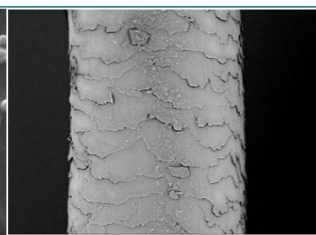
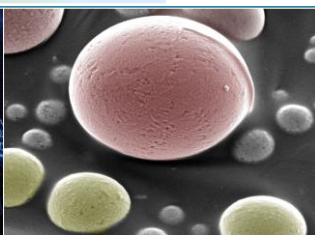


## Ćwiczenie 3

# Wyznaczenie nieznanego stężenia związku w roztworze



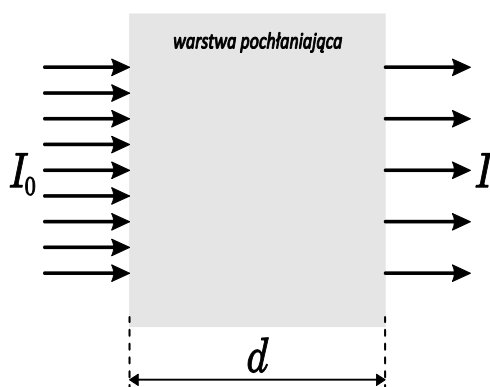
## I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie molowego współczynnika absorpcji oraz nieznanego stężenia związku w roztworze z pomiarów absorbancji.

**Pytanie organu procesowego:** Jakie jest stężenie fluoresceiny w dostarczonym materiale dowodowym?

## II. Wstęp teoretyczny

Kiedy wiązka światła pada na badany materiał, to może zostać: rozproszona, zaabsorbowana lub ulec transmisji tzn. przeniknąć przez badaną próbkę. Absorpcja światła przez próbkę polega na pochłonięciu części energii padającej wiązki przez atomy czy cząsteczki próbki, powodując tym samym ich wzbudzenie do wyższych stanów energetycznych.



Wiązka promieniowania monochromatycznego po przejściu przez jednorodny ośrodek absorbujący o grubości  $d$  ulega osłabieniu zgodnie z równaniem (prawo Lamberta):

$$I = I_0 e^{-kd}$$

gdzie:  $I_0$  - natężenie wiązki promieniowania monochromatycznego padającego na ośrodek absorbujący,  $I$  - natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek,  $k$  - współczynnik absorpcji,  $e$  - podstawa logarytmu naturalnego.

Po przekształceniach otrzymujemy:

$$\ln \frac{I_0}{I} = k \cdot d \quad \text{lub} \quad \log \frac{I_0}{I} = \frac{1}{2,303} kd .$$

W przypadku roztworów, jeżeli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero, to absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącej przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu  $c$  i do grubości warstwy absorbującej  $d$  (prawo Beera - Lamberta) co możemy ostatecznie zapisać:

$$A_\lambda = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

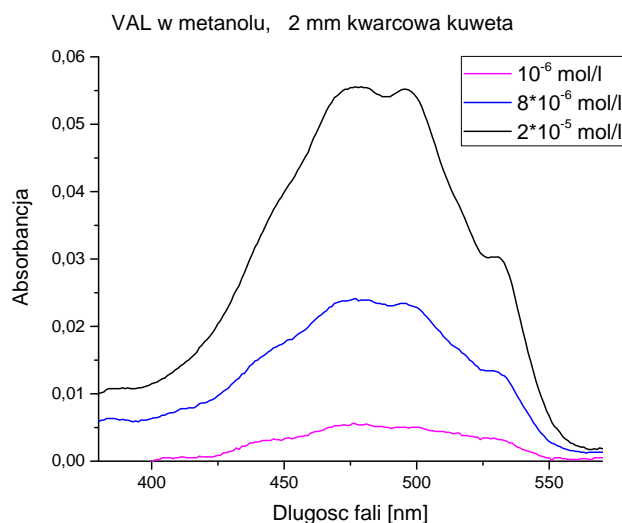
Stężenie substancji  $c$  wyraża się w [mol/l],  $\varepsilon$  - nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji, jest charakterystyczny dla danego związku i jest wyrażony w [l/(mol·cm)],  $d$  - grubość warstwy absorbującej w [cm], zaś  $A$  to absorbancja.

