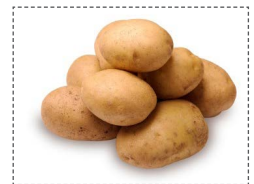


Fallstudie: Dumas-Verbrennungsmethode

Schnelle und kosteneffiziente Stickstoff-/Proteinanalyse für Stärke

Von Tatjana Adamek und Dr. Werner Küppers, Königswinter, Deutschland



1. Einleitung und Problemstellung

Stärkeprodukte enthalten aufgrund ihrer Herstellung Proteine in nur noch sehr geringen Konzentrationen. Daher ist bisher eine zufriedenstellende Analytik nur mit hohen Probeneinwaagen und langen Analysezeiten möglich. Das Analysegerät DUMATHERM der Firma C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, bietet mit seinem innovativen Detektionsprinzip sowie einer schnellen und vollständigen Verbrennung einige interessante und bedenkenswerte Alternativen zum derzeit noch gebräuchlichen Kjeldahl Verfahren.

1.1 Verwendung von Stärke und Stärkeprodukten

Stärke und deren Derivate werden in der Lebensmittelindustrie vielfach in der Herstellung von Süßwaren, Backwaren, Milchprodukten und insbesondere Getränken in Form von stärkebasierten Zuckerstoffen (vor allem Glukosesirup, Dextrose und Isoglukose) verwendet. Aufgrund ihrer Eigenschaften als modifizierbares Polymer sowie der Zusammensetzung aus fermentierbaren Zuckereinheiten wird Stärke auch als nachwachsender Rohstoff in der chemisch-technischen Industrie vielfältig eingesetzt¹. Die vielen Applikationen erklären die hohe Nachfrage nach stärkebasierten Produkten sowie den gleichzeitigen Bedarf an einer schnellen und verlässlichen Analytik.

1.2 Stärkegewinnung

Stärke wird in unseren Breiten meistens aus Kartoffeln oder Getreide gewonnen. Man gewinnt Stärke aber auch aus zahlreichen anderen Pflanzen, von denen neben Weizen und Kartoffeln auch Reis (Bruchreis aus den Reischälffabriken) und Mais besonders wichtig sind. International ist noch Maniok (Tapioka) eine wichtige Stärkeressource. Die Gewinnung erfolgt durch Auswaschen der Stärke aus den Pflanzenteilen mithilfe einer Kochsalzlösung².

2. Proteinanalyse von Stärke

Proteine in Stärke lassen sich aufgrund der geringen Konzentration nur sehr schwer präzise quantitativ nachweisen. Beim DIN-Verfahren nach Kjeldahl [3] werden verhältnismäßig große Probenmengen (ca. 10 g) eingewogen, mit Schwefelsäure aufgeschlossen und anschließend weiteren Analyseschritten unterzogen. Problematisch ist hierbei schon zu Beginn ein starkes Aufschäumen der Proben beim Aufheizen des Aufschlussgemisches am Ende bei 400 °C. Große Probengefäße sowie lange Aufschlusszeiten sind zwingend notwendig. Ein nur geringer Probendurchsatz pro Arbeitstag ist die Folge.

Tabelle 1: Proteingehalte in Stärke und Einwaagen im Kjeldahl-Aufschluss³

Probentyp	typische Einwaagen [g]	theoretischer Gehalt [%] Protein	theoretischer Gehalt [%] Stickstoff
Kartoffelstärke	5–10	0,08–0,90	0,0128–0,1441
Maisstärke	5–10	0,24–0,63	0,0384–0,1008
Reisstärke	5–10	0,76	0,1216
Tapiokastärke	5–10	0,05–0,87	0,0080–0,1392
Weizenstärke	5–10	0,21–0,50	0,0368–0,0877

