

Projectnr.: 71.314.01

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

Projectleider: N.J.G. Broex

Rapport 2002. 008

Mei 2002

Spectrometrische bepaling van het gehalte van weiewit in melkpoeders

M.A.H. Baltussen

Afdeling: Analyse en ontwikkeling (A&O), cluster Samenstellingsonderzoek (SO)

Medewerker: A.H. Koot

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 0317-475400  
Telefax 0317-417717

Copyright 2002, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT).  
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

## VERZENDLIJST

### INTERN:

directeur

auteur(s)

BU-manager

programmaleiders (4x)

Projectleiders: N.J.G. Broex, J.F. Labriijn, Dr. J. de Jong, R. Frankhuizen.

marketing & communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

### EXTERN:

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

AID (W. Nooij)

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

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

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

LNV - Directie VVA (Drs. B.W. Ooms)

NIZO, Dr. C. Olieman

	blz.
<b>INHOUD</b>	<b>1</b>
<b>SAMENVATTING</b>	<b>3</b>
<b>1 INLEIDING</b>	<b>5</b>
1.1 Principe	5
1.2 Vooronderzoek	6
<b>2 MATERIAAL</b>	<b>7</b>
2.1 Standaarden	7
2.2 Monsters	7
<b>3 METHODEN</b>	<b>8</b>
3.1 Opwerking van standaarden en monsters	8
3.2 Meting	8
3.3 Berekeningen	8
3.4 Interne validatie	9
3.5 Ringonderzoeken	9
3.6 Bijmenging van wei aan caseïnaat en magere melkpoeder	9
<b>4 RESULTATEN</b>	<b>10</b>
4.1 Interne validatie	10
4.2 Ringonderzoeken	11
4.3 Caseïnaat	12
4.4 Magere melkpoeder	13
<b>5 CONCLUSIES</b>	<b>14</b>
<b>6 DISCUSSIE</b>	<b>15</b>
<b>LITERATUUR</b>	<b>15</b>
<b>BIJLAGEN</b>	
1 SCANSNELHEID 120 nm/min	
2 SCANSNELHEID 1200 nm/min	
3 REFERENCE MATERIAL	
4 RINGONDERZOEK SEPTEMBER 2000	
5 RINGONDERZOEK FEBRUARI 2001	

## **SAMENVATTING**

Met de spectrometrische bepaling van het de verhouding weieiwit/caseïne in melkpoeders is het mogelijk op een eenvoudige en snelle manier het weieiwit- en/of het caseïnegehalte te bepalen van een monster. Het RIKILT wil de methode gaan gebruiken voor het aantonen van mengsels van magere melkpoeder en volle melkpoeder in het kader van EEG verordening 2799/99, de controle van caseïnaten op niet-caseïne eiwitten (EEG verordening 2921/90) en de controle op de toevoeging van zure wei aan magere melkpoeder.

De methode is binnen de werkgroep voor Zuiveldeskundigen van de Europese Unie uitgewerkt door Dr. C. Olieman van het NIZO en werd binnen het RIKILT opgezet en gevalideerd voor magere melkpoeder, volle melkpoeder en karnemelkpoeder. Er is door het RIKILT aan 2 ringonderzoeken deel genomen in het kader van de validatie van deze methode binnen de werkgroep voor Zuiveldeskundigen van de Europese Unie.

De methode is geschikt om caseïnaat monsters te screenen op aanwezigheid van weieiwit. Deze is echter te ongevoelig om het weieiwitgehalte voldoende nauwkeurig te bepalen. Alle positief bevonden caseïnaat monsters met een weieiwitgehalte lager dan 10% zullen derhalve bevestigd moeten worden met een referentiemethode. Toevoeging van zure wei in magere melkpoeder is eveneens aan te tonen met deze methode. MMP monsters met een weieiwit gehalte dat hoger is dan 20% maar lager dan 24% zullen bevestigd moeten worden .

De methode blijkt geschikt voor de identificatie van karnemelkpoeder t.o.v. mengsels van volle melkpoeder en magere melkpoeder.

Vergelijkingen van de interne validatie met de ringonderzoeken wijzen uit dat de herhaalbaarheid niet significant afwijkt en dat de binnenlaboratorium reproduceerbaarheid significant hoger ligt dan de tussenlaboratorium reproduceerbaarheid.

De nauwkeurigheid van de methode hangt mede af van de berekening van de 2<sup>de</sup> afgeleide door de software. Door het gebruik van een goed software pakket wordt de berekening van de 2<sup>de</sup> afgeleide verbeterd waardoor de gevoeligheid mogelijk wordt verhoogd.

Er is een RIKILT standaard voorschrift (A-RSV A0615) voor de methode geschreven met bijbehorend validatiedossier. De methode kan ter accreditatie door de Raad van Accreditatie worden aangeboden.

## 1 INLEIDING

Het RIKILT wordt gevraagd monsters te onderzoeken op vervalsingen. Deze monsters zijn caseïnaten die verdacht worden van aanwezigheid van wei (controle van caseïnaten op niet-caseïne eiwitten EEG verordening 2921/90), karnemelkpoeders ter identificatie t.o.v. mengsels van magere melkpoeder en volle melkpoeder (EEG verordening 2799/99) en magere melkpoeders ter controle op toevoeging van zure wei die ter interventie worden aangeboden. Tijdens kaasbereiding komt GMP (glycomacropeptide) vrij door de enzymatische werking van het stremsel op de caseïne. Het GMP komt in de wei terecht en is dus aantoonbaar wanneer wei is toegevoegd aan magere melk, voordat er poeder van wordt gemaakt. Bij stremming van caseïne door zuur, komt geen GMP vrij. Bij caseïnaat speelt het verhitten van de melk een rol. Wanneer de melk die verwerkt gaat worden tot caseïnaat, te sterk verhit wordt, slaan de weieiwitten neer op de caseïne en zullen na het drogen nog steeds aanwezig zijn. Ook in dit geval zal er geen GMP aanwezig zijn in het product. Bestaande methoden om leibwei aan te tonen (EEG verordening 213/2001, bijlage XVIII en XIX) zijn gebaseerd op het aantonen van GMP en dus niet geschikt voor het aantonen van niet-caseïne eiwitten (zijnde weieiwit) in caseïnaten en het aantonen van toegevoegde zure wei aan magere melkpoeder.

Tot voor kort was er binnen het RIKILT geen snelle screeningsmethode om dit soort vervalsingen aan te tonen. De spectrometrische bepaling van het weieiwitgehalte in melkpoeders ten opzichte van het totale eiwitgehalte is een nieuwe methode binnen het RIKILT die voor het aantonen van dit soort vervalsingen geschikt kan zijn als screeningsmethode.

De methode is binnen de werkgroep voor Zuiveldeskundigen van de Europese Unie uitgewerkt door het NIZO (dr. C. Olieman) en is geschikt voor melk en melkproducten.