Zależność pomiędzy absorbancją a stężeniem badanego związku, w warunkach gdy spełnione jest prawo Lamberta-Beera ma charakter liniowy i można ją wykorzystać do wyznaczenia stężenia związku w próbce.

Absorbancja jest wielkością addytywną tzn. absorbancja mieszaniny składników jest równa sumie absorbancji poszczególnych składników.

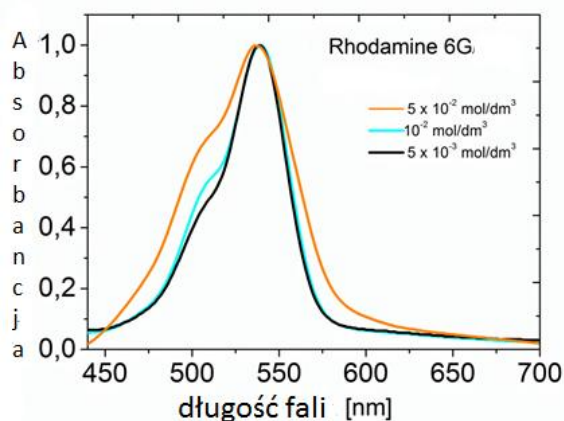
$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

Wykres zależności  $A$  od długości fali  $\lambda$  określa się mianem krzywej lub widmem absorpcji.

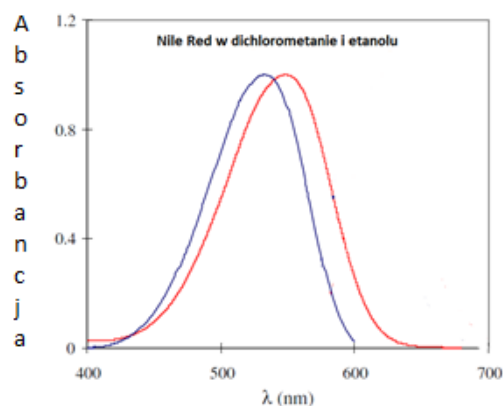


*Przykładowe widma absorpcji zmierzone dla różnych stężeń leku antynowotworowego w metanolu.*

Widma absorpcji mogą zmieniać się w zależności od stężenia badanego związku, użytego rozpuszczalnika (pH, lepkość), temperatury i.t.p.



Widma absorpcji dla Rodaminy 6G dla różnych stężeń związku.



Widma absorpcji dla Nile Red w różnych rozpuszczalnikach.

### III. Literatura

1. Z. Kęcki – „Podstawy spektroskopii molekularnej”, PWN, Warszawa 1982.
2. K. Pigoń, Z. Ruziewicz, „Chemia fizyczna”, PWN, Warszawa 1986r.
3. A. Kawski, „Fotoluminescencja roztworów”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1992.
4. J. Wójcikiewicz (red.); *Ekspertyza Sądowa. Zagadnienia Wybrane*; Wolters Kluwer, Warszawa 2007.
5. J.R. Lakowicz – „Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Springer, 2006.
6. B. Valeur – „Molecular Fluorescence. Principles and Applications”, 2001 Wiley-VCH.
7. J. Grzywacz – „Spektroskopia absorpcyjna drobin z zastosowaniem do badań luminescencyjnych”, skrypt uczelniany UG, Gdańsk 1984.
8. I. Sołtyszewski, P. Polak – „Badania kryminalistyczne”, Wyd. UMW. Olsztyn, 2007.
9. A. Cygański – „Metody spektroskopowe w chemii analitycznej”, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002.
10. D. Halliday, R. Resnick, J. Walker, – „Podstawy fizyki”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
11. P.G. Seybold, M. Gouterman and J. Callis– „Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes.” *Photochem. Photobiol.* 9, 229-242, 1969.

