

Oznaczanie azotu i białka według metody Dumasa przez spalenie na sucho oryginalnej próbki

Często zadawane pytania:

Ilościowa analiza azotu i surowego białka odgrywa ważną rolę szczególnie w ocenie produktów rolnych. W odróżnieniu do innych pierwiastków których analiza dokonywana jest metodami spektrofotometrycznymi jak AAS lub ICP, to w zakresie analizy azotu nadal szeroko stosowana jest chemiczna „na mokro” metoda Kjeldahla.

Jednakże od kilkunastu lat coraz częściej stosuje się dokładną w pełni automatyczną w sensie instrumentalnym metodę Dumasa. Pierwszy aparat do makropróbek w zakresie gramowym funkcjonujący według metody Dumasa, opartej na spalaniu próbki skonstruowano w 1989 r. W oparciu o tę konstrukcję i następne jej rozwiązania celem lepszego zrozumienia tematu, zestawiono poniżej najczęściej zadawane pytania i odpowiedzi.

Kim był Dumas?

Jean Baptiste Dumas był francuskim chemikiem (180-1884). Odkrył metodę oznaczania azotu przez mieszanie i grzanie analizowanej substancji z tlenkiem miedzi w atmosferze dwutlenku węgla. Powstałe gazy są redukowane dalej w miedzi do azotu cząsteczkowego, a następnie mierzone wolumetrycznie.

Dlaczego metoda spaleniowa?

W zmodyfikowanej metodzie Dumasa oznaczania azotu, próbka spalana jest w temperaturze ok. 1000⁰C w atmosferze tlenu. Azot zawarty w związkach (np. aminokwasy) przetwarzany jest na tlenek azotu, a następnie na azot cząsteczkowy. Po katalitycznym dopaleniu powodującym utlenianie, oraz po suszeniu i oczyszczeniu w gazie nośnym, wszystkie tlenki azotu są redukowane do azotu cząsteczkowego na reduktorze (np. miedź lub wolfram) i przenoszone za pomocą gazu nośnego do celi detektora przewodności cieplnej celem ilościowego oznaczenia. Komputer automatycznie przelicza (przy znanej wartości naważki) za pomocą wzorów empirycznych procentową zawartość azotu na współczynnik zawartości białka.

Czy chodzi o rzeczywiście nowo odkrytą metodę?

Odkryta w roku 1833 metoda Dumasa jest starsza od tradycyjnie stosowanej metody Kjeldahla. Duński uczoney Johan Gustaw Christoffer Thorsager Kjeldahl oparł swoją metodę na rozkładzie próbki za pomocą gorącego, stężonego kwasu siarkowego, a następnie destylacji pary wodnej i miareczkowanie powstałego amoniaku.

Dlaczego metoda Dumasa dopiero ostatnio znajduje szersze zastosowanie?

Początkowo analizowane metodą Dumasa wielkości próbek wynosiły tylko kilka mg, co dla praktycznego zastosowania dla produktów rolnych stanowiło znaczne ograniczenie.

W analizie chemii organicznej natomiast, metoda ta od dziesięcioleci na dobre znalazła swoje miejsce. W 1989 r. firma **Heraeus Analysentechnik** będącą prekursorem firmy **Elementar Analysensysteme** skonstruowała pierwszy analizator funkcjonujący na zasadzie spalania próbki w zakresie gramowym nawozek. Był to początek rozwoju metody Dumasa w kierunku instrumentalnych, w pełni automatycznych, zgodnych z normami aparatów do oznaczeń również białka w żywności, paszach, materiałach roślinnych i glebach. Nie bez wpływu na wysoki stopień automatyzacji i znaczne uproszczenie i uatrakcyjnienie aplikacyjne dla użytkownika tak dawno odkrytej metody, miał niewątpliwie dynamiczny w ostatnim czasie rozwój nowoczesnych układów automatyki i elektronicznego sterowania, wspomaganych dającym wiele możliwości oprogramowaniem użytkowym i serwisowym w środowisku Windows.