Binnen dit onderzoek werd aan de volgende onderwerpen gewerkt:

- Het valideren van de methode die ter accreditatie aan geboden kan worden.  
Door het RIKILT zijn magere melkpoeder (MMP), volle melkpoeder (VMP) en karnemelkpoeder (KMP) onderzocht en gevalideerd.
- Volgens EEG verordening 2921\1990 mag er niet meer dan 5% weieiwit aanwezig zijn in caseïnaat. Er is bekeken of deze methode geschikt is om caseïnaat monsters te meten op aanwezigheid van meer dan 5% wei.
- Aantoonbaarheid van bijmenging van zure wei in magere melkpoeder.

### 1.1 Principe

Weieiwitten zijn relatief kleine eiwitten zoals  $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline, serumalbumine en een geringe hoeveelheid immuunglobulines. De aminozuur samenstelling van weieiwit verschilt vrij veel van die van caseïne; weieiwit bevat veel meer tryptofaan en cysteïne dan caseïne. Deze methode is gebaseerd op het verschil in hoeveelheid tryptofaan.

Melkpoeder wordt gereconstitueerd. Aan de gereconstitueerde melkpoeder wordt 6 M guanidine toe gevoegd. Het eiwit denatureert en de eiwitgebonden aromatische aminozuren tryptofaan en tyrosine komen vrij zodat ze het UV licht kunnen absorberen. Er ontstaat een heldere oplossing waarvan een UV spectrum van 250 nm naar 310 nm wordt opgenomen. Tyrosine en tryptofaan komen in specifieke verhoudingen voor in weieiwit en caseïne en hebben een maximale absorptie

tussen 270 nm en 300 nm. Wanneer de verhouding weiewit t.o.v. caseïne verandert, zal de verhouding tyrosine/tryptofaan ook veranderen.

Tyrosine en tryptofaan veroorzaken buigpunten op de scan. Deze buigpunten worden versterkt door de 2<sup>de</sup> afgeleide te bepalen. De 2<sup>de</sup> afgeleide geeft maxima bij 294 nm en 287 nm en minima bij 290 nm en 283 nm die specifiek voor tyrosine en tryptofaan zijn. Het verhoudingsgetal ( $Q_{d2}$ ) tussen tyrosine en tryptofaan wordt berekend uit het verschil tussen de maxima en minima. Door het weiewit gehalte van het totaal eiwit gehalte in standaarden uit te zetten tegen de berekende  $Q_{d2}$ , kan het weiewit gehalte in melkpoeder monsters met behulp van lineaire regressie berekend worden.

## 1.2 Vooronderzoek

Ten behoeve van de validatie van de methode voor de EU-werkgroep voor Zuiveldeskundigen werd begin 2000 door het NIZO een ringonderzoek opgezet. Het RIKILT werd gevraagd hieraan mee te doen. Aangezien de methode binnen het RIKILT nog niet operationeel was, werd in maart/april 2000 begonnen met het opstarten van de methode. Hiertoe werden als eerste de NISECAS standaarden (zie bijlage 3) geanalyseerd. De metingen werden verricht met een resolutie van 0,1 nm wat voor de gebruikte spectrofotometer (Beckman DU640) overeen kwam met een scansnelheid van 120 nm/min. Dit stuitte op problemen. De 2<sup>de</sup> en 4<sup>de</sup> afgeleide die door de spectrofotometer werden bepaald waren vooral ruis en niet conform scans in de literatuur (Meisel 1995).

Uiteindelijk werden er metingen verricht aan standaarden en monsters bij een scansnelheid van 1200 nm/min. Het was echter niet duidelijk of de resultaten van de 2<sup>de</sup> en 4<sup>de</sup> afgeleide bruikbaar waren en het onderzoek werd voorlopig gestopt.

Begin 2001 werd het onderzoek weer opgepakt. Op dat moment was er een nieuwe versie, version 2.1, van het voorschrift (Olieman 2001).

Metingen van 2000 werden opnieuw bekeken. Er bleken zich 2 problemen voor te doen bij de bepalingen; de scansnelheid en de 4<sup>de</sup> afgeleide.

- 1) In eerste instantie werd gemeten met een scansnelheid van 120 nm/min, conform het voorschrift (Olieman 2000). Na bepaling van de 2<sup>de</sup> afgeleide was er echter alleen ruis te zien (zie bijlage 1). Later werd er gemeten met een scansnelheid van 1200 nm/min. De 2<sup>de</sup> en 4<sup>de</sup> afgeleide waren nu conform de literatuur (Meisel 1995, Olieman 2001). De scansnelheid was dus van cruciaal belang om een goede 2<sup>de</sup> afgeleide te kunnen bepalen.
- 2) Het bepalen van de 4<sup>de</sup> afgeleide was mogelijk maar de getallen waren zo klein dat uit berekeningen ermee slecht herhaalbare  $Q_{d4}$  waarden kwamen. In het nieuwe voorschrift (Olieman 2001) werd alleen nog maar gesproken over de 2<sup>de</sup> afgeleide. Uit navraag bij dhr Olieman bleek dat meerdere laboratoria problemen hadden met de 4<sup>de</sup> afgeleide. Volgens hem waren de resultaten berekend met de 2<sup>de</sup> afgeleide goed en was besloten de 4<sup>de</sup> afgeleide niet meer te gebruiken voor de berekeningen.

Nadat de problemen in kaart gebracht waren, werden de standaarden opnieuw gemeten. Deze metingen gaven bevredigende resultaten (zie bijlage 2).

In februari 2001 was er weer een nieuw ringonderzoek waaraan het RIKILT deelnam.

## **2 MATERIAAL**

### **2.1 Standaarden**

Standaarden voor de ijklijn: NISECAS, werden door het NIZO gemaakt en verstrekt. Standaarden bevatten 0%, 15%, 20%, 25% en 100% wei. Zie ook bijlage 3.

### **2.2 Monsters**

- Melkpoeders met verschillende gehalten wei ten behoeve van de ringonderzoeken, werden verstrekt door het NIZO.
- wei, standaard materiaal verstrekt door het NIZO.
- 8 caseïnat, 6 mengmonsters en 2 zure caseïnat die voor reguliere controle bij het RIKILT werden aangeboden.
- Caseïnaat, referentie monster
- BiPro, preparaat dat 95% weieiwit bevat (Davisco USA).
- 2 MMP, spray gedroogd, monsters die voor reguliere controle werden aangeboden.
- 2 VMP, referentiemonsters die op het laboratorium aanwezig zijn en geleverd worden door het NIZO.
- 2 KMP, spray gedroogd, monsters die voor reguliere controle werden aangeboden.

### 3 METHODE

#### 3.1 Opwerking van standaarden en monsters.

De standaarden worden op dezelfde manier opgewerkt als de monsters.

Een 10% oplossing van melkpoeder wordt gemaakt door water toe te voegen aan melkpoeder of standaard en onder voortdurend mengen gedurende 30min. bij kamertemperatuur.

