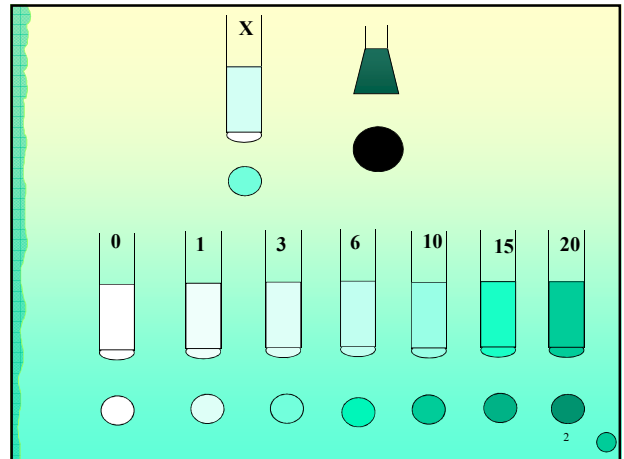


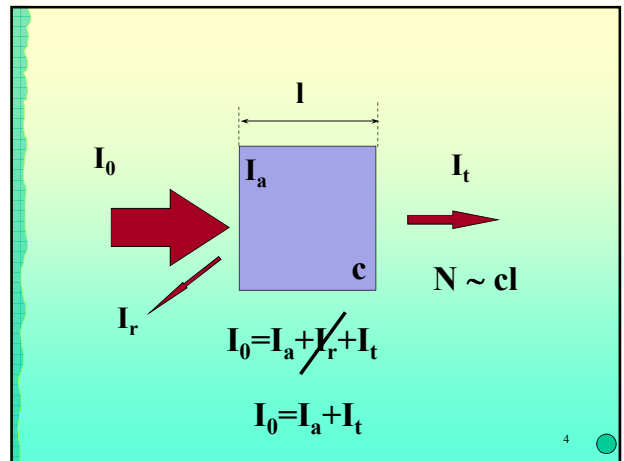
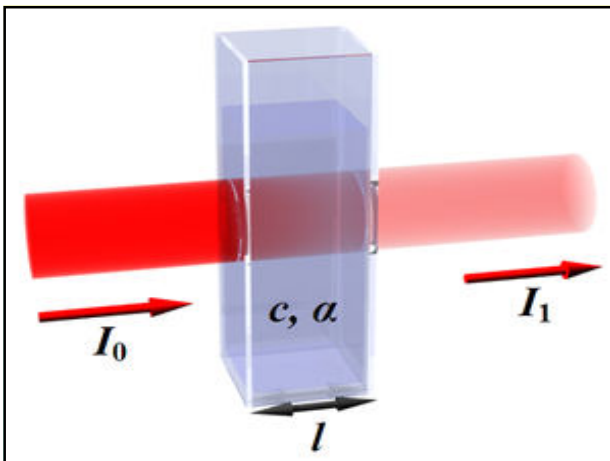
Oznaczenia fotometryczne



1



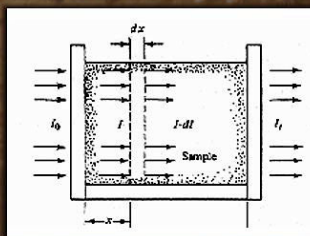
2



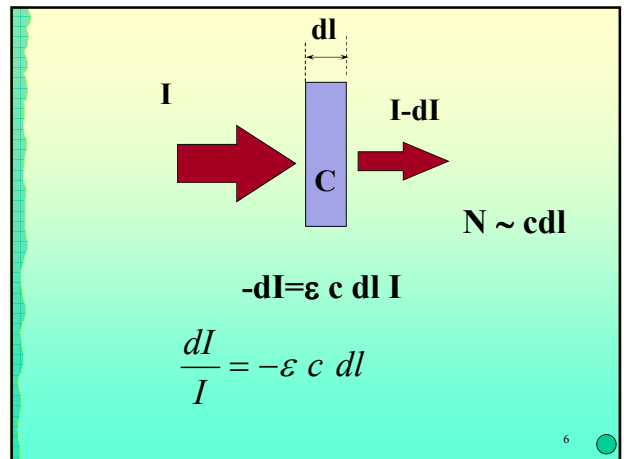
4

Beer-Lambert

$$N \sim cdx$$



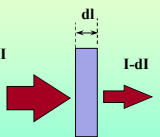
Suppose we have a very thin layer with length dx . Then, the number of molecules in that layer is proportional to cdx .



