

Porównanie procedur przygotowania próbek herbat do analizy wielopierwiastkowej metodami ICP OES i FAAS

A. Szymczycha-Madeja, M. Wełna, P. Pohl, E. Stelmach, D. Jędryczko*

W pracy porównano różne procedury (klasyczne i alternatywne) przygotowania próbek herbaty czarnej i zielonej w ich analizie wielopierwiastkowej metodami ICP OES i FAAS. Analiza statystyczna wyników wraz z oceną wybranych parametrów walidacyjnych porównywanych metod analitycznych pozwoliła na wybór znacznie prostszej i szybszej procedury przygotowania próbek bez konieczności ich rozkładu mokrego.

Wprowadzenie

Zielona i czarna herbata, produkowane z liści krzewu *Camellia sinensis*, są obecnie najpopularniejszymi napojami spożywczymi na świecie. Masowa konsumpcja naparu herbacianego powoduje wzrost zainteresowania analizą składu pierwiastkowego tego produktu. Informacja o całkowitej zawartości makro- i mikroelementów oraz pierwiastków śladowych w herbacie jest powszechnie wykorzystywana do oceny jej jakości oraz bezpieczeństwa żywnościowego. Całkowite stężenia wybranych pierwiastków w liściach i suszu herbacianym mierzy się najczęściej metodami ICP OES oraz FAAS, wymaga to jednak przygotowania próbek w postaci roztworów. Do tego celu stosuje się zazwyczaj roztwarzania na mokro w układach otwartych lub zamkniętych wspomaganych



Zielona i czarna herbata produkowane są z liści krzewu *Camellia sinensis* [fot. Pinus, lic. Creative Commons]



energią mikrofalową w obecności stężonych odczynników utleniających, np. $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ lub $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$ [1].

Przygotowanie próbek do analizy stanowi jeden z najważniejszych etapów procesu analitycznego, który wpływa na jakość otrzymywanych wyników. Rozkład mokry, chociaż efektywny, jest czasochłonny i pracochłonny oraz wiąże się ze zużyciem dużych ilości agresywnych odczynników, może być przyczyną strat analitów oraz kontaminacji próbek. Stąd też, poszukiwane są alternatywne sposoby przygotowania próbek, nie wymagające ich rozkładu i upraszczające ten etap procesu analitycznego. W przypadku analizy herbat dotychczas zaproponowano prostą i szybką metodę oznaczania Al, Ba, Ca, Mg, Mn i Zn z zastosowaniem wprowadzania zawiesin próbek do ICP OES [2]. Zawiesiny stanowiły sproszkowane próbki herbat zdyspergowane w 5% otworze HNO_3 z dodatkiem 10% Triton X-100.

Celem pracy było porównanie różnych procedur przygotowania próbek herbat do analizy wielopierwiastkowej metodami FAAS (Ca, Fe, K, Mg, Mn i Na) oraz ICP OES (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr i Zn). Uwagę skupiono na wyborze szybkiej i prostej procedury przygotowania próbek herbaty, alternatywnej w stosunku do rozkładu mokrego, najczęściej stosowanego na etapie przygotowania tego typu próbek biologicznych do pomiarów metodami spektrometrycznymi.

Część eksperymentalna

Do badań użyto czarną i zieloną herbatę torebkową. Susz herbaciany sproszkowano mechanicznie (uziarnienie $<150 \mu\text{m}$) wykorzystując młynek planetarno-kulowy firmy Fritsch, model Pulverisette 7 Premium.

Zastosowano 5 różnych procedur (P1-P5) przygotowania próbek herbat do analizy, obejmujące rozkład mokry oraz rozwiązania alternatywne z ekstrakcją wspomaganą energią ultradźwiękową. Rozkład mokry wspomagany energią mikrofalową (P1). Próbki herbat (0,5 g) zmineralizowano w mieszaninie 65% $\text{HNO}_3 + 30\% \text{H}_2\text{O}_2$ ($6+1 \text{ cm}^3$) w zamkniętym układzie mikrofalowym (Milestone, model MLS-1200 Mega). Mineralizaty przeniesiono ilościowo do pojemników z PP i uzupełniono wodą do 25,0 g. Ekstrakcja wodą królewską wspomaganą energią ultradźwiękową (P2). Próbki herbat (0,5 g) ekstrahowano $2,0 \text{ cm}^3$ wody królewskiej w łaźni ultradźwiękowej (JP Selecta, Hiszpania) w temp. pokojowej przez 15 min. Ekstrakty uzupełniono wodą do 25,0 g, odwirowano (12000 rpm, 10 min.) stosując wirówkę MPW-350 (Med. Instruments) i przesączono przez sączi membranowe ($0,45 \mu\text{m}$). Ekstrakcja 1 mol/ dm^3 roztworami wody królewskiej (P3), HNO_3 (P4) i HCl (P5) wspomaganą energią ultradźwiękową. Próbki herbat (0,5 g) zadawano 25,0 g roztworów i ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej w temp. 60°C przez 30 min. Ekstrakty odwirowano (12000 rpm, 10 min.) i przesączono przez



