

## Ćwiczenie nr B2

# OZNACZANIE ZAWARTOŚCI PROWITAMINY A W SUPLEMENTACH DIETY METODĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

### I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczanie zawartości  $\beta$ -karotenu metodą spektrofotometrii absorpcyjnej w suplementach diety:

1. Tabletki "Relastan Sun" (Novascon), 60 tabletek/800  $\mu$ g
2. Kapsułki "Beta-karoten" (WALMARK), 100 szt./6 mg

### II. Zagadnienia wprowadzające

1. Właściwości optyczne substancji
2. Absorpcja promieniowania elektromagnetycznego
3. Oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią
4. Prawa Lamberta-Beera
5. Charakterystyka  $\beta$ -karotenu

#### Literatura obowiązuująca:

1. E. Szyszko, *Instrumentalne metody analityczne*, PZWL, W-wa 1964
2. J. Minczewski, Z. Marczenko, *Chemia analityczna*, PWN, W-wa 1965
3. Praca zbiorowa, *Chemia Fizyczna*, PWN, W-wa 2001
4. G. M. Barrow, *Chemia fizyczna*, PWN, W-wa, 1973
5. E. Szymański, *Ćwiczenia laboratoryjne z chemii fizycznej*, Wyd. UMCS, Lublin 1991

## III. Część teoretyczna

### III. 1. Wprowadzenie

Oddziaływanie światła (rozumianego jako strumień fotonów) z materią (zbiorem atomów lub cząsteczek) wywołuje następujące zjawiska:

- emisję spontaniczną, w wyniku której foton emitowany jest samorzutnie przez wzbudzony atom,
- emisję wymuszoną, w wyniku której foton oddziałujący ze wzbudzonym atomem wymusza emisję identycznego fotonu przez ten atom,
- absorpcję, w wyniku której foton zostaje pochłonięty przez atom, a ten przechodzi w stan wzbudzony.

Aby światło było absorbowane przez materię energia fotonów musi odpowiadać różnicy energii poziomów energetycznych w atomach lub cząsteczkach, z którymi oddziałuje. Energia fotonów jest bezpośrednio związana z długością fali światła, inaczej mówiąc, z jego barwą. Wykorzystuje się to do identyfikacji nieznanymi substancji, badając absorpcję światła o różnych długościach fali przez daną substancję - jest to tzw. absorpcyjna analiza spektroskopowa.

Absorpcja (pochłanianie) światła przez daną substancję zależy zarówno od właściwości tej substancji (zdolności pochłaniania światła o danej długości fali) jak i jej stężenia. Pierwszy czynnik opisywany jest tzw. współczynnikiem absorpcji  $a$ , natomiast drugi (stężenie  $c$ ) - liczbą atomów lub cząsteczek znajdujących się w określonej objętości. Możemy to sobie wyobrazić na przykładzie barwnika rozpuszczonego w bezbarwnej cieczy (np. wodzie): roztwór taki będzie tym ciemniejszy (czyli tym bardziej będzie absorbował światło) im silniej sam barwnik absorbuje światło oraz im więcej barwnika rozpuścimy. Fakt ten pozwala mierzyć stężenia różnych substancji rozpuszczonych w cieczach (np. zanieczyszczeń wody) poprzez pomiar absorpcji światła.

Ilość materii, z którą oddziałuje światło zależy również od drogi, którą światło pokonuje w ośrodku. Jeśli światło przechodzi przez ośrodek o pewnej grubości, to im grubszy jest ten ośrodek, tym więcej światła zostanie zaabsorbowane.

Wielkością, która pozwala jednoznacznie określać „ilość światła”, jest jego natężenie. Natężenie światła definiujemy jako moc fali świetlnej padającej na jednostkę powierzchni. Zazwyczaj (to jest, nie przy bardzo dużych natężeniach światła) mamy do czynienia z tzw. liniową absorpcją światła, to znaczy - natężenie światła zaabsorbowanego przez ośrodek o danej grubości jest wprost proporcjonalne do natężenia światła padającego na ten ośrodek.

