

Afdeling SERH

1983-01-03

RAPPORT 84.4

Pr.nr. 505.6000

Onderwerp: Ringonderzoek over het aan-
tonen van vervalsing van melk-
poeder met behulp van polaro-
grafie

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (2x), direktie VKA, afd. SERH
(4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme),
Projektbeheer, Projektleider (Van der Veen).

RAPPORT 84.4

Pr.nr. 505.6000

Projekt: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor melk-
en zuivelprodukten

Onderwerp: Ringonderzoek over het aantonen van vervalsing van melk-
poeder met behulp van polarografie

Doel:

Het uitvoeren van een ringonderzoek om een polarografische methode voor het aantonen van vervalsing van melkpoeder met weipoeder te testen.

Samenvatting:

Na een korte inleiding over de taak en werkwijze van het RIKILT wordt eerst de theoretische achtergrond van de polarografie beschreven en vervolgens de methode van onderzoek. De methode berust op de meting van cystine-cysteïne. Het gehalte cystine-cysteïne in magere melkpoeder wordt door de toevoeging van wei aan melk aanzienlijk verhoogd. Tevens neemt het eiwitgehalte af. In een sulfiethoudende buffer wordt cystine gereduceerd tot cysteïne waarna een overmaat methylkwikchlorideoplossing wordt toegevoegd. Deze reageert met cysteïne zodat de overblijvende hoeveelheid methylkwikchloride een maat is voor het cystine-cysteïne gehalte. Het uiteindelijke gehalte cystine-cysteïne wordt bepaald met een ijkoplossing. Om de methode te testen is met een aantal laboratoria een ringonderzoek gehouden waaraan ik namens het RIKILT heb deelgenomen.

Conclusie:

De methode is geschikt voor de opsporing van het met weipoeder vervalste melkpoeder maar is nog niet geperfectioneerd. Verder onderzoek is gewenst om tot een vergaande harmonisatie van resultaten tussen de diverse laboratoria te komen.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerker/Samensteller: T.R. van Egdom, T.D.B. van der Struijs

Projectleider: N.G. van der Veen

ER

T.R. van Egdom

AV

Inleiding

1.1 Het Instituut

1.2 Afdeling Spectroscopie/Electrochemie/Radio-
activiteit/Hormonen

2.1 Theorie van de voltammetrie

2.2 Gelijkstroompolarografie

2.3 Wisselstroompolarografie

2.4 Pulspolarografie

2.5 Enkele voorwaarden voor het verkrijgen van goede
meetresultaten met polarografische systemen

3.1 Onderzoek naar de vervalsing van magere melk met wei

3.2 De globale samenstelling van magere melkpoeder

3.3 De cystine-cysteïne bepaling

3.4 Bespreking van de resultaten

3.5 Conclusie

3.6 Literatuur

Bijlage: Intern Analysevoorschrift

1.1 Het Instituut

De stageperiode is doorgebracht op het Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten te Wageningen.

Het Instituut is in 1979 ontstaan uit een fusie van het Rijkslandbouwproefstation voor Meststoffen en Veevoeders te Maastricht en het Rijkszuivelstation te Leiden.

Een aantal belangrijke activiteiten van het RIKILT zijn:

- * het stimuleren van resp. leveren van een bijdrage aan kwaliteitsbevorderend onderzoek;
- * het ontwikkelen of verbeteren van methodieken om relevant geachte kwaliteitskenmerken doelmatig te meten;
- * het bestuderen van ontwikkelingen op het gebied van de analyse van voedingsmiddelen en andere landbouwprodukten;
- * het meewerken aan het harmoniseren en normaliseren van analysemethoden zowel in nationaal, EEG en wijder internationaal verband;
- * het meten van kwaliteitskenmerken of het toezichthouden daarop in het kader van de controle door de overheid;
- * het behulpzaam zijn bij het rijkstoezicht op de werkwijze van controle-instellingen;
- * het toegankelijk maken en opbouwen van relevante geautomatiseerde documentatie van voedings- en kwaliteitsgegevens van Landbouwprodukten.

Het RIKILT betaamt uit de volgende afdelingen:

- microbiologie
- diergeneesmiddelen
- spectroscopie/electrochemie/radioactiviteit/hormonen
- organische contaminanten/bestrijdingsmiddelen
- anorganische contaminanten
- toxicologie
- microscopie
- sensoriek
- koolhydraat- en vetchemie
- eiwitchemie
- fysische kwaliteit
- levensmiddelenadditieven/micronutriënten
- algemene chemie.

1.2 Afdeling Spectroscopie/Electrochemie/Radioactiviteit/Hormonen

De stageperiode is doorgebracht op de afdeling Spectroscopie/Electrochemie/Radioactiviteit/Hormonen. Deze afdeling is voornamelijk belast met micro-chemisch onderzoek van land- en tuinbouwprodukten. Dit houdt in het kwalitatief aantonen en kwantitatief bepalen van stoffen die in slechts zeer geringe concentratie of hoeveelheid aanwezig zijn. Hiertoe beschikt de afdeling over een aantal gespecialiseerde technieken.

De afdeling heeft als speciale opdracht de controle op de "hormonen", een onderwerp dat tegenwoordig sterk in de belangstelling staat. Deze hormonen worden geanalyseerd met een aantal technieken, die op verschillende chemische of fysische principes berusten.

Spectroscopie:

Hier werd de laatste tijd weinig aandacht meer aan besteed. Door een recente aanschaf van een Fourier-transformatie infraroodspectrofotometer is deze situatie thans veranderd.

Dunnelaagchromatografie:

Er is een aantal methoden ontwikkeld voor het aantonen van hormonen (High Performance Thin Layer Chromatography).

Radioactiviteit:

Naast metingen in het kader van de kernenergiewet wordt momenteel vooral aandacht besteed aan de radioimmunochemische bepaling van hormonen (kwalitatief en kwantitatief).

Electrochemie:

Electrochemische detectie heeft op deze afdeling een breed toepassingsgebied o.a. voor het aantonen en bepalen van additieven, diergeneesmiddelen en synthetische hormonen die in land- en tuinbouwprodukten aanwezig zijn. Bij deze electrochemische analysemethoden wordt vaak een voorafgaande scheiding bewerkstelligd door het gebruik van een HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

De verrichte stagewerkzaamheden bestonden uit de toepassing van electrochemische analysemethoden waarbij de meeste tijd besteed is aan de polarografische methode voor het aantonen van vervalsing van melkpoeder. Ook is meegewerkt aan het onderzoek van nicotinezuur in vlees en de bepaling van penicilloïnezuur in melk.

2.1 Theorie van de voltammetrie

Polarografie (als onderdeel van de voltammetrie) werd ca. 50 jaar geleden geïntroduceerd door Heyrovsky. De methode is sedertdien sterk verbeterd.

Fundamentele vooruitgang in de electronica, gecombineerd met een bredere kennis van elektrodenreacties, verbeterde onderzoeks- en meetmethoden en de uitvoering van nieuwe elektroden hebben geleid tot grote nauwkeurigheid en brede toepassing vergeleken met klassieke polarografische methoden. Polarografische analyses van organische verbindingen zijn sterk toegenomen met belangrijke toepassingen in de levensmiddelen- en farmaceutische industrie, waarbij op het gebied van milieuverontreiniging ook grote mogelijkheden aanwezig zijn.