Gereconstitueerde KMP en VMP monsters worden ontvet door de monsters bij 3000 g te centrifugeren en het bovenliggende vet te verwijderen. Aan 300 µl monster of standaard wordt 10 ml 6 M guanidine HCl toegevoegd. Nadat de monsters 20 min. in een ultrasoon waterbad hebben gestaan, worden ze nog 1 uur bij kamertemperatuur gezet. Binnen 4 uur totale tijd worden ze gemeten met de spectrofotometer.

De maximale absorptie van de standaard of het monster moet tussen 0,8 en 1,2 liggen. Is dit niet het geval, dan wordt de hoeveelheid monster in 10 ml guanidine buffer aangepast zodat de absorptie wel tussen 0,8 en 1,2 ligt.

#### 3.2 Meting

Voor het meten worden de monsters gefiltreerd door een 0,22 µm discfilter.

Er wordt een spectrum opgenomen tussen 250 nm en 310 nm met een scansnelheid van 1200 nm/min. Als blanco wordt de guanidine HCl buffer genomen zonder monster en wordt als eerste gemeten. Vervolgens wordt van elke standaard en elk monster 3 scans opgenomen. De resultaten worden gemiddeld per monster.

#### 3.3 Berekeningen

Door de 2<sup>de</sup> afgeleide te berekenen tussen de punten in de scan ontstaan er maxima en minima. Met de maxima bij 294 nm en 287 nm en de minima bij 290 nm en 283 nm wordt de verhouding tussen tyrosine en tryptofaan berekend.

Als eerste wordt het verschil uitgerekend tussen de maxima en minima:

$$b_1 = d^2A/d^2 \lambda_{294 \text{ nm}} - d^2A/d^2 \lambda_{290 \text{ nm}}$$

$$b_2 = d^2A/d^2 \lambda_{287 \text{ nm}} - d^2A/d^2 \lambda_{283 \text{ nm}}$$

Waarbij  $d^2A/d^2 \lambda_{294 \text{ nm}}$  een getal is dat staat voor de 2<sup>de</sup> afgeleide van de absorptie bij 294 nm. Dit getal is dimensieloos.

Vervolgens wordt hiermee het verhoudingsgetal  $Q_{d2}$  berekend:

$$Q_{d2} = b_1/b_2 * 100$$

In een ijklijn wordt  $Q_{d2}$  uitgezet tegen het weigehalte (in %) van de standaard. De weigehalten in de melkpoeder monsters werden berekend met behulp van een lineaire ijklijn van het type:

$$y = ax + b$$



Waarbij het weiewitgehalte (x) in de standaard is uitgezet tegen  $Q_{d2}$  (y). Het lineaire verband ging niet geheel op voor 0% wei en 100% wei. Met name de standaard met 100% wei wijkt sterk af. Aangezien de gehalten weiewit van de MMP, VMP en KMP monsters ongeveer tussen 15% en 25% weiewit liggen en de afwijking van de lineariteit, van 0% en 100% wei, werd besloten de ijklijnen te berekenen met standaarden 15%, 20% en 25% wei.

Een voorbeeld van zo'n ijklijn:

$$y = 0,68 \cdot x + 30,97$$

Waarbij 0,68 de richtingscoëfficiënt van de ijklijn is en 30,97 de y-as-afsnijding, x is het onbekende weiewitgehalte in het monster, y is de berekende  $Q_{d2}$ .

In geval van caseïnaat werd de standaard met 0% wei wel meegenomen in de berekening van de ijklijn.

### 3.4 Interne validatie.

De interne validatie is uitgevoerd conform RIKILT standaard voorschrift F-RSV 0052.

Voor de interne validatie van de methode werden twee KMP, twee VMP en twee MMP monsters gedurende 8 weken in duplo geanalyseerd. Bij elke meting werden NISECAS standaarden meegenomen voor de berekening van het weiewitgehalte in de monsters. Uit de gegevens werden relevante prestatiekenmerken zoals de herhaalbaarheid r en de binnenlaboratorium reproduceerbaarheid RI berekend. Voor de herhaalbaarheid werd tevens een KMP, een VMP en een MMP monster in tienvoud geanalyseerd.

### 3.5 Ringonderzoeken

Laboratoria van een aantal landen deden aan de ringonderzoeken mee, 10 laboratoria aan het eerste ringonderzoek en 13 aan het tweede.

Er werden 10 monsters in duplo verstrekt door het NIZO die gelabeld waren met een willekeurige letter.

Uit de data van de ringonderzoeken worden de reproduceerbaarheid R en de herhaalbaarheid r berekend.

### 3.6 Bijmenging van wei aan caseïnaat en magere melkpoeder

Om vast te stellen of de methode geschikt is voor controle van niet-caseïne eiwit in caseïnaat (zijnde weiewit, EEG verordening 2921\1990) en toevoeging van zure wei aan magere melkpoeder, werd een caseïnaat monster en een MMP monster gemengd met BiPro.

De opwerking van de caseïnatens was verder conform die van de standaarden en magere melkpoeder (3.1).

## 4 RESULTATEN

### 4.1 Interne validatie.

De gegevens van alle analyses van de NISECAS standaarden werden bij elkaar genomen en hieruit werd de herhaalbaarheid  $r$  en de binnenlaboratorium reproduceerbaarheid  $RI$  van de  $Q_{d2}$  berekend (tabel 4.1).

De absorptie van de standaard van 100% wei bleek lager te zijn dan het criterium van de minimale absorptie (zie tabel 4.1). Van deze standaard werd 600  $\mu$ l genomen waaraan de guanidine buffer toegevoegd. Dit gaf het gewenste resultaat. De oorzaak van de lage absorptie moet gezocht worden in het lage eiwit gehalte van deze standaard (zie bijlage 3)

Opvallend is de grotere spreiding van de standaard met 100% wei t.o.v. de overige standaarden.

Tabel 4.1 *Prestatiegegevens van de NISECAS standaarden, zijnde: gemiddelde  $Q_{d2}$ ,  $sd$ ,  $r$ ,  $RI$ ,  $VC r$  en  $VC RI$*

monster	gemiddelde $Q_{d2}$	$sr$	$r$	$RI$
0% wei	31,5	0,44	1,25	2,26
15% wei	40,6	0,52	1,44	1,89
20% wei	44,3	0,55	1,54	1,72
25% wei	48,1	0,60	1,69	2,45
100% wei	116,1	2,60*	7,33*	10,58*
Gem.		0,66	1,49	2,10

\* niet meegenomen bij berekening gemiddelde  $r$  en  $RI$

De resultaten van de berekening van de  $r$  en de  $RI$  van de melkpoeder monsters staan in tabel 4.2.

Vergelijken we deze resultaten met die van de standaarden, dan blijkt dat zowel de  $r$  als de  $RI$  voor de melkpoeders wat hoger zijn dan voor de standaarden.

