



ÖNORM EN ISO 8968-1

Ausgabe: 2002-05-01

Normengruppe N

Ident (IDT) mit ISO 8968-1:2001 (Übersetzung)

Ident (IDT) mit EN ISO 8968-1:2001

ICS 67.100.10

Milch – Bestimmung des Stickstoffgehaltes Teil 1: Kjeldahl-Verfahren (ISO 8968-1:2001)

Milk – Determination of nitrogen content – Part 1: Kjeldahl method (ISO 8968-1:2001)

Lait – Détermination de la teneur en azote – Partie 1: Méthode Kjeldahl
(ISO 8968-1:2001)

**Die Europäische Norm EN ISO 8968-1 hat den Status einer
Österreichischen Norm.**

Die ÖNORM EN ISO 8968-1 besteht aus

- diesem nationalen Deckblatt sowie
- der offiziellen deutschsprachigen Fassung der EN ISO 8968-1:2001.

Fortsetzung
EN ISO 8968-1 Seiten 1 bis 13

EUROPÄISCHE NORM
EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE

EN ISO 8968-1

Dezember 2001

ICS 67.100.10

Deutsche Fassung

**Milch - Bestimmung des Stickstoffgehaltes - Teil 1: Kjeldahl-
Verfahren (ISO 8968-1:2001)**

Milk - Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl
method (ISO 8968-1:2001)

Lait - Détermination de la teneur en azote - Partie 1:
Méthode Kjeldahl (ISO 8968-1:2001)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 15. Dezember 2001 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort.....	3
1 Anwendungsbereich.....	3
2 Normative Verweisungen.....	3
3 Begriffe.....	3
4 Kurzbeschreibung.....	4
5 Chemikalien.....	4
6 Geräte.....	5
7 Probenahme.....	6
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	6
9 Durchführung.....	6
9.1 Einwaage und Vorbehandlung.....	6
9.2 Bestimmung.....	6
9.3 Blindwertbestimmung.....	8
9.4 Wiederfindungsversuche.....	8
10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse.....	9
10.1 Berechnung des Stickstoffgehaltes.....	9
10.2 Berechnung des Rohproteingehaltes.....	9
11 Präzision.....	10
11.1 Ringversuch.....	10
11.2 Wiederholpräzision.....	10
11.3 Vergleichpräzision.....	10
12 Untersuchungsbericht.....	10
Anhang A (informativ) Modifiziertes Untersuchungsverfahren für andere Milchprodukte, falls für dieses Produkt keine separate Norm vorhanden ist.....	11
Literaturhinweise.....	13

Vorwort

Diese Internationale Norm ISO 8968-1:2001 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnisse“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milchprodukte - Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ ausgearbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juni 2002, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2002 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

Anerkennungsnotiz

Der Text der Internationalen Norm ISO 8968-1:2001 wurde von CEN als Europäische Norm ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

WARNHINWEIS — Bei der Anwendung dieses Teils von ISO 8968/IDF 20 ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 8968/IDF 20 legt ein Kjeldahl-Verfahren zur Bestimmung des Stickstoffgehaltes flüssiger Vollmilch oder entrahmter Milch fest.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden normativen Dokumente enthalten Festlegungen, die durch Verweisungen in diesem Text Bestandteil dieser Internationalen Norm sind. Bei datierten Verweisungen gelten spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nicht. Anwender dieser Internationalen Norm werden jedoch gebeten, die Möglichkeit zu prüfen, die jeweils neuesten Ausgaben der nachstehend angegebenen normativen Dokumente anzuwenden. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen normativen Dokuments. Mitglieder von ISO und IEC führen Verzeichnisse der gültigen Internationalen Normen.

ISO 385-1, *Laboratory glassware — Burettes — Part 1: General requirements.*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Teils von ISO 8968/IDF 20 gilt der folgende Begriff.

3.1

Stickstoffgehalt

Massenanteil an Stickstoff, der nach dem in diesem Teil von ISO 8968/IDF 20 festgelegten Verfahren bestimmt wird

ANMERKUNG Der Stickstoffgehalt wird als Massenanteil in Prozent angegeben.

4 Kurzbeschreibung

Eine Einwaage wird mit einem Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumsulfat unter Verwendung von Kupfer(II)-sulfat als Katalysator aufgeschlossen, wobei vorhandener organischer Stickstoff in Ammoniumsulfat umgewandelt wird. Das Kaliumsulfat dient dazu, den Siedepunkt der Schwefelsäure zu erhöhen und ein stärker oxidierendes Gemisch für den Aufschluss bereitzustellen. Durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung im Überschuss zum abgekühlten Aufschluss wird Ammoniak freigesetzt, das in überschüssige Borsäurelösung abdestilliert und dann mit Salzsäure titriert wird. Aus der Menge des gebildeten Ammoniaks wird der Stickstoffgehalt berechnet.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, sind bei der Untersuchung nur Chemikalien von bekannter Analysenreinheit zu verwenden. Das verwendete Wasser muss destilliert oder entmineralisiert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein.

5.1 Kaliumsulfat (K_2SO_4), stickstofffrei.

5.2 Kupfer(II)-sulfatlösung, c ($CuSO_4$) = 5,0 g/100 ml.

5,0 g Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) werden in einem 100-ml-Messkolben in Wasser gelöst; es wird bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

5.3 Schwefelsäure (H_2SO_4) mit einem Massenanteil von mindestens 95 % bis 98 %, stickstofffrei (ρ_{20} (H_2SO_4) $\approx$ 1,84 g/ml).