Tevens kunnen metaalionen polarografisch bepaald worden waarbij de nauwkeurigheid de laatste jaren gelijk of zelfs groter geworden is aan bekende technieken zoals grafietoven-AAS.

Bovendien komen een groot aantal ionen in aanmerking voor Simultaan bepalingen (zoals NO_2^- , NO_3^- , CN^- , S^{2-} , Cl^- enz.)

De combinatie van grote nauwkeurigheid, reproduceerbaarheid en relatief lage kostprijs hebben ertoe geleid dat deze methoden toepassing vinden op een groot gebied van de analytische chemie.

Polarografie is een bijzondere vorm van voltammetrie, waarbij een druppelende kwikelectrode als indicatieelectrode gebruikt wordt. Het principe van voltammetrie (van volt-amperometrie) berust op de meting van de stroomsterkte als functie van de spanning over een electrochemische cel.

Voltammetrie bestaat uit een groot aantal varianten waarvan er drie besproken worden

- gelijkstroompolarografie
- wisselstroompolarografie
- pulspolarografie.

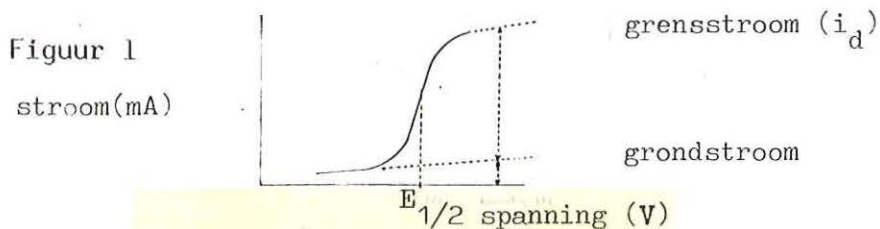
2.2 Gelijkstroompolarografie

Bij gelijkstroompolarografie wordt de spanning langs elektronische weg automatisch gevarieerd, met de hierdoor variërende stroomsterkte ontstaat een stroom-spanningcurve (polarogram) die via een recorder geregistreerd wordt.

Het polarogram (of voltammogram) vertoont sprongen (golven) die afkomstig zijn van oxidatie-/reductieprocessen die zich afspelen aan het oppervlak van de kwikdruppel. De stroom is mede afhankelijk van de druppelgrootte.

Deze voltammetrische golf heeft twee belangrijke grootheden.

- a. De grensstroom i_d : deze is evenredig met de concentratie van de component die de stroom veroorzaakt.



- b. De halfwaardepotentiaal $E_{1/2}$: de potentiaal waarbij de stroomsterkte een waarde heeft, die gelijk is aan de helft van de grensstroom. De halfwaardepotentiaal is karakteristiek voor een component in een bepaalde buffer.

Dankzij deze twee eigenschappen kan voltammetrie zowel voor kwalitatieve als kwantitatieve analyse worden toegepast.

Verklaring voor het verloop van gelijkstroompolarogram.

Indien een electrodensysteem in een oplossing geplaatst wordt, zal deze een evenwichtspotentiaal ten opzichte van die oplossing innemen. Dit wordt weergegeven in de vergelijking van Nernst.

$$E_w = E_o + \frac{RT}{NF} \ln \frac{Co}{Cr}$$

E_w = evenwichtspotentiaal

E_o = standaardpotentiaal

R = gasconstante

T = absolute temperatuur

N = aantal redoxelectronen

F = Faraday constante

$\frac{Co}{Cr}$ = concentratie van geoxideerde resp. gereduceerde vorm van een redoxkoppel.

Wordt er tussen de twee elektroden een spanning aangelegd, dan zal het systeem uit evenwicht geraken met de omringende oplossing. Door dit spanningsverschil zal er elektronenoverdracht plaatsvinden (Faraday stroom) en dus een verandering in de verhouding van het redoxkoppel optreden. Dit heeft tot gevolg dat er in toenemende mate concentratieverschillen gaan optreden (in het redoxkoppel) tussen het omliggende vloeistoflaagje om de elektrode en de rest van de oplossing. Hierdoor zal er een diffusiestroom ontstaan. Deze zal in begin snel toenemen waarbij de component over een steeds langere weg aangevoerd moet worden zodat de aanvoer van de stof na verloop van tijd achter zal blijven bij de snelheid waarmee deze component aan de indicatie-elektrode wordt omgezet. Op dat moment is de grensstroom bereikt.

Andere vormen van ionentransport zijn a) migratie, o.i.v. het electro-nisch veld (tussen de elektroden) zullen b.v. negatieve ionen zich naar de indicatie-elektrode begeven en positieve ionen naar de referentie-elektrode; b) convectie, ten gevolge van o.a. roeren en dichtheidsverschillen zullen er vloeistofstromingen optreden.

Omdat deze invloeden de analyse kunnen storen of zelfs onmogelijk maken moeten ze worden geneutraliseerd.

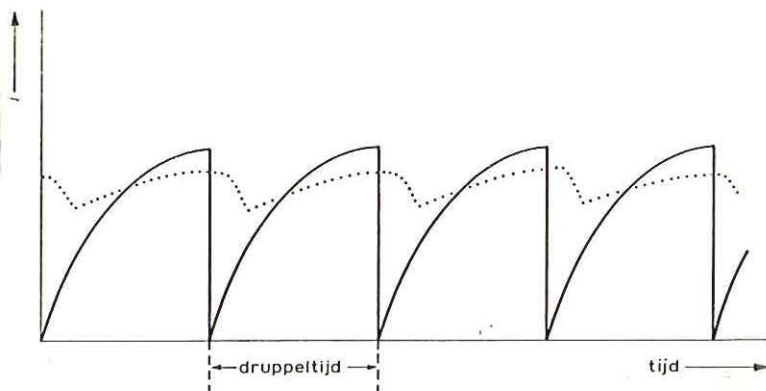
Dit gebeurt door a) een hoeveelheid electrolyt toe te dienen zodat het ladingstransport t.g.v. migratie vrijwel geheel op rekening komt van de electrolytionen en b) door een homogene oplossing in een trillingsvrije cel te brengen.

Dat polarografie de meest gebruikte vorm van voltammetrie is, is niet verwonderlijk gezien het aantal voordelen dat de DME (Dropping Mercury Electrode) boven andere elektroden heeft

- het elektrodeoppervlak wordt regelmatig vernieuwd zodat er vrijwel geen verontreinigingen optreden die het gedrag van de elektrode zouden kunnen beïnvloeden
- het oppervlak is zeer regelmatig, waarbij het oppervlak van een kwikdruppel precies uit het gewicht van de druppel berekend kan worden
- waterstof heeft een zeer grote overspanning aan kwik zodat zelfs alkalimetalen kunnen worden gereduceerd zonder dat er hinderlijke waterstofontwikkeling optreedt
- kwik kan gemakkelijk gezuiverd worden met een grootrendement (99,9%).

Als nadeel van de DME kan worden genoemd dat het elektrodeoppervlak en ook de dikte van de diffusie laag tijdens de druppelgroei verandert. Dit geeft aanleiding tot een pulserende stroom.

