



Eltra GmbH

Retsch-Allee 1-5
42781 Haan
Deutschland

Telefon 02104/2333-400

E-Mail info@eltra.com

www.eltra.com

Retsch GmbH

Retsch-Allee 1-5
42781 Haan
Deutschland

Telefon 02104/2333-300

E-Mail info@retsch.com

www.retsch.com

EINFLUSS DER PROBENVORBEREITUNG AUF STICKSTOFF- BZW. PROTEINWERTE IN DER LEBENSMITTEL- UND FUTTERMITTELANALYTIK

ZUVERLÄSSIGE PROTEIN- BESTIMMUNG BEGINNT VOR DER ANALYSE

Dr. Vivien Sommer (Eltra GmbH), Dr. Tanja Butt (Retsch GmbH)

EINLEITUNG

Kohlenstoff, Stickstoff und Protein zählen zu den wichtigsten Kenngrößen in der Lebensmittel- und Futtermittelanalytik. Normen fordern reproduzierbare, rückverfolgbare Ergebnisse und moderne Elementaranalysatoren liefern diese mit hoher Präzision. Was dabei jedoch oft unterschätzt wird: die Qualität des analytischen Ergebnisses ist bereits vor dem ersten Messschritt entschieden. Sie hängt maßgeblich davon ab, wie die Probe zerkleinert und homogenisiert wurde.

Lebensmittelmatriices sind von Natur aus inhomogen. Zu grob gemahlenes Material führen zu inhomogenen Teilproben, bei denen einzelne Messungen erheblich voneinander abweichen und Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet sein kann. Zu feines oder zu langes Mahlen hingegen erzeugt Wärmeeintrag, der Feuchtigkeit aus der Probe treibt und die Probe austrocknet. Dadurch steigen die Proteinwerte scheinbar an, obwohl sich an der tatsächlichen Zusammensetzung nichts verändert hat.

Die Feuchtigkeit, die eine Probe enthält, ist in diesem Zusammenhang kein Nebenparameter, sondern ein entscheidender Qualitätsindikator der Probenvorbereitung. Erst die Kombination aus Elementaranalyse (Stickstoffanalyse nach der Dumas-Verbrennungsmethode) und thermogravimetrischer Bestimmung der Feuchtigkeit erlaubt eine vollständige Beurteilung, ob ein Messergebnis analytisch valide ist oder ein Artefakt der Probenvorbereitung darstellt.

Der vorliegende Bericht fasst die Ergebnisse einer experimentellen Studie zusammen, in der fünf repräsentative Lebensmittelmatrices unter jeweils unterschiedlichen Mahlbedingungen analysiert wurden. Die Daten wurden gemeinsam von Retsch und ELTRA erhoben, um zu demonstrieren, wie stark die Probenvorbereitung das analytische Ergebnis beeinflusst und wie zuverlässig die Kombination aus Mahlung und anschließender Analyse von Stickstoff und Feuchtigkeit diese Einflüsse aufdeckt.

METHODISCHER ANSATZ

Lebensmittelproben müssen frisch verarbeitet werden, daher wurde im gesamten Prozess darauf geachtet, dass die Mahlung und anschließende Bestimmung von Stickstoff sowie die Feuchtigkeit direkt nacheinander stattfinden. Damit wird der Einfluss von beispielsweise Feuchtigkeitsverlust oder -zunahme, durch Trocknung oder Aufnahme von Wasser, auf ein Minimum reduziert.

Jede Matrix wurde daher frisch verarbeitet und unter mindestens zwei Mahlbedingungen aufgearbeitet: einer optimalen Einstellung sowie einer oder zwei problematischen Varianten bei der die Probe zu grob, zu fein oder zu lang verarbeitet wurde.

Für die anschließende Elementarbestimmung wurde die Dumas-Verbrennungsmethode eingesetzt. Dabei wird die Lebensmittelprobe bei einer Temperatur von 950 °C verbrannt und die Stickstoffverbindungen im Verbrennungsgas gemessen. Der Proteinwert der Probe wird dabei auf Grundlage des Stickstoffgehalts mittels eines Proteinfaktors (z.B. 6.25 für die meisten Lebensmittel oder 5.70 nur für Ölsaaten und Körner) berechnet. Die Bestimmung der Feuchtigkeit erfolgt mittels thermogravimetrischer Analyse, wobei der Masseverlust einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt wird.

