



XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CHẤT DỊ NGUYÊN CASEIN TRONG SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM TỪ SỮA

Nguyễn Thị Minh Hòa¹, Nguyễn Thị Hà Bình, Trần Cao Sơn
Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

(Ngày đến tòa soạn: 5/2/2018; Ngày sửa bài sau phản biện: 8/3/2018; Ngày chấp nhận đăng: 16/3/2018)

Tóm tắt

CASEIN trong sữa và các sản phẩm từ sữa được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector PDA tại bước sóng 280 nm và bằng phương pháp ELISA "kẹp" (sandwich). Phương pháp sắc ký lỏng cho phép định lượng được từng dạng casein (alpha, beta, kappa), xác định được tỷ lệ các dạng casein do đó cho phép đánh giá nguồn gốc sữa (sữa bò, sữa dê). Phương pháp ELISA cho phép xác định casein ở mức hàm lượng thấp, đáp ứng yêu cầu phân tích chất dị nguyên theo quy định hiện nay (10 mg/kg). Các kết quả thẩm định cho thấy phương pháp HPLC có giới hạn định lượng (LOQ) 0,8 g/100g, độ thu hồi đạt từ 78 - 98%, hệ số biến thiên tương đối trong khoảng 2,4 - 9,5%. Phương pháp ELISA có giới hạn phát hiện 3 mg/kg, độ thu hồi đạt từ 83 - 109%, hệ số biến thiên tương đối 11%. Các phương pháp đã được ứng dụng để xác định hàm lượng casein trong 20 mẫu sữa, cốm, bánh kẹo các loại được lấy trên thị trường Hà Nội.

Từ khóa: HPLC, ELISA, casein, sữa

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Casein là protein chứa phospho được tìm thấy chủ yếu trong sữa của các động vật có vú. Chúng thường chiếm 80% tổng lượng protein trong sữa bò và khoảng 20 đến 45% tổng lượng protein trong sữa mẹ. Casein cung cấp cho cơ thể các acid amin, carbohydrat và hai nguyên tố thiết yếu là calci và phospho. Tuy nhiên, casein là một chất có thể gây dị ứng trên người. Một số người khi ăn phải thực phẩm chứa casein có thể bị dị ứng, đặc biệt là casein từ sữa bò (sữa dê và sữa cừu ít gây dị ứng hơn so với sữa bò). Các phản ứng dị ứng thường gặp là đầy hơi, đau dạ dày, khó thở, phù nề niêm mạc, giảm cân, chậm lớn, sốc phản vệ...[6,7,9]. Dị ứng sữa chiếm khoảng 33% tổng số các loại dị ứng thực phẩm và tỷ lệ dị ứng sữa ở người chiếm khoảng 5%. Casein trong sữa của các loài khác nhau thì khác nhau về tỷ lệ, thành phần acid amin và bản đồ peptid của chúng.

Ở Nhật, giới hạn phát hiện của phương pháp cần để xác định chất dị nguyên là 10 mg/kg [1]. Các nước châu Âu cũng quy định nồng độ thấp nhất cho phép của các chất dị nguyên là 10 mg/kg [2]. Mức 10 µg/g cũng được nhiều nước xem là mức giới hạn cần ghi nhãn là sản phẩm có chứa sữa hay không. Ở Việt Nam chưa có quy định về mức nồng độ thấp nhất cho phép của các chất dị nguyên trong các sản phẩm thực phẩm..

Hiện nay, trên thế giới có một số phương pháp xác định casein bằng HPLC, ELISA, điện di, LC-MS/MS [3,4,5,8]. Phương pháp điện di có độ ổn định không cao. Phương pháp LC-MS/MS gặp nhiều khó khăn do cần phân giải casein thành các chuỗi polypeptid đặc trưng. Phương pháp ELISA là phương pháp được AOAC khuyến cáo sử dụng cho nhóm chất dị nguyên trong sữa, tuy nhiên phương pháp này mắc sai số rất lớn khi phân tích các mẫu có hàm lượng cao. Phương pháp HPLC với việc sử dụng sắc ký loại cỡ hoặc sắc ký pha đảo được nhiều tác giả nghiên cứu nhằm thay thế phương pháp ELISA, tuy nhiên độ nhạy vẫn chưa đạt được yêu cầu. Ở Việt Nam chưa có tiêu chuẩn về phương pháp chính thức để xác định casein.

