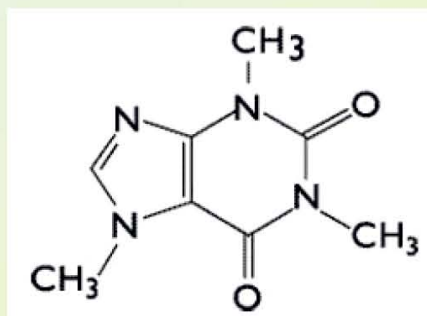


Joanna Jabłońska, Agata Łącka, Tomasz Jędrzejczyk,
Marta Słowianek, Adrian Bartos, Iwona Majak,
Katarzyna Wolska, Elżbieta Sobiecka,
Beata Smolińska, Joanna Leszczyńska

ĆWICZENIA LABORATORYJNE Z ANALITYKI ŻYWNOŚCI



**Joanna Jabłońska, Agata Łacka, Tomasz Jędrzejczyk,
Marta Słowianek, Adrian Bartos, Iwona Majak,
Katarzyna Wolska, Elżbieta Sobiecka,
Beata Smolińska, Joanna Leszczyńska**

ĆWICZENIA LABORATORYJNE Z ANALITYKI ŻYWNOŚCI

Politechnika Łódzka

Łódź 2013

SKRYPTY DLA SZKÓŁ WYŻSZYCH
POLITECHNIKA ŁÓDZKA

Recenzent
dr inż. Ewelina Hallmann

Redaktor Naukowy Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności
prof. dr hab. inż. Danuta Kalemba

© Copyright by Politechnika Łódzka 2013

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223

tel./fax 42-684-07-93

e-mail: zamowienia@info.p.lodz.pl

www.wydawnictwa.p.lodz.pl

ISBN 978-83-7283-588-8

Spis treści

Przedmowa	7
ĆWICZENIE 1	
Mineralizacja mikrofalowa jako sposób przygotowania próbek produktów spożywczych do oznaczania jonów metali metodami instrumentalnymi	8
1. Wstęp	8
1.1. MINERALIZACJA	9
1.1.1. MINERALIZACJA CIŚNIENIOWA Z WYKORZYSTANIEM ENERGII MIKROFALOWEJ	10
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	12
2.1. CEL ĆWICZENIA	12
2.2. APARATURA	12
3. WYKONANIE ĆWICZENIA.....	14
ĆWICZENIE 2	
Oznaczanie niklu	16
1. WSTĘP	16
1.1. PROCES PRODUKCYJNY JAKO ŹRÓDŁO SKAŻENIA ŻYWNOŚCI NIKLEM	16
1.2. PRODUKTY NATURALNE BOGATE W NIKIEL ORAZ PRODUKTY „SKAŻONE” NIKLEM	16
1.3. SZKODLIWOŚĆ I KONSEKWENCJE ZDROWOTNE	17
1.4. ALERGENNOŚĆ	18
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	18
2.1. CEL PRACY	18
2.2. MINERALIZACJA PRÓBEK.....	18
2.3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	19
3. WYKONANIE OZNACZENIA	19
3.1. EKSTRAKCJA NIKLU	19
3.2. ANALIZA ILOŚCIOWA METODĄ ASA	20
ĆWICZENIE 3	
Oznaczanie zawartości Cu (II) w środkach spożywczych	22
1. WSTĘP	22
1.1. WYSTĘPOWANIE MIEDZI W GLEBACH I ORGANIZMACH ROŚLIN I ZWIERZĄT	22
1.2. METODY OZNACZANIA Cu (II)	25
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	25
2.1. CEL ĆWICZENIA	25
2.2. ZASADA METODY OZNACZANIA Cu (II)	26
2.3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	27
2.4. APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY	27
3. WYKONANIE OZNACZENIA	28
3.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY	28

3.2. SPOSÓB PRZYGOTOWANIA KRZYWEJ WZORCOWEJ SŁUŻĄCEJ DO OZNACZANIA Cu (II)	28
3.3. WYKONANIE OZNACZENIA Cu (II) W PRÓBCE BADANEGO MINERALIZATU	29
3.4. SPOSÓB PRZYGOTOWANIA SPRAWOZDANIA	29
ĆWICZENIE 4	
Oznaczanie azotanów (V) i azotanów (III) w próbkach warzyw	31
1. WSTĘP	31
1.1. ZNACZENIE BIOLOGICZNE	31
1.2. METODY OZNACZANIA	33
1.2.1. AZOTANY (III)	33
1.2.2. AZOTANY (V)	34
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	34
2.1. CEL ĆWICZENIA	34
2.2. METODA GRIESSA	34
2.3. APARATURA	35
2.4. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	35
2.5. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ	36
3. WYKONANIE OZNACZENIA	36
3.1. OZNACZENIE AZOTANÓW (III)	36
3.2. OZNACZENIE AZOTANÓW (V)	37
ĆWICZENIE 5	
Spektrofluorymetryczna metoda oznaczania histaminy w produktach spożywczych (PN-90A-86786)	40
1. WSTĘP	40
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	44
2.1. CEL ĆWICZENIA	44
2.2. APARATURA	44
2.3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	44
2.4. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ	45
2.5. WYKONANIE OZNACZENIA	45
ĆWICZENIE 6	
Oznaczanie 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF) w sokach owocowych	47
1. WSTĘP	47
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	53
2.1. APARATURA	54
2.2. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	54
2.3. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ	54
3. WYKONANIE OZNACZENIA	54
3.1. ROZDZIAŁ CHROMATOGRAFICZNY Z POMIAREM SPEKTROFOTOMETRYCZNYM	54
3.2. ANALIZA WYNIKÓW	55

ĆWICZENIE 7

Oznaczenie β-laktoglobuliny za pomocą techniki ELISA	56
1. WSTĘP	56
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	57
2.1. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	57
2.2. APARATURA I SPRZĘT	58
2.3. MATERIAŁ DO BADAŃ	58
2.4. METODYKA	58
3. WYKONANIE OZNACZENIA	59
3.1. OZNACZENIE BIAŁKA	59
3.2. TEST ELISA	59
4. ANALIZA WYNIKÓW	60
4.1. ZAWARTOŚĆ BIAŁKA	60

ĆWICZENIE 8

Oznaczenie polichlorowanych bifenyli (PCB) w olejach spożywczych metodą chromatografii gazowej	62
1. WSTĘP	62
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	65
2.1. CEL ĆWICZENIA	65
2.2. APARATURA	65
2.2. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	65
2.3. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ	66
3. ANALIZA WYNIKÓW	66

ĆWICZENIE 9

Oznaczenie alergenów metodą immunoblottingu	69
1. WSTĘP	69
1.1. ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY BIAŁEK	69
1.2. TRANSFER BIAŁEK Z ŻELU NA MEMBRANĘ	72
1.3. REAKCJA IMMUNOLOGICZNA ANALIZOWANYCH BIAŁEK	72
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	74
2.1. CEL ĆWICZENIA	74
2.2. ODCZYNNIKI I ROZTWORY	74
2.3. APARATURA I SPRZĘT	75
2.4. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW PRÓBEK BADANYCH	75
3. WYKONANIE OZNACZENIA	75
3.1. ROZDZIAŁ BIAŁEK METODĄ SDS-PAGE	75
3.1.1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW	75
3.1.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO ROZDZIAŁU	76
3.1.3. PRZYGOTOWANIE I NANIESIENIE ŻELU	76
3.1.4. ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU	77
3.1.5. WIZUALIZACJA ROZDZIELONYCH BIAŁEK (BARWIENIE ŻELU)	78
3.2. IMMUNOBLOTTING ANALIZOWANYCH BIAŁEK	78
3.2.1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW	78
3.2.2. TRANSFER BIAŁEK NA MEMBRANĘ	79

3.2.3. REAKCJA IMMUNOLOGICZNA Z BIAŁKAMI.....	79
4. ANALIZA WYNIKÓW	79
ĆWICZENIE 10	
Oznaczanie zawartości Hg(II) w próbkach żywności metodą CV-AAS.....	81
1. WSTĘP	81
1.1. RTEĆ W ŚRODOWISKU	81
1.2. TOKSYCZNOŚĆ	82
1.3. RTEĆ W ŻYWNOŚCI.....	83
2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	84
2.1. CEL ĆWICZENIA	84
2.2. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ	84
3. WYNIKI I SPRAWOZDANIE	84

PRZEDMOWA

W ostatnich latach obserwuje się szybkie wprowadzanie nowych oraz udoskonalanie istniejących technologii wytwarzania środków spożywczych. Proces ten wymaga monitorowania i kontroli surowców, półproduktów i otrzymanych produktów spożywczych, co wiąże się z koniecznością opracowywania i wdrażania bardziej czułych, specyficznych i zróżnicowanych metod analitycznych. Potrzeby w zakresie instrumentalnej analizy składników śladowych w żywności, często o działaniu toksycznym, rosną w związku z zanieczyszczeniem środowiska, w szczególności gleby, wód, i w konsekwencji żywności. Wiąże się z tym konieczność unowocześniania programów nauczania, uwzględniających postęp w zakresie metod analizy.

Dobór ćwiczeń jest związany z aktualnymi potrzebami nowoczesnego kształcenia inżyniera, podejmującego po ukończeniu studiów pracę technologa żywności lub specjalisty analityka w laboratorium. Ćwiczenia zawarte w niniejszym skrypcie uwzględniają wszystkie etapy analizy, zaczynając od pobrania próbki do badań, przez przygotowanie próbki do analizy, usuwanie składników przeszkadzających, pomiar, a kończąc na opracowaniu wyników.

Mamy nadzieję, że opracowany skrypt pomoże studentom pogłębić znajomość współczesnej analityki żywności.

ĆWICZENIE 1

Mineralizacja mikrofalowa jako sposób przygotowania próbek produktów spożywczych do oznaczania jonów metali metodami instrumentalnymi

1. WSTĘP

Nieliczne metody pomiarowe umożliwiają badanie próbek w stanie natywnym, bez przygotowania. Większość fizykochemicznych metod analitycznych stosowanych do oznaczania pierwiastków śladowych w próbkach organicznych i nieorganicznych wymaga przygotowania badanych próbek w postaci roztworów.

Metody w których próbka powinna być w roztworze:

- grawimetria;
- miareczkowanie;
- spektrofotometria UV-Vis;
- spektrofлуorymetria;
- fotometria płomieniowa;
- emisyjna spektrometria atomowa ze wzbudzeniem plazmowym;
- absorpcyjna spektrometria atomowa;
- potencjometria;
- polarografia i metody woltamperometryczne;
- elektrograwimetria i kulometria;
- konduktometria.

Metody, w których próbka może być w postaci stałej lub w roztworze:

- spektrofotometria IR;
- analiza aktywacyjna;
- spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej;
- spektrometria masowa;
- spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego.

Najczęściej stosowanymi metodami przeprowadzania do roztworu próbek stałych są:

- rozpuszczanie próbki w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku;
- ługowanie składników mineralnych z próbki odpowiednimi odczynnikami;
- stapianie próbki z odpowiednio dobranymi topnikami i następnie rozpuszczanie oraz ługowanie składników mineralnych z otrzymanego stopu;
- mineralizacja próbki w odpowiednio dobranych warunkach.

Przed wyborem sposobu roztwarzania należy ustalić, czy:

- odczynnik roztworzy próbkę całkowicie;
- szybkość roztwarzania jest wystarczająca;
- użyty odczynnik nie będzie przeszkadzał w dalszym toku analizy;
- odczynnik jest wystarczająco czysty, aby nie zanieczyścił próbki;
- straty spowodowane lotnością powstających związków można zaniedbać;
- odczynnik nie reaguje z naczyniem, w którym przebiega reakcja.

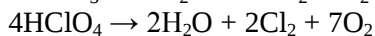
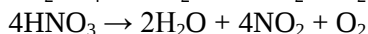
1.1. MINERALIZACJA

Mineralizacja jest najczęściej stosowanym sposobem roztwarzania próbek produktów spożywczych i materiałów pokrewnych. Proces ten stosuje się zwykle przed oznaczeniem jonów metali ciężkich jako zanieczyszczeń w produktach spożywczych. Mineralizacja jest to proces całkowitego rozkładu badanej próbki za pomocą silnych utleniaczy, najczęściej mieszaniny stężonych kwasów lub poprzez spalenie i prażenie próbki w wysokiej temperaturze. Procesy te przeprowadza się w celu wykonania oznaczenia składników mineralnych w otrzymanych roztworach mineralizatów.

Głównie sposoby mineralizacji to mineralizacja „na sucho” i mineralizacja „na mokro”.

Mineralizacja „na sucho” polega na zniszczeniu struktury organicznej przez spopielenie próbki w wysokiej temperaturze (najczęściej około 500°C). W tych warunkach substancja organiczna ulega całkowitemu rozkładowi, następuje jej zwęglenie i utlenienie tlenem atmosferycznym do CO₂ i H₂O. Azot zawarty w połączeniach organicznych przechodzi w lotne tlenki lub NH₃. Częściowemu ulotnieniu w czasie spalania ulega również siarka. Pozostałe składniki mineralne substancji pochodzenia roślinnego, takie jak: P, K, Ca, Mg, Fe, Si, Mn, B, Zn, Cu, Mo i inne przechodzą w formę nielotnych tlenków lub soli, takich jak: węglany, fosforany itp. Tworzą one pozostałość po spaleniu substancji roślinnej, tzw. *popiół surowy*. Z popiołu surowego po rozłożeniu węglanów kwasem solnym lub kwasem azotowym (V) i oddzieleniu krzemionki otrzymuje się *popiół czysty*, który poddaje się analizie ilościowej.

W przypadku mineralizacji „na mokro” zniszczenie struktury substancji organicznej następuje w wyniku jej utlenienia w płynnym środowisku stężonych kwasów. Do spalania „na mokro” stosuje się najczęściej mocne, tlenowe kwasy: siarkowy, azotowy i nadchlorowy. Kwasy te rozkładają się z wydzielaniem tlenu.



Powstający tlen powoduje utlenienie materiału pochodzenia roślinnego, wydzielają się przy tym lotne produkty rozkładu, takie jak: CO_2 , H_2O , SO_2 . W kwaśnym roztworze po spaleniu pozostają w formie soli składniki mineralne (w tym azot). Proces mineralizacji „na mokro” przeprowadza się w podwyższonej temperaturze, co znacznie zwiększa zdolność reagowania tlenu z substancją organiczną. Ze względu na szkodliwe opary kwasów powstające w czasie spalania, mineralizację należy prowadzić pod wyciągiem.

Techniki rozkładu próbek „na mokro”:

- z zastosowaniem konwencjonalnego ogrzewania;
- z wykorzystaniem ultradźwięków;
- promieniami UV;
- z wykorzystaniem energii mikrofalowej;
- w systemach otwartych lub w systemach zamkniętych (ciśnieniowa);
- w systemach stacjonarnych, w systemach przepływowych lub w fazie gazowej.

1.1.1. 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. Ponieważ ta metoda będzie wykorzystana w niniejszym ćwiczeniu, przedstawiono jej szerszą charakterystykę.

Podczas gdy rozkład próbki przez trawienie w kwasach lub też stapianie z solami metali alkalicznych jest oparty na zastosowaniu reakcji chemicznej i energii cieplnej, to w przypadku mineralizacji mikrofalowej procesy rozkładu są dodatkowo wspomagane oddziaływaniem promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości 2450 MHz. Energia promieniowania mikrofalowego jest bezpośrednio absorbowana przez polarne cząsteczki (wodę, kwasy nieorganiczne, itd.), co stanowi w tych przypadkach znacznie szybsze i skuteczniejsze źródło energii niż klasyczne ogrzewanie oparte o konwekcję i przewodnictwo cieplne. Ponadto, zlokalizowane, wewnętrzne ogrzewanie pojedynczych cząsteczek próbki najczęściej powoduje ich rozpad, zwiększając tym sposobem powierzchnię kontaktu z reagentami i szybkość rozkładu.

Mineralizacja ciśnieniowa polega na reakcji analizowanej próbki z kwasami mineralnymi w podwyższonej temperaturze w zamkniętym naczyniu z teflonu, zwanym bombą teflonową. Powstające w wyniku wydzielania gazów ciśnienie umożliwia stosowanie wyższych temperatur niż temperatury wrzenia kwasów w układach otwartych, a zatem skraca czas reakcji.

Naczynia stosowane w mineralizacji mikrofalowej muszą być wykonane z odpowiedniego materiału przepuszczalnego dla promieniowania mikrofalowego, który jednocześnie jest odporny chemicznie w stosunku do stężonych kwasów (teflon, kwarc – nieodporny na działanie kwasu fluorowodorowego).

Mineralizacja substancji organicznych powinna być całkowita w celu wyeliminowania oddziaływań matrycy, czyli składnika próbki, który występuje w dużym nadmiarze w stosunku do innych. Wiele substancji organicznych pod wpływem kwasów siarkowego i azotowego ulega sulfonowaniu i nitrowaniu i w tej postaci wytrzymuje nawet długotrwałe ogrzewanie. Pochodne sulfonowe i nitrowe mogą wykazywać zdolność kompleksowania i utrudniać dalsze oznaczanie śladów.

Żywność stanowi niekiedy trudny materiał analityczny ze względu na skomplikowany skład, dużą zawartość substancji organicznych, w tym cukrów, białek i tłuszczów, które trudno ulegają procesom mineralizacji.

Głównymi przyczynami błędów systematycznych w procedurach przygotowania roztworu badanego przed oznaczeniem analitycznym są straty pierwiastków spowodowane ich lotnością, adsorpcją oraz kontaminacją pochodzącą głównie z trzech źródeł: z naczyń, odczynników i pyłów zawartych w powietrzu.

Naczynia laboratoryjne oraz sprzęt stosowany w laboratorium powinny być wykonane z materiału obojętnego chemicznie, termicznie odpornego i pozbawionego zanieczyszczeń. Stężenie pierwiastków w bardzo rozcieńczonych roztworach może szybko ulegać zmianom w wyniku zjawisk adsorpcji i desorpcji zachodzących na powierzchni naczyń. Aby zminimalizować straty i możliwość zanieczyszczenia roztworu należy:

- używać naczyń z kwarcu, teflonu, tarflenu lub węgla szklanego (zwykle szkło nie jest materiałem odpowiednim);
- mycie i kondycjonowanie naczyń prowadzić za pomocą gorących oparów kwasów i pary wodnej;
- pomocniczy sprzęt laboratoryjny (np. do cięcia, rozdrabniania, suszenia) powinien być wykonany ze stali szlachetnej lub tworzyw syntetycznych, niebarwionych, łatwych do mycia.

W zasadzie nie można uniknąć wprowadzania zanieczyszczeń do badanego roztworu z odczynnikami, stosowanymi w procesie chemicznego przygotowania próbek. Stanowią one główne źródło zanieczyszczeń. Kwasy mineralne i odczynniki stosowane do mineralizacji, a także woda do rozcieńczania powinny być o wysokiej czystości. Ponadto, należy stosować jak najmniejsze objętości kwasów.

Ochronę przed pyłem unoszącym się w powietrzu laboratoryjnym można osiągnąć, stosując zamknięte naczynia oraz komory z laminarnym nawiewem oczyszczonego powietrza.

Straty niektórych pierwiastków (np. Hg, As, Se, Cd, Zn), jak również niektórych związków (np. tlenki, halogenki, wodorki niektórych metali) spowodowane ich lotnością występują głównie w wysokich temperaturach. Jednak straty np. rtęci i jej związków zachodzą już w temperaturze pokojowej, podczas zbierania i przechowywania próbek. Chlor w próbkach organicznych może powodować powstawanie lotnego chlorku oznaczanego składnika; węgiel substancji organicznej może redukować związki metali do postaci metalicznej, wykazującej znaczną prężność par w temperaturze mineralizacji. Błędy systematyczne spowodowane lotnością składników mogą być wyeliminowane przez stosowanie systemów zamkniętych albo przez stosowanie procedur niskotemperaturowego roztwarzania próbek.

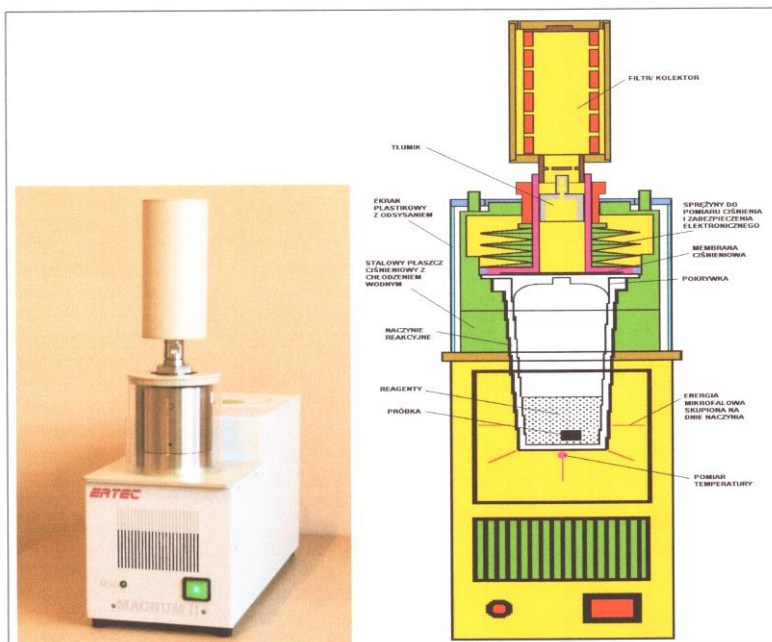
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. CEL ĆWICZENIA

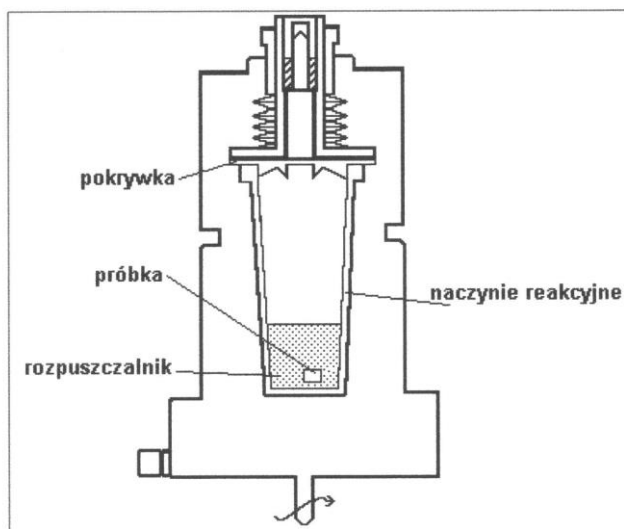
Celem ćwiczenia jest poznanie sposobu mineralizacji mikrofalowej w systemie zamkniętym próbek produktów spożywczych.

2.2. APARATURA

Reaktor/mineralizator mikrofalowy Ertec MAGNUM II składa się z obudowy metalowej, wewnątrz której umieszczony jest zespół zasilający z generatorem mikrofal w postaci magnetronu synchronicznego z falowodem. Na falowodzie zamocowana jest głowica ciśnieniowa reaktora. Głowica przykryta jest osłoną z tworzywa sztucznego zatrzymującą opary rozpuszczalników (rys. 1). Naczynie reakcyjne z pokrywką wykonane jest z teflonu, a na nim umieszczono metalową membranę bezpieczeństwa (rys. 2), która ulega zniszczeniu w wypadku gwałtownego wzrostu ciśnienia i pozwala na rozprężenie gazów otworami w korpusie górnym głowicy mineralizacyjnej. Tłumik-łapacz oparów chroni przed nieprzyjemnymi wrażeniami akustycznymi podczas gwałtownego rozprężania gazów. Mineralizator wyposażony jest w system kontroli mocy odbitej. Duże poziomy mocy odbitej mogą wystąpić w następstwie braku próbki w naczyniu reakcyjnym i mogą stanowić zagrożenie dla trwałości naczynia teflonowego. Reaktor jest sterowany z komputera typu PC.



