehalte geldt een betrouwbaarheidsinterval met een éézijdige overschrijdingskans. Gekozen is voor een overschrijdingskans die kleiner of gelijk is aan 1%. In dit geval zullen 99% van de Dumas eiwitresultaten groter dan 89,4% voldoen aan de gestelde Kjeldahlnorm van 88,00%. Met als gevolg dat Dumas eiwitresultaten kleiner dan 89,4% bevestigd moeten worden met de referentiemethode.

tabel 2:

Overzicht resultaten eiwit, Dumas - Kjeldahl Caseïnen caseïnaat		
	Dumas	Kjeldahl
n	50	50
s_r	0,12291	0,10786
r	0,344	0,302
gemiddelde (%)	91,88	90,97
verschil Dumas - Kjeldahl	0,91	
s_{D-K}	0,1964	

4.3 Magere melkpoeder

In bijlage D staan de individuele resultaten weergegeven van de acht monsters magere melkpoeder geanalyseerd op acht verschillende dagen volgens de methode Dumas. De resultaten voor herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid staan voor de individuele monsters weergegeven in tabel 3.

Voor één monster magere melkpoeder (15981) was de duploresultaat op 6^e analysedag zo afwijkend dat deze als uitbijter buiten de berekeningen zijn gehouden. Deze uitbijter werd met de Grubb's test bevestigd.

tabel 3:
Herhaalbaarheid en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid van het eiwitgehalte van magere melkpoeder

Door middel van pooling van de resultaten zijn de gemiddelden tot stand gekomen.

monster	gem	herhaalbaarheid		binnenlaboratorium reproduceerbaarheid		VC
		s_r	r	s_{R_L}	R_L	
15981	35,26	0,0343	0,096	0,0990	0,277	0,10
16559	36,30	0,0335	0,094	0,0579	0,162	0,09
16988	37,18	0,0310	0,087	0,0830	0,232	0,08
16989	36,56	0,0427	0,120	0,0801	0,224	0,12
17048	37,03	0,0202	0,056	0,0476	0,133	0,05
17183	36,08	0,0371	0,104	0,0592	0,166	0,10
17184	36,49	0,0120	0,034	0,0702	0,197	0,03
17392	35,39	0,0190	0,053	0,0460	0,129	0,05
pooled		0,0304	0,09	0,0701	0,20	

Uit het reguliere monsteraanbod werden 47 monsters geanalyseerd met zowel de Dumas- als Kjeldahlmethode. Individuele resultaten staan weergegeven in bijlage E.

Voor twee monsters, RIKILTnr.: 8913 en 24121, werden bij de Kjeldahlmethode extreem grote verschillen tussen de duplo's gevonden (resp. 1,72% en 2,47%). Bij één duploresultaat voor de Dumas was dit het geval (RIKILTnr.: 1200, duploverschil 0,45%). Deze werden op grond van de Grubb's test buitengesloten voor de vergelijking tussen beide methoden.

Uit de duploverschillen van deze resultaten werd de herhaalbaarheid berekend voor zowel methode Dumas als methode Kjeldahl (zie tabel 4). Om deze vergelijking zuiver te houden zijn de resultaten van bovenstaande drie monsters buiten de berekening gehouden voor wat betreft de herhaalbaarheid voor de Dumas en Kjeldahl.

tabel 4:

Overzicht resultaten eiwit, Dumas - Kjeldahl Magere melkpoeder		
	Dumas	Kjeldahl
n	44	44
s_r	0,0424	0,0831
r	0,120	0,233
gemiddelde (%)	36,31	35,89
verschil Dumas - Kjeldahl	0,41	
s_{D-K}	0,1025	

De herhaalbaarheid van de Dumasmethode op basis van deze 44 overgebleven routinemonsters komt voldoende overeen met die uit de initiële validatie.

In dit vergelijkend onderzoek was het verschil tussen de Dumas- en de Kjeldahlmethode 0,41% (1,1% relatief) met een standaardafwijking van de verschillen (s_{D-K}) van 0,1025.