Nghiên cứu này khảo sát phương pháp ELISA để xác định được casein ở mức hàm lượng thấp (áp dụng cho đối tượng chất dị nguyên trong sữa với mức 10 µg/g), ngoài ra phương pháp HPLC

¹ Điện thoại: 01687344689 Email: nguyenthiminhhoa94@gmail.com

cũng được khảo sát để xác định các dạng casein, từ đó phân biệt được sản phẩm sữa bò và các loại sữa khác hoặc trộn trái phép các loại sữa khác như sữa dê, sữa cừu vào sữa bò nhằm gây nhầm lẫn cho người tiêu dùng.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Casein sữa bò gồm: alpha-casein (α -casein), beta-casein (β -casein), kappa-casein (K-casein)

Đối tượng mẫu gồm: sữa, cốm, bánh kẹo được lấy ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội. Mẫu cốm và bánh kẹo dành cho đối tượng bị dị ứng casein được công bố không chứa casein hoặc không chứa sữa, do đó được ưu tiên chọn để khảo sát xác định chất dị nguyên casein trong nhóm đối tượng mẫu này.

2.2. Hóa chất

Chuẩn casein bovine (Sigma) và chuẩn α -casein (Sigma) với độ tinh khiết $\geq 75\%$. Các hóa chất sử dụng đều là các hóa chất tinh khiết phân tích: Acetonitril (Merck), Methanol (Merck), Amoni acetate (Merck), Trifluoroacetic acid (Merck). Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng kit thử ELISA AgraQuant Casein của Romers.

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối detector UV của Waters; thiết bị đọc ELISA của Thermo Fisher; và các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm gồm máy đồng nhất mẫu; cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg); thiết bị lắc xoay và máy ly tâm.

2.4. Khảo sát và thẩm định phương pháp HPLC

Sắc ký lỏng pha đảo với cột sắc ký PRP-3 (10 μ m 300 Å 4,1 x 150 mm) được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu này [10]. Khảo sát các điều kiện gồm gradient pha động, nhiệt độ cột, tốc độ dòng.

Qua tham khảo tài liệu, chúng tôi đưa ra quy trình dự kiến như sau: Mẫu được hòa tan trong nước, ly tâm lạnh loại béo, rửa casein bằng đệm amoni acetat pH = 4,3, rửa rửa thu được bằng aceton, hòa tan rửa bằng dung môi pha động, lọc qua màng và đo trên thiết bị HPLC. Quá trình lựa chọn dung môi chiết và dung dịch đệm tạo rửa casein ảnh hưởng lớn đến hiệu suất chiết mẫu, do đó chúng tôi khảo sát hai điều kiện xử lý mẫu này [10].

Phương pháp được thẩm định một số thông số cơ bản gồm tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại và độ thu hồi theo hướng dẫn của AOAC.

2.5. Khảo sát và thẩm định phương pháp ELISA

Kit thử ELISA AgraQuant Casein Assay là loại ELISA kiểu sandwich. Quá trình xử lý mẫu được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phương pháp được thẩm định về tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, độ lặp lại và độ thu hồi.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định casein bằng sắc ký lỏng HPLC