Pro Bedingung wurden zehn Messwiederholungen durchgeführt, als Streuungsmaße wurden die Standardabweichung zum Vergleich der Varianz innerhalb der Probe (SD in %, als Fehlerbalken in den Abbildungen dargestellt) sowie die relative Standardabweichung (RSD in %) zum Vergleich der verschiedenen Mahlgrade berechnet. Ein RSD-Wert unter 2,0 % gilt als analytisch akzeptabel.

ERGEBNISSE

SONNENBLUMENKERNE

Sonnenblumenkerne wurden optimal, sowie bewusst zu grob gemahlen. Für die optimale Zerkleinerung wurden 200 g der ölhaltigen Probe langsam mit einem 4 mm Ringsieb bei 18.000 rpm in der Ultrazentrifugalmühle ZM 300 zerkleinert. Eine ähnliche Probenmenge wurde durch wenige, sehr kurze Pulse bei 10.000 rpm mit der Messermühle GM 200 präpariert, um die zu grobe Probenmahlung herzustellen. Die ZM 300 erzeugte selbst unter der Verwendung von 6 oder 8 mm Sieben zu homogene Proben und konnte daher nicht für die grobe Mahlung verwendet werden (vgl. Abb. 1a).

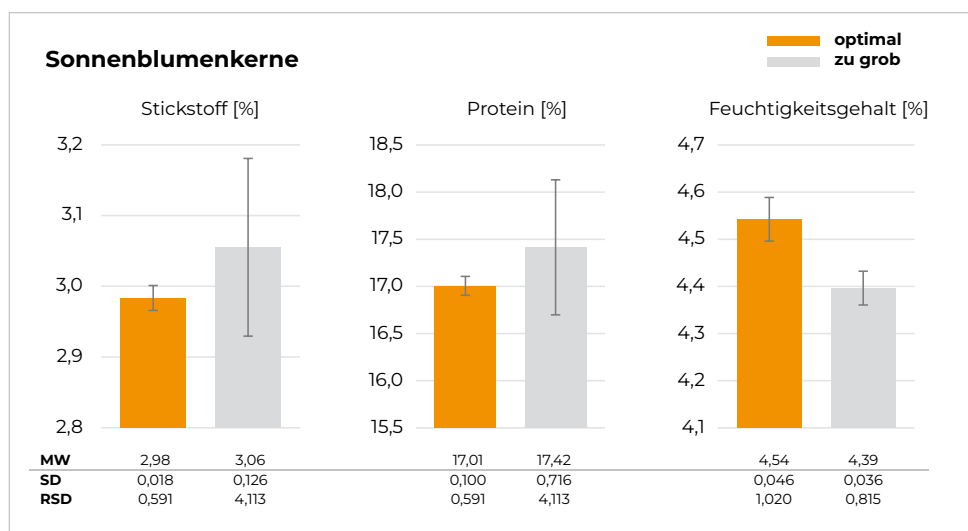
Abb. 1a: Sonnenblumenkerne:
Originalprobe (links), optimal vermahlen
mit einer ZM 300 und einem 4 mm
Ringsieb (mitte) und zu grob
vermahlen mit einer GM 200 (rechts).



Betrachtet man die Standardabweichung ausgehend vom Stickstoffwert sieht man deutlich, dass die Streuung der Probe bei optimaler Mahlung deutlich niedriger ist im Vergleich zur Probe, die zu grob zerkleinert wurde (SD 0,018 % vs. 0,126 %, siehe Abb. 1b). Vergleicht man die Mahlgrade, zeigt sich bei optimaler Mahlung eine RSD für Stickstoff bzw. Protein von 0,591 % und damit im akzeptablen Bereich liegt. Die zu grobe Zerkleinerung erhöht die Streuung um den Faktor sieben auf 4,113 %: die Teilproben sind inhomogen, jede Wägung erfasst eine andere Zusammensetzung und ist daher nicht repräsentativ.

