

Oznaczenie zawartości metali ciężkich w preparatach kolagenowych przeznaczonych do otoczkowania nasion rzepaku

Determination of heavy metal content in collagen preparations for rape seed coating

Magdalena Lasoń – Rydel¹, Katarzyna Sieczyńska^{1*}, Dorota Gendaszewska¹

¹Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Przemysłu Skórzanego

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki oznaczenia zawartości wybranych metali ciężkich w pięciu preparatach kolagenowych metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS). Śladowe ilości arsenu w dwóch pierwszych próbkach oraz brak innych toksycznych metali ciężkich, tj. chromu, kadmu, ołowiu i rtęci we wszystkich badanych próbkach kolagenowych pozwala na bezpieczne ich stosowanie w rolnictwie. Obecność cynku i miedzi w tych preparatach może przyczynić się do poprawy kiełkowania otoczkowanych preparatami kolagenowymi nasion rzepaku.

Abstract

The paper presents the results of determining the content of selected heavy metals in five collagen preparations by atomic absorption spectrometry (AAS). Trace amounts of arsenic in the first two samples and the absence of other toxic heavy metals, i.e. chromium, cadmium, lead and mercury in all collagen samples tested allow their safe use in agriculture. The presence of zinc and copper in these preparations may contribute to the improvement of germination of rapeseed coated with collagen preparations.

Słowa kluczowe: kolagen, metale ciężkie, atomowa spektrometria absorpcyjna, otoczkowanie nasion rzepaku.

Keywords: collagen, heavy metals, atomic absorption spectroscopy, rape seed coating.

1. Wstęp

Preparaty kolagenowe, jako produkty uboczne procesów technologii wyprawy skór znajdują obecnie szerokie zastosowanie w produkcji kosmetyków, farmaceutyków, ale także w rolnictwie [1]. Jednym z przykładów zastosowania tego typu preparatów w rolnictwie jest stosowanie produktów na bazie kolagenu do otoczkowania nasion roślin uprawnych, dzięki czemu rośliny wykazują zwiększoną odporność na suszę i wzrost sadzonek [2, 3]. Ze względu na zdrowie

* autor korespondencyjny: mgr Katarzyna Sieczyńska - k.sieczynska@ips.lodz.pl

człowieka, zwierząt i występujących w środowisku innych organizmów żywych, ważne jest, aby zastosowane preparaty były wolne od toksycznych metali.

Metale ciężkie mogą być przyczynami alergii skórnych, dróg oddechowych czy pokarmowych, ale nierzadko też w dłuższym okresie czasu wywołują poważne choroby [4]. Pierwiastki, takie jak: arsen (As), cynk (Zn), kadm (Cd), chrom (Cr), miedź (Cu), rtęć (Hg), ołów (Pb), cyna (Sn), kobalt (Co), nikiel (Ni), mangan (Mn), selen (Se), żelazo (Fe) i srebro (Ag) mogą wywoływać przewlekłe stany chorobowe, które występują przez określony czas w formie utajonej, aby w efekcie wywołać mutacje lub uszkodzenia komórek różnych układów funkcjonalnych człowieka [5]. Dodatkowo, niektóre z metali, np. As, Zn, Cd, Cu, i Hg mogą wywołać ostre zatrucia. Ołów, rtęć i kadm należą do najbardziej toksycznych metali ciężkich. Ołów działa toksycznie na wszystkie żywe organizmy, przez co uznaje się go za jedną z najgroźniejszych trucizn [6]. Również rtęć jest wysoce niebezpiecznym pierwiastkiem. Bezpieczne stężenie rtęci jest trudne do określenia, z uwagi na różne formy toksyczne występowania tego pierwiastka w środowisku [7]. Toksyczność kadmu wynika z wysokiego powinowactwa tego pierwiastka do biologicznie istotnych grup chemicznych (grupy aminowe, hydroksylowe, tiolowe itd.) [8]. Jak podaje literatura, istnieją zależności między stężeniami metali ciężkich w spożywanych pokarmach oraz wdychanym powietrzu, a umieralnością na nowotwory [5].

Dlatego należy zwrócić szczególną uwagę, czy metale ciężkie nie znajdują się w preparatach kolagenowych, które będą stanowiły integralną część rośliny wykorzystywanej później do produkcji żywności.

