

BADANIA NAD METODYKĄ OZNACZEŃ MIKROELEMENTÓW W PASZACH ROŚLINNYCH

Исследования методики обозначений микроэлементов в растительных кормах

Research on the Methods of Determining Trace Elements in Plant Feeding Stuffs

JAN ILECKI

Katedra Żywienia Zwierząt WSR — Poznań

Kierownik: Prof. dr K. Gawęcki

Ważne funkcje fizjologiczne, spełniane przez miedź w organizmach żywych oraz choroby przypisywane jej brakom, stawiają przed chemią analityczną konieczność znalezienia metod oznaczania, które byłyby przydatne również wtedy, gdy ilości oznaczanego pierwiastka są znikomo małe.

Metody dawniejsze, opracowane najczęściej dla przemysłu metalurgicznego, nie dają się przenieść do oznaczeń biochemicznych z dwóch względów:

- 1) ponieważ są one dostosowane do większych ilości,
- 2) nie uwzględniają substancji towarzyszących, które najczęściej przeszkadzają w oznaczaniu miedzi występującej w materiałach biologicznych.

Dla opracowania metod oznaczania pierwiastków śladowych, można obrać kilka kierunków, które stanowią odrębne szeroko dziś rozbudowane dziedziny chemii analitycznej: polarografia, metody optyczne (kolorymetria, fotometria, spektrografia) i chromatografia.

Coraz częściej można spotkać nowo opracowane metody, będące połączeniem dwóch różnych dziedzin np. izolowanie oznaczanego pierwiastka na drodze chromatograficznej i późniejsze jego oznaczenie, czy to przy użyciu polarografii czy też aparatury optycznej.

O wyborze metody oznaczania miedzi decyduje przede wszystkim wyposażenie laboratorium w odpowiednią aparaturę oraz odczynniki.

Prace Katedry nad mikroelementami postawiły przed pracownią chemiczną zadanie przygotowania odpowiednich metod oznaczania niektórych pierwiastków śladowych. Trudności, na jakie napotymano przy kolorymetrycznych oznaczeniach kobaltu i miedzi w paszach roślinnych, skło-

niły nas do adaptacji stosowanych przez innych metod oznaczania tych pierwiastków, uwzględniając nasze wyposażenie aparaturowe.

Posiadanie fotometru Pulfricha, aparatu prostego i szeroko w Polsce rozpowszechnionego, który pozwala dzięki wyposażeniu uzupełniającemu na pomiary mikro, zadecydowało o wyborze metody kolorymetrycznej.

Z analiz instrumentalnych, kolorymetria jest dziedziną najstarszą ale nie tracącą znaczenia.

Kolorymetrycznych metod oznaczania miedzi jest bardzo dużo, jednak dla celów biochemicznych stosuje się najczęściej dwie:

- 1) opracowana przez F i s c h e r a i L e o p o l d i (1933) metoda oznaczania miedzi ditizonem (1) przystosowana przez S c h a r r e r'a w 1948 r. do oznaczeń w materiałach biologicznych (2),
- 2) metoda oznaczania miedzi za pomocą dwuetylodwutiokarbaminianu sodu, opracowana przez M c F a r l a n e (1932) (3) przystosowana do oznaczeń biologicznych przez M i l l i k e n'a (1952).

Obie metody, choć powszechnie używane, mają jedną cechę ujemną wspólną: odczynniki stosowane dla wywołania barwy nie charakteryzują się specyficznością. Fakt reagowania z licznymi metalami grozi zawsze możliwością popełnienia błędu.

Praca niniejsza ma za cel próbę sprawdzenia przydatności stosowania dwufenylokarbazonu do oznaczenia miedzi. Odczynnik ten stosowano dotychczas w kolorymetrycznej metodzie oznaczania rtęci. Wiadomo o nim, że reaguje z niektórymi metalami tworząc połączenia kompleksowe.

Jednym z tych metali reagujących z dwufenylokarbazonem jest miedź:

Kompleksowe połączenie DFKN-onu z Cu nie rozpuszcza się w wodzie, przechodzi natomiast łatwo do benzenu i jego pochodnych (toluen, ksylen), zabarwiając rozpuszczalnik organiczny na kolor czerwony. Ustalenie odpowiedniego pH roztworu i obecność chlorków powoduje, że inne metale reagujące z dwufenylokarbazonem nie przechodzą do fazy organicznej (4).

Aby badany odczynnik zdał egzamin przy oznaczaniu miedzi, trzeba sprawdzić szereg faktów:

1. Dwufenylokarbazon z miedzią winien tworzyć połączenie barwne o intensywności proporcjonalnej do ilości miedzi w roztworze.

2. Na intensywność zabarwienia nie powinna wpływać obecność innych metali w badanych materiałach biologicznych, tak pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego. Jeśli jest inaczej, trzeba znaleźć takie odczynniki, które wpływ ten zlikwidują.

Omawiana obecnie część mojej pracy zajmuje się pierwszym z dwu wymienionych zagadnień.

