



Valideringsrapport

Proteinanalyse med Dumasmetoden

Krav til fødevarekvalitet – kemisk og fysisk dokumentation

20. januar 2025
Proj.nr. 2010426/2011306
Version: 1
Init. DBRE/MT/LME

Daniel Halling Breiner

Opsummering

Projektet "Krav til fødevarekvalitet – kemisk og fysisk dokumentation" har bl.a. til formål at minimere kemikalie- og/eller tidsforbrug for kemiske og fysiske analyser. Målet med de beskrevne forsøg i nærværende rapport var at sammenligne to metoder til proteinanalyse på råvarer med relevans for kødindustrien.

Stor tak til Norma & Frode Jacobsens Fond, der finansierede indkøbet af et "Rapid Max N Exceed" (herefter kaldet "Rapid Exceed") måleinstrument til proteinanalyse ved Dumasmetoden.

Baggrund

Kjeldahlmetoden har længe været den mest udbredte metode til proteinanalyse, men nye instrumenter udvikles løbende, og særligt instrumenter, der understøtter brugen af Dumasmetoden, er interessante, da Dumasmetoden ikke inkluderer brugen af kemikalier, hvilket alt andet lige er meget interessant i et bæredygtighedsøjemed.

Denne rapport indeholder:

1. Kort beskrivelse af Kjeldahl- og Dumasmetoderne.
2. Validering af proteinanalyse ved brug af en kødstandard, hvor Dumasmetoden er sammenlignet med Kjeldahlmetoden.

I notatet "Måling af proteinindholdet i forskellige prøvematrixer på Rapid Exceed" er det beskrevet, hvilke råvarer/produkter der er analyseret med Rapid Exceed inkl. måleresultater og observationer. Notatet findes på Teknologisk Instituts hjemmeside for projektet [Krav til fødevarekvalitet – kemisk dokumentation](#).

Konklusion

Validering af proteinanalyse med Dumasmetoden på Rapid Exceed blev foretaget på udvalgt kontrolstandard, som blev analyseret i alt 106 gange over en periode på 7 måneder. Der blev efterfølgende sammenlignet med resultater fra 46 tidligere gennemførte analyser af samme kontrolstandard på Kjeltec 8400 (Kjeldahlmetoden).

Valideringsresultaterne kort

- Den gennemsnitlige genfinding for Rapid Exceed blev udregnet til 101%. Den acceptable grænse for genfinding er 95%-105%.
- Analysen vurderes robust, idet der ikke blev påvist bias ved variation af prøvemængde.
- Analysens usikkerhed er bestemt til:
 - Dobbeltbestemmelse $\pm 3,3\%$ (relativt)
 - Enkeltbestemmelse $\pm 3,4\%$ (relativt)
- Selektivitet: OBS. Dumasmemetoden giver falsk positivt signal fra nitrit og nitrat, hvilket Kjeldahlmetoden ikke gør.

Vurdering af metodens selektivitet

Prøvematerialets sammensætning skal kendes, inden der omregnes fra nitrogenkoncentration til proteinkoncentration, især ved tilstedeværelsen af uorganiske nitrogenforbindelser i prøven, som vil påvirke resultatet.

Vurdering af analysens robusthed

Prøvemængden blev varieret over forskellige dage. Der blev ikke umiddelbart observeret bias ved variation af prøvemængde.

Godkendelse af metoden

Baseret på de gennemførte analyser og opnåede resultater er valideringen af proteinanalysen på Rapid Exceed godkendt.

Da der ud over homogenisering ikke foretages yderligere prøveforberedelse forud for analyse på Rapid Exceed, blev der ikke udført analyser med tilsatte komponenter (spiking) i forbindelse med validering af metoden.

Datagrundlag

Rapid Exceed

Der er kørt 56 analyser af kontrolstandard (se afsnit om prøvematrixe nedenfor) i varierende afvejninger fra 250 til 1000 mg til præcision/repeterbarhed og genfinding.

Til fastlæggelse af måleusikkerheden er der benyttet 25 dobbeltbestemmelser (afvejning af ca. 0,5 g kontrolstandard) fra forskellige analysedage over en periode på cirka 7 måneder.

Kjeldahl

Der er medtaget data fra 46 analyser af kontrolstandard.