Rys. 1. Budowa mikrofalowego mineralizatora ciśnieniowego Magnum II



Rys. 2. Budowa teflonowego naczynia mineralizacyjnego i umieszczenie próbki

3. WYKONANIE ĆWICZENIA

1. Na wadze analitycznej odważyć z dokładnością 0,0001 g kaszkę i rybę (patrz: tabela 1), mleko odmierzyć za pomocą pipety.
2. Osadzić pierścień stalowy we wnęce korpusu dolnego.
3. Próbkę umieścić w naczyniu teflonowym i zalać odpowiednią ilością kwasu lub mieszaniny kwasów. Jeśli po wprowadzeniu nastąpi gwałtowna reakcja, odczekać, aż do jej ustania.
4. Naczynko teflonowe przykryć pokrywką teflonową z umieszczoną na jej wierzchu metalową membraną bezpiecznika ciśnieniowego.
5. Zamknięte naczynko ostrożnie umieścić we wnęce korpusu dolnego głowicy reaktora.
6. Na korpus dolny nałożyć korpus górny głowicy i przekręcić w prawo aż do oporu (zamknięcie bagnetowe).
7. Ręcznie, a następnie za pomocą klucza nasadowego dokręcić nakrętkę dociskową zaworu ciśnieniowego korpusu głowicy.
8. Na głowicę nałożyć osłonę z tworzywa.
9. Odkręcić zawór wodny.
10. Włączyć zasilanie włącznikiem na przedniej ścianie reaktora.
11. Ustawić wymaganą liczbę cykli i odpowiednie czasy za pomocą programu komputerowego i uruchomić procedurę.
12. Po zakończeniu procesu chłodzenia można otworzyć głowicę reakcyjną. Nie ściągając osłony z tworzywa, przytrzymać kluczem głowicę ręką, a drugą ręką za pomocą klucza nasadowego odkręcić nakrętkę dociskową.
13. Powoli przekręcić osłonę w lewo do oporu i odczekać, aż zostaną usunięte opary. Zdjąć osłonkę i korpus górny głowicy.
14. Wyjąć naczynko teflonowe, podważając kluczem metalowy pierścień pod kołnierzem naczynia. Odłożyć pierścień metalowy. Oczyszczyć wnękę korpusu dolnego.
15. Otworzyć naczynie teflonowe, przelać próbkę do kolby miarowej i dopełnić wodą.

Ad. 11. Po uruchomieniu programu sterującego przechodzimy do zakładki „Automat” i ustawiamy kolejno:

- czas chłodzenia końcowego na 20 min,
- liczbę cykli grzanie-chłodzenie (patrz tabela 1).

Dla każdego cyklu ustawiamy:

- czas grzania,
- czas pauzy,
- ciśnienie procesu,
- temperaturę procesu,
- poziom mocy mikrofalowej dla cyklu.

Tabela 1. Parametry mineralizacji próbek żywności

Próbka	I mleko 2%	II kaszka	III ryba
Wielkość próbki	1 ml	1 g	1 g
Parametry procesu	1 cykl: 7 min./100%, 45-42 atm.	4 cykle: a. 1 min/50%, 20-17 at b. 1 min/60%, 30-27 at, 30 sek/0% c. 2 min/70%, 35-52 at., 30 sek/0% d. 2 min/80%, 45-42 at	4 cykle: a. 2 min/80%, 20-17 at, b. 1 min/60%, 30-27 at, 30 sek/0% c. 2 min/70%, 35-52 at, 30 sek/0% d. 2 min/80%, 45-42 at.
Chłodzenie	20 min	20 min	20 min
Rozpuszczalniki	7 ml HNO ₃	7 ml HNO ₃ + 3 ml H ₂ O ₂	7 ml HNO ₃

Pytania kontrolne

1. Jakie znasz sposoby mineralizacji próbek żywności?
2. Główne korzyści zastosowania mineralizacji mikrofalowej.
3. W jakich metodach analitycznych jest korzystne przeprowadzenie próbki do roztworu za pomocą mineralizacji mikrofalowej?
4. Jaki jest mechanizm grzania mikrofalowego?
5. Jakie są najczęstsze przyczyny błędów systematycznych w procesie mineralizacji mikrofalowej?
6. W jaki sposób prowadzi się mineralizację „na mokro”?
7. Budowa przyrządu do mineralizacji mikrofalowej.
8. Środki ostrożności jakich należy przestrzegać podczas mineralizacji mikrofalowej.
9. Przewidywane stężenie potasu w badanej próbce wynosi 40-100 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Zakres stężeń w oznaczeniu za pomocą spektrometru do absorpcji atomowej wynosi 0,4-2,4 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jakie rozcieńczenie próbki najlepiej przygotować?

Literatura

- [1] **Szczepaniak W.:** *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN 1996.
- [2] **Jarosz M., Malinowska E.:** *Pracownia chemiczna – analiza instrumentalna*, Wyd. Szkolne i Pedagogiczne 1994.
- [3] **Masłowska J. (red.):** *Instrumentalne metody identyfikacji i oznaczania składników żywności – Ćwiczenia laboratoryjne, część 2*, Wyd. Politechniki Łódzkiej 1998.

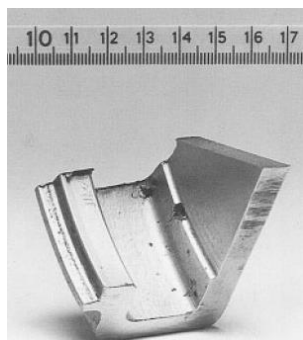
ĆWICZENIE 2

Oznaczanie niklu

1. WSTĘP

1.1. PROCES PRODUKCYJNY JAKO ŹRÓDŁO SKAŻENIA ŻYWNOŚCI NIKLEM

Większość maszyn produkcyjnych wykonanych z nierdzewnej stali zawiera w swoim składzie domieszkę niklu. Uwalnia się on jako efekt korozji bezpośrednio wskutek reakcji z obrabianym produktem w ekstremalnych warunkach fizycznych i chemicznych (np. soki owocowe – wysoka kwasowość, pasteryzacja – w wysokich temperaturach, czyszczenie maszyn – z wykorzystaniem preparatów chlorowych) [1].



Na zdjęciu widać wżery korozyjne w postaci plam na kawalku pompy używanej w produkcji keczupu. Zbudowana jest ona ze stali nierdzewnej typu AISI 316. Wystawiona była na następujące warunki fizykochemiczne:

*pH = 3,5
chlorek sodu 3,8%
temperatura 90°C*

1.2. PRODUKTY NATURALNE BOGATE W NIKIEL ORAZ PRODUKTY „SKAŻONE” NIKLEM

Nikiel występuje w sposób naturalny w przyrodzie – w wodzie, powietrzu i glebie. Zakres stężeń niklu w poszczególnych jego źródłach prezentuje się następująco (podane wartości mogą się wahać z uwagi na częsty wysoki stopień kontaminacji): [2]

Woda	5-100 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
Gleba	5-500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Rośliny	0,5-5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Zwierzęta	0,1-5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

W niektórych surowcach obserwujemy wysokie stężenie niklu, niezależne od stopnia zanieczyszczenia gleby. Surowce nieprzetworzone o wysokiej zawartości tego pierwiastka to m.in. pszenica, żyto, groch zielony, ziarna soi, owies,

ryż, orzechy ziemne. Wśród produktów przetworzonych wyróżnić można herbatę suszoną, czekoladę, suszone lub konserwowane nasiona roślin strączkowych, suszone lub puszkowane owoce [2]. Fizjologiczna śladowa obecność niklu w organizmach żywych jest czymś naturalnym i pożądanym, niezbędnym do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania. Jest on składnikiem grup prostetycznych metaloenzymów (np. pewne glioksalazy, deformylazy peptydów, reduktaza metylokoenzymu M, ureaza). Jednakże, w dawkach minimalnie większych niż wymagane staje się on toksykantem. Dla roślin o przeciętnej tolerancji niklu jest to granica $>50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy. W roślinach nadmiar niklu powoduje m.in. wypieranie innych metali z elementów funkcjonalnych organizmu (tj. enzymów), zakłóca proces mitozy i fotosyntezy oraz indukuje powstawanie reaktywnych form tlenu zaburzających ciągłość cząsteczek DNA [3].

Dziennie dorosły mieszkaniec rozwiniętego kraju europejskiego narażony jest na spożycie średnio $1,49\text{--}1,63 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ masy ciała dziennie. Największa średnia ekspozycja w badaniu *UK Total Diet Studies* wskazana została dla grupy wiekowej 1,5–4,5 lat. Wśród przebadanych 20 typów żywności, największe stężenia niklu zawarte były w orzechach, konfiturach i puszkowanych warzywach. Gdy jednak analizować wyniki w kontekście codziennej diety, większość endogennego niklu pochodzi z napojów (21%) i produktów zbożowych (16%). Zauważono jednak, że dawka ekspozycji na nikiel w ujęciu populacyjnym systematycznie malała przez okres ostatnich 30 lat [4].

1.3. SZKODLIWOŚĆ I KONSEKWENCJE ZDROWOTNE

Ekspozycja na nikiel w postaci pylistej jest bardzo szkodliwa dla człowieka, jednak w warunkach codziennych nie ma ryzyka kontaktu ze zbyt wysokim stężeniem niklu. Dziennie wdychamy $0,1\text{--}1 \text{ } \mu\text{g}$ niklu, wyłączając z tego dym papierosowy [5]. Na terenach miejskich stężenie niklu w powietrzu wg różnych źródeł może wynosić od 5×10^{-3} do nawet $170 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ [6–7]. Przy stężeniu $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ niklu z pyłów rafineryjnych w powietrzu prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwór w wyniku nieprzerwanej ekspozycji na ten czynnik kancerogeny przez okres 70 lat wynosi $2,4 \times 10^{-4}$ [8].

Akumulacja zaabsorbowanego w organizmie toksycznego niklu skutkuje rozwojem chorób płuc, nerek, choroby wieńcowej [7], jednak ponad 90% endogennego niklu nie jest adsorbowane i ulega sekrecji. Miarą zdolności metabolicznych szkodliwych metali jest ich biologiczny czas półtrwania czyli okres, w jakim organizm pozbywa się połowy ilości, jaka się do niego dostała [9].

Nikiel jest też kancerogenem, lecz z racji wysokiego wydalania rozpuszczalne formy niklu (chlorek, siarczan, azotan) stanowią zagrożenie tylko przy chronicznym poborze. Rakotwórcze własności są znacznie większym zagrożeniem ze strony związków nierozpuszczalnych (głównie siarczki). Związki takie wnikają do wnętrza komórki, gdzie oddziałują z białkami natywnymi, a poprzez

deregulację funkcji enzymatycznych pośrednio wywołują zaburzenia w ekspresji genetycznej. Prócz wspomnianej zdolności indukcji stresu oksydacyjnego, wpływają negatywnie na przebieg procesów epigenetycznych (funkcja proteolityczna wobec histonu H2A), początkują hipermetylację niektórych genów i osłabiają działanie enzymów zaangażowanych w procesy naprawy DNA (tzw. *nucleotide excision repair*) [7, 10-11].

1.4. ALERGENNOŚĆ

Nikiel jest silnym alergenem skórny. Szacuje się, że alergia dotykowa na nikiel to problem 4-13,1% populacji. Jedną z przyczyn uwrażliwienia na nikiel jest częsty kontakt skóry z wyrobami zawierającymi ten pierwiastek. Stąd problem alergii skórnej dotyczy głównie kobiet (noszenie metalowej biżuterii) i pewnych grup zawodowych (fryzjerzy, mechanicy samochodowi). Poza narażeniem na kontakt z niklem, wpływ na rozwinięcie odpowiedzi immunologicznej mają także czynniki genetyczne oraz klimat (większa podatliwość oznacza częstsze mycie nikiel z produktów codziennego użytku) [2, 12].

Istnieje pogląd iż nikiel to także alergen pokarmowy, choć aktualnie jest to jeszcze teza nie w pełni zbadana i kontrowersyjna [13]. Szacowana podaż dobowego tego pierwiastka wynosi 109-222 µg [14-15]. W przeciwieństwie do efektu kancerogennego, będącego skutkiem powolnego odkładania się jonów w organizmie, w przypadku nadwrażliwości immunologicznej, nawet najmniejsze ilości niklu mogą wywoływać efekty podobne do tych towarzyszących alergii skórnej i znane są kliniczne przypadki ludzi wrażliwych na nikiel dostarczany drogą pokarmową [16].

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. CEL PRACY

Zadanie polega na oznaczeniu zawartości niklu w próbkach organicznych. Z mineralizatu nikiel ekstrahowany jest do roztworu wodnego, a następnie poddawany analizie ilościowej.

2.2. MINERALIZACJA PRÓBEK

Mineralizację prowadzi się w celu rozkładu związków organicznych do prostych, stabilnych związków nieorganicznych i usunięciu z parą wodną takich pierwiastków jak wodór, węgiel, siarka i azot. Mineralizacja próbek odbywa się poprzez ogrzewanie analitu poddanego działaniu silnego kwasu utleniającego (HNO₃).

2.3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- 20% roztworu cytrynianu sodowego $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$
- 10% roztwór chlorowodoru hydroksyloaminy $NH_2OH \cdot HCl$
- 1% roztwór dimetylogliksymu w metanolu
- Amoniak – stężony
- Chloroform – stężony
- Amoniak – rozcieńczenie 1:50
- $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwas solny HCl

3. WYKONANIE OZNACZENIA

3.1. EKSTRAKCJA NIKLU

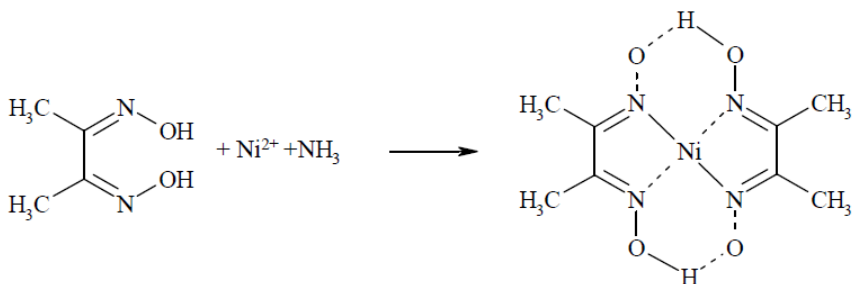
Protokół postępowania

Do badanego roztworu dodaj:

- 5 ml 20% roztworu cytrynianu,
- 2 ml 10% roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy $NH_2OH \cdot HCl$,
- 2 ml roztworu dimetylogliksymu,
- stężonego amoniaku do osiągnięcia pH ok. 9,
- wytrząsać 1 min w rozdzielaczu z 10 cm^3 chloroformu $CHCl_3$,
- ekstrakt chloroformowy (dolna faza) wytrząsać z 50 cm^3 porcją amoniaku 1:50,
- reekstrahować poprzez wytrząsanie roztworu chloroformowego (dolna faza) z 10 cm^3 $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl,
- zebrać fazę nieorganiczną (górną).

Chemiczny opis procesu

Zastosowana metoda opiera się na barwnej reakcji kompleksowania niklu z dimetylogliksymem, w wyniku której tworzy się brunatno-czerwony osad $Ni(Hdmg)_2$ rozpuszczalny w wodzie. Reakcja zachodzi w środowisku zasadowym, w obecności substancji utleniającej. Obecność cytrynianu zapobiega hydrolizie niektórych metali. Obecność reduktora (chlorowodoru hydroksyloaminy) zapewnia ilościowe wyekstrahowanie niklu w postaci dimetylogliksymianu.



Dimetylogliksymian niklu rozpuszcza się w chloroformie dając żółte zabarwienie, ale zbyt subtelne by mogło podlegać analizie kolorymetrycznej. Ekstrakcja pozwala oddzielić nikiel od innych metali, takich jak miedź, kobalt, żelazo, chrom, glin, mangan [17].

3.2. ANALIZA ILOŚCIOWA METODĄ ASA

Absorpcyjna spektrometria atomowa (ASA)/(Atomic absorption spectroscopy) (AAS)

Instrumentalna technika analizy ilościowej wykorzystująca absorpcję promieniowania przez atomy w stanie gazowym. Przejście atomów analitu z fazy stałej lub ciekłej do fazy gazowej zachodzi bezpośrednio w płomieniu bądź w kuwecie grafitowej pod wpływem wysokiej temperatury. Wolne atomy absorbują ultrafiolet lub światło widzialne o ściśle określonej częstotliwości. Uzyskany pomiar interpretuje się w oparciu o krzywą wzorcową [18].

Pytania kontrolne

1. W jakim celu wykonuje się pomiar poziomu niklu w produktach spożywczych? Jakie ma to znaczenie dla konsumentów i producentów żywności?
2. Pomiar poziomu niklu w próbkach spożywczych poprzedzaliśmy ekstrakcją chemiczną. Dlaczego?
3. Podaj przykład związku chelatującego jony niklu.
4. Czy producent żywności ma wpływ na zawartość niklu w wytwarzanych przez siebie produktach? Czy konsument ma możliwość całkowicie wyeliminować nikiel ze swojej diety?

Literatura

- [1] **Jellesen M.S., Rasmussen A.A., and Hilbert L.R.:** *A review of metal release in the food industry.* Materials and Corrosion, 2006. 57(5): pp. 387-393.
- [2] **Sharma A.:** *Relationship between nickel allergy and diet.* Vol. 73. 2007, pp. 307-312.

- [3] **Chen C., D. Huang and Liu J.:** *Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects*. CLEAN – Soil, Air, Water, 2009. 37(4-5): pp. 304-313.
- [4] **Rose M., et al.:** *Dietary exposure to metals and other elements in the 2006 UK Total Diet Study and some trends over the last 30 years*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010. 27(10): pp. 1380-404.
- [5] **Toxicological Profile for Nickel**. August 2005, U.S. Department of Health and Human Services Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- [6] **Guidelines for Drinking-Water Quality – Second Edition – Volume 2 – Health Criteria and Other Supporting Information – Addendum**. 1998, World Health Organization.
- [7] **Adamczyk M. and Bal W.:** *Współczesne poglądy na kancerogenezę metali – mechanizmy molekularne kancerogenezy jonów niklu*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2006. 39(4): pp. 361-370.
- [8] **Unit Risk Factors for Inhalation**. August 2011, New Jersey Department of Environmental Protection, Division of Air Quality, Bureau of Technical Services, Air Quality Evaluation Section.
- [9] **Menezes L.M., Quintao C.A. and Bolognese A.M.:** *Urinary excretion levels of nickel in orthodontic patients*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2007. 131(5): pp. 635-8.
- [10] **Karaczyn A.A., et al.:** *Truncation of histone H2A's C-terminal tail, as is typical for Ni(II)-assisted specific peptide bond hydrolysis, has gene expression altering effects*. Ann Clin Lab Sci, 2009. 39(3): pp. 251-62.
- [11] **Hartwig A., et al.:** *Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells*. Cancer Res, 1994. 54(15): pp. 4045-51.
- [12] **Torres F., et al.:** *Management of contact dermatitis due to nickel allergy: an update*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2009. 2: pp. 39-48.
- [13] **Pizzutelli S.:** *Systemic nickel hypersensitivity and diet: myth or reality?* Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2011. 43(1): pp. 5-18.
- [14] **Haber L.T., et al.:** *Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts*. Regul Toxicol Pharmacol, 2000. 31(2 Pt 1): pp. 231-41.
- [15] **Domingo J., Perelló G. and Giné Bordonaba J.:** *Dietary Intake of Metals by the Population of Tarragona County (Catalonia, Spain): Results from a Duplicate Diet Study*. Biological Trace Element Research: pp. 1-6.
- [16] **Krecisz B., et al.:** *Systemic contact dermatitis to nickel present in cocoa in 14-year-old boy*. Pediatr Dermatol, 2011. 28(3): pp. 335-6.
- [17] **Marczenko Z.:** *Spektrofotometryczne oznaczanie pierwiastków*. 2001, Warszawa: PWN.
- [18] **Janusa M.A. and Beck J.N.:** *Recent applications of flame atomic absorption spectrometry to environmental measurements*. LAPS, 2002. 37(2): pp. 137-186.

ĆWICZENIE 3

Oznaczanie zawartości Cu (II) w środkach spożywczych

1. WSTĘP

1.1. WYSTĘPOWANIE MIEDZI W GLEBACH I ORGANIZMACH ROŚLIN I ZWIERZĄT

Miedź o liczbie atomowej $Z = 29$ i konfiguracji elektronowej $3d^{10} 4s^1$ należy do pierwiastków śladowych o bardzo dużym znaczeniu przemysłowym i biologicznym.

W glebach miedź jest silnie wiązana przez substancję organiczną oraz minerały ilaste, a także wytrąca się w postaci siarczanów, siarczków, węglanów, dając w efekcie mało mobilne formy. Tylko niewielka część miedzi w glebach występuje w formach łatwo rozpuszczalnych i wymiennych. Mechanizm wiązania miedzi w glebach polega na procesach adsorpcji, okluzji i wytrącania, chelatowania i powstawania związków kompleksowych oraz wiązaniu przez mikroflorę. Bioprzyswajalność miedzi związanej z substancją organiczną zależy od ciężaru cząsteczkowego. Związki organiczne o niskim ciężarze cząsteczkowym, które są uwalniane podczas rozkładu substancji organicznej lub wprowadzane z organicznymi odpadami zwiększają mobilność miedzi, natomiast torfowa substancja organiczna i kwasy huminowe unieruchamiają miedź. Do czynników, które wpływają na rozpuszczalność, migrację i przyswajalność miedzi w glebach należą: odczyn gleby, substancja organiczna, bezpostaciowe wodorotlenki metali, ilość i rodzaj minerałów ilastych oraz interakcje z innymi pierwiastkami. Zawartość miedzi w naturalnych roztworach glebowych jest bardzo zróżnicowana i mieści się w granicach $3\text{--}135 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Zawartość miedzi w różnych rodzajach gleb polskich (ppm s.m.) podano w tabeli 2.

Tabela 2. Zawartość miedzi w różnych rodzajach gleb polskich (ppm s.m.)

Rodzaj lub typ gleby	Zakres	Średnia
Piaszczyste	1-26	8
Pyłowe	8-54	19
Gliniaste	15-60	20
Aluwialne	16-28	22
Rędziny	7-54	16
Brunatne	4-36	16
Czarnoziemy	6-53	19
Organiczne	1-110	6

Według najnowszych badań średnia zawartość miedzi w glebach krajowych wynosi 6,5 ppm, przy zakresie od 0,2 do 725 ppm.

Gleby są narażone na zanieczyszczenie miedzią z różnych źródeł. Poza wpływem emisji przemysłowych miedź dostaje się do gleb łącznie z niektórymi nawozami mineralnymi i organicznymi, a także z preparatami ochrony roślin i z odpadami komunalnymi. Zawartość miedzi w zanieczyszczonych glebach (ppm s.m.) podano w tabeli 3.

Tabela 3. Zawartość miedzi w zanieczyszczonych glebach (ppm s.m.)

Lokalizacja lub źródło	Kraj	Zawartość
Górnictwo i hutnictwo	Wielka Brytania	13-2000
	Belgia	16-1089
	Polska	72-620
Ogrody działkowe, sady, parki	Australia	210
	Kanada	11-130
	Polska	12-240
Odpady i ścieki komunalne, nawożenie, nawadnianie	Wielka Brytania	40-800
	Niemcy	187-280
	Polska	80-1600
Fungicydy	Wielka Brytania	60-380
	Kenia	833
	Niemcy	273-522

Najczęściej przyjmowana granica dopuszczalnej zawartości miedzi w glebach wynosi 100 ppm i jest ona przekraczana wielokrotnie w niektórych glebach zanieczyszczonych.

Miedź jest biopierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmów roślin. Wchodzi w skład różnych białek i enzymów. Jej biochemiczne funkcje i właściwości to:

- udział w procesach fotosyntezy, oddychania, przemian związków azotowych i powstawania białek, transportu węglowodanów oraz metabolizmu błon komórkowych poprzez wpływ na ich przepuszczalność,
- regulacja procesów powstawania DNA i RNA,
- udział w mechanizmach odpornościowych na choroby.

Na pokrycie fizjologicznych potrzeb większości roślin wystarczają małe stężenia miedzi powyżej 2 ppm s.m. Przeciętna zawartość miedzi w częściach nadziemnych roślin wynosi 5-20 ppm.

Miedź jest też najważniejszym biometalem dla człowieka, a jej zawartość w organizmie waha się w granicach 80-120 mg. Dzielne zapotrzebowanie na ten pierwiastek wynosi 1,5-4,0 mg. Stopień przyswajania miedzi przez organizmy

zależy od jej formy w pożywieniu i wynosi średnio dla człowieka 5-20% całkowitej dawki. Jest łatwo przyswajalna z mleka oraz młodych warzyw.

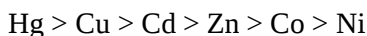
Podstawowa rola miedzi w organizmach zwierzęcych wiąże się z jej występowaniem w różnych enzymach biorących udział w procesach oksydacyjno-redukcyjnych. Jest aktywnym składnikiem hemocyjaniny (barwnik krwi niektórych bezkręgowców) oraz oksydazy cytochromowej c, która bierze udział w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym.

Do ważnych białek zawierających miedź należy ceruloplazmina. Jest to bardzo złożony związek koordynacyjny zawierający 8 atomów miedzi w cząsteczce. Jej funkcja to transport i przechowywanie miedzi. Przede wszystkim zaś bierze ona udział w wiązaniu żelaza (III) z apotransferyną. Utworzona w ten sposób transferyna przenosi żelazo do układów krwiotwórczych. Miedź bierze też udział w procesach utwardzania kolagenu, keratynizacji włosów oraz syntezy melaniny (barwnika skóry), a także wpływa na biosyntezę hemoglobiny, metabolizm lipidów i właściwości mielinowej osłonki włókien nerwowych. Niedobór miedzi powoduje zaburzenia w wyżej wymienionych procesach, które objawiają się różnymi zespołami chorobowymi, takimi jak: anemie, ograniczenia wzrostu i płodności, zaburzenia systemu nerwowego i choroby układu krążenia.

