

JAN WOŹNIAK, REGINA OŁĘDZKA, BOGUSŁAW KOLASA, MARZANNA HELNIK

## MIKROMETODA OZNACZANIA WARTOŚCI ENERGETYCZNEJ ŻYWNOŚCI Z UŻYCIEM KWASU CHROMOWEGO

### MICROMETHOD USING CHROMIC ACID FOR THE DETERMINATION OF THE CALORIC VALUE OF FOOD

Z Zakładu Bromatologii Instytutu Biofarmacji AM w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. R. Ołędzka

*Poddając krytyce metodę Rozentala wprowadzono mikrometodę oznaczania kaloryczności posiłków zapewniającą oznaczenie każdej próbki badanej o wartości energetycznej do 200 kcal/100g.*

Znajomość wartości kalorycznej np. całodziennych posiłków ma znaczenie przy planowaniu i wyżywieniu ludności, organizowaniu żywienia zbiorowego, a szczególnie dla służb kontrolnych Sanepidu, PIH i NIK w celu ustalenia kaloryczności posiłków, zgodnie z deklarowanym jadłospisem w stołówkach zakładowych, studenckich, przedszkolach, domach dziecka itp.

Przy wykonywaniu kontroli bieżącej otwartych i zamkniętych zakładów zbiorowego żywienia, porównuje się wyniki analiz dotyczące kaloryczności, otrzymane metodą klasyczną z wartościami kalorycznymi obliczonymi na podstawie tablic wartości odżywczych środków spożywczych [2]. Choć wspomniana metoda klasyczna jest uważana dotychczas za najbardziej dokładną, jest pracochłonna i długotrwała, trzeba bowiem osobno oznaczać w posiłkach zawartość tłuszczów, białka, wody, popiołu, a z różnicy – węglowodanów. Jednocześnie biorąc pod uwagę system ustalania spożycia oraz rozbieżności w kaloryczności posiłków gotowych w stosunku do kaloryczności poszczególnych produktów i odstępstwa wartości kalorycznej produktów od wielkości wziętych z tablic wartości odżywczych, należy uznać tę metodę za wielce niedokładną.

Metoda utlenienia kwasem chromowym, znana w Polsce także pod nazwą metody *Rozentala* [2, 4, 5], miała być jedną z najprostszych metod oznaczania kaloryczności posiłków zastępując metodę klasyczną. *Krauze* i wsp. [2] próbowali wykorzystać tę metodę do szybkiej kontroli posiłków gotowanych, z użyciem zaproponowanych przez *Rozentala* odczynników [5]. Propozycje te jednak nie znalazły praktycznie szerszego zastosowania, bowiem Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne sygnalizowały stale niemożność wykonania oznaczeń ze względu na niewystarczające ilości używanego dwuchromianu potasowego. Również próby prowadzone w Zakładzie Bromatologii AM w Warszawie dawały negatywne wyniki. Tymczasem kontrole nadal opierają się na metodzie badania struktury spożycia lub klasycznej pracochłonnej i długotrwałej.

Wobec sygnalizowanych mankamentów wspomnianej metody spalania kwasem chromowym zrodziła się potrzeba jej weryfikacji. W pierwszej części pracy dokonano

weryfikacji obowiązującego dotychczas współczynnika korekcyjnego [2] i wyznaczenia innej jego wartości [1]. Jednocześnie zmniejszono zużycie drogich odczynników i czas wykonania oznaczenia. Proporcje odczynników należało dobrać tak, aby w każdej próbie analitycznej można było dokonać wyznaczenia jej kaloryczności szybko i z użyciem znacznie mniejszych ilości deficytowych odczynników, niż to przewidywała dotychczas obowiązująca metoda [2].

### MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Produkty badane: olej sojowy z Zakładów Przemysłu Tłuszczowego – Warszawa, skrobia ziemniaczana rynkowa, Kazeina – BDH Anglia, ich mieszaniny przygotowane przez zmieszanie składników wagowo: skrobia – 44%, kazeina – 24%, olej – 32% suchej masy, potrawy przeznaczone do bezpośredniego spożycia (chleb, masło, sery, wędliny), następnie homogenat z 4 posiłków przeznaczonych na obiad w stołówce studenckiej o zdefiniowanym składzie i deklarowany jadłospisem wartości kalorycznej. Homogenat dań obiadowych użyto jako materiał porównawczy w oznaczeniach kaloryczności dwiema metodami: niepublikowanej mikrometody, opracowanej w Zakładzie Bromatologii AM w Warszawie z nieco zmodyfikowaną metodą *Rozentala*.