Kontrolstandard

Laboratoriets kontrolstandard er baseret på et kogt, saltet kødprodukt på dåse (som fx Jaka Bov, Spam, Luncheon meat). Produktet blendes til en ensartet homogen masse og udportioneres i bægre med ca. 15-20 gram materiale og nedfryses indtil brug. Bægrene optøs på dagen eller i køleskab natten over, inden analysen foretages.

Den anvendte standard havde et proteinindhold på 13,71%.

Til valideringsanalyserne er der altså benyttet flere forskellige bægre med kontrolstandard, som kommer fra samme homogeniserede produkt.

Dumasmetode	Metodebaggrund og analyseprincip
	Dumasmetoden er en metode til grundstofanalyse til kvantitativ bestemmelse af nitrogen i kemiske stoffer baseret på en metode, der først blev beskrevet af Jean-Baptiste Dumas i 1826.
<i>Analyseprincip</i>	Med Dumasmetoden foregår nedbrydning af prøven under forbrænding ved 8-900°C i få minutter i tilstedeværelse af ren ilt. De dannede gasser H ₂ O, CO ₂ og nitrogenoxider bliver ledt igennem forskellige filtre, hvorved H ₂ O og CO ₂ bliver bundet til filtrene, mens nitrogenoxid (NO _x) bliver omdannet til nitrogen N ₂ , der så bliver ledt til detektoren. Mængden af N ₂ omregnes til proteinkoncentration.
	Der måles både organisk og uorganisk nitrogenindhold, så har prøven et væsentligt indhold af fx nitrit eller nitrat, vil der, ved omregning fra nitrogenindhold til proteinindhold, være en forskel i forhold til Kjeldahlmetoden.
<i>Øvrige betragtninger</i>	I Rapid Exceed instrumentet bliver filtrene regenereret, således at de har lang levetid. I instrumentet er der plads til 90 prøver inklusive diverse standarder. Analysen kan passe sig selv og køre natten over, og der kan køres op til 300 prøver i døgnet.
	<p>Fordele</p> <ul style="list-style-type: none"> • Der skal ikke håndteres og bortskaffes kemikalier • Betydelig nemmere at anvende/betjene • Der bruges mindre tid pr. analyseret prøve – flere prøver pr. dag • Rengøring efter analyse er let
Kjeldahlmetode	Metoden blev udviklet i 1883 af danskeren Johan Kjeldahl. Kjeldahlmetoden er en af de mest udbredte metoder til bestemmelse af kvælstof i organiske stoffer/prøver. Protein er den væsentligste nitrogenholdige bestanddel i fødevarer.
<i>Analyseprincip</i>	Først destrueres prøven, fx et kødprodukt, ved tilsætning af koncentreret svovlsyre med efterfølgende kogning ved 420°C i 90 minutter, hvorved nitrogen i proteinerne omdannes til ammonium (NH ₄). Dette forgår i Kjeldahlkolber, og efter nedkøling overføres flaskerne til næste trin, hvor der tilsættes natriumhydroxid, og NH ₄ omdannes til NH ₃ -gas, der absorberes i og neutraliseres af en opløsning af borsyre. Den resterende mængde borsyre titreres med NaOH, hvorefter det kan beregnes, hvor meget borsyre der er tilovers, og hvor meget der har reageret med NH ₃ som et udtryk for proteinmængden.
<i>Øvrige betragtninger</i>	Metoden kræver en del plads og kan være hård ved installationerne pga. svovlsyredampe. En del farlige kemikalier skal håndteres, og metoden producerer meget kemikalieaffald. Metoden er forholdsvis arbejdskrævende, og der kan højst køres 32 prøver på en arbejdsdag.



Rapid Exceed instrument



Kjeldahl

Dumasmetode

Prøveforberedelse

Overordnet metodebeskrivelse

Der afvejes ca. 0,5 g prøve nøjagtigt i en digel. Prøven sættes på instrumentet sammen med blindprøver (tom digel) og en proteinstandard (asparaginsyre).

Analyse

Instrumentet har forskellige forudindstillede programmer, der kører lidt forskellige forbrændingsmønstre afhængig af prøvetypen. Gennem forsøg er det fundet, at programmet "sausage" fungerer godt til kød og kødprodukter. Instrumentet startes derfor på programmet "sausage".

