

POMIARY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Obowiązujące zagadnienia teoretyczne:

1. Właściwości promieniowania elektromagnetycznego
2. Widmo światła widzialnego
3. Wiązania chemiczne i przejścia elektronowe w cząsteczkach
4. Definicja absorpcji i transmitancji
5. Prawa absorpcji
6. Odchylenia od praw absorpcji
7. Budowa i zasada działania spektrofotometru
8. Zastosowanie spektrometrii UV-Vis

Zestaw do wykonania ćwiczenia zawiera :

- Spektrofotometr VIS723G
- Komputer z oprogramowaniem UVSoftware do obsługi spektrofotometru
- Kuwety szklane z korkiem o długości drogi optycznej 5mm lub 10 mm
- Kuwety szklane o różnych długościach drogi optycznej
- Pipeta do napełniania kuwet

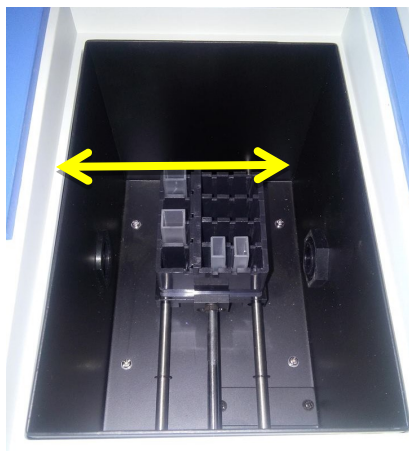
Zadanie 1. Wyznaczanie widma absorpcyjnego filtru barwnego.

Wykonanie zadania:

1. Włączyć spektrofotometr przynajmniej 10 minut przed rozpoczęciem pomiarów w celu odpowiedniego rozgrzania lamp oraz przygotować komputer do pracy włączając program UVSoftware.

Uwaga - Należy inicjalizować spektrofotometr tylko przy użyciu programu komputerowego (nie samego spektrofotometru).

2. Połączyć komputer ze spektrometrem – kliknąć przycisk CONNECT oraz INICJALIZUJ
3. Na pulpicie utworzyć nowy folder, w nazwie umieścić nazwisko osoby z grupy pomiarowej.
4. W menu programu UVSoftware należy wybrać tryb Spectrum i ustawić parametry pomiaru: Wavelength Range: 330 – 1100 nm, Display Range: -0,001 – 1,5, Sampling Interval: 2nm i Reference test: Repeat
5. Uruchomić pomiar przez naciśnięcie 'Start' w programie UVSoftware
6. Punktem odniesienia do badania filtru barwnego (set REFERENCE) będzie uchwyt filtru.



7. Na żądanie programu (set SAMPLE), jeden z filtrów barwnych ustawić na drodze świetlnej wiązki. Potwierdzenie odpowiedniego ustawienia uruchomi pomiar.
8. Dokonać przekształcenia widma Transmitancji w widmo Absorbancji i odwrotnie (zakładka SPECTRUM CONVERS, przycisk ABS→T%).

Które widmo jest bardziej czułe na zmiany?

9. Korzystając z prawego klawisza myszy dobrać optymalny zakres osi Y.
10. Powstałe widmo zapisać w stworzonym wcześniej folderze na pulpicie w formacie umożliwiającym edycję.

Jakiej barwy był badany filtr, światło o jakiej długości i barwie zostało zatrzymane, a jakie przepuszczone?

Rys.1. Komora pomiarowa spektrofotometru VIS723G z widocznymi kuwetami oraz zaznaczoną drogą wiązki świetlnej. Źródło światła znajduje się po lewej stronie

Zadanie 2. Wyznaczanie widma absorpcyjnego i transmitancji szkła kuwet oraz wody destylowanej.

Wykonaj pomiary jak w Zadaniu 1 dobierając odpowiednio próbki referencyjne: dla szkła - powietrze, dla wody - pusta kuweta.

Czy szkło lub woda absorbują intensywnie promieniowanie EM w badanym zakresie ?

**Uwaga - kuwety należy trzymać zawsze za matowe ścianki!
Nie dotykać powierzchni czynnych kuwety (powierzchni gładkich).**

Zadanie 3. Wyznaczanie widma absorpcyjnego roztworu błękitu metylenowego.

Błękit metylenowy posiada wiele zastosowań w biologii i medycynie oraz wyraźne pasmo absorpcji w zakresie widzialnym. Jest używany w diagnostyce, jako barwnik do wybarwiania biologicznych preparatów mikroskopowych, jako środek przeciwbakteryjny, a także przy zatruciach cyjankami i tlenkiem węgla

Wykonanie ćwiczenia:

1. Włączyć spektrofotometr przynajmniej 10 minut przed rozpoczęciem pomiarów w celu odpowiedniego rozgrzania lamp oraz przygotować komputer do pracy włączając program UVSoftware
2. W menu programu UVSoftware należy wybrać tryb Spectrum i ustawić parametry pomiaru: Wavelength Range: 330 – 1100 nm, Display Range: -0,001 – 1,5, Sampling Interval: 2 i Reference test: 1
3. Do pustej kuwety o grubości 0,5 cm nalać wody destylowanej, będzie ona stanowiła próbkę odniesienia
4. Do komory pomiarowej wstawić kuwetę z roztworem odniesienia (woda destylowana) oraz kuwetę z korkiem oznaczoną numerem 3, 4, lub 5 wypełnioną roztworem błękitu .
5. Na drodze wiązki światła ustawić próbkę referencyjną i przyciskiem start uruchomić badanie.
6. Na żądanie programu na drodze wiązki światła ustawić kuwetę z badanym roztworem błękitu (używając mechanizmu zmiany kuwet - ścianka czołowa przyrządu).
7. W razie potrzeby dostosować parametry tak aby widoczne było całe widmo absorpcyjne. Utworzyć widmo transmitancji.
8. Powstałe widmo zapisać w utworzonym folderze na pulpicie
9. W oparciu o dokonane pomiary wyznaczyć przedział o szerokości 100nm zawierający maksimum absorpcji, w którym pomiary widma należy wykonać ponownie z rozdzielczością 0,5 nm
10. Wyznaczyć długości fali odpowiadające maksymalnym wartościom absorbancji ($\lambda_{\max}$).

Zadanie 4. Oznaczanie stężeń roztworu metodą krzywej wzorcowej

Wykonanie ćwiczenia:

1. W Menu programu UVSoftware przejść do trybu Quantitative w którym będą wykonywane pomiary ilościowe.
2. Ustawić parametry: pod M WL wpisać wyznaczoną długość fali ($\lambda_{\max}$), ustawić pojedynczy test próbki odniesienia, a w zakładce Calculate jako wybraną formułę ustawić $\text{abs}=f(c)$
3. Do komory pomiarowej włożyć próbkę odniesienia z wodą destylowaną oraz trzy pierwsze kuwety z roztworami o znanych stężeniach.
4. Przed pomiarem każdego wzorcowego roztworu w tabeli zatytułowanej Standard należy wpisać jego stężenie.
5. Przeprowadzić pomiary dla każdej z kuwet o numerach od 1-7

- Po naciśnięciu przycisku Curve program automatycznie utworzy krzywą wzorcową referencyjną wyznaczającą zależność absorbancji od stężenia. Ręcznie należy tak dobrać zakres osi, aby wykres był odpowiednio duży.
- Z wykorzystaniem pipety pustą kuwetę napełnić do 2/3 roztworem błękitu o nieznanym stężeniu - może to być gotowy roztwór z kolby.
- Po przejściu do tabeli Unknown, kuwetę o nieznanym stężeniu mierzyć w taki sam sposób jak poprzednie roztwory.
- Program automatycznie obliczy stężenie na podstawie pomiaru absorbancji.
- Wyniki zapisać w utworzonym wcześniej katalogu na pulpicie.

Stężenia znanych roztworów:

kuweta	stężenie [mg/l]	
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		

Ponieważ program UVSoftware nie podaje niepewności wyznaczenia stężenia, więc nie zamykając go należy uruchomić arkusz kalkulacyjny Excel i przepisać do tabeli dane (stężenia i absorbancje) dla próbek o znanych stężeniach. Zaznaczyć pustą tablicę 2 x 3 (2 kolumny, 3 wiersze) i skorzystać ze zdefiniowanej funkcji reglinp (przyjmując Y - stężenie; X - absorbancja). Wartość w komórce 2 kolumny i 3 wiersza oznacza standardową niepewność oceny stężenia.

Zadanie 5. Wyznaczanie współczynnika absorpcji z zależności absorbancji od grubości warstwy absorbującej

Wykonanie ćwiczenia:

- Przygotowany w poprzednim zadaniu roztwór o wyznaczanym stężeniu nalać do kuwet o grubości warstwy 0,5cm, 1cm, 2cm, 3cm (**kuwety trzymamy zawsze za matowe ścianki!**), oraz do kuwet o odpowiadających rozmiarach nalać wodę destylowaną. (kuwety otrzymujemy od prowadzącego zajęcia).
- Ustawić parametry pomiaru: Decimals:1, Reference Test: Repeat, wpisać wyznaczoną długość fali ($\lambda_{\max}$) dla których chcemy przeprowadzić pomiar.
- Badaną próbkę o grubości 0,5cm wstawić do komory pomiarowej wraz z próbką odniesienia o tej samej grubości z wodą destylowaną i wyznaczyć maksimum absorbancji.
- Przeprowadzić pomiary dla każdego zestawu kuwet (0,5cm, 1cm, 2cm, 3 cm)
- Na podstawie otrzymanych wartości utworzyć w arkuszu kalkulacyjnym wykres zależności absorbancji od grubości warstwy absorbującej, wykreślić prostą regresji i odczytać jej współczynnik kierunkowy W oraz współczynnik korelacji R^2 .
- Wykorzystując II prawo absorpcji:

$$A = alc = Wl$$

gdzie: a – współczynnik absorpcji
 l – grubość warstwy absorbującej
 c – stężenie badanego roztworu

Obliczyć współczynnik absorpcji: $a = W/c$ oraz jego wymiar.

Zadanie 6.

- Sprawdzić wpływ niedomkniętego spektrofotometru na otrzymywane widma. Uzyskać widma absorpcyjne dla tej samej próbki błękitu metylenowego z zamkniętą i uchyloną komorą pomiarową, następnie wyeksportować je do Excela i porównać je na jednym wykresie