Pomiary w laboratorium chemicznym

Rozwiązania METTLER TOLEDO do laboratorium obejmują automatyczne pomiary analityczne, wydajne opracowywanie procesów chemicznych oraz automatyzację pomiarów laboratoryjnych i procesów produkcyjnych. Dodatkowe usługi gwarantują zgodność z oficjalnymi normami oraz spójne i dokładne dane pomiarowe.

Produkty i rozwiązania

Automatyzacja badań chemicznych
Wagi, ważenie laboratoryjne
Instrumenty analityczne
Pipety i końcówki
Analiza termiczna



www.mt.com

METTLER TOLEDO

Tabela 1. Stężenia metali, granice wykrywalności (G_w) oraz obliczone wartości parametru testu istotności t ($|t_{\text{obli}}|$) dla porównania średnich stężeń metali oznaczonych w próbkach herbat (zielonej i czarnej) metodami FAAS i ICP OES po uprzednim przygotowaniu z użyciem procedur P1-P5. Istotne różnice podkreślono

	Stężenia, $\mu\text{g/g}$															$ t_{\text{obli}} $														
	Czarna herbata					Zielona herbata					Czarna herbata					Zielona herbata					G_w ng/cm ³									
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P2	P3	P4	P5	P2	P3	P4	P5	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5			
Al	1,01 ^a	0,919 ^a	0,901 ^a	0,461 ^a	0,393 ^a	2,36 ^a	2,29 ^a	2,26 ^a	1,48 ^a	1,94 ^a	1,812 ^c	2,573	12,550	13,959	2,425	5,477	13,368	3,883 ^c	3,9	1,7	3,6	9,4	5,7	3,9	1,7	3,6	9,4	5,7		
Ba	23,3	23,2	22,7	11,9	11,3	45,7	44,5	43,9	26,4	40,5	0,548	4,648	22,800 ^c	28,000 ^c	2,578	3,624	19,141	2,005 ^c	0,21	0,11	0,32	0,29	0,22	0,21	0,11	0,32	0,29	0,22		
Ca	5,62 ^a	5,69 ^a	5,68 ^a	2,85 ^a	3,15 ^a	6,03 ^a	5,94 ^a	5,98 ^a	3,66 ^a	4,47 ^a	0,518	0,576	28,984	20,851	1,652	0,300 ^c	14,860 ^c	8,999 ^c	31	25	25	25	27	31	25	25	25	27		
Cd	0,135	0,134	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	0,125	0,130	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	0,135	-	-	-	0,801	-	-	-	-	-	-	-	-	0,64	0,48	0,69	2,4	0,71		
Co	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	< G_w ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,29	3,2	3,3	3,1		
Cr	1,22	1,20	1,13	0,332	0,504	0,951	0,947	1,18	0,715	0,830	0,612	1,743	34,045	21,117	0,262	7,152	5,821	2,227	1,1	0,81	1,1	1,3	1,3	1,1	0,81	1,1	1,3	1,3		
Cu	22,3	22,1	18,6	7,89	7,45	11,4	11,3	9,54	4,99	7,79	0,961	17,774	36,716	35,037	0,775	11,390	37,342	10,192	1,6	0,68	0,89	1,5	1,6	1,6	0,68	0,89	1,5	1,6		
Fe	117	110	74,9	39,0	44,4	150	130	97,2	63,6	86,5	2,148 ^c	14,808	29,009	23,962	3,945 ^c	12,202	19,881	12,749	52	40	41	38	35	52	40	41	38	35		
K	16,3 ^a	16,4 ^a	16,3 ^a	10,5 ^a	10,6 ^a	10,6 ^a	10,8 ^a	11,3 ^a	7,83 ^a	9,34 ^a	0,306	0,000	17,759	11,038	1,225	5,422	9,927	6,653	5,6	4,0	4,4	4,3	4,7	5,6	4,0	4,4	4,3	4,7		
Mg	1,76 ^a	1,72 ^a	1,71 ^a	1,08	0,887 ^a	1,66 ^a	1,64 ^a	1,61 ^a	1,15	1,77 ^a	1,188	2,402	15,465	25,555	2,449	3,873	11,860 ^c	1,718 ^c	4,2	2,1	3,0	2,5	2,2	4,2	2,1	3,0	2,5	2,2		
Mn	0,445 ^a	0,447 ^a	0,446 ^a	0,279 ^a	0,216 ^a	1,68 ^a	1,64 ^a	1,66 ^a	0,999 ^a	1,47 ^a	0,158	0,101	13,524	16,470	1,680	2,449	20,890 ^c	5,824 ^c	12	8,2	7,6	8,5	7,5	12	8,2	7,6	8,5	7,5		
Na	20,4	20,4	24,8	14,1	15,7	13,9	14,0	13,5	7,55	9,59	0,000	7,169	9,062	7,658	0,408	0,408	25,924	8,737	6,1	3,4	3,8	3,0	4,2	6,1	3,4	3,8	3,0	4,2		
Ni	4,10	4,07	3,75	1,04	0,341	4,36	4,32	4,08	2,16	1,94	0,604	5,017	43,864	120,902	1,386	3,834	23,105	27,000	0,65	0,30	4,6	4,3	2,6	0,65	0,30	4,6	4,3	2,6		
Pb	1,68	1,66	1,13	< G_w ^b	< G_w ^b	1,77	1,76	1,37	< G_w ^b	< G_w ^b	0,408	8,807	-	-	0,222	5,941	-	-	4,9	3,8	5,5	11	9,3	4,9	3,8	5,5	11	9,3		
Sr	11,8	11,6	9,80	6,42	10,6	15,0	15,0	14,0	8,62	12,9	2,449	17,564	15,520 ^c	9,295	0,000	4,804	21,076	4,776	0,049	0,037	0,081	0,071	0,057	0,049	0,037	0,081	0,071	0,057		
Zn	26,4	26,4	23,9	14,1	11,4	18,5	18,6	15,3	11,1	16,6	0,000	19,365	24,600 ^c	23,430 ^c	0,775	15,372	17,606	2,403 ^c	0,69	0,50	1,1	0,78	0,80	0,69	0,50	1,1	0,78	0,80		