Miedź w formie połączenia koordynacyjnego zwanego dysmutazą nadadtlenkową (Cu, Zn – SOD) występuje też w cytoplazmie każdej komórki u *Eucariota*. Jest to jeden z najważniejszych naturalnych antyutleniaczy w komórce żywej, zapobiegający wielu chorobom w tym i nowotworowym. Warto zaznaczyć, że tylko miedź związana z bioligandami może być biologicznie wykorzystana. Inna jej forma stanowi zagrożenie dla człowieka, powodując wiele chorób, w tym zespół Menkesa. Jest to choroba powodująca upośledzenie fizyczne i umysłowe (choroba stałowych włosów). Kolejnym schorzeniem spowodowanym nadmiarem niezwiązanej miedzi jest zespół Wilsona (zwyrodnienie wątrobowo-soczewkowe). Objawia się on marskością wątroby, uszkodzeniem ośrodkowego układu nerwowego i gałki ocznej. Te choroby prowadzą do nieuniknionej śmierci pomiędzy 5 a 50 rokiem życia.

Miedź łatwo tworzy połączenia z różnymi białkami. Jednym z takich białek jest metalotioneina. Proteina ta zawiera grupy sulfhydrylowe wiążące miedź i odpowiada za zwiększoną zawartość tego metalu w wątrobie. Nadmiar miedzi w diecie człowieka wiąże się przede wszystkim ze zmianami w wątrobie, a następnie z uszkodzeniem nerek, tkanki mózgowej oraz naczyń wieńcowych i mięśnia sercowego.

Największe powinowactwo do tionein wykazują jony metali przejściowych na drugim stopniu utlenienia i maleje ono w następującej kolejności:

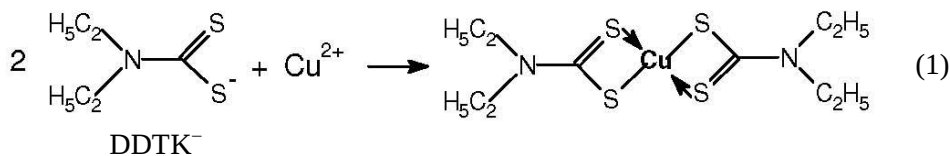


Jon o większym powinowactwie wypiera z połączenia białkowego jon o mniejszym powinowactwie. Większość tych jonów metali indukuje syntezę tionein *de novo* (na nowo). Na przykładzie Cd (II) wykazano, że jon ten w kompleksie z tioneiną jest znacznie mniej toksyczny niż wolne jony Cd^{2+} . Wykazano również, że kompleks Cu (II) z ceruloplazminą silniej kumuluje się w tkankach niż kompleks Cu (II) z albuminą.

1.2. METODY OZNACZANIA Cu (II)

Do ilościowego oznaczania Cu (II) można wykorzystać wiele metod analitycznych takich, jak np. gravimetryczne, elektrochemiczne, chromatograficzne i spektrofotometryczne. Przedstawiona poniżej metoda spektrofotometrycznego oznaczania Cu (II) w postaci kompleksu z DDTK jest również przydatna do oznaczania wielu innych pierwiastków (tabela 4).

Dietyloditiokarbaminian sodu (DDTK) jest białym krystalicznym proszkiem. Bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie. Rozpuszcza się także w etanolu. Jest praktycznie nierozpuszczalny w eterze oraz w chloroformie. DDTK tworzy kompleksy z wieloma pierwiastkami. Zgodnie z Marczenko [4] reakcja z Cu (II) przedstawiona jest równaniem (1):



Rys. 3. Reakcja powstawania kompleksu dietyloditiokarbaminianu z miedzią [4]

Kompleksy metali z DDTK dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, co umożliwia ich ekstrakcję z roztworów wodnych. W tabeli 4 przedstawiono jony metali, które można oznaczać za pomocą DDTK z wykorzystaniem ekstrakcji kompleksu do warstwy CCl_4 lub CHCl_3 .

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest poznanie bardzo dokładnej i wygodnej metody spektralnej oznaczania śladowych ilości Cu (II) w próbkach z wykorzystaniem barwnego kompleksu chelatowego Cu (II) z dietyloditiokarbaminianem sodu (DDTK).

2.2. ZASADA METODY OZNACZANIA Cu (II)

Metoda oznaczania Cu (II) polega na powstawaniu żółtego kompleksu Cu(II) z DDTK. Kompleks ten jest wewnętrznym chelatem rozpuszczalnym w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak np. alkohol izoamylowy, tetrachlorek węgla i chloroform, co wykorzystuje się szeroko w analizie. Ekstrakcja znacznie zwiększa wykrywalność, gdyż stężenie chelatu w rozpuszczalniku jest wyższe niż w roztworze wodnym.

Podczas oznaczania Cu (II) przeszkadzają następujące jony metali: Fe (III), Bi (III), Mn (II), Ni (II), Co (II), Cr (III), Mo (VI) i U (VI), które także tworzą kompleksy z DDTK. Do zamaskowania ich obecności stosuje się EDTA w środowisku zawierającym winian (pH 8-9). EDTA nie maskuje obecności Bi (III) i Tl (III). Redukcja Tl (III) do Tl (I) umożliwia jednak wykonanie oznaczania. Kation Bi (III) należy oddzielić z ekstraktu zawierającego kompleksy metali z DDTK za pomocą HCl o stężeniu $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tabela 4. Warunki dla powstawania i ekstrakcji kompleksów metali z DDTK

Pierwiastek	Zakres pH				Maksimum absorpcji w CCl ₄ [nm]
	Powsta- wania kom- pleksu	Ekstrakcji kompleksu do			
		CHCl ₃	CCl ₄	CCl ₄ w obecności EDTA*	
Ag (I)	2-14	2,6-5	4-11	4-11	340
As (III)	2-6	3-6	4-5,8	4-5,8	440
Cd (II)	2-14	2-14	4-11	4-6 (+)	340
Co (II)	2-14	2-14	4-11	4-6 (+)	650, 480, 367, 323
Cr (III)	2-6	2-6	4-11 (-)	—	—
Cu (II)	2-14	2-14	4-11	4-11	436
Fe (III)	2-9	2-9	4-9,8	4-6 (+)	600
Hg (II)	2-14	2-14	4-11	4-11	340
Mn (II)	2-9	2-9	6-9	4-11 (-)	505, 355
Mo (VI)	2-9	2-9	4 (+)	—	—
			5-11 (-)	—	—
Ni (II)	2-14	2-14	4-11	4-5,5 (+) 5,5-11 (-)	393, 326
Pb (II)	2-14	3-9,5	4-11	4-5	340
Pd (II)	2-14		4-11	4-11	348, 305
Tl (I)	2-14	2-14	4-11	4-6,5	410
Tl (III)	2-14	2-14	4-11	4-11	426

(+) ulega częściowej ekstrakcji; (-) nie ulega ekstrakcji.

*EDTA nazwany kompleksorem III – jest to sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego $(\text{NaOOCCH}_2\text{C})_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})_2$; EDTA tworzy kompleksy z jonami metali bez względu na ich stopień utlenienia w stosunku $\text{Me}^{n+} : \text{EDTA} = 1 : 1$.

2.3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- roztwór wzorcowy Cu (II) zawierający 0,1 mg miedzi w 1 cm³;
- roztwór wzorcowy Cu (II) zawierający 1 µg miedzi w 1 cm³;
- kwas siarkowy H₂SO₄ cz.d.a. o stężeniu 5 mol·dm⁻³;
- kwas azotowy HNO₃ cz.d.a. o stężeniu 15 mol·dm⁻³;
- 0,1% roztwór DDTK doprowadzony roztworem amoniaku do pH 8,0 – (jego trwałość maleje ze spadkiem pH, należy go przechowywać w ciemnej butelce!);
- CCl₄ cz.d.a., świeżo przedestylowany (temp. wrzenia 350,6 K);
- 20% roztwór winianu sodowo-potasowego KNaC₄H₄O₆, oczyszczony ekstrakcyjnie od śladów Cu (II) za pomocą DDTK;
- stężony roztwór amoniaku NH₃ · H₂O cz.d.a. (ok. 18%);
- woda redestylowana o przewodnictwie niższym niż 0,1 µS.

2.4. APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY

- rozdzielacz o pojemności 20 cm³;
- mikrobiureta na 10-25 cm³;
- kolby miarowe 1000, 100, 20 i 10 cm³;
- mineralizator mikrofalowy MAGNUM II (ERTEC, Polska);
- waga analityczna;
- spektrofotometr UV-VIS, firmy Hewlett-Packard (Niemcy), komplet kuwet.

Roztwór wzorcowy Cu (II) zawierający 0,1 mg miedzi w 1 cm³

Odważyć 393 mg CuSO₄ · 5H₂O cz.d.a. i przenieść do kolby miarowej o pojemności 1 dm³. Dodać niewielką ilość wody redestylowanej i 2 cm³ H₂SO₄ cz.d.a. o gęstości 1,3 g·cm⁻³ do pełnego rozpuszczenia soli. Uzupełnić kolbę wodą redestylowaną do kreski oraz wymieszać.

Roztwór wzorcowy Cu (II) zawierający 1 µg miedzi w 1 cm³

Do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ odmierzyć 1 cm³ roztworu wzorcowego zawierającego 0,1 mg miedzi w 1 cm³ i uzupełnić wodą redestylowaną do kreski oraz wymieszać.

3. WYKONANIE OZNACZENIA

3.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

Próbki do analizy przygotowuje się poprzez poddanie ich ciśnieniowej mineralizacji mikrofalowej metodą „na mokro”. Próbkę o masie 0,5-1,0 g odważonej z dokładnością $\pm 0,0001$ g lub o znanej objętości ($1-3\text{ cm}^3$) umieścić w teflonowym naczyniu mineralizacyjnym, zalać $6-8\text{ cm}^3$ HNO_3 o stężeniu $5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ i ogrzewać zgodnie z ustalonym wcześniej programem mineralizacji. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej mineralizat przenieść do kolbki miarowej o pojemności 10 cm^3 i uzupełnić wodą redestylowaną do kreski oraz wymieszać.

3.2. SPOSÓB PRZYGOTOWANIA KRZYWEJ WZORCOWEJ SŁUŻĄCEJ DO OZNACZANIA Cu (II)

Do 8 kolb miarowych o pojemności 10 cm^3 odmierzyć za pomocą mikrobiurety kolejno: 0 (ślepa próba); 0,6; 1,2; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 i $5,0\text{ cm}^3$ roztworu wzorcowego zawierającego $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ Cu (II) i do każdej dodać po 1 cm^3 H_2SO_4 . Następnie wszystkie kolbki dopełnić do kreski wodą redestylowaną i wymieszać. Otrzymane roztwory zawierają odpowiednio 0; 0,6; 1,2; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 i $5,0\text{ }\mu\text{g}$ Cu w 10 cm^3 .

Tabela 5. Zestawienie wyznaczonych wartości absorpcji roztworów wzorcowych zawierających Cu (II); $\lambda = 440\text{ nm}$

Lp.	Zawartość Cu (II) [μg]	Absorbancja
1	0,0	
2	0,6	
3	1,2	
4	1,5	
5	2,0	
6	3,0	
7	4,0	
8	5,0	

Każdy z otrzymanych roztworów do krzywej wzorcowej poddać postępowaniu opisanemu w punkcie 3.3 (w miejsce mineralizatu pobrać 10 cm^3 odpowiedniego roztworu). Zmierzyć absorbancję barwnych roztworów w 1 cm kuwecie względem CCl_4 przy długości fali $\lambda = 440\text{ nm}$. Uzyskane wyniki pomiarów zapisać w tabeli 5 i wykonać wykres przedstawiający krzywą wzorcową w układzie współrzędnych absorbancja w funkcji stężenia Cu (II): $A = f(c_{\text{Cu}})$.

3.3. WYKONANIE OZNACZENIA Cu (II) W PRÓBCE BADANEGO MINERALIZATU

Objętość 10 cm³ badanego mineralizatu umieścić w rozdzielaczu o pojemności 20 cm³. Dodać ostrożnie, po kropli 4 cm³ NH₃ · H₂O. Dodać 2 cm³ roztworu KNaC₄H₄O₆, 5 cm³ 0,1% roztworu DDTK oraz 2 cm³ CCl₄ i wytrząsać w ciągu 3 minut. Po oddzieleniu warstw oddzielić fazę organiczną (dolną) do kolbki miarowej o pojemności 10 cm³. Powtórzyć ekstrakcję jeszcze dwukrotnie. Połączone ekstrakty w kolbie miarowej uzupełnić do kreski za pomocą CCl₄ i wymieszać. Zmierzyć absorbancję barwnego roztworu przy długości fali $\lambda = 440$ nm, stosując jako odnośnik CCl₄. Zawartość Cu (II) w badanym roztworze odczytać z krzywej wzorcowej.

3.4. SPOSÓB PRZYGOTOWANIA SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie powinno zawierać krótki wstęp teoretyczny dotyczący wybranej metody oznaczania Cu (II) i opis wykonanych czynności. Należy podać także sposób przygotowania roztworów odczynnika kompleksującego oraz winianu sodowo-potasowego, jeżeli je przygotowywano w trakcie ćwiczenia. Ponadto należy zamieścić tabelę wyników uzyskanych podczas sporządzania krzywej wzorcowej oraz wyników oznaczania Cu (II) w próbkach badanych. W sprawozdaniu należy zamieścić wykonaną krzywą wzorcową.

Pytania kontrolne

1. Podaj zawartość miedzi w różnych rodzajach gleb. Jak kształtuje się ilość miedzi w glebach zanieczyszczonych?
2. Jak zachowuje się miedź w glebach?
3. Jaka jest rola miedzi w organizmach roślinnych?
4. Jakie funkcje spełnia miedź w organizmie ludzkim?
5. Na czym polega sposób mineralizacji próbek metodą „na mokro”?
6. Jakich zasad należy przestrzegać podczas wykonywania oznaczeń metodą spektrofotometryczną?
7. Jak przygotowuje się krzywą wzorcową?
8. Na czym polega zasada oznaczania Cu (II) w tym ćwiczeniu?

Literatura

- [1] **Minczewski J., Marczenko Z.:** *Chemia analityczna*, PWN, Warszawa 1998.
- [2] **Hay R.W.:** *Chemia bionieorganiczna*, PWN, Warszawa 1990.
- [3] **Kabata-Pendias A., Pendias H.:** *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, PWN, Warszawa 1999.
- [4] **Marczenko Z.:** *Spektrofotometryczne oznaczanie pierwiastków*, PWN, Warszawa 1979.
- [5] **Szczepaniak M.:** *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa 2002.
- [6] **Bielański A.:** *Podstawy chemii nieorganicznej*, PWN, Warszawa 2002.

ĆWICZENIE 4

Oznaczanie azotanów (V) i azotanów (III) w próbkach warzyw

1. WSTĘP

1.1. ZNACZENIE BIOLOGICZNE

W przyrodzie azotany (III) i azotany (V) występują po pierwsze w postaci naturalnych pokładów oraz jako produkty rozkładu organicznych substancji azotowych. Po drugie mogą pochodzić z gleby nawożonej nawozami mineralnymi albo ze ścieków przemysłowych. Poza tym azotany (III) i azotany (V) są stosowane do peklowania mięs [1].

Warzywa i ich przetwory są głównym źródłem azotanów (III) i azotanów (V). Polskie źródła podają, że około 75% spożywanych azotanów pochodzi z warzyw [2]. Typowymi warzywami zawierającymi azotany są: buraki, sałata, rzodkiewka, szpinak, pietruszka, marchew.

Azotany w organizmie wchłaniają się łatwo. Czynnikiem działającym jest jon azotanowy (III). Azotany (V) natomiast są redukowane do azotanów (III) poprzez enzym wytwarzany przez pałeczkę okrężnicy (*Escherichia coli*), bakterie z grupy coli i inne wchodzące w skład mikroflory układu pokarmowego [3].

W zależności od warunków panujących w przewodzie pokarmowym, tj. pH i składu mikroflory a także składu pożywienia i jego mikroflory redukcja postępuje od azotanów (V), przez azotan (III), tlenek azotu (V), hydroksyaminę do amoniaku [3].

Azotany (III) są wchłaniane z żołądka, a wydalanie azotanów (III) w moczu wynosi w ciągu 8 godzin 90% dawki. Pomimo, iż ilość wydalanych azotanów (III) zależy od wielkości dawki to nie stwierdza się ich obecności w moczu. Wynika z tego, że azotany (III) po wchłonięciu są utleniane do azotynów (V) [4].

Obecność azotanów w ślinie jest wynikiem działania mikroflory obecnej w jamie ustnej. Azotany (V) są redukowane do azotynów (III) poprzez działanie reduktazy azotanowej i mikroflory [4].

Ilość azotanów (III) w ślinie zależy od aktywności reduktazy azotanowej jak i od ilości spożytej żywności, która zawiera dużą ilość azotanów (V).

Spożywanie ich przez ludzi dorosłych, przy racjonalnym żywieniu nie nasuwa zastrzeżeń. Inaczej jest w przypadku dzieci, a zwłaszcza niemowląt. Powodem zatrucia jest przemiana azotanów (V) do azotanów (III) i następnie hemoglobiny w methemoglobinę (zaburzenia w wymianie tlenowej krwi). Szczególnie groźne jest to we wczesnym okresie życia ponieważ we krwi

niemowląt występuje hemoglobina płodowa. Łatwo ulega ona przemianie, ale znacznie trudniej redukuje się z powrotem do hemoglobiny w tym okresie życia [5].

Zawartość hemoglobiny płodowej u dorosłych ludzi wynosi do 0,4% przy czym u niemowląt jest to 60-80%. Hemoglobina płodowa różni się od hemoglobiny między innymi kolejnością aminokwasów [5].

Pierwsze objawy zatrucia azotanami można zauważyć po przyjęciu dawki 1g azotanów (III). Zatrucie charakteryzuje się zaczerwienieniem twarzy, powłok skórnych. Występuje rozszerzenie obwodowych naczyń tętniczych i spadek ciśnienia tętniczego krwi. Często obserwuje się wymioty, biegunkę, bóle głowy, drgawki. W ciężkich przypadkach występuje sinica spowodowana porażeniem układu krążenia i obecnością methemoglobiny we krwi. Dawką śmiertelną dla dorosłego człowieka jest przyjęcie dawki 4g azotanów (III).

Azotany (V) ogólnie nie stanowią zagrożenia dla zdrowia człowieka. Zatrucia azotanami (V) są rzadkie, a skutki ich działania prowadzą do podrażnienia błony śluzowej przewodu pokarmowego [6].

Nie ma jednak jednoznacznego potwierdzenia, iż azotany są odpowiedzialne za powstawanie raka żołądka. Mogą się jednak przyczyniać do łatwiejszego powstawania toksycznych i rakotwórczych N-nitrozoamin [7].

ADI dla azotanów (V) wynosi od 0 do 5 mg·kg⁻¹ ciała człowieka, a dla azotanów (III) od 0 do 0,2 mg·kg⁻¹ [6].

Zawartość azotu (N) azotanów w wodzie powyżej 10 mg w 1l (około 50 mg NO₃⁻) stanowi duże niebezpieczeństwo zatruc dla dzieci.

Jest to tym ważniejsze, że azotany (III) są wytwarzane w organizmie wskutek odwodornienia amoniaku przy udziale dehydrogenaz wskutek czego następuje nitryfikacja grupy NH₂ przez bakterie [4].

Badania dotychczasowe wskazują na to, że naturalną drogą wchłaniania się azotanów (III) i (V) jest odcinek żołądkowo-jelitowy. Wykorzystują one ten sam system transportu co jony jodkowe, chlorkowe, nadchloranowe czy rodankowe (tiocyjanianowe). Po wchłonięciu do krwioobiegu cała ilość azotanów (III) i azotanów (V) wędruje do wątroby. Tam następuje ich utlenianie (azotanów (III) do azotanów (V)), a następnie są wydalone z organizmu.

Mechanizmy działania azotanów (III) na funkcje trawienne, wydzielnicze oraz absorpcyjne błony śluzowej jelita cienkiego są przedmiotem intensywnych badań [8].

Azotany (III) i azotany (V) podlegają wieloetapowej redukcji w przewodzie pokarmowym i należy się liczyć z tym, że istnieje duże prawdopodobieństwo oddziaływania hydroksyloaminy oraz jonów amoniowych na śluzówkę jelita. Tworzenie się nitrozoamin w środowisku kwaśnym daje możliwość oddziaływania ich z kwasami nukleinowymi [8].

Dobowe spożycie azotanów (III) z żywnością może wynieść około 11 mg, a azotanów (V) może wynieść około 100 mg (z czego 86% pochodzi z jarzyn).

Woda i warzywa nie są jedynym źródłem azotanów. Znaczna ilość pochodzi może z peklowanego mięsa [9].

Azotany nadają mięsu odpowiednie właściwości sensoryczne oraz hamują rozwój niepożądanej patogennej mikroflory przede wszystkim *Clostridium botulinum*, która wytwarza silną toksynę zwaną jadem kiełbasianym czy *Clostridium perfringens* (laseczka zgorzeli gazowej). Im środowisko bardziej kwaśne tym skuteczność antybakteryjna większa.

Aby nie przekroczyć dopuszczalnej dawki azotanów (III) przy wytwarzaniu kielbas i wędlin stosuje się obecnie mieszkankę z NaCl. Zawiera ona 0,5-0,6% NaNO_2 . Azotany (V) stosuje się tylko i wyłącznie do produkcji kielbas typu salami. Dopuszczalna zawartość azotanów (III) według polskiej normy wynosi $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ produktu. Natomiast suma azotanów (III) i azotanów (V) nie może przekraczać $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ produktu.

W innego rodzaju wędlinach czy wyrobach garmazeryjnych ich suma nie może przekraczać $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ produktu.

1.2. METODY OZNACZANIA

1.2.1. AZOTANY (III)

Związki te można oznaczyć w dwojaki sposób.

Po pierwsze stosując metodę kolorymetryczną, najbardziej znaną pod nazwą metody Griessa. W środowisku kwaśnym azotany (III) reagują z pierwszorzędową aminą aromatyczną tworząc sól diazoniową. W następstwie sprzęgnięcia się tej soli z związkiem aromatycznym, który zawiera grupę $-\text{NH}_2$ lub $-\text{OH}$; powoduje powstanie barwnika azowego, który jest podstawą oznaczenia [10].

Metoda Griessa jest bardzo czuła, specyficzna, ale badany roztwór nie może zawierać substancji utleniająco-redukujących, barwnych ani takich które reagowałyby z azotanami, obniżając wynik [10, 11, 12, 13, 14].

Drugim sposobem oznaczenia jest oznaczenie redoksymetryczne.

Oznaczenie polega na miareczkowaniu roztworu o znanej ilości nadmanganianu potasu lub siarczaniu cerowego roztworem oznaczanego azotanu (III). Następnie odmiareczkuje się nieprzereagowaną ilość KMnO_4 mianowanym roztworem kwasu szczawiowego lub jodometrycznie. Unika się w ten sposób strat z powodu częściowego rozkładu azotanów (III) do tlenków (NO , N_2O_4) lub też braku reakcji nadmanganianu potasu w środowisku obojętnym lub zasadowym [11, 12].

1.2.2. AZOTANY (V)

I WAGOWO. Oznacza się jako $C_{20}H_{16}N_4 \cdot HNO_3$

Wytrąca się za pomocą nitronu jony azotanowe. Osad suszy się w temperaturze $110^{\circ}C$. W oznaczeniu mogą przeszkadzać HBr , HI , HNO_2 , $HSCN$, $HClO_4$, H_2CrO_4 , [11, 12].

II ALKACYMETRYCZNIE

Redukuje się azotan (V) stopem Devardy w środowisku zasadowym do amoniaku. Następnie oddestylowuje się amoniak do kwasu [10].

III REDOKSYMETRYCZNIE

Za pomocą mianowanego roztworu $FeSO_4$ redukuje się nadmiarem na gorąco azotan (V), w roztworze zakwaszonym. Po odpędzeniu tlenków azotu odmiareczkowuje się pozostały siarczan (VI) żelaza (II) mianowanym roztworem nadmanganianu potasu [13].

IV GAZOMETRYCZNE

Oparta jest na odtlenieniu azotanów do NO , a następnie odmierzeniu objętości powstałego wskutek odtlenienia NO .

- a) jako NO po redukcji rtęcią w obecności kwasu siarkowego w nitrometrze Lungego [14].
- b) Jako NO po redukcji $FeCl$ i HCl metodą Schloesinga i Grandeou [14].

