

KRYSTYNA KANIA, KATARZYNA PYTLAKOWSKA

SPEKTROFOTOMETRYCZNE OZNACZANIE MOLIBDENU W MATERIALE  
ROŚLINNYM, ŻYWNOŚCI I PREPARACIE FARMAKOLOGICZNYM

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF MOLYBDENUM IN VEGETABLE  
MATERIAL, FOOD AND PHARMACEUTICAL COMPOUND

Zakład Chemii Analitycznej,  
Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski,  
40-006 Katowice, ul. Szkolna  
Kierownik: prof. dr hab. *F. Buhl*

*Oznaczano molibden w suszu lucerny, ziarnie grochu, fasoli i soi oraz preparacie witaminowo-mineralnym Multi-tabs. Zastosowano metodę spektrofotometryczną wykorzystującą reakcję z 2,3,7-trihydroksyfenylofluoronem w obecności kationowego surfaktanta – bromku benzylododecyldimetyloamoniowego.*

WSTĘP

Molibden jest pierwiastkiem niezbędnym dla właściwego rozwoju roślin, zwierząt i ludzi [3, 4]. U roślin wchodzi w skład enzymów, między innymi reduktazy azotanowej i nitrogenazowej, które biorą udział w procesach wiązania azotu i redukcji azotanów. Jest również składnikiem enzymów – oksydaz będących katalizatorami innych procesów zachodzących w roślinach. Molibden jest pobierany przez rośliny w sposób bierny; jego przyswajalność rośnie wraz ze wzrostem pH gleby, co tłumaczy się zwiększeniem stężenia rozpuszczalnych form tego pierwiastka.

Fizjologiczne zapotrzebowanie na molibden jest różne dla różnych gatunków roślin. Wyższe zapotrzebowanie wykazują rośliny z rodziny motylkowych i krzyżowych oraz rośliny rosnące na podłożu o dużej zawartości azotanów. Brak molibdenu prowadzi w konsekwencji do zamierania stożków wzrostu, nekrozy liści i zaniku kwiatów. Uzupełnienie zawartości tego pierwiastka przez wprowadzenie go jako składnika nawozów mineralnych, często stosowane w nawozach dla roślin ozdobnych, powinno być ostrożne w przypadku upraw rolniczych, gdyż nadmiar molibdenu jest szkodliwy dla ludzi i zwierząt.

Rośliny są w różny sposób odporne na zbyt wysoką zawartość mobilnego molibdenu w glebie. Motylkowe mogą przyswoić do około 350 ppm Mo, przy średniej około 0,5 ppm, bez objawów toksyczności [4]. Zboża są znacznie bardziej wrażliwe na wysokie stężenie molibdenu w glebie, a jego nadmiar molibdenu powoduje w ostatecznej fazie zahamowanie rozwoju i wzrostu roślin.

Molibden pochodzący z odpadów przemysłowych i komunalnych jest niebezpieczny dla środowiska, gdyż jest rozpuszczalny a zatem łatwo dostępny dla roślin. Na terenach zanieczyszczonych stwierdzono jego zawartość w trawach wynoszącą do 200 ppm [4].

Jako biopierwiastek, molibden jest również niezbędny dla właściwego rozwoju ludzi i zwierząt. Dzienna dawka w pożywieniu dorosłego człowieka wynosi 2,7 – 3,7  $\mu\text{g}$  Mo [4].

W organizmie człowieka molibden jest składnikiem metaloenzymów, w tym enzymu flawoproteinowego, który uczestniczy w procesach redoks i katalizuje metabolizm puryn.

W warunkach naturalnych nie występuje niedobór tego mikroelementu. Natomiast w rejonach o podwyższonej zawartości Mo w glebach, roślinach i wodzie obserwuje się toksyczność tego metalu w stosunku do człowieka. Nadmiar molibdenu powoduje deformację kości, są to zmiany zbliżone do gośćca, także podatność na próchnicę zębów oraz zaburzenia w przyswajaniu białek i tłuszczów. To negatywne, toksyczne działanie molibdenu występuje często w stosunku do zwierząt. W sposób najbardziej szczególny dotyczy to przeżuwaczy, krów i owiec, mniej odnosi się do koni i trzody chlewnej. Zawartość molibdenu 20 – 100 ppm powoduje objawy zatrucia, którymi mogą być anemia, spadek ciężaru, zaburzenia ruchowe oraz ograniczenie płodności i laktacji. Fizjologiczne działanie molibdenu zależy od interakcji z innymi pierwiastkami. Dla zwierząt ważna jest właściwa proporcja miedzi do molibdenu, która z kolei zależy od ich zawartości a także od poziomu siarki w paszy [4].