3.1.1. Xây dựng phương pháp xác định casein bằng sắc ký lỏng HPLC

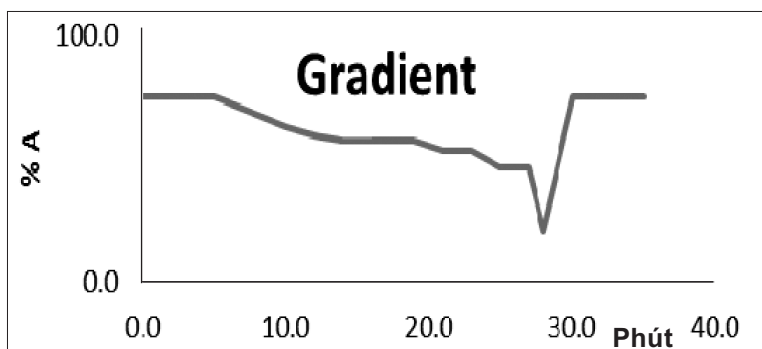
3.1.1.1. Lựa chọn pha tĩnh

Cột tách là bộ phận quan trọng của hệ thống sắc ký, đóng góp phần quan trọng quyết định quá trình tách sắc ký. Qua tham khảo các tài liệu [2,8,7] chúng tôi khảo sát 2 loại cột sắc ký gồm cột C18 (3,5 μ m; 4,6 x 150 mm) của hãng Waters và cột sắc ký PRP-3 (10 μ m 300 Å 4,1 x 150 mm) của hãng Hamilton, đây là cột sắc ký có hạt nhồi là các polystyren-divinylbenzen đồng trùng hợp gắn trên nền silica.

Kết quả cho thấy, việc dùng cột PRP cho khả năng tách ba loại casein rõ ràng, thuận lợi cho việc định lượng casein theo nhóm chất. Cột PRP có ưu điểm ít bám dính bề mặt với các hợp chất hữu cơ và bền nhiệt hơn so với cột C18.

3.1.1.2. Khảo sát thành phần pha động

Một số gradient pha động gồm 2 kênh: kênh A (acid fluoroacetic 0,1%); Kênh B (acetonitril: nước : acid fluoroacetic = 950 : 50 : 1 (v/v/v)) đã được khảo sát thu được gradient tối ưu thể hiện trong hình 1:

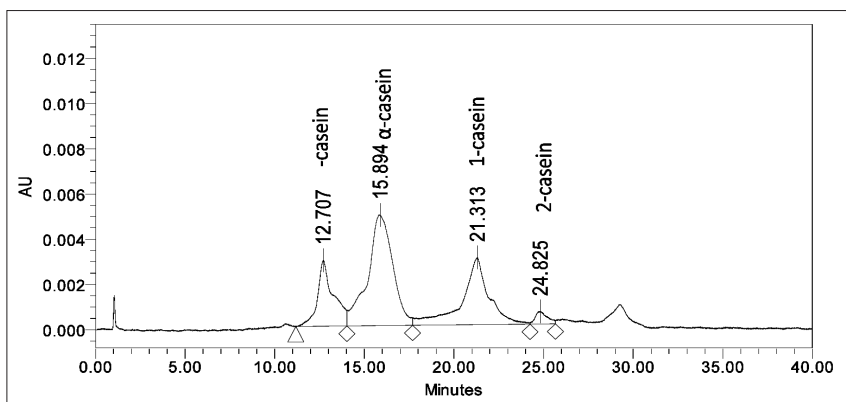


Hình 1. Chương trình gradient dung môi pha động

Chương trình pha động được khảo sát thay đổi thành phần khá chậm trong những khoảng thời gian ngắn do tính chất của các nhóm casein rất giống nhau. Ba loại casein được quan tâm là alpha, beta, kappa- casein, tuy nhiên, mỗi loại là một nhóm chất, do đó, pic sắc ký thu được của mỗi loại là một nhóm các chất có cấu trúc rất giống nhau. Vì vậy, để tách được các nhóm casein này cần thay đổi thành phần pha động chậm trong những khoảng thời gian rất ngắn.

3.1.1.3. Khảo sát nhiệt độ cột sắc ký

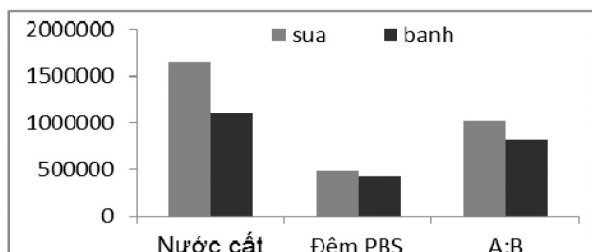
Nhiệt độ cột cũng đã được khảo sát nhằm đánh giá khả năng tách các nhóm casein trên cột sắc ký. Kết quả cho thấy, việc gia nhiệt cho cột sắc ký đến 45°C cho kết quả tách tốt hơn so với việc không gia nhiệt cho cột. Kết quả này có thể là do sự cồng kênh, kém tan của các nhóm casein. Sắc ký đồ của các casein được giới thiệu ở hình 2.