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest sprawdzenie stopnia zanieczyszczenia wybranych próbek warzyw azotanami (III) i azotanami (V). Rozwój gospodarczy oraz rosnąca urbanizacja powoduje wzrost degradacji otaczającego nas środowiska naturalnego. Ma to duży wpływ na zanieczyszczenie powietrza, wody i gleby; a co za tym idzie i zanieczyszczenie płodów rolnych.

2.2. METODA GRIESSA

Zawartość azotanów (III) i azotanów (V) oznaczono metodą opartą na reakcji Griessa zgodnie z normą Państwowego Zakładu Higieny z roku 1977 zaktualizowaną zgodnie z normą europejską EN 12014-7.

Oznaczenie azotanów (III) i azotanów (V) opiera się na pomiarze natężenia powstałej barwy w wyniku reakcji azotanów (III) z kwasem sulfanilowym

i chlorowodorkiem N-(1-naftylo) etylenodiaminy w środowisku kwasu octowego. Azotany (V) natomiast oznaczają się po uprzedniej redukcji do azotanów (III) na kolumnie kadmowej. Natężenie barwy oznaczono przy długości fali 520 nm na spektrofotometrze.

2.3. APARATURA

Spektrofotometr
Łaźnia wodna
Kolumna kadmowa

2.4. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Roztwór roboczy Griessa – to równe objętości roztworu I i II.

ROZTWÓR I – rozpuszczamy na łaźni wodnej 1,59 g kwasu sulfanilowego w 50 cm³ kwasu octowego lodowatego i 100 cm³ wody. Następnie do całości dodaje się 50 cm³ roztworu NaCl i uzupełniamy kolbę do 250 cm³.

ROZTWÓR II – rozpuszczamy na łaźni wodnej 0,03 g chlorowodorku α-naftyloaminy w 10 cm³ wody. Następnie do całości dodajemy 20 cm³ kwasu octowego lodowatego i kolbę dopełniam wodą do 100 cm³.

Roztwory odbiałczające

- a) octan cynku $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
220,0 g octanu cynku rozpuszczono w wodzie, dodano 30 cm³ kwasu octowego lodowatego i dopełniono wodą do 1000 cm³,
- b) heksacyjanożelazian (II) potasu $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
106,0 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w wodzie i dopełniono do 1000 cm³.

Roztwór wzorcowy azotanu (III) sodu NaNO_2

Rozpuszczamy 1g NaNO_2 w wodzie i uzupełniamy do 1000 cm³. Pobieram 5 cm³ powstałego roztworu do kolby na 1000 cm³ i uzupełniamy wodą do kreski. Z drugiej kolby pobieramy kolejno po 2; 5; 10; 20; 30 cm³ do kolb o pojemności 100 cm³. Dopełniamy je do 100 cm³ wodą. Przygotowane roztwory zawierały odpowiednio 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 μg $\text{NaNO}_2 \cdot \text{cm}^{-3}$.

Roztwór wzorcowy azotanu (V) sodu NaNO_3

Rozpuszczamy w wodzie 1,2736 g NaNO_3 i dopełniamy wodą do 1000 cm³. Pobieramy 5 cm³ tego roztworu do drugiej kolby miarowej o pojemności 1000 cm³ i dopełniamy wodą.

Bufor amonowy o pH 9,6-9,7

Rozpuszczono 20 cm³ stężonego kwasu solnego w 500 cm³ wody, następnie dodano 50 cm³ stężonego amoniaku i dopełniono wodą do 1000 cm³.

Chlorek sodu NaCl

Rozpuszczono 10 g w 100 cm³.

Węgiel aktywowany

Kwas solny HCl 0,1 mol·dm⁻³

Rozcieńczono 8,8 cm³ stężonego HCl wodą do 1000 cm³.

2.5. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ

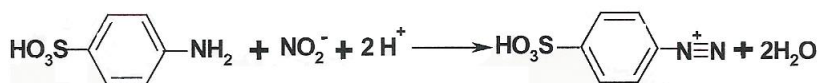
Próbkę do badań należy zhomogenizować. Następnie odważyć 5 g homogenizatu badanego warzywa. Odważony materiał przenosimy ilościowo do kolby stożkowej, przy użyciu wody o temperaturze 70-80°C i dodaniu 1 g węgla aktywowanego. Zawartość kolby ogrzewamy na łaźni wodnej przez 15 min. Po ochłodzeniu roztworu dodać odczynniki odbiałczające. Po czym całość wymieszać i odstawić na 30 min. Po tym czasie próbkę przesączyć do kolby o pojemności 100 cm³ i uzupełnić wodą do kreski.

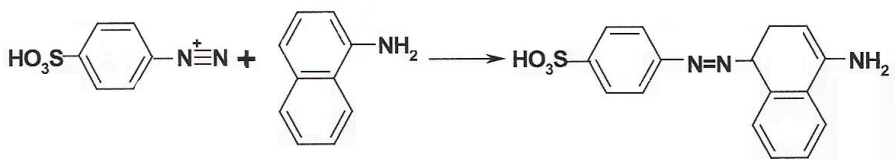
3. WYKONANIE OZNACZENIA

3.1. OZNACZENIE AZOTANÓW (III)

Pobierać 1 cm³ przesączu do probówki i dodać 1 cm³ roztworu roboczego Griessa, wymieszać i odstawić na 15 minut w ciemne miejsce. Zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda = 520$ nm.

Reakcja zachodząca podczas oznaczania azotanów (III) metodą Griessa.





Obliczenie zawartości azotanów (III) w warzywach

Zawartość azotanów (III) w próbkach warzyw w $\mu\text{g NaNO}_2$ na 1 g warzywa obliczamy na podstawie wzoru:

$$X_{\text{NaNO}_2} = C \cdot 100 \text{ cm}^3/\text{m}$$

gdzie: C – stężenie azotanów (III) odczytane z krzywej wzorcowej, odpowiadające absorbancji badanego roztworu,
m – masa próbki w g.

3.2. OZNACZENIE AZOTANÓW (V)

Na wierzchołek kolumny nanieść 5 cm^3 przesączu i natychmiast dodać buforu amonowego w ilości 2,5 cm^3 . Płyn spływający z kolumny jest zbierany do kolby miarowej o pojemności 100 cm^3 . Uzupełnić wodą do kreski. Następnie pobierać 1 cm^3 roztworu i dodać odczynnika roboczego Griessa w ilości 1 cm^3 . Wymieszać i odstawić w ciemne miejsce na 15 min. Zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda = 520 \text{ nm}$.

Obliczenie zawartości azotanów (V) w próbkach warzyw

Zawartość azotanów (V) w warzywach w $\mu\text{g NaNO}_3$ na 1 g warzywa obliczono ze wzoru:

$$Y_{\text{NaNO}_3} = C \cdot 1000 \text{ cm}^3/\text{m}$$

gdzie: C – stężenie NaNO_3 w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ odczytane z krzywej wzorcowej odpowiadające absorbancji badanego roztworu,
m – masa próbki w g.

Obliczenie azotanów (III) i azotanów (V) w warzywach w $\mu\text{g NaNO}_2$ na 1 g suchej masy warzywa obliczamy według wzoru:

$$\begin{aligned} X'_{\text{NaNO}_2} &= C \cdot 100 / m' \\ m' &= m \cdot \%s.m. \\ \%s.m. &= m_{\text{wys}} / m_0 \end{aligned}$$

gdzie: C – stężenie NaNO_2 w $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ odczytane z krzywej wzorcowej odpowiadające absorbancji badanej próbki,

m' – masa próbki w przeliczeniu na suchą masę w g,
 $\%s.m.$ – procentowy udział suchej masy w %,
 m_{wys} – masa próbki po wysuszeniu w g,
 m_0 – masa próbki przed wysuszeniem w g.

$$Y'_{NaNO_3} = C \cdot 1000 / m'$$

$$m' = m \cdot \%s.m.$$

$$\%s.m. = m_{wys} / m_0$$

gdzie: C – stężenie $NaNO_3$ w $\mu g \cdot cm^{-3}$ odczytane z krzywej wzorcowej odpowiadające absorbancji badanego roztworu,

m' – masa próbki w przeliczeniu na suchą masę w g,
 $\%s.m.$ – procentowy udział suchej masy w %,
 m_{wys} – masa próbki po wysuszeniu w g,
 m_0 – masa próbki przed wysuszeniem w g.

Tabela 6. Dopuszczalne zawartości azotanów w warzywach [6, 15]

Lp.	WARZYWO	ZAWARTOŚĆ AZOTANÓW [mg $NaNO_2 \cdot kg^{-1}$]
1	rzodkiewka, burak, szpinak, rzepa, kalarepa, koper	2000
2	kapusta, szczypior	1000
3	kalafior, ogórek, por, seler, czosnek, marchew, pietruszka	500
4	fasola, cebula, papryka, ziemniak, pomidor	250

Pytania kontrolne

1. Jakie są źródła azotanów (III) i azotanów (V) w środowisku?
2. Główne niebezpieczeństwo związane z nadmiernym spożyciem azotanów (III) i azotanów (V) przez niemowlęta.
3. Jaką drogą się dostają, jakim przemianom ulegają i na co wpływają azotany (III) w organizmie ludzkim?
4. Metody oznaczania azotanów (III).
5. Metody oznaczania azotanów (V).

Literatura

- [1] **Nikonorow M.:** *Zanieczyszczenia chemiczne i biologiczne żywności*; WNT Warszawa 1980.
- [2] Praca zbiorowa pod redakcją prof. dr hab. F. Świderskiego: *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*; WNT Warszawa 1999.

- [3] **Markowska A.:** *Ocena zawartości azotanów i azotynów w warzywach pochodzących z terenu województwa łódzkiego*; Roczniki PZH 1995, 46(4), 341-347.
- [4] **Grudziński I.P.:** *Wpływ azotanów i azotynów na jelito cienkie*; Roczniki PZH 1998, 49(3), 321-330.
- [5] **Nikonorow M., Urbanek-Karłowska B.:** *Toksykologia żywności*; PZWL Warszawa 1987.
- [6] **Gertig H., Duda G.:** *Żywność a zdrowie i prawo*; PZWL Warszawa 2004.
- [7] **Koter M.:** *Chemia rolna*; PWN, Warszawa 1987.
- [8] **Wawrzyniak A.:** *Ocena zawartości azotanów i azotynów oraz białka ogółem w wybranych warzywach uprawianych konwencjonalnie i ekologicznie*; Roczniki PZH 1997, 48(2), 177-186.
- [9] **Kowal A.L.:** *Materiały na XVI seminarium projektantów wodociągów – Zakopane, maj 1986 r.*; Polski Związek Inż. – Techn. Sanitarnych, Kraków 1986.
- [10] **Szczepaniak W.:** *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*; PWN Warszawa 2004.
- [11] **Lipiec T., Szmaj Z.:** *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej* PZWL Warszawa 1980.
- [12] **Szysko E.:** *Instrumentalne metody analityczne*; WNT Warszawa 1976.
- [13] **Grzybowska J.:** *Zanieczyszczenia chemiczne*; WNT Warszawa 1974.
- [14] **Marczenko Z., Balcerzak M.:** *Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej*; PWN Warszawa 1998.
- [15] (1)Dz.U.L 37 z 13.02.1993, Rozporządzenie zmienione rozporządzeniem (WE) nr 1882/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady (Dz.U.L 284 z 31.10.2003).

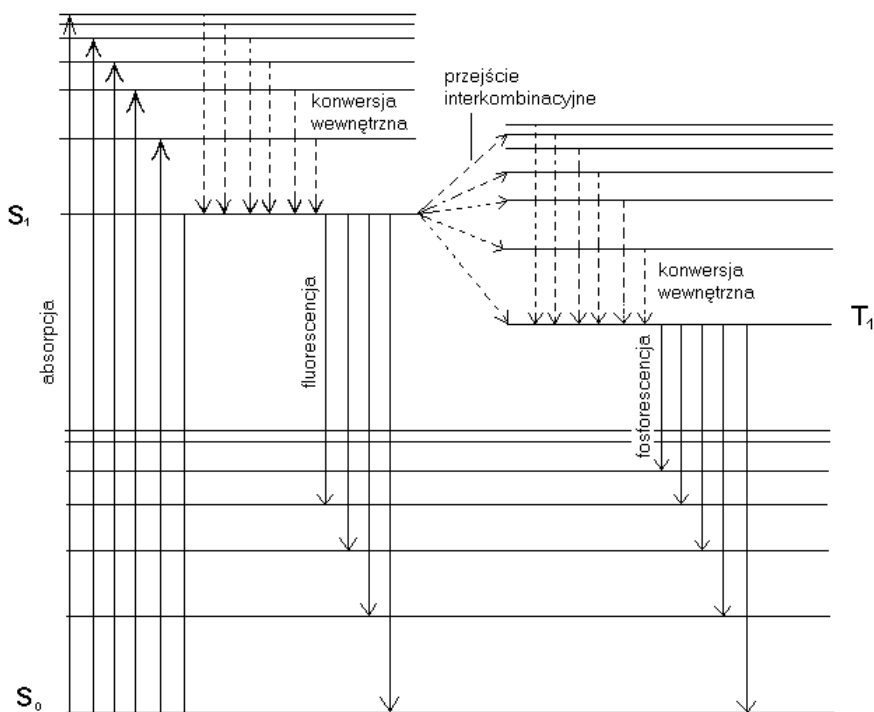
ĆWICZENIE 5

Spektrofluorymetryczna metoda oznaczania histaminy w produktach spożywczych (PN-90A-86786)

1. WSTĘP

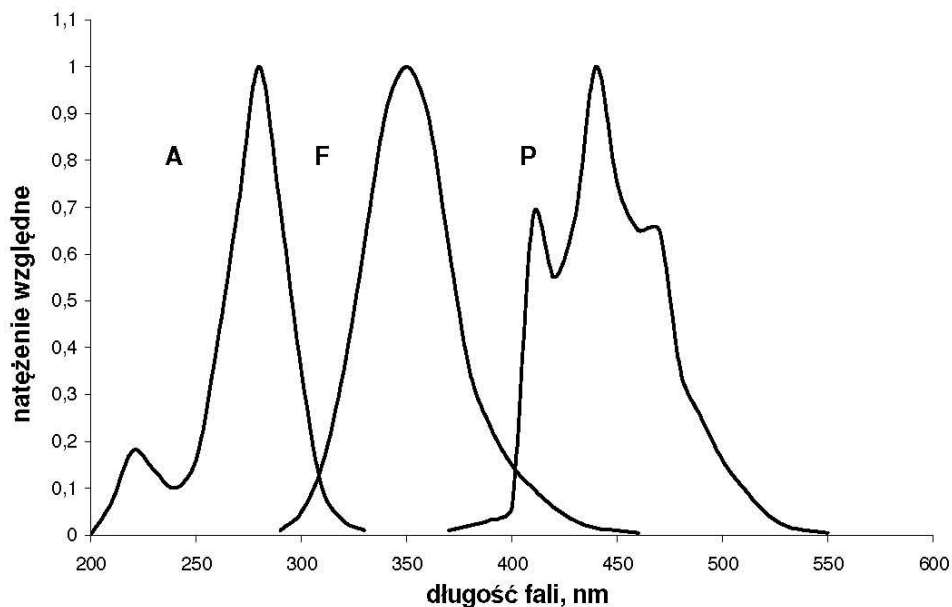
Luminescencja to emisja światła przez ciała zimne. Wyróżniamy różne rodzaje luminescencji, w zależności od czynnika, który je wywołuje:

- fotoluminescencja wywołana jest promieniowaniem UV-VIS,
- chemiluminescencja, w której wzbudzenie cząsteczki jest wynikiem reakcji chemicznej,
- bioluminescencja – wzbudzenie jest wynikiem procesów biochemicznych,
- elektroluminescencja – wzbudzenie cząsteczek w polu elektrycznym.



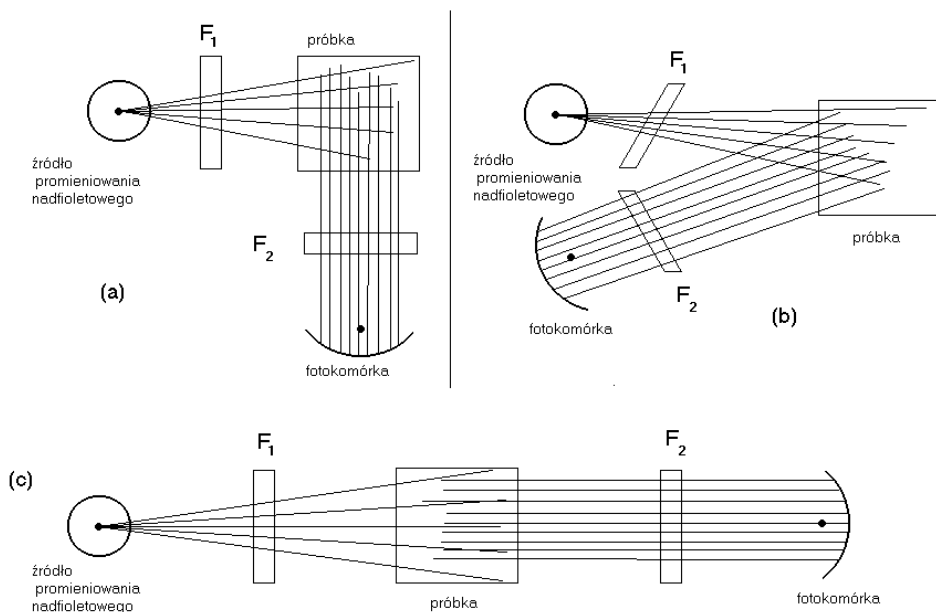
Rys. 4. Schemat przejść energetycznych związanych z absorpcją promieniowania, fluorescencją i fosforescencją

Spektrofluorymetria jest jednym z działów analizy spektralnej, w którym wykorzystuje się oddziaływanie energii z materią. Fluorescencja i fosforescencja (zaliczane do fotoluminescencji) to mechanizm umożliwiający utratę energii cząsteczce znajdującej się w elektronowym stanie wzbudzonym. Jeśli elektron przejdzie ze wzbudzonego stanu singletowego do podstawowego stanu singletowego, wypromieniowując energię, to mamy do czynienia z fluorescencją. Jeśli przejście nastąpi ze stanu trypletowego na singletowy zjawisko to nazwiemy fosforescencją (rys. 4).



Rys. 5. Widma tryptofanu: A – absorpcja, F – fluorescencja, P – fosforescencja

Do obserwacji promieniowania stosuje się zasadniczo trzy rodzaje układów geometrycznych (rys. 6):



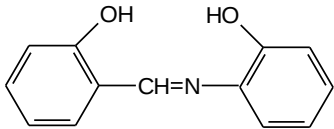
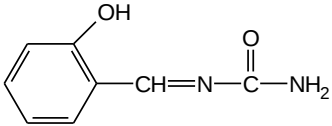
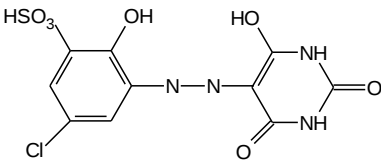
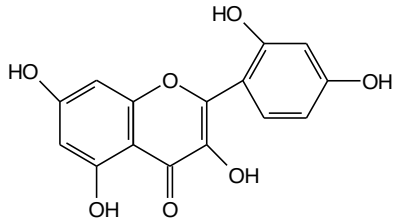
Rys. 6. Schematy układów optycznych stosowanych w fluorymetrii

Fluoryzują w zasadzie cząsteczki planarne, które mają układ skoniugowanych wiązań podwójnych np. pochodne związków arylowych. Spektrofluorymetria ma zastosowania w analizie:

- związków biologicznie czynnych (witaminy, hormony, aminokwasy, alkaloidy, proteiny i in.),
- środków farmaceutycznych (antybiotyki, barbiturany),
- substancji toksycznych w środowisku (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne).

Tę metodę wykorzystuje się również do oznaczania wielu jonów nieorganicznych i związków organicznych. W celu oznaczenia związków niefluoryzujących stosuje się zabiegi zmieniające cząsteczki we fluoryzujące (modyfikacje fizyczne i chemiczne). Przykłady oznaczeń ukazane są w tabeli 7.

Tabela 7. Przykłady odczynników stosowanych do fluorymetrycznego oznaczania metali

Nazwa i wzór odczynnika	Oznaczący pierwiastek	Warunki oznaczania	Barwa fluorescencji	Czułość [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]
Salicylo-<i>o</i>-aminofenol 	Al Ga Ge In Sc Sb	pH = 5,8-6,0 pH = 4,0-5,0 pH = 7,1 pH = 5,6 pH = 5,0-8,0 pH = 6,2	zielona zielonożółta zielonożółta zielonożółta żółta zielona	0,0005 0,15 0,4 0,2 5,0 0,2
Semikarbazon aldehydu salicylowego 	Zn Sc Ca	pH = 6,2-6,4 pH = 5,6 pH = 3,0-4,0	niebieska niebieskoblękita niebieskoblękita	0,2 0,01 0,02
Lumonomagnezon IREA 	Mg	pH = 10,0-12,0	różowa	0,002
Moryna (3,5,7,2',4'-pentahydroksyflawon) 	Al B Be Ca Zr Ge Fe Th Sc Sb Pb Sn	pH = 3,0-4,5 pH = 11,3-13,0 pH ~ 6,0 r-r HCl 2mol/dm ³ r-r HCl 1: 1 pH = 4,9 r-r alkaliczny pH = 2,5-5,0 pH = 7,0 HCl + C ₂ H ₅ OH pH = 7,0 r-r HCl, 0,04-0,06 mol/dm ³	żółtozielona żółtozielona żółtozielona żółtozielona żółtozielona żółtozielona żółtozielona żółtozielona zielona żółtozielona żółtozielona zielona	0,0005 0,06 0,001 0,17 0,001 1,5 0,001 0,0004 0,02 1,0 0,5 0,05

Fluorymetria jest stosowana ze względu na swą czułość, 100-10000 razy większą niż w technikach spektralnych oraz lepszą selektywność.

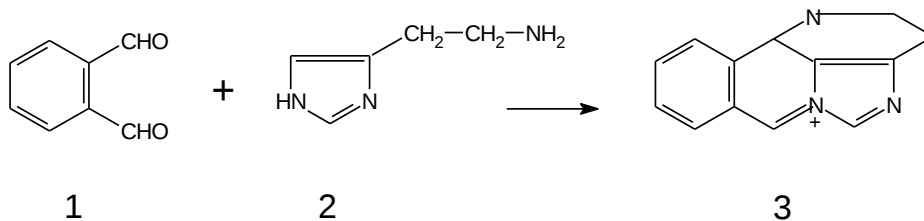
2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. CEL ĆWICZENIA

Cel ćwiczenia to zapoznanie studentów z jedną ze spektrofluorymetrycznych metod analizy. Zawartość histaminy jest oznaczana fluorymetrycznie metodą rekomendowaną przez AOAC z pomiarem fluorescencji na spektrofluorymetrze Hitachi 2000. Istotą metody jest reakcja między histaminą a aldehydem ortoftalowym. Zaletą metody jest szybkość, powtarzalność i czułość (granica oznaczalności $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).

Histamina jest jedną z amin biogennych, które są naturalnie obecne w żywności. Jeśli stężenie amin przekracza normalny poziom, często z powodu mikrobiologicznych zanieczyszczeń, wpływa to niekorzystnie na organizm. Zatrucie histaminą może spowodować wystąpienie tzw. reakcji pseudoalergiczej, czyli następujących objawów klinicznych: skurczu oskrzeli, zwężenia naczyń, obrzęków, bóli brzucha, biegunki, spadku ciśnienia tętniczego, swędzenia skóry itp. Zawartość histaminy jest kryterium jakości żywności. Nawet, jeśli bakterie są już zabite, pozostaje aktywność enzymów katalizujących powstawanie histaminy. Histamina jest produkowana przez dekarboksylację histydyny. Produkty bogate w białka (ryby, mięso, ser – wszystkie bogate w histydynę), jak również takie, jak wina, zwłaszcza musujące, piwo, fermentowane produkty mleczarskie mogą zawierać podwyższony poziom histaminy.

Histamina tworzy z aldehydem ortoftalowym stabilny fluoryzujący związek, będący podstawą jego oznaczenia.



Rys. 7. 1 – aldehyd ortoftalowy, 2 – histamina, 3 – związek fluoryzujący

2.2. APARATURA

Do oznaczenia zawartości histaminy wykorzystuje się spektrofluorometr F-2000 firmy Hitachi.

2.3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- kwas solny $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$,
- zasada sodowa $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$,

- kwas fosforowy $1,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (rozcieńczyć $12,2 \text{ cm}^3$ 85% kwasu w kolbie na 100 cm^3),
- 1% roztwór aldehydu ortoftalowego w metanolu,
- roztwór histaminy $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ (rozpuścić 167,4 mg chlorowodoru histaminy i uzupełnić $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl w kolbce o pojemności 100 cm^3).

