

Лабораторна робота

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ТА ВІЗУАЛЬНО-ТЕСТОВЕ ВИЗНАЧЕННЯ ХАРЧОВОГО БАРВНИКА ДІАМАНТОВОГО СИНЬОГО (E133) З ВИКОРИСТАННЯМ ЖЕЛАТИНОВИХ ПЛІВОК

Мета роботи:

1. дослідити оптичні властивості діамантового синього у розчинах при різних рН та при різній концентрації барвника;
2. обрати оптимальні умови іммобілізації барвника у желатиновій матриці фотоплівки – склад і рН розчину, час вилучення;
3. запропонувати методикау твердофазно-спектрофотометричного та візуально-тестового визначення діамантового синього із використанням желатинової плівки;
4. провести тестування реального зразку

1. Загальні відомості

Діамантовий синій FCF, або E133, відноситься до синтетичних харчових барвників, які надають продукції синій колір та є дозволеними до використання. Діамантовий синій застосовують при виробництві безалкогольних напоїв, морозива, кондитерських виробів, випічки і всіляких солодоців.

Необхідність аналітичного контролю синтетичних барвників пов'язана з негативним впливом їхнього великого вмісту на організм людини; практично всі барвники небезпечні і мають різний ступінь токсичності (можуть проявляти властивості алергенів, мутагенів, канцерогенів). Допустимий добовий рівень E133 становить 6,0 мг на один кг маси споживача; це значення можна прийняти за гранично допустиму концентрацію – ГДК. Синтетичні барвники можуть містити шкідливі побічні продукти синтезу; відомо, що основна забарвлююча сполука в реактиві найчастіше складає 80%.

Діамантовий синій FCF належить до класу триарилметанових барвників та має структурну формулу, що представлена на рисунку 1; хімічну формулу $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$; молярну масу – 792,85 г/моль; являє собою червоно-синій

порошок. Барвник розчиняється у воді (розчинність 20 г / 100 г) з утворенням синього розчину.

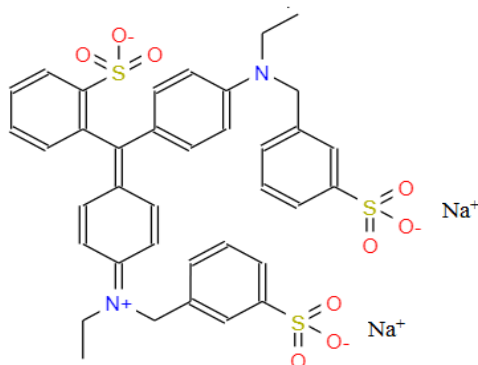


Рисунок 1. Структурна формула барвника діамантового синього FCF (E133)

Діамантовий синій існує у чотирьох рівноважних різнозарядних протонованих формах (рис. 2). Усі форми забарвлені у синій колір.

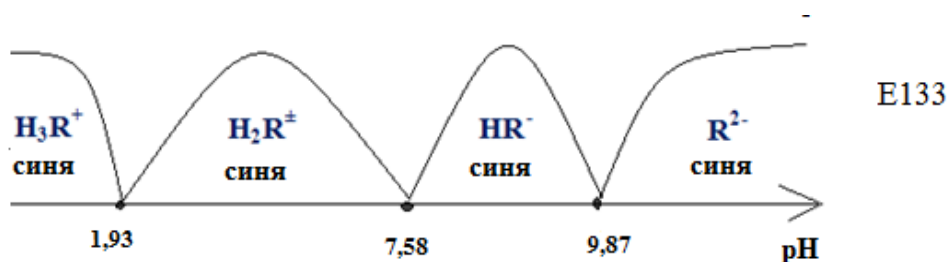


Рисунок 2. Діаграма областей переважання протонованих форм діамантового синього

У роботі запропоновано використовувати як сорбент комерційні фотографічні плівки фірми AGFA, з яких попередньо були видалені галогеніди срібла.

