

VALIDIERUNGSSTUDIE

Bestimmung des Gesamtfettgehaltes durch automatische Säurehydrolyse (HYDROTHERM)-ISO 8262-1

von B. J. Bench, Wade Whittington, Markus Kranz, Frank Guerrera



Wissenschaftlicher Artikel

von B. J. Bench^{1,2}, Wade Whittington^{1,2}, Markus Kranz³, Frank Guerrera⁴

1. Tyson Foods, Inc., Springdale (Arkansas), USA;
2. WBA Analytical Laboratories, Springdale (Arkansas), USA;
3. C. Gerhardt, Königswinter, Deutschland;
4. Lab Synergy, Goshen (New York), USA



Einführung

Der Gesamtfettgehalt gehört zu den wichtigsten Kennzahlen der Nahrungsmittelanalyse. Wenn Fettsäuren an Glyceride, Sterolester, Glycol und Phospholipide angebunden sind, muss eine Säure- oder Basenhydrolyse durchgeführt werden. Durch die Hydrolyse werden Zellwände zerstört sowie Fettemulsionen und Lipid-Protein-Bindungen aufgebrochen. Für verschiedene Matrices existieren mehrere AOAC-Verfahren. Dazu gehören die Säure- oder Basenhydrolyse zum Lösen aller Fette aus verschiedenen Produkten, gefolgt von der vollständigen Extraktion dieser Fette durch gemischte Ether.

Diese AOAC-Verfahren sind arbeitsintensiv; ihre Reproduzierbarkeit schwankt von Matrix zu Matrix. HYDROTHERM ist ein automatisiertes, geschlossenes Säurehydrolysesystem auf der Grundlage des gravimetrischen Weibull-Berntrop-Verfahrens nach ISO 8262-1.

Zusammen mit dem innovativen Schnell-Extraktionssystem SOXTHERM lässt sich bei minimalem Arbeitsaufwand die Fettanalyse von Lebensmittelprodukten vollautomatisiert durchführen. Die in dieser Validierungsstudie präsentierten HYDROTHERM-Daten werden mit Daten verglichen, die im Rahmen des Verfahrens nach AOAC 922.06 gewonnen wurden. Dabei handelt es sich um einen manuellen Säureaufschluss unter Anwendung des Mojonnier-Extraktionsverfahrens für die Säurehydrolyse.

Fleischhomogenat nach NIST 1546 (n=36) wurde unter Anwendung beider Verfahren analysiert. Die dabei mit dem HYDROTHERM-Verfahren erreichten Ergebnisse waren dem AOAC-Verfahren gleichwertig. 21 Produkte, darunter Käse, Suppen und Soßen, Fleischprodukte (roh/gekocht, paniert, Aufschnitt), Haustier-Snacks, Tortillas und Taco-Schalen wurden analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass das HYDROTHERM-Verfahren im Vergleich zum AOAC-Verfahren eine größere hydrolytische Wirksamkeit aufweist. Das HYDROTHERM-Verfahren für die automatisierte Säurehydrolyse zeichnet sich durch eine gute Wiederholbarkeit, eine hohe Produktivität, exakte Ergebnisse und eine universelle Anwendbarkeit aus.

Ziele

- Validierung des Einsatzes des HYDROTHERM Systems im Vergleich zum Verfahren nach AOAC 922.06 zur Durchführung der Fettsäurehydrolyse vor der Fettextraktion mit dem SOXTHERM System
- Verbesserte Arbeitssituation – kein Kontakt mit Chemikalien
- Einsparung von Platz (kein Abzug notwendig), Arbeitszeit und Betriebsmitteln
- Demonstration einer guten Wiederholbarkeit, einer hohen Produktivität und exakter Ergebnisse

Methoden

2-3 Gramm einer Probe in HYDROTHERM Wägpapier (C. Gerhardt Produktnr. 1004939) einwiegen. Die Probe in einen HYDROTHERM-Becher geben und ½ Teelöffel Celite hinzufügen. In den entsprechenden Trichter HYDROTHERM-Filter (C. Gerhardt Produktnr. 1004092) einsetzen. Das HYDROTHERM-Programm unter Verwendung von 15 %-iger Chlorwasserstoffsäure als Hydrolysereagens ausführen. Nach dem Abschluss des HYDROTHERM-Programms die Filter entfernen und bei 100°C für 30 Minuten trocknen lassen. Die getrockneten Filter zur Extraktion in eine Extraktionshülse aus Cellulose einsetzen. Das anfängliche Gewicht der Becher für die entsprechenden Extraktionshülsen ermitteln. Die Extraktionshülsen in den entsprechenden Becher einsetzen. 90-100 ml Petroleumäther in den Becher gießen und im SOXTHERM-System die Extraktion durchführen. Nach der Extraktion die Extraktionshülsen entfernen und die Becher 30 Minuten lang bei 100°C trocknen. Die Becher abkühlen lassen und das abschließende Bechergewicht erfassen. Der Gesamtfettgehalt wird anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Fettgehalt} = \frac{[\text{Abschließendes Bechergewicht} - \text{Anfängliches Bechergewicht}] * 100}{\text{Einwaage}}$$

HYDROTHERM

HYDROTHERM ist das weltweit einzige Verfahren zur Durchführung einer automatischen Säurehydrolyse zur traditionellen Bestimmung des Fettgehalts nach Weibull-Berntrop.

