

VALIDACIJA METODE TOTALNOG SAGOREVANJA ZA ODREĐIVANJE SIROVIH PROTEINA U HRANI ZA ŽIVOTINJE

Sandra Jakšić^{1*}, Željko Mihaljev¹, Milica Živkov-Baloš¹, Zoran Mašić²

¹Naučni institut za veterinarstvo «Novi Sad», Novi Sad, Rumenački put 20

²Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Kratak sadržaj

Sadržaj sirovih proteina je jedan od najvažnijih parametara kvaliteta hrane za životinje. Za određivanje ukupnih proteina Kjeldalova metoda je najpoznatija i najzastupljenija. Međutim, metoda totalnog sagorevanja, poznatija kao Dumasova, takođe je priznata kao standardna metoda. U ovom radu prikazan je model validacije Dumasove metode totalnog sagorevanja za određivanje sadržaja sirovih proteina na instrumentu Elementar-Rapid N. Validacija je obuhvatala određivanje linearnosti, granice detekcije, tačnosti i preciznosti, po zahtevu standarda. U procesu validacije su korišćene standardne supstance, a rezultati su obrađeni odgovarajućim statističkim metodama u programu Microsoft Excel. Ispitani parametri validacije pokazali su da testirana metoda može biti korišćena za pouzdano određivanje sadržaja ukupnog azota (proteina) u uzorcima hrane za životinje.

Ključne reči: sirovi proteini, metod totalnog sagorevanja, validacija, hrana za životinje

* E-mail: sandra@niv.ns.ac.rs

VALIDATION OF TOTAL COMBUSTION METHOD FOR CRUDE PROTEINS DETERMINATION IN ANIMAL FEED

Sandra Jakšić¹, Željko Mihaljev¹, Milica Živkov-Baloš¹, Zoran Mašić²
¹Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad, Rumenački put 20
²Faculty of Agriculture, Novi Sad

Abstract

Crude proteins content is one of the most important parameters of animal feed quality. For total proteins determination Kjeldahl method is the most known and most used. However, total combustion method, well-known as Dumas, is also recognized as standard method. In this paper the model of Dumas validation for total combustion method on the instrument Elementar- Rapid N is shown. The validation involves determination of linearity, detection limit, accuracy and precision, as the standard required. In validation procedure standard substances were used and the results were processed with suitable statistics methods in Microsoft Excel. Examined validation parameters show that the tested method can be used for accurate determination of total nitrogen (protein) determination in animal feed samples.

Key words: crude proteins, total combustion method, validation, animal feed

UVOD

Proteini su veoma važni sastojci hrane za životinje. Sadržaj sirovih proteina se izražava kao ukupan sadržaj azota pomnožen sa odgovarajućim faktorom i kao takav predstavlja važan parametar kvaliteta hrane. Postoje različite metode za određivanje sirovih proteina, a najčešće primenjivane su: IR metode, UV-vidljiva spektroskopija i instrumentalne tehnike bazirane na Kjeldalovoj i Dumasovoj metodi (McClements, 2003). Za koju metodu će se laboratorija odlučiti zavisi od vrste uzoraka, broja uzoraka i raspoloživih sredstava.

Za određivanje organskog azota najčešće se koristi Kjeldalova metoda, čije su modifikacije usvojene i kao standardne AOAC metode za različite vrste uzoraka (AOAC, 1998). Još jedna, dugo poznata metoda za određivanje različitih elemenata (ugljenik, vodonik, azot i sumpor) u različitim uzorcima jeste metoda totalnog sagorevanja (Dumasova). I ova metoda je priznata kao standardna od strane nekoliko organizacija (AOAC, 1998; ICC, 2000). Metoda se sastoji u sagorevanju uzorka u

atmosfera bogatoj kiseonikom, pri visokoj temperaturi i analiziranju dobijenih gasova u tri faze (ICC, 2000; Elementar, 2008):

1. sagorevanje: oksidacija pomoću kiseonika na oko 1000°C, i uz pomoć bakar-oksida;
2. redukcija i adsorpcija: proizvodi sagorevanja: ugljen-dioksid, voda, azot-dioksid i azot se dovode u stanje ravnoteže. Prevođenjem preko zagrejanog bakra redukuje se azot dioksid do azota, a adsorpcijom se uklanjaju ugljen-dioksid i voda;
3. kvantifikacija: ukupan azot se meri pomoću detektora termičke provodljivosti.