Przed przedstawieniem wyników przeprowadzonych prób, podaję kilka uwag, dotyczących czynności przygotowawczych do oznaczeń kolorymetrycznych.

Oznaczenia w materiale biologicznym wymagają ich mineralizacji. Cel ten można osiągnąć dwoma sposobami:

- 1) przez spalenie próby w piecu i następnie traktowanie kwasem solnym,
- 2) przez spopielenie na mokro, stosując mieszaninę kwasów utleniających, względnie stężoną wodą utlenioną i kwas siarkowy.

Spalanie na mokro jest szczególnie wtedy wygodne, jeśli naważka substancji nie jest zbyt duża.

Przy stosowaniu dwufenylokarbazonu dla oznaczenia miedzi, który cechuje się dużą czułością, a tym samym nie wymaga dużych naważek, lepszym sposobem mineralizacji okazało się spalanie na mokro. Spalanie to przeprowadza się mieszaniną kwasów azotowego, nadchlorowego i siarkowego, zmieszanych w stosunku 40 : 4 : 1.

Przy spalaniu substancji bogatych w tłuszcz, trudno utleniany przez HNO_3 , trzeba zwiększyć udział kwasu nadchlorowego.

Drugim zagadnieniem, to czystość używanych odczynników, bowiem w analizach kolorymetrycznych małych ilości pierwiastków, nie można jej pominąć bez obawy popełnienia błędu.

Z dwu możliwych sposobów eliminowania błędu: oczyszczanie wszystkich odczynników ekstrakcją z użyciem ditizonu lub przeprowadzania prób ślepych i uwzględniania poprawek, wybrano drugi jako prostszy, nie zaniebując jednak zabiegów, by poprawki te odpowiadały rzeczywistości.

Przy oznaczaniu miedzi, pierwiastka bardzo pospolitego w pracowniach chemicznych (krany wodne, gazowe, palniki, blaty stołów, aparaty destylacyjne do wody) należało jeszcze dodatkowo brać pod uwagę możliwość zanieczyszczenia prób miedzią obcą.

Dla stwierdzenia, czy istnieje proporcjonalność między ilością miedzi, sporządzono standardowy roztwór siarczanu miedzi, zawierający w 1 ml = 400 mcg Cu.

Drugi roztwór wzorcowy, zawierający w 1 ml = 20 mcg Cu otrzymano rozcieńczając roztwór pierwszy. Z roztworu drugiego przygotowano dwa roztwory robocze:

pierwszy zawierający w 1 ml = 0,5 mcg Cu,
 drugi , w 1 ml = 0,2 mcg Cu.

Wszystkie roztwory siarczanu miedzi stanowiły roztwory 1 n H_2SO_4 by zakwaszenie zapobiegało wytrącaniu się osadów zasadowych soli miedzi.

Dwufenylokarbazon (Merck p. a.) roztwór zawierający 10 mg w 100 ml sporządzono, odważając odpowiednią ilość substancji na wadze mikroanalizy i rozpuszczając ją w świeżo przedestylowanym toluenie F. O. Ch. Gliwice cz. d. a.

Roztwór DFKN w toluenie ma własną barwę. Maksimum absorpcji roztworu leży w obszarze ca 470 nm.

Wywołanie barwy kompleksowego połączenia Cu z DFKN uzyskiwano w następujący sposób:

Do rozdzielacza na 250 ml wlewano ostrożnie po ściance, by uniknąć strat na skutek pryskania, odpowiednią ilość roztworu roboczego z biurety automatycznej, dodawano 1 ml roztworu fenoloftaleiny w wodzie amoniakalnej i następnie roztwór zobojętniano wodą amoniakalną do otrzymania lekko różowego zabarwienia. Zobojętniony roztwór uzupełniano wodą destylowaną do pewnej równej dla wszystkich oznaczeń objętości, by zachować stały stosunek fazy wodnej do organicznej. Do roztworu wodnego w rozdzielaczu dodawano pipetą roztwór DFKN w toluenie, w ilości 10 ml. Rozdzielacz zamykano i jego zawartość wstrząsano przez 5 minut. Stwierdzono przy tym, że jednokrotne wytrząsanie z tolueniem wystarczy, by barwny związek przeszedł całkowicie do toluenu. Rozdzielacz pozostawiono na 5 minut w spokoju, by nastąpiło wyraźne oddzielenie faz, zlewano roztwór wodny mierząc przy okazji jego pH na pH-metrze, barwnym roztworem napełniano kiuwetę fotometru Pulfricha i po upływie 5 minut mierzono ekstynkcję roztworu, stosując filtr nr 6. Maksimum absorpcji dla czerwonego połączenia miedzi z DFKN leży w obszarze ca 530 nm.