Ze względu na toksyczność molibdenu dla ludzi i zwierząt ważna jest kontrola jego zawartości w próbkach pochodzenia roślinnego, wodach i żywności. Stosowane do tego celu metody analityczne powinny cechować się wysoką czułością, gdyż oznacza się stężenia rzędu ppm i niższe. Pożądaną cechą jest również selektywność danej metody, co zmniejsza problem usuwania wpływu substancji przeszkadzających. Wśród innych technik, takich jak ASA i ICP-AES znaczące miejsce zajmują metody spektrofotometryczne [1, 2, 6–8, 10, 11]. Ich zaletą jest niższa niż dla wymienionych wcześniej technik granica oznaczalności, natomiast ogólnie jako metody oparte na reakcjach chemicznych są mniej selektywne.

W naszej pracy, do oznaczania molibdenu zastosowano metodę spektrofotometryczną, opartą na reakcji z fenylofluoronem w obecności kationowego surfaktanta: bromku benzyldodecyldimetyloamoniowego [6].

Celem pracy było wykazanie możliwości zastosowania wyżej wymienionej metody do oznaczania Mo w preparatach o zróżnicowanej zawartości oznaczanego składnika i o różnym składzie chemicznym.

## MATERIAŁY I METODYKA

### Aparatura

Pomiary spektrofotometryczne wykonano na spektrofotometrze SPEKOL 11 produkcji C.Zeiss. Używano kuwet o grubości warstwy absorbującej 5 cm.

Materiał roślinny rozdrabniano w wysokoobrotowym młynku wirnikowym firmy FRITSCH z sitem o średnicy otworów 1 mm.

Próbki preparatu Multi-tabs mineralizowano w kolumnie mineralizacyjnej firmy HACH.

Materiał roślinny spalano w piecu muflowym.

### Odczynniki

Roztwór molibdenu (VI) o stężeniu 1 mg /ml przygotowano przez rozpuszczenie 0,7500 g tritlenku molibdenu  $\text{MoO}_3$  cz.d.a. (Merck) w 12,5 ml 2 mol /l roztworu NaOH. Roztwór lekko zakwaszono kwasem solnym i rozcieńczono wodą redestylowaną w kolbie miarowej na 500 ml.

Roztwór fenylododocyloamoniowego (PF) o stężeniu  $5 \cdot 10^{-4}$  mol /l otrzymano przez rozpuszczenie odważki 0,0800 g 2,3,7-trihydroksy-9-fenyl-6-fluoronu cz.d.a. (POCH) w metanolu z dodatkiem 1,0 ml stężonego HCl i rozcieńczenie do 500 ml metanolem.

Roztwór bromku benzylododocyloamoniowego (ST) o stężeniu 0,1 mol/l otrzymano przez rozcieńczenie 185 ml preparatu Sterinol ( POLFA ) wodą redestylowaną do objętości 500 ml. Preparat Sterinol jest 10%, wodnym roztworem bromku benzylododocyloamoniowego; jego gęstość wynosi 1,06 g/ml.

Wszystkie pozostałe odczynniki używane do mineralizacji i oznaczania miały stopień czystości cz.d.a. Do przygotowywania roztworów używano wody redestylowanej.

### Wykreślenie krzywej wzorcowej spektrofotometrycznego oznaczania molibdenu

Krzywą wzorcową spektrofotometrycznego oznaczania molibdenu wykreślono zgodnie z metodą zamieszczoną w pracy [6].

Do kolbek miarowych o pojemności 25 ml wprowadzono od 0,5 – 4,5  $\mu\text{g}$  Mo. Do każdej kolbki dodano 5 ml 0,1 mol/l ST, 0,6 ml  $5 \cdot 10^{-4}$  PF, 2,5 ml 1 mol/l HCl i uzupełniono do kreski wodą redestylowaną. Absorbancję prób zmierzono przy 526 nm, w kuwetach 5 cm, względem ślepej próby.