U laboratoriji za ispitivanje hrane za životinje odlučili smo se za primenu Dumasove metode, zbog njene brzine i jednostavnosti. U literaturi postoji nekoliko istraživanja – međulaboratorijskih ispitivanja koje porede Kjeldalovu i metodu totalnog sagorevanja za određivanje azota u uzorcima hrane za životinje. Svi autori se slažu u tome da su rezultati dobijeni Dumasovom metodom nešto viši, ali da standardna greška srednje vrednosti nije značajno različita, odnosno da metoda totalnog sagorevanja može zameniti Kjeldalovu metodu (Simonne i sar, 1997; Etheridge i sar., 1998; Marco i sar., 2002; Sader i sar., 2004; Miller i sar., 2007; Sebecic i Balenovic 2001; Schuster i sar., 1991).

U ovom radu su prikazani rezultati validacije metode totalnog sagorevanja za određivanje sirovih proteina u hrani za životinje. Naime, u standardu nije dat detaljan postupak rada, već samo mogućnost upotrebe instrumenta koji radi na principu ove metode i kojim se postižu zahtevane performance. Iz tog razloga cilj validacije metode je dokumentovanje saglasnosti testirane metode sa standardnom AOAC Official Method 990.03 Protein (Crude) in Animal Feed Combustion Method, odnosno AOAC Official Method 992.23 Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds Generic Combustion Method (AOAC, 1998).

MATERIJAL I METODE RADA

Validovana je metoda totalnog sagorevanja za određivanje sirovih proteina pomoću aparata Rapid N, Elementar, Germany (Elementar, 2008).

Postupak validacije je izveden prema Priručniku za kurs Validacija mernih metoda, Saveza hemijskih inženjera, a koji je zasnovan na zahtevima i uputstvima internacionalnih standarda (Kostić i Rakićević, 2009).

Zahtevi za izvođenje metode su prikazani u tabeli 1, a odnose se na performance metode zadate u standardu AOAC 990.03, odnosno AOAC 992.23 (AOAC, 1998).

Tabela 1: Zahtevi za izvođenje metode

Opseg	0,2-20 % N
Linearnost	Određena pomoću teoretskog sadržaja N u organskoj supstanci čistoće 99,9%
Tačnost	$\pm 0,15$ očekivane teoretske vrednosti sa standardnom devijacijom $\leq 0,15$, određeno pomoću nikotinske kiseline, lizin hidrohlorida ili triptofana
Preciznost	RSD $\leq 2,0\%$ za 10 uzastopnih određivanja N

Dnevna kalibracija aparata u cilju određivanja dnevnog faktora je izvršena pomoću asparaginske kiseline 99,8% (Sigma-Aldrich).

Limit detekcije je određen merenjem šest ponavljanja slepe probe, Sn-folije za pakovanje uzoraka koja ne sadrži azot (Elementar, Germany).

Pri postupku validacije, čiji je plan dat u tabeli 2, korišćene su sertifikovane hemikalije odgovarajuće čistoće. Za određivanje linearnosti korišćena je standardna kalibraciona supstanca etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA, 100,2%, Molar Chemicals) u količini 20-300 mg. Tačnost je određena određivanjem sadržaja azota u standardnoj supstanci L-Triptofan 99,9% (Sigma-Aldrich).

Preciznost je određena iz 10 uzastopnih određivanja azota u uzorku potpune smeše za piliće.

Tabela 2: Plan rada

Dani	Akcije
Dan 1	Određivanje granice detekcije
Dan 2	Određivanje linearnosti
Dan 3	Određivanje tačnosti
Dan 4	Određivanje preciznosti i tačnosti
Dan 5	Određivanje linearnosti

REZULTATI RADA I DISKUSIJA

Primenjena procedura određivanja granice detekcije dala je rezultate prikazane u tabeli 3. Iz dobijenih rezultata, za šest merenja i $t_{0,95} (6-1) = 2,015$, izračunata je standardna devijacija (SD) i granica detekcije, koja iznosi 0,058% N.

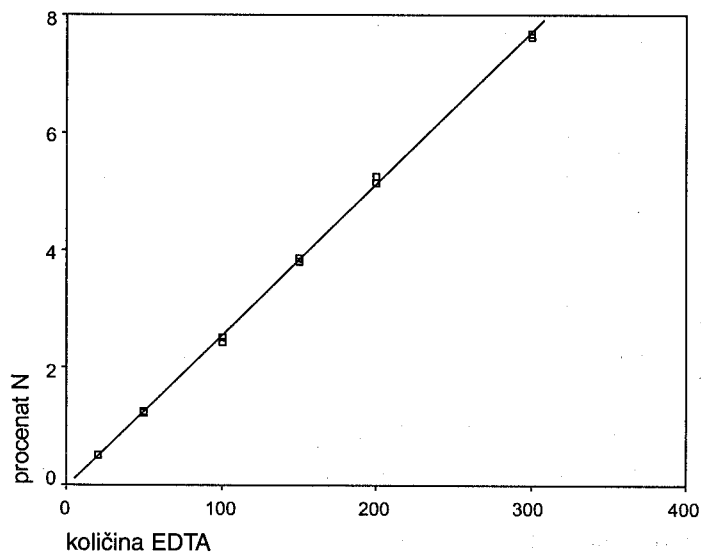
Tabela 3: Rezultati određivanja % N u slepoj probi