Analiza kolorymetryczna wykorzystuje zjawisko pochłaniania światła przez roztwory do ilościowego oznaczenia substancji barwnych, które mogą powstać w wyniku reakcji oznaczanego składnika z odpowiednim odczynnikiem. Jeżeli światło pochłanianie odpowiada długości fali z zakresu 400-760 nm, to roztwór pochłaniający jest barwny. Jak wspomniano wcześniej, intensywność zabarwienia zależy od stężenia roztworu i jest wykorzystywana do oznaczania ilości substancji rozpuszczonej w badanym roztworze. Istnieje wiele sposobów pomiaru intensywności zabarwienia roztworów. We wszystkich tych przypadkach wykorzystuje się te same prawa absorpcji światła przez roztwór.

### III. 2. Prawa absorpcji światła

Podczas badania pochłaniania światła przez roztwór, ten ostatni umieszcza się w przezroczystym naczyniu zwanym kuwetą. Najczęściej kuweta ma przekrój prostokątny a jej ścianki są do siebie równoległe. Jeżeli założymy, że na jedną ze ścianek kuwety pada strumień światła o natężeniu  $I$ , to światło to zostaje częściowo odbite od powierzchni kuwety ( $I_r$ ), częściowo zaabsorbowane przez substancję rozpuszczoną w roztworze znajdującym się w kuwecie ( $I_a$ ), a pozostała jego część ( $I$ ) przechodzi przez kuwetę z roztworem. Tak więc możemy przyjąć, że:

$$I_o = I + I_r + I_a \quad (1)$$

Ponieważ kuwety są wykonane z bardzo przezroczystych materiałów (szkło lub kwarc), to odbicie światła od powierzchni kuwet jest bardzo małe i można założyć, że  $I_r=0$ . Wówczas równanie (1) można uprościć do postaci:

$$I_o = I + I_a \quad (2)$$

Z wielkości występujących w tym równaniu, zmierzyć można  $I_o$  i  $I$ . Część światła, które zostało zaabsorbowane, można obliczyć z różnicy  $I_o - I$ .

Wcześniej zauważono, że pochłanianie światła zależy od grubości warstwy pochłaniającej. Podstawowym prawem formułującym tę zależność jest prawo podane przez Lamberta. Zgodnie z tym prawem, warstwy takiego samego roztworu o jednakowej grubości, w identycznych warunkach pochłaniają zawsze taką samą część padającego na nie promieniowania. Prawo Lamberta wyrażamy wzorem:

$$I = I_o e^{-al} \quad (3)$$

gdzie  $I$  oznacza natężenie promieniowania przepuszczonego,  $I_o$  to natężenie promieniowania padającego,  $l$  to grubość warstwy absorbującej,  $a$  jest współczynnikiem absorpcji charakterystycznym dla substancji pochłaniającej światło a  $e$  to podstawa logarytmów naturalnych.

Absorpcja światła zależy również od stężenia substancji absorbującej w roztworze. Beer, obserwując absorpcję światła przez roztwory barwne o różnym stężeniu stwierdził, że absorpcja światła jest proporcjonalna do stężenia substancji pochłaniającej w roztworze. Zależność między natężeniem ( $I_o$ ) światła padającego na warstwę roztworu o grubości  $l$  i stężeniu  $c$  można przedstawić wzorem:

$$I = I_o e^{-\epsilon'cl} \quad (4)$$

gdzie  $c$  to stężenie molowe substancji absorbującej światło w roztworze,  $l$  to grubość warstwy roztworu a  $\epsilon'$  to współczynnik absorpcji, charakterystyczny dla substancji. Równanie 4 oznacza, że natężenie światła przechodzącego przez próbkę roztworu ( $I$ ) uzależnione jest od grubości warstwy pochłaniającej ( $l$ ), od stężenia substancji pochłaniającej ( $c$ ), od natężenia promieniowania padającego na próbkę ( $I_o$ ) oraz właściwości substancji pochłaniającej ( $\epsilon'$ ). Równanie to jest znane jako prawo Lamberta-Beera.