Uit deze resultaten werd berekend dat voor een éézijdige overschrijdingskans van kleiner dan 1% een Dumas eiwitresultaat moet worden gevonden wat 0,65% hoger is dan de 'Kjeldahl-beslisgrens' voordat tot bevestiging met de referentiemethode moet worden overgegaan.

Magere melkpoeder dat wordt aangeboden in het kader van de steunregeling als beschreven in verordening EG Nr. 2799/99 moet voldoen aan een minimaal eiwitgehalte in de vetvrije droge stof. Afhankelijk van de hoogte van het steunbedrag zal voor het eiwitgehalte minimaal 31,4% of 35,6% (in de vetvrije droge stof) gevonden moeten worden. Vóór tot screening van het eiwitgehalte in magere melkpoeder wordt overgegaan zal eerst het gehalte aan vocht en vet bepaald moeten worden.

4.4 Volle melkpoeder

Het toepasbaar maken van de Dumasmethode als screeningsmethode voor volle melkpoeder was niet de eerste opzet van dit onderzoek. Een intern QC monster volle melkpoeder werd aanvankelijk toegevoegd aan de

analyseseries om te kijken in hoeverre dit monster ook toegepast kan gaan worden als intern referentiemonster voor deze analysemethode. Bij de Kjeldahl analyses werd dit monster met regelmaat in duplo geanalyseerd. In bijlage F staan hiervan de individuele resultaten weergegeven.

In tabel 5 staan de resultaten van dit monster voor beide methoden weergegeven.

tabel 5:

Overzicht resultaten eiwit, Dumas - Kjeldahl		
Volle melkpoeder KB00/so8		
	Dumas	Kjeldahl
n	17	14
s _r	0,125	0,033
r	0,351	0,092
gemiddelde (%)	27,02	26,81
verschil Dumas - Kjeldahl	0,21	

5 CONCLUSIES

De in de literatuur vermeldde verschillen tussen beide methoden (1 - 3%, relatief) werden bevestigd. Voor zowel caseinaatproducten (+1,0%), magere- (+1,1%) als volle melkpoeder (+0,8%) werd met de methode Dumas ca. 1% relatief meer eiwit gevonden dan de referentiemethode.

Van de LECO FP-2000 kan zonder meer worden gesteld dat de stikstofmeting in het, voor dit onderzoek, toegepaste meetgebied lineair is. Met een richtingscoëfficiënt gelijk aan het gehalte

stikstof in het standaardmateriaal, een kleine bias op de y-as en een $R^2 = 0,99998$ is hier sprake van een betrouwbare ijklijn.

De vastgestelde prestatiekenmerken voor de Dumas zijn niet geheel in overeenstemming met die gesteld in de draft ISO DIS 14891. Voor natriumcaseïnaat en magere melkpoeder staan hierin herhaalbaarheids-criteria beschreven op basis van het gehalte stikstof van respectievelijk 0,031% en 0,050%. De resultaten van de magere melkpoeder voldoen hier met 0,013% ruim aan. De oorzaak dat de in deze validatie verkregen herhaalbaarheid voor caseïnaatproducten groter is (0,051%) moet gezocht worden in het feit dat deze validatie uitgevoerd werd met mengmonsters van verschillende caseïnaatproducten. De gestelde criteria zullen naar verwachting wel gehaald worden zodra een referentiemonster natriumcaseïnaat beschikbaar is.

De Dumasmethode blijkt als screeningsmethode een geschikt alternatief te zijn voor het vaststellen van het eiwitgehalte van caseïnaatproducten en magere melkpoeder. Deze techniek is sneller, schoner en naar verwachting goedkoper dan de Kjeldahlmethode.

Van de monsters caseïnaatproduct die met beide methoden werden vergeleken kon in 90% van de gevallen met voldoende zekerheid een eiwitgehalte, verkregen met de Dumasmethode, gerapporteerd worden, welke voldeed aan de referentie (Kjeldahl) norm van minimaal 88,00% eiwit. Alle 5 monsters waarvoor dit niet opging waren zuurcaseïnes (een product waarvoor geen eis gesteld is aan het eiwitgehalte).