12. Mota MC, Carvalho P, Ramalho J, Leite E.- *"Spectrophotometric analysis of sodium fluorescein aqueous solutions. Determination of molar absorption coefficient."* Int Ophthalmol., 15, 321-6, 1991.
13. P. Siejak and D. Frackowiak – *"Spectral Properties of Fluorescein Molecules in Water with the Addition of a Colloidal Suspension of Silver."* J. Phys. Chem. B, 109, 14382, 2005.
14. H. Szydłowski, *Pracownia fizyczna*, PWN, 1994.
15. J. Zięba-Palus (red.) *„Mikroślady i ich znaczenie”*, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz sądowych, Kraków 2015.

#### IV. Zagadnienia do opracowania

1. Promieniowanie elektromagnetyczne: natura, cechy.
2. Energia wewnętrzna molekuł.
3. Spektroskopia i jej podział.
4. Budowa i zasada działania spektrofotometru.
5. Zjawisko absorpcji światła w roztworach. Prawa absorpcji.
6. Widmo absorpcji. Parametry widma spektralnego.
7. Regresja liniowa.

#### V. Zestaw przyrządów.



1. Zestaw komputerowy
2. Spektrofotometr Shimadzu UVmini-1240.

## VI. Wykonanie doświadczenia i opracowanie wyników

1. Zapoznaj się z instrukcją działania spektrofotometru dostępną w *Dodatku*.
2. Zmierz baseline dla kuwety wypełnionej buforem wodnym o pH = 5,5 w zakresie od 340 do 580 nm.
3. Zmierz widmo absorpcji w zakresie od 340 - 580 nm dla roztworu fluoresceiny w buforze wodnym o pH = 5,5 o stężeniu  $c = 2 \cdot 10^{-5}$  mol/l
4. Metodą kolejnych rozcieńczeń roztworu o stężeniu  $c = 2,0 \cdot 10^{-5}$  mol/l sporządź pięć roztworów wodnych fluoresceiny o różnych stężeniach molowych podanych przez prowadzącego ćwiczenie (np.:  $1,6 \cdot 10^{-5}$ ;  $1,2 \cdot 10^{-5}$ ;  $1 \cdot 10^{-5}$ ;  $0,8 \cdot 10^{-5}$ ;  $0,6 \cdot 10^{-5}$ ).
5. Zmierz absorbancję wszystkich roztworów fluoresceiny w buforze.
6. Zmierz absorbancję roztworu o nieznanym stężeniu fluoresceiny w tym samym zakresie co poprzednie. Roztwór dostarczy prowadzący ćwiczenie.
7. Wyznacz molowy współczynnik absorpcji:
  - a. wykreśl widma absorpcji dla wszystkich roztworów, odczytaj maksymalną wartość absorbancji dla odpowiedniej długości fali,
  - b. sporządź wykres zależności absorbancji  $A$  od stężenia roztworu  $c$  dla danej długości fali,
  - c. korzystając z metody regresji liniowej wyznacz molowy współczynnik absorpcji  $\epsilon_\lambda$ .

Regresja liniowa (metoda najmniejszych kwadratów) jest prostą metodą wyznaczenia parametrów najlepiej dopasowanej prostej. Jeżeli pomiędzy dwiema wielkościami fizycznymi występuje zależność liniowa to wyznaczone parametry dopasowania mogą służyć do wyznaczenia szukanej wielkości fizycznej. W tym przypadku, wyznaczamy molowy współczynnik absorpcji korzystając z liniowej zależności absorbancji od stężenia roztworu (w zakresie niskich stężeń).

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

$$\begin{array}{ccc} \uparrow & \uparrow & \uparrow \\ y & = & a \cdot x \end{array}$$

$\epsilon_\lambda = a$ ,  $A=y$ ,  $x=c \cdot d$ , gdzie  $d=1$  cm.

Regresja liniowa  $y=ax$ :

$$\bar{a} = \frac{\sum x_i y_i}{\sum x_i^2}, \quad S_{\bar{a}} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left[ \frac{\sum y_i^2}{\sum x_i^2} - a^2 \right]}, \quad r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

$a$  – współczynnik regresji liniowej,  $S_a$  – niepewność wielkości  $a$ ,  $r$  – współczynnik korelacji liniowej (wartości  $-1$  i  $1$  odpowiadają idealnemu ułożeniu punktów na prostej,  $0$  oznacza brak korelacji między zmiennymi).

d. wyznaczony molowy współczynnik absorpcji porównaj z wartością tablicową znaną w literaturze naukowej.