6

$-dI = \epsilon c \, dl \, I$

$\frac{dI}{I} = -\epsilon c \, dl$



$\int_{I_0}^{I_t} \frac{dI}{I} = -\int_0^l \epsilon c \, dl$

$\log \frac{I_t}{I_0} = -\epsilon c l$

$\log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon c l$

7

$\log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon c l$

$\log \frac{I_0}{I_t} = A$ **Absorbancja (Ekstynkcja)**

$A = \epsilon c l$

$\frac{I_t}{I_0} = T$ **Transmitancja (Przepuszczalność)**

$\log T = -\epsilon c l$

8

Prawo Beera - Lamberta

- Ilość zaabsorbowanego promieniowania jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej (l), stężenia oznaczanej substancji (c) i współczynnika absorpcji (ε), który jest specyficzny dla substancji przy danej długości fali

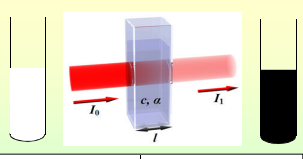
$A = \epsilon c l$

Jeśli stężenie wyrażone jest jako molowe (mol/dm³) współczynnik absorpcji nazywany jest *absorbancją molową*

9

$\log \frac{I_0}{I_t} = A$

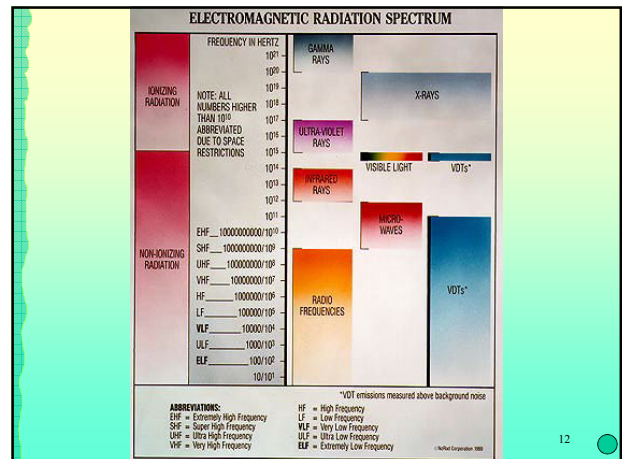
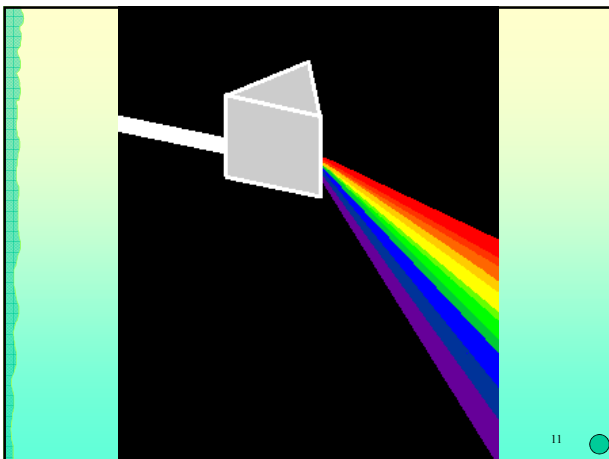
$A = \epsilon c l$

