

ADR-Empfehlung 1.13

Referenzmethode zur Bestimmung des Harnstoffgehaltes in Milch Kontinuierliche Durchflussanalyse

1. Anwendungsbereich und Zweck

Diese Methode beschreibt ein Referenzverfahren zur Bestimmung des Harnstoffgehaltes in Milch.

2. Begriff

Der Harnstoffgehalt von Milch ist der nach dem hier beispielhaft ¹⁾ beschriebenen Verfahren bestimmte Gehalt an Harnstoff.

Er wird in mg Harnstoff je 1000 ml der Probe angegeben.

3. Kurzbeschreibung des Verfahrens

Diese Methode beschreibt ein kontinuierliches Durchflussverfahren mit luftsegmentierter Proben-trennung zur photometrischen Bestimmung von Harnstoff in Milch.

Die durch das Analysengerät automatisch entnommene Probe wird in einer Natriumchloridlösung verdünnt und gegen ein DAM- Farbreagenz dialysiert. Anschließend wird ein Säurekatalysator hinzugefügt.

Der Reagenzienstrom wird auf 90°C temperiert, wobei DAM zu Diacetyl hydrolysiert und mit Harnstoff in Gegenwart von Thiosemicarbacid einen Farbkomplex bildet, dessen Absorption bei 520 nm gemessen wird. Über die Auswertesoftware des PC wird der Harnstoffgehalt angegeben.

4. Chemikalien / Herstellen von Lösungen und Standards

4.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien zu verwenden.

Das verwendete Wasser muß deionisiert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein.

- Natriumchlorid NaCl
- Diacetylmonoxim C₄H₇NO₂ (DAM)
- Thiosemicarbacid CH₅N₃S
- Harnstoff CH₄N₂O
- Eisen-III-Chlorid FeCl₃ x 6 H₂O
- Benzoesäure C₇H₆O₂

¹⁾ Hausmethode der Firma Skalar-Analytik

- Natriumhydroxid NaOH $\omega = 32\%$
- o-Phosphorsäure H₃PO₄ $\omega = 85\%$
- Schwefelsäure H₂SO₄ $\omega = 97\%$

- Brij 35 , $\omega = 30\%$ (Detergent)
- Mucosol $\omega = 4\%$ (Schnellreiniger)

4.2 Herstellen von Lösungen

Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf die Herstellung von 1000 ml Lösung.

4.2.1 Natriumchloridlösung

NaCl	18 g
Wasser, deion.	1000 ml
Brij 35 , $\omega = 30\%$	3 ml

NaCl in ca. 800 ml Wasser lösen, auf 1000 ml auffüllen und Brij hinzufügen, mischen

4.2.2 Farbreagenz

Diacetylmonoxim	1,675 g
Thiosemicarbacid	335 mg
Wasser, deion.	1000 ml
Brij 35 , $\omega = 30\%$	3 ml

Diacetylmonoxim und Thiosemicarbacid in ca. 800 ml Wasser lösen, auf 1000 ml auffüllen, Brij hinzufügen ,mischen , pH-Wert kontrollieren und falls notwendig mit $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (0,1 N) NaOH auf 7,5-8,0 einstellen.

Während der Untersuchung ist die Lösung mehrfach zu rühren.

4.2.3 Säurereagenz

Eisen-III-chlorid	33 mg
o-Phosphorsäure, $\omega = 85\%$	0,65 ml
Schwefelsäure, $\omega = 97\%$	200 ml
Wasser,deion.	800 ml

Eisenchlorid in ca. 600 ml Wasser lösen, anschließend sehr vorsichtig Phosphor- und Schwefelsäure unter Köhlen und ständigem Rühren hinzugeben, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen und gründlich mischen.

4.2.4 Spüllösung für den Probenehmer

Wasser, deion.	1000 ml
Brij 35 , $\omega = 30\%$	3 ml

4.2.5 Gesättigte Benzoesäure

Benzoesäure	5 g
Wasser, deion.	1000 ml

Benzoesäure in ca. 800 ml Wasser lösen, auf 1000 ml auffüllen, mischen und vor dem Gebrauch filtrieren.

4.2.6 Harnstoff-Stammlösung

Harnstoff 10 g
ges. Benzoesäure 1000 ml

Harnstoff in ca. 800 ml Benzoesäure lösen, auf 1000 ml auffüllen und mischen.

4.3 Herstellen von Standards

S 1 : 5 ml Harnstoff-Stammlösung sind mit ges. Benzoesäure auf 500 ml aufzufüllen
S 2 : 10 ml Harnstoff-Stammlösung sind mit ges. Benzoesäure auf 500 ml aufzufüllen
S 3 : 15 ml Harnstoff-Stammlösung sind mit ges. Benzoesäure auf 500 ml aufzufüllen
S 4 : 20 ml Harnstoff-Stammlösung sind mit ges. Benzoesäure auf 500 ml aufzufüllen

Konzentration mg Harnstoff / l Lösung

S 1 : 100 mg
S 2 : 200 mg
S 3 : 300 mg
S 4 : 400 mg

Bei Einsatz von Analysetechnik eines anderen Herstellers ²⁾ ist bei der Herstellung von Lösungen und Standards jeweils nach dessen Hausmethode zu verfahren.