Br. merenja	% N
1.	0,006
2.	0,036
3.	0,013
4.	0,013
5.	0,017
6.	0,002
SD	0,012

Rezultati merenja sadržaja N u EDTA dati su u tabeli 4 i na osnovu njih je grafički prikazana linearnost određivanja na grafikonu 1:

Tabela 4: Određivanje sadržaja N u EDTA

Br. određivanja	Količina EDTA (mg)	% N
1.	20	0,5
2.	20	0,509
3.	50	1,257
4.	50	1,224
5.	100	2,512
6.	100	2,448
7.	150	3,798
8.	150	3,86
9.	200	5,256
10.	200	5,142
11.	300	7,636
12.	300	7,682



Grafikon 1. Linearnost određivanja N u EDTA.

Primenjena procedura određivanja linearnosti (Kostić i Rakićević, 2009), pomoću programa Microsoft Excel (opcije Tools/Data Analysis/Regression) dala je rezultate prikazane u tabeli 5:

Tabela 5. Linearnost određivanja %N

Regression Statistics						
Multiple R	0,9997					
R Square	0,9995					
Adjusted R Square	0,9994					
Standard Error	0,0607					
Observations	12					
ANOVA						
	df	SS	MS	F	Significance F	
Regression	1	70,7945	70,7945	19234,8036	9,32454E-18	
Residual	10	0,0368	0,0037			
Total	11	70,8313				
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-0,0355	0,0308	-1,1517	0,2762	-0,1042	0,0332
X Variable 1	0,0258	0,0002	138,6896	9,32454E-18	0,0253	0,0262

Testiranje linearnosti kalibracione krive vršili smo izračunavanjem testirane vrednosti Zl, pomoću podataka iz tabele 5, a hipoteza «kalibraciona kriva je linearna» se prihvata, jer je testirana vrednost Zl manja od granične vrednosti za 95% fraktila od F, tj. 2,04,53.

U cilju utvrđivanja tačnosti metode, urađeno je pet uzastopnih određivanja sadržaja N u standardnoj supstanci triptofanu u dva dana (tabela 6).

Tabela 6: Određivanje sadržaja N u triptofanu

Br. određivanja	%N (I dan)	%N (II dan)
1.	13,644	13,720
2.	13,428	13,631
3.	13,469	13,369
4.	13,488	13,452
5.	13,429	13,560

Primenjena procedura (Kostić i Rakićević, 2009) određivanja tačnosti na osnovu podataka iz tabele 6, i nominalne vrednosti sadržaja N u triptofanu (13,71%), dala je sledeće rezultate: maks efikasnost (Recovery) 100%, odnosno, min efikasnost 97%, što znači da je tačnost određivanja 97-100%, istinitost 99% ($X_{sr} = 13,519\%$), a odstupanje (Bias) 1%.

Primenjena procedura (Kostić i Rakićević, 2009) određivanja preciznosti na osnovu podataka iz tabele 6 pomoću programa Microsoft Excel (opcije Tools/Data Analysis/Anova Single Factor) dala je rezultate prikazane u tabeli 7. Na ovaj način došli smo do sledećih podataka o preciznosti metode: Standardna devijacija unutar grupe iznosi $S_w = 0,087\%$, standardna devijacija između grupa $S_b = 0,078$, a ukupna standardna devijacija je $Stot = 0,117\%$

Tabela 7: Preciznost određivanja triptofana

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Row 1	2	27,364	13,682	0,002888		
Row 2	2	27,059	13,5295	0,0206045		
Row 3	2	26,838	13,419	0,005		
Row 4	2	26,94	13,47	0,000648		
Row 5	2	26,989	13,4945	0,0085805		
		xsr	13,519			
		Sx	0,09959982			
		Sx ²	0,00992013			
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,079361	4	0,01984025	2,62986798	0,158752494	5,192163144
Within Groups	0,037721	5	0,0075442			
Total	0,117082	9				

U tabeli 8 prikazani su rezultati 10 uzastopnih određivanja sadržaja N, odnosno sirovih proteina u potpunoj smeši za ishranu pilića. Dobijena relativna standardna devijacija (RSD) zadovoljava zahtev standarda te je preciznost određivanja zadovoljavajuća.

