Analiza środowiskowa, żywności i leków, 03CHE1-25S302O04359L

Ćwiczenie 2: Analiza suplementów diety - oznaczanie żelaza

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości żelaza w wybranym suplemencie diety metodą płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS) po zastosowaniu dwóch sposobów przygotowania próbki: ekstrakcji w środowisku HCl oraz roztwarzania w HNO_3/H_2O_2. W ramach ćwiczenia zostaną przygotowane roztwory wzorcowe i krzywa kalibracyjna, wykonane oznaczenia dla próbek przygotowanych obiema procedurami oraz oceniona względna wydajność ekstrakcji żelaza w HCl w odniesieniu do wyniku uzyskanego po roztwarzaniu próbki. Otrzymane wyniki zostaną przeliczone na mg Fe/g preparatu oraz mg Fe/tabletkę i porównane z zawartością deklarowaną przez producenta.

Wprowadzenie

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Wchodzi w skład hemoglobiny i mioglobiny oraz licznych enzymów uczestniczących w procesach oksydoredukcyjnych i oddychaniu komórkowym. Odgrywa kluczową rolę w transporcie i magazynowaniu tlenu oraz w procesach krwiotwórczych. W organizmie człowieka znajduje się przeciętnie kilka gramów żelaza [1, 2].

Zapotrzebowanie na żelazo zależy od wieku, płci oraz stanu fizjologicznego organizmu. Niedobór żelaza może prowadzić do zaburzeń erytropoezy i rozwoju niedokrwistości, natomiast nadmierna podaż tego pierwiastka, zwłaszcza z suplementów lub preparatów farmaceutycznych, może powodować działania niepożądane. Aktualne polskie normy żywienia określają wartości średniego zapotrzebowania (EAR) oraz zalecanego spożycia (RDA) dla poszczególnych grup ludności [1].

Suplementy diety są środkami spożywczymi przeznaczonymi do uzupełniania normalnej diety. Stanowią skoncentrowane źródło witamin, składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub fizjologiczny i są wprowadzane do obrotu w postaciach umożliwiających ich dawkowanie, np. jako tabletki, kapsułki, drażetki, saszetki z proszkiem lub ampułki z płynem [3]. Formy chemiczne witamin i składników mineralnych dopuszczone do stosowania w suplementach diety określają obowiązujące przepisy unijne i krajowe, podlegające okresowym aktualizacjom [3, 4].

W suplementach diety żelazo może występować w różnych dopuszczonych formach chemicznych, obejmujących związki żelaza na różnych stopniach utlenienia. Forma chemiczna wpływa m.in. na rozpuszczalność i biodostępność żelaza. Zastosowana w ćwiczeniu metoda FAAS nie umożliwia rozróżnienia Fe(II) i Fe(III), ponieważ oznaczana jest całkowita ilość Fe znajdującego się w roztworze pomiarowym.

W ćwiczeniu zastosowane zostaną dwa sposoby przygotowania próbki. Ekstrakcja w nieutleniającym środowisku HCl umożliwia oznaczenie frakcji żelaza przechodzącej do roztworu w przyjętych warunkach ekstrakcji. Roztwarzanie w układzie HNO_3/H_2O_2 powoduje bardziej zaawansowany rozkład matrycy organicznej próbki i będzie traktowane jako procedura odniesienia przy ocenie wydajności ekstrakcji HCl. Wyniku po ekstrakcji HCl nie należy utożsamiać z selektywnym oznaczeniem Fe(II), ponieważ HCl może rozpuszczać również związki Fe(III), a FAAS nie jest metodą specjacyjną.

Porównanie wyników uzyskanych po obu sposobach przygotowania próbki pozwala ocenić, jaka część żelaza oznaczonego po roztwarzaniu została wyekstrahowana w warunkach zastosowanej procedury HCl. W praktyce analitycznej kontrola zawartości składników mineralnych w suplementach diety pozwala również zweryfikować zgodność rzeczywistej zawartości pierwiastka z wartością deklarowaną przez producenta.