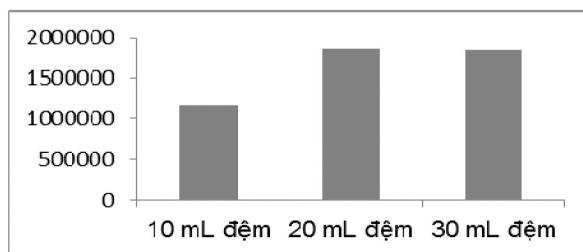
Hình 2. Sắc đồ hỗn hợp casein 1 mg/mL

3.1.1.4. Khảo sát quy trình xử lý mẫu cho phương pháp HPLC

Tiến hành khảo sát dung môi chiết ban đầu (gồm: nước cất, đệm muối phosphate, hỗn hợp dung môi AB), khảo sát pH của dung dịch đệm (4,3 ; 4,6), khảo sát thể tích dung dịch đệm (10 mL ; 20 mL ; 30 mL). Mẫu để kiểm soát hiệu suất chiết là mẫu sữa đậu nành (mẫu trắng) được thêm chuẩn ở mức 1 µg/g. Các kết quả thu được thể hiện trong hình 3 và hình 4.



Hình 3. Khảo sát dung môi chiết



Hình 4. Khảo sát thể tích dung dịch đệm

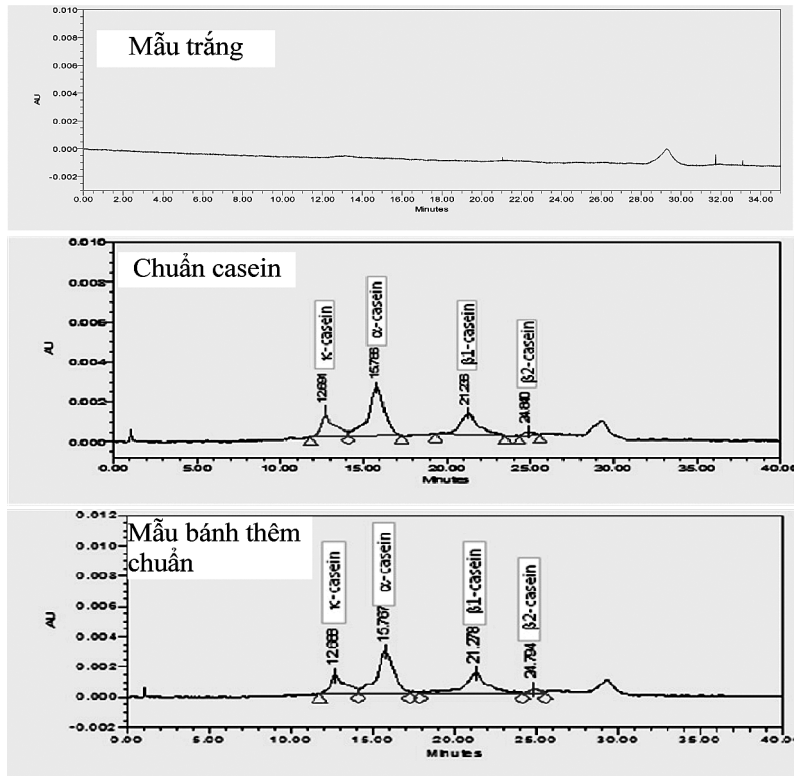
Các điều kiện tối ưu thu được sau khi tiến hành thực nghiệm như sau: dung môi chiết là nước cất, pH của dung dịch đệm là 4,3; thể tích dung dịch đệm 20 mL.