Tabelle 1 zeigt die zu erwartenden Proteingehalte in verschiedenen Stärken. Hier ist direkt erkennbar, dass es sich nahezu um Spurenanalytik handelt, wenn man noch berücksichtigt, dass sich der Proteingehalt aus dem Stickstoffgehalt durch Multiplikation mit dem Proteinfaktor (zum Beispiel 6,25 für Mais und Kartoffel-

produkte oder 5,7 für Weizen) erst ergibt. Hat man im Kjeldahl-Verfahren noch die Möglichkeit einer hohen Einwaage (mind. ca. 10 g, d. h. absolut noch 1 mg N, bei 0,01 % N-Gehalt), so sind es bei den Verbrennungsanalysen nur noch ca. 100–300 mg. Das bedeutet, absolut nur noch 0,01 mg Stickstoff für die Detektion.

Die folgenden amtlichen Methoden wurden zum Vergleich mit den in diesem Beitrag erhaltenen Ergebnissen herangezogen:

- EN ISO 3188:1994 Stärken und Stärke-derivate – Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach dem Kjeldahl-Verfahren – Volumetrisches Verfahren (ISO 3188:1978); Deutsche Fassung Ausgabedatum: 10/1994,
- AOAC 992.23, Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds,
- ICC Standardmethode Nr. 167, 2000.

Dort sind Erwartungswerte an die Präzision allerdings nicht wirklich definiert, sodass als Grundlage für die Bewertung der Analyseergebnisse die Dumas-Methode DIN EN 16634 „Bestimmung des Gehaltes an Gesamtstickstoff und Rohprotein in Getreide und Futtermitteln mit dem Verbrennungsverfahren nach Dumas“ herangezogen wurde.

2.1 Verbrennungsanalytik von Stärke nach Dumas

Für die hier gezeigten Analysen wurde ausschließlich das in **Abb. 1** gezeigte Analysegerät DUMATHERM verwendet.

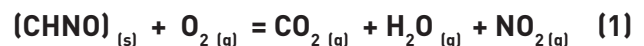


Abb. 1: Analysengerät DUMATHERM mit automatischem Probengeber und PC Steuerung

2.2 Theorie: Verbrennungsmethode zur Stickstoff-/ Proteinanalytik

2.2.1 Probenzuführung und Verbrennung

Während der Säureaufschluss nach Kjeldahl die Probe auf eher rustikale Art und Weise zerstört, bietet sich mit der Verbrennung eine etwas elegantere und zeitsparendere Alternative. Die Probe wird kontrolliert oxidiert und die resultierenden, gasförmigen Produkte der weiteren Analyse unterzogen. Ziel ist die vollständige Konversion der Probe in die Hauptprodukte Kohlendioxid, Wasser und Stickstoffdioxid (**Gleichung 1**), ohne dass die Nebenprodukte Kohlenmonoxid CO und Stickstoffmonoxid NO aus unvollständiger Verbrennung heraus entstehen.



Da Luft über 70 % Stickstoffanteile enthält, muss apparativ zunächst sichergestellt werden, dass der störende Luftstickstoff vor der Analyse vollständig von der Probe separiert wird. Dazu ist ein leistungsfähiger Probengeber notwendig. Schlüssel zum Erfolg ist hier eine effektive Abdichtung gegenüber der Umgebungsluft in Kombination mit einer ausreichenden Spülfunktion, damit Möglichkeiten einer gegenseitigen Wechselwirkung ausgeschlossen sind. **Abb. 2** zeigt zwei solche Modelle.



Abb. 2: Probengeber mit Spülfunktion - Modell Duo (kleines Bild) für geringes Probenaufkommen und Probengeber für hohen Probenumsatz mit großem Probenblett. Über die Helium-Zufuhr wird eine Spülkammer kontinuierlich gespült, bevor die Probe der Verbrennung zugeführt wird.

Moderne Verbrennungsgeräte nutzen die Heliumtechnologie, um Luftstickstoff zu vertreiben sowie gleichzeitig die größtmögliche Präzision in der Analyse zu erreichen. Beispielhaft sei ein derartiger Analysegang am Gerät DUMATHERM in **Abb. 3** näher erläutert. Basierend auf dem klassischen Prinzip der Verbrennungsanalyse nach Jean Dumas³, kann hier mit moderner Steuerung nahezu wartungsfrei gearbeitet werden.