5.4 Natriumhydroxidlösung (Natronlauge) (NaOH), stickstofffrei, mit einem Massenanteil von 50 g Natriumhydroxid je 100 g Lösung.

5.5 Indikatorlösung.

0,1 g Methylrot wird in 95 %igem Ethanol (Volumenanteil) gelöst, mit Ethanol auf 50 ml verdünnt und durchmischt. 0,5 g Bromkresolgrün werden in 95 %igem Ethanol (Volumenanteil) gelöst, mit Ethanol auf 250 ml verdünnt und durchmischt. Ein Teil Methylrotlösung wird mit fünf Teilen Bromkresolgrünlösung gemischt, oder beide Lösungen werden vollständig vereint und durchmischt.

5.6 Borsäurelösung, c (H_3BO_3) = 40,0 g/l.

40,0 g Borsäure werden in einem 1000-ml-Messkolben in 1 l heißem Wasser gelöst. Es wird abgewartet bis der Kolben und dessen Inhalt auf 20 °C abgekühlt sind. Mit Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt, 3 ml Indikatorlösung (5.5) werden zugegeben, und die Lösung wird durchmischt. Die Lösung, die hell-orange gefärbt ist, wird in einer Flasche aus Borosilikatglas aufbewahrt. Während der Lagerung ist die Lösung vor Licht und Ammoniakdämpfen zu schützen.

Bei Anwendung der elektronischen Umschlagpunkttitration des pH-Wertes kann auf die Zugabe der Indikatorlösung zur Borsäurelösung verzichtet werden. Andererseits darf der Farbumschlag auch als Prüfung auf richtige Titrationsabläufe verwendet werden.

5.7 Salzsäure-Standardmaßlösung, c (HCl) = (0,1 $\pm$ 0,0005) mol/l.

Diese Substanz sollte in seitens des Herstellers vorstandardisierter Form gekauft werden, um die oben genannte Anforderung zu erfüllen oder zu übertreffen.

ANMERKUNG (Vermeidbare) systematische Fehler, die ein Bearbeiter beim Verdünnen einer konzentrierten Säure-Stammlösung und bei der anschließenden Bestimmung der Molarität der Säure verursachen kann, können zu einer Verschlechterung der Wiederholpräzision des Verfahrens führen. Der Bearbeiter sollte für die Titration keine Lösung mit einer höheren Konzentration als 0,1 mol/l verwenden, da sich dadurch das Gesamt-Titrationsvolumen je Untersuchungsprobe verringert und die Ablesunsicherheit der Burette einen höheren Prozentsatz des Wertes ausmacht. Dies alles wirkt sich negativ auf die Wiederholpräzision und die Vergleichpräzision des Verfahrens aus. Die gleichen Probleme und zusätzliche Fehlerquellen treten auf, wenn eine andere Säure (z. B. Schwefelsäure) anstelle der Salzsäure verwendet wird. Deshalb sollte ein solcher Austausch nicht vorgenommen werden.

5.8 Ammoniumsulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, Reinheit der Trockensubstanz mindestens 99,9 % (Massenanteil).

Unmittelbar vor Gebrauch wird das Ammoniumsulfat für die Dauer von mindestens 2 h bei $(102 \pm 2)^\circ\text{C}$ getrocknet. In einem Exsikkator wird auf Raumtemperatur abgekühlt.

5.9 Tryptophan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$) oder **Lysinhydrochlorid** ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$) mit einer Reinheit von mindestens 99 % (Massenanteil).

Diese Chemikalien dürfen vor Gebrauch nicht im Wärmeschrank getrocknet werden.

5.10 Saccharose mit einem Massenanteil an Stickstoff von höchstens 0,002 %.

Die Saccharose darf vor Gebrauch nicht im Wärmeschrank getrocknet werden.

6 Geräte

Übliche Laborausstattung sowie:

6.1 Wasserbad, einstellbar auf $38^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.**6.2 Kjeldahlkolben** von 500 ml oder 800 ml Nennvolumen.**6.3 Analysenwaage**, geeignet zum Wägen auf 0,1 mg.**6.4 Siedehilfsmittel (Siedesteinchen)**, z. B. geglühter Bimsstein, Zinkpulver, Hartporzellanstücke oder Granalien aus hochreinem amphoterischem Alundum (d. h. Karborund), glatt, Korngröße 10.

Die Siedehilfsmittel sind nicht wieder zu verwenden.

ANMERKUNG Bisweilen werden Glasperlen von etwa 5 mm Durchmesser verwendet, jedoch ist es möglich, dass diese das Sieden nicht so wirksam unterstützen wie die Alundumgranalien. Außerdem können beim Aufschluss mit Glasperlen in stärkerem Maße Probleme durch Schaumbildung auftreten.

6.5 Bürette oder **automatische Pipette** (Kippautomat), geeignet zur Dosierung von 1 ml Kupfer(II)-sulfatlösung (5.2).**6.6 Graduierte Messzylinder** von 50 ml, 100 ml und 500 ml Nennvolumen.**6.7 Aufschlussgerät**, mit dem die Kjeldahlkolben (6.2) in geneigter Lage (etwa 45°) gehalten werden, ausgestattet mit elektrischer Heizquelle oder Gasbrennern, die den Inhalt der Kjeldahlkolben nicht oberhalb des Flüssigkeitsspiegels erhitzen, und einer Absaugeinrichtung für entstehende Dämpfe.