Magere melkpoeders moeten voldoen aan een eiwitgehalte in 'de vetvrije droge stof'. Eerst zal het gehalte aan vet en vocht vastgesteld moeten worden voordat met deze methode het eiwitgehalte gescreend kan worden.

Volle melkpoeder als intern QC monster, naast caseïnaatproducten en magere melkpoeder, is te afwijkend voor wat betreft matrix samenstelling. Een referentiemonster van gelijke aard is gewenst.

Deze werkwijze zal geborgd moeten worden met de referentiemethode. Deze borging staat beschreven in een RIKILT Standaard Voorschrift (RSV A0767): met regelmaat zal naast de Dumas-analyse een aantal willekeurige monsters met de referentiemethode worden geanalyseerd. Resultaten van beide methoden worden toegevoegd aan de resultatenverzameling waaruit een

nieuwe beslisgrens wordt berekend. Op deze manier wordt de methode geborgd op basis van voortschrijdende gemiddelde verschillen en spreiding van deze verschillen.

Er zal overeenstemming moeten komen voor wat betreft de rapportage van het eiwitgehalte aan de opdrachtgever. Gedacht kan worden aan rapportage van een Dumasresultaat verminderd met het actuele verschil tussen beide methoden onder vermelding van 'naar Kjeldahl gecorrigeerd Dumasgehalte'.

6 LITERATUUR

RIKILT rapport 98.012

J.J.M. Driessen

Vergelijking van de Dumas- en de Kjeldahlmethode bij de stikstofbepaling in mengvoeders en mengvoedergrondstoffen

Ellen, G. en G.G. Mahulette

Stikstofbepaling in zuivelproducten: Dumas evenaart Kjeldahl

VMT, 1997, nr. 3, pag. 25-29.

Draft International Standard ISO/DIS 14891: Milk- and milk products - Determination of nitrogen content - Routine method using combustion according to the Dumas principle.

Verordening (EG) Nr. 2921/90 van de commissie van 10 oktober 1990:

Betreffende de steunverlening voor ondermelk die tot caseïne en caseïnaten wordt verwerkt.

Verordening (EG) Nr. 2799/99 van de commissie van 17 december 1999:

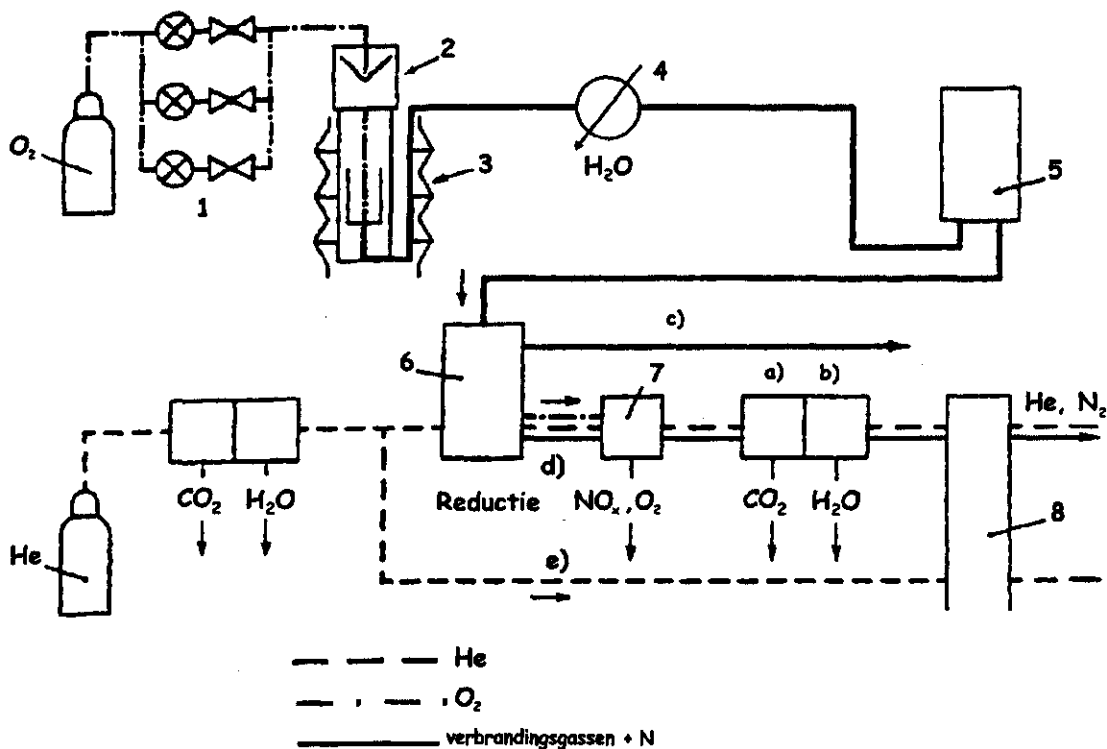
Houdende uitvoeringsbepalingen van de Verordening (EG) nr. 1255/1999 van de Raad ten aanzien van de toekenning van steun voor ondermelk en mageremelkpoeder voor voederdoeleinden en de verkoop van voornoemd mageremelkpoeder.

