



Ćwiczenie 1

Roztwarczanie materiału roślinnego do określenia zawartości magnezu w materiale roślinnym metodą spektrofotometrii UV-Vis

1.1. Wprowadzenie

Próbki biologiczne, do których należą materiały roślinne, stanowią zróżnicowaną grupę substancji chemicznych o bardzo różnorodnych właściwościach. Są to najczęściej układy heterogeniczne charakteryzujące się ogromną zmiennością składu w czasie, zależną w dużej mierze od wpływu otoczenia (środowiska). Tylko nieliczne techniki analityczne umożliwiają badanie makro- i mikroskładników w materiałach biologicznych bez uprzedniego ich przygotowania. Metody analizy wymagają przeważnie rozkładu (mineralizacji, roztworzenia) badanego materiału i przygotowania próbki w postaci roztworu. Roztwarczanie definiowane jest zwykle jako prosty proces rozpuszczania substancji w odpowiedniej cieczy, w niskiej temperaturze z udziałem lub bez reakcji chemicznej, podczas gdy mineralizacja oznacza bardziej złożony proces, dokonywany zwykle w wyższej temperaturze/lub pod zwiększonym ciśnieniem, przy pomocy odczynników i specjalnej aparatury. Różne techniki oznaczania pierwiastków wymagają innego stopnia zniszczenia matrycy organicznej. Gdy określa się całkowitą zawartość pierwiastka, należy wybrać procedurę całkowitego roztwarzania, z uwzględnieniem takich czynników jak metoda oznaczania, skład matrycy, możliwe interferencje, ryzyko strat lub zanieczyszczeń. Do najbardziej popularnych metod roztwarzania próbek biologicznych należą: mineralizacja z użyciem kwasów (na mokro) lub spopielenie (mineralizacja sucha).

1.1.1. Techniki rozkładu próbek na sucho

Do podstawowych technik mineralizacji na sucho należą:

- **Spopielenie** - polega ono na powolnym rozkładzie materii organicznej w piecu w temperaturze pomiędzy 400 - 600 °C. W trakcie rozkładu powstaje popiół, złożony

głównie z węglanów i tlenków, który następnie rozтворя się w odpowiednim kwasie lub mieszaninie kwasów.

- **Mineralizacja niskotemperaturowa w plazmie tlenowej** - strumień bardzo czystego tlenu wzbudzonego w polu generatora wysokiej częstotliwości (ponad 27 MHz) czyli tzw. strumień plazmy tlenowej o temperaturze 80-200° C kieruje się na analizowaną próbkę powodując jej spalanie (utlenienie). Zamknięty układ i brak konieczności stosowania dodatkowych odczynników ogranicza możliwość zanieczyszczania próbki. Wadą metody jest długi czas przebiegu procesu (od kilku do kilkunastu godzin).
- **Mineralizacja próbki w bombie tlenowej**- próbkę umieszcza się w kwarcowej łódeczce w zamkniętym hermetycznie naczyniu ciśnieniowym, tzw. bombie tlenowej. Naczynie napełnia się tlenem pod ciśnieniem 0,2 do 6,0 MPa i elektrycznie inicjuje zapłon. Stosuje się ją do rozkładu próbek biologicznych i żywności.
- **Rozkład próbki w butli Schönigera** - próbkę poddaje się spalaniu w atmosferze tlenu pod ciśnieniem atmosferycznym w kolbie szklanej lub kwarcowej. Powstałe gazowe produkty rozkładu absorbowane są w roztworze pochłaniającym (kwas siarkowy(VI) lub nadtlenek wodoru). Technikę tę stosuje się często do oznaczania pierwiastków głównych w materiale roślinnym.
- **Mineralizacja próbki w układzie dynamicznym** – stosowana najczęściej w organicznej analizie elementarnej. Polega na umieszczeniu próbki w łódeczce znajdującej się w rurze kwarcowej ogrzewanej do temp. 800-1000°C, przez którą przepływa najczęściej strumień czystego tlenu. Gazowe produkty rozpadu materii organicznej zatrzymywane są przez absorbenty wypełnione odpowiednio dobranymi substancjami. Udział poszczególnych pierwiastków (C, H, N, O, S) w próbce wyznacza się na podstawie przyrostu masy odpowiednich absorbentów.
- **Stapianie** - polega na stapianiu sproszkowanej próbki z topnikami takimi jak węglany alkaliczne, boraks, w tyglu grafitowym umieszczonym w piecu. Po ochłodzeniu otrzymany stop rozpuszcza się w kwasach. Metoda stosowana jest przeważnie dla próbek trudno poddających się rozтворяniu w bezpośredniej reakcji z kwasami. W analityce środowiska metodę tę wykorzystuje się sporadycznie z powodu wysokiego poziomu tła (duże ilości topnika oraz kontakt w podwyższonej temperaturze z materiałem naczynia) oraz strat lotnych składników próbki.