Po przekształceniu powyższej zależności otrzymujemy:

$$\ln \frac{I}{I_o} = -\varepsilon'cl \quad (5)$$

lub:

$$\ln \frac{I_o}{I} = \varepsilon'cl \quad (6)$$

Wprowadzając logarytm dziesiętny otrzymujemy następującą zależność:

$$\log \frac{I_o}{I} = \varepsilon cl \quad (7),$$

w której  $c$  jest stężeniem molowym a  $\varepsilon$  to molowy współczynnik absorpcji (ekstynkacja).

Równanie (7) definiuje pojęcie absorpcji ( $A$ ):

$$A = \log \frac{I_o}{I} \quad (8)$$

Absorbancja  $A$  służy do ilościowego opisu zjawiska absorpcji promieniowania, czyli zmiany jego natężenia po przejściu przez jakiś ośrodek.

Łącząc równania (7) i (8) otrzymujemy zależność zwaną prawem Lamberta-Beera:

$$A = \varepsilon cl \quad (9)$$

Stosunek natężenia promieniowania przepuszczonego przez roztwór ( $I$ ) do natężenia promieniowania padającego ( $I_o$ ) na ten roztwór nazywamy transmitancją i oznaczamy jako  $T$ , czyli:

$$T = \frac{I}{I_o} \quad (10)$$

Z porównania równań (8) i (10) wynika, że

$$A = -\log T \quad (11)$$

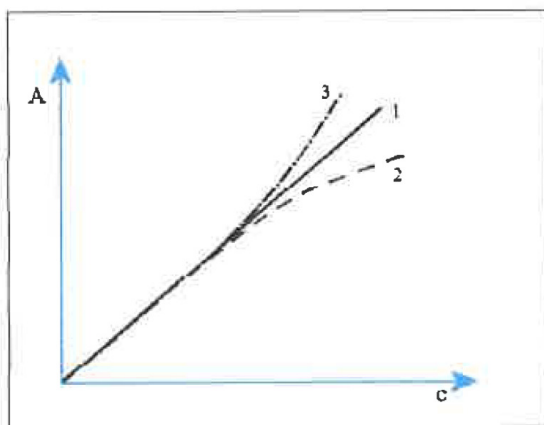
Prawo Lamberta-Beera odnosi się do przypadku, gdy w roztworze znajduje się jedna substancja absorbująca, światło jest monochromatyczne i skolimowane.

Prawo addytywności absorpcji dotyczy przypadku, gdy w próbce znajduje się  $n$  różnych substancji o stężeniach  $c_1, c_2, \dots$  i  $c_n$ , charakteryzujących się molowymi współczynnikami absorpcji  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots$  i  $\varepsilon_n$ . Absorbancja próbki jest wtedy równa sumie absorpcji jej poszczególnych składników:

$$A = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \dots + \varepsilon_n c_n l = \sum_i \varepsilon_i c_i l \quad (12)$$

Prawa dotyczące absorpcji światła przez roztwór są spełniane tylko wtedy, kiedy w tych roztworach nie zachodzą żadne reakcje między substancją absorbującą a rozpuszczalnikiem oraz między cząsteczkami substancji absorbującej. Gdy spełnione jest prawo Lamberta-Beera, zależność między absorpcją  $A$  i stężeniem roztworu  $c$  przedstawia linia prosta,

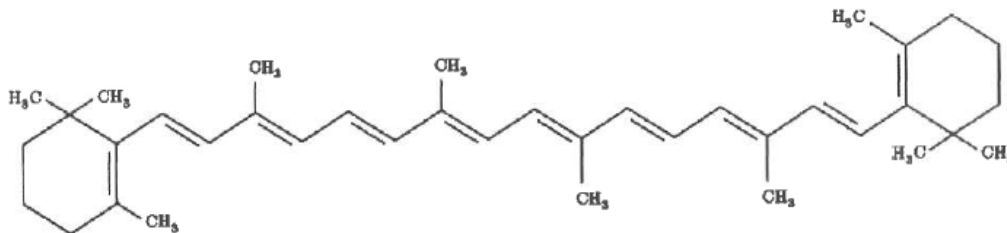
przechodząca przez początek układu współrzędnych (linia 1 na rysunku 1). Otrzymanie w wyniku pomiarów krzywych typu 2 lub 3 wskazuje, że układ w danych warunkach pomiarowych nie stosuje się do prawa Lamberta-Beera. Odstępstwa mogą być spowodowane albo zmianami chemicznymi zachodzącymi w roztworze, albo warunkami pomiaru wykonanego za pomocą nie dość precyzyjnego przyrządu. Chemiczne odstępstwa wynikają z reakcji przebiegających w roztworze w miarę wzrostu stężenia składnika oznaczanego. Mogą to być reakcje polimeryzacji lub kondensacji cząsteczek lub jonów absorbujących, reakcje między jonem (cząsteczką) absorbującym i rozpuszczalnikiem albo, w przypadku układów wieloskładnikowych, dodatkowe reakcje między poszczególnymi składnikami.



