

*Adam Florkiewicz, Ewa Cieślik, Agnieszka Filipiak-Florkiewicz*

## OZNACZANIE ZAWARTOŚCI AZOTU CAŁKOWITEGO W ŻYWNOSCI – PORÓWNANIE METODY KIEJDAHLA I DUMASA

Małopolskie Centrum Monitoringu i Atestacji Żywności  
Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. *E. Cieślik*

*Porównano dwie metody oznaczania azotu całkowitego w żywności, tj. metodę Kiejdahla oraz metodę Dumasa. Materiał badawczy stanowiły produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego i roślinnego (mięso królicze i wołowe, kalafior i ziarno owsa) oraz materiał referencyjny. Zawartość azotu określona metodą Dumasa była porównywalna z wartościami oznaczonymi metodą odwoławczą – Kiejdahla, a wartość odzysku dla wszystkich materiałów mieściła się w prawidłowym zakresie.*

Hasła kluczowe: metoda *Kiejdahla*, metoda *Dumasa*, azot, białko, żywność.  
Key words: *Kiejdahl* method, *Dumas* method, nitrogen, protein, food.

Zawartość białka w żywności i racjach pokarmowych oznacza się najczęściej za pomocą metody *Kjeldahla* (metoda pośrednia), mnożąc określoną po hydrolizie, destylacji i miareczkowaniu zawartość azotu ogólnego przez odpowiedni przelicznik, wyrażający średnią zawartość azotu w białkach produktów żywnościowych (1). Zawartość ta, zależnie od rodzaju produktu waha się od 15% (np. dla mąki pszennej) do 17% (np. dla produktów mlecznych) i średnio wynosi 16%, czyli 6,25. W metodzie *Kjeldahla* wykorzystywany jest stężony kwas siarkowy oraz inne odczynniki stanowiące zagrożenie dla zdrowia człowieka, a także środowiska naturalnego. O konieczności modyfikacji oznaczania białka mówi np. Dyrektywa Komisji z dnia 4 czerwca 1993 r. zmieniająca załącznik I do trzeciej dyrektywy 72/199/EWG – „należy zmienić wyżej wymienioną metodę ze względu na zaawansowany postęp w nauce i technice” (2), a w szczególności zaś postanowienia Dyrektywy Rady 80/1107/EWG z dnia 27 listopada 1980 r. w sprawie ochrony pracowników narażonych na ryzyko związane z oddziaływaniem czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych w czasie pracy (3). Do nowoczesnych, proekologicznych, bezpiecznych oraz szybkich metod oznaczania białka należy metoda *Dumasa*. Celem pracy była próba walidacji metody *Dumasa* poprzez porównanie oznaczania białka w próbkach żywności (pochodzenia zwierzęcego oraz roślinnego) z metodą odwoławczą *Kiejdahla*.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły próbki żywności, w tym: mięso królicze (6 próbek), mięso wołowe (8 próbek), kalafior (8 próbek), owies (9 próbek). W ramach kontroli jakości przebadano trzy materiały referencyjne: siarczan amonu (zawartość azotu N = 21,00 g/100 g), EDTA (zawartość azotu N = 9,50 g/100 g) oraz materiał pochodzący z międzynarodowych badań międzylaboratoryjnych nr 28138 LGC Proficiency Testing Group w 2007 r. (zawartość azotu N = 0,533 g/100 g). Przed przystąpieniem do analiz materiał rozdrabniano do uzyskania jednolitej próby o możliwie najmniejszej średnicy cząstek. W celu oznaczenia zawartości azotu za pomocą metody *Dumasa* stosując aparat TruSpec N firmy Leco (4) odważano ok. 0,5 g analizowanego materiału, następnie zamykano go w cynowej folii i poddawano spalaniu w atmosferze tlenu w temp. 950°C. Gazy powstałe w trakcie spalania gromadzone są i mieszane z czystym helem w obecności miedzi jako katalizatora w celu przemiany tlenków azotu w azot cząsteczkowy. Taka mieszanina gazów trafia do detektora termoprzewodnościowego emitującego sygnał elektryczny w ilości proporcjonalnej do ilości azotu. Końcowe wyniki obliczano na podstawie krzywej kalibracyjnej wykreślonej na podstawie EDTA jako wzorca. Czas analizy pojedynczej próbki wynosił 4 min. (aplikacja firmy Leco, Saint-Denis i Goury, 2004). Równocześnie w tym samym materiale oznaczano zawartość białka za pomocą metody *Kjeldahla* z wykorzystaniem aparatu Kjeltec™ 2100 firmy Foss. Materiał badany w ilości ok. 0,5 g poddano mineralizacji na mokro w stężonym kwasie siarkowym z użyciem katalizatorów. Otrzymany mineralizat destylowano w aparacie Kjeltec a następnie miareczkowano za pomocą kwasu solnego o steż. 1 mol/dm<sup>3</sup> zgodnie z aplikacją aparatu Kjeltec – Foss Tecator 2200 (5). Czas analizy (mineralizacja, destylacja, miareczkowanie) pojedynczej próbki wynosił ok. 3 h. W celu przeprowadzenia obszernej dyskusji uzyskane wyniki oznaczenia zawartości azotu (obiema metodami) w żywności przeliczano na białko (przyjmując następujące współczynniki przeliczeniowe 6,25 dla mięsa króliczego, wołowego oraz kalafiora i 5,70 dla owsa). W celu porównania obu metod analitycznych wyliczono wartość odzysku oraz porównano z zaleceniami AOAC (6). Otrzymane wyniki zestawiono, a następnie poddano analizie statystycznej obejmującej wyliczenie średniej, odchylenia standardowego, współczynnika korelacji, analizę regresji oraz wariancji w układzie jednoczynnikowym. Istotność różnic określono za pomocą testu *F-Snedecora* przy poziomie istotności  $p \leq 0,05$ . Przy statystycznym opracowywaniu wyników wykorzystano program komputerowy Statistica.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zawartość białka w mięsie króliczym wahała się w zakresie od 22,57 do 24,97 g/100 g. Otrzymane wyniki były porównywalne z wartościami przedstawionymi w Tabelach składu i wartości odżywczej żywności (7). W większości próbek wyższe ilości tego składnika oznaczono metodą *Kjeldahla* w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodą *Dumasa* (średni współczynnik odzysku 99,2%). Współczynnik korelacji dla obydwu ocenianych metod określono na poziomie 0,926 (tab. I).