Die Heizquelle sollte einstellbar sein, so dass sich die beim Aufschluss anzuwendende höchste Einstellung steuern lässt. Zur Beurteilung der Heizeinstellung wird die Heizquelle vorgewärmt. Im Falle eines Gasbrenners muss die Vorheizdauer 10 min und bei einer elektrischen Heizquelle 30 min betragen. Für die jeweilige Heizquelle ist die Heizeinstellung zu ermitteln, bei der 250 ml Wasser mit fünf bis zehn Siedesteinchen und einer Anfangstemperatur von 25°C innerhalb von 5 min bis 6 min zum Sieden gebracht werden. Das ist die höchste Heizeinstellung, die beim Aufschluss anzuwenden ist.

6.8 Destillationsgerät aus Borosilikatglas oder einem anderen geeigneten Werkstoff, passend zum Kjeldahlkolben (6.2), bestehend aus einem wirksamen Destillieraufsatz (Tropfenfänger), der mit einem Liebigkühler mit geradem Innenrohr und langem Ablaufrohr am unteren Ende verbunden ist.

Die Verbindungsschläuche und Stopfen müssen dicht schließen und vorzugsweise aus Neopren-Kautschuk hergestellt sein.

6.9 Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 500 ml, Teilstrich bei jeweils 200 ml.**6.10 Bürette**, 50 ml Nennvolumen, Skalenteilung mindestens 0,01 ml, die den Anforderungen nach ISO 385-1, Klasse A, entspricht.

Alternativ darf eine automatische Bürette verwendet werden, wenn diese die gleichen Anforderungen erfüllt.

6.11 Automatisches, mit pH-Messgerät ausgestattetes Titriergerät.

Das pH-Messgerät sollte im Bereich von pH = 4 bis pH = 7 anhand der üblichen Laborverfahren zur pH-Wert-Kalibrierung genau eingestellt sein.

7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Teil von ISO 8968/IDF 20 festgelegten Verfahrens. Ein als geeignet zu empfehlendes Probenahmeverfahren ist in ISO 707 angegeben.

Es ist wichtig, dass dem Labor eine Probe zur Verfügung gestellt wird, die tatsächlich repräsentativ ist und die während des Transportes oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden ist.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird im Wasserbad (6.1) auf 38 °C erwärmt und durch vorsichtiges wiederholtes Stürzen der Probenflasche gründlich durchmischt, ohne jedoch Schaumbildung oder Ausbuttern zu verursachen. Unmittelbar vor dem Wägen der Einwaage (9.1) wird die Untersuchungsprobe auf Raumtemperatur abgekühlt.

ANMERKUNG Zu Hinweisen hinsichtlich der Größe der Einwaage bei der Anwendung dieses Verfahrens auf andere Molke-reiprodukte als Milch siehe Anhang A.

9 Durchführung

9.1 Einwaage und Vorbehandlung

In einen sauberen und trockenen Kjeldahlkolben (6.2) werden fünf bis zehn Siedesteinchen (6.4), 15,0 g Kalium-sulfat (5.1), 1,0 ml Kupfer(II)-sulfatlösung (5.2) und etwa $(5 \pm 0,1)$ g der vorbereiteten Untersuchungsprobe (siehe Abschnitt 8) auf 0,1 mg eingewogen und 25 ml Schwefelsäure (5.3) zugegeben. Die Schwefelsäure wird dazu verwendet, eventuell am Hals des Kjeldahlkolbens anhaftende Kupfer(II)-sulfatlösung, anhaftendes Kaliumsulfat oder Reste der Einwaage herunterzuspülen. Falls schwarz gefärbter Aufschluss am Hals des Kjeldahlkolbens anhaftet, wird dieser mit einer kleinen Wassermenge heruntergespült. Der Inhalt des Kjeldahlkolbens wird vorsichtig durch-mischt.

ANMERKUNG Zu Hinweisen über die Größe der Untersuchungsprobe bei der Anwendung dieses Verfahrens auf andere Molkereiprodukte als Milch siehe Anhang A.

9.2 Bestimmung

9.2.1 Aufschluss

Vor Beginn des Aufschlusses wird die Absaugeinrichtung des Aufschlussgerätes (6.7) eingeschaltet. Der Kjeldahl-kolben und dessen Inhalt (9.1) werden auf dem Aufschlussgerät erhitzt, wobei die Einstellung der Heizquelle so niedrig gewählt wird, dass der schwarz gefärbte Aufschluss nicht in den Hals des Kjeldahlkolbens aufschäumt. Der Aufschluss wird bei dieser Geräteeinstellung durchgeführt, bis nach etwa 20 min weiße Dämpfe im Kolben auf-treten. Der Aufschluss wird dann 15 min bei Einstellung der Heizquelle auf die Hälfte des nach 6.7 ermittelten höchsten Wertes der Heizeinstellung fortgesetzt. Nach Ablauf der 15 min wird die Heizquelle auf den höchsten nach 6.7 ermittelten Wert eingestellt. Sobald der Aufschluss klar wird (klar mit leicht blau-grüner Färbung), wird der Aufschluss bei dieser Heizeinstellung für die Dauer von 1 h bis 1,5 h fortgesetzt. Falls die Flüssigkeit nicht siedet, kann der endgültige Einstellwert der Heizquelle zu niedrig sein. Die gesamte Aufschlussdauer liegt bei 1,8 h bis 2,25 h.

