LABORATORIUM 6

ZIELONA CHEMIA KOORDYNACYJNA – ILOŚCIOWE WYZNACZANIE ZAWARTOŚCI ŻELAZA W PREPARACIE FARMACEUTYCZNYM

WPROWADZENIE LITERATUROWE

Aby wykorzystać do analizy chemicznej technikę spektrofotometrii UV-Vis, analizowana próbka (analit) musi absorbować światło w zakresie UV-vis (200-800 nm), którego ilość jest proporcjonalna do stężenia analitu zgodnie z prawem Beera-Lamberta:

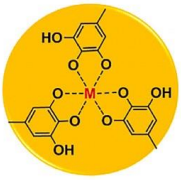
$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Gdzie:

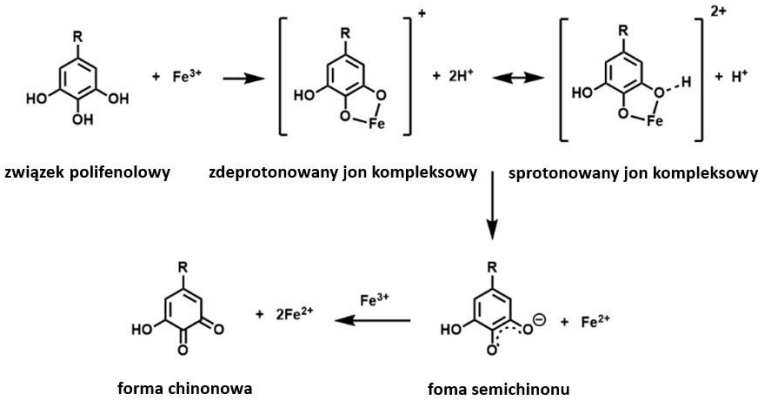
A to absorbancja,
ε [$M \cdot cm^{-1}$] to molowy współczynnik absorpcji specyficzny dla każdej substancji,
l [cm] to długość drogi optycznej (szerokość kuwety pomiarowej),
c [M] to stężenie analitu.

W przypadku, gdy analit nie absorbuje lub bardzo słabo absorbuje promieniowanie w obszarze UV-Vis, konieczne jest przekształcenie go w pochodną chromogenną, która może pochłaniać promieniowanie w tym zakresie. Na przykład, aby oznaczyć zawartość jonów Fe(II) w badanej próbce, dodaje się do niej 1,10-fenantrolinę (ligand), która tworzy z jonami żelaza(II) pomarańczowo-czerwony związek koordynacyjny, którego maksimum absorbcji występuje przy długości fali 510 nm. Należy jednak pamiętać, że ligand ten nie powinien być wykorzystywany do badań próbek biologicznych ze względu na jego toksyczne właściwości w odniesieniu do organizmów żywych (ludzie, zwierzęta, a także ekosystemy wodne).

Zielona chemia to dziedzina chemii i inżynierii chemicznej, której celem jest projektowanie procesów chemicznych (synteza, analiza), przy minimalnym zużyciu i wytwarzaniu niebezpiecznych substancji. Jednym z takich sposobów jest zastąpienie toksycznych chemikaliów poprzez ich bezpieczniejsze odpowiedniki lub zastosowanie metod alternatywnych.



Katechiny to związki polifenolowe obficie występujące w herbacie. Niektóre z nich, takie jak np. galusan epikatechiny, posiadają w swojej strukturze 3 grupy hydroksylowe, które biorą udział w tworzeniu chelatowych kompleksów z jonami żelaza(III) (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat reakcji jonów żelaza(III) ze związkiem polifenolowym.

W tym doświadczeniu jako czynnik chromogenny zastosowano naturalny odczynnik (związki polifenolowe) wyekstrahowany z liści herbaty. Roztwór ekstraktu z liści herbaty tworzy barwne kompleksy zarówno z jonami Fe(II), jak i Fe(III), przy czym te ostatnie wykazują wyższą wartość molowego współczynnika absorpcji. Pojawienie się barwy jest wynikiem utworzenia związku koordynacyjnego z jonami Fe(III) przy udziale dwóch wicynalnie skonfigurowanych grup hydroksylowych związku polifenolowego.

