

OPPGAVE 4

Bestemmelse av fosfat med molekylabsorpsjonspektrometri.

Sammendrag

Konsentrasjonen av fosfat (ortofosfat) i en utlevert vannprøve skal bestemmes ved molekylabsorpsjonspektrometri etter dannelse av fosformolybdenblått. Det tas opp et absorpsjonsspektrum og en kalibreringskurve.

Praktisk informasjon

To studenter samarbeider ved måling på instrumentene.

Opptak av absorpsjonsspekter for å finne bølgelengden for maksimal absorpsjon (λ_{\max}) gjøres i samarbeid.

Hver student lager sine egne kalibrerings- og prøveløsninger.

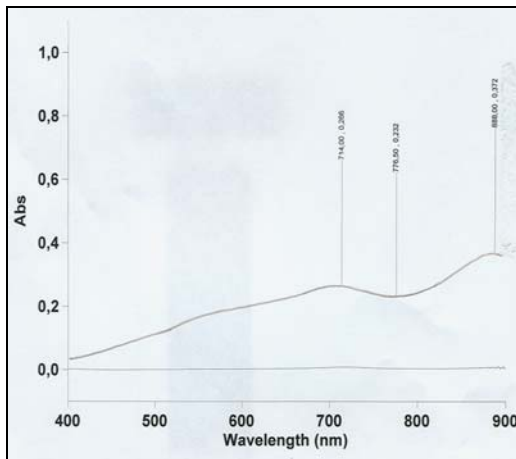
Teori er beskrevet i Harris; Quantitative Chemical Analysis, kap. 18

Godkjentgrense for kvantitativ bestemmelse: 5,0 % avvik fra "sann verdi"

Innledning

Molekylspektrometri kan benyttes til kvantitative bestemmelser av uorganiske og organiske forbindelser som absorberer i UV-synlig området. Mange forbindelser absorberer stråling i UV men bare få i synlig området. UV-området er imidlertid lite egnet for kvantitative målinger i reelle prøver pga interferens fra andre forbindelser enn analytten som er tilstede i prøven (som absorberer stråling ved den samme bølgelengden som det måles ved). Mange metoder er derfor basert på måling i det synlige området etter tilsetning av et reagens som reagerer selektivt med analytten, og danner en farget forbindelse. Dette er også tilfelle for denne fosfatbestemmelsen. Konsentrasjonen av fosfat kan bestemmes etter dannelse av fosformolybdenblått. Molybdationer i sterkt sur løsning tilsettes for å danne fosformolybdensyre. Denne reduseres så med askorbinsyre i nærvær av antimon og det fås en sterkt blåfarget forbindelse, fosformolybdenblått. Den eksakte sammensetningen av forbindelsen er ikke kjent, men den er sannsynligvis av typen $\text{PMo}_x\text{O}_y^{n-}$, der $x > 10$, og $y > 3x$. Absorpsjonsspekteret for forbindelsen er vist i figuren på neste side, for bølgelengdeområdet 400 - 900 nm. Ved kvantitativ bestemmelse måles absorbansen ved absorpsjonsmaksimum, som er ca. 880 nm. Den nøyaktige bølgelengden (λ_{\max}) for kvantitative målinger bestemmes eksperimentelt ved å ta opp et absorpsjonsspekter. Prøveløsningene som måles (etter fortykning) skal ha en konsentrasjon som ligger mellom laveste og høyeste kalibreringsløsning. Konsentrasjonen av fosfat (PO_4^{3-}), angitt som $\mu\text{g/ml P}$ (fosfor), bestemmes ut fra en kalibreringskurve.

Metoden er basert på en Norsk Standard metode (NS 4724) og benyttes av mange rutinelaboratorier for bestemmelse av fosfat i vann. Metoden kan også benyttes for å bestemme total mengde fosfor i vann, etter oksidasjon av prøven med kaliumperokso-disulfat (NS 4725). (Det er også mulig å bruke metoden til å bestemme fosforsyre i Coca Cola, men da må prøven først fortynnes 200 ganger!)



Spekter av fosformolybdenblått (0,5 µg/ml P)

Utstyr

Det finnes to molekylspektrometere på laboratoriet (dere får beskjed om hvilket dere skal benytte):

I. Hitachi Model U-2000 dobbelstråle spektrofotometer med skjerm og printer, deuteriumlampe og wolframjodidlampe, 190–1100 nm.

II. Varian Cary 100 dobbelstråle spektrofotometer med PC og printer, deuteriumlampe og wolframjodidlampe, 190–900 nm.

For begge instrumentene benyttes plastkyvetter med 1 cm lysvei.

Pipetter: Variabel mikropipette (200 – 1000µl), 2 ml, 5 ml og 10 ml glass fullpipetter

Målekolber: 10 stk. 100 ml

Veieglass

Begerglass

NB: Alt utstyr som prøve, kalibreringsløsninger og reagenser kommer i kontakt med, skal være tilstrekkelig rengjort.