Tabela 1. Normy na żelazo dla wybranych grup populacji według „Norm żywienia dla populacji Polski - 2024" [1]

Grupa	Wiek / stan fizjologiczny	Średnie zapotrzebowanie (EAR) [mg/dobę]	Zalecane spożycie (RDA) [mg/dobę]
Chłopcy	10–12 lat	7	10
Chłopcy	13–18 lat	8	12
Dziewczęta	10–12 lat*	7 / 8	10 / 15
Dziewczęta	13–18 lat*	8	15
Mężczyźni	≥ 19 lat	6	10
Kobiety	19–50 lat	8	18
Kobiety	≥ 51 lat	6	10
Kobiety w ciąży	niezależnie od wieku	23	27
Kobiety karmiące piersią	niezależnie od wieku	7	10

** Pierwsza wartość dotyczy dziewcząt przed wystąpieniem miesiączki, druga – po jej wystąpieniu. [1].*

PRÓBKI

Przedmiot badań stanowią preparaty witaminowo-mineralne powszechnie dostępne w aptekach i handlu detalicznym. W tabeli 2 zestawiono przykładowe dane pozwalające na identyfikację badanych preparatów. Na podstawie etykiety rzeczywiście analizowanego suplementu należy zanotować nazwę preparatu, producenta, deklarowaną zawartość żelaza w jednej tabletce oraz zalecaną porcję dobową. Dane te będą wykorzystane do oceny zgodności wyniku oznaczenia z deklaracją producenta.

Tabela 2. Skład analizowanych preparatów witaminowo-mineralnych.

Preparat producent	***Zastosowanie /przeznaczenie***	***Zawartość żelaza w 1 tabletce [mg]***	***Zalecana porcja dobowa***
Centrum Silver z Luteiną Wyeth®	preparat multiwitaminowy dla osób po 50 roku życia	3,5	1 tabletka
Duovit KRKA	preparat dla dzieci powyżej 10 roku życia i dorosłych	10	1 tabletka
Falvit® M Jelfa	dla kobiet ciężarnych i karmiących piersią	26	1 tabletka
Multisal® Polfa S.A.	dla dorosłych	9,0	1 tabletka 1-3 razy dziennie
Vigor® complete US Pharmacia	suplement diety dla dorosłych	14	1 tabletka
Vita-miner luteina Aflofarm	dla dorosłych	9,92	1 tabletka
Vitaral® Jelfa	dla dorosłych	6,15	1 tabletka

Wyznaczenie średniej masy tabletki

Przed rozpoczęciem przygotowania próbek należy wyznaczyć średnią masę tabletki badanego preparatu. W tym celu zważyć co najmniej 10 tabletek wybranych losowo z opakowania. Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe.

Ogólny schemat wykonania ćwiczenia

1. Wyznaczyć średnią masę tabletki badanego suplementu.
2. Przygotować co najmniej trzy równoległe próbki badanego preparatu oraz odpowiednie próby ślepe dla obu sposobów przygotowania próbki.
3. Przygotować roztwór wzorcowy podstawowy i roztwory kalibracyjne żelaza.
4. Sporządzić krzywą kalibracyjną dla Fe metodą FAAS oraz sprawdzić wpływ matrycy kwasowej HCl.
5. Dobrać rozcieńczenie próbek tak, aby stężenie żelaza mieściło się w zakresie krzywej kalibracyjnej.
6. Wykonać oznaczenie żelaza metodą FAAS dla ekstraktów HCl oraz roztworów po roztwarzaniu HNO_3/H_2O_2.
7. Obliczyć zawartość żelaza w mg Fe/g i mg Fe/tabletkę dla obu sposobów przygotowania próbki.
8. Obliczyć względną wydajność ekstrakcji żelaza w HCl w odniesieniu do wyniku uzyskanego po roztwarzaniu HNO_3/H_2O_2 i porównać wyniki z deklaracją producenta.

Odczynniki - do przygotowania w czasie zajęć:

1. Woda destylowana lub demineralizowana do przygotowania roztworów i rozcieńczeń.
2. Stężony kwas solny HCl, cz.d.a. - do przygotowania roztworu HCl o stężeniu 6,0 mol/dm^3 oraz do zakwaszania roztworów wzorcowych kontrolnych odpowiadających matrycy ekstraktów HCl.
3. Stężony kwas azotowy(V) HNO_3, cz.d.a. - do roztwarzania próbek oraz przygotowania roztworów wzorcowych.
4. Nadtlenek wodoru H_2O_2, roztwór 30%.
5. Sól żelaza dostępna na pracowni - do przygotowania roztworu wzorcowego podstawowego Fe.