Celem niniejszej pracy było oznaczenie stężeń wybranych metali ciężkich w badanych preparatach kolagenowych. Wykorzystano metodę atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS). Zadanie to realizowano w ramach projektu „Wykorzystanie hydrolizatów kolagenowych do przygotowania otoczek nasion rzepaku zwiększających odporność na suszę” – COLL-RAPE. Projekt ten zakłada wybór najlepszej metody ekstrakcji kolagenu, przydatnej w rolnictwie

do modyfikacji nasion. Rezultatem projektu będzie wykorzystanie preparatów kolagenowych do otoczkowania nasion rzepaku.

2. Materiały i metody

2.1. Preparaty kolagenowe

Analizie poddano pięć preparatów kolagenowych. Próbki – P1, P2, P3, P4, P5 otrzymane zostały metodą standardowej ekstrakcji kolagenu z surowych obrzynek odpadowej skóry cielęcej. Preparaty zawierają niezhydrolizowany kolagen o masie cząsteczkowej około 340000 Da.

Tabela 1. Charakterystyka preparatów kolagenowych

Lp.	Nazwa próbki	Kod	Konsystencja	Barwa	Zawartość popiołu [%]	pH	Zawartość hydroksyproliny [µg/ml]
1.	Próbka 1	P1	proszek	żółta	5,40	5,27	1735
2.	Próbka 2	P2	proszek	brązowa	5,29	4,82	1810
3.	Próbka 3	P3	żel	szara	1,81	7,46	823
4.	Próbka 4	P4	żel	beżowa	1,98	7,07	797
5.	Próbka 5	P5	żel	ciemnoszara	1,16	7,89	789

Próbki do badań otrzymano poprzez oczyszczanie różnymi metodami filtracji oraz sączenie przez sączki o różnej grubości. W Tabeli 1 przedstawiono charakterystykę poszczególnych preparatów.

2. 2. Przygotowanie próbek do badań

Próbki do badań przechowywano w lodówce w stałych warunkach temperatury (5-10°C). W dniu badania, próbki preparatów kolagenowych wyjęto z lodówki i umieszczono na szalkach Petriego. Próbki pozostawiono w temperaturze pokojowej do całkowitego wysuszenia. Po 10 dniach z każdej szalki pobrano po 0,1 g preparatu, a następnie dodano 7 cm³ 65% kwasu azotowego (V). Następnie próbki pojedynczo umieszczano w teflonowym naczyniu reakcyjnym, które wkładano do dolnej głowicy reaktora mineralizatora Magnum II (Ertec).

Każdą badaną próbkę zmineralizowano do uzyskania klarownego roztworu, co świadczy o pełnej mineralizacji. Proces mineralizacji wykonano w trzech cyklach dla każdej próbki, trwających łącznie 20 minut w temperaturze maksymalnej równej 300°C i pod ciśnieniem maksymalnym wynoszącym 45 barów, przy maksymalnej mocy mikrofal (100%).

W kolejnym etapie przemyto ścianki naczynia wodą i przeniesiono roztwór do kolby miarowej o pojemności 25 cm³. Na koniec wszystkie próbki przesączono przez filtr typu 388 (miękki). Celem sprawdzenia poprawności procesu, wykonano próbę ślepą z zastosowaniem wody destylowanej zamiast próbki badanej. Badania przeprowadzono wg normy PN-EN ISO 17072-2 „Skóra wyprawiona - Chemiczne oznaczanie zawartości metalu - Część 2: Ogólna zawartość metalu” [9]. W przygotowanej próbce oznaczono następujące pierwiastki: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn.

2. 3. Odczynniki chemiczne

W badaniach użyto wzorców (Chem-Lab) analizowanych pierwiastków to jest: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn o początkowym stężeniu 1000 mg/L. Krzywe wzorcowe sporządzono poprzez rozcieńczenia roztworu podstawowego. W celu eliminacji matrycowych efektów interferencyjnych wykorzystano bufor spektralny, tj. 10% azotan (V) lantanu (III) przy analizie Pb oraz Cd. Bufor spektralny to substancja, która reagując z interferentem sprawia, że jego oddziaływanie na analit zmniejsza się lub nawet zanika.