W pierwszym etapie badań wykonano utlenienie składników żywności (białko, tłuszcz, skrobia) za pomocą kwasu chromowego. Następnie poddano utlenieniu mieszaninę tych składników, homogenat dań obiadowych, wreszcie mieszaniny tych składników energetycznych w proporcjach zawartych w badanym homogenacie dań obiadowych. Do analizy pobierano równolegle po 6–9 próbek, dla homogenatu obiadowego – 20 próbek (Tabela I i II).

Tabela I. Współczynniki korekcyjne składników żywności i homogenatu  
Correction coefficients for food components and homogenate

Próba	Rodzaj badanej próbki	Liczba próbek	Współczynnik korekcyjny (x)
1	Skrobia ziemniaczana bezwodna	9	0.615 ± 0.002
2	Kazeina bezwodna	9	0.570 ± 0.011
3	Olej sojowy	9	0.596 ± 0.021
4	Mieszanina skrobi, kazeiny, oleju i wody w proporcjach: 53.45 : 28.21 : 10.70 : 7.64 %	6	0.555 ± 0.006
5	Mieszanina skrobi, kazeiny, oleju i wody w proporcjach: 9 : 5 : 6.5 : 7.95 %	6	0.599 ± 0.030
6	Homogenat chleba, masła, sera i wędliny; skład: białko, tłuszcz, węglowodany, woda w proporcjach: 4.74 : 6.66 : 9.065 : 79.55 %	6	0.595 ± 0.068

Średni współczynnik korekcyjny = 0.585 ± 0.023

Tabela II. Układy reakcyjne w procesie utlenienia homogenatu kwasem chromowym  
Reaction systems in the course of homogenate oxidation with chromic acid

Metoda	Materiał badany	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	st. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	woda
Mikrometoda (met. I)	1 g	5 g	100 cm <sup>3</sup>	7 cm <sup>3</sup>
Metoda według <i>Rozentala</i> (met. II)	15 g	25 g	100 cm <sup>3</sup>	50 cm <sup>3</sup>

Wartość kaloryczną próbek poszczególnych składników i ich mieszanin obliczono mnożąc ich masę przez średnie równoważniki energetyczne *Atwatera* (1 g tłuszczu odpowiada 9 kcal = 37,4 kJ, 1 g białka i 1 g węglowodanów – 4 kcal = 16,8 kJ). Wartość kaloryczną homogenatu ustalono metodą klasyczną – oznaczając zawartość białka metodą *Kjeidahl* ( $N \times 6,25$ ), tłuszczu – metodą ekstrakcyjno-wagową *Schmida-Bądryńskiego*, zawartość wody – przez suszenie próbki w ciągu 1 godziny, węglowodany z różnicy (masa minus białko, tłuszcz, woda i popiół).

Oznaczenie kaloryczności metodą spalania z kwasem chromowym według metody opracowanej w Zakładzie Bromatologii i dla porównania według metody *Rozentala* [1, 4].

## WYKONANIE OZNACZENIA

W naczynku wagowym odważono około 1 g jednorodnej średniej próbki laboratoryjnej z dokładnością do 0,0001 g. Naczynko z odważką umieszczono w wysokiej zlewce o poj. 500 cm<sup>3</sup>, do której uprzednio odważono z dokładnością do 0,0001 g około 5 g krystalicznego K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, cz.d.a. i dodano 7 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Po wymieszaniu zawartości zlewki wprowadza się ostrożnie niewielkimi porcjami po 2–3 cm<sup>3</sup> – 100 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu siarkowego. Po wlaniu całego kwasu siarkowego zlewkę przykrywa się szkiełkiem zegarkowym i pozostawia na okres 1 godziny. Co kilka minut wstrząsa się ostrożnie zawartość zlewki. Po utlenieniu substancji, zawartość zlewki przenosi się ilościowo do kolbki miarowej o poj. 250 cm<sup>3</sup> z 30 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. W toku uzupełniania kolbki wodą do kreski, wielokrotnie chłodzi się naczynie w strumieniu zimnej wody.