Figuur 2



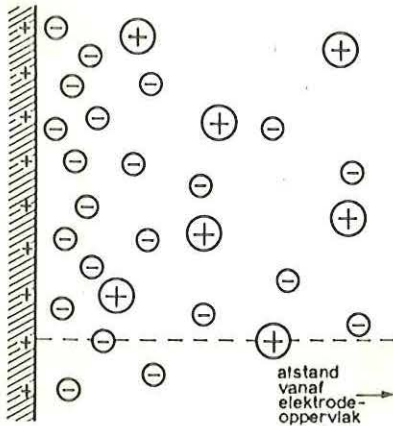
De ladingen aan het electrodeoppervlak en de laag "tegen"ionen in de oplossing vormen een condensator, bij druppelgroei zal er een groter oppervlak ontstaan waardoor de capaciteit van de condensator groter wordt, bij een op dat moment constant potentiaal, en zal er een stroom gaan vloeien (capacitieve stroom).

Immers $Q = C \cdot V$.

Q = lading

C = capaciteit

V = potentiaal.



Figuur 3

Schematische voorstelling van ionenverdeling van een negatieve indicatie-electrode (electrochemische condensator).

Deze capacitieve stroom bepaalt bij klassieke gelijkstroompolarografie de detectiegrens (10^{-5} M). Bij lage concentraties wordt de waarde van de Faradaystroom zo klein dat de capacitieve stroom de meting ingrijpend beïnvloedt en dus onbetrouwbaar maakt.

Ook is het oplossend vermogen van klassieke DME beperkt, dat wil zeggen als de halfwaardepotentiaal van twee of meer componenten dicht bij elkaar liggen (< 120 mv), dan zijn de grensstromen niet meer afzonderlijk te meten.

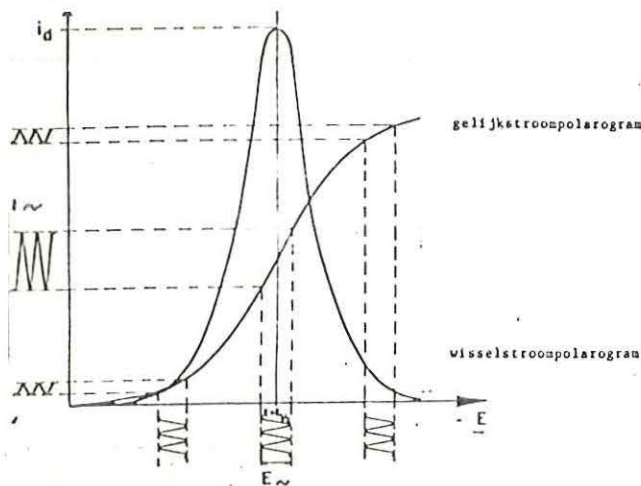
2.3 Wisselstroompolarografie

Op de normaal gebruikelijke celspanning (gelijkstroom) wordt een kleine sinusvormige wisselspanning gesuperponeerd.

Door de potentiaalverandering in het electrodensysteem zal er ook een stroomverandering optreden.

Nu is het langs elektronische weg mogelijk de door de wisselspanning opgewekte Faradaystroom te scheiden uit de totale stroom. In het verkregen wisselstroompolarogram zullen de grootste stroomveranderingen optreden in de omgeving van de halfwaardepotentiaal van het gelijkstroompolarogram.

Figuur 4



Voorbeeld van een gelijkstroompolarogram en een wisselstroompolarogram van een stof in een elektrolyt oplossing.

Bij wisselstroompolarografie hanteert men 3 grootheden

- piekstroom I_p (evenredig met de concentratie van de te bepalen component)
- piekpotentiaal E_p (onafhankelijk van de concentratie van de te bepalen component)
- halfwaardebreedte $S_{1/2}$ (onafhankelijk van de concentratie van de te bepalen component)

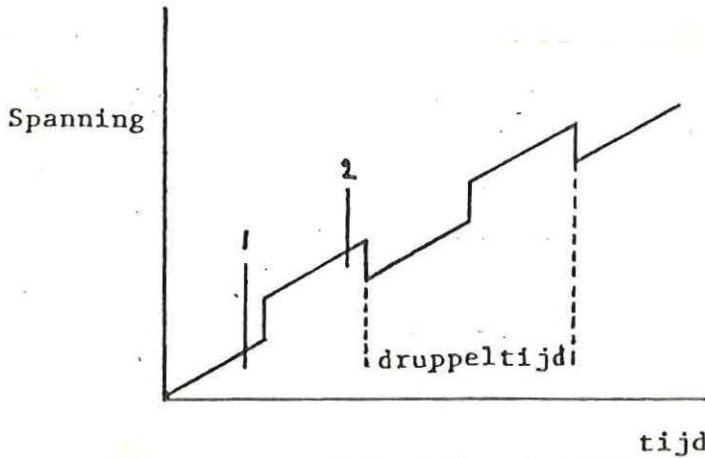
Dankzij de piekvorm van het polarogram en de eliminatie van de condensatorstroom verbetert het oplossend vermogen met een factor 3. De detectiegrens wordt met een factor 100 tot 1000 verlaagd.

2.4 Pulspolarografie

Een veelgebruikte vorm van voltammetrie is pulspolarografie, in het bijzonder: Differential Puls Polarografie (DPP).

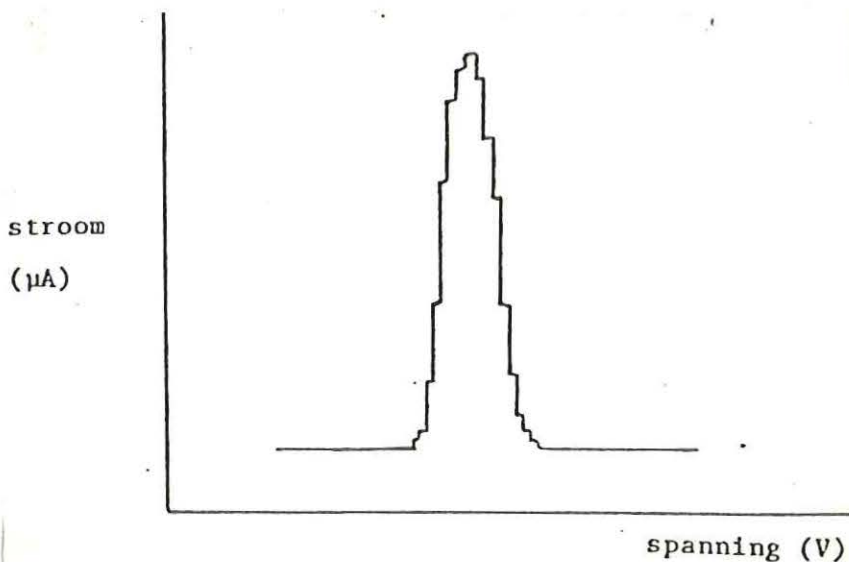
Hierbij wordt over de electrochemische cel een lineair toenemende potentiaal aangelegd, waarop kort voor het afvallen van de druppel een extra spanningspuls (met vaste amplitude) wordt gesuperponeerd. Kort voor het begin van de puls wordt de dan heersende stroomsterkte opgeslagen in een geheugen (1). Als gevolg van de puls verandert de Faradaystroom. Het verschil met de in het geheugen opgeslagen waarde neemt tijdens de puls af, maar blijft na ca. 40 ms nagenoeg constant.

