

Afd. Vlees en Vleesprodukten 1983-02-03

VERSLAG 83.9

Pr.nr. 303.0010

Onderwerp: Toetsing van een spaanse
analysemethode voor bloedmeel
in gedenatureerd melkpoeder.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (2x), afd. Vlees en
Vleesprodukten (4x), afd. Normalisatie (Humme),
Projektbeheer, Projektleider (?)

Projekt: Dienstverlening diversen

Onderwerp: Toetsing van een spaanse analysemethode voor bloedmeel in gedenatureerd melkpoeder

Doel:

Ten behoeve van de exportcertificering door de Veterinaire Dienst van met bloedmeel en vismeel gedenatureerde melkpoeder is een in Spanje voorgeschreven analysemethode voor bloedmeel getoetst op haar bruikbaarheid.

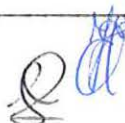
Samenvatting:

De analysemethode, afkomstig van het Spaanse Ministerie van Financiën, is vertaald en getoetst aan de hand van twee door de afd. Microscopie onderzochte monsters en twee zelf bereide monsters melkpoeder, gedenatureerd met bloedmeel. Verder is de specifieke absorptie van enkele bloedmelen die gebruikt worden voor de denaturatie van melkpoeders, bepaald.

Conclusie:

- Het is goed mogelijk om met de in spanje voorgeschreven analysemethode het gehalte aan bloedmeel in gedenatureerde melkpoeders te bepalen. Het gehalte is nauwkeurig te bepalen als ook over het denaturatiemiddel wordt beschikt.
- De in de analysemethode gehanteerde gemiddelde referentiewaarde voor de specifieke absorptie van het denaturatie (bloedmeel) is ca. 20% lager dan de specifieke absorptie van de onderzochte, nederlandse bloedmelen die voor denaturatie worden gebruikt.
- De spreiding in de gemeten waarde van de specifieke absorptie van bloedmeel komt bij één monster waarschijnlijk door inhomogeniteit van het monster. De nauwkeurigheid van de bepaling is echter ook niet zo groot dat de E_1^1 waarde tot op 0,1 kan worden opgegeven.

Verantwoordelijk: drs H.L. Elenbaas
Medewerker/Samensteller: G. Cazemier
Projectleider: ?



Inleiding

In Spanje ingevoerd melkpoeder, bestemd voor diervoeding, moet zijn gedenatureerd met een mengsel van bloedmeel en vismeel. (Van beide produkten moet volgens de Spaanse verordening minimaal 1% en maximaal 1,5% in het eindprodukt aanwezig zijn). In verband met moeilijkheden die een nederlandse fabrikant ondervond bij de export van melkpoeder naar Spanje, werd het RIKILT door de Veterinaire Dienst benaderd met het verzoek enkele onder gekontroleerde omstandigheden gedenatureerde produkten m.b.v. de in Spanje gehanteerde methode te bepalen. De VD moet certificeren. Vanwege het urgente karakter van het onderzoek is de methode niet uitputtend getoetst.

Methode

Het principe van deze methode is het in water oplossen van het bloedmeel waarna de haemgroep van het haemoglobine wordt afgesplitst met azijnzuur. De extinktie bij 396 nm is een maat voor het bloedgehalte. Om het gehalte aan bloedmeel in een monster nauwkeurig te kunnen bepalen is het nodig om de specifieke absorptie E_1^1 te bepalen. Indien E_1^1 niet bekend is wordt een waarde van 52,4 aangehouden.

Monstermateriaal

Om enige ervaring met de methode op te doen werden van een standaardmonster bloedmeel en van een standaardmengsel bloedmeel/vismeel (50/50) de specifieke extinktiefactoren E_1^1 bepaald.

Met behulp van deze waarden werden van twee monsters de gehalten aan bloedmeel en bloedmeel/vismeelemengsel bepaald. Het gehalte aan bloedmeel/vismeelemengsel was reeds door de afdeling Microscopie bepaald door sedimentatie van de in vismeel aanwezige graatjes.

Tevens werden 2 mengsels melkpoeder gemaakt en bepaald, waaraan een bekende hoeveelheid bloedmeel/vismeelemengsel was toegevoegd.

Van de V.D. werden in 1982 2 monsters gedenatureerde melkpoeder ontvangen met het in deze monsters verwerkte bloedmeel. Deze werden op het RIKILT genummerd van 32702 t/m 32705.

In 1983 werd nog een 5-tal monsters bloedmeel ontvangen, genummerd 11398 t/m 11402.

32702 was bloedmeel Sibbing Egberts
32703 was bloedmeel Vreugdenhil
32704 was melkpoeder Sibbing Egberts
32705 was melkpoeder Vreugdenhil.
11398 t/m 11402 waren in 1982 geproduceerde bloedmelen die voor denaturatie van melkpoeders waren gebruikt.