8. Znając molowy współczynnik absorpcji oraz widmo absorpcji określ nieznanie stężenie roztworu dostarczonego przez prowadzącego.

$$c = \frac{A_\lambda}{\varepsilon_\lambda \cdot d}$$



## Wskazówki

Wartości molowych współczynników absorpcji dla różnych związków są dostępne w literaturze naukowej. Jeśli znamy wartość  $\varepsilon_\lambda$  w danym rozpuszczalniku i grubość absorbującej warstwy możemy szybko wyznaczyć nieznanie stężenie z pomiarów absorbancji (patrz punkt 8).

Możemy również sporządzić wyłącznie wykres kalibracyjny  $A=f(c)$  dla serii roztworów wzorcowych o różnych, znanych stężeniach (pamiętając, że prawo LB odnosi się do roztworów rozcieńczonych) i roztworu o nieznanym stężeniu. Z wykresu zależności absorbancji od stężenia można odczytać nieznanie stężenie badanego związku. Odczytu absorbancji dla roztworów wzorcowych i tego o nieznanym stężeniu dokonujemy dla określonej długości fali (najczęściej maksimum natężenia widma absorpcji).

1. Sporządzić opinię dla organu procesowego.

Sprawozdanie ma mieć charakter przykładowej opinii biegłego tzn.: zawierać takie elementy jak:

- a) imię, nazwisko, stopień i tytuł naukowy, specjalność i stanowisko zawodowe biegłego,
- b) imiona i nazwiska oraz pozostałe dane innych osób, które uczestniczyły w przeprowadzeniu ekspertyzy, ze wskazaniem czynności dokonanych przez każdą z nich,
- c) w wypadku opinii instytucji - także pełną nazwę i siedzibę instytucji,
- d) czas przeprowadzonych badań oraz datę wydania opinii,
- e) szczegółowy opis nadesłanego materiału dowodowego, porównawczego (sposób zabezpieczenia podczas transportu, opis opakowania, jego cechy ogólne i indywidualne) i cytowane pytania organu procesowego,
- f) informacja o zastosowanych technikach i metodach,
- g) sprawozdanie z przeprowadzonych badań i obserwacji. Interpretacja wyników i formułowanie wniosków,
- h) podpisy wszystkich biegłych, którzy uczestniczyli w wydaniu opinii.

Opinia powinna być napisana zrozumiałym językiem, a wnioski powinny być bardzo czytelne.



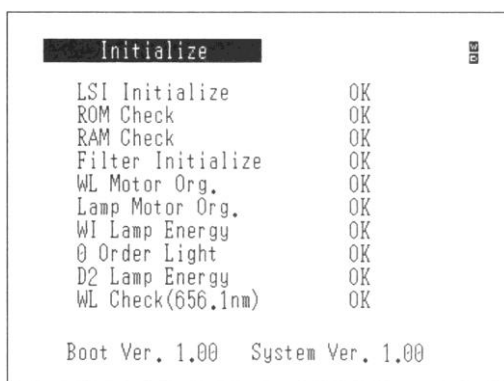
## Dodatek

### Instrukcja obsługi stanowiska do pomiaru widm absorpcji

#### I. Włączanie spektrofotometru.

1. Włączyć komputer i monitor.
2. Włączyć spektrofotometr (wyłącznikiem na tylnej ścianie spektrofotometru). Włączenie zasilania zapoczątkuje proces inicjalizacji spektrofotometru, podczas którego jest testowana praca jego poszczególnych podzespołów.

Po ukończeniu inicjalizacji ekran spektrofotometru powinien przedstawiać się jak na *Rysunku 2*.



Rysunek 2. Ekran spektrofotometru po prawidłowo zakończonej inicjalizacji.