Zur Ermittlung der spezifischen Aufschlussdauer, die unter den Untersuchungsbedingungen in einem bestimmten Labor mit einem bestimmten Aufschlussgerät erforderlich ist, wird für die Milchuntersuchung eine protein- und fett-reiche Milchprobe eingesetzt und deren Proteingehalt bei unterschiedlicher Aufschlussdauer (1 h bis 1,5 h) nach Klärung bestimmt. Der mittlere Proteingehalt erhöht sich mit zunehmender Aufschlussdauer, bleibt eine gewisse

Zeit konstant und nimmt dann wieder ab, sobald der Aufschluss zu lange dauert. Die Aufschlussdauer wird so gewählt, dass sich der höchste Proteingehalt ergibt.

Nach Beendigung des Aufschlusses muss der Aufschluss klar und frei von nicht aufgeschlossenen Bestandteilen sein. Der Aufschluss wird im geöffneten Kjeldahlkolben während einer Dauer von etwa 25 min unter einem gesonderten Abzug auf Raumtemperatur abgekühlt. Falls der Kolben zum Abkühlen auf der heißen Heizquelle belassen wird, wird mehr Zeit benötigt, um Raumtemperatur zu erreichen. Am Ende der Abkühldauer von 25 min sollte der abgekühlte Aufschluss flüssig sein oder als Flüssigkeit vorliegen, aus der sich auf dem Boden des Kolbens einige kleine Kristalle abgeschieden haben. Der unverdünnte Aufschluss darf nicht über Nacht in dem Kolben stehen gelassen werden. Der unverdünnte Aufschluss kann während dieser Zeit erstarren und ist dann nur schwer in Lösung zu bringen.

ANMERKUNG Nach einer Abkühldauer von 25 min auftretende übermäßige Kristallisation ist das Ergebnis eines unzulässigen Säureverlustes beim Aufschluss, der zu Untersuchungswerten führen kann, die zu niedrig ausfallen. Unzulässiger Säureverlust wird durch übermäßiges Absaugen von Dämpfen oder unangemessen lange Aufschlussdauer aufgrund einer falschen Einstellung des höchsten Heizquellen-/Brennereinstellwertes bewirkt.

Bei Verwendung von 500-ml-Kjeldahlkolben werden 300 ml Wasser und bei Verwendung von 800-ml-Kjeldahlkolben werden 400 ml Wasser zugegeben. Das Wasser wird auch dazu benutzt, den Kolbenhals abzuspülen. Der Kolbeninhalt wird gründlich durchmischt, wobei sicherzustellen ist, dass sich sämtliche abgesetzten Kristalle lösen. Es werden fünf bis zehn Siedesteinchen (6.4) zugegeben. Vor der Destillation wird das Gemisch wieder auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Verdünnte Aufschlüsse dürfen mit einem Stopfen versehen und für die Destillation zu einem späteren Zeitpunkt aufbewahrt werden.

9.2.2 Destillation

Das Kühlwasser für das Destillationsgerät (6.8) wird angestellt. Durch vorsichtiges Gießen am geneigten Hals des Kjeldahlkolbens werden zu der verdünnten Aufschlusslösung (9.2.1) 75 ml Natronlauge (5.4) zugegeben, so dass diese am Boden des Kolbens eine Schicht herausbildet. Zwischen beiden Lösungen sollte eine deutliche Schichtentrennung erfolgen. Um die Möglichkeit eines Ammoniakverlustes zu verringern, wird unmittelbar nach Überführen der Natronlauge in den Kjeldahlkolben dieser schnell mit dem Destillationsgerät (6.8) verbunden. Die Spitze des Kühlerablaufrohrs wird in einen Erlenmeyerkolben (6.9) eingetaucht, in dem 50 ml Borsäurelösung (5.6) vorgelegt sind. Damit der Kolbeninhalt gründlich durchmischt wird, ist der Kjeldahlkolben so lange kräftig umzuschwenken, bis keine Schichtentrennung mehr im Kolben zu erkennen ist. Der Kolben wird erneut auf die Heizquelle gestellt. Die Heizquelle wird so hoch eingestellt, dass das Gemisch siedet. Die Destillation wird fortgesetzt, bis der Inhalt stoßweise zu sieden beginnt, dann wird der Kjeldahlkolben sofort vom Destillationsgerät getrennt und die Heizquelle abgeschaltet. Das Kühlwasser wird abgestellt. Die Innen- und Außenseite der Spitze des Kühlerablaufrohrs wird mit Wasser abgespült, die Spülflüssigkeit im Erlenmeyerkolben gesammelt und der Inhalt durchmischt.

Die Destillationsgeschwindigkeit muss so eingestellt sein, dass mit Beginn des unregelmäßigen Siedens etwa 150 ml Destillat gesammelt wurden und das Gesamtvolumen der Lösung im Erlenmeyerkolben etwa 200 ml beträgt. Ist das gesammelte Volumen des Destillats geringer als 150 ml, wurden eventuell weniger als 300 ml Wasser zur Verdünnung des Aufschlusses zugegeben. Der Wirkungsgrad des Kühlers muss so sein, dass während der Destillation die Temperatur des Inhalts des Erlenmeyerkolbens 35 °C bei Verwendung eines kolorimetrischen Umschlagpunktes nicht überschreitet.