Resultaten

In tabel 1 zijn de resultaten verwerkt van de monsters afkomstig van de afdeling Microscopie.

Uit deze resultaten blijkt, dat m.b.v. de spectrofotometrische methode het gehalte aan denaturatiemiddel goed is te bepalen. De resultaten komen ook goed overeen met de op de afdeling Microscopie gehanteerde sedimentatiemethode.

De grote standaardafwijking van E_1^1 van het mengsel (E_1^1 van het bloedmeel was in simplo bepaald) zou kunnen wijzen op een vrij grote onnauwkeurigheid in de bepaling of op inhomogeniteit van het mengsel. Om dit te controleren werden vanuit een stamoplossing van het vismeel/bloedmeelmengsel diverse hoeveelheden gepipetteerd, waarin de E_1^1 waarden werden bepaald.

De hierbij gevonden waarden waren:

35,19 - 34,48 - 33,81 - 34,82 - 34,30
 $x = 34,5$ $s = 0,5$

Deze veel lagere standaardafwijking dan die, welke gevonden werd bij de eerdere E_1^1 bepaling, waarbij steeds opnieuw van het mengsel werd ingewogen, wijst op inhomogeniteit van het mengsel.

De standaardafwijking ($s = 0,5$) is echter nog vrij hoog. Dit komt door de onnauwkeurigheid van de spektrofotometer. Een verschil in aflezing van de absorptie van 0,001 resulteert in een verschil in de specifieke absorptie van 0,1. Dit verschil heeft echter nauwelijks invloed op de bepaling van de bloedmeelgehalten in melkpoeders.

Tabel 2 bevat de resultaten van de bepalingen van de door de V.D. meegenomen monsters. De veel grotere standaardafwijking van 32702 dan die van 32703 wijst op inhomogeniteit van het eerste monster.

De oorzaak hiervan is waarschijnlijk een slechtere oplosbaarheid van nr. 32702.

Dezelfde tendens zet zich voort in de bepaling van het bloedmeelgehalte in de melkpoeders. Het grotere verschil in standaardafwijking zou er op kunnen wijzen dat het bloedmeel in nr. 32705 tevens niet homogeen verdeeld is.

Er zijn totaal zeven E_1^1 waarden bepaald die uiteenliepen van 60,7 tot 71,6 (mediaan 67,7). De in spanje gebruikte specifieke absorptie van 52,4 ligt beduidend lager (ca. 20%) dan de door ons gevonden waarden. Dit betekent een tolerantie van ca. 20% van het gehalte aan bloedmeel in de melkpoeders.

Conclusies

- Uit dit vrij beperkte onderzoek blijkt, dat, indien men beschikt over de specifieke absorptie van het als denaturatiemiddel gebruikte bloedmeel, het goed mogelijk is om door middel van de in Spanje voorgeschreven spektrofotometrische methode nauwkeurig het gehalte aan bloedmeel te bepalen.
- Het nauwkeurig bepalen van de specifieke absorptie van de bloedmelen is erg moeilijk, door de sterke kleuring van de bloedmeeloplossing, waardoor de aflezing van de spektrofotometer niet voldoende nauwkeurig is.
- De in de methode voorgeschreven specifieke absorptie van 52,4, die moet worden gebruikt als geen standaard denaturatiemiddel aanwezig is, is voordelig in de gevallen waarin de juiste specifieke absorptie E_1^1 hoger is dan 52,4. Dit was het geval met alle tot dusver door ons onderzochte monsters bloedmeel.
- Er werd een duidelijk verschil in homogeniteit gevonden tussen 2 monsters bloedmeel.

Tabel 1. Bepaling gehalte denaturatiemiddel in 2 oudere monsters melkpoeder.

Bepaling E_1^1 bloedmeel 71,6.

Bepaling E_1^1 mengsel 50/50 bloedmeel/vismeeel 34,15 $s = 1,35$ ($n = 4$).

Monster oud (opgegeven gehalte 2,2%)

bloedmeelgehalte 1,2%

gehalte mengsel 50/50 2,5% microscopisch 2,4%.

Monster nieuw (opgegeven gehalte 3%)

bloedmeelgehalte 0,85%

gehalte mengsel 50/50 1,8% microscopisch 1,7%.

Eigen mengsel 1 (bevat 4,7% mengsel 50/50)

 bepaald 4,6%

Eigen mengsel 2 (bevat 0,8% mengsel 50/50)

 bepaald 1,0%.

Tabel 2. Bepaling gehalte bloedmeel van 2 monsters gedenatureerde melkpoeder

E_1^1 32702 = 68,2 $s = 1,1$ ($n = 4$)

E_1^1 32703 = 69,1 $s = 0,6$ ($n = 4$)

gehalte bloedmeel 32704 2,0% $s = 0,3$ ($n = 4$)

gehalte bloedmeel 32705 1,4% $s = 0,1$ ($n = 4$)

Door het gering aantal bepalingen zijn de berekeningen van de standaardafwijkingen waarschijnlijk niet statistisch verantwoord.