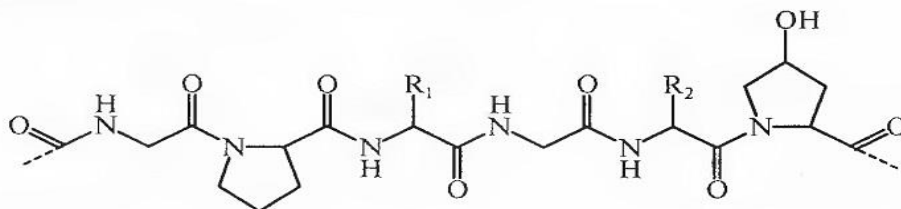


Рисунок 3. Фрагмент структурної формули молекули желатина

Відомо, що желатин — амфоліт, має ізоелектричну точку (ІЕТ) і проявляє властивості, подібні властивостям поверхнево-активних речовин. Значення рН в ІЕТ отверділого желатина дорівнює 4,5. При рН нижче 4,5 сумарний сітковий заряд

желатинової матриці позитивний, а при рН вище 4,5 – негативний. Плівки оптично позорі, їх можна фотометрувати

2. Реактиви, матеріали, розчини та обладнання

- діамантовий синій FCF, чда (ТМ «ЛЕВ-Україна»);
- розчин хлоридної кислоти, $c = 0,10$ моль/л;
- розчин оцтової кислоти, $c = 1,0$ моль/л;
- розчин натрій гідроксиду, $c = 1,0$ моль/л;
- розчин хлорної кислоти, $c = 0,10$ моль/л;
- стандартні буферні розчини з рН 1,68; 4,01; 6,86; 9,18;
- фотографічна плівка для офсетного друку фірми «AGFA», з якої за допомогою комерційних розчинів «AGFA Graphics» попередньо були видалені галогеніди срібла (товщина плівок ~ 20 мкм, розмір $2,5 \times 3,5$ см);
- мірні колби на 25, 50, 100 мл;
- піпетки місткістю 1, 2, 5, 10 мл;
- хімічні стакани;
- чашки Петрі;
- пінцет;
- ваги аналітичні ВЛР-200;
- спектрофотометр Hitachi U2000;
- рН-метр 150 МА з комбінованим скляним електродом ЕСКЛ 08М.1;
- дистильована вода; фільтрувальний папір.

3. Приготування водних розчинів барвника з концентрацією

$5 \cdot 10^{-3}$ моль/л і $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

3.1. Початковий водний розчин барвника з концентрацією $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л готують по точній наважці у мірній колбі місткістю 250,0 мл.

Обчислюють наважку барвника, необхідну для приготування 250,0 мл розчину із заданою концентрацією, враховуючи молярну масу барвника:

$$m(\text{барвника}) = \underline{\hspace{10em}} \text{ г.}$$

Наважку зважують у стаканчику на аналітичних вагах, кількісно переносять у мірну колбу та розчиняють у невеликій кількості дистильованої води, доводять до мітки водою та ретельно перемішують.

3.2. Робочий розчин барвника з концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л готують із початкового розчину шляхом розведення.

Опишіть послідовність приготування 250 мл робочого розчину із заданою концентрацією

4. Градування рН-метричної комірки з комбінованим електродом за буферними розчинами

Для іонометричних вимірювань використовували комбінований скляний електрод, який має таку конструкцію:

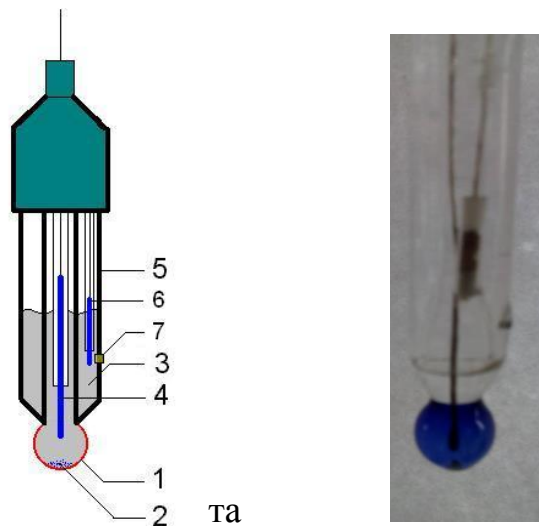


Рисунок 4. Конструкція комбінованого скляного електроду для виміру рН

1. напівпроникна мембрана, виготовлена із спеціального скла;
2. крупинки твердого AgCl ;
3. всередині «кульки» (на рисунку ПОМИЛКА) розчин $0,1$ моль/л HCl ;
4. струмовідвідний хлоридсрібний електрод;
5. корпус електроду, виготовлена зі звичайного скла;
6. електрод порівняння (хлоридсрібний електрод), занурений у розчин $3,5$ моль/л KCl ;

7. проникна мембрана — контакт з досліджуваним розчином.