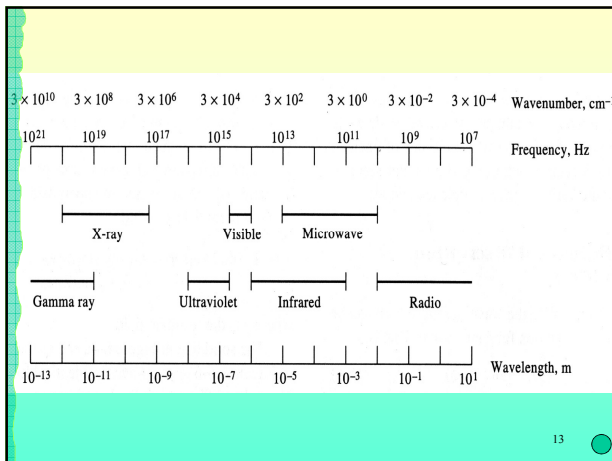


A	0	∞
T	1	0

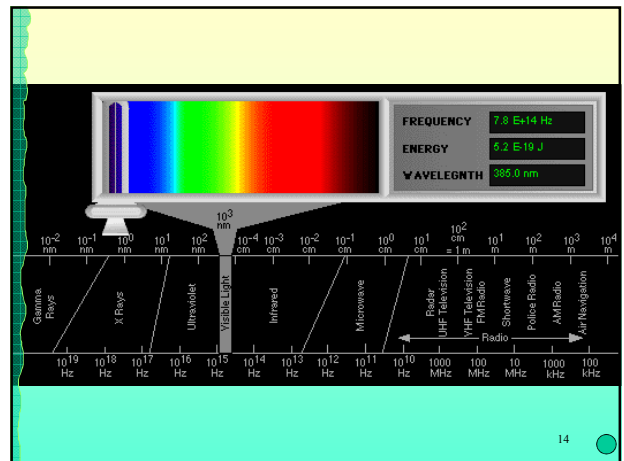
$\frac{I_t}{I_0} = T \quad \log T = -\epsilon c l$

10





13



14

Barwa światła i długość fali

[nm]

Czerwona	800 – 620
Pomarańczowa	620 – 595
Żółta	595 – 565
Zielona	565 – 490
Niebieska	490 – 440
Fioletowa	440 - 400

15

$$1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} = 10^{-7} \text{ cm}$$

$$1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m} = 10^{-8} \text{ cm}$$

$$1 \text{ \mu m} = 10^{-6} \text{ m} = 10^{-4} \text{ cm}$$

$$\text{m} - 10^{-3}$$

$$\mu - 10^{-6}$$

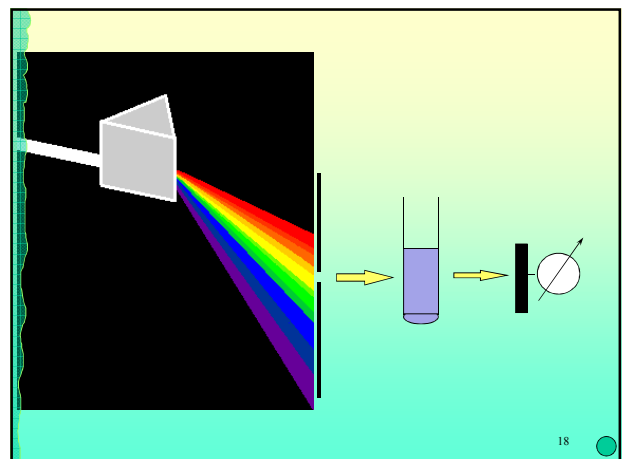
$$\text{n} - 10^{-9}$$

$$\text{p} - 10^{-12}$$

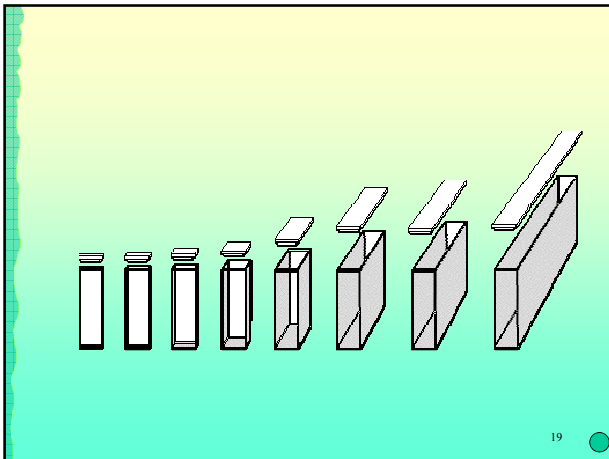
16

<i>nano</i>	n	10^{-9}	miliardowa
<i>mikro</i>	μ	10^{-6}	milionowa
<i>mili</i>	m	10^{-3}	tysięczna
<i>centy</i>	c	10^{-2}	setna
<i>decy</i>	d	10^{-1}	dziesiąta
		1	jeden
<i>deka</i>	da	10^1	deka
<i>hekto</i>	ha	10^2	hekto
<i>kilo</i>	k	10^3	kilo
<i>mega</i>	M	10^6	mega
<i>giga</i>	G	10^9	giga
<i>tera</i>	T	10^{12}	tera