2.2.2 Detektion und Auswertung

Zur Niedrigstickstoffanalyse – gerade im Bereich der Stärkeapplikation – empfiehlt sich Helium als Trägergas, da es als einziges der gezeigten Gase eine im Vergleich zum Stickstoff stark unterschiedliche Wärmeleitfähigkeit aufweist. **Tabelle 2** zeigt die Wärmeleitfähigkeiten der in der Elementaranalyse gebräuchlichen Gase. Helium als Trägergas und Stickstoff als Analyt sind hier die ideale Kombination, da da-

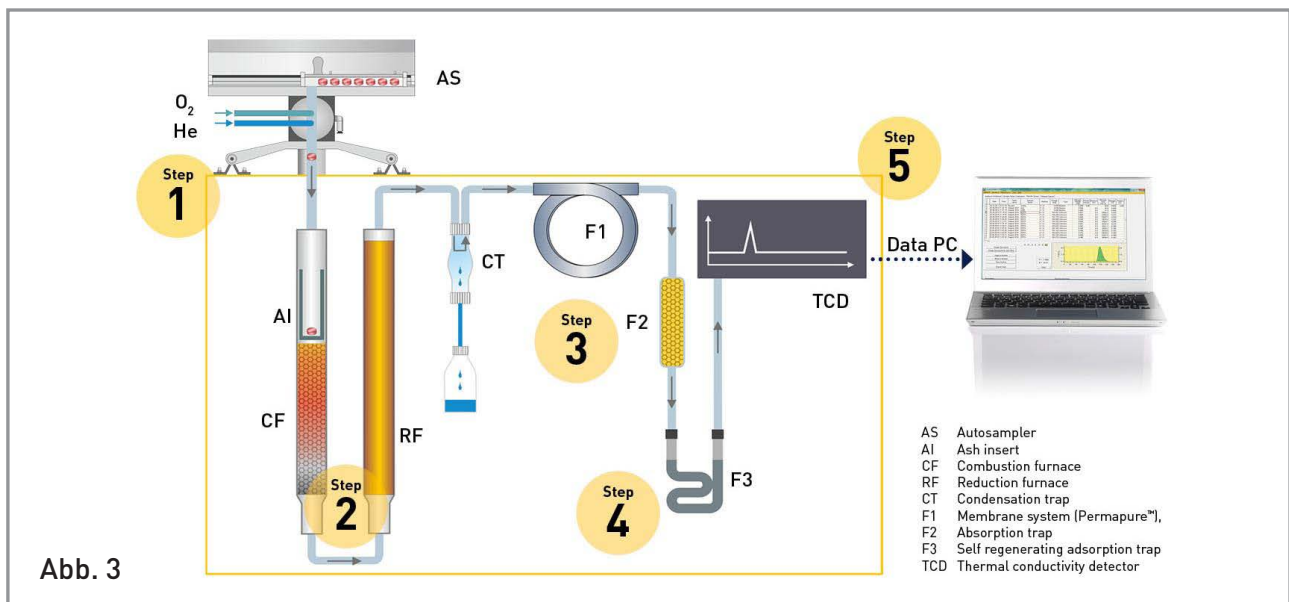


Abb. 3

Der pneumatische Probengeber (AS) führt die in Zinnfolie eingepackte feste oder flüssige Probe (rote Päckchen) dem Verbrennungsreaktor (CF) zu. Simultan wird der Heliumgasstrom umgestellt auf Sauerstoff, um die Verbrennung einzuleiten. Die Probe verbrennt und die entstehende Asche wird im Ascheinsatz (AI) gesammelt. Die gasförmigen Verbrennungsprodukte reagieren unter Zuhilfenahme von Katalysatoren vollständig zu den gewünschten Oxiden und werden nach Beendigung der Verbrennung durch einen Heliumstrom durch das Gerät weitertransportiert. Zunächst werden die Stickoxide im Reduktionsreaktor (RF) zu elementarem Stickstoff reduziert, während die beiden anderen Nebenprodukte Wasser und Kohlendioxid in speziellen Fällen (F1 bis F3) abgetrennt werden. Es verbleibt ein Gasstrom aus Helium und Stickstoff, woraus der Stickstoff mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) gemessen werden kann. Die Computersteuerung erlaubt die simultane Auswertung der Analysedaten.