Rapid Exceed-instrumentet bruger en standardkurve baseret på asparaginsyre og evt. urea (til høje koncentrationer) til udregning af nitrogenkoncentrationen, hvorefter der ganges med den såkaldte Kjeldahlfaktor (6,25) for at få protein-koncentrationen.

Som opstart på dagens analyser måles blindværdien ved at analysere en tom digel. Blindværdien fratrækkes resultat for hver enkelt prøve og standarden. Herefter køres en standard af ren asparaginsyre, så en daglig faktor kan beregnes. Den daglige faktor benyttes til at justere resultaterne, så der tages hensyn til forhold som fx barometertrykket. Derudover fungerer den som en ekstra kontrol for apparatets tilstand, idet den ikke skal afvige for meget fra 1,0.

OBS i forhold til instrumentets programmer: Den væsentlige forskel mellem de forskellige programmer leveret fra producentens side er iltforbruget – hvor længe der tilføres ilt til prøven og hvor stort flow (mL/min). Så længe der er overskud af ilt til forbrændingen, vil der ikke være nogen nævneværdig forskel på resultaterne, men den overskydende frie ilt reducerer levetiden kraftigt på forbrugskomponenterne i apparatet, så der er en klar interesse i at tilpasse iltforbrug og prøvemængde til hinanden.

Kjeldahlanalysen

Kjeldahlanalysen er opdelt i tre trin: Destruktion, destillation og titrering.

Destruktion

Ca. 1 g prøve afvejes nøjagtigt og overføres til destruktionsrør (kolber), der tilsættes 2 Kjeltabs (en katalysator bestående af kaliumsulfat og kobbersulfat) og 12 ml svovlsyre. Røret anbringes i 420°C varm destruktionsblok og henstår i 90 minutter. Efter afkøling tages prøverne over i stinkskebet, og der tilsættes 20 ml ionbyttet vand. Det organiske nitrogen i prøven er nu omdannet til ammonium-sulfat og klar til næste trin.

Destillation Destruktionsrøret sættes direkte på apparatet. Destillationen er en kombination af kogning og kondensation. Der tilsættes et overskud af base (natriumhydroxid) til indholdet for at omdanne ammoniumsulfat til ammoniakgas, som derefter føres ind i et kar med borsyre samt en indikator (der skifter farve, når væskens pH ændres).

Titring Væsken titreres med saltsyre, hvor koncentrationen kendes helt præcist. Indikatoren i væsken skifter farve, når titreringen er fuldendt, og man kan så beregne indholdet af nitrogen. I praksis udføres beregningerne af apparatet.

