

APPLICATION NOTE

Nichtprotein-Stickstoffbestimmung – NPN - in Milch und Milcherzeugnissen – Kjeldahl Methode

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 Milchezusammensetzung 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, Hippursäuren, 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:

- KJELDAITHERM KT20
- VAPODEST 500
- VACUSOG

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. Das Filtrat wird mit einer Einwegspritze per Differenzwägung eingewogen.

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. Das Filtrat kann mit einer Einwegspritze eingewogen werden.

Das Filtrat muss klar und frei von Partikeln sein. Ist dies nicht der Fall, werden Fällung und Filtration wiederholt.

Aufschluss

Die Probe wird in konzentrierter Schwefelsäure bei 410 °C aufgeschlossen. Das Filtrat neigt nicht zum Schäumen, sollte dennoch vorsichtig erhitzt und beobachtet werden. Mit den offiziellen Standards beträgt die Aufschlusszeit 2,5 Stunden, wohingegen mit einer optimierten Methode die Aufschlusszeit auf etwa 2 Stunden verkürzt werden kann.

➔ **Applikationsnotiz:** Verkürzen Sie die Aufschlusszeit, indem Sie die Proben in einen vorgeheizten Aufschlussblock geben.

Destillation und Titration

Nach dem Aufschluss wird die Probe unter Zugabe von H₂O und NaOH in einer Vorlage aus H₃BO₃ destilliert. Die Endpunktbestimmung erfolgt im VAPODEST 500 automatisch. Die Zugabe eines Mischindikators ist nicht erforderlich, kann zur visuellen Kontrolle aber verwendet werden.

Ergebnisberechnung

Der Nicht-Protein Stickstoffgehalt wird in Abhängigkeit des zuvor bestimmten Blindwertes der notierten Gewichte, der Einwaagen der Probe, des Probe-Säure-Gemisches und des Filtrats sowie des Verbrauchs der Titrationslösung berechnet.

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

APPLICATION NOTE

Analyseergebnisse

Tabelle 1: Analyseergebnisse für NPN-Bestimmungen mit der Kjeldahl-Methode.

Probentyp	Probenmenge Filtrat in [mL] +/- 10%	Gemessener Proteingehalt [%]	Standardabweichung	Relative Standardabweichung
Kuhmilch	20	0,17	0,002	1,183
Molkeisolat	25	4,332	0,021	0,476
Proteinisolat (vegan)	20	2,524	0,010	0,386
Hartkäse	10	4,733	0,023	0,486

Tabelle 2: Beispielergebnisse für Molkeisolat.

Probenmenge [mL]	Proteinfaktor	V-VB [mL]	NPN Stickstoff [%]	NPN Protein [%]
25	6,38	7,045	0,684	4,361
25	6,38	6,977	0,677	4,319
25	6,38	6,972	0,676	4,316
Durchschnitt			0,679	4,332
Standardabweichung			0,003	0,021
RSA [%]			0,476	0,476

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 KJELDATHERM und VAPODEST liefert Laboren einen wichtigen Wert zur Bestimmung des tatsächlichen Proteingehalts.

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

application@gerhardt.de