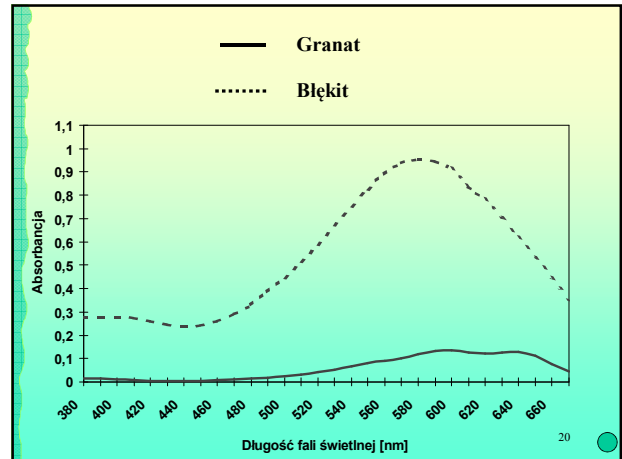
17



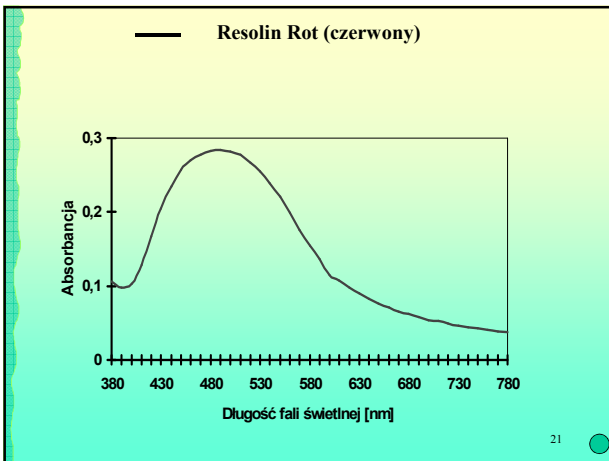
18



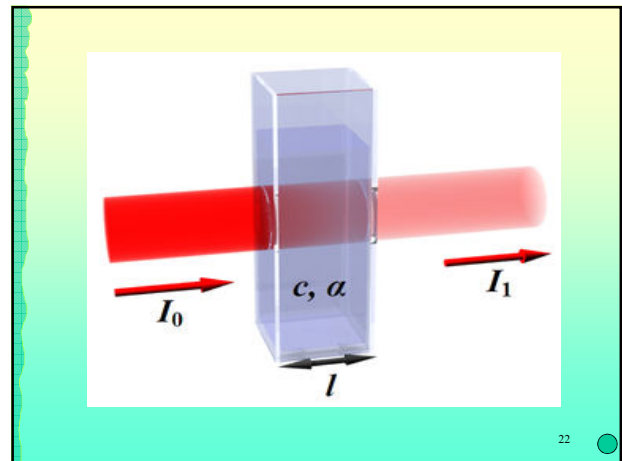
19



20



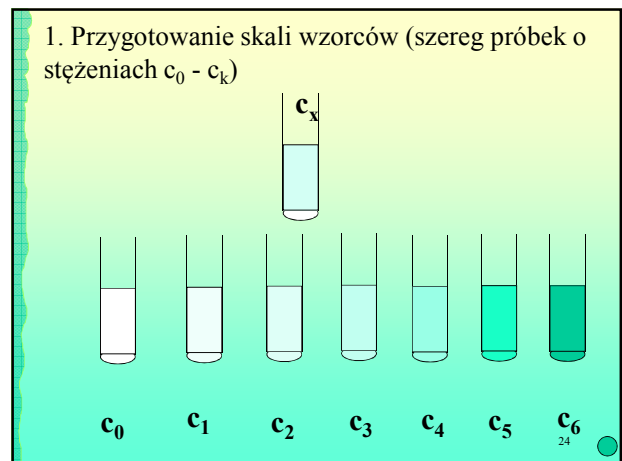
21



22

- ### Przebieg oznaczeń fotometrycznych
1. Przygotowanie skali wzorców (szereg próbek o stężeniach $c_0 - c_k$)
 2. Określenie długości fali świetlnej do pomiarów (λ_m przy, której występuje maksimum absorpcji na krzywej widma absorpcyjnego)
 3. Wykonanie pomiarów absorbancji dla skali wzorców
 4. Ustalenie zależności $c = f(A)$
 5. Pomiar absorbancji dla badanej próbki i określenie jej stężenia c_x