Z tak przygotowanego roztworu podstawowego pobiera się pipetą 2 cm<sup>3</sup> płynu do kolbki stożkowej o poj. 200–250 cm<sup>3</sup>, dodaje się 10 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i ok. 1,5 g jodku potasowego, korkuje i odstawia na okres 5 min w ciemnym miejscu. Po tym czasie do kolbki dodaje się około 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, miesza, a wydzielony jod miareczkuje się 0,1 M roztworem tiosiarczanu sodowego tak długo, aż roztwór będzie jeszcze brunatnawo zabarwiony. Następnie dodaje się 2 cm<sup>3</sup> 1%-owego roztworu skrobi i ponownie miareczkuje się do przejścia barwy granatowej roztworu do jasnozielonej.

Osobno w próbce zerowej ustala się rzeczywistą masę K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, biorącego udział w reakcji utleniania. W tym celu odważa się z dokładnością do 0,0001 g ok. 5 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, i postępuje się dalej w sposób opisany powyżej, nie dając materiału badanego.

## WYNIKI

Wyznaczenie współczynnika korekcyjnego w obliczeniach kaloryczności.

Współczynnik korekcyjny w procesie spalania kwasem chromowym ustalono na podstawie wzoru:

$$x = \frac{y}{z} \quad (1)$$

gdzie: x – szukany współczynnik, y – kaloryczność odważki, ustalona metodą klasyczną w kcal, z – ilość K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> zużyta do utlenienia odważki w gramach.

Przy obliczeniu wartości kalorycznej białek, tłuszczów i węglowodanów stosowano współczynniki *Atwatera* [3] odpowiednio: 4, 9, 4 kcal/g. Równoległe te same próbki spalono kwasem chromowym. Porównanie wartości energetycznej każdej próbki wyznaczonej metodą klasyczną z ilością dwuchromianu potasowego zużytego do utlenienia substancji pozwoliło ustalić średnie współczynniki korekcyjne w oparciu o wzór (1). Otrzymane wyniki zebrano w tabeli 1.

STATYSTYCZNA OCENA WYNIKÓW KALORYCZNOŚCI  
OTRZYMANÝCH WYŻEJ WYMIENIONĄ MIKROMETODĄ I WEDŁUG ROZENTALA

W badaniach porównawczych użyto homogenatu otrzymanego z 4 posiłków przeznaczonych na obiad w stołówce studenckiej. Wykonano po 20 równoległych oznaczeń wartości kalorycznej homogenatu mikrometodą (omówioną w niniejszej pracy) oraz metodą według *Rozental* [4, 5]. W obliczeniach kaloryczności wykorzystano ustalony wyżej współczynnik korekcyjny 0,585 zamiast 0,566 [2]. Spalania homogenatu za pomocą dwuchromianu potasowego w środowisku stężonego kwasu siarkowego i wody dokonano dwiema metodami, które różnią się proporcją odczynników reakcyjnych w stosunku do wielkości analizowanej badanej (tabela II).

Równoległe badania obiema metodami miały na celu porównanie ich pod względem przydatności analitycznej dla każdego przeciętnego laboratorium kontrolnego. Wartość kaloryczną ( $k$ ) 100 g badanego homogenatu w kcal, obliczono według wzoru:

$$k = \frac{y \cdot 100}{d} \cdot 0,585 \quad (2)$$

gdzie:  $y$  – ilość  $K_2Cr_2O_7$  zużytego do utlenienia próbki (g),  $d$  – odważka próbki (g), 0,585 – mnożnik ustalony doświadczalnie według wzoru (1). Jest to średni współczynnik korekcyjny w odniesieniu do metody klasycznej z uwzględnieniem współczynników energetycznych *Atwater*. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli III.

Tabela III. Kaloryczność dania obiadowego (homogenat)  
Caloric value of dinner meal (homogenate)

Odważka homogenatu (g)	liczba prób (n)	Zużycie $K_2Cr_2O_7$ (g)	Wartość kaloryczna (kcal/100 g)	Parametry statystyczne
Mikrometoda (metoda I)				
0.9719 – 1.0359 $\bar{d} = 0.9983$	20	1.5220 – 1.6743 $\bar{y} = 1.6743$	94.09 – 95.60 $\bar{k} = 94.75$	$\bar{x} = 94.75$ kcal/100 g $S^2 = 0.718$ $S_{\bar{x}} = 0.190$ $W_z = 0.89 \%$
Metoda według <i>Rozental</i> (metoda II)				
14.9541 – 15.0169 $\bar{d} = 14.5941$	20	23.6879 – 24.1544 $\bar{y} = 23.9541$	92.25 – 94.30 $\bar{k} = 93.46$	$\bar{x} = 93.46$ kcal/100 g $S^2 = 0.495$ $S_{\bar{x}} = 0.157$ $W_z = 0.75 \%$

