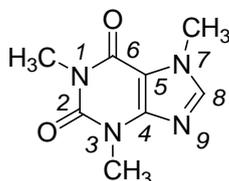


DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN CAFFEINA

(PER VIA SPETTROFOTOMETRICA ATTRAVERSO LA COSTRUZIONE DELLA RETTA DI TARATURA).



Caffeina (1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1*H*-purin-2,6-dione)

Massimo d'assorbimento della caffeina in soluzione acquosa: 273 nm

Reagenti:

- Caffeina standard EP (R 22)
- Acqua deionizzata
- Campione incognito (A) contenente caffeina

Attrezzatura:

- Bilancia analitica
- Vetrino d'orologio e bacchettina di vetro
- Bicchiere da 250 mL
- Imbuto e sostegno
- Matracci da 250,0 mL (quattro)
- Matracci da 100,0 mL (due)
- Pipetta da 10,0 mL (due)
- Pipetta da 20,0 mL
- Pipette Pasteur (quattro)
- Spettrofotometro UV
- Cuvetta in quarzo con cammino ottico da 1,00 cm
- Camice, guanti e occhiali di protezione.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

COSTRUZIONE DELLA RETTA DI TARATURA

Preparazione della stock solution (soluzione madre)

1. Dopo aver indossato i DPI, pesare esattamente alla bilancia analitica una quantità di caffeina standard compresa tra 0,0370 e 0,0420 g utilizzando il vetrino come contenitore. Trasferire la quantità pesata in un bicchiere da 250 mL sciogliendola nella minima quantità di acqua deionizzata. Portare a volume di 250,0 mL in matraccio tarato e agitare. Calcolare la concentrazione in $\mu\text{g/mL}$.

Preparazione delle soluzioni standard a concentrazioni scalari

2. Prelevare 10,0 mL (con pipetta a doppia tacca) della soluzione madre e porli in un matraccio da 250,0 mL. Portare a volume con acqua deionizzata e agitare (*Soluzione standard 1*). Calcolare la concentrazione in $\mu\text{g/mL}$.
3. Prelevare 20,0 mL (con pipetta a doppia tacca) della soluzione madre e porli in un matraccio da 250,0 mL. Portare a volume con acqua deionizzata e agitare (*Soluzione standard 2*). Calcolare la concentrazione in $\mu\text{g/mL}$.
4. Prelevare 10,0 mL (con pipetta a doppia tacca) della soluzione madre e porli in un matraccio da 100,0 mL. Portare a volume con acqua deionizzata e agitare (*Soluzione standard 3*). Calcolare la concentrazione in $\mu\text{g/mL}$.

Determinazione dei valori di assorbanza di ciascuna delle tre soluzioni standard e costruzione della retta di taratura

5. Accendere preliminarmente lo spettrofotometro UV e porre la lunghezza d'onda (λ) a 273 nm (massimo d'assorbimento della caffeina). Premere **GOTO λ** , selezionare il valore di lunghezza d'onda con i tasti \uparrow e \downarrow e poi premere il tasto giallo corrispondente a **OK**.
6. Premere il tasto giallo corrispondente a **QUANTITATIVE**. Selezionare con i tasti \uparrow e \downarrow "Create curve" e poi premere il tasto giallo corrispondente a **OK**. Selezionare con i tasti \uparrow e \downarrow "Standard curve" e poi premere il tasto giallo corrispondente a **OK**. Si leggerà la scritta "Please insert Blank"
7. Riempire sino a tre quarti la cuvetta (Attenzione! È fragile e costosa) con acqua deionizzata, asciugare le pareti esterne con un panno soffice e porla nella sede all'interno dello spettrofotometro. Chiudere il vano contenente la cuvetta. Leggere il valore di assorbanza sul

display e poi premere il tasto giallo corrispondente a **OK**. Adesso il valore di assorbanza sul display deve essere pari a 0.000.