In diesen Datensatz wurden mindestens 9 Beobachtungspaare aufgenommen. Einundzwanzig Produkte wurden unter Anwendung beider Methoden evaluiert.

Die Daten wurden bei einem gepaarten t-Tests hinsichtlich ihrer wesentlichen Unterschiede



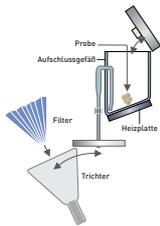
Ergebnisse der Matrixvergleiche

Produkt	HYDROTHERM		Verfahren 922.06	
	Mittelwert	σ	Mittelwert	σ
Alfredo (n=9)	22,6	7,14	22,9	7,48
Alfredo Base (n=9)	13,7	0,37 ^y	13,1	1,56 ^z
Alfredo Sauce (n=19)	23,3	5,40	23,7	5,76
Chips (n=10)	18,7	0,82	19,0	0,73
Gemahlene Hühnchen-Knorpelgewebe (n=12)	11,2	1,75	11,1	1,64
Haustier-Snacks (n=45)	10,8 ^a	4,31	7,7 ^b	4,03
Roastbeef (n=9)	12,5 ^a	1,20	10,6 ^b	0,91
Käsedip (n=17)	13,2 ^a	1,23	12,4 ^b	1,72
Backhähnchen (n=25)	8,7	1,36	8,7	1,09
Hühnchen-Knorpelgewebe (n=10)	7,9	1,99	7,2	1,46
Chicken Nuggets (n=86)	13,7 ^a	2,04	12,8 ^b	2,34
Hühnerpastetchen (n=45)	5,3 ^a	1,70	4,3 ^b	1,35
Hühnchenstreifen (n=45)	10,1 ^a	1,66	9,3 ^b	2,07
Hackfleischbällchen (n=69)	18,6 ^a	4,24	18,1 ^b	4,31
Popcorn-Hühnchen (n=38)	14,2	2,11	14,3	2,20
Kartoffelsuppe (n=9)	8,3	0,56	7,9	0,82
Hühnchen, roh (n=21)	6,4 ^a	5,05	5,7 ^b	4,97
Würstchen (n=9)	33,2	1,71	32,7	2,11
Taco-Fleisch (n=10)	13,4	2,27	12,7	2,77
Taco-Schale (n=36)	20,6 ^a	1,49	21,2 ^b	1,87
Tortilla (n=51)	7,6	1,25	7,4	1,52

^{ab} Mittelwerte, die innerhalb einer Zeile mit unterschiedlichen hochgestellten Indizes gekennzeichnet wurden, unterscheiden sich voneinander ($P \leq 0,05$).

^{yz} Standardabweichungen, die innerhalb einer Zeile mit unterschiedlichen hochgestellten Indizes gekennzeichnet wurden, unterscheiden sich voneinander ($P \leq 0,05$).

Hydrolyse



**Phase 1
Filter und Probe einsetzen**
Nach Zugabe der Probe in das Aufschlussgefäß und Einsetzen des Filters in den Trichter wird das Gerät geschlossen. Trichter und Aufschlussgefäß sind dicht verschlossen.



**Phase 2
Zugabe Salzsäure**
Nach Start des Prozesses wird eine zuvor definierte Salzsäuremenge automatisch zugegeben. Der gesamte Prozess findet im geschlossenen System statt.



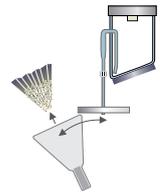
**Phase 3
Hydrolyse**
Die Probe wird in der siedenden Salzsäure hydrolysiert. Der Aufschluss der Matrix erfolgt in einem optimal dimensionierten Aufschlussgefäß.



**Phase 4
Verdünnen und Spülen**
Nach Beendigung des Aufschlusses wird die Probe mit heißem Wasser stark verdünnt. Vor der Filtration wird der Filter mit heißem Wasser befeuchtet.



**Phase 5
Filtration**
Die verdünnte Probe wird quantitativ über den Filter filtriert. Das Aufschlussgefäß wird mit heißem Wasser solange gespült, bis alle Fettanteile überführt sind und der Filter pH-neutral ist.