De ook optredende capacitiestroom neemt tijdens de puls snel af en is na 40 ms verwaarloosbaar. Op dat moment wordt de stroomsterkte gemeten (2) en vergeleken met de in het geheugen opgeslagen waarde, waarbij het verschil over de nog resterende puls geïntegreerd wordt. Hierna wordt Faraday-respons gemeten als functie van de potentiaal.



Figuur 5. Spanning/tijd diagram differentieële puls polarografie.

Het verkregen polarogram vertoont veel gelijkenis met het wisselstroompolarogram en heeft analoge eigenschappen qua scheidend en oplossend vermogen.

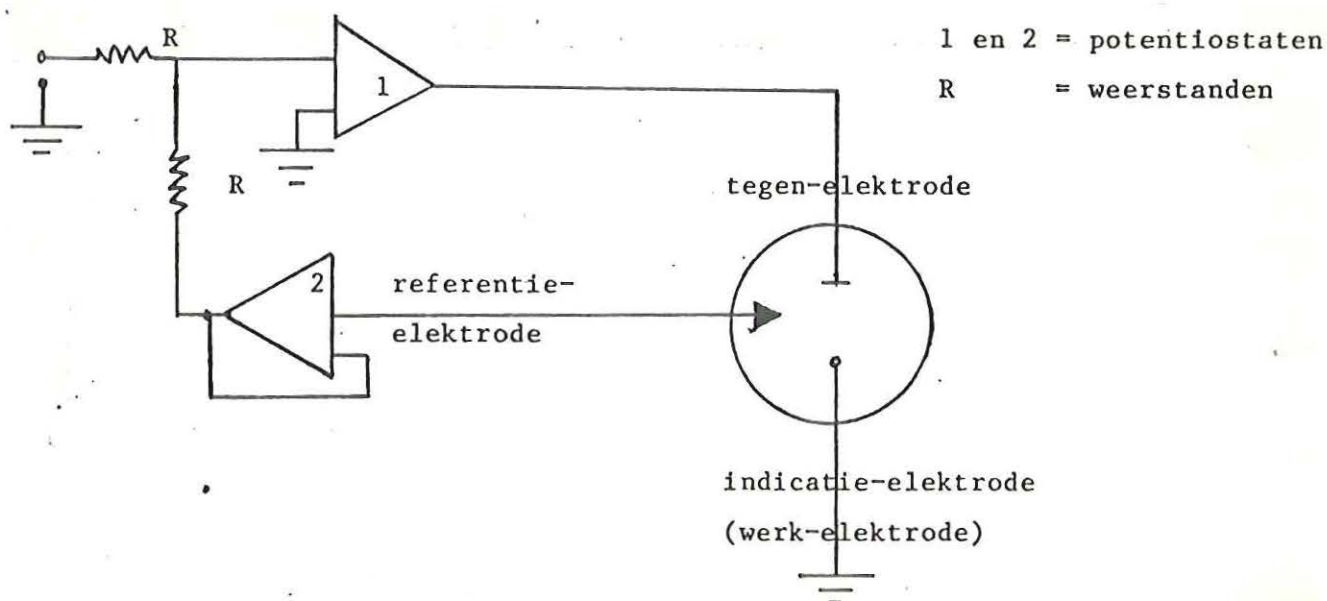


Figuur 6. Voorbeeld van een differentieële puls polarogram.

2.5 Enkele voorwaarden voor het verkrijgen van goede meetresultaten met polarografische systemen

- Het elektrodensysteem:

Men gebruikt referentieelectroden met een zo groot mogelijk oppervlak (t.o.v. de indicatie-electrode) om een zo constant mogelijk potentiaal op de referentie-electrode te behouden bij stroombelasting (twee-electrodensysteem). Omdat dit vaak niet voldoende werkt heeft men het drie-electrodensysteem ingevoerd. Het systeem bevat behalve de referentie- en indicatieelectrode ook een tegenelectrode. Deze tegenelectrode zorgt er voor dat het potentiaal verschil tussen de referentie- en indicatieelectrode op ieder moment gelijk is aan de ingestelde waarde.



Figuur 7. 3-elektrodensysteem.

- Concentratie:

De optimale concentratie van de te bepalen component ligt afhankelijk van de toegepaste techniek tussen 10^{-6} en 10^{-2} M. Bij hogere concentratie wordt er tijdens het vormen van de druppels zoveel reactieproduct gevormd, dat merkbare hoeveelheden in het kapillair kunnen binnendringen.

- Afwezigheid storende stoffen:

Vooraf opgeloste zuurstof stoort vaak in het meetgebied, daarom wordt er voor de meting stikstof door de meetoplossing geleid.

3.1 Onderzoek naar de vervalsing van magere melkpoeder met weipoeder

Volgens een EEG verordening uit 1968 wordt financiële steun gegeven bij verkoop van zuivere magere melkpoeder (het zgn. Interventieverdrag).

Omdat het hier vaak om grote hoeveelheden en dus grote bedragen gaat is het noodzakelijk eventuele vervalsingen te kunnen opsporen.

Een aantrekkelijke vorm van vervalsen is het mengen van melk met wei. Wei is een bijproduct van kaasbereiding dat erg goedkoop in de aanschaf is.

Om een geschikte controlemethode te ontwikkelen is het van groot belang te weten wat de belangrijkste chemische verschillen tussen caseïne- en weieiwitten zijn.

Dit zijn o.a.

- a. het eiwitgehalte, het eiwit-stikstofpercentage blijkt bij weipoeder een factor 5 lager te liggen dan bij melkpoeder (methode $ZnSO_4$ -stikstof Kjeldahl).
- b. het cystine-cysteïne gehalte is bij de eiwitfractie van weipoeder een factor 10 hoger in vergelijking met de eiwitfractie van melkpoeder.

Met deze kennis is het duidelijk dat melkpoeder met een hoog cystine-cysteïne gehalte en/of een laag eiwitgehaltepercentage verdacht is.

De bepaling van het eiwitgehalte wordt niet op deze afdeling uitgevoerd en wordt daarom buiten beschouwing gelaten.

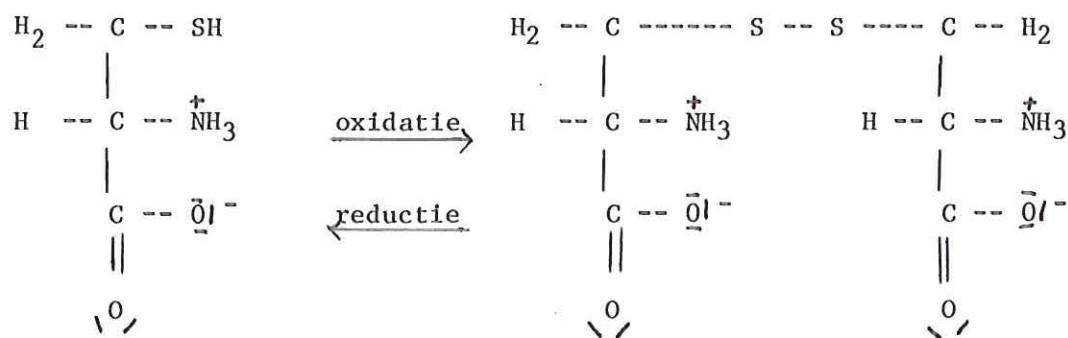
De analyse van cystine-cysteïne wordt polarografisch verricht. Na harmonisatie en normalisatie kan de methode in EEG-verband als officiële analysemethode erkend worden.