RIKILT Standaard Voorschrift (RSV) F0052

Uitgangspunten bij validatie en borging van analysemethoden

Bijlage A

Schematisch overzicht LECO FP2000



Verklaring:

- 1) controle zuurstofstroom.
 - 2) Verbrandingsbuis.
 - 3) Verwarmingselementen.
 - 4) Afscheiding van gecondenseerd waterdamp.
 - 5) Ballast tank.
 - 6) Injectiesysteem.
 - 7) Katalysatorkolom.
 - 8) Thermische geleidbaarheids detector (TCD).
-
- a) Natriumhydroxide op dragermateriaal.
 - b) Magnesiumperchloraat.
 - c) Afvoer verbrandingsgassen.
 - d) Monsterstroom.
 - e) Referentiestroom.

Bijlage B

Resultaten gehalte eiwit in caseïne / caseïnaat t.b.v. herhaalbaarheid (r) en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (R_i)

Monster nummer	analyse dag	RESULTAAT % EIWIT			Monster nummer	analyse dag	RESULTAAT % EIWIT		
		Dumas					Dumas		
		duplo		gem.			duplo		gem.
y1	y2	y1	y2						
16035	1	91,78	91,66	91,72	16555	1	88,59	88,85	88,72
	2	91,60	91,22	91,41		2	88,64	88,52	88,58
	3	90,92	90,92	90,92		3	88,68	88,62	88,65
	4	91,36	91,36	91,36		4	88,55	88,62	88,59
	5	91,23	91,23	91,23		5	88,81	88,81	88,81
	6	90,92	90,40	90,66		6	88,62	88,55	88,59
	7	91,30	91,23	91,27		(uitbijter) 7	89,70	88,62	89,16
	8	90,98	90,98	90,98		8	88,68	88,62	88,65
16050	1	91,97	91,91	91,94	16750	1	91,46	91,40	91,43
	2	92,11	91,67	91,89		2	90,93	90,87	90,90
	3	91,68	91,68	91,68		3	90,79	90,85	90,82
	4	91,74	91,62	91,68		4	90,79	90,98	90,88
	5	91,62	91,43	91,52		5	90,92	91,11	91,01
	6	91,30	91,04	91,17		6	90,66	90,66	90,66
	7	91,36	91,36	91,36		7	90,60	90,66	90,63
	8	91,36	91,30	91,33		8	90,66	90,53	90,60
16062	1	92,87	92,55	92,71	16761	1	92,29	92,36	92,32
	2	92,76	92,50	92,63		2	92,08	91,83	91,95
	3	92,70	92,77	92,73		3	91,81	91,87	91,84
	4	92,45	92,57	92,51		4	91,62	91,81	91,71
	5	92,38	92,19	92,29		5	91,87	92,00	91,94
	6	92,06	92,00	92,03		6	91,55	91,55	91,55
	7	92,32	92,32	92,32		7	91,23	91,30	91,27
	8	91,94	92,19	92,06		8	91,23	91,23	91,23
16063	1	92,04	92,10	92,07	16803	1	89,74	89,61	89,68
	2	91,86	91,73	91,80		2	89,60	89,73	89,66
	3	91,74	91,74	91,74		3	89,58	89,45	89,51
	4	91,81	91,62	91,71		4	89,45	89,32	89,38
	5	91,43	91,49	91,46		5	89,58	89,77	89,67
	6	91,23	91,04	91,14		6	89,58	89,51	89,54
	7	91,43	91,49	91,46		7	89,32	89,45	89,38
	8	91,11	91,17	91,14		8	89,45	89,38	89,42