1.1.2. Techniki mineralizacji na mokro

Rozkład matrycy odbywa się za pomocą jednego lub kilku mocnych kwasów mineralnych z dodatkiem lub bez innych związków o właściwościach utleniających. Utleniaczami są zazwyczaj HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 oraz H_2O_2 . Rozkład próbki odbywa się pod wpływem tlenu uwalnianego z tych kwasów w podwyższonej temperaturze. Do podstawowych technik rozkładu próbek na mokro zaliczamy:

- **Rozpuszczanie w kwasach na gorąco** – do destrukcji materii organicznej stosuje się najczęściej kwas azotowy(V).
- **Mineralizacja z wykorzystaniem ultradźwięków** - naczynko reakcyjne z próbką i dodaną mieszaniną utleniającą umieszcza się w łaźni ultradźwiękowej. Energia ultradźwiękowa znacznie przyspiesza proces rozkładu. Technika ta stosowana jest do roztwarzania stałych próbek środowiskowych.
- **Mineralizacja za pomocą promieniowania UV** - polega na naświetlaniu mineralizowanego roztworu w kwarcowym naczyniu reakcyjnym nisko- lub wysokociśnieniową lampą ultrafioletową. Technika ta stosowana jest do mineralizacji próbek wód, ścieków, płynów ustrojowych czy napojów.
- **Mineralizacja ciśnieniowa z wykorzystaniem energii mikrofalowej** - jest to najczęściej połączenie trzech technik mineralizacji: mineralizacji z zastosowaniem kwasu(ów) i innych substancji mineralizujących, w układzie zamkniętym-ciśnieniowym w tzw. „bombie teflonowej” oraz z zastosowaniem energii mikrofalowej. Podczas gdy rozkład próbki przez trawienie w kwasach, bądź też stapianie z solami metali alkalicznych jest oparty na zastosowaniu energii chemicznej i energii cieplnej, mineralizacja mikrofalowa zachodzi w wyniku działania promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości 2450 MHz, co powoduje wytworzenie ciepła wzmagającego reakcje chemiczne prowadzące do rozkładu próbki.

1.1.3. Magnez jako jeden z najważniejszych biopierwiastków

Magnez został odkryty w 1775 roku przez Josepha Blacka. Jest on jednym z najważniejszych biopierwiastków, niezbędnym do przeprowadzania ponad stu reakcji biochemicznych, w których działa jako aktywator enzymów. Pierwiastek ten bierze udział w procesie fotosyntezy, w konstrukcji błon komórkowych. Odpowiada za wydolność układu nerwowego, kostnego, pokarmowego czy też krążenia. Hamuje procesy starzenia oraz miażdżycę. 60 % magnezu znajduje się w kościach, 39 % w tkankach mięśniowych, natomiast 1 % występuje w płynach

międzykomórkowych. Niedobór magnezu prowadzi do nadpobudliwości psychoruchowej, zaburzeń koncentracji, nadmiernej nerwowości, skurczów mięśni, drżenia powiek, bezsenności oraz osteoporozy.

Pomimo, iż znaczne ilości magnezu występują w produktach zbożowych (nasionach, mąkach z pełnego przemiału, soi, kaszach nie oczyszczonych), orzechach, suszonych i świeżych owocach, pierwiastek ten słabo wchłania się z pożywienia – zaledwie 15 - 40%. Jest to związane z obecnością niektórych związków, które tworzą kompleksy z magnezem i uniemożliwiają łączenie aminokwasów z jonami magnezowymi. Takimi związkami są np.: np. kwas fitynowy, szczawiowy (jarzyny i otręby zbóż), fosforowy (ryby) oraz wolne nasycone kwasy tłuszczowe (tłuste mięsa i tłusty nabiał).

1.2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest przygotowanie próbki materiału roślinnego do oznaczenia zawartości magnezu metodą spektrofotometrii UV-Vis.