Om tot harmonisatie te komen vinden ringonderzoeken plaats tussen laboratoria in de lidstaten en in Zwitserland. In Nederland wordt voor wat betreft de polarografie en HPLC methoden aan de ringonderzoeken meegewerkt door o.a. het RIKILT.

3.2 De globale samenstelling van magere melkpoeder

Cysteïne is een aminozuur dat behalve de $-NH_2$ en $-COOH$ ook een $-SH$ groep in zijn moleculaire structuur heeft.

Bij oxidatie van 2 cysteïnemoleculen ontstaat cystine.



L-cysteïne

L-cystine

Cysteïne en cystine komen niet vrij voor in melk maar zijn met andere aminozuren gebonden in diverse melkeiwitten. De globale samenstelling van melk is water (87%), lactose (4,6%), vet (3,9%) en eiwit (3,25%). Dit eiwit bestaat grotendeels uit caseïne namelijk 80%.

Ook caseïne bestaat weer uit meerdere eiwitten (± 10) waarvan er twee geringe hoeveelheden cystine bevatten.

Veruit de grootste hoeveelheid cystine bevindt zich in het resterende weieiwit. Weieiwit bestaat uit serumeiwitten, dat zijn in water oplosbare eiwitten waarvan de meeste zelfs niet bij het ISO-electrische punt neerslaan.

3.3 De bepaling van het cystine-cysteïne gehalte in magere melkpoeder

In magere melkpoeder is ca. 17% van het melkeiwit weieiwit (het overige eiwit is caseïne) het cystine-cysteïne gehalte in magere melkpoeder is hoewel seizoengebonden relatief constant.

Als er in een monster meer cystine-cysteïne aangetroffen wordt dan op grond van $\pm 17\%$ weieiwit mogelijk is, wordt de toevoeging van wei aan melk bewezen geacht.

Door reductie van cystine met behulp van een sulfiet-ureumbuffer is het niet noodzakelijk om de gehalten cystine en cysteïne afzonderlijk te bepalen.



Aan de cystine bevattende oplossing wordt een overmaat methylkwikchloride (MeHgCl) toegevoegd. Na reactie



wordt de overmaat MeHgCl polarografisch bepaald.

Vanzelfsprekend wordt ook een methylkwikchlorideoplossing geanalyseerd die geen cystine bevat zodat het pieklengteverschil (piekverlaging) een maat is voor de hoeveelheid cystine-cysteïne in het monster.

Omdat de piekhoogte van de "blanco" afhankelijk is van o.a. de methylconcentratie en het apparaat (capillair) is een directe vergelijking van piekhoogten tussen laboratoria niet zinvol.

Kwantificeren geschiedt dan ook door vergelijking met een externe cystine-standaard.

Door van ieder monster resp. 50-100 en 150 mg af te wegen verkrijgt men drie coördinaten op een lijn die het verband tussen piekverlaging en inweeg weergeeft.

Met behulp van lineaire regressie wordt de richtingscoëfficiënt (RC) van deze lijn berekend. Tevens kan de gemiddelde correlatie van de afzonderlijke punten gecontroleerd worden. Ook wordt de RC van de cystine-standaard bepaald.

Door de RC van het monster te delen door de RC van de ijkoplossingen kan het gehalte cystine in het monster berekend worden.

Uit onderzoek binnen werkgroepen van EEG en ASFALEC is gebleken dat door laboratoria in de lidstaten vrij grote overeenstemming van resultaten kan worden verkregen.

- Voor het ringonderzoek werd een twaalftal monsters onderzocht en wel:
- melkpoeder (4)
 - melkpoeder met bekende hoeveelheid toegevoegd weipoeder (5)
 - melkpoeder met onbekende hoeveelheid toegevoegd weipoeder (2)
 - weipoeder (1)

3.4 Bespreking van de resultaten

De resultaten van de bij het ringonderzoek betrokken instituten zijn vermeld in tabel 1.

De monsters werden geanalyseerd met behulp van Differential Puls Polarografie. Voor het RIKILT heb ik met twee apparaten aan het onderzoek deelgenomen nl. PAR 374 en Metrohm 506.

De met deze apparaten verkregen gegevens worden met de resultaten van andere laboratoria weergegeven in grafiek 1. De punten uit de grafieken hebben betrekking op de monsters D4 en D6 t/m D12. Uit deze grafiek blijkt dat de analyseresultaten van de PAR aan relatief grote schommelingen onderhevig zijn, dit houdt waarschijnlijk verband met lichte verontreiniging van het kwikcapillair.

Ook de uitkomsten van de Metrohm en van andere laboratoria zijn aan schommelingen onderhevig.

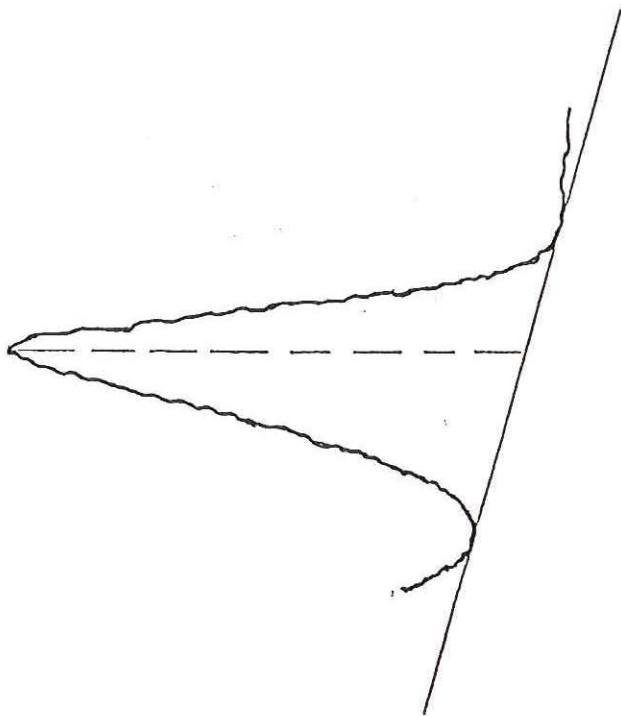
De oorzaak van de onderlinge verschillen is moeilijk te achterhalen wel kan het weigehalte in melk van nature wat variëren. Toch is er sprake van enige overeenkomsten van de analyseresultaten al zijn deze verre van perfect. Het verschil tussen de boven- en ondergrens (de zg. bandbreedte) is gemiddeld 8-9%. Dit is grafisch uiteengezet in grafiek 2.

Mogelijke oorzaken van deze verschillen zijn: Een afwijkende ijklijn waardoor de monsters over de hele linie hoger of lager uitkomen. Dit lijkt het geval te zijn met de Metrohm en Labor 8.