Bijlage C

Resultaten caseïne / caseïnaat Dumas versus Kjeldahl

datum		Dumas		average	Kjeldahl		average	D-K
		y1	y2	D	y1	y2	K	
02-11-00	21909 cas	92,15	92,41	92,28	91,37	91,32	91,35	0,94
02-11-00	21912 cas	91,39	91,45	91,42	90,81	90,99	90,90	0,52
02-11-00	21915 cas	91,26	91,32	91,29	90,58	90,56	90,57	0,72
02-11-00	21918 cas	91,00	91,13	91,07	90,33	90,20	90,27	0,80
02-11-00	21921 cas	91,30	91,37	91,34	90,40	90,49	90,45	0,89
02-11-00	21924 cas	92,84	92,71	92,78	91,96	91,97	91,97	0,81
02-11-00	21925 cas	92,46	92,71	92,58	91,82	91,64	91,73	0,85
02-11-00	21926 cas	92,33	92,39	92,36	91,68	91,64	91,66	0,70
02-11-00	21490 cas	93,24	93,30	93,27	92,30	92,38	92,34	0,93
02-11-00	21491 cas	93,43	93,56	93,49	92,80	92,61	92,70	0,79
02-11-00	21897 cas	91,32	91,38	91,35	90,56	90,56	90,56	0,79
02-11-00	21900 cas	92,53	92,66	92,60	91,60	91,73	91,66	0,94
02-11-00	21901 cas	96,43	96,43	96,43	95,76	95,76	95,76	0,67
02-11-00	21903 cas	92,27	92,21	92,24	91,40	91,19	91,29	0,95
02-11-00	21906 cas	92,72	92,79	92,75	91,88	91,72	91,80	0,96
27-10-00	16035 cas	91,78	91,66	91,72	90,70	90,83	90,76	0,96
27-10-00	16050 cas	91,97	91,91	91,94	91,19	91,09	91,14	0,80
27-10-00	16062 cas	92,87	92,55	92,71	91,88	92,18	92,03	0,68
27-10-00	16063 cas	92,04	92,10	92,07	91,18	91,21	91,19	0,88
27-10-00	16555 cas	88,59	88,85	88,72	88,15	88,15	88,15	0,57
27-10-00	16750 cas	91,46	91,40	91,43	90,47	90,74	90,61	0,82
27-10-00	16761 cas	92,29	92,36	92,32	91,46	91,48	91,47	0,86
27-10-00	16803 cas	89,74	89,61	89,68	89,13	88,82	88,98	0,70
14-11-00	23419 cas	93,52	93,59	93,55	92,15	92,27	92,21	1,35
14-11-00	23420 cas	92,50	92,44	92,47	91,41	91,39	91,40	1,07
14-11-00	23421 cas	88,49	88,81	88,65	88,23	87,98	88,10	0,55
14-11-00	23414 cas	91,38	91,26	91,32	90,42	90,60	90,51	0,81
14-11-00	23417 cas	92,70	92,70	92,70	91,67	91,53	91,60	1,10
14-11-00	23418 cas	92,25	92,31	92,28	91,23	91,24	91,24	1,05
14-11-00	22868 cas	91,30	91,62	91,46	90,57	90,30	90,44	1,02
14-11-00	23403 cas	91,36	91,55	91,46	90,58	90,48	90,53	0,93
14-11-00	23405 cas	91,74	91,80	91,77	90,64	90,74	90,69	1,08
14-11-00	23408 cas	92,06	91,99	92,03	91,11	90,82	90,96	1,06
14-11-00	23411 cas	91,10	91,23	91,17	90,40	90,46	90,43	0,74
03-11-00	21927 cas	92,17	92,62	92,40	91,45	91,37	91,41	0,99
03-11-00	22130 cas	88,73	88,66	88,70	87,76	87,73	87,74	0,95
03-11-00	22131 cas	89,05	89,24	89,14	87,87	88,00	87,94	1,21
03-11-00	22132 cas	89,17	89,24	89,21	88,07	88,05	88,06	1,15
03-11-00	22827 cas	91,04	91,10	91,07	90,14	90,17	90,16	0,91
03-11-00	22829 cas	91,61	91,61	91,61	90,60	90,37	90,48	1,12
29-11-00	24290 cas	93,61	93,87	93,74	92,57	92,43	92,50	1,24
29-11-00	24291 cas	94,18	94,25	94,21	93,12	92,96	93,04	1,17
29-11-00	24292 cas	92,47	92,47	92,47	91,51	91,18	91,35	1,12
29-11-00	24293 cas	92,34	92,60	92,47	91,74	91,79	91,76	0,71
29-11-00	24294 cas	91,75	91,95	91,85	90,47	90,40	90,44	1,41
29-11-00	24296 cas	91,25	91,37	91,31	90,42	90,35	90,38	0,93
05-12-00	24776 cas	92,53	92,02	92,27	91,41	91,28	91,34	0,93
05-12-00	24782 cas	92,46	92,34	92,40	91,32	91,53	91,43	0,97
05-12-00	24788 cas	91,33	91,33	91,33	90,69	90,64	90,66	0,67
05-12-00	24794 cas	93,12	92,86	92,99	92,31	92,12	92,21	0,77