Na czym polegają zalety w stosunku do metody Kjeldahla?

Metoda Kjeldahla rozpoczyna się od rozkładu próbki przy pomocy gorącego, stężonego kwasu siarkowego w przedziale czasowym 1-2 godzin.

Aby wspomóc rozkład dodawane są katalizatory jak selen, rtęć i inne związki metali ciężkich. Po dodaniu stężonego ługu uwalniany jest amoniak. Oddestylowany w strumieniu pary wodnej w kwasie wylapywany i oznaczany przez miareczkowanie przy pomocy ługu.

W aspekcie złożoności i warunków bezpieczeństwa dokonywania powyższej procedury zalety metody Dumasa są oczywiste.

Bezpieczeństwo

Metoda Dumasa polega na wysokotemperaturowym utlenianiu bez udziału agresywnych i trujących chemikaliów, tak niezbędnych do mineralizacji w metodzie Kjeldahla, a jedynie środków redukujących jak tlenek miedzi, miedź względnie wolfram, jak również gazu nośnego Helu lub CO₂, oraz w niewielkich ilościach tlenu.

Metoda ta nie naraża personelu na pracę ze stężonymi kwasami i zasadami bez konieczności kontroli wrzących kwasów w szklanych kolbach, pękających czasami podczas analizy czy też ich przemieszczaniu.

Odejście od stosowania do rozkładu próbek agresywnych chemikaliów

Metoda Dumasa wymaga stosowania jedynie nieagresywnej i nietoksycznej metody utleniania, oraz substancji redukujących jak tlenek miedzi, miedź lub wolfram oraz gazów. Nie zachodzi zagrożenie wynikające z posługiwania się kwasami, zasadami oraz problem składowania i utylizacji odpadów.

Znacząca oszczędność czasu

Od momentu wprowadzenia próbki do podania wyników analizy upływa zaledwie kilka minut. Czas oczekiwania na ostateczne wyniki w metodzie Kjeldahla wynosi ponad godzinę.

Małe wymagania co do miejsca instalacji

Miejsce na stole laboratoryjnym potrzebne do zainstalowania aparatu wynosi ok. 1 metr. Zasilanie elektryczne potrzebne do pracy aparatu to typowe gniazdo jednofazowe 220 V/16A

z bolcem uziemiającym. Nie ma konieczności stosowania wyciągu do agresywnych oparów kwasów, kosztownych digestoriów, oraz wydzielonego miejsca na składowanie chemikaliów i odpadów. Nie jest potrzebne również zasilanie w wodę czy sprężone powietrze.

Całkowita automatyzacja pomiaru

Po naważeniu próbek i włożeniu do 60 lub 120-pozycyjnego podajnika przebieg kolejnych analiz odbywa się automatycznie bez konieczności dozoru ze strony personelu, zaś wyniki zestawione są w gotowy do wydruku protokół pomiarowy wraz z ich opracowaniem statystycznym i zobrazowaniem mierzonych pików. Nie ma potrzeby uzupełniania i opóźniania naczyń reakcyjnych procesu rozkładu po każdej próbce.

Niskie koszty analizy

Oszczędność czasu pracy, stosowanych chemikaliów, elementów wyposażenia laboratoryjnego, kosztów utylizacji odpadów chemicznych.

Koszt materiałów eksploatacyjnych oraz zużytych gazów dla aparatu Rapid N nie przekracza 3,50 PLN.

Dokładność wyników

Metoda Dumasa zapewnia 100 % odnajdywanie azotu niezależnie od jego chemicznych wiązań w próbce (z wyjątkiem azotków metali). Rezultaty metody Kjeldahla silnie zależą od badanych związków, lub zastosowanych katalizatorów, gdyż np. niektóre związki heterocykliczne, nitrozowe, nitrowe, azowe, azotany pozostają nie rozłożone lub nie całkiem rozłożone.

Czy koszty inwestycyjne zakupu aparatu Dumasa nie są zbyt wysokie?