Przed przygotowaniem roztworu wzorcowego należy sprawdzić, jaka sól żelaza jest dostępna na pracowni, zanotować jej wzór chemiczny i stopień uwodnienia oraz obliczyć masę odważki potrzebną do przygotowania roztworu wzorcowego podstawowego o stężeniu Fe 1000 mg/dm^3. W obliczeniach należy uwzględnić udział masowy Fe w stosowanej soli.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO OZNACZENIA

W ćwiczeniu zastosowane zostaną dwa sposoby przygotowania próbki suplementu do oznaczenia żelaza: ekstrakcja w środowisku HCl oraz roztwarzanie w HNO_3/H_2O_2. Dla każdego sposobu należy przygotować co najmniej trzy równoległe próbki oraz odpowiednią próbę ślepą. Wynik uzyskany po roztwarzaniu HNO_3/H_2O_2 będzie traktowany jako wartość odniesienia do oceny względnej wydajności ekstrakcji HCl.

Ekstrakcja żelaza w środowisku HCl

Do zlewki o pojemności 150–250 cm^3 odważyć dokładnie około 0,5 g rozdrobnionego preparatu i dodać pod wyciągiem 10,0 cm^3 roztworu HCl o stężeniu 6,0 mol/dm^3. Na podstawie stężenia oraz

gęstości dostępnego stężonego HCl należy wcześniej obliczyć objętość potrzebną do przygotowania roztworu HCl o stężeniu 6,0 mol/dm^3.
Próbki wymieszać i pozostawić na 2–3 min do przereagowania. Następnie zlewki wraz z zawartością przenieść do łaźni piaskowej i, po przykryciu szkiełkiem zegarkowym, ogrzewać do zagotowania. Od momentu zagotowania utrzymywać łagodne wrzenie przez 15 min. W przypadku wyraźnego ubytku objętości spowodowanego parowaniem uzupełniać niewielkimi porcjami wody destylowanej.
Po upływie 15 min próbki zdjąć z łaźni piaskowej. Ciepłe, ale nie gorące roztwory przenieść **ilościowo** do kolb miarowych o pojemności 50,0 cm^3. Do przemywania zlewek użyć małych ilości gorącej wody destylowanej. Roztwory schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać. Jeżeli w kolbach znajduje się osad, oddzielić go przez sączenie na twardym, suchym sączku bezpośrednio do czystych plastikowych pojemników.

UWAGA: Do sączenia należy używać suchego sączka. W sprawozdaniu uzasadnić, dlaczego zwilżenie sączka wodą mogłoby wpłynąć na wynik oznaczenia.

Roztwarzanie próbki w HNO_3/H_2O_2

Do zlewki o pojemności około 150 cm^3 odważyć dokładnie około 0,5 g rozdrobnionego preparatu i pod wyciągiem dodać 10,0 cm^3 stężonego HNO_3. Zlewkę przykryć szkiełkiem zegarkowym i ogrzewać w łaźni piaskowej przez około 1 h, unikając odparowania próbki do sucha.
Jeżeli po tym czasie roztwór pozostaje barwny, przerwać ogrzewanie i pozostawić próbkę do częściowego ochłodzenia. Następnie ostrożnie, pod wyciągiem, dodać małymi porcjami około 5 cm^3 roztworu H_2O_2 o stężeniu 30%. Po ustaniu intensywnej reakcji ponownie ogrzewać próbkę do uzyskania bezbarwnego lub wyraźnie rozjaśnionego roztworu. W razie potrzeby można dodawać kolejne niewielkie porcje H_2O_2, każdorazowo po częściowym ochłodzeniu próbki.
Roztwory schłodzić do temperatury pokojowej, przenieść **ilościowo** do kolb miarowych o pojemności 50,0 cm^3 i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Jeżeli w kolbach znajduje się osad, oddzielić go przez sączenie na twardym sączku.
Przed pomiarem roztwory próbek rozcieńczyć tak, aby stężenie Fe mieściło się w zakresie stosowanej krzywej kalibracyjnej, tj. 1–5 mg/dm^3. Podczas przygotowywania roztworów do pomiaru należy zachować właściwe środowisko kwasowe próbek oraz kontrolować wpływ różnic matrycy kwasowej zgodnie z procedurą opisaną w części dotyczącej kalibracji.

