

ANNA KRAUZE, DANUTA DOMSKA

KOLORYMETRYCZNE OZNACZANIE ŻELAZA  
W MATERIALE ROŚLINNYM  
Z ZASTOSOWANIEM  $\alpha, \alpha'$ -DWUPIRYDYLU

Katedra Chemii Rolniczej w Olsztynie

Kierownik — prof. dr M. Koter

Żelazo jest jednym z podstawowych składników regulujących procesy biochemiczne w organizmach roślin, zwierząt i ludzi. Wchodzi ono w skład hemoglobiny, cytochromów i peroksydaz. Ilość żelaza w roślinach jest na ogół nieduża i zależnie od wieku i gatunku waha się w granicach od 10 do 800 ppm [5].

Do oznaczania mikrogramowych ilości żelaza duże zastosowanie znalazły metody kolorymetryczne, w których wykorzystano barwną reakcję, jaką dają jony  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  z niektórymi odczynnikami, jak rodanek potasu lub coraz częściej stosowany dwupirydyl [1, 2, 4, 5]. Odczynnik ten odznacza się wysoką czułością i selektywnością oraz pozwala na oznaczanie w badanej próbce całkowitej zawartości żelaza po redukcji  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$ . Powstałe w środowisku kwaśnym, obojętnym lub alkalicznym czerwono zabarwione kompleksowe połączenia jonów żelazawych z dwupirydylem podlegają prawu Lamberta-Beera w szerokich granicach stężeń i są trwałe w ciągu kilku miesięcy [7].

W literaturze metodycznej odczuwa się w dalszym ciągu brak dokładnego i szybkiego sposobu oznaczania żelaza w materiale roślinnym. Trudności związane z określaniem tego składnika skłoniły nas do opracowania kolorymetrycznego sposobu oznaczania żelaza z zastosowaniem dwupirydylu.

## CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

W doświadczeniu użyto następujących odczynników i roztworów:

- woda utleniona ok. 33%,
- kwas nadchlorowy o c. wł. 1,54,
- kwas solny o c. wł. 1,19 rozcieńczony wodą w stosunku 1 : 1,
- kwas siarkowy 25-procentowy,
- wodorotlenek sodu ln,
- p-hydroksyfenyloglicyna (wywoływacz fotograficzny „Glycin”) — 0,1 g rozpuszcza się w objętości 100 ml 0,4n kwasu siarkowego,
- roztwór  $\alpha,\alpha'$ -dwupirydylu — 0,5 g w 100 ml 10-procentowego kwasu octowego.

Sporządzenie krzywej wzorcowej przebiegało następująco:

— roztwór podstawowy — 0,3510 g  $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  rozpuszcza się w wodzie destylowanej uzupełniając do objętości 500 ml; 1 ml tak sporządzonego roztworu zawiera 100  $\gamma$   $\text{Fe}^{2+}$ ;

— roztwory wzorcowe: ze świeżo przygotowanego roztworu podstawowego odmierza się po 5, 10, 15 i 20 ml do kolb miarowych na 100 ml dodając 10 ml 25-procentowego kwasu siarkowego i uzupełniając wodą destylowaną do kreski. Z roztworów tych pobiera się kolejno po 5 ml, co odpowiada 25, 50, 75 i 100  $\gamma$   $\text{Fe}^{2+}$  do kalibrowanych probówek na 25 ml i dalej postępuje się tak, jak z badaną próbą.