mit sogar ein Referenzgasfluss im Detektor (wie er in klassischen Detektoren basierend auf einer „Wheatstone’schen Brückenschaltung“ noch notwendig war) überflüssig wird.

Tabelle 2: Wärmeleitfähigkeiten von verschiedenen Gasen bei 300 K⁶. Je größer der Unterschied in den Wärmeleitfähigkeitswerten ist, desto besser ist die Detektionsfähigkeit und die Präzision des Gerätes.

Gasbezeichnung	$\lambda_{300\text{ K}}$, W/m · K
Helium, He	156,7
Kohlendioxid, CO ₂	16,8
Stickstoff, N ₂	26,0
Kohlenmonoxid, CO	16,8

Da mit Stärkeproben nur geringste Mengen Stickstoff analysiert werden, ist der Gebrauch von Helium als Trägergas entscheidend für den Erfolg der Analyse.

2.3 Praxis: Durchführung einer Verbrennungsanalyse

Neben der eigentlichen Analyse durch das Analysegerät sind noch andere Punkte essenziell für eine gute und reproduzierbare Analytik:

- Probenvorbereitung
- Einwaage
- Kalibration des Detektors
- Qualitätssicherung durch den Anwender
- Messbedingungen richtig wählen
- Beurteilung und Auswertung der Ergebnisse.

Für die Einwaage verwendet man Zinnfolie und stellt daraus Zinnkügelchen her, die dann bis zur Analyse im Probenblech aufbewahrt werden.

Vor der Analyse werden die Proben in das Probenblech aufgegeben und der Autosampler im Anschluss mit der Abdeckplatte verschlossen (**Abb. 4**).

Warum benutzt man Zinnfolie?

Zinn verbrennt stark exotherm zu Zinn(IV)oxid. Dabei frei werdende Energie unterstützt die vollständige Verbrennung der Probe, sodass die Probe hierbei quasi wie ein Schwamm aufgesaugt und vollständig zersetzt wird. Als Alternative könnte auch stickstoff-freies Wägebepapier verwendet werden, allerdings fallen hier große Mengen zusätzlicher Asche an, welche abgetrennt werden muss.

2.4 Neuartige Kalibration für die Analytik von Stärke mittels DUMATHERM

Für die Analytik mittels DUMATHERM wurde eine neue Stärkeapplikation entwickelt. Wesentlicher Baustein zum Erfolg ist hierbei die Kalibration, um die nur sehr kleinen Peakflächen des Stickstoffes aus Stärkeproben quantitativ zu bestimmen.

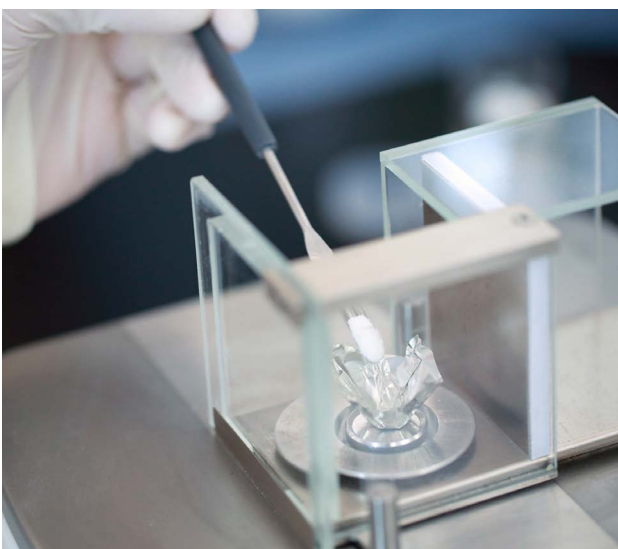


Abb. 4: Einwaage der Proben in Zinnfolie und Lagerung im Probenblech (rechts) bis zur Probenabgabe in den Probengeber.