Die Varianz des Feuchtigkeitsgehalts verhält sich mit rund 4,54 % bei der optimalen Mahlung und 4,39 % bei der zu groben Mahlung hingegen ähnlich. Der leicht höhere Anteil an ausgetretener Feuchtigkeit in der feineren Probe, lässt sich durch die größere Verkleinerung erklären: aus kleineren Partikeln, kann Feuchtigkeit besser entweichen als aus Kernstücken oder vollständigen Kernen.

Abb. 1b: Stickstoff-, Protein- und Feuchtigkeitsgehalt von Sonnenblumenkernen. Mittelwert $\pm$ SD. Optimaler (ZM 300 4 mm) vs. zu grober Mahlgrad (GM 200). RSD-Anstieg um Faktor sieben bei zu grober Mahlung.



WEIZEN

Die Weizenkörner wurden bewusst optimal und zu fein gemahlen. Für den optimalen Mahlgrad wurde mit einem 1,5 mm Ringsieb (ZM 300) sowie bei zu feiner mit einem 0,2 mm Ringsieb gemahlen. Bei der feinen Mahlung entstanden dabei erhöhte Temperaturen zwischen 50 und 60 °C.



Abb. 2a: Weizen: Originalprobe (links), optimal vermahlen (Mitte, ZM 300 1,5 mm) und übermahlen (rechts, ZM 300 0,2 mm).

Betrachtet man die Stickstoffwerte der optimalen Mahlung zeigt sich eine geringe Streuung der Probe (SD 0,032 %, RSD 1,478 %). Bei zu feinem Mahlgrad zeigt sich eine noch geringere Streuung und damit augenscheinlich bessere Reproduzierbarkeit (SD 0,018 %, RSD 0,798 %), jedoch gleichzeitig höhere Stickstoffwerte (vgl. Abb. 2b). Warum das so ist? Feineres Pulver ist homogener, die einzelnen Messungen stimmen daher besser überein.

Der entscheidende Befund ist der Feuchtigkeitsgehalt, denn dieser sinkt von 10,86 % auf 7,23 % vergleicht man die optimale mit der zu feinen Mahlung, ein Verlust von 3,6 Prozentpunkten durch den Wärmeeintrag beim Übermahlen. Dieser Feuchtigkeitsverlust hat eine direkte Konsequenz: der Stickstoffgehalt steigt scheinbar, weil sich das Verhältnis von Stickstoff zur Gesamtmasse verschiebt. Die bessere RSD bei zu feiner Mahlung täuscht darüber hinweg, dass das Messergebnis nicht mehr die Originalprobe repräsentiert. Präzision und Richtigkeit entkoppeln sich.

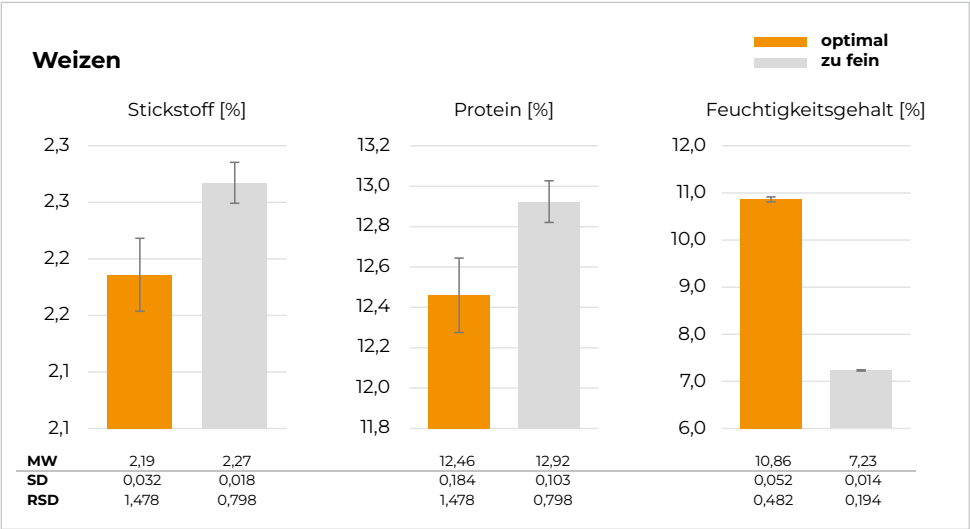


Abb. 2b: Stickstoff-, Protein- und Feuchtigkeitsgehalt von Weizenkörnern. Mittelwert ± SD. Optimaler (ZM 300 1,5 mm) vs. zu feinem Mahlgrad (ZM 300 0,2 mm, Temperatur 50 - 60 °C). Trotz besserer RSD ist der Feuchtigkeitsverlust von 3,6 % ein klares Zeichen für eine veränderte Probe aufgrund der Probenvorbereitung.