8. Comparirà la scritta "*Number:x*". Selezionare con i tasti \uparrow e \downarrow il numero delle soluzioni standard. Nel nostro caso sono tre e quindi si dovrà ottenere la scritta "*Number:3*". Premere il tasto giallo corrispondente a **OK**. Compariranno le scritte: *Insert 1# standard* e "*Imput 1# Conc: 00000*".
9. Aprire il vano dello spettrofotometro, uscire la cuvetta ed eliminare il contenuto. Avvinare la cuvetta e poi riempirla con la **Soluzione standard 1** servendosi di una pipetta Pasteur. Asciugare le pareti esterne della cuvetta con un panno soffice e porla nella sede all'interno dello spettrofotometro. Chiudere il vano. Leggere il valore di assorbanza sul display e prenderne nota. Inserire il valore di concentrazione espresso in $\mu\text{g/mL}$ (quattro cifre significative più un punto!). Attenzione! Ogni cifra del valore di concentrazione deve essere selezionata con i tasti \uparrow e \downarrow e poi confermata premendo il tasto giallo corrispondente a **OK**. Se si sbaglia non è possibile tornare facilmente indietro! Completato l'inserimento del valore di concentrazione, lo strumento mette in memoria tale valore accoppiandolo alla corrispondente assorbanza.
10. Compariranno le scritte: *Insert 2# standard* e "*Imput 2# Conc: 00000*". Aprire il vano dello spettrofotometro, uscire la cuvetta ed eliminare il contenuto. Avvinare la cuvetta e poi riempirla con la **Soluzione standard 2** servendosi di una pipetta Pasteur. Asciugare le pareti esterne della cuvetta con un panno soffice e porla nella sede all'interno dello spettrofotometro. Chiudere il vano. Leggere il valore di assorbanza sul display e prenderne nota. Inserire il valore di concentrazione espresso in $\mu\text{g/mL}$ (quattro cifre significative più un punto!). Attenzione! Ogni cifra del valore di concentrazione deve essere selezionata con i tasti \uparrow e \downarrow e poi confermata premendo il tasto giallo corrispondente a **OK**. Se si sbaglia non è possibile tornare facilmente indietro! Completato l'inserimento del valore di concentrazione, lo strumento mette in memoria tale valore accoppiandolo alla corrispondente assorbanza.
11. Compariranno le scritte: *Insert 3# standard* e "*Imput 3# Conc: 00000*". Aprire il vano dello spettrofotometro, uscire la cuvetta ed eliminare il contenuto. Avvinare la cuvetta e poi riempirla con la **Soluzione standard 3** servendosi di una pipetta Pasteur. Asciugare le pareti esterne della cuvetta con un panno soffice e porla nella sede all'interno dello spettrofotometro. Chiudere il vano. Leggere il valore di assorbanza sul display e prenderne nota. Inserire il valore di concentrazione espresso in $\mu\text{g/mL}$ (quattro cifre significative più un punto!). Attenzione! Ogni cifra del valore di concentrazione deve essere selezionata con i

tasti \uparrow e \downarrow e poi confermata premendo il tasto giallo corrispondente a **OK**. Se si sbaglia non è possibile tornare facilmente indietro! Completato l'inserimento del valore di concentrazione, lo strumento mette in memoria tale valore accoppiandolo alla corrispondente assorbanza.

12. Prendere nota dell'equazione della retta di taratura e del valore di r (coefficiente di regressione) mostrati sul display. Il grafico è costruito mettendo la concentrazione in ordinate e l'assorbanza in ascisse.

ANALISI DEL CAMPIONE (A) CONTENENTE UNA QUANTITÀ INCOGNITA DI CAFFEINA

13. Prendere il Campione A (contenuto in un bicchiere da 100 mL), scioglierlo nella minima quantità di acqua e portarlo a volume di 250,0 mL. Agitare la soluzione (*Soluzione A1*).
14. Prelevare 10,0 mL (con pipetta a doppia tacca) della *Soluzione A1* e porli in un matraccio da 100,0 mL. Portare a volume con acqua deionizzata e agitare (*Soluzione A2*).
15. Riempire sino a tre quarti la cuvetta con acqua deionizzata, asciugare le pareti esterne con un panno soffice e porla nella sede all'interno dello spettrofotometro. Chiudere il vano contenente la cuvetta. Leggere il valore di assorbanza sul display e poi premere il tasto giallo corrispondente a **TEST**. Si è azzerato lo strumento. Assorbanza pari a 0.0000.
16. Aprire il vano dello spettrofotometro, uscire la cuvetta ed eliminare il contenuto. Avvinare la cuvetta e poi riempirla con la *Soluzione A2* servendosi di una pipetta Pasteur. Asciugare le pareti esterne della cuvetta con un panno soffice e porla nella sede all'interno dello spettrofotometro. Chiudere il vano. Leggere il valore di assorbanza sul display e poi premere il tasto giallo corrispondente a **TEST**. Sul display comparirà il valore di concentrazione (in $\mu\text{g/mL}$) della caffeina nella *Soluzione A2* calcolato sulla base dell'equazione della retta di taratura; prenderne nota.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN CAFFEINA (mg) PRESENTE NEL CAMPIONE A

17. Il risultato finale deve esprimere il contenuto di caffeina (in mg) nel campione A.
18. Tenere conto che il valore di concentrazione dato dallo spettrofotometro per il campione è espresso in $\mu\text{g/mL}$ ed è relativo alla soluzione diluita *A2*.
19. Tenere conto che l'intero campione A è stato inizialmente sciolto in 250,0 mL (*Soluzione A1*) e che di questa soluzione sono stati prelevati 10,0 mL per preparare 100,0 mL della *Soluzione A2*, analizzata allo spettrofotometro.
20. Tutto il resto è *up to you!*

RESPONSABILITÀ E PREPARAZIONE DELLE RELAZIONI FINALI

- I. Gli studenti sono suddivisi in gruppi di dieci (un gruppo per ciascun bancone).
- II. Per ogni gruppo viene designato uno *Studente Responsabile*. Egli deve sovrintendere e organizzare il lavoro. Risponde in prima persona del buon esito dell'analisi e della stesura della relazione finale.
- III. Per ogni gruppo deve essere presentata una relazione finale.
- IV. In relazione dovranno essere descritti calcoli e operazioni relativi alla costruzione della retta di taratura e operazioni, calcoli e risultato finale per il campione A.
- V. In relazione deve essere indicato il Turno di laboratorio e il numero di bancone; la relazione deve essere inoltre firmata in calce dagli studenti che hanno contribuito all'analisi e controfirmata dallo *Studente Responsabile*.