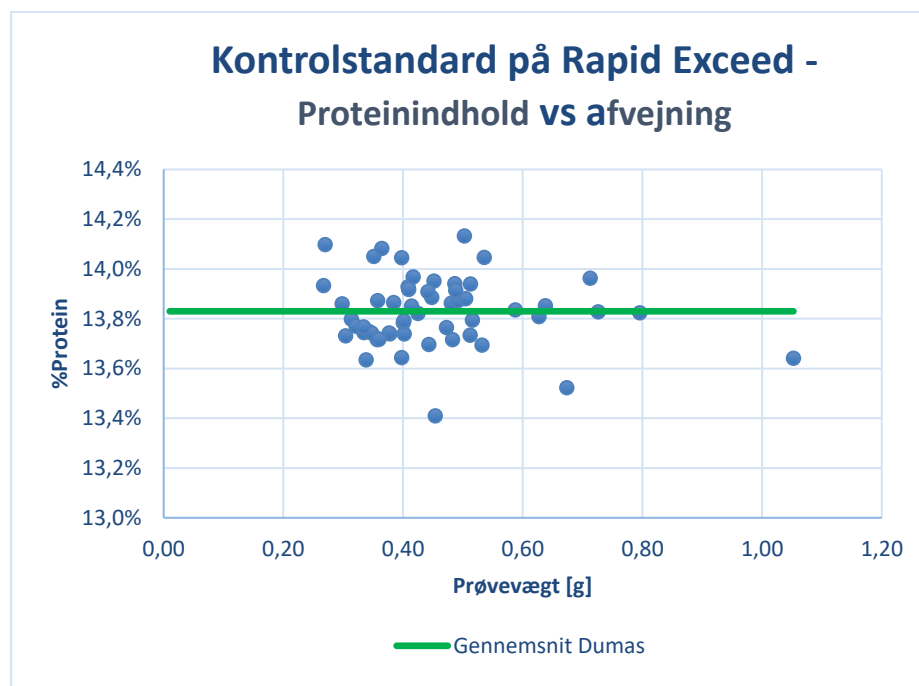
Resultater

Vurdering af selektivitet Det er velkendt, at der kan forekomme (positiv) interferens fra en lang række nitrogenholdige stoffer udover det protein, der er til stede i prøven, og som ønskes kvantificeret. Dette gælder både organiske (fx melamin, urea, frie aminosyrer, kreatin, kreatinin) og uorganiske stoffer (fx ammonium). Denne interferens er dog ens for analyse på begge instrumenter.

Dumasmetoden giver desuden falsk positivt signal fra nitrit og nitrat, hvilket Kjeldahlmetoden ikke gør. Samlet set betyder det, at sammensætningen af prøvematrixen skal vurderes for interferens, hvis der skal angives en proteinkoncentration frem for blot en nitrogenkoncentration.

Selektiviteten påvirkes derudover af Kjeldahlfaktoren (6,25), der benyttes til at omregne fra nitrogenindhold til proteinindhold. Kjeldahlfaktoren er et gennemsnit, der har været brugt bredt gennem mange år, men kjeldahlfaktoren kan variere mellem forskellige proteinkilder.

Måleresultater Kontrolstandard blev analyseret 56 gange på Rapid Exceed på 4 forskellige dage. Prøvemængderne var forskellige og varierede fra 250 til 1000 mg. Formålet hermed var at undersøge, om der var en entydig bias ved forskellige afvejsninger (figur 1).



Figur 1. Proteinindholdet i kontrolstandarden som funktion af prøvemængde (56 analyser).

Umiddelbart ses der ingen bias i forhold til variation af prøvemateriale, idet det målte indhold af totalprotein fordeler sig pænt omkring gennemsnittet. Rapid Exceed måler præcist med en standardafvigelse (Std.dev.) på 0,14% og en variationskoefficient (CV%) på 1% (se tabel 1).

Laboratoriet godkender generelt analyseresultater, når de ligger indenfor ± 2 standardafvigelser fra det fastlagte gennemsnit. Ved indkøring af Kjeldahlapparatet (Kjeltec 8400) blev gennemsnittet fastlagt til 13,71%, og standardafvigelsen til 0,29%. Det giver et interval for godkendelse af analyseresultatet fra 13,13% til 14,29% i proteinindhold (vores kontrolgrænser). Samtlige målinger for begge apparater ligger inden for kontrolgrænserne (± 2 standardafvigelser), og resultaterne er derfor tilfredsstillende (se figur 2).

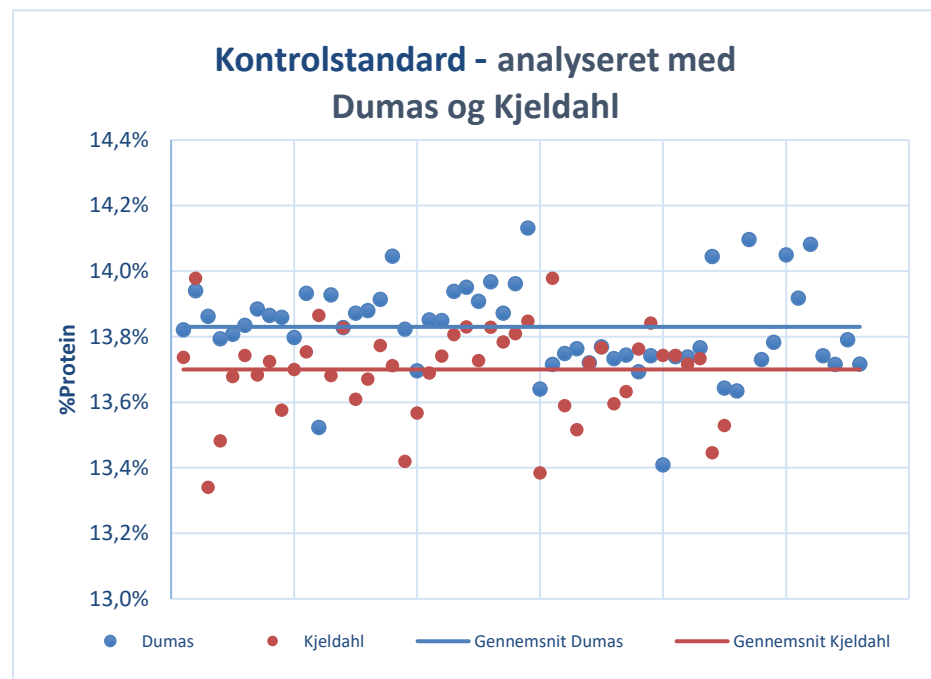
Tabel 1. Proteinmålinger på Rapid Exceed og Kjeldahlinstrumenter med kontrolstandard. Minimum og maksimum angiver laveste og højeste værdi målt på de 2 instrumenter. Std.dev.: Standardafvigelse. CV%: variationskoefficient.