$d, y, i k$  – wyrazy wzoru (2)

W ocenie statystycznej otrzymanych wyników posłużono się następującymi parametrami statystycznymi [6]: średnią arytmetyczną zbiorowości próbnej [ $\bar{x}$ ] wariancją zbiorowości próbnej [ $S^2$ ], odchyleniem standardowym zbiorowości próbnej [ $S$ ], odchyleniem standardowym arytmetycznej [ $S_{\bar{x}}$ ], przedziałem ufności średniej arytmetycznej [ $k = \bar{x} \mp t \cdot S_{\bar{x}}$ ], współczynnikiem zmienności [ $W_z = S \cdot 100/\bar{x} \%$ ].

Celem porównania obu metod jest ustalenie, czy wyniki obu populacji (metoda I i II) należą do tej samej zbiorowości generalnej. Wykorzystuje się tutaj wzór na empiryczną wartość  $t_{emp}$ :

$$t_{emp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}} \cdot \sqrt{n} \quad (3)$$

Dla  $t = 2,093$  (wartość tabelaryczna) przy założonym prawdopodobieństwie 0,95 i przy liczbie stopni swobody  $V = 19$ , otrzymano empiryczną wartość  $t_{emp}$ :

$$t_{emp} = \frac{94,75 - 93,46}{\sqrt{0,718 + 0,495}} \cdot \sqrt{20} = 5.24 \quad (3)$$

Ponieważ wartość tablicowa  $t < t_{emp}$ , więc obie populacje wyników (met. I i II) nie należą do tej samej zbiorowości generalnej.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W serii oznaczeń poszczególnych składników energetycznych (węglowodany, tłuszcze, białko) otrzymano różne współczynniki korekcyjne: od niskiej wartości dla kazeiny (0,570) i oleju sojowego (0,596) do podwyższonej wartości wynoszącej 0,615 przy spalaniu skrobi (tab. I). Należy przypuszczać, iż ten ostatni współczynnik, wynikający z mniejszego zużycia  $K_2Cr_2O_7$  w procesie utleniania skrobi, powstał wskutek częściowego zwęglenia substancji kwasem siarkowym zanim nastąpił właściwy proces utleniania w reakcji z kwasem chromowym. Białko i olej nie ulegają zwęgleniu, utleniając się wolniej kwasem chromowym po uprzedniej hydrolizie. Stąd zużycie dwuchromianu w końcowym bilansie procesu utleniania jest większa niż dla skrobi.

W procesie utleniania mieszanin trzech zasadniczych składników energetycznych, występujących w różnych proporcjach otrzymano współczynniki korekcyjne 0,555 i 0,599 (tab. I, poz. 4 i 5). Mieszanina składników z poz. 5 na 100 % suchej masy zawierała 32% oleju, zaś mieszanina z poz. 4 – tylko 10%. Widać z tego, że wartość współczynnika rośnie wraz ze stężeniem tłuszczu w badanym materiale. Może to również wynikać z faktu, że te same składniki inaczej reagują z czynnikami utleniającymi w żywności naturalnej niż w mieszaninach (zmieszane fazowo). Niemniej obliczenia wykazały, że średnia wartość współczynnika korekcyjnego wynosząca 0,585 powtarza się niezależnie od postaci materiału badanego: dla homogenatu, pojedynczych składników energetycznych bądź ich mieszanin (poz. 4, 5, 6 tab. I). Jest zatem wyższa od wartości zaproponowanej przez *Rozentala* (0,566) [2,1].

W drugiej części pracy zastosowany współczynnik korekcyjny 0,585 otrzymany analitycznie (mikrometoda) i metodą klasyczną oznaczania kaloryczności dań obiadowych sprawdził się w pełni, bowiem analitycznie ustalona wartość kaloryczna dania obiadowego wynosząca  $94,75 \pm 0,398$  kcal/100 g była zbliżona do wartości deklarowanej przez jadłospis (96,8 kcal/100 g), czyli w przedziale dopuszczalnego błędu analitycznego dla tego typu badań.