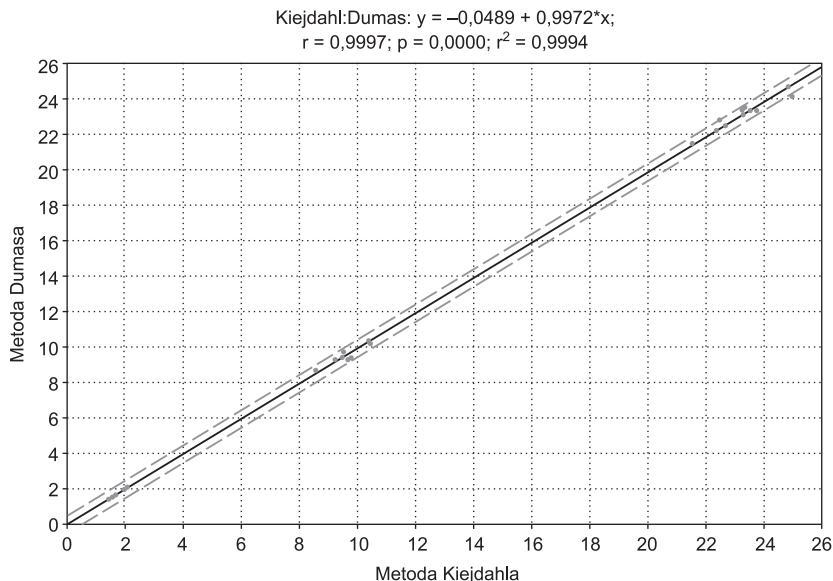
Tabela I. Zawartość azotu\*/białka oznaczona metodą *Kjeldahla* oraz *Dumasa*Table I. The content of nitrogen\*/protein assessed by *Kjeldahl* and *Dumas* method