9.2.3 Titration

Der Inhalt des Erlenmeyerkolbens (9.2.2) wird unter Verwendung einer Bürette (6.5) mit Salzsäure (5.7) titriert. Der Umschlagpunkt ist bei der ersten Spur eines Farbumschlags nach rosa erreicht. An der Bürette wird der Verbrauch auf mindestens 0,05 ml abgelesen. Eine beleuchtete Rührwerksplatte kann helfen, den Umschlagpunkt besser sichtbar zu machen.

Alternativ wird der Inhalt des Erlenmeyerkolbens (9.2.2) mit Salzsäure (5.7) unter Verwendung eines korrekt kalibrierten automatischen, mit pH-Messgerät ausgestatteten Titriergerätes (6.11) titriert. Der pH-Umschlagpunkt der Titration wird bei pH = 4,6 erreicht, was dem steilsten Punkt in der Titrierkurve (Wendepunkt) entspricht. Die Menge des verbrauchten Titriermittels wird am automatischen Titriergerät abgelesen.

ANMERKUNG 1 Die erste Spur einer Rosafärbung wird bei dem in diesem Verfahren festgelegten Indikatorsystem und der 4 %igen Borsäurelösung bei pH = 4,6 bis pH = 4,3 beobachtet. In der Praxis ist die Veränderungsgeschwindigkeit des pH-Wertes als Funktion der zugegebenen 0,1-mol/l-Salzsäure in diesem pH-Bereich sehr hoch. In diesem System werden etwa 0,05 ml an 0,1-mol/l-Salzsäure benötigt, um den pH-Wert im Bereich von 4,3 bis 4,6 um 0,3 Einheiten zu verändern.

EN ISO 8968-1:2001 (D)

ANMERKUNG 2 Die Leistungsstatistiken für dieses Verfahren innerhalb eines Labors und in unterschiedlichen Labors wurden anhand einer Titration mit Farbumschlagpunkt bestimmt. Der Vergleich der endgültigen Untersuchungsergebnisse, einschließlich derer für die Blindprobenuntersuchungen, die mit einem pH-Umschlagpunkt von 4,6 erzielt wurden, mit denen einer Titration mit Farbumschlagpunkt zeigten, dass kein signifikanter statistischer Unterschied zwischen diesen nachweisbar war.

9.3 Blindwertbestimmung

Die Blindproben sind immer mit der gleichen Salzsäure (5.7) und der gleichen Bürette (6.5) oder dem automatischen, mit pH-Messgerät ausgestatteten Titriergerät (6.11) zu titrieren, wie sie für die Einwaagen verwendet werden. Die Blindwertbestimmung wird nach der in 9.1 bis 9.2.3 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt, wobei die Einwaage durch 5 ml Wasser mit etwa 0,85 g Saccharoseanteil (5.10) ersetzt wird.

Die Blindwerte werden protokolliert. Falls sich die Blindwerte verändern, ist die Ursache zu ermitteln.

ANMERKUNG 1 Die Saccharose in einer Blindprobe oder in einem Wiederfindungsstandard dient als organisches Material, das beim Aufschluss so viel Schwefelsäure verbraucht, wie es annähernd einer Einwaage entspricht. Falls die Menge der am Ende des Aufschlusses verbleibenden freien Schwefelsäure zu gering ist, wird die Wiederfindungsrate des Stickstoffs bei den Wiederfindungsversuchen nach 9.4.2 und 9.4.3 zu niedrig sein. Falls jedoch die Menge der am Ende des Aufschlusses verbleibenden Säure ausreicht, um den gesamten Stickstoff zurückzuhalten, aber die Temperatur- und zeitlichen Bedingungen beim Aufschluss nicht ausreichend waren, um den gesamten Stickstoff aus einer Probe freizusetzen, wird die Wiederfindungsrate des Stickstoffs nach 9.4.2 annehmbar und die Wiederfindungsrate des Stickstoffs nach 9.4.3 zu gering sein.

Die Menge an für die Blindprobe verbrauchtem Titrationsmittel sollte immer größer als null sein. Blindproben in demselben Labor sollten stets etwa gleich sein. Typische Werte für Blindproben sind gleich oder geringer als 0,2 ml.

ANMERKUNG 2 Ist die Blindprobe bereits vor Beginn der Titration rosa gefärbt, liegt ein Fehler vor. Üblicherweise sind in derartigen Fällen die Erlenmeyerkolben unsauber, oder an der Außenseite des Destillationsgeräts kondensiertes Wasser aus der Luft ist in den Sammelkolben getropft und hat die Kontamination verursacht.

9.4 Wiederfindungsversuche

9.4.1 Die Genauigkeit des Verfahrens sollte regelmäßig mit folgenden nach 9.1 bis 9.2.3 durchgeführten Wiederfindungsversuchen überprüft werden.

9.4.2 Mit einer Einwaage, bestehend aus 0,12 g Ammoniumsulfat (5.8) und 0,85 g Saccharose (5.10), wird überprüft, ob kein Stickstoffverlust auftritt.

ANMERKUNG Der Wiederfindungsversuch mit Ammoniumsulfat liefert keine Angaben darüber, ob sich die Aufschlussbedingungen zur Freisetzung von Proteinstickstoff eignen.

