

APPLICATION NOTE

Nichtprotein-Stickstoffbestimmung in Milch und Milcherzeugnissen – Dumas Methode

Angelehnt an die Methode basierend auf der Norm **DIN EN ISO 8968-4:2016** - Milch und Milcherzeugnisse – Bestimmung des Proteinstickstoff-Gehaltes und des Nichtproteinstickstoff-Gehaltes und Berechnung des tatsächlichen Proteingehaltes



Einleitung

Milch und Milchprodukte enthalten hochwertige Proteine die der Mensch besonders gut verwerten und zum Aufbau von körpereigenem Eiweiß verwenden kann. Milchproteine sind nicht nur in der Produktion traditioneller Milchprodukte von Bedeutung, sondern spielen aufgrund ihrer vielfältigen funktionalen Eigenschaften und hohen ernährungsphysiologischen Wertigkeit auch eine wichtige Rolle in einem breiten Sortiment von Lebensmitteln, wie beispielsweise in der Babynahrung und im pharmazeutischen Sektor. Dementsprechend hat der Proteingehalt der Milch eine maßgebliche Bedeutung bei der Festlegung des Preises.

Milchproteine besehen im Wesentlichen aus Casein, Molkenproteinen und „Nicht-Protein-Stickstoff“ (Non-protein nitrogen oder auch NPN). Dabei ist NPN der Bestandteil des Rohproteins, der vom Menschen nicht verarbeitet werden kann und daher vom sogenannten echten Protein oder auch Reinprotein abgegrenzt wird. NPN ist ein entscheidender Bestandteil der Milchzusammensetzung und umfasst verschiedene stickstoffhaltige Verbindungen, die keine Proteine sind, aber dennoch von großer Bedeutung für die Bewertung der Produktqualität und -sicherheit sind. NPN setzt sich zusammen aus Kreatin/Kreatinin, Peptiden, Hippsäuren, freien Aminosäuren, Orotsäure, Harnsäure, Ammoniak und Urea (Harnstoff), wobei Urea den größten Teil ausmacht. Um also den relevanten Proteinanteil zu ermitteln muss der NPN-Anteil aus dem Proteingehalt mit folgender Berechnung subtrahiert werden:

Reinprotein = Rohprotein – NPN.

Im Bereich der Qualitätskontrolle von Milchprodukten und der Ernährungsanalyse spielt die genaue Bestimmung des Nicht-Protein-Stickstoffs (NPN) in Milch und Milchprodukten eine zentrale Rolle. Die Bestimmung von NPN ist

C. Gerhardt Geräte:

- DUMATHERM N Pro

Zusätzliche Ausstattung:

- Analytische Waage
- Mixer
- Wasserbad
- Filtrierstation
- Laborabzug

APPLICATION NOTE

relevant, da der Proteingehalt durch Zusatz von anderen Stoffen mit hohem Stickstoffgehalt künstlich gesteigert werden kann.

Ein Beispiel hierfür ist der Melamin-Skandal aus China vor einigen Jahren – hier wurde Melamin, eine Industriechemikalie, Milchpulver zugesetzt und so der Proteingehalt gesteigert. Eine reine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl stößt hier an seine Grenzen und würde einen zu hohen Proteingehalt ausweisen. Die Bestimmung von NPN wird aber auch dazu genutzt, um Rückschlüsse bzgl. der Qualität der Fütterung der Tiere zu ziehen – Anhand der Ergebnisse der NPN-/Harnstoffanalyse kann der Inhalt oder die Reihenfolge der Rationen so angepasst werden, dass die Fütterungskosten, die Milchproduktion und die Reduzierung der Stickstoffabfälle in der Umwelt optimiert werden.