Zur Berechnung der Analyseergebnisse muss eine Kalibration verwendet werden, welche die Signalgrößen der unbekannt Proben vollständig abdeckt. Bei den verwendeten Einwaagen von ca. 150 mg wurden Signalgrößen von ca. 150–500 mVs erreicht. Da die Signalgrößen am absoluten Detektionslimit liegen, empfiehlt sich eine mehrstufige Kalibration mit einem Feststoffstandard und einem Flüssigstandard. **Abb. 5** zeigt eine derartige Kalibrationskurve, erweitert durch Messpunkte nach oben hin mit dem Feststoffstandard EDTA.

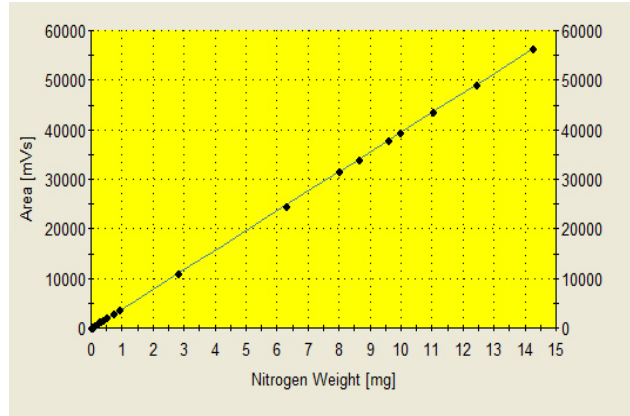


Abb. 5: Kalibration für den DUMATHERM mit insgesamt 20 Messpunkten mittels THAM (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, mit 9,57 % N)

Für die Analysen der unbekannt Proben wurden zunächst Standardbedingungen verwendet, d. h. ca. 100–200 mg Einwaage, Sauerstoff-Dosierung mit 400 ml/min, 990 °C Verbrennungstemperatur.

Die folgenden **Abb. 6 und 7** zeigen Analyseergebnisse am Beispiel der Kartoffelstärke und Weizenstärke.

Dumatherm Nitrogen / Protein Analyser											
Serial Number :		159		Submitter:							
Software Version :		DUMATHERM MANAGER V2.06E		Operator:		Adamek					
Date	Time	Sample name	Weight [mg]	Standard name	Category	Protein factor	Peak Area [mV*s]	N Weight [mg]	Nitrogen [%]	Protein [%]	
19.03.2012	11:15:17	3288	99,487		A 1,2	6,25	1,256E+02	1,743E-02	0,018	0,109	
19.03.2012	11:26:23	3288	151,112		A 1,2	6,25	1,622E+02	2,679E-02	0,018	0,111	
23.03.2012	12:46:49	3288	149,531		A 1,2	6,25	1,896E+02	2,635E-02	0,018	0,110	
03.04.2012	10:16:56	3288	199,620		A 1,2	6,25	1,959E+02	3,527E-02	0,018	0,111	
23.04.2012	09:52:04	3288	151,654		A 1,2	6,25	1,618E+02	2,651E-02	0,018	0,109	
Calibration # :								46 (Cubic, With Zero)			
Analysis Conditions for Method :								Method_1			
Sample Table :								Analytische Studien			
Temperatures:				Times:							
Combustion Reactor		989 °C		Sample Delay		5 s					
Reduction Reactor		649 °C		Sample Stop		9 s					
Degassing Oven		299 °C		Run Time		Auto					
Flow Rates:											
He I		195,3 sccm									
He II		199,9 sccm									
O ₂		400,1 sccm									
								Average		0,018	0,110
								Standard Deviation		0,000	0,00
								RSD [%]		0,568	0,55