Rys. 1. Krzywe  $A = f(c)$  w zależności od stosowania lub niestosowania się układu do prawa Lamberta-Beera.

### III. 3. $\beta$ -karoten

Karoteny są barwnikami występującymi w żółtych i zielonych częściach roślin. Z materiału roślinnego ekstrahuje się je mieszaniną acetonu i eteru naftowego. W tych warunkach do wyciągu przechodzi  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -karoten, a ponadto chlorofil, ksantofil i likopen.  $\beta$ -karoten można oddzielić na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent eter naftowy. W suplementach diety najczęściej stosuje się  $\beta$ -karoten w postaci roztworu olejowego lub krystalicznej. Zawartość  $\beta$ -karotenu w uzyskanym roztworze oznacza się kolorymetrycznie. Krzywą wzorcową wykonuje się stosując jako wzorce wodne roztwory dichromianu potasowego o różnych stężeniach odpowiadających określonemu stężeniu  $\beta$ -karotenu.



Rys. 2. Struktura chemiczna  $\beta$ -karotenu.

## IV. Część doświadczalna

### IV. 1. Aparatura i odczynniki

#### 1. Aparatura:

- spektrofotometr
- wirówka
- kuwety o grubości  $d = 1 \text{ cm}$
- kolby miarowe o poj.  $10 \text{ cm}^3$  - 6 szt.
- kolba miarowa o poj.  $100 \text{ cm}^3$
- pipety miarowe o poj.  $2 \text{ cm}^3$  - 2 szt.
- pipety miarowe o poj.  $20 \text{ cm}^3$  - 3 szt.
- zlewki o poj.  $25 \text{ cm}^3$  - 2 szt.
- strzykawki - 2 szt.

#### 2. Odczynniki:

- krystaliczny dichromian potasu
- eter naftowy
- Tabletki "Relastan Sun" (Novascon), 60 tabletek /  $800 \mu\text{g}$
- Kapsułki "Beta-karoten" (Walmart), 100 szt. /  $6 \text{ mg}$

### IV. 2. Przygotowanie roztworów

1. Roztwór podstawowy dichromianu potasu o stężeniu  $0,72 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$

Odważyć  $0,72 \text{ g}$  krystalicznego dichromianu potasu i przenieść do kolby miarowej o pojemności  $100 \text{ cm}^3$ . Dopełnić wodą destylowaną do kreski.

2. Wykonanie roztworów do krzywej kalibracyjnej

- Do sześciu kolbek miarowych o pojemności  $10 \text{ cm}^3$  odmierzyć kolejno:  $0,2$ ;  $0,3$ ;  $0,4$ ;  $0,5$ ;  $0,8$  i  $1,0 \text{ cm}^3$  roztworu podstawowego i uzupełnić wodą destylowaną do kreski.
- Obliczyć stężenia dichromianu potasu w uzyskanych roztworach - wyrazić je w  $\text{mg}/\text{cm}^3$ .
- Zmierzyć wartości absorbancji dla każdego roztworu. Pomiar przeprowadza się za pomocą spektrofotometru Spekol, przy długości fali  $450 \text{ nm}$ , wobec wody jako odnośnika.

### IV. 3. Preparatyka kapsułki i pomiar absorbancji

#### UWAGA!

#### UŻYWAĆ SUCHYCH NACZYŃ, PIPET I KUWET!

**W przypadku gdy są one mokre należy przemyć je niewielką ilością acetonu i wysuszyć w strumieniu zimnego powietrza.**

1. Nalać do zlewki  $10 \text{ cm}^3$  eteru naftowego.
2. Kapsułkę o masie  $210 \text{ mg}$  przekłuć (OSTROŻNIE!) igłą ze strzykawką. Kapsułka powinna mieć dwa otwory. Przesunąć igłę tak, aby jej koniec znajdował się w kapsułce.