Tabela 8: Određivanje sadržaja N u potpunoj smeši za ishranu pilića

Br. odred.	%N	% proteina
1.	3,916	24,478
2.	3,686	23,035
3.	3,898	24,363
4.	3,829	23,929
5.	3,824	23,897
6.	3,750	23,436
7.	3,705	23,158
8.	3,825	23,908
9.	3,897	24,355
10.	3,830	23,937
Xsr	3,805	23,780
Sx	0,076	0,475
RSD %	1,999	1,999

ZAKLJUČAK

Dobijeni eksperimentalni rezultati određivanja linearnosti, granice detekcije, tačnosti i preciznosti ukazuju da je validovana metoda primenjiva za određivanje sirovih proteina u uzorcima hrane za životinje. Metoda se pokazala kao jednostavna, brza i praktična, obzirom na činjenicu da zahteva malu količinu uzorka i da analiza jednog uzorka traje 3 minuta.

Metoda može biti korišćena za određivanje sadržaja proteina u stočnoj hrani, u skladu sa sledećim kartonom metode.

NAUČNI INSTITUT ZA VETERINARSTVO NOVI SAD	IZVEŠTAJ O VALIDACIJI METODE Naziv metode: Određivanje sadržaja proteina u hrani za životinje	Datum: 22.06.2009.
NIV-NS	Odeljenje za ispitivanje hrane za životinje	

KARTON METODE	
Naziv metode: Određivanje sadržaja proteina u hrani za životinje	Datum izrade izveštaja: 22.06.2009.
Ispitivani parametar: Azot	Izveštaj izradio: mr Sandra Jakšić
Vrsta uzorka: Hrana za životinje	
Princip metode:	Merenje sadržaja azota i preračunavanje na sadržaj proteina u skladu sa AOAC Official Method 990.03 Protein (Crude) in Animal Feed Combustion Method, odnosno, AOAC Official Method 992.23 Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds Generic Combustion Method.
Kratak opis validacije:	Metoda je validovana određivanjem linearnosti (6 nivoa koncentracije), granice detekcije (6 određivanja) tačnosti (standardna supstanca, određivanje u duplikatu u 5 serija) i preciznosti (1 prirodni uzorak, određivanje u 10 uzastopnih merenja).
Rezultati validacije	
Opseg	0,5-20 %
Linearni opseg	0,5-7,5 %
Granica detekcije	0,06%
Efikasnost	97-100%
Ponovljivost	0,09%
Standardna devijacija između grupa	0,08%
Standardna devijacija	0,12%
Ispitivanje izvršio:	mr Sandra Jakšić
Arhiva (oznaka sobe, registratora):	Validacija metoda, soba 503
Odobrio	mr Željko Mihaljev
Datum :	22.06.2009.

LITERATURA

1. AOAC INTERNATIONAL, 1998.
2. Elementar, Rapid N Cube, Condensed Manual, Germany, 2008.
3. Etheridge R.D., Pesti G.M., Foster E.H.: A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology* 73, 21-28, 1998.
4. ICC Standard No. 167: Determination of crude protein in grain and grain products for food and feed by the Dumas Combustion Principle, 2000. <http://www.icc.or.at/methods3.php#ICC109>
5. Kostić N., Rakićević M.: Priručnik za kurs Validacija mernih metoda, Beograd, Savez hemijskih inženjera, 2009.

6. Marco A., Rubio R., Compano R., Casals I.: Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. *Talanta* 57, 1019-1026, 2002.
7. McClements D.J.: Analysis of Food Products (Food Science 581), 2003 <http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Proteins.html>.
8. Miller E.L., Bimbo A.P., Barlow S.M., Sheridan B.: Repeatability and reproducibility of determination of the nitrogen content of fishmeal by the combustion (Dumas) method and comparison with the Kjeldahl method: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 90, 6-20, 2007.
9. Sader A.P.O., Oliveira S.G., Berchielli T.T.: Application of Kjeldahl and Dumas combustion methods for nitrogen analysis. *Archives of Veterinary Science* 9, 73-79, 2004.
10. Schuster M., Morwarid M., Sattes H.: Dumas combustion method for estimating protein content of feeds. Umweltaspekte der Tierproduktion. 103.VDLUFA Kongress, Ulm, 16/21. September 1991.
11. Sebecic B., Balenovic J.: Rapid ecologically acceptable method for wheat protein content determination - Comparison of methods. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 97, 221-225, 2001.
12. Simonne A.H., Simonne E.H., Eitenmiller R.R., Mills H.A., Cresman III C.P.: Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Foods? *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 73, 39-45, 1997.

Primljeno: 28.10.2009.

Odobreno: 23.11.2009.