NUSSMISCHUNG

Eine kommerzielle Nussmischung wurde optimal gemahlen und zu lang bzw. übermahlen und anschließend analysiert. Dafür wurde mit der GM 200 mittels wenigen Pulsen bei 4.000 rpm Rückwärtslauf plus 10 s bei 10.000 rpm Vorwärtslauf der optimale Mahlgrad hergestellt. Für die zu lange bzw. Übermahlung der Probe wurde ebenfalls die GM 200 verwendet, und zusätzlich zur optimalen Vorgehensweise zu lang mit einer Dauer von insgesamt 1 min bei 10.000 rpm im Vorwärtslauf gemahlen (siehe Abb. 3a).

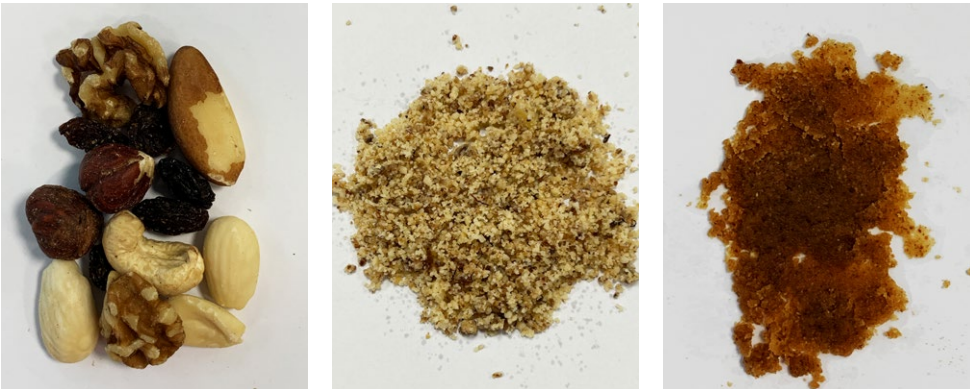


Abb. 3a: Nussmischung: Original-probe (links), optimal vermahlen (Mitte, GM 200) und übermahlen (rechts, GM 200).

Betrachtet man die Streuung der Stickstoffwerte des optimalen Mahlgrads im Vergleich zur Übermahlung, zeigt sich kaum ein Unterschied (SD 0,027 % vs. 0,034 %). Wirft man hier ein Blick auf die RSD, sieht man jedoch, dass die Varianz der Messwerte bei der optimalen Mahlung geringer ist im Vergleich zur übermahlenen Probe (RSD 0,952 % vs. 1,244 %).

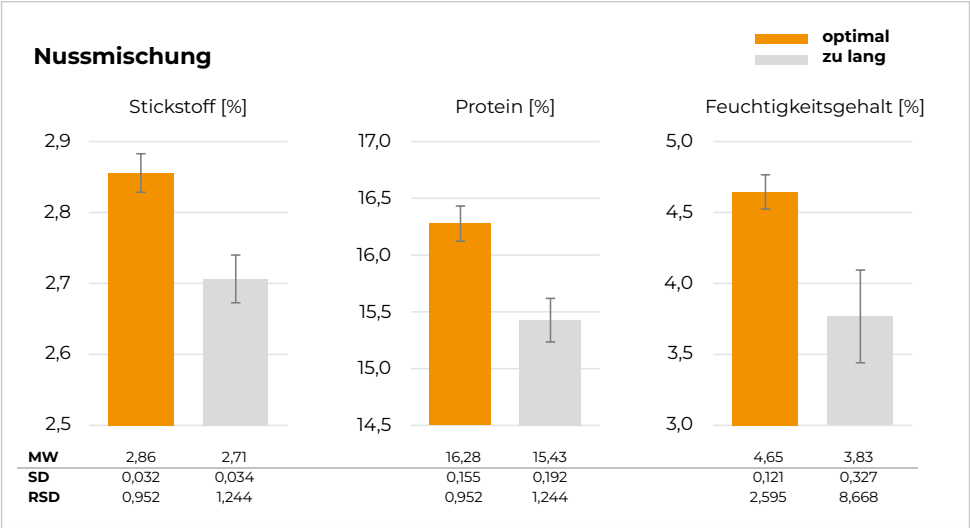


Abb. 3b: Stickstoff-, Protein- und Feuchtigkeitsgehalt einer Nussmischung. Mittelwert ± SD. Optimaler Mahlgrad vs. Übermahlen (GM 200). SD und RSD steigen bei Übermahlung der Probe.