Під час вимірювань електрод занурюють у розчини так, щоб він не торкався стінок стакану, а місце контакту з електролітичним ключем знаходилося у розчині.

Вимірювальна комірка:



Аналітичний сигнал: $E \equiv \Delta E = E_{\text{иЭ}} - E_{\text{ЭП}} + E_{\text{диф}}$

Градувальна характеристика: $E = E^{\ominus} + \theta \lg c(\text{H}^+)$ АБО

$$E = E^{\ominus} - \theta \text{pH}$$

Для градування використовують стандартні буферні розчини такого складу:

pH = 1,68 — розчин «калію тетраоксалату» — калій тригідрооксалату дигідрату $\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{KHC}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) з концентрацією 0,05 моль/л;

pH = 4,01 — розчин калію гідрофтالاتу $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ (KHFt) з концентрацією 0,05 моль/л;

pH = 6,86 — розчин, що містить 0,025 моль/л калію дигідрофосфату KH_2PO_4 і 0,025 моль/л натрію гідрофосфату Na_2HPO_4 ;

pH = 9,18 — розчин декагідрату натрію тетраборату $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ з концентрацією 0,01 моль/л.

На підставі результатів вимірювань ЕРС (табл. 1) необхідно:

- *побудувати градувальний графік,*
- *отримати рівняння градувальної залежності,*
- *визначити градувальні параметри E^{\ominus} та θ ,*
- *записати формулу для обчислення pH в досліджуваних розчинах.*

Таблиця 1. Результати вимірювання ЕРС в градувальних розчинах

pH	1,68	4,01	6,86	9,18
E, мВ	148	6	-153	-294

5. Вивчення впливу pH на оптичні властивості водних розчинів барвника

Готують розчини діамантового синього з концентрацією $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л та різними значеннями рН: 1,0; 3,0; 5,0; 8,5; 11,0; 13,5.

Значення рН 1,0 та 3,0 створюють додаванням необхідної аліквоти хлоридної кислоти, рН 5,0 – ацетатним буферним розчином, рН 8,5 – боратним буферним розчином, рН 11,0 та 13,5 – розчином лугу (NaOH).

Опишіть послідовність приготування 100 мл кожного розчину із заданими значеннями рН і концентрацією барвника.

Розчини фотометрують у скляних кюветах з $l = 1$ см, у видимій частині спектру, у діапазоні довжин хвиль $\lambda = 350-700$ нм, відносно води. Результати вимірювань заносять у таблицю №2.

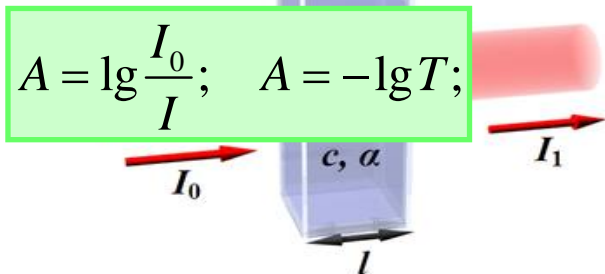
На фотографіях представлений зовнішній вигляд спектрофотометра Hitachi U2000, кюветне відділення приладу та кювети для вимірювання.





В основі вимірювань лежить закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$



$$T = I / I_0$$

T – пропускання

A - світлопоглинання (поглинання, оптична щільність)

c – молярна концентрація, моль/л

l - довжина поглинаючого шару, см

ε -коефіцієнт молярного поглинання, л·см/моль

Таблиця 2. Результати вимірювання світлопоглинання розчинів діамантового синього з різним значенням рН