2.4. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ

Naważkę 1g próbki utrzyć w moździerzu, zhomogenizować z 5 cm^3 metanolu w ciągu 2 minut. Homogenat przenieść do kolby na 10 cm^3 i inkubować w łaźni wodnej w temperaturze 60°C . Po ochłodzeniu do temperatury 25°C , uzupełnić alkoholem metylowym do 10 cm^3 i odwirować przy 3500 obr./min. Otrzymany roztwór przechowywać w lodówce.

Przygotowanie kolumny z wypełniaczem

Odważyć 2 g wypełniacza jonowego Dowex 1X8, 50-100mesh i przeprowadzić w formę wodorotlenkową, używając 30 cm^3 wodorotlenku sodu o stężeniu $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na 1g żelu. Po wymieszaniu odstawić na pół godziny. Zdekantować ług bez straty żelu, odmyć wodą destylowaną, przenieść na bibułę karbowaną i dalej płukać do uzyskania obojętnego przesączu. Tak przygotowany wypełniacz może być przechowywany pod wodą nie więcej niż 7 dni. Kolumnę chromatograficzną napęlić na wysokość 8 cm i zabezpieczyć przed wyschnięciem. Przed naniesieniem ekstraktu przemyć 10 cm^3 wody destylowanej.

Pod kolumną umieścić kolbę o pojemności 50 cm^3 zawierającą 5 cm^3 roztworu kwasu solnego o stężeniu $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na kolumnę nanieść 5 cm^3 wody, a następnie 1 cm^3 ekstraktu i 4 cm^3 wody. Gdy roztwór przejdzie przez kolumnę do wysokości ok. 2 mm nad żel, dodać 5 cm^3 wody i eluować. Dodawanie wody powtarzać aż do uzyskania 50 cm^3 eluatu. Uzyskany eluat wymieszać i przechowywać w lodówce do czasu wykonania oznaczenia.

2.5. WYKONANIE OZNACZENIA

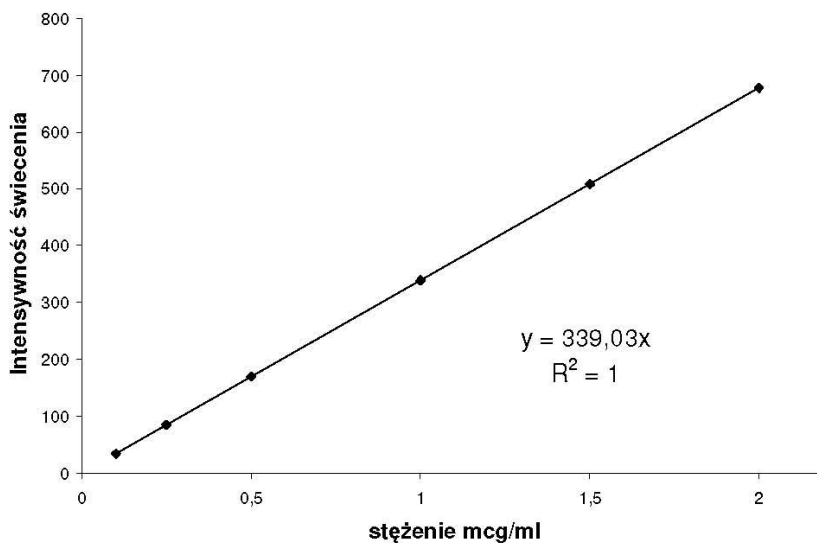
Przygotować rozcieńczenia podstawowego roztworu histaminy w zakresie od $0,1$ do $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Do $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu histaminy dodać $1,0 \text{ cm}^3$ $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl i $0,3 \text{ cm}^3$ $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztworu NaOH i $0,1 \text{ cm}^3$ aldehydu ortoftalowego. Po 4 minutach dodać $0,3 \text{ cm}^3$ H_3PO_4 , zmierzyć emisję promieniowania nie później niż po 30 minutach, przy długościach fal $\lambda_{\text{EX}} = 350 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{EM}} = 444 \text{ nm}$. Narysować krzywą wzorcową i obliczyć zawartość histaminy w próbce wg wzoru:

$$m = c \cdot v \cdot r$$

gdzie: c – zawartość histaminy odczytanej z krzywej,

v – objętość próbki,

r – rozcieńczenie.



Rys. 8. Przykładowa krzywa wzorcowa zawartości histaminy w próbce

Pytania kontrolne

1. Co to jest fotoluminescencja?
2. Czym różni się fluorescencja od fosforescencji?
3. Proszę podać zasadę fluorymetrycznego oznaczania histaminy.
4. Na czym polega pomiar fluorymetryczny?
5. W jaki sposób można oznaczać związki niefluoryzujące?

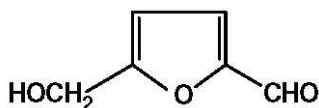
ĆWICZENIE 6

Oznaczanie 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF) w sokach owocowych

1. WSTĘP

Pod wpływem nadmiernego ogrzewania lub długotrwałego przechowywania żywności zawierającej węglowodany i białka dochodzi do nieenzymatycznego brunatnienia w wyniku zachodzących reakcji Maillarda. Produktami pośrednimi powstającymi w tych reakcjach są związki furfuralowe: furfural, 5-metylofurfural i występujący w największej ilości hydroksymetylofurfural.

Hydroksymetylofurfural (HMF) – 5(hydroksymetylo)-2-furaldehyd, w postaci czystej występuje jako igielki lub płatki o zapachu kwiatów rumianku lub w postaci bezbarwnego syropu, podrażniającego oczy. HMF jest bardzo słabo lotny, rozpuszczalny bardzo dobrze w wodzie, alkoholach, acetonie, octanie metyli i DMF, rozpuszcza się także w eterze i chloroformie.

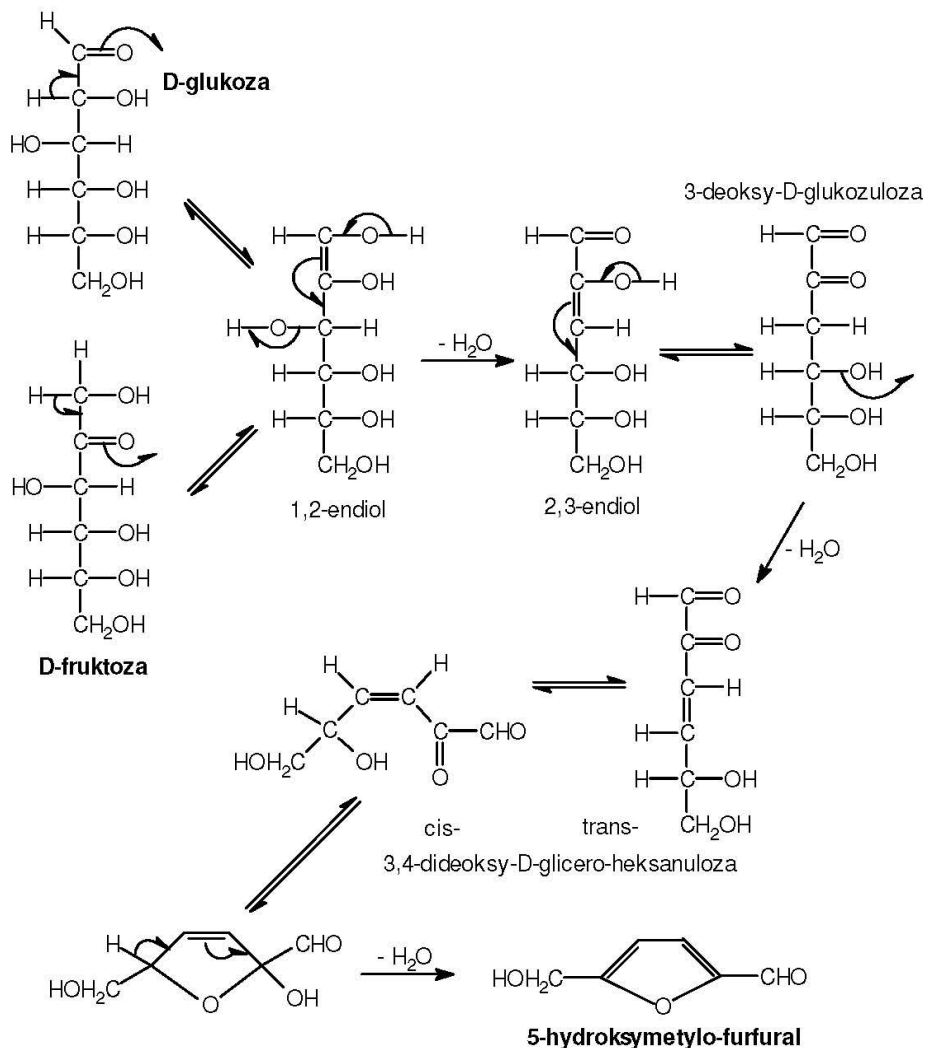


HMF w wysokich stężeniach jest cytotoksyczny, powoduje podrażnienia oczu, górnych dróg oddechowych, skóry i błon śluzowych. Związek ten jest znany również jako genotoksyczny i rakotwórczy, ale mechanizmy jego toksycznego działania nadal pozostają niejasne. Dawka doustna LD₅₀ 3,1 g·kg⁻¹ ciała została ustalona dla szczurów. Dodatkowo badania tych zwierząt wykazały, że 1% HMF w diecie spowodował wzrost komórek rakowych okrężnicy [1]. Jednoznaczne powiązanie HMF z karcenogenezą uzyskano w badaniach myszy i szczurów. W cytozolu wątroby w obecności siarczanów jest on konwertowany do estru kwasu siarkowego (5-sulfooksymetylofurfuralu) o właściwościach mutagennych [2].

HMF tworzy się z heksoz w trakcie ogrzewania i przechowywania żywności bogatej w cukry, przy czym są znane dwie główne drogi jego powstawania. W pierwszej z nich HMF powstaje w wyniku karmelizacji cukrów w temperaturze ponad 150°C. Karmelizacji najłatwiej ulegają cukry redukujące (glukoza, fruktoza, ksyloza, ryboza), a proces ten jest katalizowany poprzez środowisko kwasowe. Rysunek 9 przedstawia schemat tworzenia HMF podczas karmelizacji.

Druga droga powstawania HMF jest związana z reakcjami nieenzymatycznego brunatnienia, jak potocznie zwane są reakcje Maillarda. Grupa aldehydowa

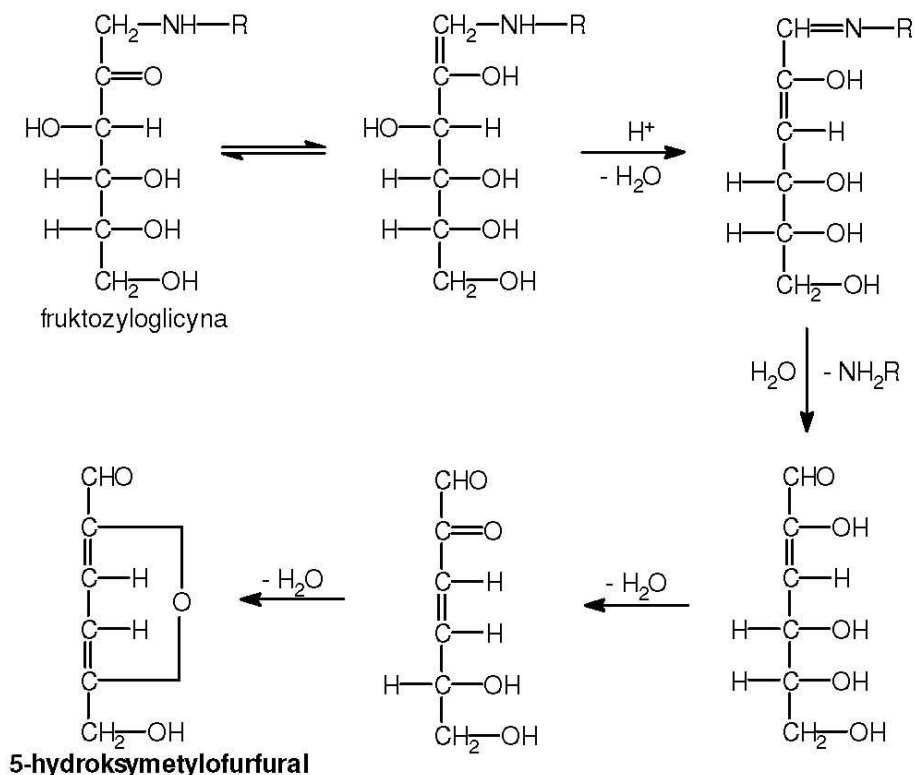
węglowodanu reaguje z grupą aminową aminokwasu lub białka, co w wyniku daje bezbarwne produkty pośrednie, związki Amadori, z których podczas ogrzewania powstaje HMF (rys. 10). W wyniku dalszych reakcji powstaje szereg barwnych związków, pożądanych w technologii żywności wybranych produktów (np. wypieki) lub niepożądanych w pozostałych. Tworzenie produktów reakcji Maillarda obniża bowiem wartość żywieniową produktu poprzez blokowanie lub destrukcję niektórych reszt aminokwasów (lizyna, cysteina, metionina, tryptofan) oraz ograniczenie ich biodostępności.



Rys. 9. Schemat powstawania HMF w procesie karmelizacji cukrów

HMF jest wykorzystywany jako związek wskaźnikowy powstawania zmian nieenzymatycznych żywności podczas obróbki technologicznej (ogrzewanie) oraz w trakcie przechowywania. Jego obecność jest wskaźnikiem zachodzącego pierwszego etapu reakcji Maillarda, przed pojawieniem się niekorzystnych z punktu widzenia organoleptycznego i żywieniowego barwnych polimerów. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) rekomenduje maksymalne stężenie HMF w sokach owocowych na poziomie $5\text{--}10\text{ mg HMF}\cdot\text{dm}^{-3}$ w zależności od rodzaju owoców.

W przypadku miodów HMF może służyć także do oceny zafałszowań dodatkiem cukru inwertowanego. Dopuszczalna zawartość hydroksymetylofurfuralu według Polskich Norm została ustalona tylko dla miodu i wynosi $3\text{ mg HMF na }100\text{ g miodu}$ ($30\text{ mg HMF}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ miodu}$) [3].



Rys. 10. Schemat powstawania HMF w reakcji Maillarda

METODY OZNACZANIA HMF

W literaturze opisywane są metody oznaczania 5-hydroksymetylofurfuralu w dwóch postaciach: wolnej i związanej. Forma związana HMF opisywana jest jako potencjalny 5-hidroksyfurfural związany z białkami jako produkt Amadori, a uwalniana zostaje w wyniku ogrzewania z kwasem szczawiowym w temperaturze 100°C w ciągu 25 minut. Zawartość związanego HMF w próbce wyznacza się jako różnicę pomiędzy ilością wolnego HMF, a ilością całkowitą określoną po hydrolizie kwasem szczawiowym.

Najczęściej stosowane są metody spektrofotometryczne (Winklera, TBA). Po przeprowadzeniu reakcji HMF z wybranym związkiem powstaje produkt, którego absorpcja promieniowania (w zakresie światła widzialnego lub UV) jest wprost proporcjonalna do stężenia związku w roztworze. Sam HMF absorbuje promieniowanie jedynie w zakresie UV, jednakże nie stosuje się tej właściwości do oznaczenia spektrofotometrycznego, ze względu na absorpcję w tym zakresie przez wiele innych związków obecnych w próbkach.

Metoda Winklera (kolorymetryczna) [4]

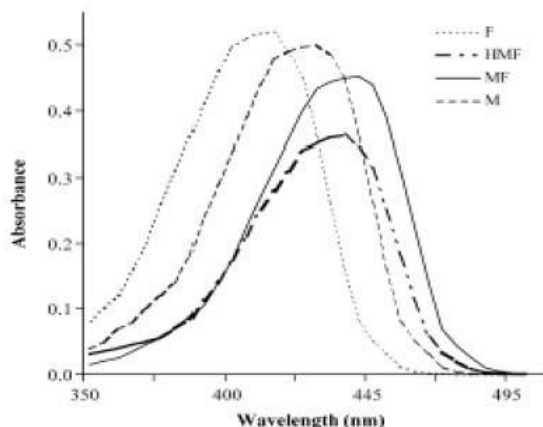
W wyniku reakcji HMF z kwasem barbiturowym i p-toluidyną w środowisku kwaśnym, najczęściej w obecności kwasu octowego, powstaje produkt o barwie czerwonej, którego stężenie jest oznaczane kolorymetrycznie przy długości fali 550 nm. Metoda jest mało selektywna, obok HMF reagują także inne pochodne furfuralu.

Metoda TBA (kolorymetryczna) [5]

HMF reaguje z kwasem tiobarbiturowym (TBA) w środowisku kwaśnym; powstaje barwny produkt o maksimum absorpcji 443 nm, którego ilość wyznacza się kolorymetrycznie. Metoda ta nadal jest szeroko stosowana w analizie produktów mlecznych, mimo wielu wad. Do najważniejszych zaliczyć można brak specyficzności (zamiast HMF oznacza się związki furfurowe) oraz ograniczoną stabilność barwnego kompleksu w czasie analizy.

Metoda spektrofotometrii pochodnych [6]

W metodzie tej wykorzystuje się jedną z powyższych metod kolorymetrycznych do uzyskania barwnej pochodnej. Zamiast pomiaru absorpcji przy jednej długości fali mierzy się absorbancję w szerszym zakresie, np. z TBA jest to zakres 300-550 nm.



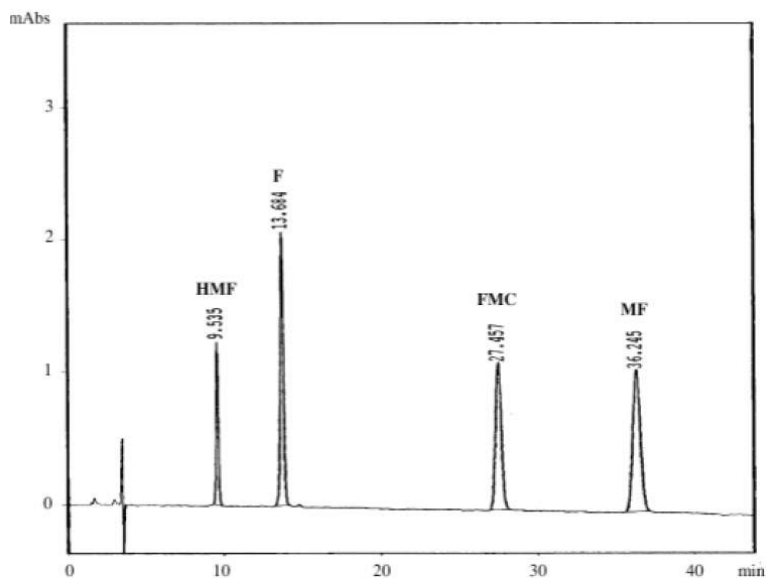
Długość fali [nm]

Rys. 11. Widma absorpcji produktów reakcji z TBA z furfurałem (F), 5-hydroksymetylofurfurałem (HMF), metylofurfurałem (MF) i mieszaniną powyższych związków (M) [6]

Na podstawie widm roztworów wzorcowych i ich pierwszych pochodnych wyznacza się długości fal, dla których pochodna absorbancji jest proporcjonalna do zawartości poszczególnych składników obecnych w mieszaninie, a następnie matematycznie oznacza się zawartość poszczególnych związków z widm absorpcji próbki badanej.

Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [7]

Metoda HPLC jest metodą pozwalającą na oznaczenie HMF w obecności innych związków furfuralowych. Najczęściej stosowana jest metoda w układzie odwróconych faz (RP) na kolumnie z grupami funkcyjnymi C_{18} w układzie stałego przepływu fazy ruchomej (metanol-woda lub acetonitryl-woda) przy spektrofotometrycznej detekcji przy długości fali 283 nm.



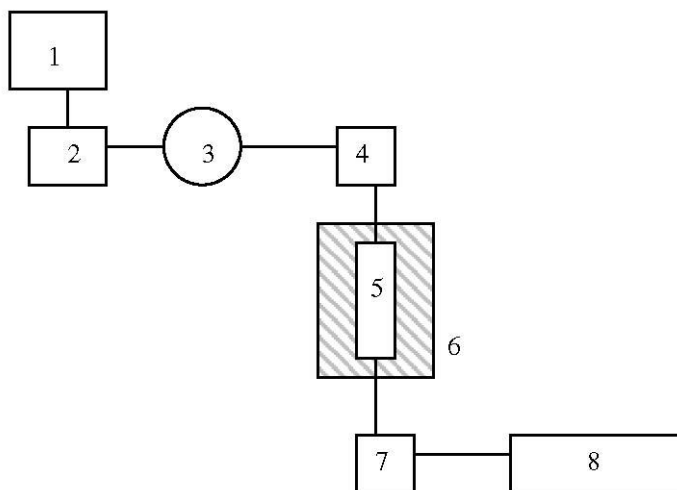
Rys. 12. Chromatogram mieszaniny standardów: 5-hydroksymetylofurfural (HMF), furfural (F), furylometyloketon (FMC) i metylofurfural (MF) [8]

Oprócz wymienionych metod zostały także opisane do oznaczania HMF inne metody: spektrofotometryczna metoda White'a (wykorzystująca rozkład grupy chromoforowej HMF przy użyciu 0,1% NaHSO₄) [9], metoda analizy wstrzykowej (oparta o metodę Winklera) [10] oraz elektroforeza kapilarna [11], ale metody te nie znalazły szerokiego zastosowania.

WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA (HPLC)

Metody chromatograficzne są metodami rozdzielu mieszanin, w których rozdzielane składniki ulegają podziałowi pomiędzy dwie niemieszające się fazy: fazą nieruchomą (stacjonarną) oraz fazą ruchomą. W metodzie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (ang. *high pressure liquid chromatography* – HPLC), zwanej także wysokosprawną chromatografią cieczową (ang. *High performance liquid chromatography*) fazą nieruchomą stanowi wypełnienie kolumny chromatograficznej, a fazę ruchomą ciecz wprowadzana do kolumny pod wysokim ciśnieniem (50-100 MPa) ze stałą szybkością przepływu. Wypełnieniem kolumny są najczęściej porowate ziarna krzemionkowe o małej średnicy (3-10 μm) z chemicznie przyłączonymi związkami chemicznymi, decydującymi o rozdziale składników mieszanin. Ze względu na różnice polarności grup funkcyjnych fazy stacjonarnej rozróżnia się chromatografię: w układzie faz normalnych (NP), gdy faza stacjonarna jest bardziej polarna niż faza ruchoma oraz

w układzie faz odwróconych (RP), gdy faza stacjonarna posiada jako grupy funkcyjne niepolarne grupy alkilowe, a faza ruchoma jest polarna (np. woda).



Rys. 13. Schemat chromatografu cieczowego: 1 – zbiornik fazy ruchomej, 2 – pompa, 3 – manometr, 4 – dozownik próbek, 5 – kolumna, 6 – termostat, 7 – detektor, 8 – rejestrator

Składniki mieszaniny po rozdzieleniu na kolumnie i po jej opuszczeniu są wykrywane przez detektor, który może być detektorem spektrofotometrycznym, elektrochemicznym i in. Efekt rozdziálu chromatograficznego zapisywany jako zależność sygnału z detektora w funkcji czasu lub objętości fazy ruchomej nosi nazwę chromatogramu i jest podstawą analizy jakościowej i ilościowej analizowanej mieszaniny. Czas liczony od momentu wprowadzenia próbki do kolumny do pojawienia się na chromatogramie maksimum piku, to znaczy maksymalnego stężenia składnika próbki, nazywa się czasem retencji. Uzyskane czasy retencji substancji po porównaniu z czasami retencji analizowanych roztworów wzorcowych pozwalają na identyfikację związków chemicznych, natomiast powierzchnie otrzymanych na chromatogramach pików są proporcjonalne do ilości wprowadzonej do kolumny substancji.

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENYRALNA

Ćwiczenie polega na oznaczaniu HMF w sokach owocowych. Oznaczenia wykonuje się metodą RP HPLC z detektorem spektrofotometrycznym.

2.1. APARATURA

Właściwe pomiary wykonuje się za pomocą zestawu do wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej firmy Dionex (USA). Zestaw składa się z następujących elementów: degazera membranowego DG-1310, dwuskładnikowej pompy gradientowej wysokociśnieniowej P 580A HPG, autosamplera Gina 50T, kolumny Hypersil ODS (250 x 4,6 mm; 5 μ) firmy ThermoQuest, pieca termostadowego do kolumny STH 585 z możliwością regulacji temperatury $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, detektora UV/VIS UVD 170S z możliwością równoczesnego pomiaru spektrofotometrycznego przy czterech dowolnie wybranych długościach fal w zakresie 200-595 nm oraz programu komputerowego Chromeleon wersja 6.00, zbierającego i przetwarzającego uzyskiwane dane eksperymentalne.

2.2. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Do wykonania ćwiczenia będą wykorzystane następujące odczynniki i roztwory:

- woda destylowana,
- metanol do chromatografii,
- HMF (wzorzec),
- roztwór Carrez I (15% wodny roztwór heksacyjanożelazianu(II) potasu),
- roztwór Carrez II (30% wodny roztwór siarczanu(VI) cynku).