Bijlage D

Resultaten gehalte eiwit in magere melkpoeder t.b.v. herhaalbaarheid (r) en binnenlaboratorium reproduceerbaarheid (R_i)

Monster nummer	analyse dag	RESULTAAT % EIWIT			Monster nummer	analyse dag	RESULTAAT % EIWIT		
		Dumas					Dumas		
		duplo		gem.			duplo		gem.
y1	y2	y1	y2						
15981 (uitbijter)	1	35,38	35,39	35,39	17048	1	37,06	37,06	37,06
	2	35,33	35,32	35,32		2	37,07	37,09	37,08
	3	35,31	35,23	35,27		3	37,05	37,07	37,06
	4	35,28	35,35	35,31		4	37,03	37,07	37,05
	5	35,24	35,20	35,22		5	36,99	36,98	36,99
	6	35,14	37,97	36,56		6	36,95	36,94	36,94
	7	35,12	35,18	35,15		7	37,02	37,07	37,05
	8	35,13	35,12	35,13		8	37,00	37,02	37,01
16559	1	36,42	36,33	36,38	17183	1	36,03	36,11	36,07
	2	36,33	36,31	36,32		2	36,08	36,10	36,09
	3	36,28	36,30	36,29		3	36,19	36,09	36,14
	4	36,37	36,35	36,36		4	36,15	36,14	36,14
	5	36,27	36,21	36,24		5	36,09	36,09	36,09
	6	36,23	36,26	36,24		6	35,99	35,98	35,98
	7	36,32	36,26	36,29		7	36,03	36,09	36,06
	8	36,22	36,27	36,24		8	36,02	36,04	36,03
16988	1	37,34	37,30	37,32	17184	1	36,54	36,54	36,54
	2	37,26	37,23	37,25		2	36,53	36,51	36,52
	3	37,22	37,15	37,19		3	36,58	36,61	36,60
	4	37,22	37,19	37,20		4	36,53	36,53	36,53
	5	37,18	37,16	37,17		5	36,48	36,46	36,47
	6	37,04	37,12	37,08		6	36,40	36,40	36,40
	7	37,15	37,17	37,16		7	36,42	36,42	36,42
	8	37,09	37,07	37,08		8	36,42	36,43	36,42
16989	1	36,69	36,69	36,69	17392	1	35,40	35,40	35,40
	2	36,58	36,62	36,60		2	35,41	35,36	35,39
	3	36,59	36,56	36,58		3	35,49	35,44	35,46
	4	36,53	36,62	36,57		4	35,40	35,42	35,41
	5	36,57	36,58	36,57		5	35,39	35,41	35,40
	6	36,49	36,50	36,50		6	35,32	35,31	35,32
	7	36,58	36,45	36,51		7	35,36	35,33	35,35
	8	36,42	36,46	36,44		8	35,37	35,36	35,36