λ , нм	рН					
	1,0	3,0	5,0	8,5	11,0	13,5
350	0,020	0,016	0,020	0,023	0,017	0,017
360	0,035	0,026	0,028	0,038	0,022	0,019
370	0,048	0,038	0,037	0,052	0,032	0,027
380	0,061	0,055	0,048	0,067	0,048	0,043
390	0,074	0,062	0,056	0,082	0,059	0,054
400	0,093	0,071	0,068	0,102	0,068	0,063
410	0,100	0,088	0,074	0,113	0,085	0,080
420	0,090	0,074	0,054	0,095	0,065	0,062
430	0,076	0,058	0,043	0,073	0,057	0,052
440	0,063	0,047	0,035	0,048	0,044	0,038
450	0,044	0,039	0,019	0,031	0,034	0,029
460	0,032	0,020	0,015	0,020	0,019	0,024
470	0,020	0,018	0,026	0,018	0,018	0,020
560	0,031	0,029	0,068	0,019	0,022	0,019
570	0,065	0,051	0,113	0,100	0,043	0,044
580	0,095	0,099	0,210	0,210	0,090	0,120
590	0,130	0,200	0,360	0,390	0,192	0,210
600	0,290	0,330	0,430	0,510	0,300	0,270
610	0,370	0,480	0,500	0,650	0,420	0,370
620	0,460	0,620	0,660	0,870	0,590	0,530
630	0,550	0,780	0,820	1,100	0,700	0,650
640	0,440	0,590	0,620	0,800	0,520	0,500
650	0,350	0,460	0,480	0,630	0,400	0,350
660	0,240	0,350	0,370	0,490	0,310	0,220
670	0,180	0,240	0,250	0,240	0,230	0,150
680	0,100	0,089	0,120	0,100	0,080	0,088
690	0,085	0,060	0,054	0,065	0,058	0,050
700	0,055	0,043	0,028	0,026	0,032	0,023

Побудуйте спектри поглинання барвника при різних значеннях рН та зробіть висновки щодо положення максимумів світлопоглинання та їхньої інтенсивності. Оберіть значення рН для подальшого спектрофотометричного визначення барвника у розчинах.

6. Вивчення залежності світлопоглинання розчинів барвника від його концентрації

Готують серію розчинів з $\text{pH} = 2,5$ і різною концентрацією діамантового синього. Значення рН у розчинах створюють за допомогою хлоридної кислоти. Розчини фотометрують у видимій області спектру при обраній в п. 5 довжині хвилі.

Опишіть послідовність приготування 50 мл кожного розчину із заданими значеннями рН і концентрацією барвника та заповніть таблицю №2.

На підставі результатів вимірювань, наведених у таблиці:

- побудувати графічну залежність світлопоглинання розчинів від концентрації ДС (градуювальний графік),*
- отримати рівняння градуувальної залежності,*
- переконатися, що залежність має лінійний характер,*
- уточніть діапазон концентрацій барвника, у якому лінійність залежності зберігається,*
- дані внесіть в таблицю №3*

Таблиця 2. Результати дослідження залежності світлопоглинання розчинів діамантового синього (ДС) від його концентрації у розчинах

($V(\text{розчину}) = 50 \text{ мл}$, $c(\text{HCl})_0 = 0,1 \text{ моль/л}$,)

№ розчину	Схема приготування розчинів				Світлопоглинання розчинів при $\lambda = \text{--- нм}$
	$c(\text{ДС})$, моль/л	$c(\text{ДС})_0$, моль/л	$V(\text{ДС})_0$, мл	$V(\text{HCl})$, мл	
1	$1 \cdot 10^{-6}$				0,092
2	$5 \cdot 10^{-6}$				0,468
3	$7 \cdot 10^{-6}$				0,649
4	$10 \cdot 10^{-6}$				0,868
5	$20 \cdot 10^{-6}$				1,684

Таблиця 3. Характеристики градуовальної залежності для спектрофотометричного визначення діамантового синього

Діапазон вмісту, що визначається, Δc , 10^{-6} моль/л	Рівняння градуовальної залежності (n=5, P=0,95)

7. Вибір оптимальних умов іммобілізації діамантового синього в желатиновій плівці

Вибір оптимального значення рН

Виходячи з даних діаграми областей переважання окремих протонованих форм барвника зробіть висновок щодо оптимального діапазону рН для іммобілізації діамантового синього у желатиновій плівці.