2. 4. Metody badawcze

Oznaczenia stężenia metali ciężkich w badanych próbkach przeprowadzono przy użyciu techniki płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) na aparacie jednowiązkowym Unicam 939. Stężenia poszczególnych metali oznaczano stosując techniki:

1. VGAAS (ang. *Vapour Generation Atomic Absorption Spectrometry*) w tym:

- a) HGAAS (ang. *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*) – absorpcyjną spektrometrię atomową z generowaniem wodorków, służącą do wykrycia zawartości metalu Sb. W metodzie tej do oznaczeń wykorzystuje się tzw. generator wodorków, celem wytworzenia lotnych połączeń metalu z wodorem.
- b) CVAAS (ang. *Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry*) – absorpcyjną spektrometrię atomową z generowaniem zimnych par dla metalu Hg. Technika stosowana tylko do oznaczeń rtęci. Do badań wykorzystuje się również generator wodorków, w którym wytwarzane są wolne atomy rtęci.

2. Płomieniową absorpcyjną spektrometrię atomową FAAS (ang. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) – jest to technika z użyciem atomizera płomieniowego dedykowana dla metali Pb, Cd, Cr, Cu, która przeprowadza próbkę ciekłą w formę aerozolu.

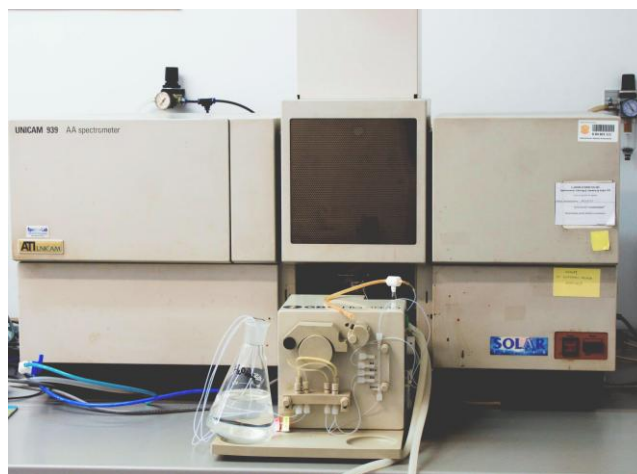
Pomiary wykonano z użyciem lamp z katodą wnękową (HCL, ang. *Hollow Cathode Lamp*), stosując do pomiarów adekwatne do konkretnego pierwiastka lampy. Zastosowano atomizację płomieniową, stosując korekcję tła (lampa deuterowa) dla metali: As, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn z uwagi na zastosowane najbardziej czułych linii analitycznych w zakresie poniżej 400 nm (Tabela 2). Lampa deuterowa (D2) emituje promieniowanie w szerokim zakresie (190 – 400 nm), które nie jest absorbowane przez atomy próbki w sposób znaczący, podlega natomiast rozproszeniu i innym procesom związanym z generacją tła. Dla linii analitycznej Cr (357,9 nm) działanie korekcji tła i jej skuteczność jest mocno ograniczona, dlatego jej nie zastosowano. Rodzaj płomienia, skład mieszaniny gazów i długość fali ulegały zmianie w zależności od oznaczanego pierwiastka (Tabela 2). Do pomiarów wykorzystano palnik o długości 50 mm. Spektrometr absorpcji atomowej przedstawiono

na Rys. 1. Wyznaczono granice oznaczalności metody (Tabela 3).

Tabela 2. Charakterystyka parametrów zastosowanych w technice AAS

Metal	Parametry zastosowane w technice AAS	
	Długość fali [nm]	Rodzaj płomienia-technika
As	193,7	acetylen-powietrze-metoda generacji wodorków
Cd	228,8	acetylen-powietrze-utleniająca
Cr	357,9	acetylen-podtlenek azotu-redukująca
Cu	324,8	acetylen-powietrze-utleniająca
Hg	253,7	bezpłomieniowo-technika zimnych par
Pb	217,0	acetylen-powietrze-utleniająca
Zn	213,9	acetylen-powietrze-utleniająca

Badania przeprowadzono zgodnie z normą [9]. Podaną normę stosuje się do badania metali w następujących próbkach: skórze naturalnej, skórze powlekanej, materiałach włókienniczych i tworzywach. Przed przystąpieniem do prac, metoda badawcza została zoptymalizowana pod względem planowanych oznaczeń.



Rys. 1. Spektrometr absorpcji atomowej Unicam 939 z generatorem wodorków HG3000 (technika 1 i 2).