Oznaczenia wykonano następująco: odważa się 1-2 g powietrznie suchej, zmielonej substancji roślinnej i po zwęgleniu na łaźni piaskowej spala się przez 3-4 godz w piecu w temperaturze 450-500°C. W celu przyspieszenia spalania do ostudzonego popiołu zwilżonego wodą destylowaną dodaje się 0,5-1 ml wody utlenionej ok. 33-procentowej i po odparowaniu na łaźni wodnej spala się jeszcze przez 1 godz. W przypadku ciemnej barwy popiołu należy dodać 0,5-1 ml kwasu nadchlorowego (c. wł. 1,54) i spalać na łaźni piaskowej do odparowania kwasu i uzyskania szarobiałej (słoma) lub białej (ziarno) barwy popiołu. Ostudzony popiół zwilża się 2 ml wody destylowanej i dodaje 5 ml kwasu solnego (c. wł. 1,19), rozcieńczonego wodą w stosunku 1 : 1 oraz po przykryciu szkiełkiem zegarkowym podgrzewa do wrzenia i rozpuszczenia. Po ostudzeniu dodaje się 5 ml 25-procentowego kwasu siarkowego i odparowuje do usunięcia kwasu solnego. Otrzymany roztwór rozcieńcza się gorącą wodą destylowaną i sączy przez średnie sączki do kolb miarowych o objętości 50 ml przemywając kilkakrotnie sączek gorącą wodą destylowaną. Po ostudzeniu i uzupełnieniu wodą destylowaną do kreski oraz po dokładnym wymieszaniu pobiera się 5 ml (co odpowiada 0,1-0,2 g substancji roślinnej i stężeniu 0,5 ml 25-procentowego kwasu siarkowego) do probówek kalibrowanych na 25 ml. Następnie dodaje się 1 ml p-hydroksyfenyloglicyny i 1 ml dwupirydylu oraz 4 ml ln wodorotlenku sodu

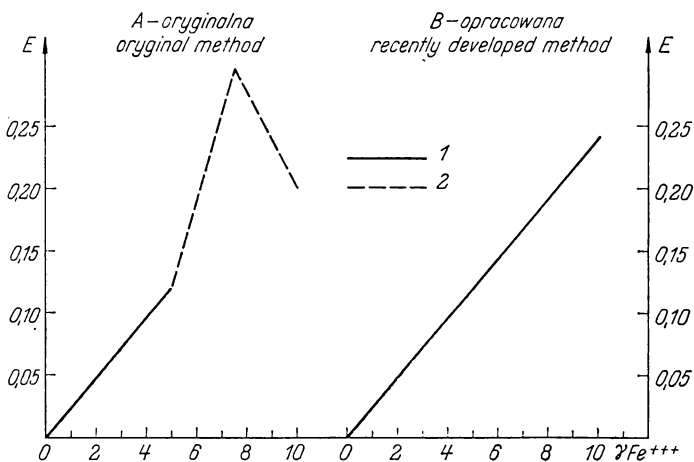
w celu doprowadzenia do pH 4,0. Uzupełniony do kreski wodą destylowaną i wymieszany barwny roztwór kolorymetruje się przy długości fali 490 m $\mu$  w kiuwetach o grubości warstwy 1 cm.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

W celu sprawdzenia wartości opracowanej metody oznaczania żelaza w materiale roślinnym wybrano i porównano najczęściej spotykane w literaturze metody kolorymetryczne z zastosowaniem rodanku potasu i  $\alpha,\alpha'$ -dwupirydyłu [2, 6]. Zgodnie z zaleceniem wielu autorów [1, 3, 4, 6] wzięto przy tym pod uwagę następujące czynniki, wpływające na dokładność metody:

- odczyn badanego roztworu,
- stężenie odczynnika reagującego i jego czułość,
- szybkość powstawania i trwałość barwnego kompleksu,
- rodzaj reduktora.

Przeprowadzone pomiary kontrolne stosowanych metod wykazały, że bardzo ważnym elementem, niezależnym od doboru odczynnika reagującego z żelazem, jest określony odczyn środowiska, który nie uregulowany może wpłynąć na obniżenie lub podwyższenie wyników oznaczeń. W metodzie rodankowej wpływ odczynu środowiska uwidacznia się już w roztworach wzorcowych żelaza i dopiero wyrównanie odczynu tych roztworów pozwala na otrzymanie krzywej zgodnej z prawem Lamberta-Beera (rys. 1a i 1b). Z przeprowadzonych dalszych badań okazało się



Rys. 1. Krzywa do oznaczania żelaza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) metodą rodankową Pipera  
1 — pH początkowe roztworów 1,1-1,3, 2 — pH początkowe roztworów <1,0