P1: mineralizacja mikrofalowa w mieszaninie $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$; P2: ekstrakcja ultradźwiękowa w wodzie królewskiej;

P3-P5: ekstrakcja ultradźwiękowa w 1 mol/dm³ roztworze wody królewskiej (P3), HNO_3 (P4) i HCl (P5).

Wartość krytyczna testu t (t_{kryt}): 2,776 ($p=0,05$).

^a Stężenie w mg/g.

^b Poniżej granicy wykrywalności (< G_w).

^c Z użyciem testu C. Wartość krytyczna (C_{kryt}): 4,303 ($p=0,05$).



sączki membranowe. Próbkę przygotowano i analizowano w trzech powtórzeniach ($n=3$). Dla każdej z procedur, przygotowano również roztwory ślepych prób.

Stężenia Ca, Fe, K, Mg, Mn i Na w otrzymanych roztworach próbek oznaczono metodą FAAS z zastosowaniem spektrometru firmy PerkinElmer, model 1100B. Stężenia Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr i Zn oznaczono metodą ICP OES przy użyciu spektrometru firmy Varian, model 720. Do kalibracji użyto metodę krzywych wzorcowych.

Wyniki

Dokładność zastosowanych procedur przygotowania próbek herbat do ich analizy wielopierwiastkowej metodami FAAS i ICP OES sprawdzono poprzez porównanie stężeń oznaczonych pierwiastków. Wyznaczono także precyzję wyników (jako względne odchylenie standardowe, s_{wz}) oraz granice wykrywalności oznaczanych pierwiastków (G_w). Procedurę P1 przyjęto za procedurę odniesienia, jej wyniki zweryfikowano poprzez analizę certyfikowanego materiału odniesienia liści herbaty: INCT-TL-1 (IChTJ, Polska). W celu określenia statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniami pierwiastków otrzymanych przy użyciu procedury P1 i pozostałymi procedurami (P2-P5), zastosowano test t -Studenta, poprzedzony porównaniem odchyleń standardowych (s) (test F -Snedecora). Wartości krytyczne testu F i t , przy założeniu 95% przedziału ufno-

ści ($p=0,05$), wynosiły 19,00 (F_{kryt}) i 2,776 (t_{kryt}). W przypadku istotnych różnic między wartościami s ($F_{obl} > F_{kryt}$) zastosowano test Cohrana i Coxa (C -test), dla którego wartość krytyczna (C_{kryt}) wynosiła 4,303 ($p=0,05$). Dokładność oznaczenia pierwiastków z wykorzystaniem alternatywnych procedur (P2-P5) określono również badając odzysk dodanych pierwiastków. Do próbek herbat przed analizą dodano odpowiednie ilości wzorca wielopierwiastkowego, by ich stężenia końcowe w roztworach próbek wynosiły 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 i 5,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Wyniki analizy (stężenia metali, wartości obliczone parametru t_{obl} , G_w) zestawiono w tabeli 1.