Abb. 6: Analysenergebnisse zu Kartoffelstärke mit variierenden Einwaagen von 100–200 mg

Dumatherm Nitrogen / Protein Analyser											
Serial Number :		159		Submitter:							
Software Version :		DUMATHERM MANAGER V2.06E		Operator:		Adamek					
Date	Time	Sample name	Weight [mg]	Standard name	Category	Protein factor	Peak Area [mV*s]	N Weight [mg]	Nitrogen [%]	Protein [%]	
24.04.2012	14:20:55	3289	150,005		A 1,2	5,71	2,755E+02	5,569E-02	0,037	0,212	
27.04.2012	09:31:05	3289	151,690		A 1,2	5,71	2,756E+02	5,570E-02	0,037	0,210	
15.05.2012	11:02:32	3289	150,058		A 1,2	5,71	2,731E+02	5,506E-02	0,037	0,210	
15.05.2012	11:06:20	3289	148,009		A 1,2	5,71	2,690E+02	5,402E-02	0,037	0,208	
22.05.2012	10:30:41	3289	151,604		A 1,2	5,71	2,764E+02	5,592E-02	0,037	0,211	
Calibration # :								46 (Cubic, With Zero)			
Analysis Conditions for Method :								Method_1			
Sample Table :								EDTA 3385			
Temperatures:				Times:							
Combustion Reactor		989 °C		Sample Delay		5 s					
Reduction Reactor		649 °C		Sample Stop		9 s					
Degassing Oven		299 °C		Run Time		Auto					
Flow Rates:											
He I		195,0 sccm									
He II		199,9 sccm									
O ₂		399,9 sccm									
								Average		0,037	0,210
								Standard Deviation		0,00	0,00
								RSD [%]		0,62	0,65