CEL BADAWCZY

- Podkreślenie roli „zielonej chemii" i wpływu toksycznych chemikaliów na środowisko i zdrowie człowieka.
- Ilościowe oznaczenie zawartości jonów żelaza(III) w badanym preparacie z wykorzystaniem absorpcyjnej spektrofotometrii w zakresie światła widzialnego.
- Przygotowanie serii roztworów wzorcowych w celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej.
- Wykorzystanie procesu kompleksowania oznaczanych jonów żelaza(III) do analizy, przy użyciu ekstraktu z herbaty jako czynnika chromogennego.
- Oznaczenie zawartości jonów żelaza w analizowanej próbce farmaceutyku.

DO SAMODZIELNEGO PRZYGOTOWANIA

MATERIAŁ DO OPANOWANIA: Fizykochemiczne właściwości żelaza, związki koordynacyjne żelaza, rola i znaczenie biologiczne jonów żelaza, źródła jonów żelaza w diecie, skutki niedoboru żelaza w organizmie człowieka, spektrofotometria UV-Vis, metoda krzywej wzorcowej, zasady zielonej chemii i przykłady ich zastosowania.

PLAN PRACY W LABORATORIUM: w oparciu o szczegółową instrukcję do **LABORATORIUM** przygotować w formie notatek (indywidualny dziennik/zeszyt Studenta) spis szkła laboratoryjnego oraz odczynników niezbędnych do przeprowadzenia eksperymentu.

UWAGA: wszystkie notatki z powyższej listy **POWINNY** być przedstawione (poddane sprawdzeniu) Prowadzącemu **PRZED** przystąpieniem do pisania kolokwium z materiału **LABORATORIUM**!

INSTRUKCJE DO LABORATORIUM 6

ZIELONA CHEMIA KOORDYNACYJNA - ANALIZA ILOŚCIOWA ŻELAZA W PREPARACIE FARMACEUTYCZNYM

1. BUFOR OCTANOWY O pH 4,8

Przygotować 0,2 M bufor octanowy o pH 4,8 rozpuszczając w dużej zlewce (1000 ml) 14,42 g uwodnionego octanu sodu ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) lub 8,693 g bezwodnego (CH_3COONa) w około 800 ml wody dejonizowanej, dodając 5,45 ml stężonego kwasu octowego (CH_3COOH). Zlewkę umieścić na mieszadle magnetycznym i dobrze mieszając sprawdzić pH tak przygotowanego buforu za pomocą papierka wskaźnikowego lub pH-metru. W razie potrzeby dostosować pH za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego (HCl) lub wodorotlenku sodu (NaOH). Na koniec dostosować objętość roztworu buforowego do 1000 ml w kolbie miarowej, używając wody dejonizowanej. Przygotowany bufor przelać do zakręcanej butelki 1000 ml. Sprawdzić pH otrzymanego buforu, które powinno wynosić ok. 4,8. Podpisać butlę jako ***BUFOR OCTANOWY.***

Uwaga! Pracę ze stężonym kwasem octowym (CH_3COOH) powinno się wykonywać pod dygestorium z zachowaniem zasad bezpieczeństwa!

2. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW ŻELAZA(III) DO KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ

Przygotować pięć kolb miarowych (25 ml) i odpowiednio je podpisać. Przygotować w nich serię roztworów roboczych Fe(III) o stężeniach odpowiednio: 10, 20, 30, 40 i 50 mg/dm^3 poprzez rozcieńczanie odpowiedniej objętości ***WZORCA ROBOCZEGO*** (o stężeniu 250 mg/dm^3) i uzupełnianie do kreski ***BUFOREM OCTANOWYM***. Wszystkie obliczenia przygotować w dzienniku laboratoryjnym, a otrzymane wartości zapisać w Tabeli 1.

3. PRZYGOTOWANIE CHROMOFORU KOMPLEKSUJĄCEGO JONY Fe(III) (EKSTRAKT Z HERBATY)

Do zlewki (250 ml) włożyć torebkę herbaty *Lipton Black Tea*, którą kolejno zalać 50 ml gorącej wody dejonizowanej i zaparzać ją przez 10 minut. Po tym czasie wyjąć torebkę ze zlewki, a jej zawartość rozcieńczyć ***BUFOREM OCTANOWYM*** do objętości ok. 250 ml. Zlewkę podpisać: ***ROZTWÓR CHROMOFORA***

4. PRZYGOTOWANIE PRÓBKI ZAWIERAJĄCEJ TABLETKĘ SUPLEMENTU/LEKU/FARMACEUTYKU

Produkt/y leczniczy/e do analizy wskazuje Prowadzący!