Tabel 4.2 *Prestatiegegevens van de melkpoeder monsters, zijnde: gemiddeld weieiwitgehalte,  $sd$ ,  $r$ ,  $sRI$  en  $RI$ .*

monster	weieiwitgehalte	$sr$	$r$	$sRI$	$RI$	$VC$
MMP-1	14,5	0,56	1,58	0,93	2,60	3,9
MMP-2	16,1	0,43	1,21	0,79	2,22	2,7
VMP-1	16,0	0,36	1,01	0,93	2,61	2,3
VMP-2	16,4	0,93	2,61	1,33	3,74	5,7
KMP-1	23,8	1,08	3,03	1,01	2,82	4,5
KMP-2	26,9	0,78	2,19	1,57	4,39	2,9
Gem.		0,74	2,07	1,12	3,15	

Tabel 4.3 *Gemiddeld weiewit gehalte van KMP, MMP, VMP: sd, r, VCr, n=10.*

monster	gem. % weiewit	sr	r	VC
MMP	15,3	0,73	2,06	4,8
VMP	16,5	0,87	2,44	5,3
KMP	22,7	1,03	2,89	4,5
Gem.		0,89	2,48	

#### 4.2 Ringonderzoeken.

De resultaten van de individuele laboratoria staan in bijlage 4 en 5.

In tabel 4.4 zijn de resultaten van de standaard deviatie sr, de herhaalbaarheid r, de reproduceerbaarheid R en de variatie coëfficiënt VC per monster bij elkaar gezet met het gemiddelde van de sr, r en R.

Tabel 4.4 *Resultaten van de ringonderzoeken uitgedrukt in het gemiddelde gehalte aan wei per monster, sr, r, R en VC.*

		September 2000				Februari 2001					
monster	gem. % weiewit	sr	r	R	VC	monster	gem. % weiewit	sr	r	R	VC
A/F	14,22	1,01	2,83	2,96	7,1	A/B	14,70	0,62	1,75	2,55	4,2
B/R	14,21	0,89	2,5	2,65	6,3	C/E	14,16	0,61	1,71	2,39	4,3
C/E	14,28	0,63	1,75	2,55	4,4	D/R	14,02	0,97	2,71	2,34	6,9
D/U	35,23	0,86	2,41	6,4	2,4	F/Q	14,60	0,73	2,03	2,06	5,0
G/Q	14,37	0,79	2,22	3,00	5,5	G/S	14,67	0,59	1,72	1,53	4,0
H/S	14,68	0,73	2,05	1,83	5,0	H/U	14,64	0,71	2,00	2,03	4,8
K/P	15,78	0,39	1,10	3,39	2,5	K/O	16,03	0,36	1,00	1,71	2,2
L/V	15,45	1,14	3,2	4,14	7,4	L/P	14,49	0,51	1,43	1,73	3,5
M/O	15,46	0,75	2,10	2,40	4,9	M/V	15,63	0,62	1,75	1,71	4,0
N/T	24,64	0,80	2,24	5,8	3,2	N/T	15,60	0,48	1,02	1,78	3,1
gem		0,82	2,27	3,51				0,64	1,71	1,98	

De r en de R van het tweede ringonderzoek zijn kleiner dan van het eerste. Dit komt waarschijnlijk door een betere vaardigheid van de deelnemende laboratoria met de methode.

De gemiddelde weiewit gehalten van MMP-1 en MMP-2 komen overeen met die van de ringonderzoeken. Aangezien KMP en VMP niet zijn meegenomen in de ringonderzoeken wordt hierover wat betreft de gemiddelden geen uitspraak gedaan. Wel kan een uitspraak gedaan worden t.a.v. de standaard afwijkingen.

Met behulp van de F-toets worden de varianties van de monsters van de validatie en van het ringonderzoek van februari 2001 met elkaar vergeleken. Het doel was om vast te stellen of de varianties (en dus ook de standaard afwijkingen) van MMP-1, MMP-2, VMP-1, VMP-2, KMP-1 en KMP-2 significant verschillen met die van het ringonderzoek. Hiertoe werd de kleinste variantie uit het tweede ringonderzoek (van monster K/O) vergeleken met de varianties van de MMP, VMP en

KMP monsters. De F-toets gaf aan dat er geen significante verschillen zijn. Hieruit volgt dat de herhaalbaarheid  $r$  in de validatie eveneens niet significant afwijkt van het tweede ringonderzoek. Wanneer de  $R$  en de  $RI$  van respectievelijk van het tweede ringonderzoek en de interne validatie met elkaar vergeleken worden blijkt dat de gemiddelde  $RI$  groter is dan de gemiddelde  $R$ . Aangezien er slechts een  $RI$ -waarde binnen het bereik van de  $R$ -waarden valt, mag aangenomen worden dat het een significant verschil is. De  $r$  en de  $RI$  van de standaarden komen meer overeen met die van het tweede ringonderzoek. De verwachting was dat de  $RI$  relatief kleiner zou zijn dan de  $R$  aangezien de spectrofotometer en de chemicaliën dezelfde zijn bij elke analyse. Bij het bepalen van de  $R$  gebruiken de verschillende laboratoria andere apparatuur en chemicaliën wat logischerwijs een grotere afwijking tot gevolg zou hebben. Het feit dat de  $RI$  gemiddeld groter is dan de  $R$  kan erop wijzen dat de bepaling binnen het RIKILT onnauwkeuriger is dan op andere laboratoria.

#### 4.3 Caseïnaat

Caseïnaat monsters werden gemeten om vast te stellen of de methode wel geschikt is voor caseïnaat i.v.m. de (slechte) oplosbaarheid van caseïnaten in water. Daarna werd gekeken of toevoeging van wei aan caseïnaat te bepalen is.

Bij de opwerking van de caseïnaten bleek dat alleen de zure caseïnaten niet goed oplossen in water, overige caseïnaten wel. Vóór het nemen van 0,3 ml monster werd de oplossing van zure caseïnaat eerst heel goed gemengd. Na toevoegen van 6M guanidine loste het eiwit wel op. De resultaten staan in tabel 4.5. Deze resultaten liggen binnen de nauwkeurigheid van de standaard met 0 % wei.

Tabel 4.5 *Caseïnaten,  $Q_{d2}$  en het weieiwitgehalte*

monster	$Q_{d2}$	weieiwit (%)
1	30,5	0,6
2	30,0	-0,1
3	30,4	0,4
4	29,1	-1,4
zc 5	30,8	0,9
6	30,8	0,9
7	30,7	0,8
zc 8	30,4	0,4

*zc=zure caseïnaat*

Caseïnaat monsters werden gemengd met 0 %, 3 %, 5 % en 10 % Bipro en gemeten (tabel 4.6). De standaard deviatie komt overeen met eerder berekende standaard deviaties voor MMP. Metingen van caseïnaat met toevoeging van 3% en 5% geeft goede gehalten echter geen significant verschil, daarvoor is de sd te groot. 10% toevoeging van weieiwit aan caseïnaat geeft wel een waarde die significant verschilt van 3% en 5%.