Wyliczone współczynniki równania regresji krzywej wzorcowej:  $y = ax + b$ ,

gdzie  $x$  jest zmienną niezależną  $c_{\text{Mo}}$  [ $\mu\text{g}/25\text{ml}$ ],  $y$  zmienną zależną  $A$ , wynoszą:

$a = 0,2176$  i  $b = 0,0083$  a współczynnik korelacji  $r$  ma wartość 0,9998.

### Przygotowanie próbek, mineralizacja i oznaczanie molibdenu

a) Materiał roślinny i próbki żywności

Łodygi i liście lucerny pocięto na drobne kawałki, suszono na powietrzu a następnie w suszarce w temperaturze nie przekraczającej  $60^\circ\text{C}$ . Ziarno grochu, fasoli i soi suszono w suszarce w takiej samej temperaturze. Próbki rozdrobniono w młynku wirnikowym, uzyskując ziarno o średnicy 1mm. Zmielone próbki przechowywano w zamkniętych naczyniach szklanych.

Do oznaczania molibdenu odważano po 5,0000 g analizowanego materiału. Próbki umieszczano w tyglach platynowych i spalano w temperaturze 150 –  $200^\circ\text{C}$  w otwartym piecu muflowym. Po zakończeniu wstępnego spalania zamykano drzwiczki pieca i stopniowo przez 2 h podnoszono temperaturę ogrzewania do  $450^\circ\text{C}$ . W tej temperaturze prażono próbki przez 2 h. Po upływie tego czasu tygle wyjęto z pieca, ochłodzono i przykryto szkiełkami zegarkowym. Popiół zwilżono 3 ml wody redestylowanej uchylając szkiełka, dodano 1 ml stężonego kwasu solnego, ogrzano do wrzenia i oddzielono osad od przesącza na miękkim sączku. Przesącz zachowano a sączki z osadem umieszczono ponownie w tyglach, spopieliło i prażono w temperaturze  $500^\circ\text{C}$  przez 30 minut. Do popiołu dodano 1 ml stęż. HF i odparowano powstały  $\text{SiF}_4$  na elektrycznej płycie grzewczej. Suchą pozostałość zwilżono 3 ml wody redestylowanej, 1 ml stężonego HCl i oddzielono osad od przesącza na miękkim sączku. Połączone przesącze zebrano do kolbki o pojemności 50 ml, uzupełniono do kreski wodą redestylowaną i oznaczono molibden metodą fenylododocyloamoniową w obecności bromku benzylododocyloamoniowego. W tym celu do kolbek miarowych na 25 ml odmierzonego po 5 ml mineralizatu i dalej postępowano tak jak podczas wykreślenia krzywej wzorcowej.

Próbki z dodatkiem wzorca przygotowano wprowadzając 10  $\mu\text{g}$  Mo w postaci roztworu wzorcowego do odważki analizowanej substancji. Następnie przeprowadzono mineralizację i oznaczenie molibdenu w sposób opisany powyżej.

b) Preparat witaminowo – mineralny Multi – tabs

Tabletki preparatu rozdrabniano i zmielono w moździerz porcelanowym na jednolity proszek. Do mineralizacji odważano po 0,1000 g masy tabletkowej i umieszczano w kolbie mineralizatora HACH. Do próbki dodawano 5 ml stężonego  $H_2SO_4$  i ogrzewano w temperaturze około  $190^\circ C$ . Aby uzyskać klarowny, bezbarwny roztwór, podczas mineralizacji dodawano czterokrotnie po 3 ml perhydrolu. Czas mineralizacji wynosił 30 minut. Po zakończeniu ogrzewania roztwór ochłodzono, przeniesiono do kolbki miarowej na 100 ml, uzupełniono wodą redestylowaną do kreski i wymieszano.

Aby oznaczyć molibden, 2 ml analizowanego roztworu umieszczano w kolbce miarowej na 25 ml i dalej postępowano tak jak podczas wykreślenia krzywej wzorcowej.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Podobnie jak w przypadku innych mikroelementów, molibden wykazuje pozytywne działanie na organizmy żywe w określonym zakresie stężeń. Natomiast przy przekroczeniu dopuszczalnego, bezpiecznego stężenia, może być przyczyną zatruc u ludzi i zwierząt. Dlatego ważne jest oznaczanie jego zawartości w próbkach pochodzenia naturalnego.