Для вибору оптимального значення рН у розчині при вилученні барвника в плівку готують серію розчинів з концентрацією ДС $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л та різним

значенням рН (від 1 до 5). Значення рН 1–3 у розчинах створюють за допомогою НСІ, значення рН 4–5 підтримують за допомогою ацетатних буферних розчинів.

Розчини виливають у чашки Петрі, у них занурюють безбарвні зразки плівок на 30 хв. За допомогою пінцету плівки виймали з розчину і сушать на повітрі. Після висушування плівки фотометрують при $\lambda_{\max} = 638$ нм. Результати вимірювань наведені у таблиці №4.

Таблиця 4. Результати дослідження залежності світлопоглинання желатинових плівок з іммобілізованим барвником від рН розчину

№ розчину	рН	A
1	1,0	0,004
2	1,5	0,022
3	2,0	0,046
4	2,5	0,307
5	3,0	0,223
6	4,0	0,125
7	5,0	0,021

Побудуйте залежність світлопоглинання плівок (A) від рН розчину та зробіть висновок щодо оптимального значення рН для вилучення барвника у плівку.

Вибір часу встановлення гетерофазної рівноваги

При обраному значенні рН плівки витримують в розчинах барвників від 5 до 40 хв. Після висушування плівки фотометрують при $\lambda_{\max} = 638$ нм.

Результати вимірювань наведені у таблиці №5.

Побудуйте кінетичну залежність A від t, яка є ізотермою сорбції барвника в желатиновій матриці та встановіть оптимальний час вилучення барвника у плівку.

Таблиця 5. Результати дослідження залежності світлопоглинання желатинових плівок з іммобілізованим барвником від часу витримання плівок у розчині

№ розчину	Час, t, хв	A
1	5	0,123
2	10	0,175
3	15	0,231
4	20	0,268
5	25	0,261
6	30	0,267
7	40	0,270

8. Вивчення залежності світлопоглинання модифікованих плівок від концентрації барвника у розчині

Готують серію розчинів з рН = 2,5 і різною концентрацією діамантового синього. Значення рН у розчинах створюють за допомогою хлоридної кислоти (схему приготування розчинів див. у п. 6).

У розчини занурюють безбарвні зразки плівок на 20 хв, після висушування плівки фотометрують при $\lambda_{\max} = 638$ нм.

На підставі результатів вимірювань, наведених у таблиці №6:

- побудувати графічну залежність світлопоглинання модифікованих плівок від концентрації ДС у розчині (градувальний графік),
- отримати рівняння градувальної залежності,
- переконатися, що залежність має лінійний характер,
- уточніть діапазон концентрацій барвника, у якому лінійність залежності зберігається,
- дані внесіть в таблицю №7

Таблиця 6. Результати дослідження залежності світлопоглинання желатинових плівок з іммобілізованим діамантовим синім (ДС) від його концентрації у розчинах (рН = 2,5)

№ розчину	c(ДС) у розчині, моль/л	Світлопоглинання модифікованих плівок
1	$5 \cdot 10^{-6}$	0,041
2	$7 \cdot 10^{-6}$	0,076
3	$10 \cdot 10^{-6}$	0,102
4	$20 \cdot 10^{-6}$	0,204
5	$30 \cdot 10^{-6}$	0,300
6	$40 \cdot 10^{-6}$	0,412
7	$50 \cdot 10^{-6}$	0,521
8	$60 \cdot 10^{-6}$	0,632
9	$70 \cdot 10^{-6}$	0,802

Таблиця 7. Характеристики градуувальної залежності для твердофазно-спектрофотометричного визначення діамантового синього з використанням желатинових плівок

Діапазон вмісту, що визначається, Дс, 10^{-5} моль/л	Рівняння градуувальної залежності (n=9, P=0,95)

9. Візуально-тестове визначення діамантового синього

Для кількісного визначення вмісту діамантового синього можна використовувати колірну шкалу, яка представляє собою набір тест-зразків, кожен з яких відповідає певній відомій концентрації барвника у розчині.

Було встановлено, що при концентрації барвника у розчині нижче $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л отримати плівки блакитного кольору, які добре б сприймалися оком, не вдалося. Тому значення концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л можна прийняли за характеристику нижньої межі діапазону визначаємого вмісту ДС і з цієї концентрації почати побудову колірної шкали.