Bijlage E
Resultaten magere melkpoeder Dumas versus Kjeldahl

datum	rikilt nummer	Dumas			Kjeldahl			
		y1	y2	D	y1	y2	K	D-K
03-11-00	21944 mmp	37,48	37,53	37,51	37,02	36,99	37,01	0,50
03-11-00	22128 mmp	35,89	35,83	35,86	35,43	35,44	35,44	0,42
03-11-00	22129 mmp	33,79	33,77	33,78	33,40	33,36	33,38	0,40
14-11-00	23374 mmp	37,10	37,14	37,12	36,47	36,50	36,48	0,63
14-11-00	23375 mmp	36,79	36,90	36,85	36,50	36,41	36,46	0,39
14-11-00	23376 mmp	36,83	36,83	36,83	36,38	36,45	36,41	0,41
22-11-00	1924 mmp	38,79	38,78	38,79	38,29	38,18	38,24	0,55
22-11-00	6464 mmp	35,31	35,29	35,30	34,77	34,75	34,76	0,54
22-11-00	6465 mmp	35,84	35,88	35,86	35,43	35,41	35,42	0,44
22-11-00	8383 mmp	35,58	35,65	35,61	34,59	35,04	34,81	0,80
22-11-00	8913 mmp	35,88	35,84	35,86	33,78	35,50	34,64	1,22
22-11-00	9445 mmp	35,11	35,08	35,09	34,67	34,68	34,67	0,42
22-11-00	11105 mmp	35,08	35,08	35,08	34,64	34,62	34,63	0,45
22-11-00	13459 mmp	37,24	37,19	37,22	36,65	36,66	36,66	0,56
27-11-00	24121 mmp	36,91	36,85	36,88	36,37	33,90	35,13	1,75
27-11-00	24122 mmp	37,03	36,98	37,01	36,52	36,57	36,54	0,46
27-11-00	24123 mmp	36,74	36,68	36,71	36,30	36,24	36,27	0,44
27-11-00	24124 mmp	36,67	36,80	36,73	36,36	36,37	36,36	0,37
27-11-00	24313 mmp	37,63	37,55	37,59	37,13	37,18	37,15	0,44
29-11-00	24314 mmp	35,93	35,94	35,94	35,47	35,54	35,51	0,43
29-11-00	24406 mmp	37,29	37,21	37,25	36,81	36,86	36,83	0,42
30-11-00	24660 mmp	38,04	38,06	38,05	38,00	37,67	37,84	0,21
30-11-00	24661 mmp	38,06	38,04	38,05	37,71	37,65	37,68	0,37
30-11-00	24662 mmp	36,37	36,44	36,41	36,01	36,01	36,01	0,40
30-11-00	24663 mmp	36,20	36,09	36,14	35,86	35,84	35,85	0,30
30-11-00	24664 mmp	37,48	37,41	37,45	37,06	37,07	37,06	0,38
30-11-00	24665 mmp	37,31	37,40	37,35	37,02	37,11	37,06	0,29
30-11-00	24666 mmp	38,30	38,29	38,30	37,88	38,08	37,98	0,32
30-11-00	24667 mmp	38,27	38,28	38,27	37,78	37,80	37,79	0,49
30-11-00	24407 mmp	37,36	37,44	37,40	37,02	36,91	36,97	0,43
30-11-00	24594 mmp	34,96	34,89	34,93	34,52	34,53	34,53	0,40
19-12-00	1200 mmp	38,29	38,74	38,52	38,31	38,34	38,32	0,19
19-12-00	1203 mmp	37,80	37,80	37,80	37,37	37,53	37,45	0,35
19-12-00	3906 mmp	34,18	34,16	34,17	33,87	33,87	33,87	0,30
19-12-00	6467 mmp	32,78	32,75	32,76	32,53	32,50	32,51	0,25
19-12-00	10572 mmp	33,71	33,75	33,73	33,46	33,37	33,42	0,31
19-12-00	12956 mmp	37,09	37,02	37,06	36,63	36,93	36,78	0,28
19-12-00	13698 mmp	35,92	35,88	35,90	35,51	35,54	35,52	0,38
19-12-00	15007 mmp	36,73	36,67	36,70	36,29	36,27	36,28	0,42
19-12-00	2740 mmp	37,19	37,16	37,18	36,77	36,76	36,76	0,41
19-12-00	3479 mmp	33,97	33,93	33,95	33,60	33,58	33,59	0,36
19-12-00	5121 mmp	38,25	38,20	38,23	37,85	37,85	37,85	0,38
19-12-00	5123 mmp	37,81	37,89	37,85	37,30	37,53	37,42	0,43
19-12-00	12650 mmp	35,68	35,65	35,66	35,27	35,36	35,32	0,35
19-12-00	15218 mmp	34,95	34,82	34,89	34,47	34,46	34,46	0,42
19-12-00	15768 mmp	33,75	33,69	33,72	33,39	33,36	33,37	0,35
19-12-00	15769 mmp	33,43	33,48	33,45	32,94	32,95	32,94	0,51