5. Geräte

Autoanalyser , z.B. der Firma Skalar –Analytik, PC und Drucker

6. Probenahme

6.1 Probenahme-Technik

Die Probenahme ist beim Autoanalyser-Verfahren integrierter Bestandteil der Gerätetechnik.

6.2 Lagertemperatur

Die Proben sind bis zum Beginn der Untersuchung bei einer Temperatur im Bereich von 2 °C bis 8 °C zu lagern.

6.3 Konservierung

Die Proben können unkonserviert als auch konserviert analysiert werden.
Die nachfolgenden Konservierungsverfahren haben sich bewährt. Andere Verfahren können eingesetzt werden, sofern sie das Untersuchungsergebnis nicht beeinflussen.

6.3.1 Eine chemische Konservierung der Rohmilchproben ist durch Zusatz eines Konservierungsmittels auf der Basis von Natriumazid und Chloramphenicol (Azidiol) möglich. Die Endkonzentration des Natriumazids muss $p = 12\text{mg}/100\text{ml}$ und des Chloramphenicol $p = 0,5\text{mg}/100\text{ml}$ betragen.

²⁾ z.B. Bran und Lübbecke, Technikon, Bentley

6.3.2 Eine chemische Konservierung der Rohmilchproben ist durch Zusatz von standardisierten Tabletten (z.B. Natriumazid-Tabletten³⁾ oder Bronotabs⁴⁾ entsprechend der Hersteller-Angaben möglich. Analog hierzu sind auch flüssige Aufbereitungen verwendbar.

7. Durchführung

7.1 Vorbereitung der Proben

Proben, die bereits längere Zeit unter Kühllhaltung standen, sind zur besseren Fettverteilung auf max. 40°C zu erwärmen.

Die Untersuchung sollte bei Raumtemperatur erfolgen.

7.2 Bestimmung

Vor Untersuchungsbeginn ist das Untersuchungsgerät ca. 15 Minuten mit Wasser, deion. zu spülen.

Anschließend sind die entsprechenden Lösungen anzuschließen und bis zur konstanten Basislinie (ca. 20 Minuten) durchlaufen zu lassen.

Danach erfolgt die Justierung der Photometer und die Kalibrierung mit den Standards S 1 bis S 4.

Weitere Kalibrierungen sind vor jeder neuen Probenserie durchzuführen.

Jede Probenserie schließt mit dem Kontrollstandard S 4 (Drift) ab.

Je nach Software-Programm erfolgt entsprechend dem Drift-Wert und dem Basislinienverlauf eine automatische Korrektur der Probenmesswerte.

Steht eine automatische Auswertesoftware nicht zur Verfügung, so muss bei Probenserien mit einer Überschreitung der zulässigen Driftabweichung eine nochmalige Untersuchung der entsprechenden Serie vorgenommen werden. Die zulässige Driftabweichung darf maximal dem Fehler der Wiederholbarkeit entsprechen.

Nach der Untersuchung ist das Gerät mit einer auf 40°C erwärmten Mucosollösung ca. 20 Minuten zu reinigen und anschließend ca. 20 Minuten mit Wasser, deion. zu spülen. Schläuche und Membranen sind nach Bedarf zu wechseln.

8. Auswertung

8.1. Berechnung

Die Berechnung des Ergebnisses erfolgt automatisch über die Auswertesoftware.

Der Gehalt an Harnstoff wird in mg/l ohne Kommastelle angegeben.

8.2. Zuverlässigkeit der Methode

Entsprechend diverser Ringvergleiche im Rahmen der LKV/MPR in den Konzentrationsbereichen von 84 - 355 mg Harnstoff/l Milch wurden die Werte für die Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit ermittelt.

8.2.1 Wiederholbarkeit , r und Standardabweichung der Wiederholbarkeit , s_(r)

$$r = 10 \text{ mg/l} \quad ; \quad s_{(r)} = 3,5 \text{ mg/l}$$

8.2.2 Vergleichbarkeit , R und Standardabweichung der Vergleichbarkeit , s_(R)

$$R = 25 \text{ mg/l} \quad ; \quad s_{(R)} = 8,8 \text{ mg/l}$$

³⁾ z.B. vom Hersteller Merck KgaA, Darmstadt

⁴⁾ z.B. vom Hersteller D&F Control Systems, Inc. USA

9. Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht sind unter Hinweis auf diese Methode mindestens anzugeben :
Art, Herkunft und Bezeichnung der Probe
Datum der Probenahme
Eingangs- und Untersuchungsdatum
Untersuchungsergebnis
Begründung, falls von dieser Methode abgewichen worden ist

10. Erläuterungen

Diese Referenzmethode wurde von der Projektgruppe Milchanalytik und Güteprüfung der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter erarbeitet.
Alle in dieser Methode aufgeführten Handelsnamen oder sich auf einzelne Anbieter beziehende Produktbeschreibungen dienen lediglich als Information zur Unterrichtung der Anwender dieser Methode und bedeuten keine bevorzugte Anerkennung des genannten Produktes durch die Projektgruppe. Gleiche Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

11. Inkrafttreten

Die ADR-Empfehlung tritt am 01.01.2003 in Kraft.

© Alle Rechte vorbehalten, insbesondere das Recht auf Vervielfältigung und Verbreitung sowie Übersetzung. Kein Teil dieses Textes darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Genehmigung von der ADR reproduziert werden oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.