	Antal målinger	Minimum	Maksimum	Gennemsnit	Std.dev.	CV%
Dumas	56	13,41%	14,13%	13,83%	0,14%	1,00%
Kjeldahl	46	13,34%	13,98%	13,71%	0,14%	1,04%

Det bemærkes, at de 46 prøver analyseret på Kjeldahl har lavere standardafvigelse end beskrevet i ovenstående afsnit om måleresultater, hvor den er angivet til 0,29% (ved metodeindkørsel). Dette er en lille forskel og kan skyldes små forskelle i graden af blanding af kontrolstandard.

Resultaterne for proteinindhold i kontrolstandarden målt med de to metoder er sammenlignet. Her blev det fundet, at genfindingen for målinger udført ved Dumas' metode på Rapid Exceed ved sammenligning med måling på Kjeldahl i gennemsnit bliver 101%, hvilket er tilfredsstillende.

Det betyder i praksis, at Dumasmetoden måler lige så præcist som Kjeldahlmetoden; dertil er Standardafvigelse (std.dev.) og CV% ens.



Figur 2. Indholdet af protein i kontrolstandard målt med hhv. Dumas- og Kjeldahlmetoderne.

Det ses af figur 2, at det gennemsnitlige proteinindhold afviger ganske lidt svarende til en faktisk forskel på 0,12% protein mellem de to metoder (13,71% protein målt med Kjeldahl og 13,83% protein målt med Dumas).

Usikkerhed

For at fastlægge den endelige usikkerhed for Dumasmetoden på Rapid Exceed er analysedata for kontrolstandardens opsamlet over en periode på cirka 7 måneder. I alt 25 dobbeltbestemmelser fra forskellige dage blev anvendt til at beregne laboratoriets usikkerhed.

Dernæst tillægges en biaskomponent, som er fundet, ved at laboratoriet har deltaget i en præstationsprøvning (FAPAS), hvor mange laboratorier modtager den samme prøve til analyse.

Der kan så beregnes en total analyseusikkerhed for både enkelt- og dobbeltbestemmelser:

Dobbeltbestemmelse $\pm 3,3\%$ (relativt)

Enkeltbestemmelse $\pm 3,4\%$ (relativt)

Til sammenligning er analyseusikkerheden på Kjeldahl – Kjeltec 8400 estimeret til cirka $\pm 4,0\%$ (relativt).

Konklusion

Validering af proteinanalyse med Dumasmetoden på Rapid Exceed blev foretaget på udvalgt kontrolstandard, som blev analyseret i alt 106 gange over en periode på 7 måneder. Der blev efterfølgende sammenlignet med resultater fra 46 tidligere gennemførte analyser af samme kontrolstandard på Kjeltec 8400 (Kjeldahlmetoden).

Baseret på de gennemførte analyser og opnåede resultater er valideringen af proteinanalysen på Rapid Exceed godkendt:

- Den gennemsnitlige genfinding for Rapid Exceed blev udregnet til 101%. Den acceptable grænse for genfinding er 95%-105%.
- Analysen vurderes robust, idet der ikke blev påvist bias ved variation af prøvemængde.
- Analysens usikkerhed er bestemt til:
 - Dobbeltbestemmelse $\pm 3,3\%$ (relativt)
 - Enkeltbestemmelse $\pm 3,4\%$ (relativt)
- Selektivitet: OBS. Dumasmetoden giver falsk positivt signal fra nitrit og nitrat, hvilket Kjeldahlmetoden ikke gør.