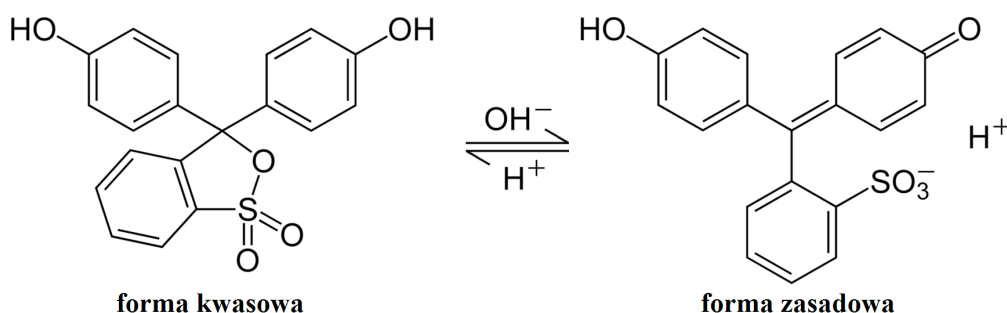


Ćwiczenie 3: Spektrofotometryczne oznaczanie czerwieni fenolowej metodą dodatku wzorca.

Celem ćwiczenia jest poznanie właściwości czerwieni fenolowej oraz spektrofotometryczne oznaczenie jej stężenia w roztworze o nieznanym pH z wykorzystaniem metody dodatku wzorca.

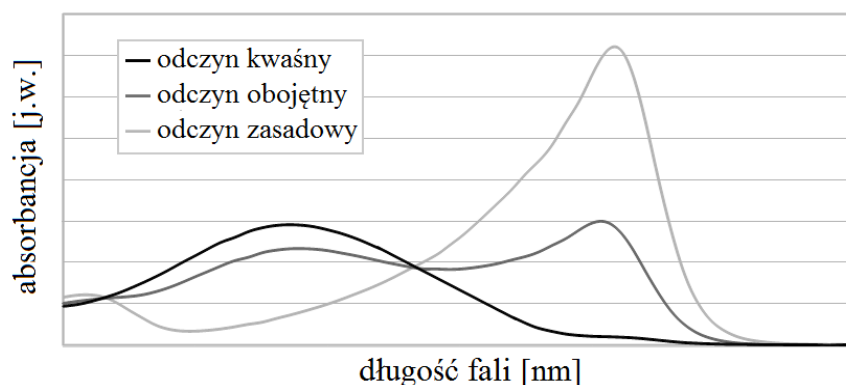
Czerwień fenolowa, fenylosulfoftaleina (Rysunek 1) jest słabym kwasem, który w środowisku wodnym istnieje w dwóch formach o różnych barwach. Udział poszczególnych form w roztworze zależy od jego pH; w roztworach kwaśnych dominuje forma niezdysocjowana o barwie żółtopomarańczowej, podczas gdy w roztworach zasadowych wskaźnik istnieje głównie w formie zdysocjowanej o barwie różowofioletowej. W zakresie pH 6,8 – 8,4 czerwień fenolowa wykazuje różne odcienie zabarwienia pośredniego, będącego mieszaniną barw formy kwasowej i zasadowej.



Rysunek 1. Kwasowa i zasadowa forma czerwieni fenolowej.

Czerwień fenolowa jest wskaźnikiem wykorzystywanym między innymi w biotechnologii do kontroli procesu hodowli komórek. Nagłe zakwaszenie hodowli (związane np. z jej zakażeniem bakteryjnym) jest sygnalizowane przez zmianę barwy wskaźnika z czerwonej na żółtopomarańczową. Czerwień fenolowa znajduje także zastosowanie (choć coraz rzadziej) w diagnostyce pracy nerek (próba PSP). Po dożylnym podaniu znanej ilości czerwieni fenolowej oznacza się spektrofotometrycznie jej stężenie w moczu pacjenta – zbyt wolne usuwanie wskaźnika z krwiobiegu jest objawem stanu chorobowego nerek.

Absorbancja próbki (przy danej długości fali) w istotny sposób zależy od jej odczynu (z wyjątkiem absorbancji w punkcie izobestycznym, Wykres 1). Jest to znaczącym utrudnieniem przy próbie oznaczenia czerwieni fenolowej w roztworach o różnych wartościach pH, gdyż na mierzoną wartość absorbancji wpływa nie tylko stężenie analitu, ale także skład matrycy (kwasy i zasady zmieniające pH roztworu). Rozwiązaniem tego problemu byłoby oznaczenie czerwieni fenolowej metodą krzywej wzorcowej wobec wzorców o takim samym pH (dopasowanie matrycy), jednakże, wymagałoby to stworzenia wielu serii wzorców dla próbek o różnych wartościach pH.



Wykres 1. Krzywe absorpcji czerwieni fenolowej (stężenie wskaźnika jest stałe) w roztworach o różnych odczynach.

W sytuacji gdy nie można wykonać serii wzorców z dopasowaniem matrycy (matryca zbyt złożona lub o nieznanym składzie) skutecznym rozwiązaniem jest zastosowanie metody dodatku wzorca. W pierwszym etapie wykonywany jest pomiar absorbancji (A_0) próbki o nieznanym stężeniu analitu (c_0). Następnie, do takiej samej próbki dodaje się pewną ilość wzorca, który powoduje wzrost stężenia analitu o ściśle określoną wartość (Δc). Dla próbki wzbogaconej w analit także wykonuje się pomiar absorbancji (A_1 , gdzie $A_1 = A_0 + \Delta A$). Zakładając liniową zależność pomiędzy wartością mierzonej absorbancji, a stężeniem analitu, jego początkowe stężenie (c_0) można obliczyć z równania: $\frac{\Delta A}{\Delta c} = \frac{A_0}{c_0}$. W praktyce zwykle wykorzystuje się metodę wielokrotnego dodatku wzorca, która pozwala osiągnąć większą dokładność oznaczenia.