Bepaling van de specifieke absorptie van 5 in 1982 voor denaturatie gebruikte bloedmelen:

E_1^1 11398 60,7

11399 64,9

11400 67,5

11401 67,9

11402 66,9

Ministerio de Hacienda (Ministerie van Financiën).

Beschikking van de 28ste oktober 1980 voor het vaststellen van criteria voor de denaturatie van melk en wei, tariefpost nr. 04.04.A.2.

APPENDIX II

II.1 Bepaling van het percentage van oplosbaar bloed aanwezig in een monster gedenatureerde melk- of weipoeder.

II.2 Deze methode is gebaseerd op de verkrijging van de specifieke absorptie E_1^1 van de hemoglobine van het oplosbare bloed opgelost in een mengsel van ijsazijn-water bij 396 nm.

Bepaal vervolgens de absorptie van het monster bij dezelfde golflengte en onder vergelijkbare omstandigheden. Uit beide waarden laat zich het percentage oplosbaar bloed dat aanwezig is in het monster afleiden door toepassing van de desbetreffende formule.

II.3

II.3.1 Spectrofotometer met toebehoren (cuvet voor vloeistoflaag van 1 cm)

II.3.2 Magnetische roerder

II.3.3 Centrifuge

II.3.4 Maatkolf van 250 ml

II.3.5 Maatkolf van 100 ml

II.3.6 Pipet van 20 ml

II.3.7 Centrifugebuizen voor 10 ml vloeistof

II.3.8 Trechter met filter.

II.4

II.4.1 Mengsel van ijsazijn-water. Weeg 50 g ijsazijn en 50 g gedestilleerd water af. Meng en homogeniseer.

II.5 Bestaat uit twee onderdelen:

II.5.1 Bepaling van de specifieke absorptie in het monster oplosbaar bloed

Weeg, met een nauwkeurigheid van 1 mg, ca. 100 mg bloedmeel af en breng over in een bekersglas van 250 ml, voeg toe 150 ml gedestilleerd water en roer gedurende 5 min. Breng de oplossing over in een maatkolf van 250 ml en was het glas herhaalde malen met gedestilleerd water. Vul aan tot precies 250 ml. Neem vervolgens 20 ml van deze oplossing, giet uit in een maatkolf van 100 ml en vul nauwkeurig aan met het ijsazijnwatermengsel. Centrifugeer 10 ml van deze oplossing en meet de absorptie in een cuvet van 1 cm bij 396 nm, met als blanco de ijsazijnwateroplossing.

$$E_1^1 = 12,5 \times \frac{A}{P}$$

E_1^1 = specifieke absorptie

A = afgelezen absorptie

P = gewicht van het bloedmeel in g.

Als de specifieke absorptie E_1^1 lager is dan 50, mag het bloedmeel niet als denatureermiddel gebruikt worden.

II.5.2 Bepaling van de absorptie van het monster melk of gedenatureerde wei

Weeg nauwkeurig 10 g melk of weipoeder en breng over in een bekersglas van 250 ml, voeg toe 150 ml gedestilleerd water dat eerst verwarmd is tot 40-50°C en roer totdat zich een emulsie vormt; breng vervolgens deze emulsie over in een maatkolf van 250 ml, was het glas herhaalde malen met gedestilleerd water, koel en vul nauwkeurig aan tot 250 ml; neem 20 ml van de emulsie en giet uit in een maatkolf van 100 ml; vul nauwkeurig aan met het mengsel van ijsazijn en gedestilleerd water.

Indien de oplossing troebel is, centrifugeer (dan) 10 ml gedurende 15 min bij 5700 omwentelingen; verwijder vervolgens met behulp van een spatel het bovendrijvende vlies, filtreer het centrifugaat en herhaal zonodig de bewerkingen zodat de oplossing tenslotte helder blijft. Meet vervolgens de absorptie in de cuvet van 1 cm bij 396 nm, met als blanco de azijn-wateroplossing.

II.6 Het percentage aan oplosbaar bloed leidt men af door toepassing van de volgende formule

$$S = \frac{A}{E_1^i} \times \frac{1250}{P}$$

S = percentage oplosbaar bloed aanwezig in het monster

A = absorptie afgelezen in II.5.2

P = gewicht van de melk of het weipoeder uitgedrukt in g

E_1^i = specifieke absorptie van het bloed bepaald in II.5.1.

Indien men deze waarde niet heeft kunnen bepalen vóór de toevoeging van het bloedmeel aan de melk of de wei, wordt als gemiddelde referentiewaarde $E_1^i = 52,4$ gebruikt.