

DLQ-Richtlinie 1.13

DLQ-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 beschriebenen Verfahren (Hausmethode der Firma Skalar analytic GmbH) bestimmte Gehalt an Harnstoff.

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

3. Kurzbeschreibung des Verfahrens

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

Die durch einen Probenehmer automatisch entnommene Probe wird während der Analyse mit einer Natriumchloridlösung verdünnt und gegen ein Farbreagenz (Diacetylmonoxim/Thiosemicarbazid) dialysiert. Anschließend wird ein Säurekatalysator hinzugefügt.

Der Reagenzienstrom wird auf 90°C temperiert, wobei Diacetylmonoxim zu Diacetyl hydrolysiert und mit Harnstoff in Gegenwart von Thiosemicarbazid einen Farbkomplex bildet, dessen Absorption bei 520 nm gemessen wird. Der Harnstoffgehalt wird über die Gerätesoftware berechnet und ausgewiesen.

4. Chemikalien / Herstellen von Lösungen und Standards

4.1 Chemikalien

Für die Untersuchung sind analysenreine Chemikalien und deionisiertes Wasser zu verwenden.

- Natriumchlorid NaCl
- Diacetylmonoxim C₄H₇NO₂ (DAM)
- Thiosemicarbazid CH₅N₃S

- Harnstoff $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$
- Eisen-III-Chlorid $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- Benzoesäure $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$
- Natriumhydroxid NaOH = 0,1 mol/l
- o-Phosphorsäure H_3PO_4 $\omega = 85\%$
- Schwefelsäure H_2SO_4 $\omega = 97\%$
- Brij 35 , $\omega = 30\%$ (Detergent)
- Mucapol $\omega = 4\%$ (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
- deionisiertes Wasser 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
- deionisiertes Wasser 1000 ml
- Brij 35 , $\omega = 30\%$ 3 ml

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

4.2.3 Säurereagenz

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

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

4.2.4 Spüllösung für den Probenehmer

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

4.2.5 Gesättigte Benzoesäure

Benzoessäure	5 g
deionisiertes Wasser	1000 ml

Benzoessäure 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
- S 5: 25 ml Harnstoff-Stammlösung sind mit ges. Benzoesäure auf 500 ml aufzufüllen

Konzentration in mg Harnstoff pro Lösung

- S 1: 100 mg
- S 2: 200 mg
- S 3: 300 mg
- S 4: 400 mg
- S 5: 500 mg

Bei Einsatz von adäquater Analysetechnik eines anderen Herstellers ist beim Ansetzen von Lösungen und Standards nach der Herstellermethode zu verfahren.

Bei der Untersuchung von Proben mit einem Harnstoffgehalt > 400mg pro l sollte der Standardbereich entsprechend erweitert werden.

5. Geräte

Autoanalyser (z.B. Skalar analytik GmbH), Probenehmer, Auswertungssoftware

6. Probenbehandlung

6.1 Probenlagerung

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

6.2 Probenkonservierung

Mit diesem Untersuchungsverfahren können sowohl unkonservierte als auch konservierte Proben analysiert werden.

Chemische Konservierungsmittel, die überwiegend für die Konservierung von Rohmilchproben eingesetzt werden, sind z.B. Azidiol, (Natriumazid/Chloramphenicol), Bronopol, Bronopol/Kathon bzw. Borsäure. Die Verwendung von anderen Konservierungsmitteln ist möglich, sofern sie das Untersuchungsergebnis nicht beeinflussen.

7. Durchführung

7.1 Vorbereitung der Proben

Proben, die vor der Untersuchung einen längeren Zeitraum gekühlt wurden, können zur besseren Fettverteilung auf max. 40°C erwärmt werden.

Die Untersuchung erfolgt bei Raumtemperatur.

7.2 Bestimmung

Vor Untersuchungsbeginn ist das Analysengerät ca. 15 Minuten mit Wasser zu spülen.

Anschließend sind die Gebrauchslösungen Natriumchlorid, Farbreagenz, Säurereagenz und Spüllösung anzuschließen und bis zur konstanten Basislinie (ca. 20 Minuten) durchlaufen zu lassen.

Danach erfolgt die Justierung der Photometer. Mit jedem Analysenlauf werden die Kalibrierung mit den Standards S 1 bis S 5 gemessen. Die Messung einer unabhängigen Kontrollprobe wird empfohlen.

Weitere Kalibrierungen sind vor jeder neuen Probenserie durchzuführen.

Jede Probenserie schließt mit dem Kontrollstandard S 5 (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 Mucasollösung ca. 20 Minuten zu reinigen und anschließend ca. 20 Minuten mit deionisiertem Wasser 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 , $s_{(R)}$

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

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 DLQ-Referenzmethode wurde von der Projektgruppe Milchanalytik und Güteprüfung des Deutschen Verbandes für Leistungs- und Qualitätsprüfungen e.V. (DLQ) 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 DLQ-Richtlinie tritt am 01.12.2013 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 des DLQ reproduziert werden oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.