

ĆWICZENIE 32

INSTRUKCJA WYKONANIA ĆWICZENIA

Aparatura:

- Spektrofluorymetr Cary Eclipse z systemem termostatuującym Peltier.
- Spektrofotometr UV-Vis Cary 50
- Kuwety Kwarcowe o drodze optycznej 10 mm (2)
- Kolby Erlenmeyera, kolby miarowe, pipety Pasteura, pipety automatyczne, cylindry miarowe.

Odczynniki:

- Roztwór kwasu siarkowego (VI) o stężeniu 0,05 M
- Roztwór wodorotlenku potasu o stężeniu 5,4 M (A)
- 4% roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu $[K_3Fe(CN)_6]$ (B)
- Odczynnik utleniający: Mieszanina A+B w stosunku objętościowym 25:1. (*Przygotować bezpośrednio przed reakcją*)
- Izobutanol
- Roztwór chlorowodorku tiaminy o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ w 0,05 M kwasie siarkowym (VI)
- Produkt komercyjny zawierający w swoim składzie witaminę B1

CZĘŚĆ 1: PREPARATYKA

1. Przygotowanie utleniacza.

W kolbce Erlenmeyera ze szlifem o pojemności 100 ml przygotować odczynnik utleniający. W tym celu należy zmieszać 75 ml roztworu wodorotlenku potasu (5,4 mol/L) z 3 mL roztworu heksacyjanożelazianu (III) potasu (4%). *Mieszaniny utleniającej nie należy przechowywać dłużej niż przez 4 godziny.*

2. Sporządzenie wzorcowych roztworów chlorowodorku tiaminy

- Do 6 ponumerowanych kolbek miarowych pojemności 10 ml odmierzyć kolejno: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 i 2,5 ml roztworu chlorowodorku tiaminy o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ i uzupełnić do objętości końcowej 10 ml roztworem kwasu siarkowego(VI) (0,05 M).
- Przygotować 6 ponumerowanych kolbek Erlenmeyera 50 ml. Do każdej z nich dodać po 8 ml odczynnika utleniającego a następnie przenieść roztwory tiaminy z kolbek miarowych do kolejnych kolbek Erlenmeyera. Opisać dokładnie która kolba Erlenmeyera zawiera który roztwór tiaminy. Odczekać 10 minut.
- Następnie do każdej kolby dodać po 10 ml izobutanolu, wytrząsać przez 1 minutę i pozostawić do rozdzielania warstw.
- Po rozdzieleniu warstw otrzymujemy wzorce tiaminy o stężeniach: 0,0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 $\mu\text{g/ml}$.

3. Przygotowanie roztworu próbki tiaminy o nieznanym stężeniu.

Do kolby miarowej 10 ml przenieść 5 ml roztworu chlorowodoru tiaminy o nieznanym stężeniu (X; otrzymany od asystenta) i uzupełnić do 10 ml roztworem kwasu siarkowego(VI) (0,05 M). Następnie przenieść roztwór z kolby miarowej do kolby Erlenmeyera zawierającej 8 ml odczynnika utleniającego i odczekać 10 minut. Po tym czasie dodać 10 ml izobutanolu, po czym wytrząsać przez 1 minutę i rozdzielić warstwy.

4. Przygotowanie roztworu badanego produktu zawierającego witaminę B1.

Do 3 kolb miarowych 10 ml przenieść 0,5 g badanego produktu (SAMPLE; otrzymany od asystenta) i uzupełnić do 10 ml roztworem kwasu siarkowego(VI) (0,05 M). Następnie przenieść roztwór z kolby miarowej do kolby Erlenmeyera zawierającej 8 ml odczynnika utleniającego i odczekać 10 minut. Po tym czasie dodać 10 ml izobutanolu, po czym wytrząsać przez 1 minutę i rozdzielić warstwy.

CZĘŚĆ 2: SPEKTROSKOPIA

5. Dobór optymalnej długości fali wzbudzenia i emisji – wykonanie widma absorpcji, wzbudzenia i emisji tiochromu.

Zgodnie z instrukcją obsługi spektrometru UV-Vis oraz spektrofluorymetru zarejestrować widmo absorpcji, wzbudzenia i widmo emisji utlenionego chlorowodoru tiaminy.

