



Ćwiczenie G6

Zastosowanie zjawiska absorpcji do wyznaczania nieznanego stężenia związku w roztworze



I. Zagadnienia do opracowania.

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

II. Zadania doświadczalne.

1. Zapoznać się z układem pomiarowym na *Zdjęciu 1*.



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

2. Zapoznaj się z instrukcją działania spektrofotometru dostępną w *Dodatku*.
3. 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.: $1,6 \cdot 10^{-5}$; $1,2 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-5}$; $0,8 \cdot 10^{-5}$; $0,6 \cdot 10^{-5}$).
4. Zmierz baseline dla kuwety wypełnionej buforem wodnym o pH=5,5 w zakresie od 340 do 580 nm.
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.
8. 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 ϵ_λ .
9. Znając molowy współczynnik absorpcji oraz widmo absorpcji określ nieznaną stężenie roztworu dostarczonego przez prowadzącego.

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

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).

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

$$\begin{array}{c} \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \\ y = a \cdot x \end{array}$$

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

Regresja liniowa $y = ax$:

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

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

III. Literatura.

1. Z. Kęcki – „Podstawy spektroskopii molekularnej”, PWN, Warszawa 1982.
2. K. Pigoń, Z. Ruziewicz, „Chemia fizyczna”, PWN, Warszawa 1986.
3. A. Kawski, „Fotoluminescencja roztworów”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1992.
4. J.R.Lakowicz – „Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Springer, 2006.
5. B.Valeur – „Molecular Fluorescence. Principles and Applications”, 2001 Wiley-VCH.
6. J. Grzywacz – „Spektroskopia absorpcyjna drobin z zastosowaniem do badań luminescencyjnych”, skrypt uczelniany UG, Gdańsk 1984.
7. 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, 109,14382-14386, 2005.
8. H. Szydłowski, *Pracownia fizyczna*, PWN, 1994.

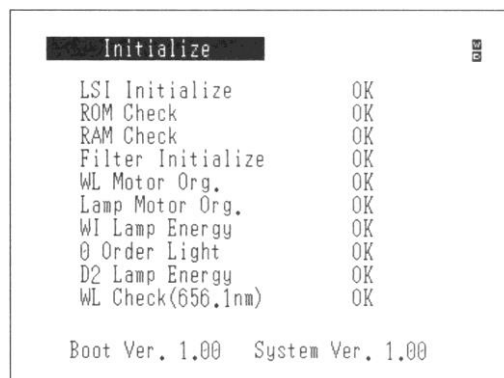
Dodatek

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.

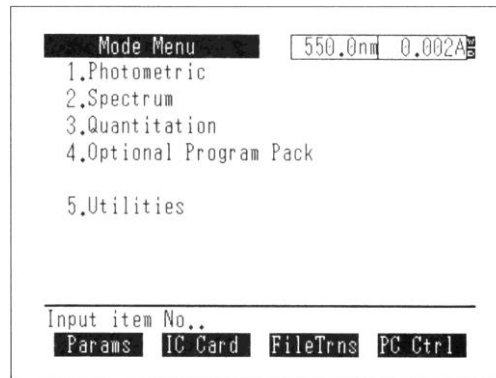


Wskazówka

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

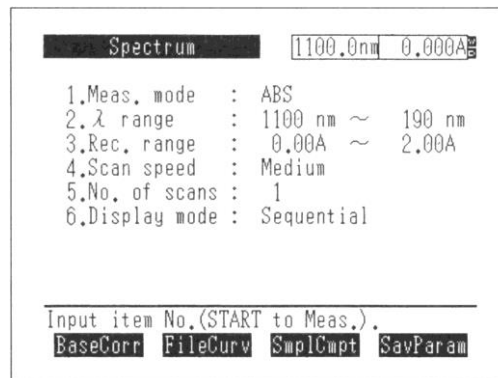
II. Ustawianie parametrów pomiarowych.

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

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.

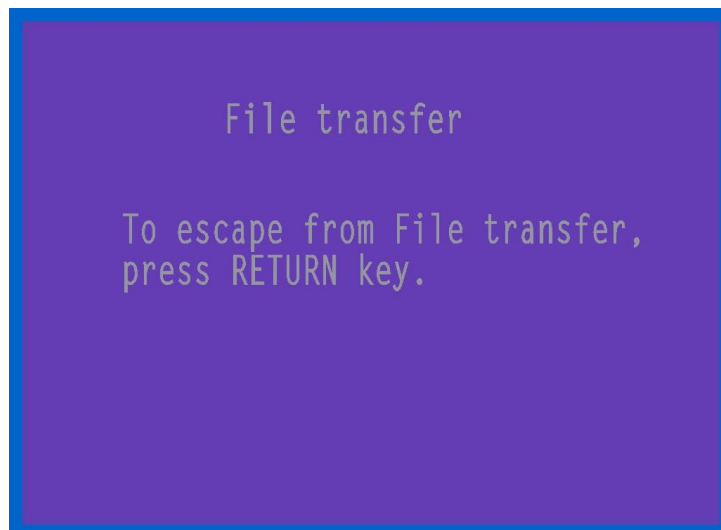
Po zakończonym pomiarze, należy przesłać dane do komputera. W tym celu spektrofotometr należy ustawić w trybie transferu plików. Wymaga to przejścia do trybu wyboru rodzaju pracy spektrofotometru (poprzez dwukrotne naciśnięcie klawisza RETURN). Na ekranie pojawi się okno:



Zdjęcie 7. Ekran spektrofotometru.