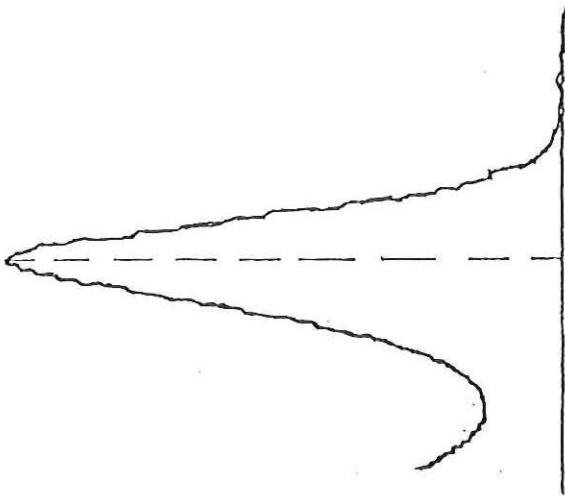
De meest voorkomende afwijking van de ijklijn treedt op bij ijkoplossingen waarvan de cystine niet volledig is opgelost.

Een oplossing hiervoor is het oplossen van de cystine in een 0,1 M HClO_4 oplossing waarbij het cystine gehalte over een langere tijd constant blijft.

Figuur 8 Methode van piekmeting

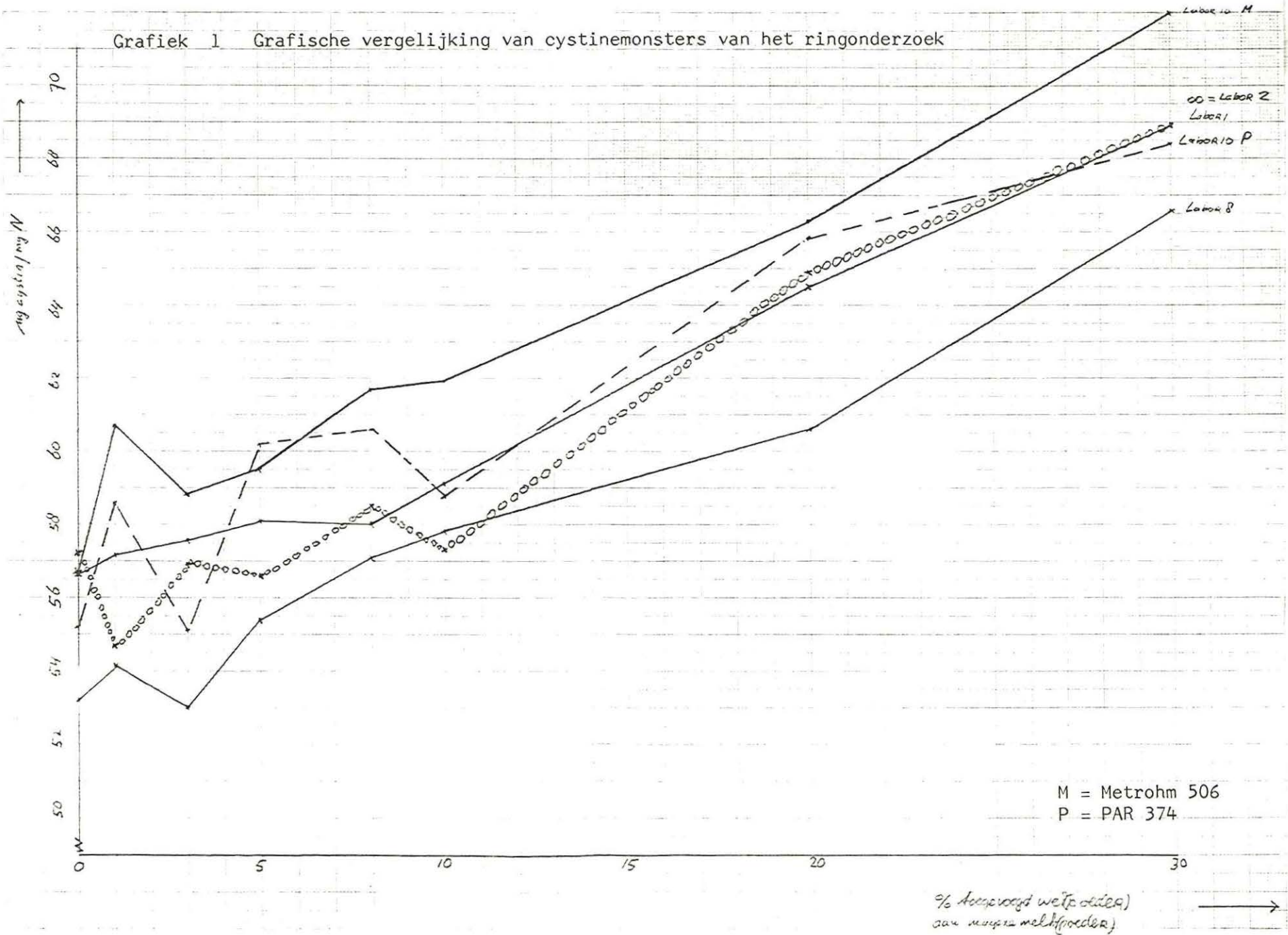


Angulaire piekmeting



basislijnmeting

Grafiek 1 Grafische vergelijking van cystinemonsters van het ringonderzoek

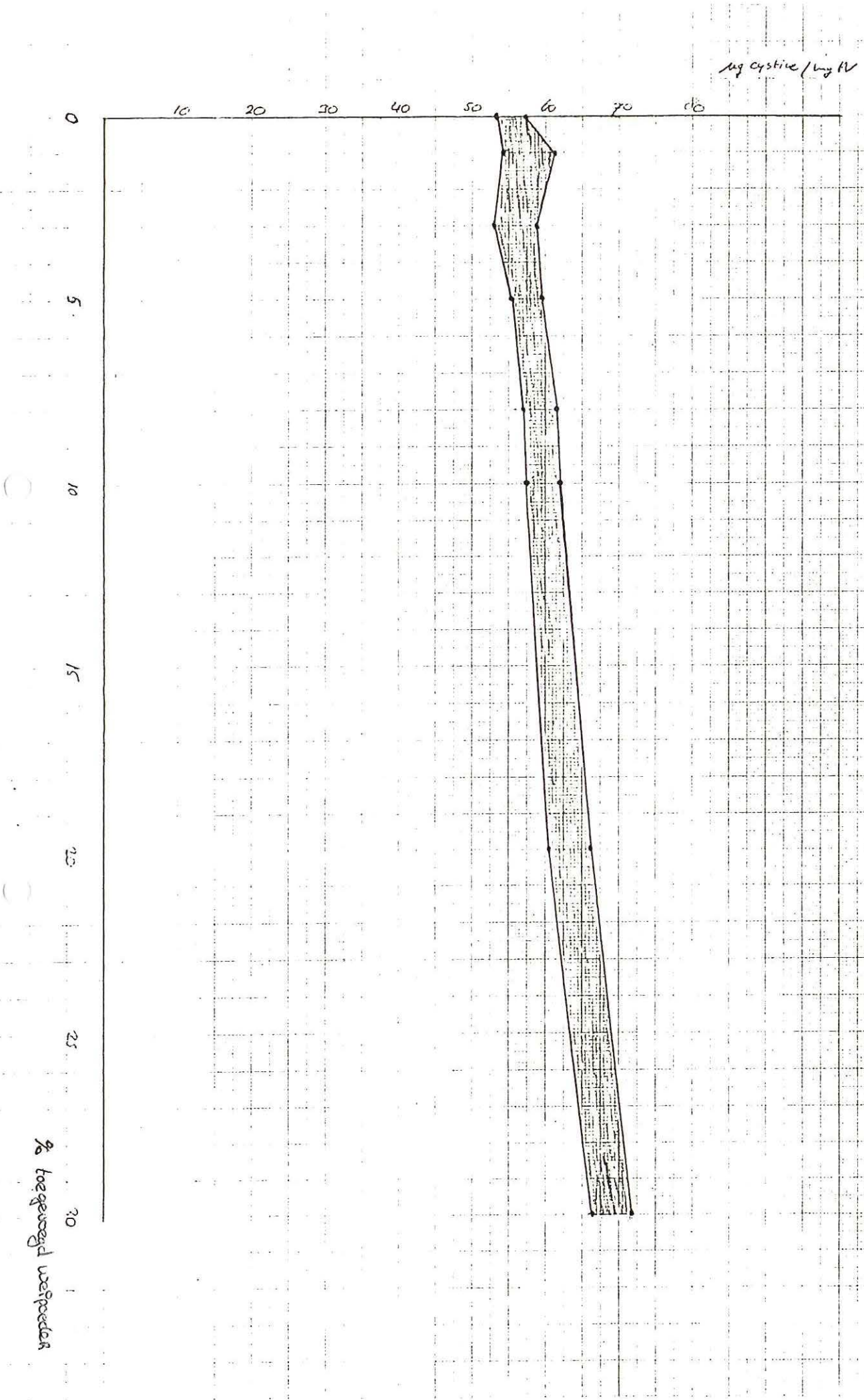


Ook de wijze van piek interpretatie is van belang, hierbij onderscheidt men twee methoden namelijk de basislijnmeting en de tangiale piekmeting zie figuur 8. In eerste instantie zijn de pieken met de basislijnmethode gemeten en achteraf met de tangiale piekmeting. Hierbij bleek dat met de laatstgenoemde methode de cystinegehalten wat daalde, zie grafiek 3.

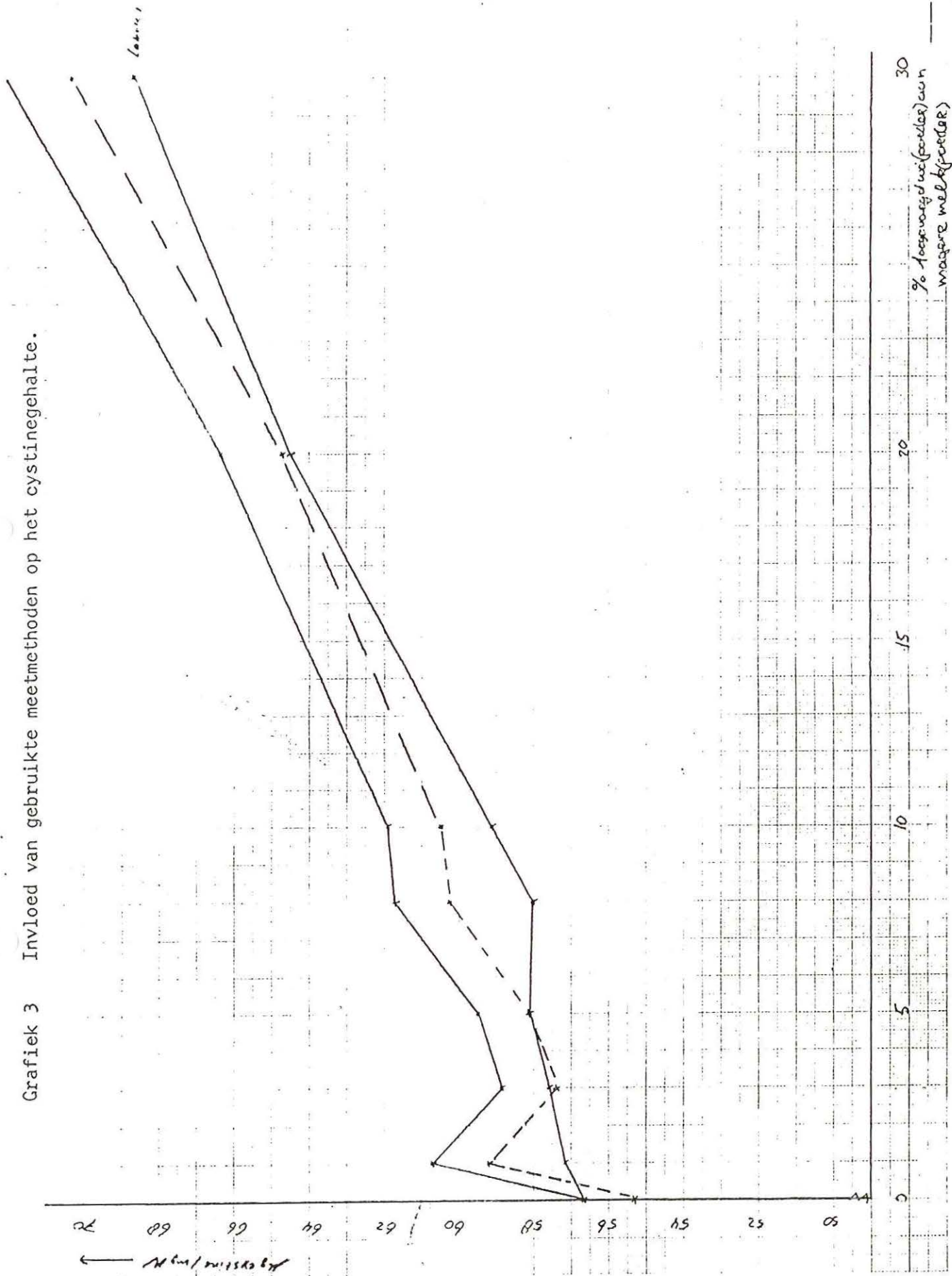
Voor een goede onderlinge vergelijking is het noodzakelijk om ook de gevonden eiwitgehalten in het eindresultaat te betrekken.

In grafiek 4 zijn cystinegehalten ook doorgerekend met de eiwitgehalten van laboratoria 2. Hierbij is zichtbaar dat de gehalten cystine bij gebruik van elkaars eiwitgehalte meer overeenkomen.

Grafiek 2 Bandbreedte van cystinegehalte in magere melkpoeder.



Grafiek 3 Invloed van gebruikte meetmethoden op het cystinegehalte.



3.5 Conclusies

De methode is goed bruikbaar voor de opsporing van vervalsing van magere melkpoeder met weipoeder. Op grond van de resultaten kan een vervalsing van melk met 5% wei of meer als bewezen geacht worden. Gezien de optredende verschillen is een verdere harmonisatie van de methode noodzakelijk. De verschillen kunnen voornamelijk verklaard worden door afwijkingen in de cystine ijklijn, verschillen in het eiwitgehalte en wijze van piekmeting.

De afwijking van de ijklijn, die het gevolg is van het niet geheel oplossen van cystine, kan voorkomen worden door de cystine op te lossen in 0,1 M HClO₄ waarbij het cystinegehalte stabiel blijft. Het is wenselijk dat alle laboratoria dezelfde wijze van piekmeting toepassen waarbij de tangiale piekmeting de voorkeur verdient.