Materiał	Zawartość azotu*/białka oznaczona metodą <i>Kjeldahla</i> (g/100 g)	Zawartość azotu*/białka oznaczona metodą <i>Dumasa</i> (g/100 g)	Wartość odzysku (%)	Średnia wartość odzysku (%)	Współczynnik korelacji
Materiał referencyjny (Siarczan amonu)	21,20±0,000*	21,23±0,028*	100,1	100,5	0,9999
Materiał referencyjny (EDTA)	9,37±0,042*	9,55±0,011*	101,9		
Materiał referencyjny (badania międzylaboratoryjne)	0,541±0,005*	0,537±0,004*	99,4		
Mięso królicze	23,35±0,226	23,66±0,521	101,3	99,2	0,926
Mięso królicze	23,32±0,064	23,16±0,626	99,3		
Mięso królicze	23,77±0,431	23,38±0,208	98,4		
Mięso królicze	22,70±0,273	22,57±0,695	99,4		
Mięso królicze	24,84±0,240	24,76±0,416	99,7		
Mięso królicze	24,97±0,205	24,19±0,124	96,9		
Mięso wołowe	23,24±0,622	23,42±0,103	100,8	100,0	0,956
Mięso wołowe	23,48±0,014	23,31±0,059	99,3		
Mięso wołowe	22,51±0,085	22,90±0,091	101,7		
Mięso wołowe	21,51±0,226	21,55±0,117	100,2		
Mięso wołowe	22,37±0,262	22,26±0,163	99,5		
Mięso wołowe	23,57±0,198	23,39±0,001	99,2		
Mięso wołowe	23,33±0,021	23,32±0,004	100,0		
Mięso wołowe	22,63±0,594	22,42±0,020	99,1		
Ziarno owsa	10,41±0,325	10,34±0,066	99,3	98,8	0,930
Ziarno owsa	8,56±0,495	8,70±0,195	101,6		
Ziarno owsa	10,45±0,375	10,17±0,236	97,3		
Ziarno owsa	9,51±0,290	9,36±0,239	98,4		
Ziarno owsa	9,26±0,269	9,28±0,190	100,2		
Ziarno owsa	9,81±0,339	9,36±0,021	95,4		
Ziarno owsa	9,66±0,445	9,28±0,106	96,1		
Ziarno owsa	9,56±0,141	9,70±0,187	101,5		
Ziarno owsa	9,50±0,156	9,44±0,130	99,4		
Kalafior (róža zielona)	2,06±0,445	2,06±0,190	100,0	98,0	0,997
Kalafior (róža zielona)	1,66±0,198	1,62±0,187	97,6		
Kalafior (róža zielona)	2,03±0,304	2,00±0,130	98,5		
Kalafior (róža zielona)	2,07±0,170	2,02±0,094	97,6		
Kalafior (róža biała)	1,49±0,035	1,45±0,009	97,3		
Kalafior (róža biała)	1,58±0,219	1,55±0,001	98,1		
Kalafior (róža biała)	1,63±0,156	1,61±0,045	98,8		
Kalafior (róža biała)	1,67±0,148	1,60±0,008	95,8		