Das bedeutet es gab größere Schwankungen bei den gemessenen Stickstoffwerten bei der Übermahlenen Probe. Interessanterweise ist der ermittelte Stickstoffgehalt der übermahlenen Probe mit 2,71 % niedriger als der Messwert der optimal vorbereiteten Probe mit einem Gehalt von 2,86 % (siehe Abb. 3b). Aufschluss gibt hier der Feuchtigkeitsgehalt: die übermahlene Probe weist mit 3,83 % eine geringere Feuchtigkeit auf als die optimale Probe mit einem Wert von 4,65 %. Durch den längeren und auch wärmeren Prozess des Mahlens, tritt bei der Nussmischung mehr Wasser und auch Fett aus, wodurch die scheinbar validen Messwerte nicht der Realität entsprechen. Warum der Austritt von Fett hier entscheidend ist: es enthält ebenfalls Proteine.

Daher scheint der Proteingehalt niedriger in der übermahlenden Probe trotz des gemessenen Feuchtigkeitsverlustes. Durch die zusätzlich einhergehende Verklumpung, erzeugt die Übermahlung eine sehr inhomogene Probe, was SD und RSD bestätigen.

KÜRBISKERNE

Geröstete Kürbiskerne zeichnen sich durch einen besonders hohen Proteingehalt von 30 bis 36 % aus und stellen damit interessantes Probenmaterial für eine Stickstoff- bzw. Proteinanalyse dar. Für die Analyse wurden die Kürbiskerne in einem optimalen Mahlgrad und einem übermahlenden, zu langem Mahlgrad vorbereitet. Vorgehensweise entspricht der Mahlung der Nussmischung mit der GM 200.



Abb. 4a: Kürbiskerne: Originalprobe (links), optimal vermahlen (Mitte, GM 200) und übermahlen (rechts, GM 200).

Die Kürbiskernprobe zeigt beim optimalen Mahlgrad eine geringe Streuung (SD 0,051 %, RSD 0,872 %). Bei der übermahlenden Probe zeigt sich hingegen eine höhere Streuung (SD 0,064%, RSD 1,110 %) bei einem gleichzeitigem niedrigerem Stickstoffwert (siehe Abb. 4b). Der Feuchtigkeitsgehalt sinkt beim Übermahlen leicht von 6,54 % auf 5,79 %, was auf einen geringen, aber messbaren Wärmeeintrag hindeutet. Die Kürbiskerne zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Sonnenblumenkerne: durch die Übermahlung treten neben Wasser auch Fett und damit Stickstoff bzw. Proteine aus. Dadurch entsteht eine klumpende, nicht mehr homogene Probe die inkonsistente und nicht reale Ergebnisse liefert.