INFORMACJE WSTĘPNE

Przed przystąpieniem do przygotowania roztworu analizowanej próbki zapisać w raporcie (Tabela 2) szczegółowe informacje o farmaceutyku, takie jak nazwa, producent, numer partii, właściwości fizyczne produktu (kolor, kapsułka lub pigułka), ilość żelaza w tabletce, a także inne składniki wymienione na etykiecie produktu.

PRZYGOTOWANIE ROZTWORU PRÓBKI DO ANALIZY

Uwaga! Praca ze stężonym kwasem solnym (HCl) oraz nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) musi odbywać się pod wyciągiem z zachowaniem zasad bezpieczeństwa!

1. Zważyć dwie tabletki otrzymanego preparatu i zapisać w Tabeli 2 średnią masę jednej tabletki.
2. Rozetrzeć tabletki w moździerzu.
3. Odważyć do analizy (na wadze analitycznej, w naczynku wagowym) ilość roztartego proszku odpowiadającą mniej więcej masie jednej tabletki. Zapisać w Tabeli 1 (z dokładnością do 4-go miejsca po przecinku) odważoną masę.

4. Przenieść ilościowo odważoną porcję preparatu do zlewki (250 ml) zużywając na przepłukanie naczynka wagowego nie więcej niż 50 ml wody dejonizowanej. Dodać do zlewki 2 ml stęż. HCl, przykryć szkiełkiem zegarkowym i całość ogrzewać na palniku przez 1 godzinę. Roztwór powinien się zagotować (trawienie).
5. Po ostudzeniu strawionej próbki przefiltrować ją ilościowo do kolby miarowej (100 ml) i dopełnić kolbę do kreski za pomocą ***BUFORU OCTANOWEGO***. Podpisać kolbę.
6. Przenieść 1 ml roztworu przygotowanego w pkt. 5 do kolby miarowej (25 ml), dodać 0,5 ml 30% nadtlenku wodoru (H_2O_2) i całość mieszać ręcznie do momentu zaniku wydzielających się pęcherzyków gazu. Następnie dopełnić roztwór do kreski za pomocą ***BUFORU OCTANOWEGO*** i pozostawić na 15 min, aby zapewnić całkowite utlenianie Fe(II) do Fe(III).

5. POMIAR ABSORBANCJI ROZTWORÓW WZORCOWYCH CHROMOFOR-Fe(III)

Włączyć spektrofotometr jednowiązkowy (spekol) na około 10 minut przed rozpoczęciem pomiarów, a w tym czasie zapoznać się z instrukcją jego obsługi.

ABSORBANCJA ŚLEPEJ PRÓBY

1. Ustawić spekol na wybraną długość fali (570 nm).
2. Wstawić do urządzenia kuwetę napełnioną buforem octanowym (odnośnik) i wykonać pomiar absorbancji (linia bazowa).
3. Przygotować **roztwór-0** (próbka nie zawierająca żelaza) poprzez wymieszanie w zlewce (25 ml) 10 ml ***ROZTWORU CHROMOFORA*** (ekstrakt herbaciany) z 5 ml ***BUFORU OCTANOWEGO***. Po wymieszaniu odmierzyć do kuwety 3 ml otrzymanej mieszaniny, włączyć stoper i po 3 minutach wykonać pomiar absorbancji **roztworu-0**, a otrzymany wynik zapisać w Tabeli 3.

ABSORBANCJA ROZTWORÓW WZORCOWYCH (KRZYWA KALIBRACYJNA)

4. Przygotować **roztwór-1** poprzez wymieszanie w zlewce (25 m) 10,00 ml ***ROZTWORU CHROMOFORA*** (ekstrakt z herbaty) z 5,00 ml roztworu Fe(III) o danym stężeniu. Po wymieszaniu odmierzyć do kuwety 3 ml otrzymanej mieszaniny, włączyć stoper i po 3 minutach wykonać pomiar absorbancji **roztworu-1**, a otrzymany wynik zapisać w Tabeli 3.
5. Tę samą procedurę zastosować w przypadku pozostałych **roztworów 2 – 5** zawierających Fe(III) o znanych stężeniach (20, 30, 40 i 50 mg/dm^3)