Curve for determining iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) by the Pipers's rhodanate method  
1 — initial pH of solutions 1,1-1,3, 2 — initial pH of solutions <1,0

również, że stosowanie metody rodankowej przy oznaczaniu żelaza w materiale roślinnym jest kłopotliwe. Pozwala ono wprowadzić na stosunkowo dokładne określanie małych zawartości żelaza w zakresie stężeń 1-10  $\gamma$  (tab. 1), ale występujące w roślinach duże zróżnicowanie w ilościach

T a b e l a 1

Sprawdzenie błędu metody rodankowej podanej przez Pipera  
Verification of error of the Piper's rhodanate method

Stężenie $\gamma$ $Fe^{3+}$ - $Fe^{3+}$ concentration in $\gamma$				Różnica Difference	Błąd Error %
w badanej próbce in the sample tested	dodatek addition	razem total	znaleziono found		
4,0	2,5	6,5	6,5	0,0	0,00
5,4	2,5	7,9	7,9	0,0	0,00
2,3	5,0	7,3	7,2	0,1	-1,37
4,6	5,0	9,6	9,6	0,0	0,00
5,4	5,0	10,4	10,4	0,0	0,00
7,5	5,0	12,5	12,5	0,0	0,00
9,6	5,0	14,6	13,9	0,7	-4,80
4,6	7,5	12,1	12,3	0,2	+1,65
5,4	10,0	15,4	15,2	0,2	-1,30
10,8	10,0	20,8	18,7	2,1	-10,10
Razem - Total				3,3	$\pm 19,22$
Średnio - Mean				0,3	$\pm 1,92$

tego składnika stwarza konieczność ciągłego kontrolowania i ustalania rozcieńczenia badanej próbki.

Utrzymanie jednakowego odczynu środowiska decyduje również o dokładności wyników w metodach z zastosowaniem  $\alpha, \alpha'$ -dwupirydyli, przy czym uważa się, że optimum odczynu badanego roztworu przy stosowaniu tego odczynnika mieści się w granicach pH 3,0-4,5 [4]. W trakcie oznaczania żelaza ściśle według sposobu podanego przez Pipera i Barona [2, 6] dużą trudność sprawia wyrównanie odczynu badanych roztworów, ponieważ do tego celu autorzy stosują stężone odczynniki i roztwory (stężony amoniak i 10n wodorotlenek sodu). W metodzie podanej przez Pipera [6] wywołanie barwnego kompleksu żelaza z dwupirydylem występuje wyraźnie tylko w przypadku dużych ilości żelaza w badanym roztworze. Przy małych ilościach tego pierwiastka wytwarzanie się barwnego kompleksu jest stopniowe, co wpływa na niedokładność wyników, spowodowaną niedostatecznym lub nadmiernym zalkalizowaniem środowiska. W metodzie opracowanej przez Barona używany do redukcji  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  kwas siarkowy nie daje pewności, że redukcja zaszła całkowicie, przy czym powstający podczas tej reakcji nadmiar dwutlenku

T a b e l a 2

Sprawdzenie błędu metody podanej przez Pipera z zastosowaniem  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dwupirydylu  
 Verification of error of the Piper's method, under  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dipyridil application

Stężenie $\gamma$ $Fe^{2+}$ - $Fe^{2+}$ concentration in $\gamma$				Różnica Difference	Błąd Error %
w badanej próbce in the sample tested	dodatek addition	razem total	znaleziono found		
22,5	5,0	27,5	29,0	1,5	+5,45
57,5	5,0	62,5	64,0	1,5	+2,40
22,5	10,0	32,5	29,5	3,0	-9,24
40,0	10,0	50,0	49,0	1,0	-2,00
57,5	10,0	67,5	71,0	3,5	+5,18
20,0	25,0	45,0	40,0	5,0	-11,12
40,0	25,0	65,0	68,0	3,0	+4,61
49,0	25,0	74,0	71,0	3,0	-4,06
20,0	50,0	70,0	69,0	1,0	-1,43
22,5	50,0	72,5	71,5	1,0	-1,25
Razem - Total				23,5	$\pm 46,74$
Średnio - Mean				2,3	$\pm 4,45$