23



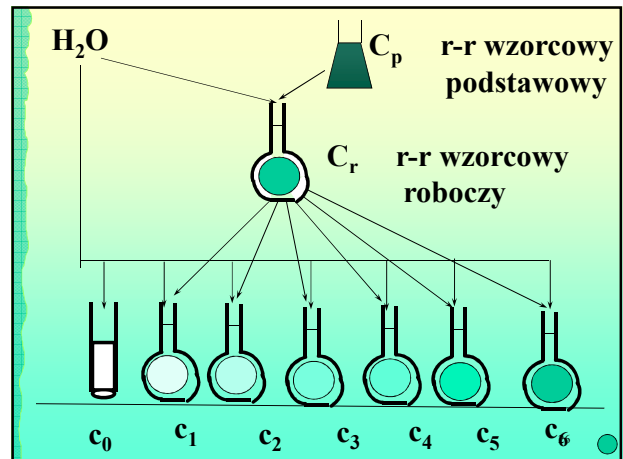
24

Ustalenie ilości i liczbowych wartości stężeń

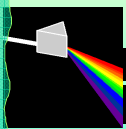
$$c_0 - c_k \quad c_0 < c_x < c_k$$

Przygotowanie szeregu roztworów o przyjętych stężeniach przez odpowiednie rozcieńczanie roztworów podstawowych i roboczych

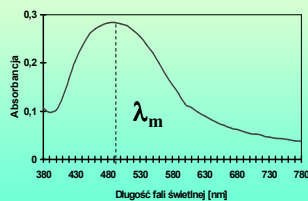
25



2. Określenie długości fali świetlnej do pomiarów (λ_m przy, której występuje maksimum absorpcji na krzywej widma absorpcyjnego)



$$380 \text{ nm} < \lambda < 780 \text{ nm}$$



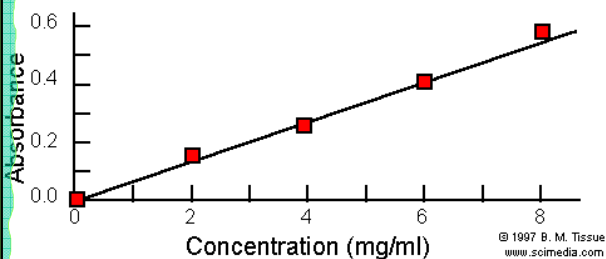
27

3. Wykonanie pomiarów absorpcji dla wcześniej przygotowanych roztworów (skali wzorców)

$$c_i \longrightarrow A_i$$

28

4. Ustalenie zależności $c = f(A)$
[$A = f(c)$]

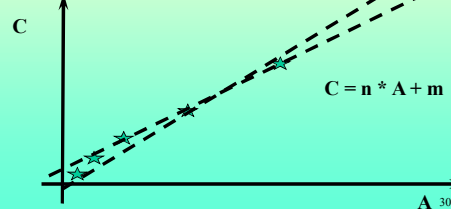


© 1997 B. M. Tissue
www.scimed.com

29

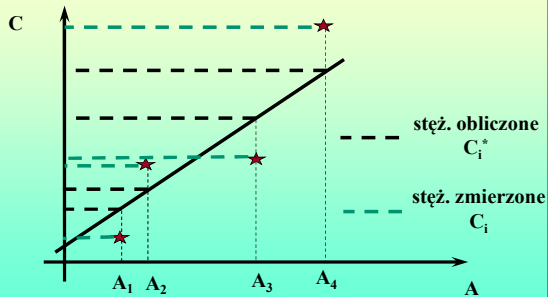
Opracowanie wyników oznaczeń fotometrycznych

1. Wykonanie k pomiarów absorpcji dla k próbek o różnych stężeniach i ustalenie zależności pomiędzy intensywnością zabarwienia (Absorbancją) a stężeniem substancji $C = f(A)$



30

Jak wybrać prostą, która najlepiej opisuje zależność $c=f(A)$?