\* – zawartość azotu – materiały referencyjne

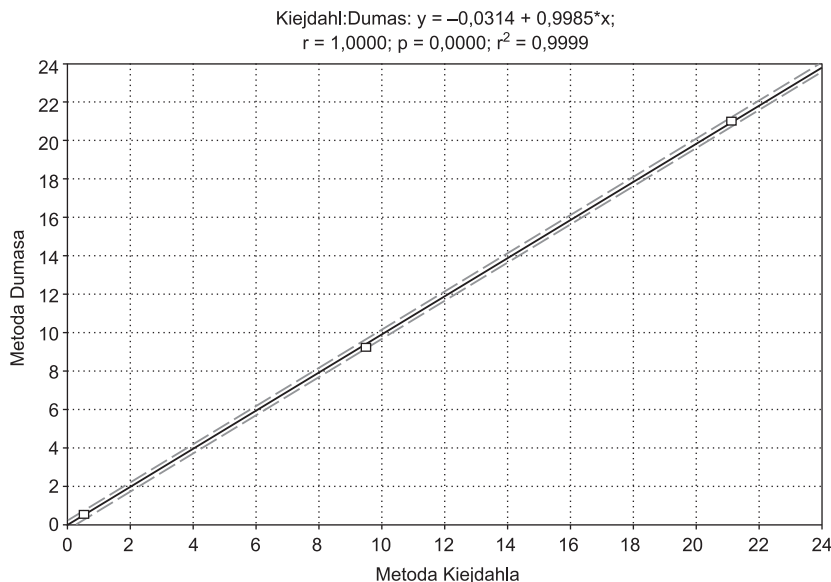
Zbliżone ilości białka stwierdzono także w mięsie wołowym, od 21,51 do 23,57 g/100 g. Wartości te były zbliżone z wynikami innych autorów (7, 8). Zaobserwowane różnice w poziomie tego składnika oznaczonego metodą *Kiejdahla* oraz *Dumasa* były nieco mniejsze niż w mięsie króliczym, a średni współczynnik odzysku wynosił 100% (99,1–101,7%). Współczynnik korelacji wyznaczono na poziomie 0,956. Również zawartość białka oznaczona w owsie (8,56–10,45 g/100 g) mieściła się w zakresach podawanych przez innych autorów. Współczynnik korelacji pomiędzy wartościami otrzymanymi metodą *Kiejdahla* a metodą *Dumasa* wyniósł dla badanego materiału 0,930 (wartość odzysku wahała się w granicach 95,4–101,65, wynosząc średnio 98,8%). Ilość białka stwierdzona w kalafiorze białym oraz zielonym mieściła się w granicach 1,45–2,07 g/100 g. Według polskich danych literaturowych zawartość tego składnika w świeżej masie kalafiora waha się w zakresie 1,1–2,5 g/100 g (9, 10). W warzywie tym spośród wszystkich przebadanych produktów uzyskano najwyższy współczynnik korelacji pomiędzy wartościami oznaczonymi obydwoma metodami tj. 0,997, przy średniej wartości odzysku 98,0% (tab. I). Analizując wyniki zawartości białka we wszystkich próbkach należy stwierdzić, że wartości oznaczone obydwoma metodami były zbliżone, a wyznaczony dla nich współczynnik korelacji wyniósł 0,9997. Potwierdza to przeprowadzona analiza regresji. Dla wszystkich danych punkt przecięcia osi ze współzrędną opisująca ilość białka oznaczoną metodą *Kiejdahla* jako funkcję zawartości białka wyznaczoną metodą *Dumasa* był praktycznie równy zero (ryc. 1).

Wykorzystując wykreślone równanie krzywej regresji:  $Dumas = -0,0489 + 0,9972x$ , to na podstawie wyników otrzymanych metodą *Dumasa* można z dużą



Ryc. 1. Zawartość białka w produktach żywnościowych oznaczona metodami Kiejdahla oraz Dumasa (g/100 g).

Fig. 1. Protein content in food determined by Kiejdahl and Dumas methods (g/100 g).



Ryc. 2. Zawartość azotu w materiałach referencyjnych oznaczona metodami *Kjeldahla* oraz *Dumasa* (g/100 g).

Fig. 2. Nitrogen content in reference material determined by *Kjeldahl* and *Dumas* methods (g/100 g).

dokładnością określić wynik, jaki otrzyma się stosując metodę *Kjeldahla*. Porównując wyniki wszystkich przeprowadzonych oznaczeń można stwierdzić, że ilości azotu/białka oznaczone metodą *Kjeldahla* w większości przypadków były nieznacznie wyższe od ilości uzyskanych metodą *Dumasa*. Również nieco niższą zawartość azotu oznaczoną metodą *Dumasa* w różnych typach mięsa w porównaniu do wartości otrzymanych metodą *Kjeldahla* uzyskali *Thompson* i współpr. (11). Przeprowadzona analiza wariancji nie wykazała jednak istotnego zróżnicowania w zawartości białka w badanych produktach w zależności od zastosowanej metody oznaczania ( $p = 0,97061$ ). Również istotnego statystycznie zróżnicowania poziomu azotu w zależności od użytej do jego metody oznaczenie nie stwierdził *Etheridge* i współpr. (12). Autorzy ci porównywali poziom azotu określony tymi samymi metodami m.in. w paszach, jajach i tuszach zwierzęcych. Jedynie w dwóch ostatnich przypadkach wyniki oznaczone metodą *Kjeldahla* oraz *Dumasa* różniły się istotnie, przy czym wartości uzyskane metodą *Dumasa* były wyższe. Ich zdaniem przyczyną oznaczania wyższej ilości azotu metodą *Dumasa* jest wysoka temperatura stosowana podczas spalania a nie jak sądzi *McGeehan* (13) wysoka zawartość np. azotanów w materiale badawczym. Dodatkowo w celu walidacji metody *Dumasa* dokonano oznaczenia zawartości azotu w materiale referencyjnym. Ilość azotu we wszystkich próbkach była niemal identyczna bez względu na zastosowaną metodę (ryc. 2), a obliczony współczynnik korelacji był równy 1.