**Phase 6
Filterentnahme**
Zum Schluss wird der Filter entnommen, getrocknet und zur Fett-Extraktion in eine Extraktionshülse überführt.

Zeit: ca. 90 Minuten

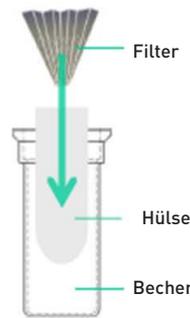
Probenvorbereitung für die Extraktion



1. Becherglas einwiegen



2. Filter trocknen



3. Filter in Extraktionsbecher einsetzen



4. Lösung hinzufügen

Zeit: ca. 30-60 Minuten

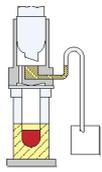
evaluiert. Die Gleichheit der Varianzen innerhalb der einzelnen Methoden wurde, unterteilt nach Produkttyp, bei einem allgemeinen t-Test evaluiert. Die größte Differenz wurde bei den Haustier-Snacks ermittelt. In allen Fällen ergab das HYDROTHERM-Verfahren höhere Mittelwerte als das Verfahren nach AOAC 922.06. Darüber hinaus wurde nur in einem Fall (Alfredo Base) innerhalb eines Produkttyps zwischen den beiden Verfahren eine abweichende Varianz festgestellt.

SOX THERM

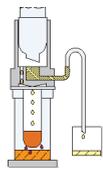
Das SOX THERM Prinzip ermöglicht eine erhebliche Vereinfachung und Beschleunigung des traditionellen Soxhlet-Verfahrens sowie die Einhaltung internationaler und nationaler Normen und Extrahierungsstandards.



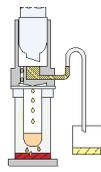
Extraktion



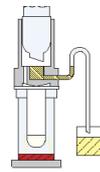
Phase 1
Im ersten Arbeitsschritt wird die Probe im siedenden Lösungsmittel extrahiert.



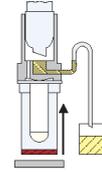
Phase 2
Der Lösungsmittelspiegel wird soweit abgesenkt, bis sich eine deutliche Trennung zwischen Lösungsmittel und Extraktionshülse ergibt. Das rückgewonnene Destillat wird im Sammeltank aufgefangen.



Phase 3
Die Probe wird über dem siedenden Lösungsmittel im Lösungsmitteldampf durch das vom Kühler zurückfließende, kondensierte Lösungsmittel extrahiert.



Phase 4
Der größte Teil des Lösungsmittels wird abdestilliert und zurückgewonnen.



Phase 5
Die Extraktionsbecher werden automatisch von der Heizbank abgehoben. Es wird noch minimal probenschonend eingedampft.

Zeit: ca. 2-8 Stunden

Finale Vorbereitungen



1. Hülse entfernen



2. Becherglas im Ofen trocknen



3. Becherglas im Exsikator trocknen

Zeit: ca. 90 Minuten

Sicherheit – Wichtige Verbesserungen

- HYDROTHERM und SOXTHERM sind geschlossene Systeme, bei deren Anwendung auf den Einsatz eines Abzugs verzichtet werden kann.
- Da keine gefährlichen brennbaren Abfälle entstehen, sind HYDROTHERM und SOXTHERM umweltfreundliche Verfahren.

- Die Exposition gegenüber schädlichen sauren Dämpfen und Lösungsmitteldämpfen ist beim HYDROTHERM-Verfahren deutlich geringer.

Diskussionsthemen

- Der richtige Fettgehalt
- Verschiedene Methoden der Säurehydrolyse

Ergebnisse für die Validierung nach ISO 17025

Matrix	n	Mittelwert in % (HT)	Std.-Abweichung (HT)	Mittelwert in % (AOAC)	Std.-Abweichung (AOAC)
Fleischhomogenat nach NIST 1546 (COA-Wert = 21%)	36	21,15	1,04	21,24	1,02
Interne QS-Unterlagen	61	27,45	0,64	26,22	0,92
Hühnerbrust	20	4,34	0,15	4,11	0,22
Tortilla	20	7,66	0,17	7,16	0,2
Roher Schinkenspeck	20	33,39	0,61	31,67	1,64

Ergebnisse von Laborvergleichsuntersuchungen

Programm/Proben-ID	Labor- ergebnis	Mittelwert	Std.- Abweichung	Z-Score
AAFCO/Kälberfutter (Anzucht)	4,6	4,6253	0,46397	-0,05
AAFCO/Hunde-Trockenfutter	9,425	9,6576	0,41083	-0,57
AAFCO/Maiskleber	4,96	4,9295	0,39613	0,08
AAFCO/Kälberfutter (Wachstum)	4,555	4,5781	0,55513	-0,04
AAFCO/Rinderfutter (Wachstum)	4,855	5,12	0,44344	-0,6
AAFCO/Schweinefutter (Wachstum)	4,495	4,4269	0,40048	0,17
AAFCO/Rinderfutter, pelletiert	6,32	6,4767	0,49843	-0,31
AAFCO/Erstfuttermittel für Schweine	5,995	6,4948	0,56559	-0,88
LGC/Probe auf Getreidebasis	10,02	9,86	0,386	0,4
LGC/Probe auf Fleischbasis'	26,17	26,19	1,047	-0,02
LGC/Probe auf Fleischbasis'	14,59	14,76	0,59	-0,29