Abb. 7: Weizenstärke mit gleichbleibender Einwaage von ca. 150 mg

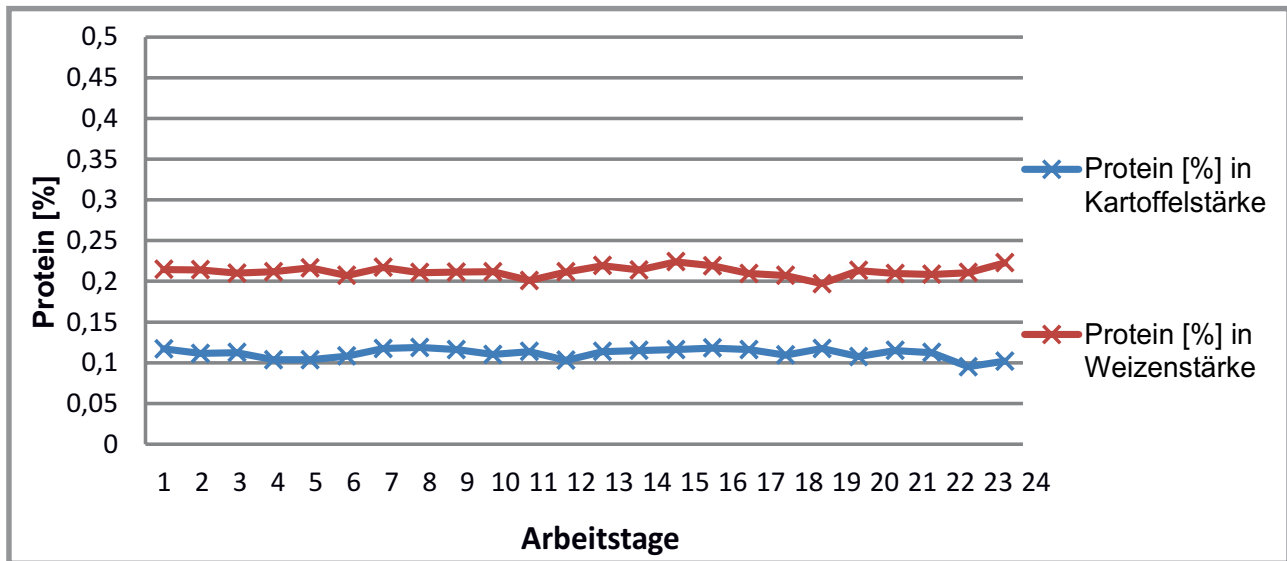


Abb. 8: Langzeitstabilität der Kalibration über einen Zeitraum von insgesamt zwei Monaten, gemessen an 24 unterschiedlichen Arbeitstagen.

Als Besonderheit wurde die Kartoffelstärke noch mit stark unterschiedlichen Einwaagen gemessen, wobei auch hier noch aus gezeichnete relative Standardabweichungen von $<0,6\%$ erhalten wurden. Dies zeigt, dass für die Analysen nur 100 mg Einwaage notwendig ist. Die erhaltenen Peakflächen sind mit ca. 200 mVs sehr nahe am Detektionslimit von 0,01 mg N absolut.

2.5 Langzeitstabilität der Kalibration

Die entwickelte Kalibration hatte eine sehr gute Stabilität. Mit einer Kartoffelstärke- und einer Weizenstärkeprobe, die über fast zwei Monate an 24 Arbeitstagen kontinuierlich in der täglichen Routine mit analysiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die neu ausgearbeitete Kalibration eine hochpräzise Analytik im Bereich von unter 0,25 % Protein mit dem DUMATHERM stabil möglich macht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 8** gezeigt.

2.6 Fazit

Die Stickstoff-/Proteinanalyse nach Dumas ist mit den heute verfügbaren Verbrennungsgeräten eine ernstzunehmende Alternative zur Säureaufschlussmethode nach Kjeldahl. Trotz nur geringer Einwaagen ist eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit ohne großen Aufwand möglich. Die

vorgestellte Kalibrationsstrategie erlaubt die verlässliche Analyse von Stickstoffgehalten am Detektionslimit von 0,01 mg N absolut, bis hin zu hochproteinhaltigen Glutenproben (60–80 % Protein). Da die untersuchte Stärke eine ausgezeichnete Homogenität aufweist, waren sogar beste Analyseergebnisse mit nur 100 mg Probeneinwaage möglich. Hiermit sind die üblichen Probleme im Kjeldahl-Aufschluss mit starkem Schäumen und hohen Chemikalienverbräuchen eliminiert und man kann schnell und sauber eine quantitative Analyse mit einem Verbrennungsgerät erhalten. Nicht ohne Grund etabliert sich deshalb die Verbrennungsmethode immer mehr als zweite Referenzmethode neben der Kjeldahl-Methode.

Literatur

1. www.de.wikipedia.org/wiki/St%C3%A4rke
2. Fachverband der StärkeIndustrie e. V.; www.staerkeverband.de/html/zahlen.html
3. DIN EN ISO 3188:1994, Stärken und Stärkederivate Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach dem Kjeldahl-Verfahren – Volumetrisches Verfahren (ISO 3188:1978); Deutsche Fassung Ausgabedatum: 1994, 10
4. Souci, S. W., W. Fachmann und H. Kraut: Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. – 5. überarbeitete und ergänzte Auflage,; medpharm Scientific Publishers, Stuttgart (1994), CRC PRESS, Tokyo, S. 596 ff
5. Traité Élémentaire de Chimie, Vol. II (1789), Kapitel VII, S. 493–501
6. www.wikipedia.de (2011)

C. Gerhardt – Qualität made in Germany

STANDARDANALYSEN AUTOMATISIEREN

Vollautomatische Labor-Analysensysteme von C. Gerhardt sind hochentwickelte Spezialgeräte. Sie automatisieren wiederkehrende Analyseprozesse 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.