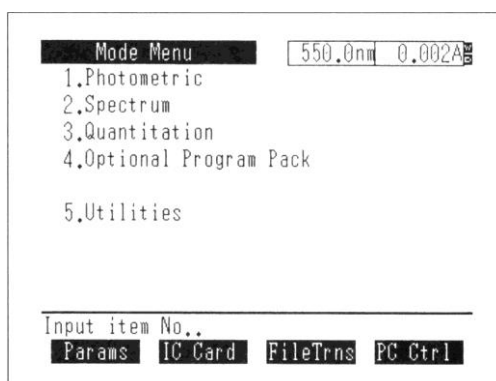


### Wskazówka

Dla uzyskania optymalnych warunków pracy, należy odczekać co najmniej 10 minut po zakończeniu inicjalizacji spektrofotometru.

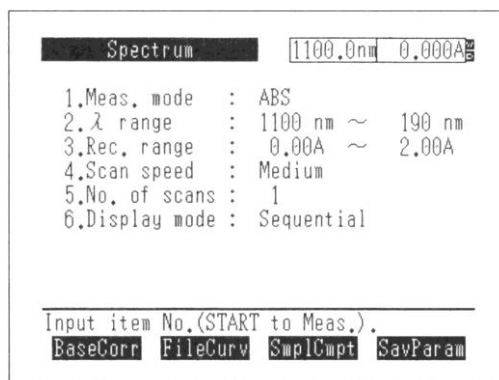
#### II. Ustawianie parametrów pomiarowych.

W trybie pracy spektrofotometru umożliwiającym wybór rodzaju pomiaru (*Rysunek 3*) należy wybrać opcję 2 . Spectrum.



Rysunek 3. Ekran spektrofotometru gotowego do pracy.

Ekran spektrofotometru będzie wyglądał jak na Rysunku 4.



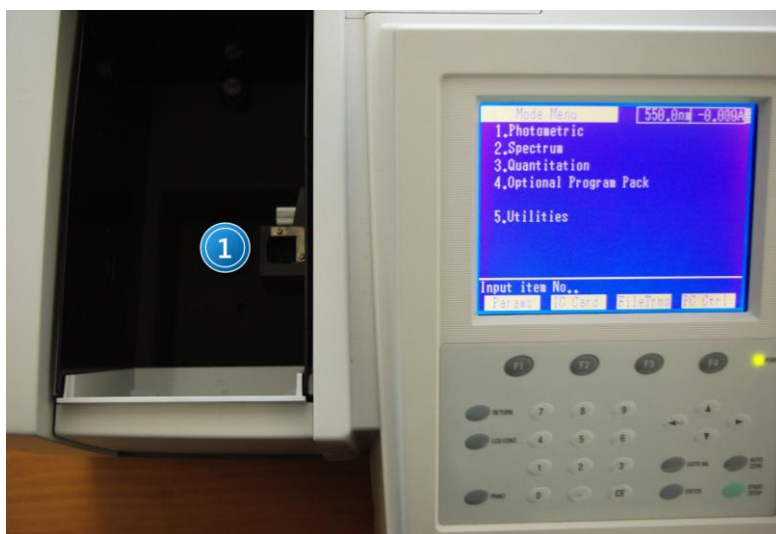
Rysunek 4. Ekran trybu wyboru parametrów pomiarowych dla pomiarów widm

Posługując się klawiaturą spektrofotometru należy wprowadzić następujące parametry:

1.Meas. mode	:	<b>ABS</b>
2.λ range	:	<b>350 nm ~ 550 nm</b>
3.Rec. range	:	<b>0.00A ~ 2.00A</b>
4.Scan speed	:	<b>very slow</b>
5.No. of scans	:	<b>1</b>
6.Display mode	:	<b>Sequential</b>

### III. Pomiar linii bazowej.

Pomiaru linii bazowej należy dokonać ze względu na konieczność uwzględnienia właściwości spektralnych zarówno samej kuwety (musi być identyczna jak kuweta pomiarowa, w której wykonywane będą pomiary widm przygotowanych roztworów), jak i rozpuszczalnika, w którym rozpuszczono badaną substancję. W tym celu należy wsunąć kuwetę z czystym rozpuszczalnikiem w uchwyt na kuwety, pokazany na Zdjęciu 5.