Tabel 4.6 *BiPro toegevoegd aan caseïnaat: weieiwitgehalte en sd, n=4*

monster	weieiwit (%)	sd
+ 0%	-0,9	
+ 3%	2,5	0,7
+ 5%	4,3	0,6
+ 10%	10,3	0,9

#### 4.4 Magere melkpoeder

Een magere melkpoeder met een eiwitgehalte van 36,9%, werd vermengd met 3%, 5% en 10% Bipro. De monsters werden in 8-voud gemeten. De resultaten staan in tabel 4.7.

De berekende gehalten en de standaard deviatie zijn naar verwachting. In het geval van MMP is het moeilijker te zeggen bij welk percentage weieiwit er een verdenking moet zijn aangezien het weieiwitgehalte van verschillende MMP monsters kan variëren. Bij een gehalte dat hoger ligt dan 20% mag men aannemen dat er iets aan de hand is met het monster en is verder onderzoek van dit monster gewenst. Bij gehalten die boven 24% uit komen zal bevestiging niet noodzakelijk zijn.

Tabel 4.7 *BiPro toegevoegd aan MMP: weieiwitgehalte en sd, n=8*

monster	weieiwit (%)	sd
+ 0%	14,2	0,7
+ 3%	17,8	0,7
+ 5%	20,1	0,6
+ 10%	23,5	0,8

## 5 CONCLUSIES

1. De spectrometrische methode met bepaling van de 2<sup>de</sup> afgeleide voor het bepalen van de wei/caseïne verhouding in melk en melkproducten blijkt binnen het RIKILT goed te werken. Het is een eenvoudige methode en het opwerken van de monsters vergt weinig tijd. De poedermonsters hoeven niet persé oplosbaar te zijn, wanneer er een suspensie wordt verkregen voldoet deze ook prima.
2. De spectrofotometer voldoet aan de gestelde eisen, nl.; spectrum opnemen en het bepalen van de 2<sup>de</sup> afgeleide van de scan.
3. De methode is gevalideerd voor MMP, KMP en VMP via interne validatie en ringonderzoeken. Uit de resultaten hiervan blijkt dat de methode binnen het RIKILT qua herhaalbaarheid niet significant verschilt van de ringonderzoeken. De binnenlaboratorium reproduceerbaarheid RI is echter groter dan de reproduceerbaarheid R, wat erop kan duiden dat de nauwkeurigheid van de methode binnen het RIKILT minder goed is.
4. De methode kan gebruikt worden als screeningsmethode voor het aantonen van niet-caseïnaat eiwit (zijnde weieiwit) in caseïnaat volgens EEG verordening 2921\1990 en van (zure) wei in magere melkpoeder. Hoewel het verschil tussen 3% en 5% weieiwit in caseïnaat en magere melkpoeder niet significant is, daarvoor de sd te groot, is het wel mogelijk om vast te stellen of er weieiwit in een caseïnaat cq MMP monster aanwezig is. Gezien de ongevoeligheid van de methode zullen alle caseïnaat monsters met een weieiwitgehalte dat lager ligt dan 10% bevestigd moeten worden met een referentiemethode. De bevestigingsgrenzen voor toevoeging van zure wei aan MMP zullen tussen 20% en 24% gemeten weieiwitgehalte moeten liggen Een goede referentiemethode is capillaire zone elektroforese (Recio en Olieman 1996).  
Het is aan te bevelen de methode voor deze toepassingen verder te valideren.
5. KMP blijkt een significant hoger weieiwit gehalte te bevatten dan MMP en VMP. De methode kan gebruikt worden als screeningsmethode voor de identificatie van KMP t.o.v. mengsels van MMP/VMP in het kader van EEG verordening 2799/99.
6. Er is een RIKILT standaard voorschrift A-RSV (A0613) en een compleet validatie dossier conform F0052. De methode kan ter accreditatie aangeboden worden.

## 6 DISCUSSIE

Zoals in de conclusie al is aan gegeven is de methode binnen het RIKILT onnauwkeuriger dan binnen andere laboratoria wat uit het laatste ringonderzoek blijkt. Een reden voor de onnauwkeurigheid kan de berekening van de 2<sup>de</sup> afgeleide van de scans door de software zijn. Bij een scansnelheid van 1200 nm/min worden vrij weinig punten opgenomen. Hiermee kan de software wel een 2<sup>de</sup> afgeleide berekenen, maar door het geringe aantal punten worden de toppen van de maxima en de minima 'afgesneden' (zie bijlage 2). Het afsnijden van de toppen kan extra fouten opleveren.

De ruis die ontstaat bij berekening van de 2<sup>de</sup> afgeleide bij een scansnelheid van 120 nm/min (bijlage 1) is het gevolg van een slechte berekening door de software van de punten die tijdens de scan zijn opgenomen. De 2<sup>de</sup> afgeleide wordt steeds berekend tussen 3 punten en niet tussen meerdere punten zodat de ruis weg gefilterd wordt, het zogenaamde 'smoothen'. De software is wel in staat te 'smoothen' maar deze berekend eerst de 2<sup>de</sup> afgeleide van de 'niet gesmoothte' scan en 'smootht' vervolgens de punten van de 2<sup>de</sup> afgeleide. Dit heeft niet als gevolg dat er minder ruis in de 2<sup>de</sup> afgeleide komt maar dat de ruis slechts gedempt wordt.

De verwachting is dat de nauwkeurigheid van de berekeningen zal verbeteren wanneer de 2<sup>de</sup> afgeleide van de scans gemeten bij 120 nm/min op een betere manier wordt berekend door een goed software pakket te gebruiken. Dit kan de gevoeligheid van de methode ten goede komen..

Tot nu toe is het nog niet gelukt een software pakket te vinden dat voldoet aan de eisen.

## LITERATUUR

Meisel, H., Application of fourth derivative spectroscopy to quantitation of whey protein and casein in total milk protein, *Milchwissenschaft* 50 (5), 247-251, 1995

Olieman, C., Determination of percentage serum protein of total milkprotein in milk and milkproducts, version 2.1 29-01-2001

Olieman, C., Resultaten 2<sup>de</sup> en 3<sup>de</sup> ringonderzoek, CHEM/7484/2000

Resio, I. and Olieman, C., Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 17, 1228-1233, 1996

Paraaf:  
Datum:

08-03-00

Onderwerp: scansnelheid 120 nm/min

Wavelength Scan  
ReadSamples Tabulate +-\*/Scans Scatter Meta Method SaveClear Print Quit

Scan directory: VIEW	Autoprint: [No]	Method name: A:\CAS WEI
Start wl: 250 nm	Autosave: [Yes]	Autosave name: [A:\J0803_
End wl: 310 nm	Scans per sample: 1	Sampling device: None
Overlay scans: [No]	Interval: 30.00 [sec]	Scan speed: 120 nm/min

A:\0803\_001 ( 120)