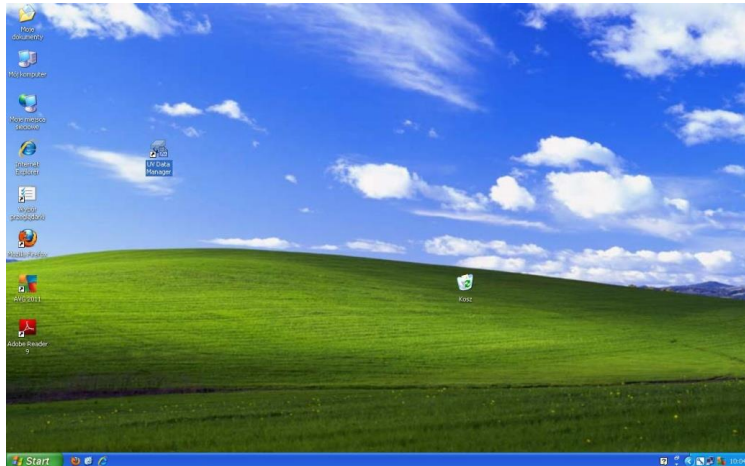
Klawiszami ze strzałkami wybierz OK, potwierdź wybór przyciskiem ENTER.

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*):



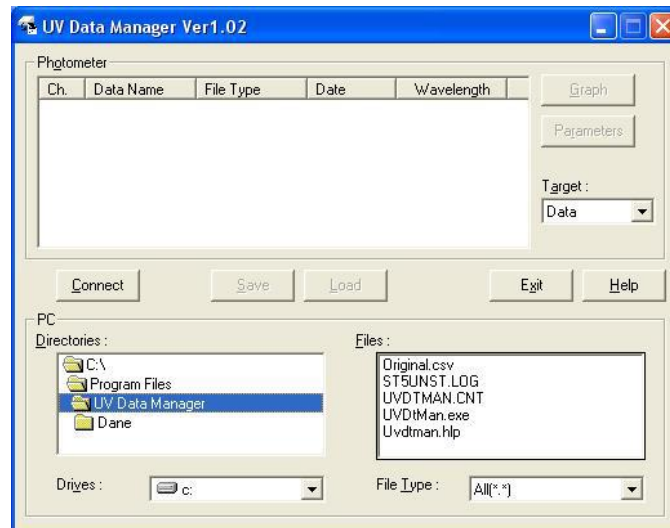
Zdjęcie 8. Ekran spektrofotometru w trybie przesyłania plików.

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.

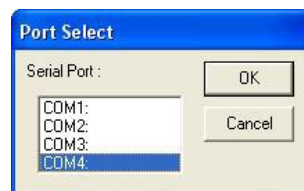
Po uruchomieniu programu otrzymuje się następujący widok ekranu (Zdjęcie 10):



Zdjęcie 10. Okno programu UV Data Manager.

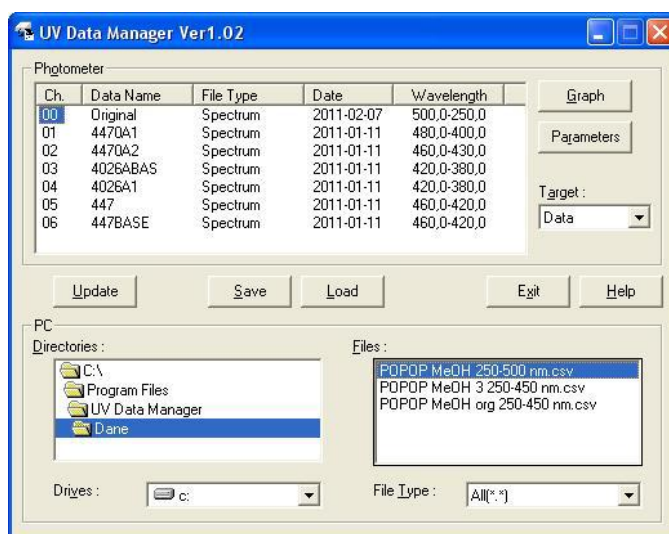
Należy połączyć komputer ze spektrofotometrem klikając raz na przycisk Connect.

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.