# OZNACZANIE WOLNYCH SULFONAMIDÓW

**ZASADA METODY**

Oznaczanie wolnych sulfonamidów jest mikromodyfikacją metody Bratton i Marshall, u podstaw której leży reakcja barwna wytworzona pomiędzy zdwuazowanym sulfonamidem, a chlorowodorkiem naftyloetylenodiaminy. Jest to metoda spektrofotometryczna, w wyniku której powstaje różowe zabarwienie o maksimum absorbcji przy długości fali 530nm.

**ODCZYNNIKI**

1. 20% kwas trichlorooctowy
2. 0,1% azotan sodu III
3. 0,5% sulfaminian amonu
4. Odczynnik sprzęgający: 0,1 % r-r chlorowodorku N-1-naftyloetylenodiaminy
5. Roztwór standardowy **(**1 mg sulfatiazolu w 1 ml wody)

**WYKONANIE KRZYWEJ STANDARDOWEJ**

Należy przygotować stężenia do krzywej standardowej według tabelki poniższej:

Tabela1. Ilościowy skład próbek do wykonania krzywej wzorcowej o założonych stężeniach.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Stężenie sulfonamidu  (mg/100ml) | Roztwór standardowysulfonamidu  (1mg/1ml) [ul] | woda [ul] |
| 5 | 12,5 | 237,5 |
| 10 | 25 | 225 |
| 15 | 37,5 | 212,5 |
| 20 | 50 | 200 |
| 30 | 75 | 175 |
| 40 | 100 | 150 |

Do każdej probówki (z próbą wzorcową) dodać kolejno 3,75 ml wody destylowanej i 1 ml 20% TCA i wymieszać dokładnie.

Próbę ślepą stanowią 4ml wody destylowanej i 1 ml TCA 20%.

**Przygotowanie próbki badanej**

Do próbki badanej (250ul) dodać kolejno 3,75ml wody destylowanej i 1ml 20% TCA, dokładnie wymieszać.

Probówki z próbkami badanymi, wzorcami oraz ślepą umieścić w łaźni lodowej i dodawać odczynniki wg. następującego schematu:

1. 0,5ml azotanu sodu (III) , dobrze wymieszać i odczekać 3 min.
2. 0,5ml sulfaminianu amonu, dobrze wymieszać i odczekać 2min.
3. 0,5ml odczynnika sprzęgającego, wymieszać o odczekać 10 min.

Pomiary absorbancji przeprowadzić przy długości fali 530nm wobec próby ślepej.

Wykreślić krzywą standardową i na podstawie otrzymanego wyniku dla próby badanej podać stężenie otrzymanej próbki.