3. Włożyć kapsułkę do kolbki z eterem i kilka razy, poruszając tłokiem strzykawki, wypłukiwać zawartość kapsułki eterem z kolbki.
4. Zlać zawartość zlewki nr 1 zawierającej  $\beta$ -karoten do kolbki miarowej o pojemności  $25\text{ cm}^3$ . Kilka razy wypłukać zlewkę nr 1 niewielką ilością eteru. Łączna objętość ekstraktu eterowego nie może przekroczyć  $25\text{ cm}^3$ . Uzupełnić eterem kolbę do kreski.
5. Pobrać  $0,1\text{ cm}^3$  tak przygotowanego roztworu i przenieść do kolby miarowej o pojemności  $10\text{ cm}^3$ . Objętość kolby miarowej uzupełnić eterem do  $10\text{ cm}^3$  (roztwór rozcieńczony).
6. Zmierzyć wartość absorbancji końcowego roztworu  $\beta$ -karotenu (roztworu rozcieńczonego) na spektrofotometrze Spekol, przy długości fali  $450\text{ nm}$ , stosując jako odnośnik eter naftowy.
7. Pustą kapsułkę rozciąć i pozostawić do wyschnięcia. Zważyć suchą kapsułkę.

#### IV. 4. Preparatyka tabletki i pomiar absorbancji

1. Rozgniecioną tabletkę o masie ok.  $400\text{ mg}$  przenieść do kolby miarowej o pojemności  $25\text{ cm}^3$ . Zawartość zalać wodą o temperaturze  $30^\circ\text{C}$ . Wytrząsać aż do całkowitego przejścia barwnika do roztworu.
2. Pobrać  $1\text{ cm}^3$  zawiesiny i przenieść do probówki.
3. Probówkę umieścić w wirówce i wirować  $5\text{ minut}$ .
4. Otrzymany roztwór zlać do kolby miarowej o pojemności  $25\text{ cm}^3$  i dopełnić objętość kolby wodą destylowaną do kreski.
5. Zmierzyć absorbancję otrzymanego roztworu na spektrofotometrze, przy długości fali  $450\text{ nm}$ , wobec wody jako odnośnika.

#### IV. 5. Opracowanie wyników

Wiedząc, że roztwór wodny dichromianu potasu o stężeniu  $0,36\text{ mg/cm}^3$  odpowiada barwie eterowego roztworu  $\beta$ -karotenu o stężeniu  $2,08\text{ }\mu\text{g/cm}^3$ , uzupełnić dane w tabeli 1.

1. Na podstawie danych zawartych w tabeli 1 sporządzić krzywą kalibracyjną, tj. zależność absorbancji (roztworów dichromianu potasowego) od stężenia  $\beta$ -karotenu.
2. Obliczyć parametry regresji liniowej krzywej kalibracyjnej i wartość współczynnika dopasowania  $R^2$ .
3. Obliczyć zawartość  $\beta$ -karotenu w badanej próbce (w mg) uwzględniając rozcieńczenie roztworów.
4. Otrzymany wynik zawartości  $\beta$ -karotenu (w mg) przeliczyć na ekwiwalent witaminy A wiedząc, że  $10\text{ mg}$   $\beta$ -karotenu jest równe  $500\text{ }\mu\text{g}$  eqv. witaminy A.

**Tabela 1.** Skala wzorców do oznaczania  $\beta$ -karotenu.

Lp.	Objętość podstawowego roztworu dichromianu potasu [cm <sup>3</sup> ]	Stężenie dichromianu potasu [mg/ cm <sup>3</sup> ]	Odpowiadające wartości stężenia $\beta$ -karotenu [ $\mu$ g/ cm <sup>3</sup> ]	Absorbancja wodnych roztworów dichromianu potasu
1	0,2			
2	0,3			
3	0,4			
4	0,5			
5	0,8			
6	1,0			