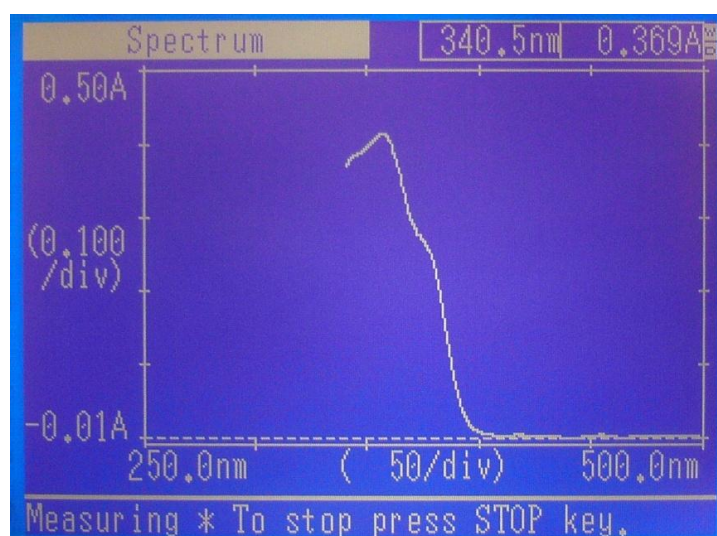
Zdjęcie 5. Widok otwartej komory na próbki spektrofotometru: 1 – uchwyt na kuwety.

Po umieszczeniu kuwety w uchwycie i zamknięciu komory spektrofotometru, należy uruchomić pomiar linii bazowej naciskając klawisz F1 (BaseCorr). Podczas pomiaru spektrofotometr kilkakrotnie dokona pomiarów dla zadanego zakresu. Odczekać chwilę na automatyczne zakończenie pomiaru, oznajmione krótkim sygnałem dźwiękowym spektrofotometru.

Po wykonaniu pomiaru linii bazowej, wyjąć kuwety z czystym rozpuszczalnikiem z uchwytu na kuwety.

#### IV. Pomiar widm absorpcji.

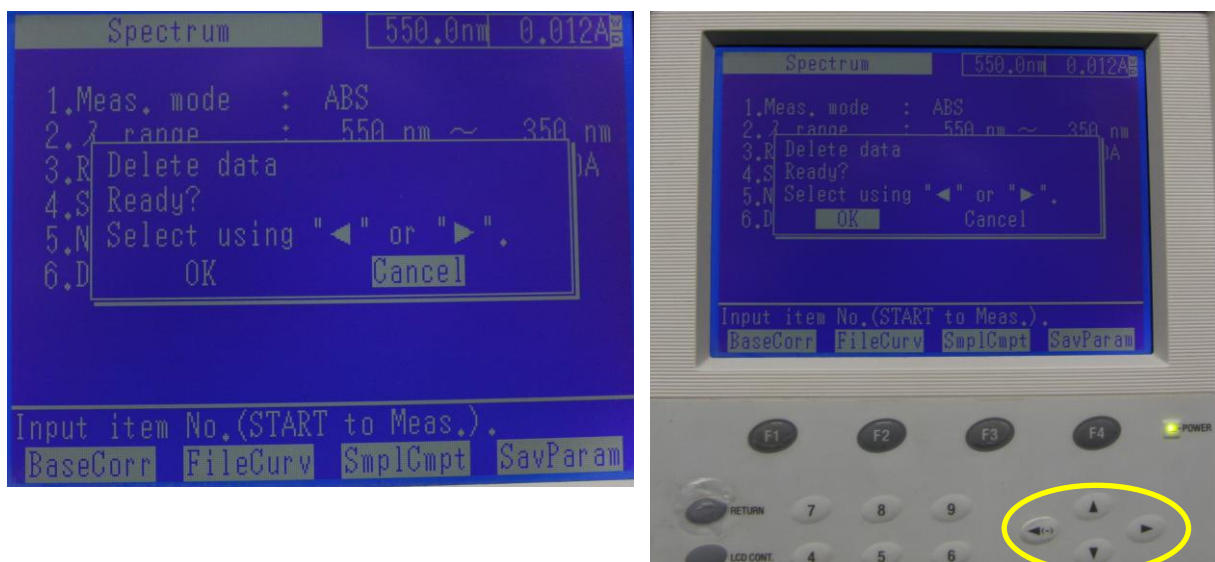
Umieścić kuwety z badanym roztworem w uchwycie wewnątrz komory na próbki spektrofotometru (Zdjęcie 5). Po zamknięciu komory spektrofotometru, uruchomić pomiar widma absorpcji wciskając klawisz START/STOP. Widok ekranu w trakcie pomiaru widma absorpcji jest przedstawiony na Zdjęciu 6.