Der prozentuale Anteil an wiedergefundenem Stickstoff muss für alle Positionen auf dem Gerät zwischen 99,0 % und 100 % liegen. Bei Wiederfindungsraten unter 99 % ist die Äquivalentkonzentration des Titrationsmittels höher als der angegebene Wert, oder beim Aufschluss oder bei der Destillation kann ein Stickstoffverlust aufgetreten sein. Es ist möglich, ein Gemisch aus Ammoniumsulfat und einer kleinen Menge Schwefelsäure (Rückstandsmenge, die am Ende eines Aufschlusses verbleibt) in einem Kjeldahlkolben zu verwenden. Das Gemisch wird mit dem üblichen Volumen Wasser verdünnt, es wird die übliche Menge an Natronlauge zugegeben und destilliert. Falls die Wiederfindungsrate immer noch um den gleichen Betrag zu niedrig ist, tritt der Stickstoffverlust im Destillationsgerät und nicht beim Aufschluss auf. Die mögliche Ursache kann ein Leck in einem Schlauch des traditionellen Systems sein, oder die Ablaufspitze des Kühlers taucht zu Beginn der Destillation nicht tief genug in die Borsäurelösung ein. Das Destillationsgerät sollte diese Überprüfung bestehen, bevor die Wiederfindungsrate nach dem Verfahren nach 9.4.3 überprüft wird.

Überschreiten die Wiederfindungsraten des Stickstoffs 100 %, ist kein Stickstoffverlust aufgetreten. In diesem Fall sind einige der möglichen Ursachen folgende:

- a) das Ammoniumsulfat ist kontaminiert;
- b) die tatsächliche Molarität des Titrationsmittels ist geringer als der angegebene Wert;
- c) die Kalibrierung der Bürette für das Titrationsmittel ist falsch;

- d) die Temperatur des Titrationsmittels liegt zu weit oberhalb der Temperatur bei der Kalibrierung der Bürette oder
- e) der Ablauf des Titrationsmittels aus der Bürette erfolgt schneller, als es die Kalibrierung der Bürette maximal vorsieht.

9.4.3 Der Wirkungsgrad des Aufschlussverfahrens wird unter Verwendung von 0,16 g Lysinhydrochlorid oder 0,18 g Tryptophan (5.9) und 0,67 g Saccharose (5.10) überprüft.

Es muss mindestens ein Massenanteil von 98 % des Stickstoffs wiedergefunden werden. Ist die Wiederfindungsrate, bei einer Wiederfindungsrate des Massenanteils von Ammoniumsulfat von 99 % bis 100 %, geringer als 98 %, so ist die Aufschlusstemperatur oder –dauer unzureichend (das Verfahren nach 9.2.1, Absatz 1 und Anmerkung, ist zu befolgen), oder der Kjeldahlkolben enthält nicht aufgeschlossenes Probenmaterial (d. h. verkohlte Substanz). Die endgültige Beurteilung der Eignung des Verfahrens erfolgt am besten über die Beteiligung an Ringversuchen, bei denen die statistischen Parameter innerhalb eines Labors und für unterschiedliche Labors auf der Grundlage der Untersuchung von Milchuntersuchungsproben berechnet werden.

9.4.4 Niedrigere Ergebnisse bei einer der Prüfungen der Wiederfindungsrate (oder höhere als 100 % in 9.4.2) deuten auf Fehler in der Durchführung und/oder eine ungenaue Konzentration der Salzsäurelösung (5.7) hin.

10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse

10.1 Berechnung des Stickstoffgehaltes

10.1.1 Der Stickstoffgehalt der Untersuchungsprobe, w_N , wird nach folgender Gleichung errechnet:

$$w_N = \frac{1,4007 (V_s - V_b) M_r}{m}$$

Dabei ist

w_N der Stickstoffgehalt der Probe, angegeben als Massenanteil in Prozent;

V_s das Volumen der bei der Bestimmung (9.2.3) verbrauchten Salzsäure (5.7), in Milliliter, angegeben auf 0,05 ml gerundet;

V_b das Volumen der bei der Blindwertbestimmung (9.3) verbrauchten Salzsäure (5.7), in Milliliter, angegeben auf 0,05 ml gerundet;

M_r die genaue Molarität der Salzsäure (5.7), angegeben auf vier Dezimalstellen;

m die Masse der Einwaage (9.1) in Gramm, angegeben auf 0,1 mg gerundet.

10.1.2 Falls die erhaltenen Ergebnisse für weitere Berechnungen erforderlich sind, werden diese auf vier Dezimalstellen angegeben. Falls es sich dabei um endgültige Ergebnisse handelt, werden diejenigen für den Stickstoffgehalt auf drei Dezimalstellen und diejenigen für den Proteingehalt auf zwei Dezimalstellen angegeben. Die erhaltenen Ergebnisse sollten nicht weiter gerundet werden, bis die endgültige Verwendung des Untersuchungswertes erfolgt.

ANMERKUNG Dies gilt besonders, wenn die Werte für weitere Berechnungen verwendet werden sollen. Ein Beispiel dafür ist, wenn die aus der Analyse vieler Probenmaterialien erhaltenen Einzeluntersuchungswerte verwendet werden, um Leistungsstatistiken für das Verfahren hinsichtlich der Varianzbreite innerhalb eines Labors und für unterschiedliche Labors zu berechnen. Ein anderes Beispiel ist, wenn die Werte als Bezugswert für die Kalibrierung von Geräten (z. B. Infrarot-Milchanalysator) dienen, wobei die Werte von vielen Proben für eine Berechnung mittels einfacher oder multipler Regression verwendet werden. In derartigen Fällen sollten die erhaltenen Werte nicht gerundet werden, bevor diese für weitere Berechnungen verwendet werden.