1. Badanie właściwości czerwieni fenolowej.

Do kolbek o pojemności 25,0 cm³ wprowadzić dokładnie 1,50 cm³ roztworu czerwieni fenolowej, 2,5 cm³ odpowiedniego buforu (pH 3,56; 4,65; 6,68; 7,41; 9,19; 10,01; 12,45) i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Zarejestrować krzywe absorpcji przygotowanych roztworów (zerując przyrząd dla wody) w zakresie światła widzialnego co 5 nm. Sporządzić wykres przedstawiający zmiany absorbancji w zależności od długości fali dla roztworów o różnym pH oraz opisać charakterystykę spektrofotometryczną czerwieni fenolowej, podając w formie tabeli: punkty izobestyczne (absorbancja i długość fali), długości fal, przy których występują maksima absorpcji dla formy kwasowej i zasadowej oraz zakresy pH, w których występuje każda z form.

2. Oznaczenie zawartości czerwieni fenolowej w próbce.

Zawartość kolby ($100,0\text{ cm}^3$) otrzymanej do analizy należy dopełnić wodą destylowaną do kreski. Do czterech kolbek o pojemności $25,0\text{ cm}^3$ wprowadzić dokładnie $5,00\text{ cm}^3$ próbki, a następnie dodać odpowiednio 0, 200, 400 i 600 μl wzorcowego roztworu czerwieni fenolowej o stężeniu $100\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Uzupełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać. Na podstawie barwy roztworów określić odczyn próbki. Zmierzyć absorbancję dla poszczególnych roztworów przy $\lambda = 445\text{ nm}$ (kwaśny odczyn próbki) lub $\lambda = 558\text{ nm}$ (odczyn obojętny lub zasadowy). Jako odnośnika użyć wody destylowanej.

Na podstawie wykonanych pomiarów przedstawić graficznie zależność absorbancji od zmiany stężenia czerwieni fenolowej w próbce. Zależność przybliżyć funkcją liniową, na jej podstawie obliczyć stężenie czerwieni fenolowej w próbce. Wynikiem oznaczenia jest masa czerwieni fenolowej (z uwzględnieniem niepewności pomiaru) w kolbie otrzymanej do analizy.

Literatura:

- [1] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., Podstawy chemii analitycznej. t. 1 i 2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
- [2] Szmal Z., Lipiec T., Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej, Wydawnictwo Lekarskie, PZWL Warszawa 1996, Rozdział 7, s. 569-571.
- [3] Głuch I., Balcerzak M., Chemia analityczna. Ćwiczenia laboratoryjne., Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2007.

Zagadnienia do kartkówki:

Prawa absorpcji.

Absorpcja promieniowania, a barwa związku.

Pojęcia: absorbancja, transmitancja, molowy współczynnik absorpcji, zakres widzialny promieniowania, punkt izozbestyczny, chromofor, efekt auksochromowy, efekt batochromowy.

Budowa i zasada działania spektrofotometru.

Obliczenia związane z wyznaczaniem stężenia metodą pojedynczego dodatku wzorca.

Obliczenie niepewności pomiaru

Odchylenie standardowe wyznaczonego stężenia analitu (s_c) należy policzyć ze wzoru:

$$s_c = c_0 \sqrt{\left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2}$$

gdzie c_0 to stężenie analitu w próbce, a i b to odpowiednio współczynnik kierunkowy i współczynnik przesunięcia krzywej zależności absorbancji od wzrostu stężenia analitu, a wartości s_a i s_b to odchylenia standardowe wspomnianych współczynników. Wyprowadzenie powyższej zależności zostało przedstawione w literaturze (pozycja [1], rozdział 26, str. 301).

Sposób obliczenia wartości s_a i s_b został opisany w literaturze (pozycja [1], rozdział 8, str.196-199). Dopuszczalne jest również wykorzystanie funkcji REGLINP w programie MS Excel lub OO Calc.

Wykorzystanie funkcji REGLINP

(na przykładzie programu Calc w pakiecie OpenOffice, ta sama funkcja jest dostępna w programie Excel pakietu Microsoft Office).

1. W osobnych kolumnach należy podać przyrosty stężeń czerwieni fenolowej (wyliczone na podstawie objętości dodanego wzorca) i zmierzone wartości absorbancji.

2. Zaznaczamy w arkuszu 4 puste komórki (2x2) i klikamy **Wstaw** → **Funkcja**. Wyszukujemy funkcję **REGLINP** i klikamy **Dalej**. Jako **Dane Y** należy podać wartości zmierzonej absorbancji, jako **Dane X** wartości przyrostów stężeń, w polach **Typ linowy** i **Parametry** wpisujemy dowolną wartość niezerową i klikamy **OK**.

3. We wcześniej zaznaczonych komórkach pojawią się 4 nowe wartości. Dwie pierwsze, tj. $E2$, $F2$, to odpowiednio współczynnik kierunkowy (a) i współczynnik przesunięcia (b) krzywej regresji. Dwie kolejne, tj. $E3$, $F3$, to odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego (s_a) i współczynnika przesunięcia (s_b).

	A	B	C	D	E	F
1	objętość dodanego	przyrost stężenia	zmierzona			
2	wzorca [μl]	czerwieni fenolowej [mg/l]	absorbancja [j.w.]		0,05575	0,1344
3	0	0	0,138		0,001322	0,002592
4	200	0,8	0,176			
5	400	1,6	0,221			
6	600	2,4	0,268			
7	800	3,2	0,315			