Print ↓ ↑ ← → Exit Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print

A:\0803\_001 Scan Functions: Scan 2ndDer 4thDer Smoothing: None

wl	Abs	Pick
276.4	0.9744	pk
276.9	0.9729	pk
280.0	0.9441	pt
283.0	0.9018	pt
284.0	0.8563	pt
287.0	0.6737	pt
290.0	0.5585	pt
294.0	0.3579	pt

Blank (VIS ON) RediScan DEVICES 310.0 nm TIME DATE TEMP CELL  
MATCH OFF [UV ON] RediRead PrtScrn 0.0000 Abs 10:43 08/03/00 N/A 1

Wavelength Scan  
ReadSamples Tabulate +-\*/Scans Scatter Meta Method SaveClear Print Quit

Scan directory: VIEW	Autoprint: [No]	Method name: A:\CAS WEI
Start wl: 250 nm	Autosave: [Yes]	Autosave name: [A:\J0703_
End wl: 310 nm	Scans per sample: 1	Sampling device: None
Overlay scans: [No]	Interval: 30.00 [sec]	Scan speed: 120 nm/min

A:\0803\_001 ( 120)

Print ↓ ↑ ← → Exit Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print

A:\0803\_001 Scan Functions: Scan 1stDer 3rdDer Smoothing: None

wl	Abs	Pick
276.4	0.9744	pk
276.9	0.9729	pk
280.0	0.9441	pt
283.0	0.9018	pt
284.0	0.8563	pt
287.0	0.6737	pt
290.0	0.5585	pt
294.0	0.3579	pt

Blank (VIS ON) RediScan DEVICES 310.0 nm TIME DATE TEMP CELL  
MATCH OFF [UV ON] RediRead PrtScrn 0.0000 Abs 10:43 08/03/00 N/A 1

Paraaf: \_\_\_\_\_

Protocol/proef nr.: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

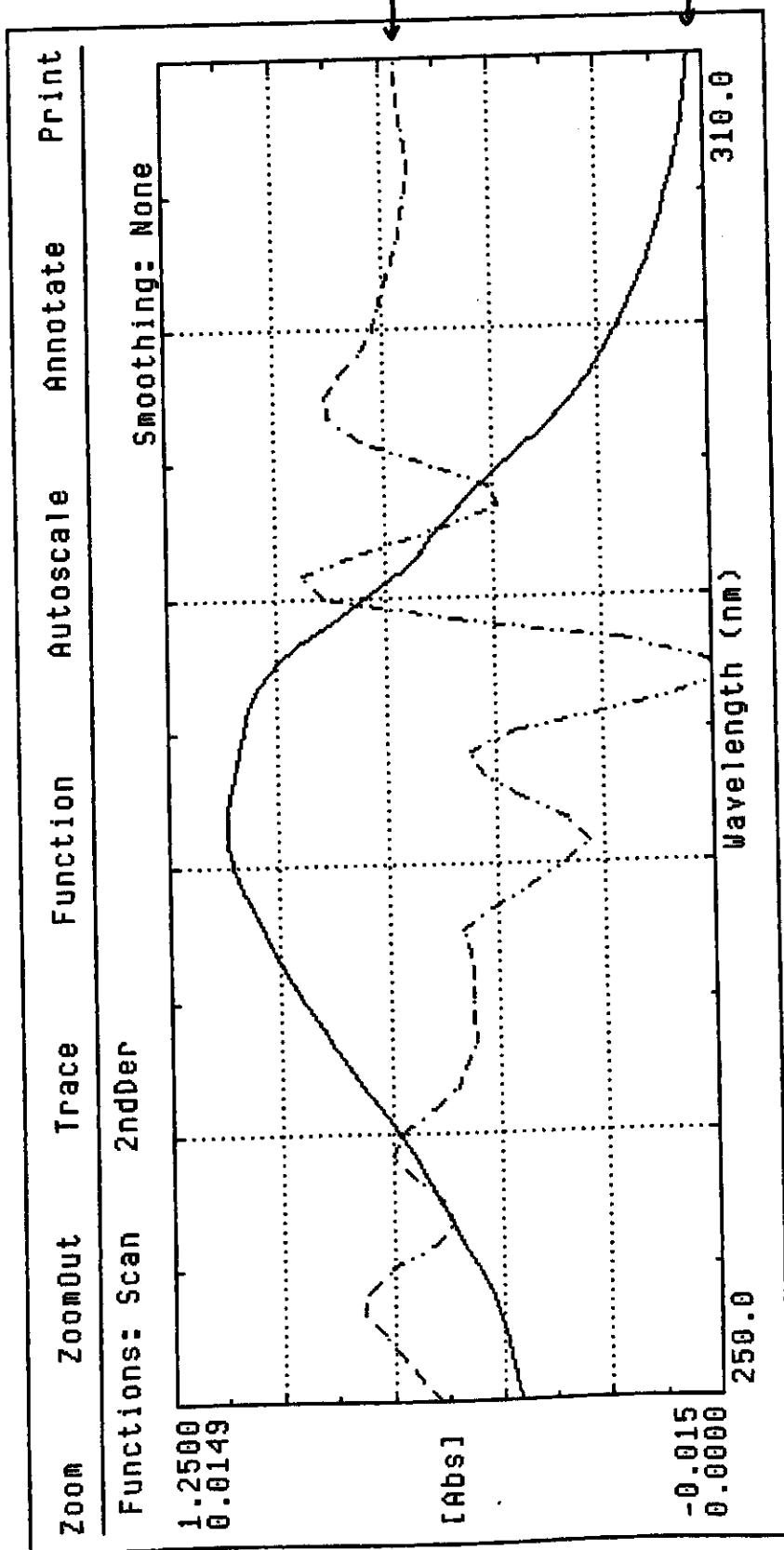
Rawdata map nr.: \_\_\_\_\_



# Bijlage 2

RIKILT\_DLO

Date: 05/11/01  
Time: 02:48



scansnelheid: 1200 nm/min

## REFERENCE MATERIAL

### NISECAS 0, 15, 20, 25, and 100

Batch June 1998

#### DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The complete set consists of five tins, each containing about 90 g of powder. Subsets are also available. The number denotes the percentage serum protein of total protein. By using several membrane filtration techniques a concentrated serum protein solution and a concentrated casein milk was obtained, which were mixed together with permeate to afford NISECAS 15, 20 and 25. The resulting mixtures were spray dried by low heat spray drying at the NIZO pilot plant facility. Skim milk used was of Dutch origin.

#### STORAGE OF THE SAMPLE

In order to maintain the quality of the reference material the unopened tins should be stored at 4°C (max. 3 years), ca. -20°C is recommended for long term storage. After opening store the remaining sample in a well closed container at 4°C (max. 1 year).

#### COMPOSITION OF THE SAMPLE

NISECAS 0 and 100 were analysed by CZE<sup>1</sup> for the presence of residual serum proteins and casein's, respectively. Serum proteins were not detectable (<0.5%) in NISECAS 0 and casein's were not detectable (<0.2%) in NISECAS 100. Mixing of solutions of NISECAS 0 and 100 was carried out on the basis of true protein content (Kjeldahl, TCN-NPN) in order to arrive at solutions containing 15, 20 and 25% serum protein of total protein.