## WNIOSKI

1. Zawartość azotu oznaczona metodą *Dumasa* była porównywalna z wartościami oznaczonymi metodą odwoławczą – *Kiejdahla*.
2. Obliczona wartość odzysku dla wszystkich materiałów mieściła się w prawidłowym zakresie.
3. Metoda *Dumasa*, ze względu na krótki czas trwania analizy, mniejszą pracochłonność może być alternatywną metodą oznaczania azotu/białka w żywności.
4. Dodatkową zaletą metody *Dumasa* jest jej proekologiczny charakter tj. brak niekorzystnego oddziaływania na środowisko naturalne.

A. Florkiewicz, E. Cieślik, A. Filipiak-Florkiewicz

DETERMINATION OF TOTAL NITROGEN CONTENT IN FOOD.  
A COMPARISON OF KIEJDAHL AND DUMAS METHODS

Summary

The aim of this work was to compare two (Kjeldahl and Dumas) methods for assessment of total nitrogen content in food products. The study materials were: 31 samples of animal- and plant-derived food products (rabbit meat, beef meat, cauliflower and oat grains) as well as 3 reference materials (ammonium sulphate, EDTA, and material from international interlaboratory research) as a quality control check samples during analysis. The TruSpec N (LECO Co.) apparatus was applied in the Dumas method. The time of single sample analysis was about 4 minutes. The same samples were assessed by Kjeldahl method with KJeltec2100 (Foss Co.) apparatus. The time of single sample analysis (mineralisation, distillation, and titration) was about 3 hours. The results of Dumas method were comparable with those for the reference Kjeldahl method. The Dumas method, because of short analysis time, simpler procedure and no harmful effect on the environment can be used as the alternative method for direct determination of nitrogen quantity, and indirect determination of total protein content in foodstuffs.

PISMIENICTWO

1. *Saint-Denis T., Goupy J.*: Optimization of a nitrogen analyzer based on the Dumas method, *Analytica Chimica Acta*, 2004; 515: 191-198. – 2. Dyrektywa Komisji 93/28/EWG z dnia 4 czerwca 1993 r. zmieniająca załącznik I do trzeciej dyrektywy 72/199/EWG ustalającej wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz. – 3. Dyrektywa Komisji 91/322/EWG z dnia 29 maja 1991 w sprawie ustanowienia indykatorywnych wartości granicznych w wykonaniu dyrektywy Rady 80/1107/EWG w sprawie ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na działanie czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych w miejscu pracy. – 4. Aplikacja aparatu TruSpec N firmy Leco, 2003. – 5. Aplikacja aparatu Kjeltec - Foss Tecator 2200, 2001. – 6. AOAC PEER: Verified Methods Program, manual on policies and procedures, Arlington, VA, 1993. – 7. *Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda, Iwanow K.*: Tabele składu i wartości odżywczej żywności. PZW, 2005; 91-347. – 8. El S.N.: Evaluation protein quality of meats using collagen content, *Food Chemistry*, 1995; 53: 209-210. – 9. *Orłowski M., Kolota E.*: Uprawa warzyw. Wyd. Brasika 1999; 32-33. – 10. *Rumpel J.*: Uprawa kalafiorów. Wydawnictwo Hortpress sp z o.o., Warszawa, 2002.

11. *Thompson M., Owen L., Wilkinson K., Wood R., Damant A.*: Testing for bias between the *Kjeldahl* and *Dumas* methods for the determination of nitrogen in meat mixtures, by using data from a designed interlaboratory experiment. *Meat Science*, 2004; 68: 631-634. – 12. *Etheridgea R.D., Pestib G.M., Fostera 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*, 1998; 73: 21-28. – 13. *McGeehan, S.L., Naylor, D.V.*: Automated instrumental analysis of carbon and nitrogen in plants and soil samples. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.* 1988; 19: 493-505.