Quy trình chiết mẫu tối ưu như sau: Cân 2 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 20 mL nước, lắc ngang 30 phút. Ly tâm lạnh loại béo 6000v/p tại 0°C. Thêm 20 mL đệm amoni acetate 1M, pH = 4,3 để kết tủa casein. Ly tâm 6000v/p trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Lọc lấy kết tủa và rửa kỹ bằng acetone, để khô trong tủ hút. Hòa tan tủa bằng 20 mL hỗn hợp dung môi A:B (7:3). Lọc dịch qua màng, và phân tích trên thiết bị UPLC-PDA.

3.1.2. Thẩm định phương pháp phân tích bằng sắc ký lỏng

3.1.2.1. Tính đặc hiệu

Chất phân tích được xác định bằng bước sóng UV đặc trưng 280 nm với phổ đồ đặc trưng của từng chất. Mẫu trắng không cho tín hiệu chất phân tích (mẫu trắng được sử dụng là mẫu sữa đậu nành nguyên chất), chuẩn và mẫu thêm chuẩn cho tín hiệu chất tại cùng thời gian lưu.



Hình 5. Sắc đồ mẫu trắng, chuẩn, mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 1 mg/mL

3.1.2.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

LOD và LOQ được xác định thông qua đánh giá tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N). LOD được xác định tại nồng độ thu được S/N khoảng bằng 3; LOQ được xác định tại nồng độ thu được S/N khoảng bằng 10. LOD và LOQ tương ứng xác định được là 0,3 g/100g và 0,8 g/100g.

3.1.2.3. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính của phương pháp xác định được trong khoảng nồng độ từ 0,8 đến 10 mg/L tương ứng nồng độ trên mẫu từ 0,8 đến 10 g/100g.

3.1.2.4. Độ thu hồi, độ lặp lại

Độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn casein vào mẫu trắng (bánh, sữa) đã được xác định không chứa casein, tiến hành phân tích theo quy trình đã xây dựng. Mẫu sữa đậu nành được thêm chuẩn ở các mức nồng độ 1, 3, 5 g/100g. Kết quả phân tích có độ thu hồi R% nằm trong khoảng từ 78 - 98%, với RSD% từ 2,4 - 9,5%. Điều này cho thấy phương pháp có độ đúng, độ lặp lại đáp ứng yêu cầu của AOAC.



* Kết luận: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có độ tin cậy, độ đúng cao và có khả năng tách tốt các dạng casein nên rất phù hợp với việc xác định loại sữa trong các chế phẩm sữa và định lượng hàm lượng casein có trong các mẫu sữa và bánh kẹo bổ sung sữa

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích bằng ELISA

Chúng tôi sử dụng bộ Kít AgraQuant Casein của Hãng Romers và tham khảo quy trình xử lý mẫu của nhà cung cấp. Quy trình xử lý mẫu như sau: Cân 0,5 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL, thêm 10 mL đệm pha loãng nóng, lắc xoáy. Lắc ngang 15 phút. Ly tâm 10 phút tại 2000 v/p để thu lớp dịch trong ở giữa lớp lắng và lớp béo. Lấy 100 μ L dung dịch chiết vào giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Đổ bỏ dung dịch trong giếng, rửa giếng bằng 5 lần thể tích giếng. Vỗ nhẹ mặt giếng vào giấy thấm cho khô giếng. Thêm 100 μ L dung dịch cộng hợp (conjugate) vào mỗi giếng, ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng. Đổ bỏ dung dịch trong giếng, rửa giếng bằng 5 lần thể tích giếng. Vỗ nhẹ mặt giếng vào giấy thấm cho khô giếng. Thêm 100 μ L dung dịch cơ chất (substrate) vào mỗi giếng, ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm 100 μ L dung dịch dừng phản ứng (stop solution) vào mỗi giếng. Đo đo trên máy ELISA tại bước sóng 450 nm.

Chúng tôi tiến hành phân tích mẫu trắng (mẫu sữa đậu nành), mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 40 μ g/g. Kết quả phân tích mẫu cho mẫu sữa đậu nành không phát hiện casein (độ hấp thụ của mẫu sữa đậu nành thấp hơn độ hấp thụ của chuẩn 0 μ g/g), mẫu thêm chuẩn cho độ thu hồi 105%, đạt yêu cầu AOAC. Quy trình cho độ thu hồi tốt, do đó chúng tôi chọn quy trình xử lý mẫu này để thẩm định các thông số về tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ thu hồi. Đối tượng thẩm định là các mẫu cốm, bánh. Đây là đối tượng mẫu có bổ sung sữa ở mức hàm lượng thấp, hoặc không bổ sung sữa.

