

Instrukcja stanowiskowa do ćwiczenia M8 z użyciem spektrofotometru UV/VIS VIS-723G

1. Włączyć: spektrofotometr Rayleigh (włącznik znajduje się na prawym boku instrumentu), następnie komputer i monitor stojący przy spektrofotometrze.



2. Poprosić prowadzącego zajęcia o podanie stężeń roztworów wzorcowych, dla których należy obliczyć objętości roztworu wyjściowego V_0 oraz objętości wody V_w dla podanych stężeń (patrz część teoretyczna instrukcji). Wyniki wpisać do Tabeli 1.

l.p.	C [M]	V_0 [ml]	V_w [ml]	A (w drugim maksimum)
1.	0	0	10	
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				

3. Korzystając z pipety automatycznej przygotować roztwory wzorcowe.
4. Uruchomić aplikację **UVsoftware**. Na wstążce poleceń kliknąć ikonę „**SETTINGS**”. W okienku ustawień, wybrać: **Com Port: COM3** oraz **SN: 12400150**; zatwierdzić przyciskiem „**OK**”.
5. Uruchomić połączenie klikając przycisk „**Connect**” (lewy dolny narożnik okienka) oraz potwierdzić przeczytany komunikat „**Connect success!**” (w okienku informacyjnym przycisk „**OK**”).
6. Uruchomić inicjację systemu klikając przycisk „**Initialization**” (lewy dolny narożnik okienka) oraz potwierdzić przeczytany komunikat „**Initialization success!**” (w okienku informacyjnym przycisk „**OK**”).
7. **W razie pojawienia się innych komunikatów zgłosić problem osobie prowadzącej ćwiczenia!!!**

8. Wybrać z menu wstążki ikonę „**Spectrum**”, a następnie ikonę „**Param**”.
9. Po otwarciu okna parametrów ustawić:
Data Mode: **Abs**
Wavelength Range: **340-530nm**
Display Range: **-0.010 – 1.000**
Scan mode: **Once**
Save mode: **Manual**
 Overlay
Sampling Interval (nm): **5**
Scan Speed: **Middle**
Decimals: **3**
Reference Test: **Once**
10. Zatwierdzić ustawienia parametrów skanowania przyciskiem „**OK**”.
11. Z paska poleceń wybrać ikonę „**Start**” i postępować zgodnie z poleceniami wyświetlanymi na ekranie monitora.
12. Pojawi się napis: “**Please set the reference position.....**” (“Proszę ustawić pozycję odnośnika....”).
 - otworzyć pokrywę komory pomiarowej spektrofotometru,
 - wlać wodę destylowaną do przezroczystej kuwety (Uwaga! Objętość wody nie powinna być niższa niż wskazuje to trójkąt znajdujący się na ściance kuwety, powinna być ok. 0,3 - 0,5 cm poniżej wysokości kuwety), - papierowymi ręczniczkami znajdującym się przy stanowisku pracy **przetrzeć ścianki kuwety** uważając, aby do wody nie nawrzucać kłaków celulozy (**zewnętrzne powierzchnie kuwety muszą być czyste i suche!!!!**),
 - **trzymając za chropowate ścianki**, kuwetkę z odnośnikiem (wodą destylowaną) wstawić do koszyczka pomiarowego (na poniższym zdjęciu pozycja kuwety została zaznaczona pomarańczowym kółkiem), kierując przezroczyste ścianki w bieg promieni świetlnych – wprowadzając roztwór w bieg promieni świetlnych,