Koszt w pełni automatycznego aparatu Dumasa nie jest wyższy od półautomatycznego aparatu Kjeldahla. Biorąc pod uwagę koszt kolumny do mineralizacji, urządzeń wyciągowych, magazynowania i utylizacji chemikaliów, to koszty aparatu Dumasa są niższe. Istotne jest również wyliczenie pośrednich kosztów kompletnego stanowiska laboratoryjnego, usuwania odpadów, środków bezpieczeństwa przy posługiwaniu się gorącym kwasem siarkowym, wymianą stłuczonych kolb do mineralizacji, częstej renowacji skorodowanych wyciągów, które w dłuższym okresie pracy wykazują w rzeczywistości znacznie wyższe koszty stosowania metody Kjeldahla.

Czy metoda Kjeldahla nie jest oficjalnie obowiązującą w normach metodą?

Fakt ten w wielu krajach należy do przeszłości. Ze względu na oczywiste zalety metody Dumasa, została ona zaakceptowana w wielu krajach jako procedura alternatywna.

W USA i Kanadzie przez normy AOAC, AOCS, AACC. W Niemczech znalazła swoje miejsce w normach DIN dla produktów mlecznych, gleb, produktów browarniczych, pasz (MEBAK, LUFA). W przygotowaniu są normy ISO na ziarna i produkty zbożowe. W wielu krajach jakkolwiek normy nadal zawierają tylko metodę Kjeldahla, to przepisy nie zabraniają

stosowania wygodniejszej i dokładniejszej jako alternatywnej i porównawczej metody Dumasa. Często wprowadzenie zmian lub poprawek do lokalnych norm są procedurami bardzo kosztownymi i długotrwałymi, zatem komitety normalizacyjne poszczególnych krajów nie są zainteresowane zwykle podejmowaniem tych zagadnień.

Czy metoda Dumasa nie jest przeznaczona dla laboratoriów wykonujących duże ilości analiz?

W przypadku analiz kilku próbek miesięcznie używanie aparatu w pełni automatycznego nie ma oczywiście ekonomicznego uzasadnienia, ale już przy 5-10 analizach dziennie można rozważyć zakup aparatu Dumasa. Duża wygoda w obsłudze i łatwe uzyskiwanie wyników analiz w ciągu kilku minut sprawia, że aparat ten nadaje się do kontroli jakości dokonywanych procesów produkcyjnych. Stwarza on zatem nowe zadania analityczne i możliwości, którym nie są w stanie sprostać starsze, wolniejsze techniki analityczne. Należy spodziewać się, że ze względu na dużą prostotę i oszczędność metoda ta w przyszłości będzie obowiązywać w większości norm.

Ale również aparaty Dumasa wymagają przecież czynności konserwacyjnych.

Jest sprawą oczywistą, że również rozkład metodą spaleniową powoduje zużywanie się materiałów. Wysoka temperatura rozkładu może powodować korozję materiałów, pierścieni uszczelniających oraz zużycie materiałów na reduktory i katalizatory jak tlenek miedzi, lub miedź i wolfram, które muszą być wymieniane. Jednakże takie czynności w nowych aparatach wykonuje się co kilkaset analiz. Niektóre starsze aparaty Dumasa wymagały częstszych czynności konserwacyjnych. Zmniejszenie czynności konserwacyjnych stanowi obecnie parametr jakościowy aparatów o wysokiej wydajności. Częste wymiany filtrów kurzowych, pierścieni uszczelniających, osuszaczy nie mają już miejsca w standardach jakościowych tej klasy analizatorów.

Czy metoda Dumasa nie wymaga również stosowania toksycznych chemikaliów ?

Do dokładnych pomiarów próbek zawierających duże ilości siarki jako materiał absorbujący SO_2 szczególnie przydatny jest chromian ołowiu. Jednakże zastosowanie przez firmę Elementar metody redukcji za pomocą wolframu (zgłoszony patent) sprawia, że nie ma potrzeby stosowania dodatkowych absorbentów siarki.