Zdjęcie 6. Ekran spektrofotometru podczas pomiaru widma absorpcji.

## V. Zapis zmierzonych danych na dysku komputera.

Po zakończonym pomiarze, należy przesłać dane do komputera. W tym celu spektrofotometr należy ustawić w trybie transferu plików. Wymaga to przejścia do trybu wyboru rodzaju pracy spektrofotometru (poprzez dwukrotne naciśnięcie klawisza RETURN). Na ekranie pojawi się okno:



Zdjęcie 7. Ekran spektrofotometru.

Klawiszami ze strzałkami wybierz OK, potwierdź wybór przyciskiem ENTER.

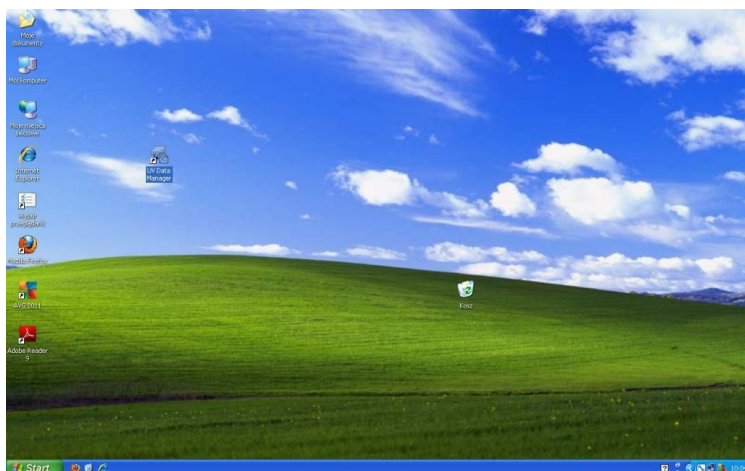
Ekran powinien wówczas wyglądać jak na *Rysunku 3*. W tym trybie, klawiszem F3 (FileTrans) ustawić spektrofotometr w gotowości do transmisji plików. Wówczas ekran spektrofotometru przedstawia się następująco (*Zdjęcie 8*):



Zdjęcie 8. Ekran spektrofotometru w trybie przesyłania plików.

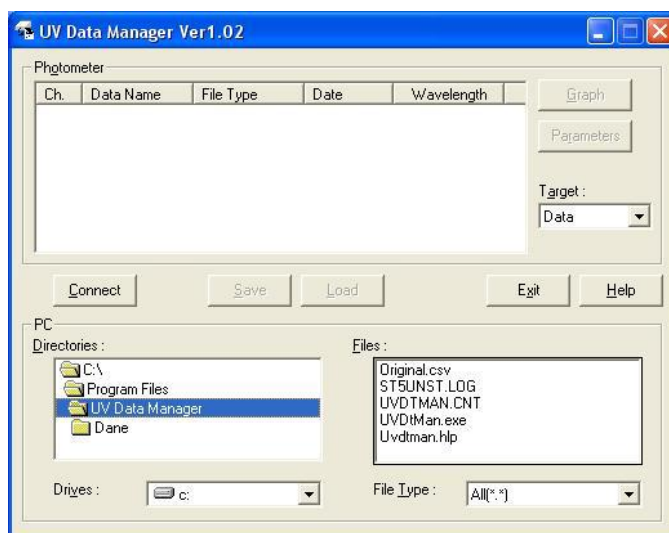
Aby wyjść z trybu transmisji plików, po zakończonej transmisji, należy nacisnąć klawisz RETURN.

Uruchomić program UV Data Manager na komputerze klikając dwukrotnie wskaźnikiem myszki na ikonę programu (Zdjęcie 9).