6. POMIAR ABSORBANCJI ROZTWORÓW PRÓBKI/PRÓBEK O NIEZNANEJ ZAWARTOŚCI ŻELAZA

1. Przygotować ślepą próbę poprzez wymieszanie w zlewce (25 ml) 5 ml roztworu badanej próbki (leku lub suplementu) z 10 ml ***BUFORU OCTANOWEGO***. Całość dobrze wymieszać, włączyć stoper w momencie mieszania, odmierzyć do kuwety 3 ml tak otrzymanego roztworu, włożyć ją do spekola i po upływie 3 minut zarejestrować wartość absorbancji. Otrzymany wynik zapisać wynik w Tabeli 3.
2. Pomiar absorbancji żelaza w roztworze badanej próbki wykonać dokładnie w ten sam sposób, wprowadzając w miejsce ***BUFORU OCTANOWEGO*** 10,00 ml ***ROZTWORU CHROMOFORA*** (ekstrakt herbaciany).
3. Od wartości absorbancji badanej próbki należy odjąć wartość absorbancji odczytanej dla ślepej próby. Otrzymany wynik zapisać wynik w Tabeli 3.

RAPORT Z LABORATORIUM 6

ZIELONA CHEMIA KOORDYNACYJNA - ANALIZA ILOŚCIOWA ŻELAZA W PREPARACIE FARMACEUTYCZNYM

TABELA 1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW ROBOCZYCH ŻELAZA O ZNANYM STĘŻENIU

Stężenie przygotowywanego roztworu Fe(III) w mg/dm^3	Pobrana objętość roboczego roztworu wzorcowego Fe(III) o stężeniu 250 mg/dm^3	Objętość końcowa przygotowywanego roztworu w ml
10		25
20		25
30		25
40		25
50		25

TABELA 2. INFORMACJE O BADANYM PREPARACIE

Badany preparat farmaceutyczny:	
Producent i nr. partii:	
Data ważności:	
Właściwości fizyczne preparatu:	
Zawartość masowa (procentowa) żelaza w jednej tabletce deklarowana przez producenta:	
Postać żelaza w preparacie:	
Masa „naczynka" wagowego (tara):	
Masa „naczynka" wagowego z dwoma tabletkami (brutto):	
Masa dwóch tabletek (netto):	
Średnia masa jednej tabletki:	
Masa „naczynka" wagowego (tara):	
Masa „naczynka" wagowego ze sproszkowaną tabletką (brutto):	
MASA ODWAŻONEJ DO ANALIZY PRÓBKI (NETTO):	

TABELA 3. ZAREJESTROWANE WARTOŚCI ABSORBANCJI

Seria rozcieńczeń – krzywa kalibracyjna		
Badany roztwór	**Wartość absorbancji przy λ = 570 nm (zmierzona)**	**Wartość absorbancji przy λ = 570 nm (po odjęciu ślepej próby)**
chromofor + bufor **(ślepa próba)** **roztwór-0**		-
chromofor + roztwór Fe(III) **roztwór-1** (c = **10 mg/dm^3**)		
chromofor + roztwór Fe(III) **roztwór-2** (c = **20 mg/dm^3**)		
chromofor + roztwór Fe(III) **roztwór-3** (c = **30 mg/dm^3**)		
chromofor + roztwór Fe(III) **roztwór-4** (c = **40 mg/dm^3**)		
chromofor + roztwór Fe(III) **roztwór-5** (c = **50 mg/dm^3**)		
Badana próbka		
bufor + badana próbka **(ślepa próba)**		-
chromofor + badana próbka		

OPRACOWANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW:

1. Narysować krzywą kalibracyjną, wykreślając stężenia roztworów Fe(III) (oś X) względem zarejestrowanych wartości absorbancji (oś Y) roztworów chromofor-Fe(III). Pamiętać o uwzględnieniu ślepej próby. Narysować linię trendu i wyznaczyć równanie prostej oraz wartość współczynnika R^2.
2. Obliczyć stężenie jonów Fe(III) w roztworze próbki badanej, wykorzystując wartość absorbancji roztworu próbki oraz równanie regresji liniowej.
3. Uwzględniając współczynnik rozcieńczenia, obliczyć zawartość żelaza w masie preparatu pobranego do analizy.
4. Uwzględniając średnią masę tabletki, obliczyć zawartość jonów Fe(III) w jednej tabletce badanego preparatu.
5. Przedyskutować otrzymany wynik.

LITERATURA

[1] S. Lapanantnoppakhun et al., *J. Chem. Educ.* 2020, 97, 1, 207–214