Die Methode

Probenvorbereitung

Die **flüssigen Proben** werden in ein Becherglas überführt und in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 38–40 °C erwärmt. Anschließend wird die zu untersuchende Probe unter vorsichtigem Mischen auf Raumtemperatur abgekühlt und in einem Erlenmeyerkolben eingewogen. Daraufhin wird die Milchprobe mit Trichloressigsäure versetzt und das Milch-Säure-Gemisch erneut gewogen. Nach Bildung des Niederschlags wird der Inhalt des Erlenmeyerkolbens filtriert und das Filtrat in einem sauberen, trockenen Erlenmeyerkolben gesammelt.

Feste Proben werden ggf. mit einem Mixer oder einer Rotormühle homogenisiert und eine entsprechende Menge der Probe in Wasser bei 40–50 °C gelöst. Durch Zugabe von Trichloressigsäure erfolgt die Bildung des Niederschlags, der nach kurzer Erwärmung der Suspension abfiltriert wird, sodass das Filtrat in einem sauberen, trockenen Erlenmeyerkolben aufgefangen werden kann. Vor der Einwaage wird Zinnfolie (z.B. DumaFoil) tariert, 75 mg Superabsorber eingewogen und die Probe mit Hilfe einer Einwegspritze eingewogen.

→ **Applikationsnotiz:** Aufgrund des geringen Stickstoffgehaltes müssen ca. 400 mg des Filtrats eingewogen werden. Hier kann es von Vorteil sein DumaFoilXL zu verwenden, um das Probenhandling zu vereinfachen.

Einwaage / Kalibration

Bei einer Einwaage von ca. 400 mg Filtrat werden je nach Probe Peakflächen zwischen 400-900 mVs erreicht, was einer absoluten Menge an Stickstoff von ca. 0,08 – 0,18 mg entspricht. Daher sollte die gewählte Kalibrierung diesen Arbeitsbereich abdecken. Für solch niedrige Stickstoffgehalte wird in der Regel eine THAM-Lösung verwendet, hier eine THAM-Lösung mit 0,05% N Stickstoff, die mit Einwaagen zwischen 150 mg bis 400 mg den gewünschten Arbeitsbereich abdeckt. Die Mindestanforderung für die Korrelationsfaktor R2 ist ein Wert von $\geq 0,999$.

Ergebnisberechnung

Der nichtprotein Stickstoffgehalt wird in Abhängigkeit der Einwaagen der Probe, des Probe-Säure-Gemisches, des Filtrats und des Stickstoffgewichts im Filtrat berechnet.

→ **Applikationsnotiz:** Verwenden Sie zur Berechnung unsere bereits vorbereitete Excel-Tabelle, die wir Ihnen gerne zur Verfügung stellen.

APPLICATION NOTE

Tabelle 1: Analyseergebnisse für NPN-Bestimmungen Dumas-Methode.

Probentyp	Probenmenge Filtat in [mg] +/- 10%	Gemessener Proteingehalt [%]	Standardabweichung	Relative Standardabweichung
Kuhmilch	400	0,155	0,005	3,519
Molkeisolat	400	2,906	0,102	3,509

Tabelle 2: Beispielergebnisse für Kuhmilch.

Probenmenge [mg]	Proteinfaktor	N Gewicht [mg]	NPN Stickstoff [%]	NPN Protein [%]
406,254	6,38	0,080	0,026	0,167
404,697	6,38	0,070	0,023	0,147
403,159	6,38	0,077	0,025	0,162
407,195	6,38	0,072	0,023	0,149
404,635	6,38	0,073	0,024	0,154
403,500	6,38	0,074	0,025	0,156
Durchschnitt			0,024	0,155
Standardabweichung			0,001	0,005
RSA [%]			3,519	3,519

Fazit

Für Milch und Milchprodukte hat der Proteingehalt einen wesentlichen Stellenwert zur Beurteilung der Qualität und zur Bestimmung des Preises. Daher ist es für die Analytik wichtig auch den "wahren" Proteingehalt in der Milch zu bestimmen. Eine NPN Analyse mit DUMATHERM liefert Laboren einen wichtigen Wert zur Bestimmung des tatsächlichen Proteingehalts.

Für weitere Informationen oder andere Anwendungen wenden Sie sich bitte an:

application@gerhardt.de