1.3. Wykonanie ćwiczenia

1.3.1. Roztwarzanie materiału roślinnego (mineralizacja na mokro)

Odważyć nie więcej niż 0,2 g liści borówki brusznicy, przenieść ilościowo do kolby okrągłodennej poj. 250 ml i dodać 10 ml stężonego kwasu azotowego(V). Kolbę umieścić w płaszczu grzejnym, połączyć z chłodnicą zwrotną, włączyć zasilanie wody chłodzącej i rozpocząć ogrzewanie do momentu całkowitego rozтворzenia próbki i zaniku wydzielania się tlenków azotu. W miarę potrzeby dodać kilka ml stężonego roztworu HNO_3 , lecz nie ogrzewać dłużej niż 2 godziny. Po ochłodzeniu roztworu wprowadzić 10 ml 30% nadtlenek wodoru i kontynuować ogrzewanie do całkowitego odbarwienia roztworu (w razie konieczności wprowadzić dodatkową 5 ml porcję wody utlenionej). Wyłączyć ogrzewanie płaszcza grzejnego i poczekać do ostudzenia roztworu. Zawartość kolby przenieść ilościowo przez sącdek do kolby miarowej poj. 50 ml i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Tak sporządzony roztwór roztworzonego materiału roślinnego może zostać wykorzystany do oznaczania zawartości magnezu w materiale roślinnym metodą spektrofotometrii UV-Vis.

1.3.2 Oznaczenie zawartości magnezu w materiale roślinnym metodą spektrofotometrii UV-Vis

a. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Do 6 kolb miarowych o pojemności 50 mL wprowadzić kolejno: 0; 50; 100; 150; 200 i 250 μl

wzorcowego roztworu soli magnezu o stężeniu 1000 ppm. Następnie do każdej kolby dodać 5,0 mL roztworu żółci tytanowej, 1,0 mL 1 % roztworu alkoholu poliwinylowego i 25 mL wody. Wymieszać, a następnie mieszając dodawać kroplami do każdej kolby 5,0 mL 1,0 M roztworu NaOH. Uzupełnić kolby wodą do kreski i dokładnie wymieszać. Po upływie 15 min. zmierzyć absorbancję roztworów przy $\lambda=545$ nm.

b. Oznaczanie zawartości magnezu w badanej próbce

Pobrać 10 mL roztworu uzyskanego po roztworzeniu próbki i wprowadzić do kolby o pojemności 50,0 mL. Następnie do kolby dodać 5,0 mL roztworu żółci tytanowej, 1,0 mL 1 % roztworu alkoholu poliwinylowego i 10 mL wody. Wymieszać, a następnie mieszając dodawać kroplami do kolby 6,0 M roztwór NaOH do zmiany zabarwienia oraz 5,0 mL 1,0 M roztworu NaOH. Uzupełnić kolby wodą do kreski i dokładnie wymieszać. Po upływie 15 min. zmierzyć absorbancję roztworów przy $\lambda=545$ nm.

1.4. Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

Roztworzenie materiału roślinnego (mineralizacja na mokro)

- Zestaw do mineralizacji na mokro – płaszcz grzejny, regulator napięcia, chłodnica zwrotna, kolba okrągłodenna poj. 250 ml,
- Waga analityczna 1 szt.,
- Wysuszone liście borówki brusznicy,
- Stężony kwas azotowy(V),
- 30% nadtlenek wodoru (w butelce zakręcanej 200 ml)
- kolba miarowa poj. 50 ml z korkiem,
- cylindry miarowe poj. 10 cm³ - 2 szt.,
- lejek szklany mały 2 szt, lejek szklany średni – 1 szt.,
- łyżeczka metalowa 1 szt.,
- naczynko wagowe 1 szt.,
- bagietka szklana 1 szt.,
- sączi.

Oznaczenie zawartości magnezu w materiale roślinnym metodą spektrofotometrii UV-Vis

- kolba miarowa poj. 50 mL 7 szt.,
- 100 mL wodnego roztworu wzorcowego magnezu o stężeniu 1000 ppm (kolba stożkowa),
- 1000 mL wodnego roztworu żółceni tytanowej o stężeniu 0,05%,
- 1000 mL wodnego roztworu alkoholu poliwinylowego o stężeniu 1%,
- 500 mL wodnego roztworu 1M NaOH,
- 100 mL wodnego roztworu 6 M NaOH,
- strzykawka 250 μ L 1 szt.,
- pipeta 1 mL 1 szt.,
- pipeta 2 mL 7 szt.,
- pipeta 5 mL 2 szt.,
- cylinder 10 mL 2 szt.,
- pipeta Pasteura 5 szt.,
- cenki

Opracowanie wyników

1. W sprawozdaniu należy dokładnie opisać część doświadczalną.
2. Metodą krzywej kalibracyjnej obliczyć zawartość magnezu w badanej próbce.
3. Skomentować uzyskane wyniki.

Literatura

1. Kabata-Pendias A., Pendias H. 1999. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN, Warszawa
2. Piotr Stepnowski, Elżbieta Synak, Beata Szafranek, Zbigniew Kaczyński. 2010. *Monitoring i analityka zanieczyszczeń w środowisku*. Uniwersytet Gdański, Gdańsk.
3. <http://www.ptmag.pl>