

Analiza środowiskowa, żywności i leków

CHC 0230171

Ćwiczenie 2: Analiza suplementów diety - oznaczanie żelaza

W organizmie ludzkim znajduje się 3,5 - 4,5 g żelaza. Rola żelaza w organizmie jest prawie wyłącznie związana z procesami oddychania komórkowego. Jest ono składnikiem wielu ważnych białek, np. hemoglobiny czy mioglobiny, występuje również w centrach aktywnych licznych enzymów takich jak: katalaza, peroksydazy oraz cytochromy. Żelazo jest niezbędne dla organizmu jako składnik krwiotwórczy oraz do transportu i magazynowania tlenu. Zapotrzebowanie na żelazo jest zmienne i zależy między innymi od wieku, płci i stanu organizmu. Norma dobowego spożycia waha się w dość dużych granicach. U osób dorosłych: od 10 mg/dobę u mężczyzn, do 20 mg u kobiet, z zastrzeżeniem że w okresie ciąży i karmienia powinno to być ok. 30 mg/dobę. Niedobór spotyka się w stanach zwiększonego zapotrzebowania, zaburzeń wchłaniania lub zwiększonej utraty żelaza. W takim przypadku może wystąpić niedokrwistość. W przypadku potwierdzonego niedoboru żelaza należy wprowadzić suplementację preparatami żelaza.

Nadmierne spożycie żelaza może prowadzić do zmniejszenia wchłaniania innych składników mineralnych (cynku, miedzi), zwiększenia ryzyka wystąpienia infekcji, nadmiernego gromadzenia żelaza w tkankach i ich uszkodzenie oraz zwiększenia wystąpienia chorób nowotworowych. Sole żelaza(III-VI) są nieszkodliwe, ponieważ się nie wchłaniają. [1]

Światowa Organizacja Zdrowia – WHO, oraz Instytut Żywności i Żywienia – IŻŻ są organizacjami mającymi na celu ochronę zdrowia, zwalczanie epidemii, jak i ustają normy dotyczące składu lekarstw i jakości produktów spożywczych. IŻŻ jest polskim odpowiednikiem WHO. Obie te instytucje ściśle ze sobą współpracują, wraz z Komisją Europejską i Organizacją do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa – FAO. Na podstawie wieloletnich badań i obserwacji ustalono normy dotyczące dawek pierwiastków, potrzebnych do prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu, jak i dawek pierwiastków toksycznych, mutagennych czy śmiertelnych. Dane związane z zapotrzebowaniem na żelazo zostały zebrane w Tabelach 1 i 2, zamieszczonych poniżej.

Tabela 1. Zapotrzebowanie na żelazo - dane WHO i IŻŻ.

	<i>Zalecane racje żywieniowe RDA [mg/dzień]</i>	<i>Najwyższy tolerowany poziom spożycia UL [mg/dzień]</i>	<i>Dzienne spożycie [mg/dzień]</i>	<i>Dawka toksyczna [mg]</i>
Kobiety	8 - 27	40 - 45	8,1 - 22,7	nie oznaczona
Mężczyźni	8 - 11	40		

Tabela 2. Zalecane dzienne dawki spożycia żelaza dla poszczególnych grup wiekowych z uwzględnieniem płci [2].

<i>Grupa wiekowa</i>	<i>Zalecana dzienna dawka żelaza [mg]</i>
Mężczyźni w wieku:	
11 - 18 lat	18
powyżej 19 lat	10
Kobiety w wieku:	
11 - 50 lat	18
powyżej 51 lat	10
w czasie ciąży i podczas laktacji	18