2.3. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ

Próbki 5,1 cm³ soku przenieść do probówki, dodać 0,9 cm³ metanolu. Po dokładnym wymieszaniu roztwór przesączyć przez sączonek lub filtr celulozowy i przenieść do fiolek na 1,5 cm³. Fiolki umieścić w podajniku autosamplera.

Jeżeli przesącz jest mętny, próbkę przed sączeniem należy sklarować. W tym celu 10 cm³ badanego soku przenieść do kolbki na 25 cm³, dodać po 1 cm³ roztworów Carrez I i II, 2,5 cm³ metanolu i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Po dokładnym wymieszaniu roztwór przesączyć przez sączonek lub filtr celulozowy i przenieść do fiolek na 1,5 cm³. Fiolki umieścić w podajniku autosamplera.

3. WYKONANIE OZNACZENIA

3.1. ROZDZIAŁ CHROMATOGRAFICZNY Z POMIAREM SPEKTROFOTOMETRYCZNYM

Ustalić przepływ fazy ruchomej w chromatografii. Fazę ruchomą stanowi mieszanina wody i metanolu w proporcji 90:10 (v/v) przy szybkości przepływu

1 ml/min. Ustalić długość fali detektora spektrofotometrycznego na 283 nm. Próbkę nastrzykiwać w ilości 20 μ l z poszczególnych fiolek umieszczonych w autosamplerze, począwszy od fiołki zawierającej roztwór wzorcowy HMF. Wykonać co najmniej 3 powtórzenia analizy każdego roztworu. Czas pojedynczej analizy ustalić na 10 min.

3.2. ANALIZA WYNIKÓW

Na podstawie powierzchni uzyskanych pików z analizy roztworów wzorcowych wykreślić krzywą kalibracyjną $A = f(c)$, gdzie A – powierzchnia pików, c – stężenie HMF wyrażone jako mg HMF na 10 cm^3 soku. Uzyskany wynik przeliczyć na 1 dm^3 soku i porównać z wartościami zalecanymi zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu w sokach owocowych.

Pytania kontrolne

1. W jakich warunkach tworzy się HMF w żywności?
2. Dlaczego HMF jest wykorzystywany jako związek wskaźnikowy w żywności?
3. Biologiczne działanie HMF na organizm ludzki.
4. Na czym polega różnica oznaczania HMF metodą spektrofotometryczną a metodą HPLC z detekcją spektrofotometryczną?

Literatura

- [1] Zhang X.M. et al.: *Carcinogenesis*, 14, 773, 1993.
- [2] Surh Y.J. et al.: *Carcinogenesis*, 15, 15510, 1994.
- [3] PN – 88/A – 77626, Miód pszczeli.
- [4] Winkler J.: *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, 102, 161, 1955.
- [5] Keeney M., Bassette R.: *J. Dairy Sci.*, 43, 945, 1959.
- [6] Rocha S.M., Coimbra M.A., Delgadillo I.: *Carbohydr. Polym.*, 56, 287, 2004.
- [7] Albala-Hurtado S. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2128, 1997.
- [8] Ferrer E. et al.: *J. Chromatogr. A*, 947, 85, 2002.
- [9] White J.: *J. Assoc. Anal. Chem.*, 62, 509, 1979.
- [10] Salinas F. et al.: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 340, 250, 1991.
- [11] Morales F.J., Jimenez-Perez S.: *Food Chem.*, 72, 525, 2001.

ĆWICZENIE 7

Oznaczanie β -laktoglobuliny za pomocą techniki ELISA

1. WSTĘP

Alergia pokarmowa jest uznawana przez WHO jako 4 najważniejszy problem zdrowotny w uprzemysłowionych krajach na świecie. Szacuje się, że schorzenia te dotyczą 2% populacji osób dorosłych i około 4-8% dzieci. Spożycie alergennej żywności przez osobę uczuloną może wywołać objawy ze strony skóry, układu pokarmowego, oddechowego, krążenia, takie jak: pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy, atopowe zapalenie skóry/egzema, astma, nieżyt nosa, wymioty, biegunka, skurcze, podciśnienie, obrzęk łącznie z zagrażającym życiu wstrząsem anafilaktycznym. W przeciągu ostatnich kilku dekad częstość występowania alergii wzrosła, stwarzając ważne wyzwanie dla alergologii klinicznej i przemysłu spożywczego.

Dyrektywa 2003/89/EC Parlamentu Europejskiego i Rady z 10 listopada 2003 r. wymaga, aby każdy z alergennych składników wymienionych na liście był etykietowany nawet jeśli stanowi mniej niż 25% produktu żywnościowego. Lista ta obejmuje 14 następujących produktów: mleko krowie, jaja, ryby, skorupiaki, zboża zawierające gluten (pszenica, owies, jęczmień, żyto), orzechy drzewne (laskowe, włoskie, nerkowca, makadamia, pekan, pistacjowe, brazylijskie, migdały), orzechy ziemne, soja, seler zwyczajny, sezam, gorczyca i produkty pochodne, łubin, mięczaki oraz siarczyny (w stężeniu przynajmniej $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Przyczyną pojawienia się objawów klinicznych może być każdy alergen pokarmowy, w wieku niemowlęcym dominującym alergenem jest mleko krowie, w starszych grupach wiekowych objawy kliniczne uwarunkowane nadwrażliwością alergiczną najczęściej występują po spożyciu mleka krowiego, jaj kurzych, orzechów drzewnych i ziemnych, soi, pszenicy, ryb. Alergeny to antygeny wywołujące nadwrażliwość medioną przez mechanizmy immunologiczne. Pod względem chemicznym są to glikoproteiny o masie cząsteczkowej od 10 do 70 kDa.

Alergia na krowie mleko (*Cow's Milk Allergy* – CMA) występuje powszechnie w dzieciństwie, z tego typu alergii zazwyczaj wyrasta się w ciągu 1 roku życia, jednakże 15% dzieci pozostaje alergikami na całe życie. Krowie mleko zawiera 3-3,5% białek, które można podzielić na 2 klasy: kazeiny (80%) i białka serwatki (20%). Serwatka to odciek pozostający po strąceniu kazein z chudego mleka, jest mieszaniną czterech głównych składników stanowiących około 80% frakcji (α -laktoglobuliny, β -laktoglobuliny, immunoglobulin i albumin osocza) oraz wielu innych występujących w małych ilościach, w tym dużej liczby enzymów. Badania dużych populacji alergików wykazały, że to właśnie

białka występujące najobficiej w krowim mleku, takie jak: laktoglobuliny (β -LG), kazeiny (CN) i α -laktoalbuminy (ALA) są głównymi alergenami; również białka obecne w mleku w mniejszych ilościach, takie jak albumina bydlęca (BSA), laktoferyna (LF) i immunoglobuliny (Ig) także odgrywają ważną rolę w wywoływaniu alergii na mleko. Podczas gdy nadwrażliwość na CNs, β -LG i ALA są ze sobą powiązane, to alergia na BSA występuje całkowicie niezależnie.

W wyniku wielu badań udało się scharakteryzować i opisać 2 główne alergeny zaangażowane w CMA: kazeinę (α s1-CN) i β -laktoglobulinę.

β -laktoglobulina (β -LG) należy do białek serwatkowych, jest globularną albuminą o masie cząsteczkowej 18,4 kDa, stanowi ok. 50% białek serwatkowych. Stężenie β -LG w mleku krowim wynosi ok. 3,2-3,5 g·dm⁻³.

β -LG należy do nadrodziny lipokalin, jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek wiążących lipidy i jest zdolne do wiązania szerokiego zakresu cząsteczek włączając retinol, β -karoten, nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe i węglowodory alifatyczne. Posiada 3 mostki dwusiarczkowe i jest obecne w kilku odmianach, przy czym najbardziej powszechne są warianty A i B minimalnie różniące się składem aminokwasów, natomiast wariant C odkryto w rasie, chowie Jersey. β -LG występuje naturalnie jako mieszanina monomerów i dimerów, przy czym proporcja monomerów wzrasta po ogrzewaniu do 70°C. Jej pojedynczy łańcuch peptydowy jest zbudowany ze 162 aminokwasów, spośród których należy wymienić metioninę, nieodzowny składnik racjonalnego żywienia.

β -LG uczula do 80% chorych z CMA, prowokacja doustna dzieci z CMA wypadła dodatkowo u 62% badanych. Istotną rolę w uczulających właściwościach tego białka odgrywa laktoza (ogólny odsetek węglowodanów w β -LG wynosi 0,1%). Ogólnie β -LG posiada wiele (co najmniej 8) epitopów. Trzy z nich są uważane za większe. W β -LG możemy wyróżnić następujące fragmenty peptydów, pierwsze z nich są rozpoznawane przez 97, 92 i 89% ludzkich surowic: AA102-124, AA41-60 i AA149-162. Drugą grupę peptydów stanowią AA1-8, AA25-40, AA92-100 rozpoznawane przez 58-72% ludzkich surowic, ostatnia grupa obejmuje peptydy AA9-14, AA84-91 i AA92-100 rozpoznawane przez 40% ludzkich surowic.

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- odczynnik WR (*working agent*) do oznaczenia białka, w skład którego wchodzi:
 - BCA (*bicinchoninic acid*) Protein Assay Reagent A,
 - BCA Protein Assay Reagent B,

- bufor fosforanowy (płuczący) PBS (2 dm^3) o następującym składzie:
 - KH_2PO_4 (0,754 g), Na_2HPO_4 (11,464 g), NaCl (18 g), Tween 20 (*polyethylene glycol sorbitan monolaurate* – detergent niejonowy) (2 cm^3), dopełnić wodą destylowaną do 2 dm^3 ,
- bufor węglanowy o pH 9,6 otrzymany po rozpuszczeniu 1 kapsułki odczynnika firmy Sigma w $100 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$ destylowanej,
- 1,5 % r-r żelatyny w PBS do blokowania płytki,
- r-r handlowy substratu dla enzymu: TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna firmy Sigma do oznaczania aktywności peroksydazy chrzanowej lub pNPP (fosforan p-nitrofenolu) do oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej,
- $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ lub $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$ do zatrzymania reakcji enzymatycznej.

2.2. APARATURA I SPRZĘT

- mikropłytki polistyrenowe 96-studzienkowe,
- inkubator do mikropłytek Solo firmy ThermoLabsystem,
- płuczka automatyczna BIO-TEK EL 40108 Wellwash firmy ThermoLabsystem,
- mikropłytkowy czytnik do testów Multiskan RC firmy ThermoLabsystem z oprogramowaniem komputerowym (program Genesis),
- pipety automatyczne nastawne na $100 \mu\text{m}^3$, $200 \mu\text{m}^3$, jedno- i wielokanałowe,
- probówki polipropylenowe z korkiem,
- probówki typu ependorf.

2.3. MATERIAŁ DO BADAŃ

- próbka badana (mleko, produkty fermentowane),
- monoklonalne przeciwciała ludzkie – IgE – skierowane przeciwko β -laktoglobulinie,
- monoklonalne przeciwciała mysie skierowane przeciwko ludzkiej immunoglobulinie IgE skoniugowane z peroksydazą chrzanową lub fosfatazą alkaliczną firmy Sigma.

2.4. METODYKA

Metoda Pierce'a – oznaczanie białka przebiega w dwóch etapach, w pierwszym następuje chelatowanie (redukcja) jonów miedzi Cu^{2+} do Cu^+ przez białko (zasadowe środowisko), w wyniku reakcji tworzy się barwny (jasnoniebieski) kompleks białkowo-miedziowy (reakcja biuretowa). W drugim etapie z powstałym wcześniej jonem miedziowym (Cu^+) reaguje kwas bicinochinowy (BCA), w wyniku chelatowania 2 molekuł BCA z 1 jonem Cu^+ tworzy się barwny (fiole-

towy) produkt, którego absorbancja jest proporcjonalna do stężenia białka w próbce.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) jest testem immunoenzymatycznym wykorzystującym reakcję barwną enzymu sprzężonego z przeciwciałem do jakościowego i ilościowego oznaczania antygenów. Reakcja z enzymem tworzy barwny produkt, którego stężenie może być oznaczone spektrofotometrycznie. Ilość powstałego produktu odpowiadająca stężeniu kompleksu przeciwciało-antygen jest proporcjonalna (ELISA pośredni, bezpośredni, sandwich) lub odwrotnie proporcjonalna (kompetycyjna ELISA) do ilości alergenów w próbce żywności. Stężenie kompleksu przeciwciało-antygen jest wyznaczone w oparciu o krzywą wzorcową wyznaczoną przy użyciu właściwych standardów. W tym ćwiczeniu zastosowano pośredni test ELISA. Ten schemat reakcji ELISA jest najczęściej stosowany i służy do wykrywania ilości badanego białka w próbce (homogenaty tkankowe) oraz w badaniach diagnostycznych np. do ustalenia miana przeciwciał we krwi.

3. WYKONANIE OZNACZENIA

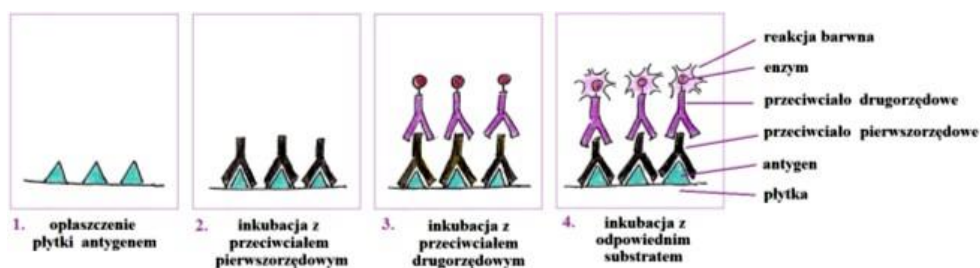
3.1. OZNACZENIE BIAŁKA

1. Przygotowanie 10-krotnych rozcieńczeń próbki badanej w H_2O destylowanej.
2. Naniesienie $25 \mu\text{m}^3$ przygotowanych rozcieńczeń próbki w 3 powtórzeniach na płytkę (próba kontrolna – $25 \mu\text{m}^3 \text{H}_2\text{O}$).
3. Przygotowanie odczynnika WR przez zmieszanie odczynnika A i B w stosunku 1:50.
4. Dodanie do wszystkich studzienek $200 \mu\text{m}^3$ odczynnika WR.
5. Inkubacja płytki w temp 37°C przez 0,5 h w inkubatorze.
6. Pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$.
7. Obliczenie zawartości białka na podstawie krzywej wzorcowej dla albuminy (BSA).

3.2. TEST ELISA

1. Przygotowanie x-krotnych rozcieńczeń próbek w buforze węglanowym tak, aby uzyskać 1-5 μg białka na studzienkę.
2. Opłaskanie płytki poprzez naniesienie do studzienki $100 \mu\text{m}^3$ roztworu próbki badanej w 3 powtórzeniach i inkubacja przez noc w 4°C .
3. Usunięcie roztworów ze studzienek i przepłukanie studzienek buforem PBS przy użyciu płuczki automatycznej (4 razy).

4. Blokowanie miejsc niezajętych przez antygen za pomocą żelatyny, inkubacja 1 h. Etap ten zapobiega nieselektywnemu przyłączaniu się badanych białek do fazy stałej podczas następnych etapów testu.
5. Usunięcie roztworów ze studzienek i przepłukanie płytki buforem PBS (4 razy).
6. Dodanie do wszystkich studzienek (poza kontrolnymi) $100\ \mu\text{m}^3$ rozcieńczonego roztworu surowicy wzorcowej zawierającej IgE specyficzne dla β -laktoglobuliny, inkubacja 1 h. Próbkki kontrolne nie zawierają surowicy wzorcowej.
7. Usunięcie roztworów ze studzienek i przepłukanie płytki buforem PBS (4 razy).
8. Dodanie do wszystkich studzienek $100\ \mu\text{m}^3$ rozcieńczonego (1000x) roztworu drugorzędowego przeciwciała skierowanego przeciwko IgE ludzkiej znakowanego enzymem (peroksydazą chrzanową lub fosfatazą alkaliczną), inkubacja 1 h.
9. Usunięcie roztworów ze studzienek i przepłukanie płytki buforem PBS (4 razy).
10. Dodanie $100\ \mu\text{m}^3$ substratu odpowiedniego dla danego enzymu TMB lub pNPP, inkubacja odpowiednio 1 h lub 0,5 h. Pojawi się reakcja barwna a jej intensywność świadczy o ilości badanego białka w próbce.
11. Dodanie $100\ \mu\text{m}^3$ $1\ \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ H_2SO_4 lub $3\ \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej.
12. Pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 450$ lub $405\ \text{nm}$.



4. ANALIZA WYNIKÓW

4.1. ZAWARTOŚĆ BIAŁKA

W oparciu o zależność absorbancji od stężenia białka obliczono:

a) w przypadku próbki płynnej:

zawartość białka w próbce = $x[\text{mg}\cdot\text{cm}^{-1}] \cdot \text{rozcieńczenie próbki}$,

b) w przypadku próbki stałej przygotowujemy ekstrakt z próbki i oznaczamy:
zawartość białka w ekstrakcie = $x[\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}] \cdot \text{rozcieńczenie ekstraktu}$
zawartość białka w próbce = $(x[\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}] \cdot \text{rozcieńczenie} \cdot V)/m$,

gdzie: m – naważka,

V – objętość ekstraktu,

x – liczymy z równania $y = ax + b$ z krzywej wzorcowej dla albuminy.

Krzywa wzorcowa sporządzona dla albuminy:

1. Immunoreaktywność ogólna:

$$I_{\text{og.}} = (A - A_k) \cdot \text{rozc. ELISA} \cdot V \text{ ekstraktu,}$$

gdzie: A – średnia wartość absorbancji próbki badanej,

A_k – średnia wartość absorbancji próby kontrolnej,

2. Immunoreaktywność właściwa – immunoreaktywność w przeliczeniu na białko:

$$I = I_{\text{og.}} / B,$$

gdzie: $I_{\text{og.}}$ – immunoreaktywność ogólna,

B – zawartość białka w badanych próbkach.

Pytania kontrolne

1. Jakie wymagania narzuca Dyrektywa Parlamentu Europejskiego w stosunku do produktów żywnościowych?
2. Wskaż objawy występujące po spożyciu alergennej żywności oraz zdefiniuj pojęcie alergenu.
3. Jakie dwa podstawowe klasy białek zawiera mleko krowie, określ udział procentowy każdej z nich?
4. Które białka krowiego mleka uczestniczą w wywoływaniu alergii pokarmowej?
5. Przedstaw budowę i funkcje β -laktoglobuliny.

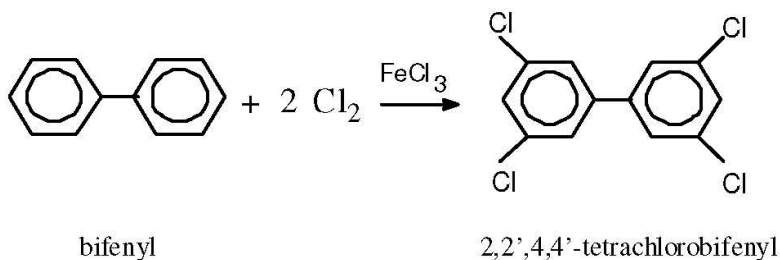
ĆWICZENIE 8

Oznaczanie polichlorowanych bifenyli (PCB) w olejach spożywczych metodą chromatografii gazowej

1. WSTĘP

TOKSYCZNE WŁAŚCIWOŚCI PCB

Polichlorowane bifenyle (PCB) to organiczne związki syntetyczne powstające w wyniku chlorowania cząsteczek bifenyli, rysunek 14. W zależności od liczby atomów chloru i miejsca ich podstawienia istnieje możliwość syntezy 209 izomerów PCB zwanych kongenerami.



Rys. 14. Schemat reakcji powstawania tetrachlorobifenylu

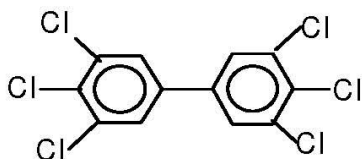
W latach 1930-1976 ponad 600 mln ton tych związków użyto jako:

- podstawowe komponenty cieczy izolacyjnych (olejów) do napełniania transformatorów i kondensatorów,
- dodatki do płynów hydraulicznych,
- dodatki do farb i lakierów,
- składniki plastyfikatorów tworzyw sztucznych.

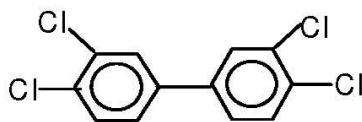
W latach 60. stwierdzono, że PCB są związkami toksycznymi dla organizmów żywych. Wnioski te zostały wyciągnięte na podstawie badań prowadzonych u pacjentów z chorobą Yusho i Yu-Cheng, która wystąpiła masowo w Japonii w 1968 roku oraz na Tajwanie w 1979 roku. Choroba ta, spowodowana została spożyciem oleju ryżowego skażonego PCB przez kilka tysięcy osób. Skażenie nastąpiło na skutek wycieku olejów mineralnych z urządzeń technicznych do oleju jadalnego podczas procesu produkcji [1, 2].

Toksyczne efekty wpływu PCB na organizm ludzki zaobserwowano również u osób pracujących przy produkcji urządzeń elektrotechnicznych wypełnianych olejami zawierającymi PCB [3-5]. Badania prowadzono także u dzieci osób zatrutych PCB. Zwiększone stężenie polichlorowanych bifenyli w organizmach matek powodowało zmiany rozwoju psychicznego i fizycznego u potomstwa [6, 7].

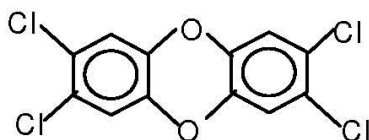
Toksyczność PCB jest ściśle związana ze strukturą kongenerów. Na największą uwagę, ze względu na poziom toksyczności, zasługują kongenery nie zawierające atomów chloru w pozycji *orto* lub izomery z jednym atomem chloru w pozycji *orto* jednego z dwóch pierścieni bifenylu. Kongenery te wykazują koplanarną konfigurację z dioksynami, a dokładnie z 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyną (2,3,7,8-TCDD), uznaną za najbardziej toksyczną w grupie dioksyn [8].



3,3',4,4',5,5'-heksachlorobifenyl



3,3',4,4'-tetrachlorobifenyl



2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna

Rys. 15. 2,3,7,8-TCDD oraz przykłady koplanarnych kongenerów PCB

Toksyczność poszczególnych związków wykazujących podobieństwo do dioksyn, między innymi PCB, jest zróżnicowana. Spośród dioksyn i pochodnych furanu do najbardziej toksycznych należą izomery zawierające cztery atomy chloru w cząsteczce [9].

Toksyczność PCDD, PCDF i PCB ustalono w stosunku do najbardziej toksycznej dioksyny, 2,3,7,8-TCDD, której wartość współczynnika LD_{50} dla świń morskich wynosi 0,6 μg na kilogram masy ciała. Wyznaczono współczynnik równoważnika toksyczności (TEF), którego wartość dla 2,3,7,8-TCDD równa jest 1. Innym związkom przypisano wartości od 0 do 1. Tabela 8 zestawia wartości TEF dla niektórych kongenerów PCB [10] według danych opublikowanych przez Safe'a [11], Smith'a [12] i Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) [13].

PCB wpływa na organizm ludzki podobnie jak 2,3,7,8-TCDD, która, działając na jądro komórkowe powoduje zmiany zapisu kodu genetycznego, jak również wpływa na pracę hormonów sterydowych, estrogenu i testosteronu [14].

Tabela 8. Zestawienie wartości TEF dla wybranych kongenerów PCB

Lp.	Kongener PCB	Nr IUPAC	TEF wg Safe'a	TEF wg Smith'a	TEF wg WHO
1	3,3',4,4'-CB	77	0,01	0,0027	0,0005
2	3,4,4',5-CB	81	-	0,0000086	-
3	3,3',4,4'-CB	126	0,1	0,4	0,1
4	3,3',4,4',5,5'-CB	169	0,05	0,0016	0,01
5	2,3,4,4'-CB	60	-	0,0000085	0,0001
6	2,3,3',4,4'-CB	105	0,001	0,0011	0,0005
7	2,3,4,4',5-CB	114	0,0002	0,000095	0,0001
8	2,3',4,4',5-CB	118	0,0001	0,0000083	0,0001
9	2',3,4,4',5-CB	123	0,00005	0,00024	0,0001
10	2,3,3',4,4',5-CB	156	0,0004	0,000046	0,0005
11	2,3',4,4',5,5'-CB	167	-	0,0000072	0,00001
12	2,3,3',4,4',5,5'-CB	189	-	0,0000085	0,0001
13	2,2',3,3',4,4'-CB	128	-	<0,0000072	-
14	2,2',3,4,4',5'-CB	138	-	<0,0000072	-
15	2,3,3',4,4',6-CB	158	-	<0,0000072	-
16	2,3,4,4',5,6-CB	166	-	<0,0000072	-
17	2,2',3,3',4,4',5-CB	170	-	0,000016	0,0001
18	2,2',4,4',5,5'-CB	180	-	-	0,00001

Metabolizm ksenobiotyków, do których zaliczane są dioksyny i polichlorowane bifenyle przebiega na ogół w dwóch fazach, w których pierwsza związana jest z reakcjami redoks druga zaś z substancjami hydrofilowymi obecnymi w organizmie [15]. Na rysunku 16 zaproponowano schemat przemian ksenobiotyków w organizmie człowieka.