Aby przygotować próbkę należy pobrać 2,5 ml warstwy organicznej (górną warstwę) roztworu o stężeniu 0,20 µg/ml i przenieść roztwór do kuwety kwarcowej wskazanej przez asystenta. Następnie korzystając z spektrofotometru i spektrofluorymetru zarejestrować wymagane widma. Postępować wg wskazówek instrukcji obsługi spektroskopów oraz wskazówek asystenta.

Zadanie: Wyznaczyć optymalną długość fali wzbudzenia λ_{EX} oraz emisji λ_{EM} .

6. Wykonanie pomiarów natężenia fluorescencji próbek wzorcowych i próbek do oznaczenia.

Pomiary natężenia fluorescencji należy wykonać zgodnie z instrukcją obsługi spektrofluorymetru oraz wskazówkami asystenta dla wzorcowych roztworów chlorowodoru tiaminy, roztworu próby badanej i roztworu badanego produktu.

Pobrać 2,5 ml warstwy organicznej (górną warstwę) i zmierzyć jej natężenie fluorescencji przy optymalnych długościach fali wzbudzenia. Pomiar natężenia fluorescencji dla próbki (SAMPLE) oraz dla próby badanej (X) należy powtórzyć 3 razy.

Zadanie: Wyniki pomiarów zestawić w tabeli.

ARKUSZ WYNIKÓW

Ćwiczenie 32.

Imiona i nazwiska wykonujących ćwiczenie:	Data i nr grupy:
---	------------------------------------

L.p.	Stężenie chlorowodorku tiaminy [µg/ml]	Natężenie fluorescencji I [A.U.]	Uwagi
1.	0,00		
2.	0,05		
3.	0,10		
4.	0,15		
6.	0,20		
7.	0,25		
8.	X		
9.	X		
10.	X		
11.	SAMPLE		
12.	SAMPLE		
13.	SAMPLE		

NOTATKI:

Wyniki przyjąłem

.....
data i podpis asystenta

OPIS DO ĆWICZENIA NR 2 [SZABLON]

Sprawozdanie z Ćwiczenia nr 2 Ciągła produkcja poli(alkoholu winylowego)	Data wykonania ćwiczenia:	
Asystent prowadzący ćwiczenie:	Data oddania sprawozdania:	
Imiona i nazwiska osób wykonujących ćwiczenie:		Nr grupy:
Uwagi asystenta:		

1. CEL ĆWICZENIA.

2. OPIS EKSPERYMENTU.

- Załączenie widm absorpcji, wzbudzenia i emisji dla utlenionego chlorowodoru tiaminy.
- Zwięzłe przedstawienie czynności wykonywanych podczas ćwiczenia.

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

- Równanie zachodzącej reakcji.
- Wykonanie wykresu kalibracyjnego natężenia fluorescencji od stężenie chlorowodoru tiaminy $f(C)=I$. Wyznaczenie równania wykresu i współczynnika R^2 .
- Odczytanie z wykresu (używając wyznaczonego w poprzednim punkcie równania) stężenie tiaminy w próbce X i próbce badanego produktu SAMPLE.
- Obliczenie błędu oznaczania dla próbki X
Błąd bezwzględny (ΔX) – bezwzględna wartość różnicy między wartością rzeczywistą (X^*) a wartością otrzymanego wyniku - zadanie (X).

$$\Delta X = |X^* - X|$$

Błąd względny ($\Delta X_{wzgl.}$) – wyraża stosunek wielkości błędu bezwzględnego (Δx) do mierzonej wartości rzeczywistej (X^*). Błąd względny jest wartością niemianowaną. Wyrażony w procentach ułatwia porównywanie wielkości błędów pomiędzy sobą.

4. DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI.

- Czy cel ćwiczenia został osiągnięty?
- Czy błąd oznaczenia był znaczący, a jeśli tak to czym było to spowodowane?
- Podczas jakich rzeczywistych procesów produkcyjnych używa się spektrofluorymetrii do oznaczania zawartości składników produktu?