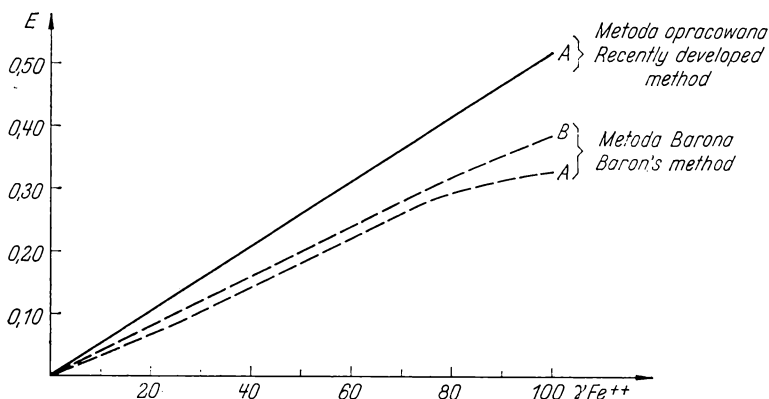
T a b e l a 3

Sprawdzenie błędu metody Barona  
 Verification of error of the Baron's method

Stężenie $\gamma$ $Fe^{2+}$ - $Fe^{2+}$ concentration in $\gamma$				Różnica Difference	Błąd Error %
w badanej próbce in the sample tested	dodatek addition	razem total	znaleziono found		
30,0	10,0	40,0	40,0	0,0	0,00
50,0	10,0	60,0	60,0	0,0	0,00
28,0	25,0	53,0	57,5	4,5	+8,49
50,0	25,0	75,0	76,0	1,0	+1,33
51,5	25,0	76,5	77,0	0,5	+0,65
57,5	25,0	82,5	94,0	11,5	+13,93
30,0	50,0	80,0	91,0	11,0	+13,75
50,0	50,0	100,0	105,0	5,0	+5,00
27,5	75,0	102,5			nie odczytano - unread
50,0	75,0	125,0			nie odczytano - unread
Razem - Total				33,5	$\pm 43,15$
Średnio - Mean				4,1	$\pm 5,39$

siarki nie pozostaje także bez wpływu na dokładność wyników [3, 7].  
 Przy tym sposobie oznaczania żelaza wykreślona krzywa wzorcowa wykazuje zgodność z prawem Lamberta-Beera dopiero po dłuższym okre-

się czasu (rys. 2). Odczytane wartości żelaza na podstawie tej krzywej odbiegają znacznie od wyników uzyskanych w metodach opisanych przez Pipera z zastosowaniem rodanku potasu i dwupirydyli (tab. 5).



Rys. 2. Krzywe do oznaczania żelaza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) z zastosowaniem  $\alpha, \alpha'$ -dwupirydyli  
A — pomiar E wykonany od razu, B — pomiar E wykonany na drugi dzień

Curve for determining iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) under  $\alpha, \alpha'$ -dipyridil application

A — E measurement carried out immediately, B — E measurement carried out on another day

Ze względu na wynikające trudności przy oznaczaniu żelaza w materiale roślinnym opracowano dokładną i prostą metodę oznaczania całkowitej ilości tego pierwiastka (po redukcji  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$ ) z zastosowaniem  $\alpha, \alpha'$ -dwupirydyli. Różni się ona od metod podanych przez Pipera i Barona większą precyzją wykonania (niezależnie od rozpiętości zawartości żelaza), wynikającą ze ścisłego ustalenia optymalnego odczynu badanych roztworów, doboru odpowiedniego reduktora oraz właściwego stężenia odczynnika reagującego. Drogą pomiarów analitycznych ustalono, że najbardziej optymalny odczyn środowiska, w którym powstaje trwałe, barwny, kompleksowy związek żelaza z dwupirydyliem jest  $\text{pH} = 4,0$  (tab. 6). Ze stosowanych reduktorów, jak kwas siarkowy, p-hydroksyfenyloglicyna i siarczyny sodu najbardziej zadowalające wyniki otrzymano przy użyciu wywołacza „Glycin” w roztworze 0,4n kwasu siarkowego (tab. 5). W celu zlikwidowania wpływu przeszkadzających jonów cynku, miedzi, niklu i innych pierwiastków oraz przyspieszenia powstania barwnego kompleksu  $\text{Fe}^{2+}$  z dwupirydyliem zastosowano odczynnik reagujący o stężeniu 0,5 g w 100 ml 10-procentowego kwasu octowego (tab. 6). Oznaczona zawartość żelaza według opracowanej metody jest dokładna i zgodna z wynikami otrzymanymi sprawdzoną metodą rodankową i dwu-