Porównanie dwu metod wykazało, że różnica między wynikami otrzymanymi mikrometodą i metodą według *Rozental* jest statystycznie istotna, tzn. że wyniki uzyskane tymi metodami nie należą do tej samej zbiorowości generalnej:  $t < t_{emp}$ . Różnica ta może być spowodowana tym, że metoda według *Rozental* [2] jest obciążona błędem systematycznym. Źródłem tego błędu – jak się wydaje – jest niski potencjał utleniający układu w drugim etapie utlenienia homogenatu, spowodowany niedostateczną ilością dwuchromianu potasowego. Przy tej nawet niskiej kaloryczności homogenatu w mieszaninie zawierającej 15 g substancji spalanej i 25 g  $K_2Cr_2O_7$ , w końcowym etapie spalania pozostaje zaledwie około 1 g dwuchromianu potasowego w całej objętości mieszaniny reakcyjnej. Natomiast w procesie spalania tego samego homogenatu w składzie określonym mikrometodą, nadmiar  $K_2Cr_2O_7$  po zakończeniu reakcji utleniania wynosi jeszcze około 3,5 g w małej objętości układu, zawierającego w początkowej fazie spalania 1 g homogenatu.

Przy wartości kalorycznej badanej próby, wynoszącej ponad 100 kcal/100 g, analiza według metody *Rozental* jest niewykonalna, ponieważ w reakcji utlenienia powstaje niedobór dwuchromianu potasowego. W związku z tym nie daje się zastosować tej metody w oznaczaniu wysokokalorycznych posiłków. Natomiast zmodyfikowana i sprawdzona metoda (mikrometoda) może być stosowana z powodzeniem do oznaczania kaloryczności posiłków o wartości nawet do 200 kcal/100g, co wynika z założonego metodą nadmiaru  $K_2Cr_2O_7$  wobec masy próbki badanej.

#### WNIOSKI

1. Opracowana mikrometoda oznaczania kaloryczności żywności charakteryzuje się: zadowalającą precyzją, gwarancją wykonalności również w stosunku do posiłków o wysokiej kaloryczności, niskim zużyciem odczynników w porównaniu z metodą według *Rozental*, co wiąże się ze znacznym obniżeniem kosztów analizy i zwiększeniem szybkości wykonania.

2. Zmieniony współczynnik korekcyjny 0,585 zamiast 0,566 wynika z optymalizacji procesu utleniania składników energetycznych żywności uwarunkowanego najkorzystniejszymi proporcjami dwuchromianu potasowego, kwasu siarkowego, wody i spalanej próbki żywności.

3. W nowym układzie reakcyjnym mikrometody analiza każdej dowolnej próbki badanej żywności jest wykonalna

J. Woźniak, R. Olędzka, B. Kolasa, M. Helnik

#### MICROMETHOD USING CHROMIC ACID FOR THE DETERMINATION OF THE CALORIC VALUE OF FOOD

#### Summary

Rozental's method using chromic acid for the determination of the caloric value of meals has failed to find practical application, on account of applying faulty amounts of the oxidizing reagents and of the tested sample, as well as large volumes of liquids and reaction solutions. In this connection,

we thoroughly verified this method, introducing another value of the correction coefficient. By changing the proportions of the reaction components, we developed a modified method referred to as micromethod for caloric value determination using chromic acid. Application of minimal amounts of reagents and tested sample allowed for analysing food samples with caloric value up to 200 kcal/100 g as well as for cutting down the duration of the analysis.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Helnik M.*: Próba weryfikacji metody oznaczania wartości kalorycznej. (Praca magisterska), Zakład Bromatologii AM w Warszawie, 1988. – 2. *Krauze S., Bożyk Z., Piekarski L.*: Podręcznik laboratoryjny analityka żywnościowego, PZWL, Warszawa 1966. – 3. *Młodecki H., Piekarski L.*: Zagadnienia zdrowotne żywności. PZWL, Warszawa 1987. – 4. *Rozental L.*: Zastosowanie utleniania kwasem chromowym w praktyce laboratoriów żywnościowych. Rocz. PZH 1959, 10, 361. – 5. *Rozental L.*: Nowa szybka metoda oznaczania wartości kalorycznej żywności. Rocz. PZH 1957, 8, 27. – 6. *Szysko E.*: Instrumentalne metody analityczne. PZWL, Warszawa 1971.

Dn. 1989.11.10

02-907 Warszawa, ul. Banacha 1