Suplementy diety, to, zgodnie z ustawą o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia [3], środki spożywcze, które mają na celu uzupełnienie normalnej diety. Powinny być skoncentrowanym źródłem witamin, składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny. Wprowadzane są do obrotu w opakowaniach umożliwiających łatwe dawkowanie, w postaci np. kapsułek, tabletek, drażetek, saszetek z proszkiem, ampułek z płynem itp., które przeznaczone są do spożywania w jak najmniejszych, odmierzonych ilościach [4, 5]. Suplementy diety, jako środki spożywcze, powinny charakteryzować się odpowiednimi cechami zarówno pod względem jakości sensorycznej i wartości odżywczej, a także bezpieczeństwa dla zdrowia konsumenta. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia o składzie i oznakowaniu suplementów diety preparaty te powinny w swoim składzie zawierać witaminy i składniki mineralne, które występują naturalnie w żywności i są spożywane jako jej część [6]. Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety z dnia 9 października 2007 roku (Dz. U. z dnia 24 października 2007 r.) [7] zawiera, między innymi, wykaz witamin i składników mineralnych oraz ich formy chemiczne, które mogą być stosowane w produkcji suplementów diety. W przypadku żelaza mogą to być, jedynie: węglan żelazawy, cytrynian żelazawy, cytrynian amonowo-żelazawy, glukonian żelazawy, fumaran żelazawy, dwufosforan sodowo-żelazawy, mleczan żelazawy, siarczan żelazawy, dwufosforan żelazawy (pirofosforan żelazawy), cukrzan żelazawy, żelazo elementarne (karbonyl + żelazo elektrolityczne + zredukowany wodór) oraz dwuglicynian żelaza. Rozporządzenie to precyzuje również zalecaną ilość żelaza jako 800 mg na dzień.

PRÓBKKI

Przedmiot badań stanowią preparaty witaminowo-mineralne dla dorosłych powszechnie dostępne w aptekach i supermarketach. W tabeli numer 3, zamieszczonej poniżej, zestawiono dane pozwalające na identyfikację badanego preparatu i weryfikację danych pomiarowych, tj. nazwę preparatu, jego przeznaczenie, zawartość żelaza w jednej tabletkce preparatu, zalecaną dobową dawkę preparatu oraz nazwę producenta.

Tabela 3. Skład analizowanych preparatów witaminowo-mineralnych.

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

UWAGA:

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia powinna zostać wyznaczona średnia masa tabletek preparatu wybranego przez grupę współpracujących studentów. Średnią masę tabletek analizowanego preparatu wyznacza się jako średnią arytmetyczną (i odchylenie standardowe) z wyników pomiarów masy co najmniej różnych 10 tabletek wybranych losowo z każdego opakowania każdej z serii analizowanych preparatów multiwitaminowych.

Odczynniki - do przygotowania w czasie zajęć:

(A) *Roztwór podstawowy wzorca Fe zakwaszony HNO₃*: roztwór przygotowany z azotanu żelaza(III) o stężeniu Fe wynoszącym 1000 ppm, zakwaszony kwasem azotowym (stężenie HNO₃ w roztworze powinno wynosić ok 4-5%).

(B) *Roztwór podstawowy wzorca Fe zakwaszony HCl*: roztwór przygotowany z azotanu żelaza(III) o stężeniu Fe wynoszącym 1000 ppm, zakwaszony kwasem azotowym (stężenie HCl w roztworze powinno wynosić ok 4-5%).

EKSTRAKCJA ŻELAZA

Należy przygotować minimum trzy równoległe próbki analizowanego materiału oraz tzw. ślełą próbę.

Do zlewki o pojemności 150 - 250 cm³ (w zależności od dostępności) odważyć dokładnie około 0,5 g rozdrobnionego preparatu i dodać (pod wyciągiem) 10 cm³ 6M kwasu solnego HCl (**uwaga**: proszę sprawdzić jakie stężenie molowe ma 35-37 % kwas solny, dostępny na pracowni, a następnie przygotować 6M roztwór kwasu solnego).