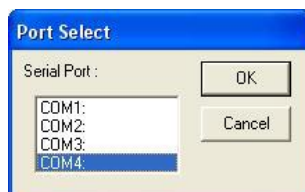
Zdjęcie 9. Widok ekranu monitora.

Po uruchomieniu programu otrzymuje się następujący widok ekranu (Zdjęcie 10):



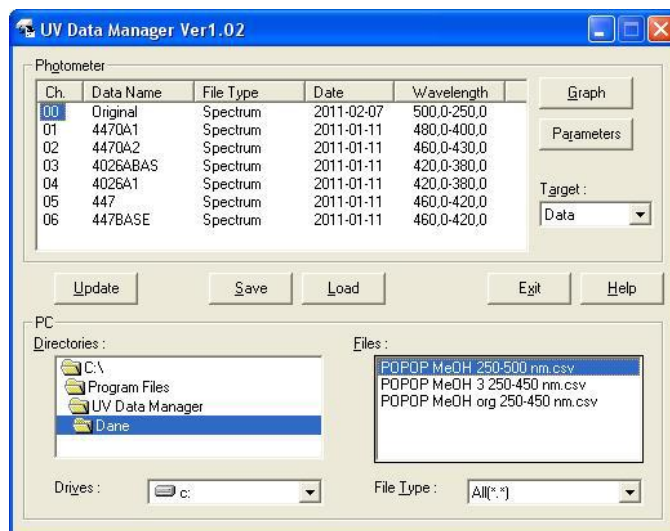
Zdjęcie 10. Okno programu UV Data Manager.

Należy połączyć komputer ze spektrofotometrem klikając raz na przycisk Connect. Na ekranie komputera pojawi się wtedy okienko z pytaniem o wybór portu komputera (Zdjęcie 11), przez który ma nastąpić transmisja danych.



Zdjęcie 11. Okienko wyboru portu do transmisji danych.

Po wyborze portu COM4 (poprzez naciśnięcie OK) nastąpi przekazanie danych ze spektrofotometru do pamięci komputera a okno programu będzie wyglądać jak na *Zdjęciu 12*.



Zdjęcie 12. Okno UV Data Manager po wykonanej transmisji danych ze spektrofotometru.

Zmierzone dane (krzywa absorpcji w postaci tabeli z długościami fal i wartościami fotometrycznymi oraz z parametrami pomiaru) są zawsze umieszczone w pliku „Original” (widoczny w oknie „Photometer”) stąd do zapisu danych na dysku komputera należy zaznaczyć kanał **Ch**, tak jak na *Zdjęciu 12*. Jako aktywny MUSI BYĆ zaznaczony podkatalog „Dane” w okienku „Directories”. Rozwijalne okno „Target” musi mieć wartość „Data”. Po naciśnięciu wskaźnikiem myszki przycisku „Save” otworzą się typowe okna dialogowe umożliwiające zapis na dysku pliku użytkownika. W rozwijalnej liście „File Type” należy wybrać „Text (\*.csv)” i w odpowiednim oknie wpisać nazwę pliku.

Ze względu na sposób zapisywania danych w spektrofotometrze i format transmisji danych pomiędzy spektrofotometrem i komputerem, każdy pomiar musi być przekazywany do komputera i na nim zapisywany zgodnie z powyższą instrukcją.

Aktualnie **nie jest możliwe** dokonywanie wielokrotnych pomiarów w spektrofotometrze z późniejszym ich przekazaniem do komputera.

Każdy kolejny pomiar widma absorpcji, po jego wykonaniu w spektrofotometrze, należy przekazać do komputera (po uprzednim ustawieniu spektrofotometru w trybie transmisji danych opisanym wyżej) klikając przycisk „Update” w oknie programu UV Data Manager (*Zdjęcie 12*).



## UWAGA!

Podczas importu danych do programu Origin uwzględnić format CSV zapisywanych plików.



Dane zapisywane w plikach CSV mają następujący format:

500,0, 0,0022

499,5, 0,0017

499,0, 0,0026

498,5, 0,0026

498,0, 0,0026

497,5, 0,0027

497,0, 0,0027 itd.