Rys. 16. Schemat przemian ksenobiotyków w organizmie człowieka

W fazie pierwszej główną reakcją jest hydroksylacja katalizowana przez jeden z enzymów zaliczanych do monooksygenaz lub cytochromów P-450. Innymi reakcjami zachodzącymi w fazie pierwszej są redukcja i hydroliza. W fazie drugiej hydroksylowane lub zmienione w inny sposób w fazie pierwszej ksenobiotyki ulegają przekształceniu do różnych metabolitów polarnych poprzez sprzężanie z kwasem glukuronowym, siarkowym, octowym, glutationem albo niektórymi aminokwasami lub poprzez metylację. Głównym celem obu faz przemian ksenobiotyków jest zwiększenie ich rozpuszczalności w wodzie, dzięki czemu ułatwione jest ich wydalenie z organizmu. Bardzo silnie hydrofobowe ksenobiotyki, w tym PCB, mogą długi czas przebywać w tkance tłuszczowej organizmu.

Badania kliniczne prowadzone przez James'a i współpracowników [16] sugerują, że PCB wywołuje różne schorzenia skóry (wysypkę, podrażnienia). Zjawiska te zaobserwowano głównie u osób mieszkających w pobliżu terenów skażonych PCB, spożywających ryby zakażone tymi związkami oraz u osób pracujących przy obsłudze urządzeń wypełnionych olejami zawierającymi PCB.

Badania prowadzone pod kierunkiem Hayes'a [17] wykazały, że efekty kancerogenne PCB ujawniają się u osób narażonych na długotrwały kontakt z tymi związkami, powodując zwiększone ryzyko zachorowalności na nowotwór wątroby lub woreczka żółciowego.

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA PCB

Ze względu na dokładność i jakość otrzymywanych wyników do analiz polichlorowanych bifenyli wykorzystywane są techniki chromatografii gazowej (GC) oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrografem masowym (GC/MS). W analizie PCB najczęściej stosowany jest detektor wychwytu elektronów (ECD) oraz detektor płomieniowy (FID). Gazami nośnymi, używanymi podczas analiz, są wysokiej czystości azot lub hel.

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z oznaczaniem polichlorowanych bifenyli (PCB) w olejach jadalnych przy użyciu technik AAS.

2.2. APARATURA

Do analiz polichlorowanych bifenyli użyto chromatograf gazowy SRI 8610, (SRI INSTRUMENTS, CA, USA), dla którego granica wykrywalności wynosi 1 bpm. Chromatograf zawiera detektor wychwytu elektronów (ECD) i kolumnę kapilarną DB-5 o długości 30 m. Gazem nośnym jest azot, którego ciśnienie wstępne wynosi 1.5 psi (około 0,1 atm). W oznaczeniach wykorzystywane jest oprogramowanie Peak Simple II wersja 3.86.

2.2. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Podczas wykonywania ćwiczenia do analiz wykorzystano różne oleje zawierające PCB:

- olej mineralny,
- olej rzepakowy,
- olej winogronowy,
- olej słonecznikowy.

Odczynniki chemiczne potrzebne do wykonania ćwiczenia:

- izooktan cz.d.a.,
- stężony kwas siarkowy,
- wzorec PCB Mix 1 firmy Supelco zawierający 6 kongenerów PCB w ilości 10 ppm każdy:
 - 2,6-dichlorobifenyl (2-CB),
 - 2,4,4'-trichlorobifenyl (3-CB),
 - 2,2',4,4'-tetrachlorobifenyl (4-CB),
 - 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobifenyl (7-CB),
 - 2,2',4,4',5,5'-heksachlorobifenyl (6-CB),
 - 2,2',3,4,4',5,5'-heksachlorobifenyl (6*-CB).

2.3. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ

1 cm³ oleju zanieczyszczonego PCB należy odpowiednio rozcieńczyć w izooktanie, tak by końcowy roztwór nie przekraczał stężenia 50 ppm oznaczanych związków. 0,5 μm³ przygotowanego roztworu należy nanieść na kolumnę chromatograficzną. Analiza powinna być prowadzona w odpowiednim programie temperaturowym.

3. ANALIZA WYNIKÓW

Po przeprowadzonych analizach należy określić stężenie wybranych kongenerów PCB w skażonym oleju. Otrzymane wyniki (chromatogram) należy porównać z wynikami wzorca PCB Mix 1 firmy Supelco.

Otrzymane wyniki należy porównać z obowiązującymi normami europejskimi i określić czy i jaka zawartość PCB jest dopuszczalna w olejach mineralnych.

Z chromatogramu otrzymanego dla wzorca, którym jest mieszanina kongenerów PCB Mix 1 należy odczytać powierzchnie pod pikami wybranych kongenerów. Powierzchniom tym odpowiada stężenie kongeneru PCB 10 ppm.

Z chromatogramu otrzymanego dla analizowanej próby oleju skażonego PCB należy odczytać powierzchnie pików dla wybranych kongenerów PCB. Zawartość poszczególnych kongenerów PCB należy obliczyć ze wzoru:

$$C = \frac{10 * B}{A} [\text{ppm}]$$

gdzie: C – stężenie wybranego kongeneru PCB wyrażone w ppm,

A – powierzchnia pików wybranego kongeneru PCB odczytana z chromatogramu wzorca,

- B – powierzchnia piku wybranego kongeneru PCB odczytana z chromatogramu analizowanej próbki oleju,
 10 – stężenie wybranego kongeneru PCB ze wzorca Mix 1 wyrażone w ppm.

Wyniki należy zestawzić w tabeli:

Nr próby	Rodzaj próby	Oznaczany kongener	Powierzchnia piku	Stężenie [ppm]
1	Wzorec PCB Mix 1			
2	Olej słonecznikowy			
3	Olej rzepakowy			
4	Norma			

Pytania kontrolne

1. Omówić budowę i zastosowanie polichlorowanych bifenyli (PCB).
2. Omówić właściwości toksyczne PCB i dioksyn.
3. Omówić metabolizm ksenobiotyków w organizmie człowieka.
4. Omówić przygotowanie i analizę próbek olejowych zawierających PCB.

Literatura

- [1] **Haglund P., Jakobsson E., Masuda Y.:** (1995), *Isomer-specific analysis of polychlorinated naphthalenes in Kanechlor KC 400, Yusho rice oil, and adipose tissue of a Yusho victim*, Organohalogen Compd 26, pp. 405-410.
- [2] **Tanabe S., Kannan N., Wakimoto T., Tatsukawa R., Okamoto T., Masuda Y.:** (1989), *Isomer-specific determination and toxic evaluation of potentially hazardous coplanar PCBs, dibenzofurans and dioxins in the tissues of "Yusho" PCB poisoning victim and in the causal oil.*, Toxicol. Environ Chem 24, pp. 215-231.
- [3] **Bertazzi P.A., Riboldi L., Pesatori A., Radice L., Zocchetti C.:** (1987), *Cancer mortality of capacitor manufacturing workers*, Am J Ind Med 11, pp. 165-176.
- [4] **Brown D.P., Jones M.:** (1981), *Mortality and industrial hygiene study of workers exposed to PCB*, Arch Environ Health 36, pp. 120-129.
- [5] **Brown D.P.:** (1987), *Mortality of workers exposed to PCB – An update*, Arch Environ Health 42, pp. 333-339.
- [6] **Guo Y.L., Lin C.J., Yao W.J., Ryan J.J., Hsu C.C.:** (1994), *Musculoskeletal changes in children prenatally exposed to PCB and related compounds (Yu-Cheng children)*, J Toxicol Environ Health 41, pp. 83-93.
- [7] **Yu M.-L., Hsu C.-C., Gladen B.C., Rogan W.J.:** (1991), *In utero PCB/PCDF exposure: Relation of developmental delay to dysmorphology and dose*, Neurotoxicol Teratol 13, pp. 195-202.
- [8] **Silberhorn E., Glauert H.P., Robertson L.W.:** (1990) *Carcinogenicity of Polychlorinated biphenyls: PCBs and PBBs*, Crit. Rev. Toxicol.20(6):397-426.

- [9] **Huang Q.D., Rusling J.F.:** (1995), *Formal Reduction Potentials and Redox Chemistry of Polyhalogenated Biphenyls in a Bicontinuous Microemulsion*, Environ. Sci. Technol.29(1): 98-103.
- [10] **Safe S.:** (1990), *Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs), and Related Compounds: Environmental and Mechanistic Considerations Which Support the Development of Toxic Equivalency Factors (TEFs)*, Crit. Revi. Toxicol. 21 (1): 51-88.
- [11] **Smith L.M., Schwartz T.R., Feltz K., Kubiak T.J.:** (1990), *Determination and Occurrence of AHH-Active Polychlorinated Biphenyls, 2,3,7,8-Tetrachloro-p-dioxin and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in Lake Michigan Sediment and Biota. The question of Their Relative Toxicological Significance*, Chemosphere 21(9):1063-1085.
- [12] **Ahlborg U.G., Hanberg A.:** (1994), *Toxic Equivalency Factors for Dioxin-Like PCBs*, Environ. Sci.Pollut. Res. Int. 1(2):67-68.
- [13] **Colborn T., Von Saal F.S., Soto A.M.:** (1993), *Developmental Effects of endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans*, Environ. Health Perspect. 101(5):378-384.
- [14] **Raloff J.:** (1994), *The Gender Benders. Are Environmental Hormones Emasculating Wildlife?* Sci. News 145:24-27.
- [15] **Murray R.K., Granmer D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.:** (1995), *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ss. 817-823.
- [16] **James R.C., Busch H.B., Tamburro C.H., Roberts S.M., Schell J.D., Harbison R.D.:** (1993), *Polychlorinated Biphenyl Exposure and Human Disease*, J. Occ. Med. 35(2):136-147.
- [17] **Hayes M.A.:** (1987), *Carcinogenic and Mutagenic Effects of PCBs*, in *Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology*. Environmental Toxin Series Vol. 1; Safe S and Hutzinger O., Edss. (New York: Springer-Verlag), pp. 77-95.

ĆWICZENIE 9

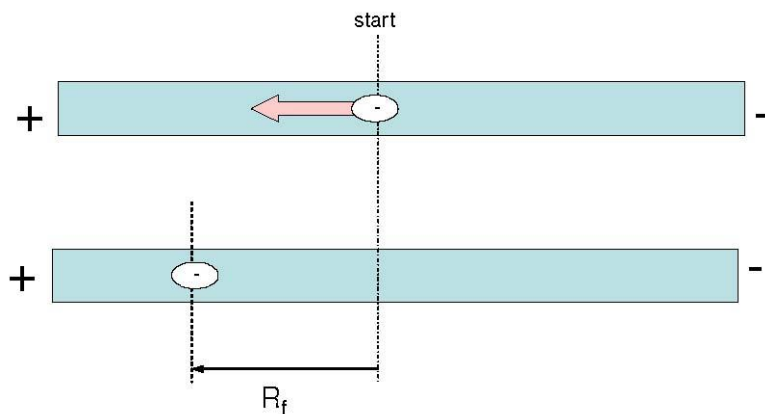
Oznaczenie alergenów metodą immunoblottingu

1. WSTĘP

Immunoblotting, zwany także *Western blotting*, to technika analityczna stosowana do wykrywania i analizowania białek w próbkach tkanek lub ich ekstraktach. Składa się z trzech części: rozdziału elektroforetycznego białek, transferu na membranę i reakcji immunologicznej specyficznych przeciwciał z analizowanymi białkami. Nazwa metody (*Western blotting*) została użyta jako żart i nawiązanie do wcześniej opracowanej metody (*Southern blotting*), elektroforetycznej analizie DNA, opracowanej przez Edwina Southerna.

1.1. ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY BIAŁEK

Elektroforeza to metoda analityczna, oparta na ruchu naładowanej elektrycznie cząstki w zewnętrznym polu elektrycznym. W zależności od ruchliwości elektroforetycznej cząstek, ich rozmiaru, kształtu, masy cząsteczkowej oraz wielkości ładunku elektrycznego początkowa mieszanina rozdziela się na poszczególne składniki, rozdzielone przestrzennie na matrycy elektroforegramu.



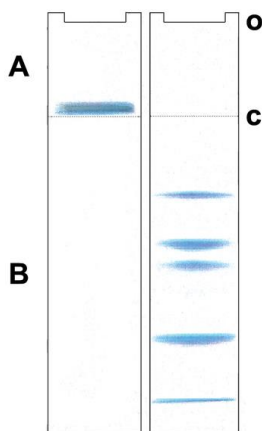
Rys. 17. Schemat działania elektroforezy; start – miejsce naniesienia próbki, R_f – droga migracji (współczynnik retencji frakcji)

Do rozdzielania białek stosuje się elektroforezę żelową na żelu poliakrylamidowym (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE). Matrycą takiego nośnika jest spolimeryzowany akrylamid, charakteryzujący się porami o różnej wielkości, zależnej od stężenia akrylamidu i bis-akrylamidu (N,N'-metyleno-bis-akrylamidu) podczas sieciowania. Gęstość żelu zależy od całkowitego stężenia obu składników, natomiast stopień usieciowienia zależy od stężenia bis-akrylamidu. Reakcję polimeryzacji inicjują wolne rodniki dodawane przez N,N,N',N'-tetrametylo-etylenodiaminę (TEMED) i stabilizowane przez nadsiarczan amonu. Reakcja zachodzi bez dostępu tlenu, który jest inhibitorem tego procesu.

Najczęściej metoda PAGE służy do rozdzielania białek w zakresie od 5 do 2 000 kDa. W zależności od mas rozdzielanych białek stosuje się różne stężenia akrylamidów, małe białka (ok. 2 kDa) rozdziela się na żelu z zawartością 20-30% akrylamidów, do rozdzielania dużych białek (ok. 100 kDa) stosuje się żele o bardzo niskim stężeniu, np. 2,5%. Żel jest w rozdziale elektroforetycznym nie tylko nośnikiem, pełni także funkcję ochronną dla białek przed nadmiernym przegrzewaniem związanym z przyłożonym napięciem elektrycznym, a także sита molekularnego, w zależności od rozmiaru porów wpływa na rozdział białek, zwalniając ruch większych molekuł, oraz ostatecznie utrzymuje rozdzielone białka po zakończeniu rozdzielania w formie umożliwiającej ich dalszą obróbkę, np. transfer lub barwienie.

Żel poliakrylamidowy najczęściej jest stosowany w postaci żelu płytowego o grubości warstwy 0,75÷1,5 mm, umożliwiając równoczesny rozdział wielu próbek. Dodatkowo stosuje się proces w tzw. żelu nieciągłym. Taki żel jest przygotowywany bezpośrednio przed rozdzieleniem w formie dwóch polimerów różniących się usieciowieniem. Podstawowym żelem jest żel rozdzielający (o małych porach), który jako pierwszy jest polimeryzowany pomiędzy dwoma płytkami szklanymi. To właśnie w tym żelu następuje rozdzielenie elektroforetyczne mieszanin. Drugim żelem jest żel zagęszczający (o dużych porach), o wysokości warstwy 1,5-2 cm (w zależności od objętości próbki), wprowadzany nad spolimeryzowany żel rozdzielający. W tej technice bufory: elektrodowy i bufory wchodzące w skład żeli różnią się składem i pH. Podczas migracji przez żel zagęszczający mieszanina białek w próbce ulega koncentracji, dzięki czemu niezależnie od objętości próbki badanej wszystkie białka wchodzą w żel rozdzielający w postaci wąskiego pasma.

Próbki badane są umieszczane w studzienkach żelu, formowanych mechanicznie podczas polimeryzacji żelu zagęszczającego. Podczas rozdzielania, białka z każdej próbki migrują pionowo w dół żelu, tworząc ścieżkę, indywidualną dla każdej studzienki. Po zakończeniu elektroforezy poszczególne białka są rozdzielone na ścieżce w postaci prążków (widoczne dopiero po wybarwieniu).



Rys. 18. Schemat migracji białek w żelu podczas elektrolizy
(A – żel zagęszczający, B – żel rozdzielający, o – poziom naniesienia próbki,
c – granica żeli)

Ważnym elementem w metodzie PAGE jest zastosowanie odpowiednich buforów, będących główną fazą, w której umieszczone są białka. Bufory nie tylko utrzymują stałe pH podczas procesu, ale także przenoszą odpowiednie jony w polu elektrycznym. Składniki buforu nie mogą modyfikować lub reagować ze składnikami mieszaniny rozdzielanej. Wybór buforów ma wpływ na rozdzielczość metody, jest stosowany podczas rozdziału jeden bufor lub dwa – katodowy i anodowy.

Białka są nanoszone na żel w postaci natywnej (niezmienionej chemicznie) lub w postaci zdenaturowanej. Rozdział białek następuje w zależności od ich rozmiaru i/lub ładunku. Mniejsze fragmenty lub cząstki łatwiej migrują poprzez pory żelu.

Najczęściej stosowaną techniką PAGE do rozdzielania białek jest wykorzystanie dodecylosiarczanu sodu (SDS). Dodatek tego detergentu powoduje nieodwracalną denaturację białek i nadaje cząsteczkom negatywny ładunek elektryczny, przy czym ładunek otrzymanych polimerów jest proporcjonalny do ich masy cząsteczkowej. Ogrzewanie białek z detergentem do 60°C przyspiesza przyłączanie SDS, utrwalaając denaturację. Dodatkowo do próbek dodaje się inne silne środki redukujące, takie jak 2-merkaptetanol lub ditiotreitol (DTT), redukujące mostki disiarczkowe w białkach. Przyłączanie SDS zachodzi przy stałym stosunku 1,4 g SDS·g⁻¹ polipeptydu. Utrata przestrzennej struktury białek ułatwia ich ruch w żelu, co u białek natywnych jest utrudnione przez ich kształt. Analizę otrzymanych elektroforegramów ułatwia dodatek tzw. markerów masowych, handlowej mieszaniny kilku białek o wybranych masach cząsteczkowych. Porównując drogę przebytą przez analizowane białka i białka z markera, można

wyznaczyć masy cząsteczkowe poszczególnych protein (zależność półlogarytmiczna).

Dodatkowo do próbki badanej jest dodawany roztwór barwnika np. błękit bromofenolowy. Ten niskocząsteczkowy związek posiada najwyższą ruchliwość elektroforetyczną w przygotowanej mieszaninie, przemieszcza się podczas procesu elektrolizy najszybciej, a co za tym idzie wskazuje eksperymentatorowi przebieg rozdziału w żelu (białka są bezbarwne). Dotarcie barwnika do anodowego (dolnego) końca żelu oznacza zakończenie rozdziału elektroforetycznego.

Obok rozdziału jednokierunkowego (1D) są stosowane rozdziały 2D, u których proces elektrolizy jest dwuczęściowy. Pierwszy etap rozdziału pojedynczej próbki przebiega w żelu formowanym w rurce, najczęściej jest to elektroogniskowanie (IEF). Rozdział białek w żelu następuje na skutek gradientu pH immobilizowanego w żelu. W zewnętrznym polu elektrycznym białko migruje w zależności od własnego ładunku do miejsca o pH odpowiadającego jego punktowi izoelektrycznemu (pI), w którym białko traci ładunek i kończy migrację. W drugim etapie rozdziału żel z rurki umieszcza się na górnej krawędzi żelu płytowego i prowadzi drugi rozdział w kierunku obróconym o 90° w stosunku do pierwszego rozdziału, np. w oparciu o masy cząsteczkowe. Rozdział 2D daje więcej informacji o mieszaninie białek w próbce badanej, pojawiających się na żelu w postaci plamek (spotów), jednakże jednorazowo na żelu może być analizowana tylko jedna próbka, podczas gdy w rozdziale 1D w zależności od rozmiarów żelu analiza dotyczy od kilku do kilkunastu próbek.

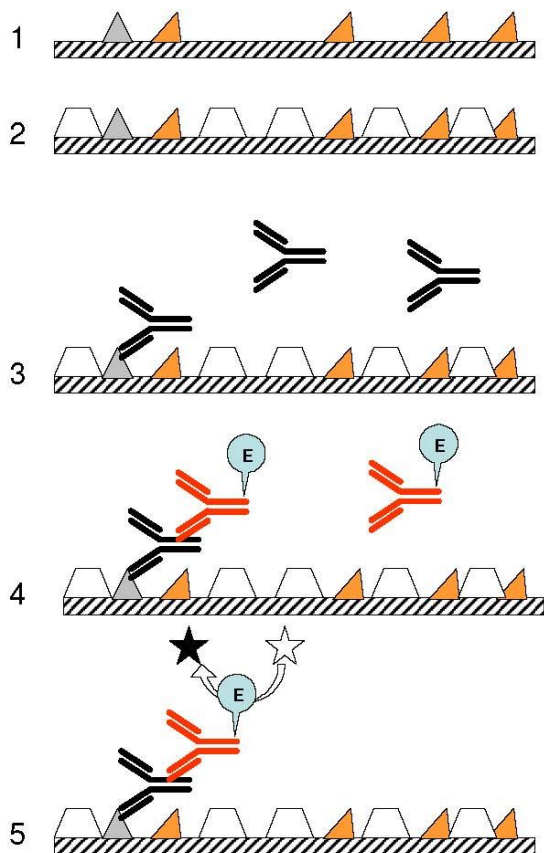
1.2. TRANSFER BIAŁEK Z ŻELU NA MEMBRANĘ

Po rozdziale elektroforetycznym białka znajdują się wewnątrz żelu i w takiej formie są niedostępne dla swoistych przeciwciał. Drugim etapem immunoblottingu jest przeniesienie ich z żelu na membranę wykonaną z nitrocelulozy lub difluorku poliwinylidenu (PVDF). Transfer jest wykonywany przy użyciu przyłożenia zewnętrznego napięcia elektrycznego, w środowisku buforu transferowego. Potwierdzenie procesu transferu białek można uzyskać przez niespecyficzne barwienie barwnikami (Błękit brylantowy Coomassie lub Ponceau S).

1.3. REAKCJA IMMUNOLOGICZNA ANALIZOWANYCH BIAŁEK

Umieszczone na powierzchni membrany białka są dostępne dla swoistych przeciwciał. Jednak przed ich dodaniem jest wymagany etap blokowania. Polega on na uniemożliwieniu przypadkowego przyłączania (adhezji) przeciwciał do samej membrany, poprzez naniesienie na nią w miejsca wolne roztworu białek nie reagujących z wybranymi przeciwciałami. Najczęściej stosuje się roztwory albuminy surowicy wołowej lub odtłuszczonego mleka w buforze. Blokowanie jest niezbędnym etapem przed reakcją, redukuje zakłócenia pomiaru i eliminuje

falszywe pozytywne wyniki. Nadmiar białek blokujących, niezwiązanych z membraną, jest usuwany przez przepłukanie membrany buforem przemycającym.



Rys. 19. Schemat reakcji immunoenzymatycznej na membranie
(1 – przeniesienie białka na powierzchni membrany, 2 – blokowanie miejsc pustych membrany przy użyciu białek mleka krowiego, 3 – dodatek swoistych przeciwciał, 4 – dodanie koniugatu drugich przeciwciał z enzymem, 5 – wywołanie reakcji barwnej)

Zanurzenie membrany w roztworze swoistych przeciwciał pozwala na swobodny dostęp przeciwciał do białek, przeciw którym były wytworzone. Przeciwciała przylgają się do antygenów (i tylko do nich), a ich nadmiar jest po upływie czasu inkubacji usuwany w trakcie przemycania. Ze względu na stosowanie różnych przeciwciał swoistych skierowanych przeciw różnym antygenom, nie stosuje się znakowania przeciwciał swoistych, a zamiast tego wykorzystuje się drugie przeciwciała, znakowane poprzez przyłączenie innej cząsteczki, np. biotyny, enzymu lub radioaktywnego izotopu. Przeciwciała drugiego rodzaju są

produkowane przeciw białkom pochodzącym od gatunku osobnika, od którego pochodzą swoiste przeciwciała, a różnego niż producent przeciwciał drugich, np. kozie przeciwko króliczym. Niezwiązane przeciwciała, tak jak wcześniej, są usuwane podczas przemycania membrany.

W zależności od sposobu znakowania drugich przeciwciał są stosowane różne rodzaje wizualizacji immunoreaktywnych białek. Najczęściej do znakowania, są stosowane enzymy, które pod wpływem dodanego, odpowiednio dobranego, bezbarwnego substratu tworzą barwne związki lub związki charakteryzujące się luminescencją. Ostatnim etapem jest zeskanowanie membrany do pliku i jego obróbka matematyczna.