3. Omówienie i dyskusja wyników

Wyniki pomiarów stężeń metali w badanych próbkach przedstawiono w Tabeli 3. Przy analizie uzyskanych wyników należy wziąć pod uwagę, które z badanych metali są toksyczne, a które niezbędne roślinie do wzrostu. Wśród metali toksycznych znajdują się m.in.: arsen, ołów, rtęć, chrom i kadm [4],

z kolei metale, takie jak: miedź i cynk, w odpowiednim stężeniu pełnią funkcję mikroelementów dla roślin, zwierząt oraz mikroorganizmów [6].

Tabela 3. Wyniki pomiaru stężeń metali w analizowanych preparatach kolagenowych (kolorem niebieskim zaznaczono otrzymane wartości stężeń metali)

Metal	Granica oznaczalności badanych metali [mg/kg]	Stężenie badanych metali [mg/kg _{s.m.}]				
		P1	P2	P3	P4	P5
As	0,005	1,256	1,032	<0,005	<0,005	<0,005
Cd	0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Cr	0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Hg	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Pb	0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Cu	0,02	<0,02	<0,02	17,04	13,13	7,48
Zn	0,05	<0,50	65,97	11,59	13,06	22,42

W przypadku metali silnie toksycznych, w próbce P1 i P2 wykryto śladowe ilości arsenu (P1-1,256 mg/kg_{s.m.}, P2-1,032 mg/kg_{s.m.}). W żadnej z badanych próbek (P1-P5) nie wykryto obecności kadmu, chromu, rtęci oraz ołowiu. Według dyrektywy 2002/32WE wyniki stężeń arsenu nie przekraczają maksymalnych, dopuszczalnych stężeń dla roślin, przeznaczonych na pasze [10]. Dyrektywa ta stanowi, że stosowanie produktów przeznaczonych na pasze, w których zawartość niepożądanych substancji przekracza maksymalne zawartości, w tym dla arsenu (2 mg/kg_{s.m.}), kadmu (1 mg/kg_{s.m.}) i ołowiu (10 mg/kg_{s.m.}) jest niedozwolone. Oznacza to, że nasiona otoczkowane badanymi preparatami mogą być przeznaczone na produkty paszowe. Podobne oznaczenia metali przeprowadzili Łukowski i wsp. (2017) [6], którzy zbadali trawy pastewne pod kątem obecności metali ciężkich tj. Pb, Cd, Cu, Zn i dodatkowo niklu (Ni). W badaniach również wykorzystano metodę atomowej spektroskopii absorpcyjnej płomieniowej.

Po przeprowadzeniu badań okazało się, że zawartość metali ciężkich w badanych trawach pastewnych nie przekraczała krytycznych zawartości metali

w odniesieniu do roślin paszowych, z wyjątkiem siedmiu z trzydziestu trzech próbek traw, w przypadku zawartości ołowiu [6]. Autorzy pracy podkreślają, że przekroczenie krytycznej wartości stężenia ołowiu w roślinie powoduje pogorszenie ilości i jakości plonów [6]. Zatem konieczny jest stały monitoring zawartości tego pierwiastka na każdym etapie produkcji pasz.

Przeprowadzając analizę składników niezbędnych roślinie do wzrostu można przyjąć, że cynk i miedź są jednymi z ważniejszych mikroelementów w uprawie zbóż [7]. Rola miedzi sprowadza się m.in. do stymulacji wzrostu i rozwoju rośliny, zwiększenia zdrowotności łanu czy stymulacji krzewienia [11]. Co więcej, miedź tworzy połączenia kompleksowe z m.in. aminokwasami, czy składnikami błon komórkowych, które biorą udział m.in. w procesach metabolicznych [12]. Natomiast cynk jest odpowiedzialny m.in. za procesy związane z powstawaniem regulatorów wzrostu [6]. Oba te pierwiastki oznaczono w próbce P3, P4 i P5. Stężenie miedzi dla badanych próbek wynosiło: 17,04 mg/kg_{s.m.} (P3), 13,13 mg/kg_{s.m.} (P4), 7,48 mg/kg_{s.m.} (P5). Jak podaje Łukowski i wsp. (2017) [6], średnia optymalna zawartość miedzi w roślinach powinna wynosić od 5 do 20 mg/kg_{s.m.}. Gdy stężenie miedzi w roślinie jest niższe niż 5 mg/kg_{s.m.} obserwuje się niedobory tego pierwiastka [6]. Z kolei stężenie cynku w badanych preparatach kolagenowych wynosiło 11,59 mg/kg_{s.m.} (P3), 13,06 mg/kg_{s.m.} (P4), 22,42 mg/kg_{s.m.} (P5) oraz (65 mg/kg_{s.m.}) (P2). Uzyskane wyniki stężeń cynku mieszczą się (próbki: P3, P4, P5) lub nieco przekraczają (próbka P2) wartości z przedziału zawartości cynku dla traw pastewnych z rejonu Polski, który wynosi od 11,65 do 52,07 mg/kg_{s.m.} oznaczonych przez Łukowskiego i wsp. (2017) [6].