10.2 Berechnung des Rohproteingehaltes

10.2.1 Der Rohproteingehalt, w_p , wird nach folgender Gleichung errechnet:

$$w_p = w_N \times 6,38$$

EN ISO 8968-1:2001 (D)

Dabei ist

w_P der Rohproteingehalt der Probe, angegeben als Massenanteil in Prozent;

w_N der Stickstoffgehalt der Probe, angegeben als Massenanteil in Prozent auf vier Dezimalstellen (10.1);

6,38 der allgemein anerkannte Multiplikationsfaktor zur Angabe des Stickstoffgehalts als Rohproteingehalt.

10.2.2 Die erhaltenen Ergebnisse für den Rohproteingehalt werden auf drei Dezimalstellen angegeben, falls diese für weitere Berechnungen benötigt werden. Im Fall endgültiger Ergebnisse (siehe 10.1) werden diese auf zwei Dezimalstellen angegeben.

11 Präzision

11.1 Ringversuch

Die Werte für die Wiederhol- und die Vergleichsgrenzen wurden aus den Ergebnissen eines nach ISO 5725¹⁾ durchgeführten Ringversuchs abgeleitet. Einzelheiten des Ringversuchs zu dem Verfahren sind in [5] und [6] zusammengefasst. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind möglicherweise nicht zwangsläufig auf andere Konzentrationsbereiche und Matrices als die angegebenen anwendbar.

11.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen, voneinander unabhängigen Stickstoffbestimmungen, die derselbe Bearbeiter mit dem gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial in demselben Labor mit derselben Geräteausstattung innerhalb der kürzestmöglichen Zeitspanne erhält, wird nicht häufiger als in 5 % der Fälle für den Stickstoffgehalt 0,006 % (für den Rohproteingehalt 0,038 %) überschreiten.

11.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Stickstoffbestimmungen, die verschiedene Bearbeiter mit dem gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial in verschiedenen Labors mit unterschiedlichen Geräteausstattungen erhalten, wird nicht häufiger als in 5 % der Fälle für den Stickstoffgehalt 0,007 7 % (für den Rohproteingehalt 0,049 %) überschreiten.

12 Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht sind anzugeben:

- alle notwendigen Angaben zur vollständigen Identifizierung der Probe;
- das Probenahmeverfahren, falls bekannt;
- das angewendete Verfahren unter Hinweis auf diesen Teil von ISO 8968/IDF 20;
- sämtliche Einzelheiten von Arbeitsgängen, die in diesem Teil von ISO 8968/IDF 20 nicht festgelegt sind oder als wahlfrei anzusehen sind, zusammen mit Einzelheiten von Vorkommnissen, die möglicherweise das (die) Ergebnis(se) beeinflusst haben können;
- das (die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se);
- falls die Wiederholpräzision überprüft wurde, das ermittelte Endergebnis;
- falls die Wiederfindungsrate überprüft wurde, das ermittelte Endergebnis;

1) ISO 5725:1986 (jetzt zurückgezogen) wurde zur Ermittlung der Präzisionsdaten herangezogen.

Anhang A (informativ)

Modifiziertes Untersuchungsverfahren für andere Milchprodukte, falls für dieses Produkt keine separate Norm vorhanden ist

A.1 Allgemeines

Das in diesem Teil von ISO 8968/IDF 20 beschriebene Verfahren wurde optimiert und hinsichtlich dessen Leistungsfähigkeit bei der Untersuchung von Kuhmilch evaluiert. Falls keine separate Norm vorhanden ist, kann bei einem Labor der Wunsch bestehen, das gleiche Verfahren mit geringer Abänderung zur Bestimmung des Stickstoffgehaltes bei einer Reihe von Milchprodukten anzuwenden. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass das Verfahren und dessen Leistungsfähigkeit bei Nichtvorliegen einer separaten Norm für derartige Anwendungen nicht validiert wurde.

A.2 Durchführung

Die erforderliche Masse der Einwaage, die von einer wie im Folgenden beschriebenen entsprechend vorbereiteten Untersuchungsprobe entnommen wurde, wird auf 0,1 mg eingewogen. Die Bestimmung des Stickstoffgehaltes erfolgt nach dem in 9.1 bis 9.4 beschriebenen Verfahren.

Die beim Aufschluss- und Destillationsvorgang verwendeten Mengen an Schwefelsäure (5.3) und Natriumhydroxidlösung (5.4) sollten nicht verändert werden. Die Veränderung des Verhältnisses von Säure zu anderen Bestandteilen erniedrigt den Anfangssiedepunkt des Gemischs beim Aufschluss und ist deshalb nicht ratsam.

Bei der Arbeit mit den Chemikalien, die in diesem Teil von ISO 8968/IDF 20 festgelegt sind, sollte eine Einwaage angemessener Größe verwendet werden. Die geeignete Einwaagegröße für irgendeine Untersuchungsprobe (eines Produktes) kann wie folgt abgeschätzt werden: Bei jeder Untersuchungsprobe muss die optimale Proteinmenge je Kjeldahlkolben (6.2) bei 0,15 g bis 0,30 g liegen. Wenn also eine durchschnittliche Cheddar-Käseprobe 24,00 % Protein enthält, sollte die Masse der Einwaage bei 0,625 g bis 1,25 g liegen. Die Entscheidung, Einwaagemassen einzusetzen, deren Mittelwert am unteren oder oberen Ende des Bereiches liegt, hängt davon ab, wie viel Säure die übrigen Probenbestandteile (d. h. Fett und Kohlenhydrate) beim Aufschluss verbrauchen werden.