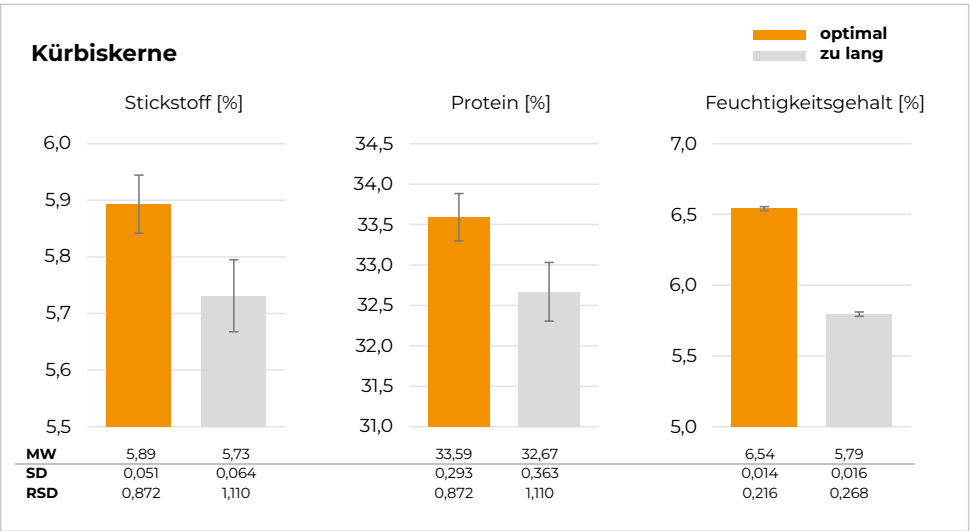


Abb. 4b: Stickstoff-, Protein- und Feuchtigkeitsgehalt von Kürbiskernen. Mittelwert ± SD. Optimaler Mahlgrad vs. Übermahlen (GM 200). SD und RSD steigen bei Übermahlung der Probe.

FLEISCH

Fleisch stellt aufgrund seiner Beschaffenheit und hohen Wassergehalts von 42 - 46 % eine analytisch anspruchsvolle Matrix dar. Drei Mahlbedingungen wurden verglichen: optimal, zu grob und zu lang. Alle Vermahlungen wurden in der GM 200 durchgeführt: wenige Pulse für zu grob, zusätzlich 10 s bei 10.000 rpm für optimal, und weitere 20 s bei 10.000 rpm für zu lang.



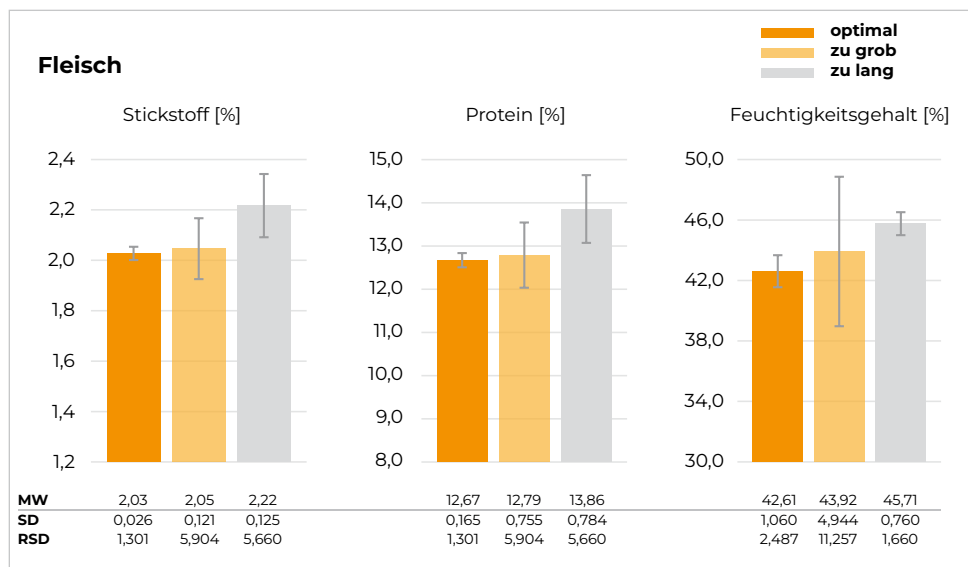
Abb. 5a: Fleisch mit Speckschwarte vor der Vermahlung (links oben) und in den drei Vermahlungsgraden zu grob, optimal und zu lang (rechts oben, links unten, rechts unten; alle mit GM 200). Die Verfärbung und Entmischungseffekte bei zu lang vermahlener Probe sind deutlich zu erkennen.

Die Stickstoffwerte zeigen eindeutig: nur die optimale Einstellung liefert reproduzierbare Ergebnisse (SD 0,026 %, RSD 1,301 %). Auch der Feuchtigkeitsgehalt von durchschnittlich 42,61 % bestätigt mit sehr konstanten Messwerten diese Ergebnisse (SD 1,060 %, RSD 2,487 %; vgl. Abb. 5b). Die RSD für die Feuchtigkeit liegt knapp über dem 2 %-Schwellenwert, ein Hinweis auf die grundsätzliche Schwierigkeit, feuchte und bindegewebsreiche Proben reproduzierbar aufzuschließen und anschließend zu analysieren.