Tabela 4

Sprawdzenie błędu opracowanej metody  
Verification of error of the own, recently developed method

Stężenie $\gamma$ Fe <sup>2+</sup> - Fe <sup>2+</sup> concentration in $\gamma$				Różnica Difference	Błąd <sup>xxx</sup> Error %
w badanej próbce in the sample tested	dołatek addition	razem total	znaleziono found		
12,0	25,0	37,0	38,0	1,0	+2,70
20,0	25,0	45,0	44,5	0,5	-1,12
21,0	25,0	46,0	44,5	1,5	-3,27
54,0	25,0	79,0	78,5	0,5	-0,64
10,0	50,0	60,0	62,0	2,0	+3,03
12,0	50,0	62,0	61,5	0,5	-0,81
21,0	50,0	71,0	70,5	0,5	-0,71
24,5	50,0	74,5	76,0	1,5	+2,01
29,0	50,0	79,0	80,5	1,5	+1,89
10,0	75,0	85,0	86,0	1,0	+1,17
Razem - Total				10,5	$\pm 17,35$
Średnio - Mean				1,0	$\pm 1,73$

<sup>xxx</sup>/ Występujące najczęściej wahania błędów oznaczeń żelaza w zakresie stężeń od 10-90  $\gamma$  /na 60 zbadanych/

Error fluctuations occurring most frequently in iron determination within the range of concentrations of 10-90  $\gamma$  /per each of the 60 concentrations investigated/

Tabela 5

Zawartość żelaza w roślinach w ppm oznaczonego kilkoma metodami  
Iron content in plants /in ppm/, determined by several methods

Roślina Plant		Metody - Method				
		rodankowa rhodanate	z $\alpha$ , $\alpha'$ - dwupirydylem with $\alpha$ , $\alpha'$ - dipirydyl			
			wg Pipera according to Piper	Barona - Baron		nowo opracowana recently developed
			rodzaj reduktora reductor kind			
		Glycin Glycine	H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Glycin Glycine	
Żyto - słoma - Rye - straw		96,0	98,0	115,0	78,0	98,0
Owies - ziarno - Oats - grain		80,0	80,0	110,0	72,0	80,0
Rzepak - ziarno - Rape - seed		150,0	160,0	200,0	-	164,0
Koniczyna - siano - Clover - hay		76,6	75,0	100,0	66,6	79,2
Buraki - korzenie - Beets - roots		108,5	115,0	162,0	114,0	116,0

Wpływ odczynu środowiska, czasu i stężenia odczynnika reagującego na wyniki oznaczenia zawartości żelaza  
 Effect of reaction medium, time and concentration of responding reagent upon the results of iron content determination

pH roztworu pH of solution	Stężenie Fe <sup>2+</sup> w $\gamma$ Fe <sup>2+</sup> concentration, in $\gamma$	Stężenie $\alpha, \alpha'$ - dwupirydyli % $\alpha : \alpha'$ - dipyridil concentration, %		
		0,2	0,2	0,5
		$\gamma$ Fe <sup>2+</sup> po skolorymetrowaniu $\gamma$ Fe <sup>2+</sup> after colorimetric determination		
		w czasie od 1-6 godziny within 1-6 hours	na drugi dzień on the next day	odrazu immediately
w roztworach wzorcowych - in standard solutions				
3,0	25	23	25	25
3,5	"	23	25	25
4,0	"	23	25	25
4,5	"	22	25	25
5,0	"	19	24	-
3,0	50	48	50	50
3,5	"	48	50	50
4,0	"	50	53	50
4,5	"	44 - 47 - 48	50	50
5,0	"	38	45	-
3,0	75	71	75	75
3,5	"	71	75	75
4,0	"	71	75	75
4,5	"	61 - 67 - 71	75	75
5,0	"	59	65	-
3,0	100	96	98	98
3,5	"	96	98	98
4,0	"	98	100	100
4,5	"	92 - 94	100	100
5,0	"	82	87	-
w roztworach badanych roślin - in solutions of tested plants				
3,0	6,5	6,0	6,5	6,0
3,5	"	6,5	6,5	6,5
4,0	"	6,5	6,5	6,5
4,5	"	6,5	6,5	6,5
4,0	25	23	25	n.o.
4,5	"	22	25	n.o.
5,0	"	19	24	n.o.
3,0	34,5	34	34,5	34
3,5	"	34	34,5	34
4,0	"	34,5	34,5	34,5
4,5	"	32,5	34,0	32,5