Próbki wymieszać i pozostawić na 2-3 minuty do przereagowania. Następnie zlewki wraz z zawartością przenieść do łaźni piaskowej i, przykryte szkiełkiem zegarkowym, ogrzewać do zagotowania. W tym stanie roztwory utrzymywać przez 15 minut. W razie odparowania próbek dodawać wodę destylowaną. Po upływie 15 minut od momentu zagotowania się roztworów próbki zdjąć z łaźni piaskowej (ogrzewanie wyłączyć). Ciepłe (ale nie gorące) roztwory przenieść **ilościowo** do kolb miarowych o pojemności 50,0 cm³. Do przemywania zlewek użyć małych ilości **gorącej** wody destylowanej. Roztwory schłodzić do temperatury pokojowej i uzupełnić kolby wodą destylowaną do kreski. Znajdujący się w kolbach osad oddzielić od roztworu przez sączenie na twardym sączku (roztwory należy przesączać przez suchy sączek - dlaczego? – bezpośrednio do plastikowych pojemników o pojemności 30 cm³).

ROZTWARZANIE

Należy przygotować minimum trzy równoległe próbki analizowanego materiału oraz tzw. ślełą próbę.

W zlewce o pojemności 150 cm³ umieścić ok. 0,5 g (dokładnie odważone) próbki preparatu, dodać 10 cm³ stężonego kwasu azotowego (V) HNO₃. Zlewki z zawartością ogrzewać w łaźni piaskowej przez ok. 1 godzinę, jeżeli roztwór po zakończeniu roztwarzania jest barwny dodać ok. 5 cm³ 30 % nadtlenku wodoru i ogrzewać ponownie do uzyskania bezbarwnego roztworu próbki (w razie potrzeby dodawać następne porcje wody utlenionej). Roztwory o temperaturze pokojowej przenieść **ilościowo** do kolb miarowych o pojemności 50,0 cm³ i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Jeżeli w kolbach znajduje się osad, należy go oddzielić od roztworu przez sączenie na twardym sączku.

Przed wykonaniem pomiarów roztwory próbek należy rozcieńczyć tak, by stężenie żelaza w roztworach mieściło się w zakresie prostoliniowości krzywej wzorcowej – czyli od 1 do 5 ppm. Stężenie kwasu solnego w próbkach rozcieńczonych powinno być takie samo jak w próbkach wyjściowych (podczas rozcieńczania próbek należy dodać odpowiednią ilość stężonego HCl).

WYZNACZENIE ZAWARTOŚCI ŻELAZA W BADANEJ PRÓBCE

1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Przed przystąpieniem do przygotowania roztworów wzorcowych należy sprawdzić (metodą ważenia) pojemność kilku, losowo wybranych całego zestawu, kolb miarowych i pipet.

Mając do dyspozycji azotan żelaza(III) przygotować podstawowy roztwór wzorca o stężeniu żelaza równym 1000 ppm.

W tym celu do kolby miarowej o pojemności 250,0 cm³ (lub mniejszej) wprowadzić odpowiednią ilość soli (**wcześniej obliczoną i dokładnie odważoną**). Następnie dodać ok. 25 cm³ wody i potrzebną ilość stężonego kwasu azotowego – tak by stężenie końcowe wynosiło 4-5%. Wymieszać ruchem okrężnym zawartość kolby. Uzupełnić kolbę wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać.

Posługując się jednolmiarowymi pipetami o pojemności 1, 2, 5, 10 i 20 cm³ oraz kolbkami o pojemności 50,00 cm³ przygotować roztwory wzorcowe żelaza do sporządzenia krzywej wzorowej (czyli do wyznaczenia zależności pomiędzy stężenia żelaza w roztworze a mierzoną absorbancją) rozcieńczając odpowiednio roztwór podstawowy wzorca Fe (roztwór o stężeniu żelaza wynoszącym 1000 ppm). Jeżeli to będzie konieczne proszę wcześniej sporządzić roztwór wzorca o stężeniu pośrednim pomiędzy stężeniem wzorca podstawowego a stężeniami roztworów do krzywej kalibracji – np.: 50 czy 100 ppm.

UWAGA: zakres prostoliniowości krzywej wzorcowej dla żelaza w przypadku pomiarów dokonywanych przy zastosowaniu atomowej spektrometrii absorpcyjnej wynosi: 1-5 ppm.