Do tego celu może być wykorzystana, stosowana w niniejszej pracy metoda spektrofotometryczna. Polega ona na utworzeniu barwnego kompleksu Mo (VI) z 2,3,7-trihydroksyfenylofluoronem w obecności bromku benzyldodecyldimetyloamoniowego [6]. Metoda charakteryzuje się wysoką czułością;  $\epsilon = 1,05 \cdot 10^5$ , a możliwość przeprowadzenia reakcji w kwaśnym środowisku pozwala wyeliminować wpływ innych jonów i w konsekwencji przeprowadzić oznaczenie molibdenu bez wstępnego wydzielenia.

Analizowany materiał zawierał zróżnicowane ilości molibdenu. Zawartość oznaczonego składnika determinuje wielkość odważki i w dużym stopniu stosowany sposób mineralizacji. Materiał roślinny i ziarna grochu fasoli i soi, gdzie spodziewano się zawartości molibdenu rzędu ppm, mineralizowano metodą suchą. Do analizy odważano 5 g próbki; a przy tak dużej odważce korzystniejszy jest ten sposób mineralizacji [9]. Mineralizacja dużej próby na mokro jest kłopotliwa technicznie. Wymaga użycia dużych ilości kwasów, których nadmiar należy usunąć z próbki. Wiąże się to z długotrwałym odparowywaniem. Istnieje również niebezpieczeństwo wprowadzenia razem z kwasami zanieczyszczeń do analizowanej próbki. Stosowana mineralizacja sucha nie stwarza tego rodzaju problemów. W tym przypadku istotna jest temperatura prażenia, która musi być dobrana tak, aby uniknąć strat oznaczanego składnika.

Analizowane próbki materiału roślinnego i żywności prażono w temperaturze nie przekraczającej  $500^\circ C$ , co zabezpiecza przed stratami molibdenu. Po spopieleniu

i wyprażeniu, rozpuszczano suchą pozostałość w HCl (1+3) i odparowano krzemionkę w postaci  $SiF_4$  po dodaniu do próbki stężonego HF [8]. Czynność ta jest konieczna, gdyż wyniki otrzymany bez usunięcia  $SiO_2$  nie są powtarzalne.

Oznaczenie molibdenu w suszu lucerny, ziarnach grochu, fasoli i soi przeprowadzono w sposób opisany w części eksperymentalnej. Analizowano również próbki z dodatkiem wzorca molibdenu. Wyniki zamieszczono w tabeli 1. Na ich podstawie można stwierdzić, że stosowana metoda spektrofotometryczna pozwala oznaczać mikrogramowe zawartości molibdenu z dużą precyzją. Względne odchylenie standardowe nie przekracza 1%. W próbkach z dodatkiem wzorca oznaczono molibden z błędem nie przekraczającym 4%.

Tabela I. Wyniki oznaczania molibdenu w materiale roślinnym, żywności i preparacie witaminowo – mineralnym  
Results of the determination of molybdenum in vegetable material, food and pharmaceutical compound

Analizowana próbka	Oznaczono Mo ppm, n=6, $\alpha=0,05$	SD	RSD %	Oznaczono Mo z dodatkiem wzorca,* ppm, n=6, $\alpha=0,05$	Odzysk %
susz lucerny	2,12 ± 0,02	1,5*10 <sup>-2</sup>	0,71	4,19 ± 0,04	103,5
ziarno soi	4,84 ± 0,01	1,2*10 <sup>-2</sup>	0,35	6,86 ± 0,01	101,0
ziarno grochu	1,45 ± 0,01	0,9*10 <sup>-2</sup>	0,47	3,53 ± 0,01	104,0
ziarno fasoli	0,87 ± 0,01	1,1*10 <sup>-2</sup>	0,34	2,93 ± 0,01	103,0
	Oznaczono Mo µg w 1 tabletkę n=10, $\alpha=0,05$				Błąd oznaczenia %
Multi-tabs	254,8 ± 4,3	6,16	2,38		1,9