31

Metoda najmniejszych kwadratów

Najlepszą prostą, w sensie metody najmniejszych kwadratów, będzie ta prosta, dla której suma kwadratów odległości punktów mierzonych po osi C będzie najmniejsza

$$\sum_{i=1}^{i=k} (C_i^* - C_i)^2 = \min$$

32

$$C_i^* = nA_i + m$$

$$\sum_{i=1}^{i=k} (nA_i + m - C_i)^2 = \min$$

Funkcja posiada minimum w p-cie, w którym zerują się wartości pierwszej pochodnej (względem poszukiwanych wartości n i m)

$$\begin{cases} \frac{d}{dn} \sum_{i=1}^{i=k} (nA_i + m - C_i)^2 = 0 \\ \frac{d}{dm} \sum_{i=1}^{i=k} (nA_i + m - C_i)^2 = 0 \end{cases}$$

33

$$\begin{cases} 2 \sum_{i=1}^{i=k} A_i (nA_i + m - C_i) = 0 \\ 2 \sum_{i=1}^{i=k} (nA_i + m - C_i) = 0 \end{cases}$$

$$\begin{cases} n \sum_{i=1}^{i=k} A_i^2 + m \sum_{i=1}^{i=k} A_i = \sum_{i=1}^{i=k} A_i C_i \\ n \sum_{i=1}^{i=k} A_i + m * k = \sum_{i=1}^{i=k} C_i \end{cases}$$

34

$$m = \frac{\sum_{i=1}^{i=k} A_i^2 \sum_{i=1}^{i=k} C_i - \sum_{i=1}^{i=k} A_i \sum_{i=1}^{i=k} A_i C_i}{k \sum_{i=1}^{i=k} A_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{i=k} A_i \right)^2}$$

$$n = \frac{k \sum_{i=1}^{i=k} A_i C_i - \sum_{i=1}^{i=k} A_i \sum_{i=1}^{i=k} C_i}{k \sum_{i=1}^{i=k} A_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{i=k} A_i \right)^2}$$

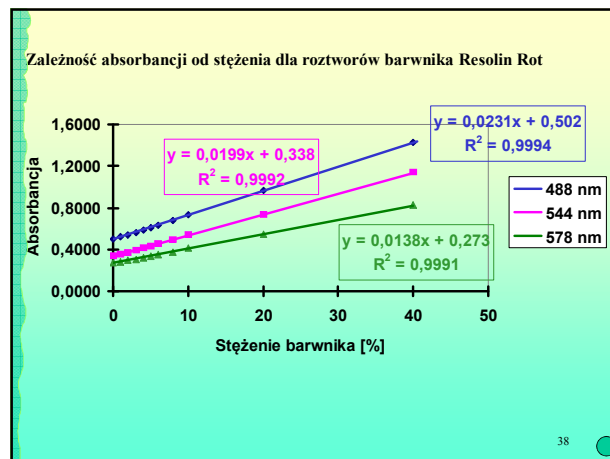
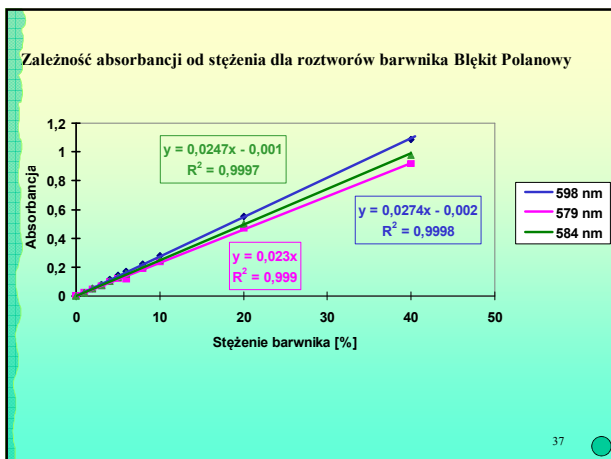
35