3.2.1. Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu của phương pháp được xác định bằng cách phân tích mẫu trắng là mẫu sữa đậu nành nguyên chất và mẫu thêm chuẩn. Mẫu trắng cho tín hiệu độ hấp thụ thấp hơn chuẩn 0, cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu đạt yêu cầu.

3.2.2. Giới hạn phát hiện

Phân tích mẫu thêm chuẩn tại mức nồng độ 20 mg/kg (gấp 7 lần LOD ước lượng), lặp 10 lần, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn SD, hệ số R. Kết quả thực nghiệm cho R = 4,1 (đạt yêu cầu). Do đó, giới hạn phát hiện của phương pháp được xác định là 3 mg/kg.

3.2.3. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính của phương pháp được xây dựng theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit từ 0,2 mg/L đến 6 mg/L, tương ứng nồng độ trên mẫu từ 4 mg/kg đến 12 mg/kg.

3.2.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu sữa đậu nành (mẫu trắng) thêm chuẩn, lặp lại 6 lần. Kết quả thu được cho thấy các giá trị độ thu hồi nằm trong khoảng từ 83-109% và độ lệch chuẩn tương đối 11,3%, đạt yêu cầu theo quy định của AOAC.

* Kết luận: Phương pháp ELISA có độ đặc hiệu tốt, giới hạn phát hiện nhỏ (3 mg/kg) phù hợp với việc xác định sự có mặt của chất dị nguyên casein trong các sản phẩm thực phẩm.

3.3. Ứng dụng phân tích casein trong một số đối tượng thực phẩm

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng casein trên 7 mẫu sữa, 3 mẫu cốm, 10 mẫu bánh kẹo được lấy tại Hà Nội năm 2017. Các mẫu có hàm lượng sữa cao (cỡ %) sẽ được phân tích bằng phương pháp HPLC để xác định các dạng casein. Các mẫu có hàm lượng casein nhỏ (cỡ mg/kg) hoặc công bố không có sữa sẽ được

phân tích bằng phương pháp ELISA. Ngoài ra, mẫu thêm chuẩn casein được phân tích song song nhằm kiểm tra độ thu hồi theo từng nền mẫu. Kết quả xác định casein trên nền mẫu thực được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Tổng hợp kết quả xác định casein trên mẫu thực

Mã số	Tên mẫu	Nguồn sữa	Phương pháp	Tổng casein (g/100g)	HL protein (g/100g)	Tỷ lệ α : β :K (%)
M1	Sữa	Sữa bò	HPLC	14	16,2	49:32:18
M2	Sữa	Sữa bột nguyên kem	HPLC	8,0	9,6	51:28:20
M3	Sữa	Sữa dê 25%	HPLC	14	17	48:34:18
M4	Sữa	Sữa bò	HPLC	13	17	49:32:18
M5	Sữa	Sữa bò	HPLC	15	19	50:32:18
M6	Thực phẩm bổ sung	Sữa bột nguyên kem	HPLC	18	21,4	49:31:19
M7	Sữa	Sữa bột tách béo	HPLC	8,0	10,8	50:29:21
M8	Cốm	-	ELISA/ HPLC	KPH	-	-
M9	Cốm	-	ELISA/ HPLC	KPH	-	-
M10	Cốm	-	ELISA/ HPLC	KPH	-	-
M11	Bánh	-	ELISA/ HPLC	KPH	6,6	-
M12	Bánh	-	HPLC	2,0	8	51:28:20
M13	Bánh	-	HPLC	1,0	6,6	51:30:19
M14	Bánh	-	HPLC	1,0	8	49:32:19
M15	Bánh	-	HPLC	1,8	10	51:30:19
M16	Bánh	-	HPLC	2,0	6,5	50:31:18
M17	Bánh	-	HPLC	2,0	9,4	51:30:18
M18	Bánh	-	HPLC	1,5	7	48:32:18
M19	Kẹo	-	ELISA/ HPLC	KPH	0	-
M20	Bánh	-	HPLC	15	36	50:31:18
M21	Sữa	Sữa dê nguyên chất	HPLC		-	41:34:24

Ghi chú: KPH (không phát hiện).