Запропонуйте варіант колірної шкали з коефіцієнтом геометричної прогресії $q=2$

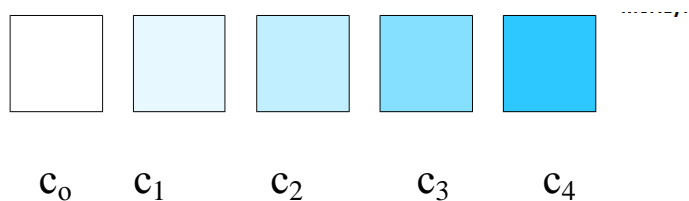


Рисунок 5. Колірна шкала для визначення барвника E133

10. Твердофазно-спектрофотометричне визначення вмісту E133 у безалкогольному напої

У якості об'єкта аналізу було обрано безалкогольний негазований напій «4move», який представляє собою непрозору рідину синього кольору. У складі напою виробники вказали наявність синього харчового барвника E133, однак вміст барвника не регламентували. Напій каламутний, тому пряме спектрофотометричне визначення барвника (без спеціальних прийомів фільтрування розчину) не можливо. В цьому випадку доречно використовувати твердофазно-спектрофотометричне визначення барвника.

У трьох пробах напою встановлюють необхідне значення $pH=2,5$, додаючи декілька крапель розчину 3 моль/л HCl. Значення pH контролюють потенціометрично.

В отримані розчини занурюють безбарвні зразки плівок на 20 хв, висушують на повітрі та фотометрують при $\lambda_{max}=638$ нм. Результати вимірювань наведено у таблиці №8:

По рівнянню градувальної залежності (табл. №7) обчисліть концентрацію барвника у вихідній пробі, результати обчислень занесіть у таблицю №8.

Правильність визначення вмісту барвника перевіряють методом «введено – знайдено». Для цього у досліджуваній розчин об'ємом 50 мл при рН 2,5 вносять 1 мл вихідного розчину діамантового синього з концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

В отримані розчини занурюють на 20 хв нові зразки безбарвної плівки, висушують на повітрі та фотометрують при $\lambda_{\max}=638$ нм. Результати вимірювань наведено у таблиці №8:

Обчисліть концентрацію E133 у напої згідно рівняння градувальної залежності. Переконайтеся у правильності отриманих результатів визначення.

Таблиця 8. Результати твердофазно-спектрофотометричного визначення вмісту барвника E133 у безалкогольному напої (P=0,95, n=3)

$c(\text{ДС})_{\text{введено}},$ $10^{-5}, \text{ моль/л}$	A	$c(\text{ДС})_{\text{знайдено}},$ $10^{-5}, \text{ моль/л}$	$c_{\text{середн}},$ $10^{-5}, \text{ моль/л}$
0	0,115		
	0,111		
	0,111		
1,0	0,226		
	0,233		
	0,227		

Виходячи зі значення ГДК для E133 (6,0 мг на один кг маси споживача) впливає, що для середньостатистичної людини масою близько 70 кг рівень допустимого добового споживання барвника не повинен перевищувати 420 мг.

Встановіть, чи безпечно вживати цей напій?

11. Візуально-тестове визначення вмісту E133 у безалкогольному напої

Отриману колірну шкалу для діамантового синього (п. 9) використовують для візуально-тестового визначення вмісту барвника у безалкогольному напої «4move». В якості контрольних використовують ті ж самі модифіковані плівки, які були досліджені методом твердофазної спектрофотометрії.

Тестування полягає у тому, що спостерігачі повинні порівнювати колір контрольних зразків зі шкалою. Результати визначень наведено у таблиці №9.

Оцініть вміст барвника та діапазон розкиду результатів

Чи узгоджуються результати визначення вмісту барвника у безалкогольному напої твердофазно-спектрофотометричним та візуально-тестовим методами?

Таблиця 9. Результати візуально-тестового визначення вмісту барвника E133 у безалкогольному напої (n=15)

Результати визначення $c, 10^{-5}$, моль/л	Число визначень	$c_{\text{сер}}, 10^{-5}$, моль/л	Інтервал розкиду результатів визначення, 10^{-5} , моль/л
0,75	3		
1,0	8		
1,5	4		