For å hindre forurensing av reagenser, bruk aldri pipetter eller spatler direkte i reagensene. Hell istedet en liten mengde (litt mer enn det du skal bruke) over i et tørt lite begerglass før uttak

Prøve (utleveres på 100 ml plastflasker)

Vann inneholdende 2,5 -9,0 µg/ml P (PO_4^{3-})

Reagenser

Ferdig laget, står på laboratoriet:

Standard fosfatløsning: 100 µg/ml P

Molybdatløsning: Løsningen består av 25 g/l ammoniummolybdat,

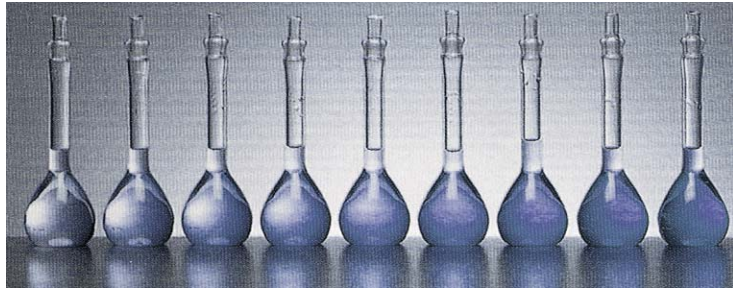
(NH_4)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, og 1,0 g/l kaliumantimon(III)oksidtartrathydrat,

K(SbO)C₄H₄O₆·0,5H₂O, i 5,0 M H₂SO₄.

Lages av hver student:

16,0 g/l askorbinsyreløsning: 1,60 g askorbinsyre, $C_6H_8O_6$, løses i 100 ml vann (benytt 100 ml målekolbe).

Utførelse



Tillaging av kalibreringsløsninger og prøve

Prøveløsninger, kalibreringsløsninger og blindprøve lages parallellt på 9 stk 100 ml målekolber.

Det lages 3 replikater av prøveløsningen (10 ganger fortynnet utlevert prøve) og 5 kalibreringsløsninger som dekker konsentrasjonsområdet 0,2 - 1,0 $\mu\text{g/ml P}$.

Blindprøven (0 $\mu\text{g/mL P}$) må inneholde alle reagensene.

Overfør først 10,00 ml fra den utleverte prøveløsningen til 100 ml målekolbe. Lag totalt 3 prøvereplikater.

Pipetter ut passende volum (med mikropipette) av fosfat standardløsningen (100 $\mu\text{g/ml P}$) for å lage 0,2 0,4 0,6 0,8 og 1,0 $\mu\text{g/ml P}$. Notér pipettenummeret.

Alle de 9 målekolbene (inkl. tom målekolbe for blindprøve) tilsettes 2,0 ml av molybdatløsningen og deretter 5,0 ml av askorbinsyreløsningen. Rist kolben etter hver tilsetning før det fortynnes til 100,0 ml. Husk å riste målekolbene også etter fortynning til merket for å sikre fullstendig blanding. Tiden fra tillaging til måling skal være den samme for alle løsningene. Løsningene skal måles innen 3 timer etter tillaging.

Måling

Konsentrasjonen av fosfor bestemmes ved hjelp av kalibreringskurven som tas opp. Instrumentet tegner opp kalibreringskurven og beregner automatisk konsentrasjonen av fosfor i ukjent løsning. Husk å ta hensyn til fortynningen ved beregning av konsentrasjonen i den utleverte vannprøven.

Bruksanvisningen også kalt SOP (standard operasjonsprosedyre), finnes ved instrumentene. Denne angir instrumentparametere som skal benyttes, og nøyaktig prosedyre for opptak av absorpsjonsspekter, samt måling av kalibrerings- og prøveløsninger.

Spektrometerene som benyttes er dobbeltstråleinstrumenter. Ved opptak av kalibreringskurve og måling av ukjent prøve fylles blindprøven i den ene kyvetten og kalibrerings- eller prøveløsning i den andre.

For å finne bølgelengden for maksimal absorpsjon (λ_{\max}) tas det først opp et absorpsjonsspekter, der absorbansen registreres som funksjon av bølgelengden, i området 400 - 900 nm eller 400-1100 nm (avhengig av hvilket instrument som benyttes).

Ved opptak av kalibreringskurve måles absorbansen for blindprøve og alle kalibreringsløsningene etter stigende konsentrasjon ved λ_{\max} (ca. 880 nm). Deretter prøveløsningene.

Analyseseddel

Lever analyseresultatet ved å fylle ut en analyseseddel før du forlater laboratoriet:

Analyseseddelen skal inneholde følgende:

- 1) Analyseresultatet ($\mu\text{g/ml P}$) for den utleverte løsningen (middelverdi, enkeltverdier og relativt standardavvik).
 - 2) λ_{\max} for måling
 - 3) Pipettenr. til mikropipette.
- Sjekk at resultatet er innenfor det oppgitte konsentrasjonsområdet.



Rapporten

Instrumentutskriften for kalibreringskurven og absorpsjonsspektret skal vedlegges rapporten. Konsentrasjonen av fosfat i mol/l skal også beregnes og oppgis.

Følgende momenter skal innpasses i rapporten:

1. Absorptiviteten (a) for fosformolybdenblått ved λ_{\max} skal beregnes ut fra kalibreringskurven.
2. Tegn en enkel prinsippskisse av et molekylabsorbsjonsspektrofotometer.
3. Forklar kort hva som skjer når et molekyl absorberer stråling i UV- synlig området.
4. Fosfationet er fargeløst. Hva har du foretatt deg i denne analysen og hvorfor, for å kunne bestemme konsentrasjonen av dette spesiet med absorpsjonsspektrofotometri?
5. Forklar hvordan du ut fra fargen på løsningene kan si noe om i hvilket bølgelengdeområde løsningen absorberer? Kan du ved å sammenligne prøven med kalibreringsløsningene si noe om konsentrasjonen av fosfat? Hvordan stemmer det med analyseresultatet ditt?
6. Hvorfor benyttes blindprøve?