W przypadku herbaty czarnej, precyzja wyników dla próbek przygotowanych przy użyciu procedury P1 (0,4-6,9%), P2 (0,8-7,5%) i P3 (0,8-8,0%) była porównywalna i wyższa niż po zastosowaniu pozostałych dwóch procedur, tj. P4 (2,5-11%) i P5 (1,9-9,0%). Podobną zależność i zbliżone wartości s_{wz} otrzymano dla próbek herbaty zielonej: 0,6-7,2% (P1), 0,5-4,6% (P2), 0,4-7,3% (P3), 3,9-9,2% (P4) oraz 2,8-11% (P5). Niezależnie od sposobu przygotowania próbek, w herbatach czarnych i zielonych nie oznaczono Co. Podobnie, stężenie Cd oraz Pb w próbkach przygotowanych przy użyciu procedur P3, P4 i P5 (Cd) oraz P4 i P5 (Pb) było poniżej ich wartości G_w .

W wyniku porównania stężeń pierwiastków w próbkach przygotowanych z uży-

ciem procedury odniesienia (P1) i pozostałych procedur (P2-P5), stwierdzono, że zbliżone wartości otrzymano jedynie stosując procedurę P2. Dokładność procedury P2 potwierdziła analiza statystyczna uzyskanych wyników (tabela 1). Różnice pomiędzy wynikami otrzymanymi dla procedury P2 oraz procedury odniesienia są statystycznie nieistotne, tj. obliczone parametry testów są poniżej ich wartości krytycznych ($t_{obl} < t_{kryt}$ i $C_{obl} < C_{kryt}$). W przypadku procedur P3, P4 i P5 wartości stężeń większości (P3) lub wszystkich (P4, P5) pierwiastków były niższe w porównaniu do wartości odniesienia. Dla procedury P3 otrzymano wyniki różniące się w sposób istotny dla 8 (czarna herbata) i 11 (zielona herbata) spośród 14 oznaczanych pierwiastków. W przypadku procedury P4 wartości krytyczne testów były przekroczone dla 13 pierwiastków (czarna i zielona herbata). Dla procedury P5 istotne różnice odnotowano dla 13 (czarna herbata) i 8 (zielona herbata) pierwiastków. Oznaczało to, że użycie procedur P3, P4 i P5 prowadziło do uzyskania błędnych wyników oznaczeń. Ilościowe odzyski otrzymano stosując procedury P1 i P2 (herbata czarna: 96,0-105% i 98,1-104%; herbata zielona 93,6-105% i 97,0-102%). Dla pozostałych procedur odzyski były niższe i zróżnicowane, tj. w zakresach 86,9-103% (P3), 72,8-107% (P4) i 72,8-96,0% (P5) (herbata czarna) oraz 83,2-101% (P3), 75,0-102% (P4) i 77,0-97,5% (P5) (herbata zielona).

Spośród alternatywnych procedur (P2-P5) najniższe wartości G_w otrzymano dla procedury P2. Wartości te wynosiły 0,04-0,8 ng/cm^3 (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Sr i Zn), 2-8 ng/cm^3 (Al, K, Mg, Mn, Na i Pb) i 25-40 ng/cm^3 (Ca i Fe). Ponadto, wartości te były niższe w porównaniu do uzyskanych dla procedury odniesienia (P1).

Wnioski

Wykazano, że ekstrakcja wspomaganą energią ultradźwiękową za pomocą wody królewskiej może być zastosowana na etapie przygotowania próbek herbat do pomiarów zawartości całkowitych pierwiastków metodą FAAS i ICP OES, zastępując mineralizację tych próbek. Zaproponowana procedura jest szybsza i prostsza w wykonaniu, nie powoduje strat analitycznych oraz jest wolna od efektów matrycowych.

Praca powstała w toku realizacji projektu badawczego 2013/09/B/NZ9/00122 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Literatura

- [1] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Pohl, TrAC Trends Anal. Chem., 35 (2012) 165.
- [2] N. S. Mokgalaka, R. I. Mc Crindle, B. M. Botha, J. Anal. At. Spectrom., 19 (2004) 1375.

* Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej, Wybrzeże Stanisława Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.