Współczynnik korelacji określa dopasowanie prostej o współczynnikach n i m do wyników pomiarów c_i ; A_i

$$r^2 = n^2 \frac{k \sum_{i=1}^{i=k} A_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{i=k} A_i \right)^2}{k \sum_{i=1}^{i=k} c_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{i=k} c_i \right)^2}$$

$$r^2 \in \langle 0; 1 \rangle$$

36



1. Ustalenie spodziewanego zakresu stężeń (c_x)
 2. Przygotowanie skali wzorców (szereg próbek o stężeniach od c_0 do c_k)
 3. Określenie długości fali świetlnej do pomiarów (λ_m przy, której występuje maksimum absorpcji na krzywej widma absorpcyjnego)
 4. Wykonanie pomiarów absorpcji dla skali wzorców (wyniki absorpcji dla próbek o znanych stężeniach)
 5. Ustalenie zależności $c = f(A)$ (wartości m i n we wzorze $c = n \cdot A + m$)
 6. Pomiar absorpcji A_x badanej próbki
 7. Obliczenie stężenia c_x ($c_x = n \cdot A_x + m$)
- 39

W celu określenia stężenia barwnej substancji X w badanej próbce wykonano następujące czynności:

do kolby miarowej o pojemności 0,2 dm³ odmierzone 20 cm³ roztworu barwnej substancji X o stężeniu 1g/dm³. Kolbę uzupełniono wodą do kreski i wymieszano uzyskując w ten sposób roboczy roztwór wzorcowy substancji X;

do kolb miarowych o pojemności 100 cm³ odmierzone odpowiednio 0; 1; 2; 5; 10; 20 i 40 cm³ wzorcowego roztworu roboczego. Kolby uzupełniono wodą do kreski i wymieszano;

wykonano pomiar absorpcji dla tak przygotowanych roztworów wzorcowych uzyskując wyniki 0,05; 0,07; 0,09; 0,14; 0,22; 0,40 i 0,76;

pomiar absorpcji badanej próbki dał wartość absorpcji równą 0,49.

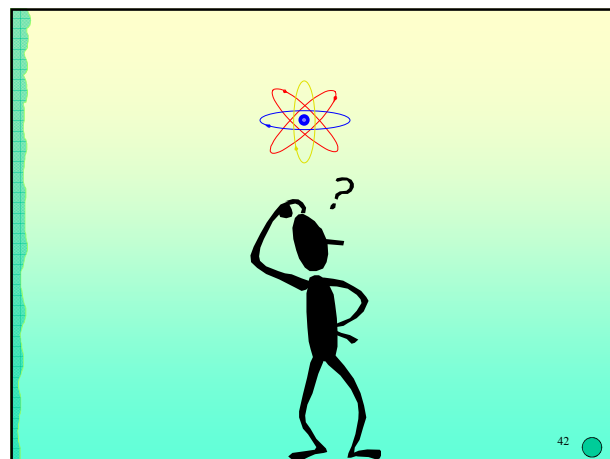
Oblicz stężenie substancji X w badanej próbce.

40

Podaj procedurę przygotowania fotometrycznej analizy barwnej substancji X dysponując następującymi danymi:

- stężenie substancji X w badanej próbce zawiera się w granicach 0 - 5 ppm;
- stężenie wzorcowego podstawowego roztworu substancji X wynosi 25 g/dm³;
- roztwory stanowiące skalę wzorców (7 stężeń) należy przygotować w kolbach miarowych o pojemności 0,2 dm³;
- Minimalna objętość odmierzanych roztworów nie powinna być mniejsza niż 1 ml.

41



10 ml (**a**) podstawowego r-ru wzorcowego o stężeniu 200 ppm (**b**) umieszczono w kolbie miarowej o pojemności 200 cm³ (**c**). Kolbę uzupełniono wodą do kreski i wymieszano uzyskując w ten sposób roboczy r-r podstawowy. Do trzech kolb miarowych o pojemności 50 ml (**d**) odmierzone odpowiednio 5; 10 i 20 cm³ (**e₁, e₂, e₃**) roboczego r-ru podstawowego.

Określ stężenia tak uzyskanych trzech roztworów.