4. Podsumowanie

Śladowe ilości arsenu w próbkach P1 i P2 oraz brak innych toksycznych metali ciężkich tj. chromu, kadmu, ołowiu i rtęci w badanych preparatach pozwala na bezpieczne ich stosowanie w rolnictwie. Obecność cynku i miedzi w preparatach kolagenowych może przyczynić się do poprawy kiełkowania nasion, otoczkowanych tymi substancjami. Tym samym można stwierdzić, że produkowana żywność z tych upraw będzie również wolna od groźnych dla zdrowia zanieczyszczeń metali ciężkich.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu pt. "Wykorzystanie hydrolizatów kolagenów do przygotowania otoczek nasion rzepaku zwiększających odporność na suszę", finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu EUREKA/COLL-RAPE, Łukasiewicz - Instytut Przemysłu Skórzanego.

Literatura

- [1] Li G.Y., Fukunaga S., Takenouchi K., Nakamura F.: *Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials*, International Journal of Cosmetic Science, **27**, 2005, str. 101-106.
- [2] Grzesiak E., Ławińska K., Gendaszewska D., Lasoń-Rydel M.: *Nowy sposób wykorzystania hydrolizatów kolagenu, cz. I*, Przegląd Włókienniczy - Włókno, Odzież, Skóra, **8**, 2018, str. 28-31.
- [3] Ławińska K., Gendaszewska D., Grzesiak E., Jagiełło J., Obraniak A.: *Zagospodarowanie odpadów garbarskich w nasiennictwie*, Przemysł Chemiczny, **96** (11), 2017, str. 2344-2347.
- [4] Jabłońska-Trypuć A., Klewszczewska E.: *Pozytywne i negatywne efekty działania metali w wybranych formach kosmetycznych*, Farmaceutyczny Przegląd Naukowy, **5**, 2008, str. 43-45.
- [5] Ociepa-Kubicka A., Ociepa E.: *Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny i zwierzęta i ludzi*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, **15** (2), 2012, str. 169-180.
- [6] Łukowski, A., Wiater J., Dymko A.: *Bioakumulacja metali ciężkich w trawach pastewnych*, Inżynieria Ekologiczna, **18**, (1), 2017, str. 149-158.
- [7] Kot K., Kosik-Bogacka D., Łanocha-Arendarczyk N., Ciosek Ż.: *Wpływ związków rtęci na organizm człowieka*, Farmacja Współczesna, **9**, 2016, str. 210-216.
- [8] Kaczyńska M., Zajączkowski M., Grzybiak M.: *Toksyczny wpływ kadmu na rośliny i człowieka*, Annales Academiae Medicae Gedanensis, **45**, 2015, str. 65-70.
- [9] PN-EN ISO 17072-2: 2011 „Skóra wyprawiona - Chemiczne oznaczanie zawartości metalu - Część 2: Ogólna zawartość metalu”.

[10] Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1275/2013 z dnia 6 grudnia 2013 r. zmieniające załącznik I do dyrektywy 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do maksymalnych zawartości arsenu, kadmu, ołowiu, azotanów (III), lotnego olejku gorczycznego i szkodliwych zanieczyszczeń biologicznych.

[11] <https://www.farmer.pl/produkcja-roslinna/zboza/cynk-i-miedx-filarami-plonu-zboz,50716.html> – dostęp dnia 15.10.2019 r.

[12] Dziadek K., Waclawek W.: *Metale ciężkie w środowisku. cz. I. Metale ciężkie (Zn, Cu, Ni, Pb, Cd) w środowisku glebowym*, Chemia, Dydaktyka, Ekologia, Metrologia, **10** (1-2), 2005, str. 33- 44.