Trong số 07 mẫu sữa có 02 mẫu sữa có công bố nguồn gốc sữa dê, một mẫu sữa nước (sữa dê tươi Ba Vì) và một mẫu sữa bột. Tỷ lệ các dạng casein alpha:beta:kappa trong sữa bò khoảng 50:30:19, trong sữa dê là khoảng 31:54:12. Trong sữa có bổ sung sữa dê thì tỷ lệ β -casein trong mẫu 2 mẫu sữa dê cao hơn so với tỷ lệ này trong sữa bò, khá phù hợp với công bố bổ sung sữa dê trong sản phẩm. Ba mẫu cốm công bố không chứa sữa đều không phát hiện có casein. Hai mẫu bánh kẹo (trong số 10 mẫu) không có casein.

4. KẾT LUẬN

Quy trình xác định casein bằng phương pháp HPLC và ELISA đã được xây dựng và thẩm định. Các kết quả nghiên cứu và ứng dụng phương pháp cho thấy có thể sử dụng phương pháp HPLC để xác định các dạng casein khác nhau và sử dụng phương pháp ELISA để xác định được casein ở mức hàm lượng thấp theo quy định hiện hành của Châu Âu (10 mg/kg).



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Shoji M., "Japanese food allergen labeling regulation: an update", Journal of AOAC international, 101(1), 2018.
2. Poms R.E., Klein K.L., Anklam E., "Methods of allergen analysis in food: a review", Food Additives and Contaminants, 21(1), 2004, pp. 1-31.
3. Bobe G., Beitz D.C., Freeman A.E., & Lindberg G.L., "Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gelelectrophoresis Detection of milk adulterations", Journal of Chromatography A, 967, 2002, 209-218
4. Xu Ming-Fang, Dai Jin-Feng, Xiang Ming-Xia, Cheng Xi-Fei, Zeng Xiao-Cong, Wan Cong-Qing, Zhou Wei-Jun, "Study on Differences of Milk Proteins by Liquid Chromatography-Mass Spectrometer", Chinese Journal of analytical chemistry, 42(4), 2014, pp. 501-506.
5. Strange E.D., "Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins", Journal of chromatography, 624, 1992, pp. 81-102
6. Sicherer S.H., & Sampson H.A., "Food allergy", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2), 2010, pp. S116-S125.
7. Monaci L., Tregoat V., "Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review", European Food Research and Technology, 223, 2006, pp. 149-179.
8. Morinaga, "Casein ELISA kit for the quantitative determination for milk protein in food", Morinaga Institute of Biological Science, Inc (MIoBS), Japan.
9. Parkin J., Cohen B., "An overview of the immune system", The Lancet, 357(9270), 2001, pp. 1777-1789.
10. Ana C.A. Veloso, Natércia Teixeira, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, "Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis Detection of milk adulterations", Journal of Chromatography A, 967 (2002) 209-218

Summary

VALIDATION OF METHOD FOR THE DETERMINATION OF BOVINE CASEIN IN MILK AND MILK PRODUCTS

Nguyen Thi Minh Hoa, Nguyen Thi Ha Binh, Tran Cao Son

National Institute for Food Control

Bovine caseins in dairy and dairy products were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a PDA detector at 280 nm or by sandwich ELISA method. Liquid chromatography method was developed to determine different types of casein including alpha, beta, and kappa casein at high content (% level), which calculate the proportion of casein forms, thus allow the identification of milk sources (cow's milk, goat's milk). The ELISA method determines casein at low content (LOD was of 3mg/kg) which meets the labeling requirements of EU and Japan for food allergens. The validation data show that both methods fit the purpose with the recovery of 78-98% and the coefficient of variation is from 2.4 to 9.5%. The methods have been applied for the determination of casein content in 20 samples of milk, food supplement, cake and candy from Hanoi's markets.

Keywords: HPLC, ELISA, casein, milk