\* Dodawano 10 µg molibdenu do 5 g próbki

Preparat witaminowo – mineralny Multi-tabs jest produkowany przez duńską firmę Ferrgsan. Występuje między innymi w postaci tabletek o masie 0,5 g. Zawiera zestaw witamin i mikroelementy, w tym molibden w ilości 250 µg. Ze względu na tak znaczną zawartość molibdenu nie analizowano całych tabletek, lecz je rozdrabniano i odważano 0,1000g otrzymanego, jednorodnego proszku. W tym przypadku zastosowano mineralizację na mokro za pomocą stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i perhydroflu, którą przeprowadzono w kolumnie mineralizacyjnej firmy Hach. Ogrzewając próbkę przez 30 minut w temperaturze około 190°C uzyskano klarowny, bezbarwny roztwór, w którym oznaczono molibden w sposób opisany w części eksperymentalnej. Wyniki oznaczania molibdenu w preparacie Multi – tabs zamieszczono w tabeli I. Błąd oznaczania, obliczony w stosunku do zawartości deklarowanej przez producenta nie przekracza 2%, a względne odchylenie standardowe wynosi 2,4% (Tab. I).

#### WNIOSKI

Zastosowana metoda oznaczania molibdenu w materiale roślinnym, żywności i preparacie witaminowo – mineralnym charakteryzuje się dobrą precyzją i dokładnością, co przedstawiono za pomocą odchylenia standardowego, procentu odzysku wzorca i błędu względnego w stosunku do wartości deklarowanej. Pozwala również oznaczać zawartości molibdenu rzędu ppm bez wstępnego oddzielenia.

K. Kania, K. Pytlakowska

## SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF MOLYBDENUM IN VEGETABLE MATERIAL, FOOD AND PHARMACEUTICAL COMPOUND

### Summary

A spectrophotometric method was applied for determination of molybdenum in dried lucerne, grains of soya, peas and bean and vitamin-mineral compound – Multi-tabs. The method is based on the reaction between molybdenum (VI) and 2,3,7-trihydroxyphenylfluorone in the presence of benzyldecyldimethylammonium bromide. In all samples it was possible to determine molybdenum content directly, after mineralization without its preliminary separation. Accuracy of the determination of molybdenum were checked by the method of standard addition, or by comparison with producer data. To establish the precision of the method, the standard deviation and relative standard deviation were calculated.

### PIŚMIENNICTWO

1. *Cruses Blanco C., Garcia Compana A., Ales Barrero F., Roman Ceba M.*: Simultaneous spectrophotometric determination of traces of molybdenum and boron in plant leaves. *Anal. Chim. Acta* 1993, 283, 213–223.
2. *Garcia Compana A., Ales Barrero F., Roman Ceba M., Fernandez Gutierrez A.*: Spectrofluorimetric determination of molybdenum in vegetal tissues and pharmaceutical compound with alizarin red S in micellar medium. *Analyst* 1994, 119, 1903–1906.
3. *Hay R.W.*: *Chemia bionieorganiczna*, PWN, Warszawa, 1990.
4. *Kabata-Pendias A., Pendias H.*: *Biochemia pierwiastków śladowych*, PWN, Warszawa, 1990.
5. *Kamińska W., Kardasz T., Roszyk E., Roszyk S., Strahl A., Strojek Z.*: Metody suchej mineralizacji materiału roślinnego do oznaczeń zawartości niektórych makro- i mikroelementów. *Roczniki Gleboznawcze*, 1983, 34, 133–151.
6. *Kania K., Buhl F.*: Spectrophotometric determination of molybdenum by means of phenylfluorone and lauryldimethylbenzylammonium bromide. *Chem. Anal.* 1993, 38, 613–617.
7. *Martinez Vidal J. L., Fernandez Alba A.R.*: Spectrophotometric determination of molybdenum in vegetal tissues, soils and pharmaceutical compounds with mandelohydroxamic acid. *Analyst* 1990, 115, 329–331.
8. *Molina Diaz A., Pascual Reguera M.J., Linan Veganzones E., Fernandez de Cordova M.L., Capitan Vallvey L.F.*: First derivative solid – phase spectrophotometric determination of molybdenum at the  $ng\ ml^{-1}$  level. *Talanta* 1996, 43, 185–191.
9. *Ostrowska A., Gawliński S., Szczubata Z.*: *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*, katalog, Warszawa, 1991.
10. *Xu Q., Yuan X.*: Flow-injection spectrophotometric determination of molybdenum in plants. *Fenxi Huaxue* 1992, 20, 319–321.
11. *Yu Y., Peng S., Huang J.*: Synthesis of 7-(2-carboxy-4-bromobenzoazo)-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (CBB) and spectrophotometric determination of molybdenum in foods. *Huaxue Shiji* 1992, 14, 337–339.

Otrzymano: 1999.09.13