Allgemein zeigen die zu grobe und zu lange Mahlung bei den Messwerten eine deutlich höhere Streuung der Stickstoffwerte (RSD 5,904 % und 5,660 %).

Bei zu grober Mahlung der Fleischprobe zeigen sich dabei ähnliche Stickstoffwerte wie bei der optimalen Mahlung, jedoch eine viel höhere Streuung bei Stickstoff (SD 5,904 %) sowie dem Feuchtigkeitsgehalt (SD 4,944 %, vgl. Abb. 5b). Dies zeigt deutlich den Einfluss der inhomogenen Probe auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Im Gegensatz wurden bei zu langem Mahlen höhere Stickstoffwerte gemessen (2,22 % bei zu lang vs. 2,03 % bei optimal), was sich durch den höheren Wasser- bzw. Fettverlust, bei längerer und damit wärmeren Mahlung erklären lässt.

Abb. 5b: Stickstoff-, Protein- und Feuchtigkeitsgehalt von Fleisch. Mittelwert $\pm$ SD. Optimaler Mahlgrad, zu grober Mahlgrad und zu lange gemahlene Probe (GM 200). SD und RSD steigen bei zu grobem und zu langem Mahlen der Probe an, nur die optimale Mahlung liefert für alle Parameter reproduzierbare Ergebnisse.



Durch das zu lange Mahlen wurde die Probe deutlich entmischt und teilweise verflüssigt, wodurch die Schwankungen erklärbar sind und die Probe scheinbar mehr Protein aufweist. Dass gleichzeitig ein höherer Feuchtigkeitsgehalt gemessen wurde, liegt daran, dass der hohe Mahlgrad ebenfalls dazu führt, dass Wasser bei der Analyse besser austreten kann. Fleisch toleriert keinen Kompromiss bei der Probenvorbereitung: weder zu grobes, noch zu langes Mahlen ergibt ein analytisch verwertbares Ergebnis.

DISKUSSION UND FAZIT

Die Ergebnisse über alle fünf Matrices zeigen konsistent: der Mahlgrad ist keine technische Nebenbedingung, sondern eine analytische Variable. Ein zu grober Aufschluss erzeugt inhomogene Proben mit hoher Messunsicherheit, ohne dass dies am Analysator selbst sichtbar wird. Die Messungen erscheinen präzise, bilden aber nicht die tatsächliche Zusammensetzung der Gesamtprobe ab. Ein zu feiner oder zu langer Aufschluss verändert die Probe durch Wärmeeintrag messbar: Feuchtigkeit und flüchtige Verbindungen entweichen, Stickstoff- bzw. Proteinwerte steigen scheinbar an. Oder es treten Entmischungseffekte ein, wo Wasser und/oder Fette abgetrennt werden und damit der Stickstoff- bzw. Proteinwert scheinbar sinkt.

Der Feuchtigkeitsgehalt erweist sich in diesem Kontext als unverzichtbarer Qualitätsindikator. Ein stabiler Feuchtigkeitsgehalt ist kein Zufallsbefund, sondern der Beleg für eine thermisch schonende und vollständig homogenisierende Probenaufbereitung. Erst wenn Elementaranalyse und Feuchtigkeitsbestimmung gemeinsam betrachtet werden, lässt sich bei bestimmten Lebensmittelproben beurteilen, ob ein Ergebnis analytisch valide ist oder ein Artefakt der Probenvorbereitung darstellt. Die Kombination beider Messtechniken sollte im Laboralltag bei einem Cross-Check berücksichtigt werden.

Für die Laborpraxis für die Analyse von Lebensmittelproben ergibt sich eine klare Empfehlung: die Validierung analytischer Methoden muss die Probenvorbereitung explizit einschließen, so wie von den gängigen Normen vorgegeben. Die optimale Mahleinstellung ist matrixspezifisch und muss für jede Probe individuell ermittelt werden. Die vorliegenden Daten zeigen, dass scheinbar geringe Abweichungen von der optimalen Einstellung den Unterschied zwischen einem validen und einem irreführenden Analyseergebnis ausmachen können.