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1. CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z immunologicznymi metodami oznaczania składników w żywności, a szczególnie poznanie metody immunoblottingu oznaczania alergenów w żywności.

2.2. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- woda destylowana,
- etanol 60% i 95 % roztwór wodny (v/v),
- methanol,
- n-butanol,
- glicerol,
- akrylamid,
- bis-akrylamid,
- tris,
- dodecylosiarczan sodu (SDS),
- nadsiarczan amonu (APS),
- TEMED,
- merkaptoetanol,
- bromofenol,
- glicyna,
- kwas trichlorooctowy (TCA),
- błękit brylantowy Coomassie,
- NaCl,
- KCl,
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

- KH_2PO_4 ,
- Tween 20,
- BCIP/NBT,
- $1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl,
- Odtłuszczone mleko w proszku.

2.3. APARATURA I SPRZĘT

- aparat do elektroforezy z przystawką do immunoblottingu,
- waga analityczna typ AP 250 Ohaus,
- wirówka,
- mikrostrzykawki nastawne jednokanałowe z tipsami jednorazowymi wykonanymi z PP,
- fiołki polipropylenowe z korkiem PP 7 cm^3 , fiołki Eppendorffa PP $1,5\text{ cm}^3$,
- pojemniki PP.

2.4. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW PRÓBEK BADANYCH

Naważkę $1,0\text{ g}$ mąki przenieść do fiołki o pojemności 7 cm^3 , dodać $5,0\text{ cm}^3$ 60% etanolu i wytrząsać na wytrząsarce 10 minut. Po tym czasie odwirować, ciecz nad osadu przenieść do probówki, do osadu dodać ponownie $5,0\text{ cm}^3$ 60% etanolu i wytrząsać na wytrząsarce 10 minut. Odwirować, a roztwór połączyć z supernatantem otrzymanym wcześniej.

3. WYKONANIE OZNACZENIA

3.1. ROZDZIAŁ BIAŁEK METODĄ SDS-PAGE

3.1.1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW

UWAGA! Akrylamid jest neurotoksyną – zachować odpowiednie bezpieczeństwo w kontakcie z tym związkiem i jego roztworami.

Roztwór A:

akrylamid	58,4 g
bis-akrylamid	1,6 g
uzupełnić wodą destylowaną do 200 cm^3 .	

Roztwór B:

tris	36,3 g
SDS	0,8 g

Rozpuścić w H_2O , ustalić pH 8,8 ($1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}$); uzupełnić wodą destylowaną do 200 cm^3 .

Roztwór C: tris 3,025 g
 SDS 0,2 g
 uzupełnić wodą destylowaną do 50 cm^3 ; pH 6,8

Roztwór D: nadsiarczan amonu 0,1 g
 uzupełnić wodą destylowaną do 1 cm^3 ; przygotować bezpośrednio przed użyciem

Roztwór E: roztwór C 25 cm^3
 glicerol 5 cm^3
 merkaptioetanol 10 cm^3
 bromofenol 0,1 g
 uzupełnić wodą destylowaną do 100 cm^3 .

Roztwór F: tris 30,29 g
 glicyna 144,14 g
 SDS 1,0 g
 uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm^3 ; pH 8,3; przed użyciem rozcieńczyć wodą 10x

Roztwór G: n-butanol 25 cm^3
 woda $2,5 \text{ cm}^3$

Roztwór H: kwas trichlorooctowy (TCA) 48 g
 woda 152 cm^3

Roztwór I: błękit brylantowy Coomassie 0,5 g
 rozpuścić w 100 cm^3 95% wodnego roztworu etanolu (v/v).

3.1.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO ROZDZIAŁU

Do $250 \mu\text{m}^3$ ekstraktu badanego dodać $125 \mu\text{m}^3$ roztworu E, $300 \mu\text{m}^3$ glicerolu i gotować 10 minut. Odwirować.

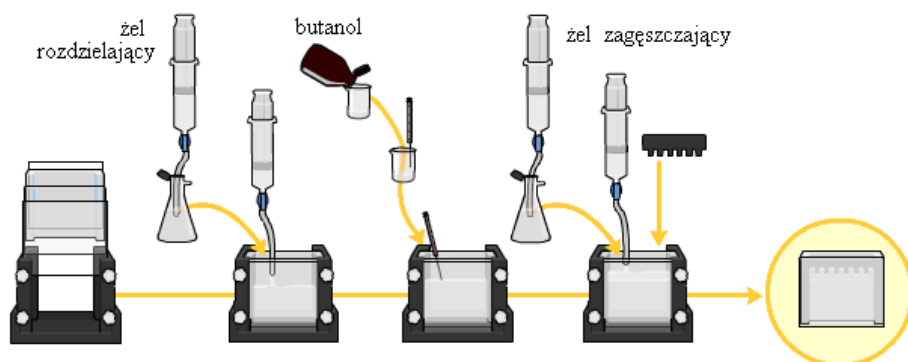
3.1.3. PRZYGOTOWANIE I NANIESIENIE ŻELU

Przygotować roztwór żelu rozdzielającego 10%: do $6,65 \text{ cm}^3$ roztworu A dodać $5,0 \text{ cm}^3$ roztworu B oraz $8,85 \text{ cm}^3$ wody destylowanej. Roztwór dokładnie wymieszać.

Przygotować roztwór żelu zagęszczającego: Do $1,33\text{ cm}^3$ roztworu A dodać $2,5\text{ cm}^3$ roztworu C i $6,2\text{ cm}^3$ wody destylowanej. Dokładnie wymieszać.

Po przygotowaniu roztworu żelu rozdzielającego pobrać 1 cm^3 tego roztworu (na korek) i dodać $3\text{ }\mu\text{m}^3$ TEMED-u i $5\text{ }\mu\text{m}^3$ roztworu D (nadsiarczany amonu). Wlać przygotowaną porcję żelu pomiędzy dwie płytki szklane i poczekać, aż żel ulegnie zestaleniu tworząc korek. Do pozostałej ilości żelu rozdzielającego dodać $20\text{ }\mu\text{m}^3$ TEMED-u i $75\text{ }\mu\text{m}^3$ roztworu D i przenieść do przestrzeni między płytkowej. Wierzch fazy żelującej nawarstwić 1 cm^3 butanolu (roztworu G) i pozostawić w celu polimeryzacji na 45-60 min.

Po uzyskaniu żelu rozdzielającego wylać warstwę butanolu i przepłukać kilkakrotnie wierzch żelu wodą destylowaną i osuszyć bibułą. Przygotować żel zagęszczający: do wcześniej otrzymanego roztworu żelu dodać $20\text{ }\mu\text{m}^3$ TEMED-u i $75\text{ }\mu\text{m}^3$ roztworu D, dokładnie wymieszać i przenieść do przestrzeni między płytkowej. Włożyć grzebień do żelu, zostawić na 20 minut do spolimeryzowania.



Po zastygnięciu żelu rozdzielającego wyjąć grzebień, przepłukać otrzymane studzienki roztworem F (buforem elektroforetycznym), zwracając uwagę na usunięcie powietrza nad żelem. Płytki z żelem pomiędzy nimi przenieść do komory elektroforetycznej, z komorami anodową i katodową wypełnionymi roztworem F.

3.1.4. ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU

Do studzienek żelu nanieść odpowiednio: $3\text{ }\mu\text{m}^3$ roztworu markera masowego i po $10\text{--}15\text{ }\mu\text{m}^3$ próbki w zależności od sposobu dalszego postępowania po elektroforezie (barwienie lub transfer). Podłączyć przewody elektrod do odpowiednich przyłączy potencjostatu. Prowadzić elektrolizę przy stałym napięciu prądu 145 V . Koniec elektroforezy wyznacza migracja barwnika do dolnego końca żelu (ok. 2 godz.).

3.1.5. WIZUALIZACJA ROZDZIELONYCH BIAŁEK (BARWIENIE ŻELU)

Przy oznaczaniu białek metodą immunoblottingu nie stosuje się barwienia żelu po rozdziale elektroforetycznym. W ćwiczeniu poniższy fragment pojawia się ze względów dydaktycznych.

Po zakończeniu elektroforezy wyłączyć zasilanie potencjostatu, wyjąć płytki z żelem i wyjąć żel. Żel przenieść do pojemnika. 5,0 cm³ roztworu I (barwnik) zmieszać z 95,0 cm³ roztworu H (roztwór TCA), zalać żel przygotowanym roztworem i inkubować w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Po tym czasie roztwór barwiący wylać, żel kilkakrotnie przepłukać wodą destylowaną w celu usunięcia nadmiaru barwnika. Żel przenieść na folię bezbarwną i zeskanować.

3.2. IMMUNOBLOTTING ANALIZOWANYCH BIAŁEK

3.2.1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW

Roztwór J (transferowy): pH 8,3

tris 0,525 g

glicyna 14,4 g

metanol 100 cm³

uzupełnić wodą destylowaną do 1 dm³.

Roztwór K (PBS): NaCl 8,01 g

KCl 0,20 g

Na₂HPO₄ · 2H₂O 1,78 g

KH₂PO₄ 0,27 g

Tween 20 1,0 cm³

uzupełnić wodą destylowaną do 1 dm³ pH 7,4

Roztwór L: odtłuszczone mleko w proszku 3,0 g

Rozpuścić i uzupełnić roztworem K do 100 cm³.

Roztwór M: surowica pacjenta z przeciwciałami IgG antygliadynowymi

Rozcieńczyć 100x przy użyciu roztworu K.

Roztwór N: koniugat mysich przeciwciał przeciwko ludzkim IgG z fosfatazą alkaliczną.

Rozcieńczyć 1000x przy użyciu roztworu K.

3.2.2. TRANSFER BIAŁEK NA MEMBRANĘ



Żel przenieść do pojemnika, przemyć roztworem J (transferowym), w osobnych pojemnikach umieścić w roztworze J warstwy gąbki, arkusze bibuły (większe od żelu) oraz membranę odpowiadającą rozmiarem żelowi. Na płycie anody (dolna) umieścić w kolejności: gąbkę nasączoną roztworem J, dwie warstwy bibuły (również nasączone), membranę, żel, dwie warstwy bibuły (nasączone), gąbkę (nasączoną), przykryć katodą (patrz rys. powyżej). Podłączyć przewody elektrod do odpowiadających im przyłączom potencjostatu, prowadzić transfer przy napięciu 20 V i natężeniu prądu 500 mA w ciągu 12 godzin.

Po zakończeniu transferu wyłączyć zasilanie potencjostatu, przenieść membranę do pojemnika i dodać roztwór L (mleko w PBS), inkubować 2 godz. w temperaturze pokojowej lub 12 godz. w temperaturze 4°C. Następnie usunąć roztwór blokujący i przepłukać membranę roztworem K.

3.2.3. REAKCJA IMMUNOLOGICZNA Z BIAŁKAMI

Do pojemnika z membraną dodać roztworu M (swoiste przeciwciała), inkubować w temperaturze pokojowej z równoczesnym łagodnym mieszaniem przez 1 godz., po tym czasie roztwór usunąć, membranę przemyć roztworem K. Dodać roztwór N (drugie przeciwciała z enzymem), inkubować 1 godz., roztwór usunąć, membranę przemyć roztworem K. Dodać roztwór BCIP/NBT, inkubować 1 godz. i roztwór substratu usunąć. Membranę przenieść na bibułę, zostawić do wysuszenia i zeskanować.

4. ANALIZA WYNIKÓW

Pliki zawierające skany komputerowe żelu SDS-PAGE i membrany immunoblottingu opracować przy użyciu programu GelScan, mierząc densytometrycznie stopień zaciemnienia ścieżek, podawany w jednostkach zaciemnienia IOD.

Porównać wyniki uzyskane obiema metodami, napisać wnioski wynikające z przeprowadzonego ćwiczenia.

Pytania kontrolne

1. Jakie właściwości białka wykorzystuje się podczas rozdziału elektroforetycznego?
2. Wymień sposoby przeprowadzenia elektroforezy.
3. Co to jest immunoblotting?
4. Jakie przeciwciała mogą być wykorzystane w immunoblottingu?
5. Zastosowanie immunoblottingu.

ĆWICZENIE 10

Oznaczanie zawartości Hg(II) w próbkach żywności metodą CV-AAS

1. WSTĘP

1.1. RTĘĆ W ŚRODOWISKU

Znaczenie rtęci jako substancji skażającej środowisko naturalne wynika ze specyficznej natury tego metalu, zdeterminowanej mnogością źródeł zanieczyszczenia, lotnością, ruchliwością, trwałością i dużą toksycznością jej poszczególnych form chemicznych – głównie metylortęci i rtęci pierwiastkowej.

Rtęć jest metalem ciężkim występującym w przyrodzie w niewielkich ilościach. Uważana jest za osobliwy pierwiastek chemiczny, gdyż przejawia szczególnie silną aktywność biologiczną i chemiczną oraz zmienność form występowania. Związki rtęci o bardzo zróżnicowanych właściwościach chemicznych i fizycznych włączane są w różne cykle obiegu przyrodniczego. Rtęć, która dostanie się do środowiska naturalnego, nie ulega degradacji, stale w nim zalega, zmieniając jedynie miejsce depozytu. Metal ten krąży w atmosferze, wodach powierzchniowych, osadach wodnych, glebach, skąd jest pobierany przez rośliny i dostaje się do łańcucha troficznego, którego ostatnim ogniwem jest człowiek.

Biogeochemiczny obieg rtęci zależy w dużym stopniu od stężenia oraz fizyczno-chemicznych reakcji, określających formy występowania tego pierwiastka w środowisku. W odpowiednich warunkach środowiskowych rtęć może występować w postaci: związków lotnych (Hg^0 , CH_3HgCH_3); związków rozpuszczalnych w wodzie (Hg^{2+} , HgX_2 , HgX_3^- oraz HgX_4^{2-} , gdzie $\text{X} = \text{OH}^-, \text{Cl}^-, \text{Br}^-$); a także w postaci nierozpuszczalnych kompleksów (CH_3HgS^- , CH_3Hg^+ oraz w postaci Hg^{2+} związanej z siarką, występującą w kwasach humusowych).

W warunkach naturalnych można mówić o globalnym i lokalnym obiegu rtęci. Globalny cykl krążenia rtęci jest związany z cyrkulacją w atmosferze rtęci metalicznej (Hg^0) i jest najczęściej wynikiem występowania tego metalu w źródłach naturalnych (gleby, wody). Obieg lokalny, o znacznie mniejszym zasięgu, jest związany głównie z krążeniem dimetylortęci i jest wynikiem działalności człowieka.

Rtęć dostaje się do powietrza w postaci pary lub cząstek różnych związków. Metal ten najintensywniej paruje ze swojej formy elementarnej oraz ze związków alkilowych. Pary rtęci są szybko wiązane przez pył atmosferyczny, z którym opadają na ziemię lub ulegają rozpuszczeniu w wodach opadowych. W powietrzu atmosferycznym dominuje lotna rtęć elementarna (Hg^0) oraz dime-

tylortęć (CH_3)₂Hg. Obie formy mogą powstawać i podlegać dalszej transformacji w wyniku procesów biochemicznych i fotochemicznych.

Okolo 50-95% rtęci występującej w powietrzu to rtęć lotna (HgO), która może utrzymywać się w tym środowisku przez długi okres czasu i jest najczęściej przenoszona na znaczne odległości, przyczyniając się do globalnego obiegu tego metalu. Rtęć elementarna jest słabo rozpuszczalna w wodzie, dlatego opady atmosferyczne nie wpływają znacząco na jej transport do innych części środowiska. Rtęć metaliczna jest utleniana w atmosferze przez ozon, nadtlenek wodoru, podchloryny oraz organiczne związki tlenowe. Hg na +1 i +2 stopniu utlenienia występuje w atmosferze w znacznie mniejszych ilościach niż rtęć metaliczna i stanowi okolo 3% ogólnego stężenia tego metalu w atmosferze. Te formy rtęci, w przeciwieństwie do rtęci metalicznej, są łatwo rozpuszczalne w wodzie i często przedostają się z opadami atmosferycznymi do wód powierzchniowych i gleb, powodując ich zanieczyszczenie.

W wodach rtęć występuje zwykle w dużym rozproszeniu. Metal ten dostaje się do wód zarówno z opadem atmosferycznym, jak i ze spływem wód gruntowych i powierzchniowych. Udział rtęci transportowanej z gleb jest niewielki. Szczególnie dużą rolę w obiegu rtęci odgrywają opady atmosferyczne. Stężenie tego pierwiastka w wodzie deszczowej zależy w dużym stopniu od rozpuszczalności związków i form w powietrzu atmosferycznym.

Związki rtęci w środowiskach wodnych zależą w dużym stopniu od warunków oksydacyjno-redukcyjnych. W wodach o właściwościach oksydacyjnych dominują formy HgCl_4^{2-} i HgOH^+ , a w redukcyjnych środowiskach: CH_3HgS^- i HgS_2^- , natomiast w wodach o warunkach zmiennych przeważa rtęć w postaci CH_3HgCl i $\text{HC}_3\text{Hg}^{2+}$. Aktywność mikroorganizmów w środowisku wodnym przyczynia się w znacznym stopniu do transformacji związków rtęci, powodując w następstwie jej parowanie z powierzchni wód.

Pomimo łatwego przechodzenia rtęci z formy zasorbowanej do wody zachodzi stały proces nagromadzenia się jej w osadach. Zmiany zawartości rtęci w osadach są cennym wskaźnikiem jej dopływu do ekosystemów wodnych.

1.2. TOKSYCZNOŚĆ

W toksykologii połączeń rtęci rozróżnia się toksyczne oddziaływanie par rtęci, nieorganicznych soli rtęci i organicznych połączeń tego pierwiastka, z uwagi na zróżnicowany mechanizm działania tych związków. Wszystkie jednak odznaczają się wysoką toksycznością w stosunku do organizmów żywych.

Obecność rtęci w organizmach żywych, m.in. w organizmach ludzi, zwierząt i roślin, ma znaczenie toksykologiczne, gdyż nie są znane jakiekolwiek funkcje metaboliczne rtęci w tych organizmach. Istotą toksycznego działania tego pierwiastka na organizmy żywe jest powinowactwo jonu rtęciowego do grup sulfhydrylowych białek i enzymów, co może powodować zakłócenia w funkcjonowaniu układów enzymatycznych oraz w mechanizmie syntezy. Efek-

tem tego może być dysfunkcja aparatu genetycznego komórki, upośledzenie funkcji immunologicznych organizmu, uszkodzenie układu nerwowego (efekt neurotoksyczny) i sercowo-naczyniowego oraz zaburzenia funkcjonowania nerek i wątroby (u ludzi i zwierząt). Rtęć może być wchłaniana przez organizm w postaci metalicznej (pary rtęci), związków nieorganicznych oraz połączeń organicznych. Za najbardziej niebezpieczne uznaje się pary rtęci metalicznej oraz związki organiczne o krótkim łańcuchu węglowym.

Rtęć jest stwierdzana we wszystkich tkankach zwierzęcych, przy czym największe jej ilości występują w tkankach organizmów morskich. Metal ten akumuluje się zwykle w narządach mięsowych oraz w tkankach twardych. Zawartość rtęci w mięsowych organach zwierząt, w płynach ustrojowych, w mleku oraz we włosach, sierści i piórach ptaków jest dobrym wskaźnikiem skażenia środowiska.

Wchłanianie rtęci przez organizmy ludzi i zwierząt oraz mechanizm toksycznego działania tego pierwiastka jest uzależnione od postaci rtęci. Związki rtęci wydalone są z organizmu człowieka przede wszystkim z moczem i kałem, a także ze śliną, mlekiem i włosami oraz – przez skórę – z potem. Okres półtrwania rtęci w organizmie człowieka mieści się średnio w granicach od 20 do 80 dni, w zależności od formy tego metalu oraz tkanki lub organu, w których metal uległ akumulacji.

Oddziaływanie rtęci na organizmy żywe jest bardzo specyficzne. Szkodliwy wpływ rtęci na organizmy zwierzęce i człowieka ulega zmianom pod wpływem różnych czynników, np. selen ma wpływ na zdrowotne skutki zatrucia rtęcią. Podejrzewa się, że selen tworzy kompleksy z rtęcią, które raczej opóźniają negatywne skutki zdrowotne niż je osłabiają. W innych badaniach stwierdzono, że ludzie konsumujący ryby skażone jednocześnie rtęcią i PCB są narażeni na działanie obydwu tych substancji niezależnie (nie ma synergizmu).

1.3. RTĘĆ W ŻYWNOŚCI

Bezpieczeństwo i jakość zdrowotna żywności wzbudzają obecnie szerokie zainteresowanie konsumentów. Obok czystości mikrobiologicznej zawartość zanieczyszczeń chemicznych stanowi kryterium bezpieczeństwa zdrowotnego produktów spożywczych. Podstawowym aktem prawnym określającym wymagania i procedury niezbędne dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności i żywienia jest Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywienia z dn. 25.08.2006 r. (Dz.U. nr 171, poz. 1225).

Zasadniczym aktem UE ustalającym maksymalne dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń w środkach spożywczych jest Rozporządzenie Komisji (WE) nr 420/2011 z dn. 30.04.2011 (Dz.U.UE, L 111). W przypadku rtęci rozporządzenie to podaje maksymalne poziomy zanieczyszczeń dla produktów rybołówstwa i niektórych gatunków ryb, które wynosi 0,50 mg/kg świeżej masy.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1. CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości rtęci w próbkach żywności oraz porównanie otrzymanych wyników z obowiązującymi normami.

Zasada metody AAS oznaczania rtęci

Do oznaczenia rtęci w próbkach żywności stosowana będzie technika zimnych par absorpcyjnej spektrometrii atomowej (CV-AAS) (PN-EN 13806:2003). Oznaczenie rtęci metodą CV-AAS polega na wprowadzeniu par rtęci do specjalnej kuwety absorpcyjnej, przez którą zostaje przepuszczone promieniowanie ultrafioletowe pochodzące z katodowej lampy rtęciowej o długości fali 253,7 nm. Związkiem redukującym rtęć jest bromowodorek sodu.

2.2. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ

W celu oznaczenia zawartości rtęci w próbkach żywnościowych, próbki te należy rozetrzeć w moździerzu do uzyskania homogenicznej masy i poddać mineralizacji ciśnieniowej. Sposób prowadzenia mineralizacji jest zależny od rodzaju próbki żywności. Mineralizację dla próbek: mleka 2%, kaszki i ryby należy prowadzić zgodnie z parametrami przedstawionymi w ćwiczeniu 1 („Mineralizacja mikrofalowa jako sposób przygotowania produktów spożywczych do oznaczania jonów metali metodami instrumentalnymi”), tabela 1.

3. WYNIKI I SPRAWOZDANIE

Wyniki pomiarów należy przedstawić w jednostkach [mg/kg świeżej masy].

Sprawozdanie powinno zawierać: krótki wstęp teoretyczny, cel ćwiczenia, zwięzły opis metody przygotowania prób oraz techniki oznaczenia jonów rtęci oraz wnioski, z odniesieniem do przepisów prawnych, dotyczących koncentracji rtęci w produktach żywnościowych.

Pytania kontrolne

1. Rtęć w środowisku.
2. Toksyczność rtęci i jej związków.
3. Akty prawne dotyczące zanieczyszczeń chemicznych żywności.
4. Metoda CV-AAS oznaczania rtęci.

Literatura

- [1] **Juszczak L.:** (2008): *Chemiczne zanieczyszczenia żywności i metody ich oznaczania* – cz. I; Laboratorium Przemysłowe, 3: 38-42.
- [2] **Kannan K. et al.:** (1998): *Distribution of total mercury and methyl mercury in water, sediment and fish from South Florida estuaries*; Archives of environmental Contamination and Toxicology 34: 109-118.
- [3] **Kabata-Pendias A., Pendias H.:** (1999): *Biogeochemia pierwiastków śladowych*; PWN Warszawa: 170-183.
- [4] **Mniszek W.:** (1992): *Określanie emisji rtęci ze źródeł przemysłowych*; Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej: 14-16.
- [5] **O'Neill P.:** (1997): *Chemia środowiska*; PWN Warszawa-Wrocław: 244-249.
- [6] **Masłowska J. praca zbiorowa:** (1997): *Instrumentalne metody identyfikacji oznaczania składników żywności*, Wydawnictwo PŁ, 293-300.
- [7] PN-EN 13806:2003: Artykuły żywnościowe. Oznaczanie pierwiastków śladowych – Oznaczanie zawartości rtęci techniką zimnych par, metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (CVAAS) po mineralizacji ciśnieniowej.
- [8] PN-EN 13805:2003: Artykuły żywnościowe – Oznaczanie pierwiastków śladowych – Mineralizacja ciśnieniowa.

ISBN 978-83-72-83-588-8
Politechnika Łódzka
Łódź 2013