pirydylową Pipera (tab. 5). Krzywa wzorcowa przebiega zgodnie z prawem Lamberta-Beera w zakresie stężeń 0-100  $\gamma$ , średni błąd metody wynosi  $\pm 1,7\%$ .

#### WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że przy oznaczaniu żelaza w materiale roślinnym przy użyciu  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -dwapirydylu dokładność oznaczeń zależy głównie od określonego pH środowiska, rodzaju reduktora i stężenia odczynnika reagującego. Najbardziej miarodajne wyniki otrzymano przy pH 4,0 i zastosowaniu odczynnika reagującego w stężeniu 0,5% oraz przy użyciu do redukcji żelaza p-hydroksyfenyloglicyny. Czułość metody mieści się w zakresie stężeń od 0-100  $\gamma$  przy średnim błędzie  $\pm 1,7\%$ .

#### LITERATURA

- [1] Allport N.L.: Analiza kolorymetryczna. PZWL, Warszawa 1956.
- [2] Baron H.: Landw. Forsch., B. 4, H. 1, 13, 1954.
- [3] Belcher R., Wilson C.L.: Nowe metody w analizie chemicznej. PWT Warszawa 1958.
- [4] Marczenko Z.: Odczynniki organiczne w analizie nieorganicznej. PWN, Warszawa 1959.
- [5] Nowotny-Mieczyska A.: Fizjologia mineralnego żywienia roślin. PWRiL, Warszawa 1965.
- [6] Piper C.S.: Analiza gleby i roślin. PWN, Warszawa 1957.
- [7] Struszyński M.: Analiza ilościowa i techniczna. PWT, Warszawa 1952.

А. КРАУЗЕ, Д. ДОМСКА

#### КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА В РАСТИТЕЛЬНОМ ВЕЩЕСТВЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ $\alpha, \alpha'$ -ДИПИРИДИЛА

Кафедра Агрохимии Высшей Сельскохозяйственной Школы, Ольштин

#### Резюме

Разработан метод определения общего количества железа (после восстановления  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ ) в растениях с применением  $\alpha, \alpha'$ -дипиридила. Метод позволяет точно определить содержание этого элемента при реакции испытуемого раствора pH 4,0 в диапазоне концентрации от 0 до 100  $\gamma$ .

По сравнению с обычно рекомендованными в литературных сведениях способами определения железа, разработанный метод пригоден для массовых определений этого элемента в растительном веществе с большой дифференцированностью содержания железа. Средняя погрешность метода  $\pm 1,7\%$ .

A. KRAUZE, D. DOMSKA

COLORIMETRIC DETERMINATION OF IRON IN PLANT MATERIAL USING  
 $\alpha,\alpha'$ -DIPYRIDYL

Department of Agricultural Chemistry College of Agriculture in Olsztyn

## Summary

A method has been developed for the determination of total iron (after  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$  reduction) in plants using  $\alpha,\alpha'$ -dipyridyl. The method allows exact determination of that element at pH 4,0 within the range of 0-100  $\gamma$ ; it is applicable to serial determinations of iron in plants containing different amount of this element. The mean error of the method is  $\pm 1,7\%$ .

*Wpłynęło do redakcji w lipcu 1968 r.*