WYZNACZENIE ZAWARTOŚCI ŻELAZA W BADANEJ PRÓBCE

1. Przygotowanie roztworów wzorcowych i kalibracja

Przed przygotowaniem roztworów wzorcowych należy metodą wagową sprawdzić rzeczywistą objętość kilku losowo wybranych kolb miarowych i pipet z zestawu używanego podczas ćwiczenia.
Z dostępnej na pracowni soli żelaza przygotować roztwór wzorcowy podstawowy o stężeniu Fe 1000 mg/dm^3. Przed wykonaniem odważki sprawdzić wzór chemiczny i stopień uwodnienia soli oraz obliczyć masę potrzebną do przygotowania wybranej objętości roztworu.
Do kolby miarowej wprowadzić obliczoną i dokładnie odważoną ilość soli, dodać niewielką ilość wody oraz odpowiednią ilość HNO_3, tak aby końcowe stężenie kwasu w roztworze wzorcowym było zgodne z warunkami przyjętymi na pracowni (około 4-5 % (v/v)). Uzupełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać.

Z roztworu podstawowego przygotować, w razie potrzeby poprzez roztwór pośredni (np. 50 lub 100 mg/dm^3 Fe), co najmniej pięć roztworów kalibracyjnych w zakresie stężeń: 1–5 mg/dm^3 Fe. Roztwory kalibracyjne powinny być zakwaszone HNO_3 w sposób zapewniający porównywalną matrycę kwasową.
Dodatkowo przygotować co najmniej dwa roztwory kontrolne Fe o stężeniach mieszczących się w zakresie kalibracji, zakwaszone HCl w stopniu zbliżonym do matrycy ekstraktów HCl. Na podstawie ich wyników ocenić wpływ różnicy matrycy kwasowej HCl/HNO_3 na odpowiedź aparatu. Za wynik akceptowalny przyjąć zgodność wyniku z wartością nominalną mieszczącą się w zakresie 85–115% wartości nominalnej. Jeżeli co najmniej jeden z roztworów kontrolnych nie spełnia tego kryterium, oznaczenia ekstraktów HCl należy wykonać z zastosowaniem kalibracji przygotowanej w środowisku HCl.

W warunkach pomiarowych stosowanych w tym ćwiczeniu zakres roboczy roztworów kalibracyjnych Fe wynosi 1–5 mg/dm^3

2. Bieżąca kontrola jakości oznaczenia

Dla każdego wariantu przygotowania próbki należy wykonać próbę ślepą obejmującą wszystkie odczynniki i etapy procedury, z pominięciem badanego preparatu. Wartość sygnału próby ślepej należy uwzględnić podczas opracowania wyników.

Oznaczenie należy wykonać dla co najmniej trzech równolegle przygotowanych próbek.

3. Oznaczenie żelaza

Zasada oznaczenia metodą FAAS

W płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej oznaczany pierwiastek zostaje przekształcony w wolne atomy w płomieniu. Atomy żelaza absorbują promieniowanie o charakterystycznej długości fali, a absorbancja w określonym zakresie stężeń jest zależna od stężenia żelaza w roztworze. Zależność tę wyznacza się doświadczalnie na podstawie roztworów kalibracyjnych.

Na podstawie deklarowanej przez producenta zawartości żelaza oraz zakresu krzywej kalibracyjnej zaproponować odpowiednie rozcieńczenie każdej próbki. Końcowe stężenie Fe w roztworze przeznaczonym do pomiaru powinno mieścić się w zakresie 1–5 mg/dm^3. Wszystkie zastosowane współczynniki rozcieńczenia należy zapisać i uwzględnić w obliczeniach końcowych.
Podczas rozcieńczania zachować właściwe środowisko kwasowe: HCl dla próbek po ekstrakcji HCl oraz HNO_3 dla próbek po roztwarzaniu HNO_3/H_2O_2. Oznaczenia zawartości żelaza wykonać metodą FAAS z atomizacją w płomieniu.

Z równania krzywej kalibracyjnej, wyznaczonej na podstawie zależności absorbancji od stężenia Fe, obliczyć stężenie Fe w mierzonych roztworach. Następnie, z uwzględnieniem masy odważki, objętości roztworu po przygotowaniu próbki, wszystkich zastosowanych rozcieńczeń oraz wyniku próby ślepej, obliczyć zawartość żelaza w mg Fe/g preparatu oraz mg Fe/tabletkę osobno dla ekstrakcji HCl i roztwarzania HNO_3/H_2O_2.

4. Ocena względnej wydajności ekstrakcji żelaza

Wynik uzyskany po roztwarzaniu próbki w HNO_3/H_2O_2 przyjąć jako wartość odniesienia odpowiadającą zawartości Fe oznaczonej po bardziej całkowitym rozkładzie matrycy próbki. Nie należy traktować jej jako wartości prawdziwej w sensie metrologicznym bez dodatkowego potwierdzenia kompletności roztwarzania.