3.6

Literatuur

- Mrowetz, Y und Tomasov, J., Bestimmung des Molkenproteinanteils am Gesamtprotein von Copräzipaten, Milchwissenschaft 35 Jahrgang nr. 11 1980.
- Dr E. Lechner, Erfahrungen der Untersuchung von Milchtrockenprodukten, Die Molkerei - Zeitung Welt der Milch, 35. Jahrgang, nr. 42, 1981.
- Dr F. Freese en Dr W.E. van der Linden, Electrochemische analysemethoden, Agron Elsevier, 1971.
- Gebrauchsanweisung Polarecord E 506. Metrohm AG CH 9100 Herisau Zwitserland.
- Dr ir C.J. Mooring, Electrochemische analysemethoden, syllabus, Vovol cursus 1983.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT

1. Toestellen en hulpmiddelen

1.1 Polarograaf

Instrumentele parameters:

- rapid - U = 1,5 - I comp = 160
- p - t drop = 0,8 - schuifknop I comp = 0
- U start = -0,4 - mm/t drop = 0,25 - DP = 0, UDP = 100

Deze parameters worden nooit veranderd.

1.2 Pipetten van 1 ml en 25 ml.

1.3 Maatkolven van 50, 100 en 1000 ml.

1.4 Toestellen en hulpmiddelen voor het bepalen van met zinksulfaat-neerslagbare N.

2. Reagentia

2.1 Methylkwikchlorideoplossing - Stockoplossing

Los in een maatkolf van 50 ml precies 1256 mg methylkwikchloride (CH_3HgCl) op in N,N-dimethylformamide (DMF) en vul aan tot de merkstreep met DMF.

2.2 Methylkwikchlorideoplossing ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$)

Breng 2 ml van oplossing 2.1 in een maatkolf van 100 ml samen met 23 ml DMF. Vul aan met water tot de merkstreep.

2.3 Sulfiet-ureumbuffer, pH 9,2

Breng in een bekerglas van 1 l achtereenvolgens 9 g NH_4Cl , 25 g Na_2SO_3 (of 50 g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 40 g KCl en 500 g ureum. Vul aan met water tot ongeveer 980 ml.

Verwarm het mengsel tijdens het oplossen in een warmwaterbad om de oplossingswarmte te compenseren. Roer voorzichtig. Stel de pH in op $9,2 \pm 0,1$ met NH_4OH , 25%.

Breng de oplossing voorzichtig over in een maatkolf van 1000 ml (glazen staafje!) en vul aan tot de merkstreep met water.

Bewaar deze buffer gedurende maximaal 1 week in een gesloten fles.

Opmerking

Bij het bereiden van deze buffer moet contact met lucht zoveel mogelijk vermeden worden.

3. Werkwijze

3.1 Blanko-waarde

Pipetteer in een polarograafvatje 5 ml water, 25 ml buffer (2.3) en 2 ml CH_3HgCl (2.2). Laat gedurende ongeveer 30 sec. N_2 doorborrelen. Sluit de N_2 -stroom af en neem een polarogram op onder de omstandigheden 1.1.

3.2 Poeder

Weeg in 3 polarograafvatjes resp. 50, 100 en 150 ml poeder af. Voeg 5 ml water toe en meng voorzichtig met een glazen staafje tot al het poeder is opgelost. Voeg 25 ml buffer (2.3) toe, meng voorzichtig en laat 2 minuten rusten.

Voeg 2 ml CH_3HgCl -oplossing (2.2) toe en polarografeer zoals in 3.1.

3.3 IJking

Weeg nauwkeurig 120 mg cystine af en breng dit in een maatkolf van 1000 ml. Vul aan tot de merkstreep met water. Breng een magnetisch roerstaafje in de kolf, dek deze af met parafilm en verwarm bij 60°C onder roeren gedurende ongeveer 4 uur tot alles opgelost is. Koel af tot kamertemperatuur. Voer dit 3 maal uit zodat men tenslotte 3 standaardoplossingen heeft.

3.3.2 Met elke standaardoplossing worden de volgende bepalingen uitgevoerd:

Pipetteer in 5 polarograafvatjes respectievelijk 1, 2, 3, 4 en 5 ml cystine-oplossing (3.3.1) en 4, 3, 2, 1 en 0 ml water. Voeg 25 ml buffer (2.3) toe en 2 ml CH_3HgCl -oplossing (2.2). Meng voorzichtig en polarografeer zoals in 5.1.

4. Berekeningen

4.1 Bepaling van de piekhoogte

De piekhoogte wordt gemeten in mm, loodrecht op de horizontale raaklijn aan het laagste punt van het polarogram (zie voorbeeld).

4.2 Berekening van de ijklijn voor elke cystine-oplossing

- Meet de hoogte van elke piek van de polarogrammen bekomen in 3.3.2 zoals beschreven in 4.1.
- Meet de hoogte van de blanco (3.1) zoals beschreven in 4.1.
- Bepaal voor elke piek het hoogteverschil = blanco (3.1) - ijkpiek (3.3.2). Dit zijn de waarden y_1 tot y_5 .
- Bepaal de preciese hoeveelheid cystine die elke gepolarografeerde ijkoplossing (3.3.2) bevat. Dit zijn de waarden x_1 tot x_5 .
- Bereken de regressiecoëfficiënt R volgens:

$$R = \frac{5 \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{5 \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}$$

$$x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_5$$

$$x_i^2 = x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_5^2$$

$$y_i = y_1 + y_2 + \dots + y_5$$

$$y_i^2 = y_1^2 + y_2^2 + \dots + y_5^2$$

$$x_i y_i = x_1 y_1 + x_2 y_2 + \dots + x_5 y_5$$

4.3 Als eindwaarde wordt het gemiddelde van de 3 bekomen R-waarden (1 per gebruikte cystine-oplossing) genomen indien deze niet noemenswaardig van elkaar verschillen. Bij de aanwezigheid van 1 sterk afwijkende waarde wordt deze laatste weggelaten bij de berekening van het gemiddelde.

4.4 Berekening van een poeder

- Bepaal voor elke piek bekomen in 3.2 de hoogte volgens 4.1.

- Bepaal het hoogteverschil door elke hierboven verkregen waarde van de hoogte van een blanco af te trekken. Men verkrijgt aldus de 3 waarden y_1, y_2, y_3 .
- Bepaal het juiste gewicht van de 3 afwegingen en bereken, uitgaande van de waarde voor de met $ZnSO_4$ -neerslagbare N, het aantal mg N in elke afweging. Dit zijn de 3 waarden x_1, x_2 en x_3 .
- Bereken de golfvermindering/mg N als

$$B = \frac{3 \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{3 \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i} \quad (\text{zie ook 4.2})$$

- Bereken het aantal μg cystine/mg N als $\frac{G}{R} \times 1000$

(R = het resultaat van 4.3).

5. Opmerkingen

- Bij verandering van kapillair mag de attenuatie (A/mm) veranderd worden en wel zodanig dat de hoogte van de blanco maximaal wordt.
- Na elke verandering van kapillair moet er een nieuwe ijklijn (3.3) opgesteld worden.
- Indien de hoogte van de blanco meer dan 1 cm onder de normale waarde komt moet het kapillair vervangen worden.
- Voor elke reeks bepalingen de hoogte van de Hg-kolom regelen!