Zgodność z prawem Lamberta-Beera stwierdzono w następujący sposób:

Oznaczano ekstynkcję roztworów barwnych DFKN z różnymi wzrastającymi stopniowo ilościami miedzi. Z danych tych wykreślano krzywą wzorcową. W wypadku zgodności z prawem Lamberta-Beera linia łącząca wartości ekstynkcji powinna przebiegać prosto. Dodatkowo brano pewne znane ilości roztworu miedzi, wywoływano dodatkiem DFKN barwę i mierzono ekstynkcję roztworu, by następnie z wielkości ekstynkcji przy pomocy sporządzonego w tym samym dniu wykresu, odczytać ilość miedzi. Stwierdzono, że:

1. Wszystkie 25 krzywych nie stanowiły linii prostych. Były mniej lub więcej liniami łamanymi.

2. Odczytane ilości miedzi obarczone były czasami błędem, dochodzącym do 10%. Stwierdzono również brak powtarzalności w odczytach ekstynkcji dla tych samych stężeń miedzi. Przy oznaczeniach używano tych samych odczynników, zmieniano jedynie codziennie roztwór DFKN, sporządzany z tych samych odczynników i w podobnych warunkach.

Stwierdzono, że przyczyną błędów w oznaczeniach kontrolnych nie były:

- 1) dodawana jako wskaźnik fenoloftaleina,
- 2) pH roztworu ekstrahowanego,
- 3) czas ekstrakcji,
- 4) nietrwałość roztworu barwnego w czasie (czas wykonania pomiaru na fotometrze),
- 5) różne stężenia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ powstającego przy zobojętnianiu roztworu soli miedzi amoniakiem,
- 6) stosunek ilości wody do toluenu,
- 7) stosunek DFKN do ilości Cu.

Za główne źródło błędów trzeba uważać sam DFKN. Potwierdzeniem takiego przypuszczenia może być fakt, że niekiedy zdarzało się, iż sam DFKN bez dodatku Cu poddany wszystkim operacjom (ekstrakcji, rozdzielania) dawał roztwór toluenu wyraźnie zabarwiony na czerwono. Z tej racji postanowiono sprawdzić DFKN.

Cechą charakterystyczną każdego połączenia chemicznego jest jego widmo absorpcyjne, sporządzone na spektrofotometrze. Jest to wykres przedstawiający zależność między długością fali, wyrażoną w nm jako odciętą a najczęściej ekstynkcją

$$E = \log \frac{J_0}{J} = e cd \text{ jako rzędną, gdzie}$$

J_0 = natężenie światła padającego

J = natężenie światła przechodzącego

c = stężenie w mol/litr

d = grubość warstwy w cm

e = molarny dziesiętny współczynnik ekstynkcji równy ekstynkcji gdy $c = 1$ mol/litr i $d = 1$ cm.

Widma połączeń barwnych leżą w obszarze światła widzialnego. Widma połączeń bezbarwnych trzeba szukać albo w ultrafiolecie albo też w podczerwieni.

Dla roztworu DFKN w toluenie należy poszukać poza maksimum absorpcji leżącym w obszarze ca 470 nm (barwa pomarańczowa) jeszcze maksima absorpcji w ultrafiolecie. Wyznaczanie tego widma w ultrafiolecie ograniczone jest przez maksimum absorpcji, charakterystyczne dla użytego jako rozpuszczalnik toluenu, występujące w obszarze poniżej 285 nm. Znalezienie widma absorpcyjnego dla DFKN, czy to w ultrafiolecie, czy też z braku takiego w tym obszarze (290—460 nm) — w obszarze światła widzialnego pozwoli ustalić, czy odczynnik ulega zmianom

w roztworze. Ubytek spowodowany częściowym rozkładem zmieni charakter widma. Zmiana ta pozwoli również ustalić, jaki inny związek powstaje w wyniku rozkładu.

Zagadnienie to jest obecnie w Katedrze opracowywane. Próby wykreślenia widm toluenu cz. d. a. nie dały zgodnych rezultatów. Należy przyjąć, że toluen jest zanieczyszczony, gdyż poza charakterystycznym dla toluenu maksimum absorpcji, leżącym w obszarze poniżej 285 nm występowały maksima różne dla różnych partii toluenu, świadczące o jego zanieczyszczeniu.

Postanowiono toluen oczyścić metodą podaną przez Vogela A. J. (5), wyznaczyć widmo absorpcyjne i dla sprawdzenia porównać z widmem, toluenu spektralnie czystego.

Należy przypuszczać, że ta właśnie droga przyczyni się do zmniejszenia błędów przy oznaczeniach miedzi za pomocą dwufenylokarbazonu.

LITERATURA

1. Fischer H., Leopoldi A. — Colorimetrische Bestimmung von Pb und Cu mit Dithizon. *Angew. Chem.* 47, 90, 1934.
2. Scharer K., Schaumlöffel E. — Die Bestimmung kleinster Mengen Kupfer als Cu-Diäthylthiocarbaminat durch Verdrängungsreaktion. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde* 87, 1, 1959.
3. William D., McFarlane — *Biochem. J.* 26, 1022—33 1932.
4. Łapin Ł. N., Prijew I. G. — Primienienije difenikarbazona dla kolorimetričeskogo mikroopriedielenija miedi w pischzewych produktach i gotowych bludach. *Woprosy pitanija* 1, 68, 1958.
5. Vogel A. I. — *J. Chem. Soc.* 607, 1948.