TABLE. Protein and nitrogen contents of NISECAS.

NISECAS	% TN	% NPN	% true protein [% (TN-NPN)*6.35]
0	4,685	0,173	28,7
15	5,550	0,302	33,3
20	5,855	0,398	34,7
25	4,780	0,358	28,1
100	1,555	0,438	7,1

- 1) N. de Jong, S. Visser and C. Olieman, Determination of milk proteins by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.* 652, (1993) 207.

6 juli, 1998

# Bijlage 4

Ringonderzoek september 2000.

monster	Gehalte weleiwit (% t.o.v. totaal eiwit)													r	R	
	lab nr.															Gem.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RIKILT					
A	12,28	13,9	14,4	13,4	13,63	14,82	12,10	15,40	14,65	13,61	13,37	13,78	2,83	2,96		
F	14,08	16,2	15,3	13,4	14,26	16,24	14,30	13,50	14,80	14,68	14,43	14,65				
B	14,27	13,6	14,3	14,4	13,93	14,96	14,00	15,00	14,30	11,33	13,26	13,94	2,50	2,65		
R	13,34	15,1	14,4	14,6	14,13	14,44	13,20	15,40	16,10	14,35	14,22	14,48				
C	12,4	14,3	14,6	13,8	14,15	14,08	12,80	14,50	15,25	13,48	14,26	13,97	1,75	2,55		
E	14,13	15,5	14,6	13,8	14,34	14,61	13,70	14,50	16,90	14,03	14,46	14,60				
D	34,33	32,4	34,3	35,5	37,61	33,96	34,00	40,30	33,60	35,63	35,74	35,22	2,41	6,4		
U	32,86	33,7	32,0	35,3	36,38	33,53	35,10	40,60	34,50	37,35	36,35	35,24				
G	16,49	13,7	15,0	14,2	14,38	15,12	15,60	14,20	14,20	13,47	14,66	14,64	2,22	3,00		
Q	15,55	11,2	14,9	13,1	13,39	15,07	14,00	14,10	14,30	14,83	14,57	14,09				
H	14,14	14,9	15,2	14,5	15,45	15,44	14,90	15,50	14,80	13,65	13,84	14,76	2,05	1,83		
S	14,28	18,0	13,8	14,5	14,19	14,49	12,90	14,80	14,40	14,46	14,82	14,60				
Y	16,88	16,1	15,3	14,9	14,32	16,61	12,70	16,40	16,20	14,43	20,78	16,06	1,10	3,39		
P	16,94	15,5	16,0	15,5	14,05	15,43	13,40	16,10	16,20	15,38	16,10	15,51				
L	17,3	14,7	15,9	14,2	14,32	16,99	12,90	16,80	17,40	14,94	14,98	15,49	3,20	4,14		
V	13,55	16,1	14,7	14,7	15,79	15,35	12,60	15,70	18,25	16,45	16,34	15,41				
M	15,44	16	15,8	14,3	15,79	16,88	13,90	15,20	16,10	14,97	14,44	15,35	2,10	2,40		
O	16,47	15,4	14,9	14,2	14,02	19,32	13,90	16,30	14,85	16,25	15,64	15,57				
N	21,85	22,8	24,7	21,7	26,57	23,90	23,70	29,30	26,30	25,23	25,41	24,68	2,24	5,8		
T	21,84	23,7	24,1	22,5	24,46	24,32	22,80	27,60	25,90	26,33	27,00	24,60				