- delikatnie zamknąć pokrywę i zatwierdzić wykonanie polecenia klikając „OK” w oknie komunikatu.
- 13. Następuje rejestracja linii odniesienia... Koniec rejestracji oznajmia komunikat: **“Please set the SAMPLE position....”** (“Proszę ustawić pozycję PRÓBKII....”).
- 14. W tym momencie należy, klikając **”OK”**, rozpocząć rejestrację widma absorpcji odnośnika. Koniec rejestracji oznajmia komunikat: **„Scan complete!”**, którego odnotowanie należy potwierdzić klikając **”OK”**.
- 15. Wodę z kuwetki wlać do czystej zlewki. Kuwetkę odwrócić nad ręczniczkiem papierowym, bardzo lekko uderzając pozbyć się wody pozostałej w kuwecie.
- 16. Przemyc kuwetkę badanym roztworem o najmniejszym stężeniu (do połowy napełnić ją roztworem, wylać roztwór z kuwetki do zlewki z wodą. Uwaga! Kuwetkę można przemyć badanym roztworem dwukrotnie, jeśli jego objętość w probówce na to pozwoli). Kuwetkę odwrócić nad ręczniczkiem papierowym, bardzo lekko uderzając pozbyć się roztworu pozostałego w kuwecie.
- 17. Wlać badany roztwór do przezroczystej kuwetki (Uwaga! Objętość roztworu powinna być taka sama jak badanej wody destylowanej (ok. 0,3 - 0,5 cm poniżej wysokości kuwety), - papierowymi ręczniczkami znajdującym się przy stanowisku pracy przetrzeć ścianki kuwetki uważając, aby nie nawrzucać do roztworu kłaków celulozy (**zewnętrzne powierzchnie kuwetki muszą być czyste i suche!!!!**)
 - kuwetkę z roztworem wstawić do koszyczka pomiarowego,
 - delikatnie zamknąć klapę spektrofotometru.
- 18. Zmierzyć widma absorpcji poszczególnych roztworów wzorcowych – z paska poleceń za każdym razem wybrać ikonę **„Start”**, pojawi się komunikat: **“Please set the SAMPLE position....”** (“Proszę ustawić pozycję PRÓBKII....”).
- 19. Po zakończeniu pomiaru absorbancji (**„Scan complete!”**), którego odnotowanie należy potwierdzić klikając **”OK”** zmieniać roztwór na kolejny o wyższym stężeniu. Należy pamiętać o przemywaniu kuwetki badanym roztworem, trzymaniu kuwetki za chropowate ścianki oraz o dokładnym wycieraniu ścianek kuwetki.
- 20. Dla roztworu o największym stężeniu odczytać długość fali I pasma absorpcji (maksimum pasma o dłuższej fali, II maksimum absorpcji). Przy ustalonej długości fali odczytać absorbancję dla badanych roztworów – wyniki wpisać do Tabeli 1.
- 21. Zarejestrowane widma absorpcji program przechowuje oddzielnie. Aby zapisać i wydrukować poszczególne widma należy:
 - wybrać zakładkę z widmem (np. Data 1, Data 2...)
 - na pasku poleceń (powyżej zakładek z widmami) kliknąć polecenie **„Data”** (rozwija się menu)
 - z menu wybrać opcję **„Save”** (otwiera się okno zapisu)
 - wybrać katalog **„Pulpit”** (z lewej strony okna)
 - utworzyć katalog (ikona folderu z gwiazdką, górny prawy róg) nadając mu unikalną dla grupy studenckiej nazwę i wejść w niego
 - nadać nazwę zapisywanemu plikowi (unikalną dla pliku)
 - zatwierdzić klikając przycisk **„Zapisz”**.
 - widma należy zapisać wg poleceń kolejno.
- 22. Wydruk widm absorpcji:
 - wybrać zakładkę **„Data”** zawierającą wszystkie widma
 - prawym przyciskiem myszy kliknąć dowolne miejsce wykresu (rozwija się menu)

- wybrać polecenie „**Autosize**” (następuje automatyczne dopasowanie zakresu osi do wykresów widm)
 - na pasku poleceń (powyżej zakładek z widmami) kliknąć polecenie „**Report**” (rozwija się menu)
 - wybrać polecenie „**Preview**” (wyświetla się raport zawierający dane i wykres widm)
 - wybrać polecenie „**Print**” (ikona drukarki – następuje drukowanie wykresów widm)
 - zamknąć okno podglądu wydruku (ikona krzyżyk)
23. Wykres zależności absorbancji od stężeń badanych roztworów ryboflawiny $A = f(C)$:
- dwukrotnie szybko kliknąć na ikonę z programem **GraphPad Prism** (otworzy się program):
 - z Tabeli 1 przepisać do **kolumny X** wartości stężeń roztworów wzorcowych,
 - wartości maksymalnej absorbancji należy wpisać do **kolumny Y**.
24. Przy użyciu programu **GraphPad Prism**, wykonać analizę regresji liniowej otrzymując parametry równania prostej:
- **slope**: [wartość parametru]±[niepewność parametru] (współczynnik kierunkowy prostej - wartość parametru „a” we wzorze $C_x = \frac{A_x - b}{a}$),
 - **Yintercept**: [wartość parametru]±[niepewność parametru] – współczynnik kierunkowy prostej „b” w powyższym wzorze.
25. Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć nieznaną stężenie C_x roztworu, będącego mieszaniną kilku innych roztworów
26. Wykonać rachunek niepewności tych stężeń – w tym celu należy wykorzystać wzory podane w części teoretycznej do tego ćwiczenia.