Bijlage F

Resultaten volle melkpoeder Dumas versus Kjeldahl

datum	rikilt nummer	Dumas			Kjeldahl		
		y1	y2	D	y1	y2	K
22-9-2000	KB00/so8	26,96	26,77	26,87			
27-9-2000	KB00/so8	27,00	27,04	27,02			
29-9-2000	KB00/so8	27,07	27,12	27,09			
3-10-2000	KB00/so8	27,01	27,08	27,04			
4-10-2000	KB00/so8	27,10	27,08	27,09			
6-10-2000	KB00/so8				26,72	26,73	26,73
12-10-2000	KB00/so8				26,76	26,78	26,77
16-10-2000	KB00/so8	27,10	27,01	27,06			
17-10-2000	KB00/so8	27,01	26,92	26,97			
24-10-2000	KB00/so8				26,74	26,67	26,71
26-10-2000	KB00/so8				26,87	26,81	26,84
27-10-2000	KB00/so8	27,08	26,77	26,92			
30-10-2000	KB00/so8				26,87	26,78	26,82
1-11-2000	KB00/so8				26,81	26,81	26,81
2-11-2000	KB00/so8	27,06	26,81	26,94	26,89	26,85	26,87
3-11-2000	KB00/so8	27,08	27,11	27,09	26,82	26,82	26,82
6-11-2000	KB00/so8				26,82	26,78	26,80
9-11-2000	KB00/so8				26,87	26,78	26,82
14-11-2000	KB00/so8	27,29	27,07	27,18			
16-11-2000	KB00/so8				26,85	26,84	26,84
20-11-2000	KB00/so8				26,85	26,83	26,84
22-11-2000	KB00/so8	27,22	27,12	27,17	26,84	26,80	26,82
27-11-2000	KB00/so8	27,09	27,17	27,13			
29-11-2000	KB00/so8	27,03	26,95	26,99			
30-11-2000	KB00/so8	26,78	26,52	26,65			
5-12-2000	KB00/so8	27,15	26,99	27,07			
6-12-2000	KB00/so8				26,85	26,83	26,84
19-12-2000	KB00/so8	27,26	26,88	27,07			