Roztwory wzorcowe służące do przygotowania krzywej kalibracji powinny być zakwaszone kwasem azotowym. W przypadku tego ćwiczenia należy również sporządzić dwa roztwory wzorca o stężeniach z zakresu prostoliniowości krzywej wzorcowej zakwaszone kwasem solnym – o stężeniu HCl zbliżonym do stężenia tego kwasu w próbkach.

2. Oznaczenie żelaza

UWAGA: znając deklarowaną przez producenta zawartość żelaza w analizowanym suplemencie i zakres pomiarowy prostoliniowego odcinka krzywej wzorcowej proszę zaproponować sposób rozcieńczenia próbki umożliwiający pomiar oznaczanego pierwiastka – tj. rozcieńczenie roztworów próbek do stężenia mieszczącego się w zakresie prostoliniowości krzywej wzorcowej. Rozcieńczając próbki należy pamiętać o zakwaszeniu roztworów kwasem solnym.

Oznaczenia zawartości żelaza wykonać z zastosowaniem atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu.

Z równania krzywej wyznaczonego na podstawie zależności mierzonych absorbancji wcześniej przygotowanych roztworów wzorcowych od stężenia żelaza wyznaczyć wartość stężenia jonów żelaza w badanej próbce. Obliczyć zawartość żelaza w preparacie w mg/g oraz odchylenie standardowe przeprowadzonego oznaczenia.

Obliczyć zawartość żelaza(II) w analizowanym preparacie witaminowo-mineralnym (w przeliczeniu na średnią masę tabletki).

SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie może zawierać bardzo krótki opis zastosowanej procedury i stosowanych metod pomiarowych, natomiast powinno zawierać dokładny opis przygotowania próbek suplementu diety do pomiaru, opis przygotowania roztworów wzorców, oraz wyniki obliczeń zawartości żelaza(II) w tym preparacie. Proszę porównać wyznaczoną zawartość z danymi podawanymi przez producentów preparatów na opakowaniu suplementu oraz z dobowym zapotrzebowaniem osób dorosłych na żelazo.

UWAGA:

Bardzo proszę w obliczeniach uwzględnić dane dotyczące ślepych prób, a końcowe wyniki podać jako średnie arytmetyczne obliczone z danych dla wszystkich przygotowanych prób.

LITERATURA

1. edited by Seńczuk, W., Toksykologia, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999.
Kabata – Pendias A., *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999
2. Harper H.A., Rodwell V., Mayer P., *Zarys chemii fizjologicznej*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1983
3. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 7 lutego 2005 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia. Dz.U. 2005, nr 31, poz. 265
4. Waszkiewicz-Robak B., *Suplement diety - środek spożywczy czy alternatywa produktu leczniczego?*, Agro Przemysł 2/2009
5. Brzozowska A., Roszkowski W., Pietruszka B., Kałuża J., *Witaminy i składniki mineralne jako suplementy diety*, Żywność. Nauka, Technologia, Jakość 2005, 4 (45) Supl., 5 – 16
6. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 grudnia 2002 r. w sprawie specyfikacji, kryteriów czystości, wymagań dotyczących pobierania próbek i metod analitycznych stosowanych w trakcie urzędowej kontroli żywności do oznaczania parametrów właściwych dla poszczególnych dozwolonych substancji dodatkowych, poszczególnych substancji pomagających w przetwarzaniu oraz zawartości zanieczyszczeń. (Dz. U. 2003, nr 59, poz. 530; Dz. U. 2004, nr 94, poz. 934; Dz. U. 2005, nr 58, poz. 511)
7. Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety z dnia 9 października 2007 roku (Dz. U. z dnia 24 października 2007 r.)
8. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, 1996
9. Templeton D., Ariese A., Cornelis R., Danielsson L. G., Muntau H., van Leeuwen H. P., Łobinski R., *Pure Appl. Chem.*, 72, 8 (2000) 1453 -1470
10. Hulanicki A., *Współczesna chemia analityczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001
11. Marczenko Z., Balcerzak M., *Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998
12. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996
13. Cygański A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1997