Grijze vlakken: uitbijters

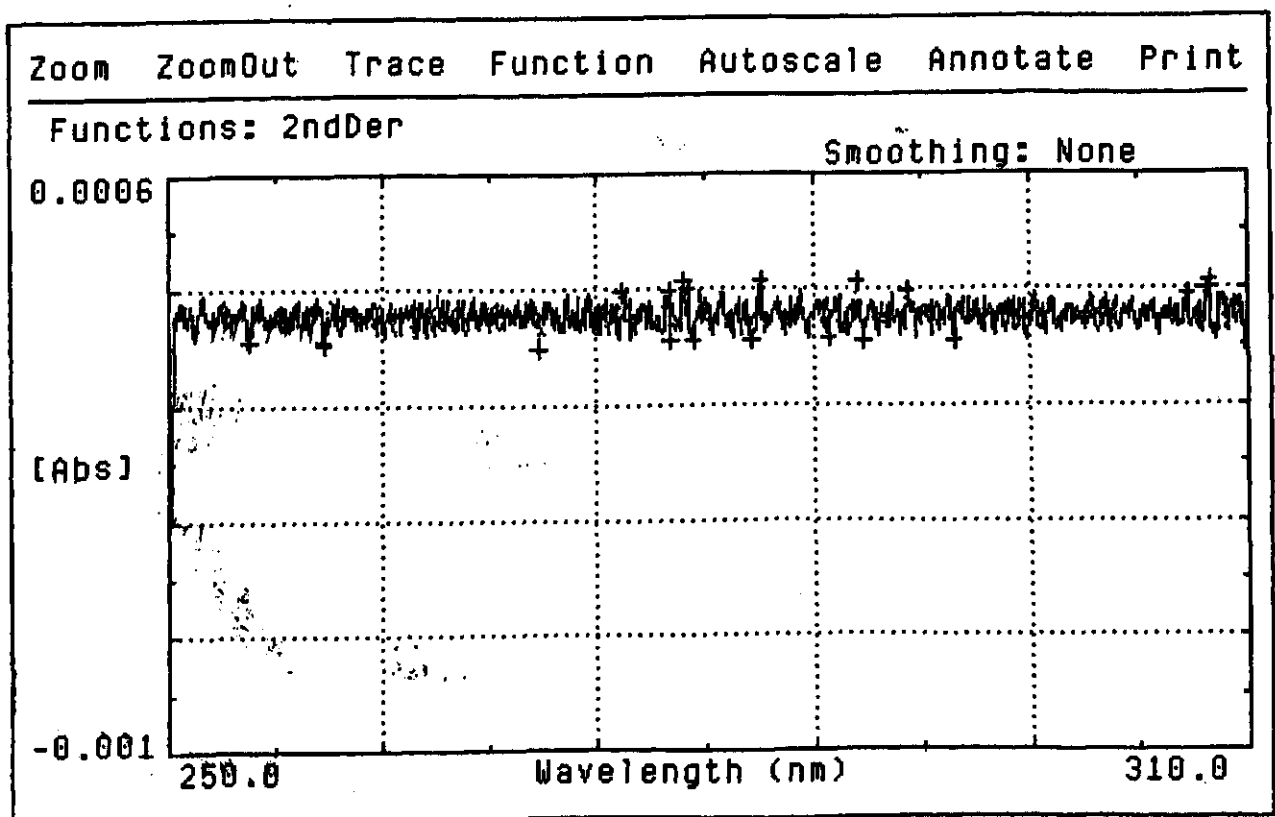
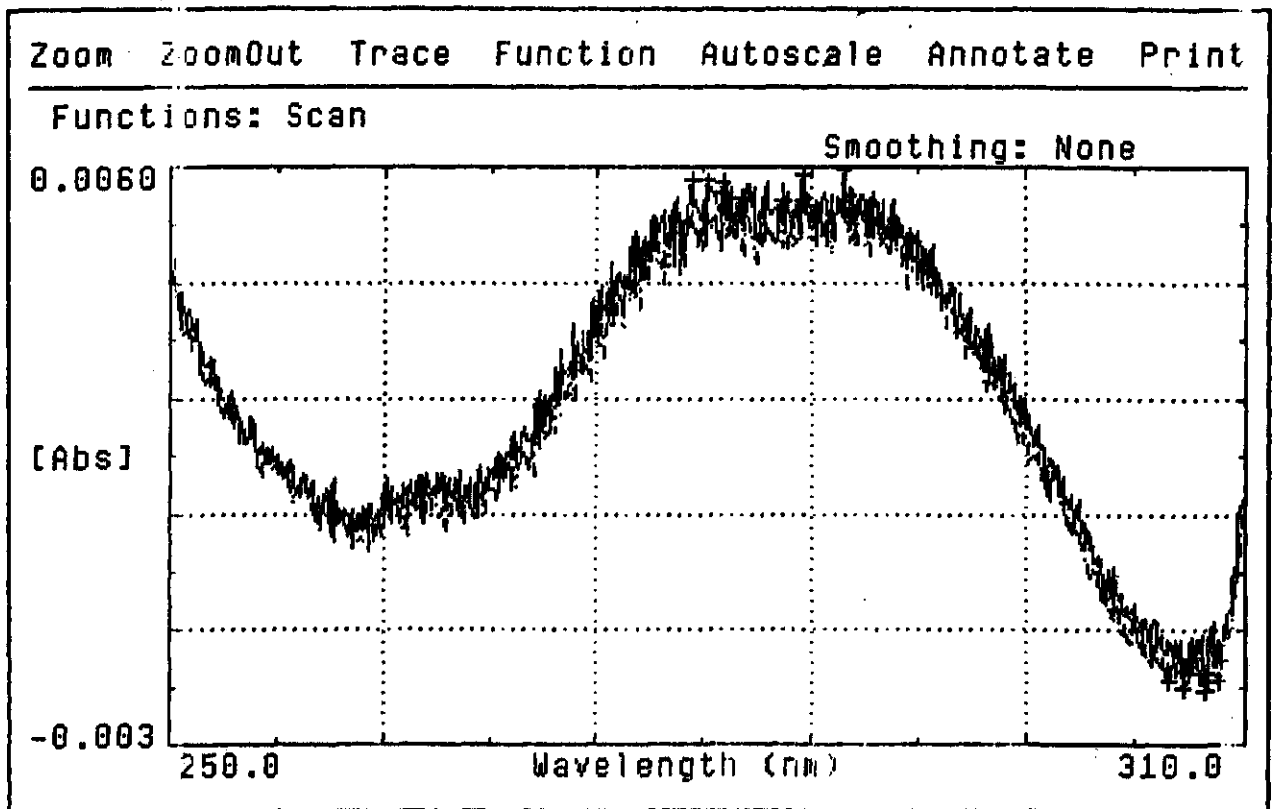
# Bijlage 5

Ringonderzoek februari 2001

monster	Gehalte weieiwit (% t.o.v. totaal eiwit)													R	R	
	Labnr.															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RIKILT	13			Gem.
A	16,00	15,30	15,36	14,95	14,2	14,57	15,00	14,90	16,70	13,50	13,78	14,71	15,00	14,89	1,75	2,55
B	13,50	11,30	15,48	14,84	13,85	14,85	15,40	13,70	17,00	14,30	14,31	15,11	14,70	14,75		
C	13,90	15,10	14,16	14,01	14,04	13,54	14,40	13,10	12,90	14,60	14,22	14,55	15,22	14,13	1,71	2,39
E	13,00	13,40	14,33	15,85	13,47	13,62	14,50	12,60	12,00	13,90	14,31	14,54	14,38	13,84		
D	12,10	12,70	14	14,69	13,34	14,33	14,20	13,80	12,90	12,50	14,08	14,48	14,23	13,64	2,71	2,34
R	14,00	15,90	14,03	14,96	13,69	14,43	14,80	15,00	14,50	14,70	13,56	13,75	13,77	14,39		
F	15,50	14,00	14,69	15	14,28	14,07	14,60	15,00	13,10	13,80	14,29	15,12	14,52	14,46	2,03	2,06
Q	13,60	14,70	14,49	14,71	16,78	13,96	14,50	15,60	14,00	15,10	14,15	14,92	15,04	14,73		
G	13,70	14,10	14,14	14,93	15,05	14,85	14,50	14,40	12,00	14,80	14,03	15,68	14,85	14,59	1,72	1,53
S	15,10	14,80	14,61	14,74	13,59	14,96	15,20	15,20	12,30	14,70	14,26	14,14	14,66	14,66		
H	15,40	13,90	14,14	15,21	13,9	15,58	14,10	14,80	12,00	14,80	14,29	15,21	14,20	14,63	2,00	2,03
U	15,10	16,30	14,57	14,27	13,51	15,72	14,90	14,80	12,20	13,90	14,08	13,54	15,14	14,65		
K	17,50	14,30	15,72	16,22	15,47	16,46	15,80	16,10	13,40	14,80	15,66	16,66	15,88	16,03	1,00	1,71
O	17,30	17,80	15,62	15,9	15,58	16,51	16,20	15,90	13,90	16,10	15,47	15,84	15,92	16,03		
L	13,80	14,30	14,24	15,08	12,92	14,8	14,50	14,20	11,50	14,70	14,37	14,28	14,53	14,31	1,43	1,73
P	14,30	16,00	14,39	14,59	13,85	15,21	14,80	15,20	11,80	14,50	14,11	13,79	15,19	14,66		
M	14,60	14,90	15,12	16,7	14,15	15,61	15,60	16,00	12,90	15,70	15,16	15,62	15,53	15,39	1,75	1,71
V	15,60	16,60	15,24	16,22	16,32	15,43	16,00	16,40	13,80	16,00	15,29	15,82	15,45	15,86		
N	15,80	15,20	15,27	15,72	14,23	16,27	15,50	16,10	13,20	15,90	15,06	14,97	15,20	15,44	1,02	1,78
T	15,70	14,90	15,43	16,9	14,74	16,79	16,20	16,00	14,20	16,00	15,27	16,69	15,46	15,84		

Grijze vlakken: uitbijters

# Bijlage 6



scansnelheid: 120 nm/min  
smoothing: none