Das Verfahren beschreibt eine Zugabe von 25 ml (etwa 46 g) Schwefelsäure zur Einwaage im Kjeldahlkolben. Am Ende des Aufschlusses müssen etwa 15 g Säure im Kolben verbleiben, um den gesamten Stickstoff zurückzuhalten.

Es sollte daran gedacht werden, dass Schwefelsäure durch die Einwaage verbraucht wird und auch durch Verflüchtigung während des Aufschlusses verloren geht. Der Verlust durch Verflüchtigung kann der Menge, die durch die organischen Substanzen in einer Einwaage verbraucht wird, entsprechen. Die endgültige Menge der Rest-Säure wird eine Funktion beider dieser Prozesse sein. Ein übermäßiger Säureverlust (verursacht durch übermäßiges Absaugen von Dämpfen oder zu heiße Kolbenhälse) kann dazu führen, dass am Ende des Aufschlusses zu wenig Rest-Säure übrig bleibt, selbst wenn die Einwaagegröße richtig war.

Eine zu geringe Menge an Rest-Säure führt nach 25 min Abkühldauer zur Kristallisation des Aufschlusses und zu einer niedrigen Wiederfindungsrate des Stickstoffs.

Sahne mit 40 % Fettanteil ist ein Beispiel für ein schwieriges Produkt. In diesem Fall ist der Protein- und Stickstoffgehalt niedrig und der Fettgehalt hoch. Angenommen, eine durchschnittliche Sahneprobe enthält etwa 40 % Fett, 1,9 % Protein und 2,9 % Laktose. Um eine Masse von 0,15 g Protein im Kjeldahlkolben zu erhalten, sollte eine Einwaage von 7,89 g verwendet werden. Diese Einwaage würde 3,16 g Fett enthalten, das allein 56,9 g (etwa 30,9 ml) Schwefelsäure beim Aufschluss verbrauchen würde, ohne dass irgendein Verlust von Schwefelsäure durch Verflüchtigung berücksichtigt wird (auf der Grundlage der Annahme, dass 1 g Fett beim Aufschluss 18 g Schwefelsäure verbraucht). Dies ist ein Beispiel für den Fall, dass die Menge der Einwaage verringert werden muss, um zu ermöglichen, dass am Ende des Aufschlusses eine angemessene Menge an Schwefelsäure verbleibt. Im Fall von Untersuchungsproben wie Sahne sollte ein Titrationsmittel niedrigerer Konzentration verwendet werden

(z. B. 0,01 mol/l). In diesen Fällen muss die eingewogene Menge verringert werden, um zu ermöglichen, dass am Ende des Aufschlusses eine angemessene Menge an Schwefelsäure verbleibt.

Die für eine Blindprobe oder für Wiederfindungsstandards für andere Produkte als Kuhmilch erforderliche Menge an Saccharose darf wie folgt ermittelt werden:

Erstens ist (je nach Produkt) für die gewählte Untersuchungsprobe eine Abschätzung des annähernden Fett-, Protein- und Kohlenhydratgehaltes und der annähernd für den Aufschluss zu verwendenden Einwaagemasse erforderlich.

Zweitens verbrauchen beim Aufschluss 1 g Fett etwa 18 g Schwefelsäure, 1 g Protein etwa 9 g Schwefelsäure und 1 g Kohlenhydrate etwa 7 g Schwefelsäure.

Auf der Grundlage der obigen Angaben kann die von einer Einwaage verbrauchte Säuremenge und die Menge an Saccharose, die beim Aufschluss für den Verbrauch der gleichen Säuremenge benötigt wird, berechnet werden. Die berechnete Saccharosemenge sollte für die Blindprobe und den Wiederfindungsstandard mit Ammoniumsulfat verwendet werden.

Für den Aminosäurestickstoff-Wiederfindungsstandard (9.4.3) wird die Menge an Saccharose hinsichtlich der Menge an Säure verringert, die vom Lysinhydrochlorid oder vom Tryptophan verbraucht wird (berechnet als Protein). Es wird angenommen, dass die Wiederfindungsrate des Stickstoffs beim Aufschluss in dem verwendeten Gerät bei anderen Untersuchungsproben die gleiche ist wie bei Milch, ohne dass Wiederfindungsversuche durchgeführt werden, um Bedingungen zu schaffen, unter denen vergleichbare Konzentrationen an Schwefelsäure am Ende des Aufschlusses erreicht werden.

Literaturhinweise

- [1] ISO 707, *Milk and milk products — Guidance on sampling.*
- [2] ISO 5725:1986, *Precision of test methods — Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.*
- [3] ISO 5725-1:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions.*
- [4] ISO 5725-2:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.*
- [5] BARBANO, D. M., Clark, J. L., Dunham, C. E., and Fleming, J. R., Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 1990, pp. 849–859.
- [6] LYNCH, J. M., BARBANO, D. M., Fleming, J. R., Performance evaluation of direct forced-air total solids and Kjeldahl total nitrogen methods: 1990 through 1995. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **80**, 1997, pp. 1038–1043.