AAFCO – Association of American Feed Control Officials

LGC – Standards von LGC, ein von der ISO akkreditierter Anbieter von Laborvergleichsuntersuchungen

- International angewendete Verfahren nach Weibull-Stoldt und Weibull-Berntrop
- Globale Trends – Methoden und Labore
- Methoden für unterschiedliche Anwendungen und Probenotypen
- Röse-Gottlieb-Verfahren; Schmid-Bondzynski-Ratzlaff-Verfahren – siehe die Einleitung zur ISO 8262:20054
- Wichtigkeit der Probenvorbereitung

Fazit

Bei der Probe „Fleischhomogenat nach NIST 1546“ wurden unter Anwendung des HYDROTHERM-Verfahrens Ergebnisse ermittelt, die dem Verfahren nach AOAC 922.06 statistisch äquivalent waren.

Bei Produkten mit einem geringen, mittleren und hohen Fettgehalt (n=20) waren die unter Anwendung des HYDROTHERM-Verfahrens ermittelten Ergebnisse im Vergleich mit den unter Anwendung des Verfahrens nach AOAC 922.06 ermittelten statistisch äquivalent oder besser, wobei die Standardabweichung und der Variationskoeffizient auf allen drei Ebenen besser waren. Hinsichtlich der mittleren Ergebnisse für alle

Produkte erwies sich bei der Extraktion des gesamten Fetts das HYDROTHERM-Verfahren gegenüber dem Verfahren nach AOAC 922.06 als leistungsstärker.

Beim automatisierten HYDROTHERM-/SOXTHERM -Verfahren war der Gesamtarbeitsaufwand im Vergleich zum Verfahren nach AOAC 922.06 geringer.

Die je Probe aufzuwendenden Gesamtkosten für Materialien und Chemikalien waren beim HYDROTHERM-/SOXTHERM-Verfahren um 22 % geringer.

Literaturhinweise

1. AOAC Method 922.06, „Fat in Flour.“
2. AOAC Method 991.36, „Crude Fats in Meats.“
3. Gerhardt Application Note B.1.3.HT, „Total Fat in Meat and Meat Products.“
4. ISO 8262:2005 und IDF 124-1:2005, Milchprodukte und milchhaltige Lebensmittel - Bestimmung des Fettgehalts nach dem gravimetrischen Weibull-Berntrop-Verfahren (Referenzverfahren); S. VI

C. Gerhardt – Qualität made in Germany

STANDARDANALYSEN AUTOMATISIEREN

Vollautomatische Labor-Analysensysteme von C. Gerhardt sind hochentwickelte Spezialgeräte. Sie automatisieren wiederkehrende Analysenprozesse entsprechend nationaler und internationaler Standards und Normen. Sie liefern kontinuierlich präzise und reproduzierbare Analyseergebnisse schnell, kostengünstig, ressourcenschonend und hocheffizient.

■ ■ ■ ■ ■

+ HYDROLYSE VOLLAUTOMATISCH

HYDROTHERM – automatisches Säure-Hydrolyse-System für die Fettbestimmung nach Weibull-Stoldt. Zusammen mit SOXTHERM ist HYDROTHERM eine ideale Systemlösung zur Gesamtfettbestimmung.

+ FETTEXTRAKTION VOLLAUTOMATISCH

SOXTHERM – automatisches Schnell-Extraktionssystem zur Fettbestimmung.

+ STICKSTOFFANALYSE VOLLAUTOMATISCH

DUMATHERM – Stickstoff-/Proteinbestimmung von festen und flüssigen Proben nach der Verbrennungsmethode von Dumas. Für fast alle Probenmatrices eine schnelle und komfortable Alternative zur klassischen Kjeldahl-Methode.

+ ROHFASEREXTRAKTION VOLLAUTOMATISCH

FIBREITHERM – vollautomatische Abarbeitung der Koch- und Filtrationsvorgänge bei der Rohfaser-, ADF- und NDF-Bestimmung.

+ WASSERDAMPF-DESTILLATION VOLLAUTOMATISCH

VAPODEST – Schnell-Destilliersystem zur Stickstoff- und Proteinbestimmung nach Kjeldahl und Wasserdampfdestillation als Probenvorbereitung für weitere Analysen.

Stand 09/2015 | Technische Änderungen vorbehalten