Względną wydajność ekstrakcji żelaza w HCl obliczyć ze wzoru:

$$\boldsymbol{E = \left(\frac{Fe_{HCl}}{Fe_{HNO_3,H_2O_2}} \right) \cdot 100\%}$$

$\boldsymbol{Fe_{HCl}}$ - średnia zawartość żelaza oznaczona po ekstrakcji próbki w HCl [mg Fe/g lub mg Fe/tabletkę],
$\boldsymbol{Fe_{HNO_3,H_2O_2}}$ - średnia zawartość żelaza oznaczona po roztwarzaniu próbki w HNO_3/H_2O_2, wyrażona w tych samych jednostkach.

Na podstawie uzyskanej wartości ocenić, jaka część żelaza oznaczonego po roztwarzaniu została wyekstrahowana w warunkach zastosowanej procedury HCl. Wynik przekraczający 100% powinien skłonić do analizy możliwych przyczyn, m.in. wpływu matrycy, różnic kalibracji, błędów rozcieńczeń lub niepewności wyników.

SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie powinno zawierać:

1. krótki opis celu ćwiczenia i zasady oznaczenia żelaza metodą FAAS;
2. wyniki wyznaczenia średniej masy tabletki;
3. opis obu sposobów przygotowania próbek oraz przygotowania prób ślepych;
4. obliczenia związane z przygotowaniem roztworu wzorcowego podstawowego i roztworów kalibracyjnych;
5. krzywą kalibracyjną wraz z równaniem prostej i wartością R^2;
6. schemat wszystkich rozcieńczeń próbek;
7. obliczenia zawartości Fe w mg/g i mg/tabletkę osobno dla próbek po ekstrakcji HCl i po roztwarzaniu HNO_3/H_2O_2;
8. średnie wartości wyników i odchylenia standardowe dla obu sposobów przygotowania próbki;
9. obliczoną względną wydajność ekstrakcji Fe w HCl w odniesieniu do wyniku po roztwarzaniu HNO_3/H_2O_2;
10. porównanie uzyskanych wyników z zawartością deklarowaną przez producenta oraz ocenę wpływu sposobu przygotowania próbki na wynik oznaczenia;
11. wnioski, w tym ocenę jakości uzyskanych wyników i znaczenia zastosowanych działań kontrolnych.

ZAKRES ZAGADNIEŃ OBOWIĄZUJĄCYCH DO ĆWICZENIA

1. Rola żelaza w organizmie i znaczenie jego prawidłowej podaży.
2. Suplementy diety jako źródło składników mineralnych.
3. Podstawy atomowej spektrometrii absorpcyjnej.
4. Atomizacja w płomieniu i zasada pomiaru absorbancji atomowej.
5. Krzywa kalibracyjna i zakres liniowości.
6. Przygotowanie próbek stałych do analizy instrumentalnej.
7. Ekstrakcja i roztwarzanie jako sposoby przygotowania próbki – różnice, cel i wpływ na wynik analizy.

8. Znaczenie środowiska HCl i HNO_3/H_2O_2 w przygotowaniu próbek; ograniczenia interpretacji wyniku po ekstrakcji HCl jako zawartości Fe(II) oraz wyniku po roztwarzaniu jako zawartości Fe ogółem.

9. Próba ślepa i jej znaczenie w kontroli jakości oznaczenia.

10. Wpływ matrycy i zakwaszenia na oznaczenie metodą FAAS.

11. Rozcieńczenia i przeliczanie stężenia Fe na mg/g i mg/tabletkę.

12. Średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, względna wydajność ekstrakcji i ocena zgodności wyniku z deklaracją producenta.

LITERATURA

1. Normy żywienia dla populacji Polski – 2024, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa 2024.

2. Harper H.A., Rodwell V.W., Mayes P.A., Zarys chemii fizjologicznej, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1983.

3. Dyrektywa 2002/46/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 10 czerwca 2002 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstw Państw Członkowskich odnoszących się do suplementów żywnościowych, z późniejszymi zmianami.

4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety, z późniejszymi zmianami, w tym: Dz.U. 2025 poz. 1182 oraz Dz.U. 2026 poz. 1115.

5. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Fundamentals of Analytical Chemistry, Saunders College Publishing, 1996.

6. Hulanicki A., Współczesna chemia analityczna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.

7. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996.

8. Cygański A., Metody spektroskopowe w chemii analitycznej, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1997.

9. Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.G., Muntau H., van Leeuwen H.P., Łobinski R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches, Pure Appl. Chem. 72 (2000) 1453–1470.