Czy wyniki otrzymywane metodami Kjeldahla i Dumasa są porównywalne?

Przede wszystkim należy wyjaśnić, że wysokotemperaturowy rozkład metodą Dumasa zapewnia 100 % odtworzenie azotu całkowitego. Zależnie od substancji mineralizacja metodą Kjeldahla może być powodem wahań i zaniżenia wyników. Dla produktów rolnych dobre porównanie wyników otrzymanych obiema metodami, mogą dać rozległe testy obejmujące

większą ilość laboratoriów badających tę samą próbkę wzorcową, lub próbkę innego materiału bardzo dobrze zhomogenizowanego. Nieznacznie niższe rezultaty otrzymane metodą Kjeldahla mogą zostać przeliczone za pomocą doświadczalnie wyznaczonego i statystycznie wyliczonego współczynnika korelacyjnego.

Aparat Dumasa może być wykalibrowany na wzorzec białka-azotu, który jest analizowany aparatem Kjeldahla.

Czy możliwe do analizowania wielkości naważek aparatem Dumasa są w ogóle reprezentatywne?

Nowoczesne aparaty mogą analizować próbki do kilku gram. Do zbadania 1 grama substancji organicznej potrzebny jest dobry aparat, jakkolwiek większość próbek daje poprawne rezultaty już w kilkuset lub kilkudziesięciu mg. Jeśli próbki wykazują dużą niehomogeniczność powinny być dobrze zmielone i wymieszane, ponieważ nawet przy naważce 10 g nie uzyska się sensownej dokładności analitycznej.

Duża szybkość dokonywanych analiz umożliwia wykonanie wielokrotne analizy tej samej próbki i wyznaczenie wartości średniej.

Czy spektrometr NIR nie jest również dobrą alternatywą?

Spektrometry NIR i aparaty Dumasa nie są dla siebie konkurencyjne a uzupełniają się wzajemnie. Spektroskopia NIR lub NIT nie jest metodą bezpośrednią. Dokładność silnie zależy od rodzaju próbki i właściwych wzorców kalibracyjnych, które muszą być dość zbliżone do analizowanej próbki. Metoda Dumasa jako metoda quasi-absolutna może służyć do dokładnego oznaczania różnych rodzajów próbek za pomocą tej samej wzorcowej krzywej analitycznej (uśrednionej, przy użyciu czystej chemicznie substancji wzorcowej). Proste i dobre zastosowanie metod NIR ma miejsce do pomiarów homogenicznych i znanych substancji przy średnich wymaganiach co do dokładności.

Wzorce kalibracyjne mogą być oznaczane aparatem Dumasa. Natomiast do oznaczeń azotu w mieszaninach lub nieznanymi naturalnymi substancjami znacznie lepiej sprawdzają się aparaty Dumasa.

Czy nie jest ograniczona czułość detekcji?

W badaniu typowych próbek chodzi przede wszystkim o dokładną ilościową analizę w zakresie 0,01 % do teoretycznie 10%N, ale nie o analizę śladową w zakresie ppm. Mocną stroną tej metody jest niezależność od składu matrycy kalibracja, duża jej stabilność w czasie w szerokim zakresie pomiarowym detektora przewodności cieplnej. Do oznaczeń śladowych najlepiej nadaje się detekcja chemiluminescencyjna. Jednakże ze względu na silną zależność krzywej kalibracji od matrycy, nie jest to optymalne w zastosowaniu do produktów rolnych. W zakresie detekcji poniżej 50 ppm N firma Elementar oferuje czuły aparat VarioTrace N z detektorem przewodności cieplnej, którego zaletą w porównaniu do detektora chemiluminescencyjnego jest prostota i niezależność od matrycy próbki kalibracja.

Czy istnieją jakieś ograniczenia odnośnie rodzaju próbki?

Badane próbki mogą być ciekłe lub stałe. Nie jest wymagane chemiczne wstępne przygotowanie próbki.