DIE ZUVERLÄSSIGE PROTEINBESTIMMUNG BEGINNT VOR DER ANALYSE MIT DER RICHTIGEN PROBENVORBEREITUNG.

EINGESETZTE GERÄTE ZUR PROBENVORBEREITUNG

GRINDOMIX GM 200 – MESSERMÜHLE FÜR LEBENSMITTEL UND FUTTERMITTEL

Die Messermühle GRINDOMIX GM 200 von Retsch ist speziell für die schnelle und schonende Homogenisierung von Lebensmitteln, Futtermitteln und ähnlichen Matrices konzipiert – einschließlich Proben mit hohem Wasser-, Fett- oder Ölgehalt. Der leistungsstarke 1.000 W Motor mit variabler Drehzahl ermöglicht die Verarbeitung von Probenmengen bis 700 ml. Zahlreiches Zubehör wie Schwerkraftdeckel sorgen für optimale Anpassungen an unterschiedliche Probenmatrices.

Durch Rückwärtslauf werden die scharfen Klingen geschont und Proben mit den stumpfen Seiten der Klingen vorzerkleinert. Programmieroptionen wie Mahldauer, Geschwindigkeit oder auch Intervallfunktion runden die flexible Nutzung ab.



ULTRA-ZENTRIFUGALMÜHLE ZM 300 – SCHNELL, PRÄZISE, ANALYSE-NEUTRAL

Die Ultra-Zentrifugalmühle ZM 300 von Retsch erreicht mit bis zu 23.000 U/min den höchsten Durchsatz ihrer Klasse und ermöglicht eine analyse-neutrale Probenvorbereitung in kürzester Zeit. Das integrierte Temperaturmonitoring gewährleistet die Reproduzierbarkeit auch bei langen Mahlprozessen oder großen Probenvolumina.

Die breite Auswahl an Rotoren (6, 12 oder 24 Zähne), Ringsieben und Kassetten macht die ZM 300 zum Allrounder für Körner, Samen, Lebensmittel, Futtermittel, pflanzliche Materialien und viele weitere Matrices.



MEHR ÜBER RETSCH

Möchten Sie mehr über unsere
Anwendungen erfahren?
Scannen Sie den QR-Code und
entdecken Sie unsere Lösungen.

EINGESETZTE GERÄTE ZUR PROTEINBESTIMMUNG



ELEMENTRAC CN-r – C/N/PROTEIN-ANALYSATOR NACH DUMAS

Der ELEMENTRAC CN-r von ELTRA ist ein Verbrennungsanalysator nach der Dumas-Methode zur Bestimmung von Kohlenstoff und Stickstoff in organischen und anorganischen Proben. Die Analyse erfolgt innerhalb von 2 Minuten und 30 Sekunden und ist damit die schnellste auf dem Markt. Durch die vollständige Oxidation der Probe im Sauerstoffstrom bei 950 °C werden Verbrennungsgase freigesetzt und anschließend mittels Infrarotdetektor und Wärmeleitfähigkeit detektiert.

Dieses Detektionsprinzip ermöglicht eine präzise und selektive Analyse über einen weiten Konzentrationsbereich. Die Analyse läuft dabei nach den gängigen Normen und Standards (ISO, AOAC, etc.) und ist damit für Lebensmittel- und Futtermittelanalytik bestens geeignet.



TGA – THERMOGRAVIMETRISCHER ANALYSATOR

Die TGA von ELTRA bestimmt Massenänderungen einer Probe in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit. Die Probe wird unter definierten Bedingungen erhitzt, wobei der Masseverlust durch Feuchtigkeit, flüchtige Bestandteile sowie der Aschegehalt präzise bestimmt werden. Die Methode zeichnet sich durch hohe Reproduzierbarkeit und direkte Messung ohne Kalibrierung aus.

In Kombination mit der Elementaranalyse liefert die TGA wichtige ergänzende Informationen, gerade zur Interpretation von Veränderungen in Stickstoffgehalten aufgrund von unterschiedlicher Homogenisierungsgrade und stellt damit ein wichtiges Bindeglied in der Analytik von Lebensmittel- und Futtermittelproben dar.



MEHR ÜBER ELTRA

Möchten Sie mehr über unsere **Anwendungen** erfahren? Scannen Sie den QR-Code und entdecken Sie unsere Lösungen.