

Imię i Nazwisko Studenta	Data	Ocena	Podpis Prowadzącego

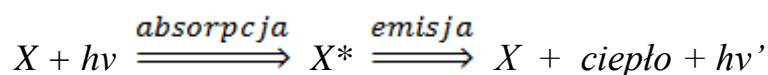
FLUORYMETRIA

Na ćwiczeniach obowiązuje materiał zawarty w podręczniku:

R. Kocjan „Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna. Tom 2” –

rozd. 1.4.2 (str. 21 -23); 5.6 – 5.6.1.1 (str. 102 – 110)

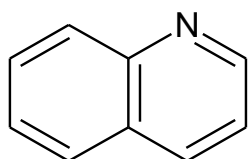
Luminescencja to zjawisko emisji promieniowania elektromagnetycznego, która następuje w czasie nie krótszym niż 10^{-10} s od chwili zaabsorbowania energii przez atomy lub cząsteczki danej substancji.



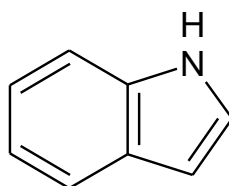
Ze względu na czynnik, który wywołuje to promieniowanie, luminescencję dzielimy na:

- fotoluminescencję - wywołana absorpcją fotonów w zakresie UV-VIS (fluorescencja i fosforescencja).
- chemiluminescencję - wytworzona w trakcie niektórych reakcji chemicznych
- bioluminescencję - rodzaj chemiluminescencji, wywołana w wyniku procesów biochemicznych zachodzących w organizmach żywych np. przez świetliki. Występuje również u wielu bakterii, grzybów, niektórych pierwotniaków oraz organizmów głębinowych
- elektroluminescencję - powstaje na skutek zderzeń cząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym z luminoforem
- tryboluminescencję - luminescencja wywołana poprzez tarcie, zginanie, ściskanie
- rentgenoluminescencję - wywołana promieniowaniem rentgenowskim
- radioluminescencję – świecenie pod wpływem promieniowania α , β , γ
- sonoluminescencję - wywołana ultradźwiękami
- termoluminescencję - wywołana przez ogrzewanie substancji, która wcześniej została pobudzona przez światło.

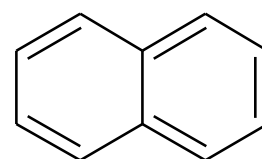
Najbardziej intensywną fluorescencję wykazują cząsteczki o płaskiej, usztywnionej strukturze, zawierające pierścienie aromatyczne, np. chinolina, indol czy naftalen.



chinolina



indol



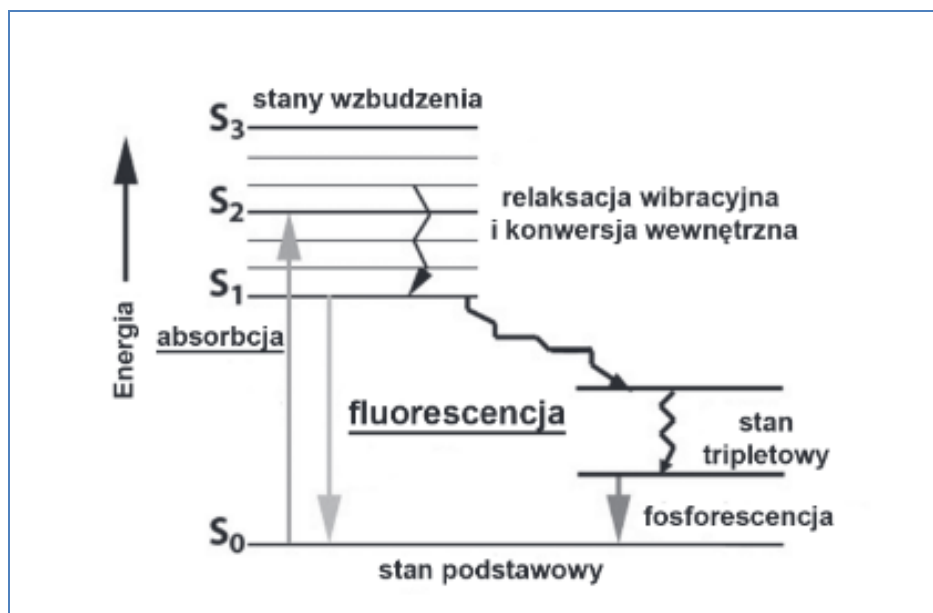
naftalen

Najczęściej związkami fluorescencyjnymi są:

1. Związki aromatyczne i heterocykliczne, polimery (np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne).
2. Niektóre barwniki (np. fluoresceina, rodamina, chlorofil).
3. Związki biologiczne:
 - a) aromatyczne aminokwasy (np. tyrozyna, tryptofan)
 - b) zasady nukleinowe (np. cytozyna, uracyl) w DNA i RNA
 - c) niektóre witaminy i hormony (np. tiamina, adrenalina).
4. Luminofory nieorganiczne (np. siarczki cynku i kadmu). Charakteryzuje je wysoka wydajność świetlna. Luminofory siarczkowe są dobrymi elektroluminoforami, rentgenoluminoforami oraz katodoluminoforami.

Fizyczne podstawy luminescencji

Każda cząsteczka posiada charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych – elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych. W wyniku absorpcji promieniowania ultrafioletowego lub widzialnego cząsteczka przechodzi do jednego ze stanów wzbudzonych, a następnie dąży do osiągnięcia stanu równowagi, czyli stanu, w którym energia całkowita przyjmuje wartość minimalną (emisja energii). Procesy absorpcji i emisji energii przedstawia się schematycznie na tzw. diagramie przejść energetycznych Jabłońskiego - **ryc. 1**.



Ryc. 1. Diagram Jabłońskiego.

W większości cząsteczek, w stanie podstawowym, elektrony są sparowane (zajmują ten sam orbital a ich spiny są przeciwne). Jest to tzw. stan singletowy S₀. Absorpcja energii może spowodować przeniesienie elektronu na poziom o wyższej energii bez zmiany jego spinu (singletowy stan wzbudzony). Dezaktywacja tego stanu może następować na różne sposoby. Cząsteczka w stanie wzbudzonym (czas życia w tym stanie wynosi 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ s) może ulec bezpromienistej konwersji wewnętrznej (relaksacji oscylacyjnej) z utratą energii oscylacyjnej do najniższego poziomu oscylacyjnego S₁ na wzbudzonym poziomie elektronowym. Wyemitowany wtedy foton przy przejściu z tego stanu do stanu podstawowego S₀ ma energię mniejszą niż foton wzbudzający. Widmo emisyjne związane z tym przejściem przesunięte jest więc w stronę fal dłuższych stosunku do widma absorpcji (tzw. przesunięcie Stokesa), a zjawisko to nazywa się zjawiskiem fluorescencji.

Po relaksacji oscylacyjnej, wzbudzona cząsteczka, może także wykonać tzw. przejście międzysystemowe (interkombinacyjne) ze wzbudzonego stanu singletowego do wzbudzonego stanu tripletowego T₁ (elektrony nie są sparowane, ich spiny są równoległe) i dopiero później do stanu podstawowego S₀. Przejście między stanami T₁ i S₀, jako stanami o różnej multipletowości, jest tzw. przejściem wzbronionym, statystycznie mało prawdopodobnym. Cząsteczka przez względnie długi czas przebywa w stanie wzbudzonym (czas życia cząsteczki w stanie trypletowym jest dłuższy niż w stanie singletowym i trwa od 10⁻⁴ do 10⁴ s), następnie łamiąc multipletową regułę wyboru, emituje foton i wraca do podstawowego stanu elektronowego S₀. To zjawisko nazywamy fosforescencją. Fosforescencja jest zjawiskiem bardziej rozciągniętym w czasie i o mniejszej intensywności niż fluorescencja.

Dla małych stężeń substancji natężenie fluorescencji I_f jest wprost proporcjonalne do stężenia substancji:

$$I_f = K \cdot I_p \cdot a \cdot c \cdot l$$

gdzie:

K - stała aparaturowa

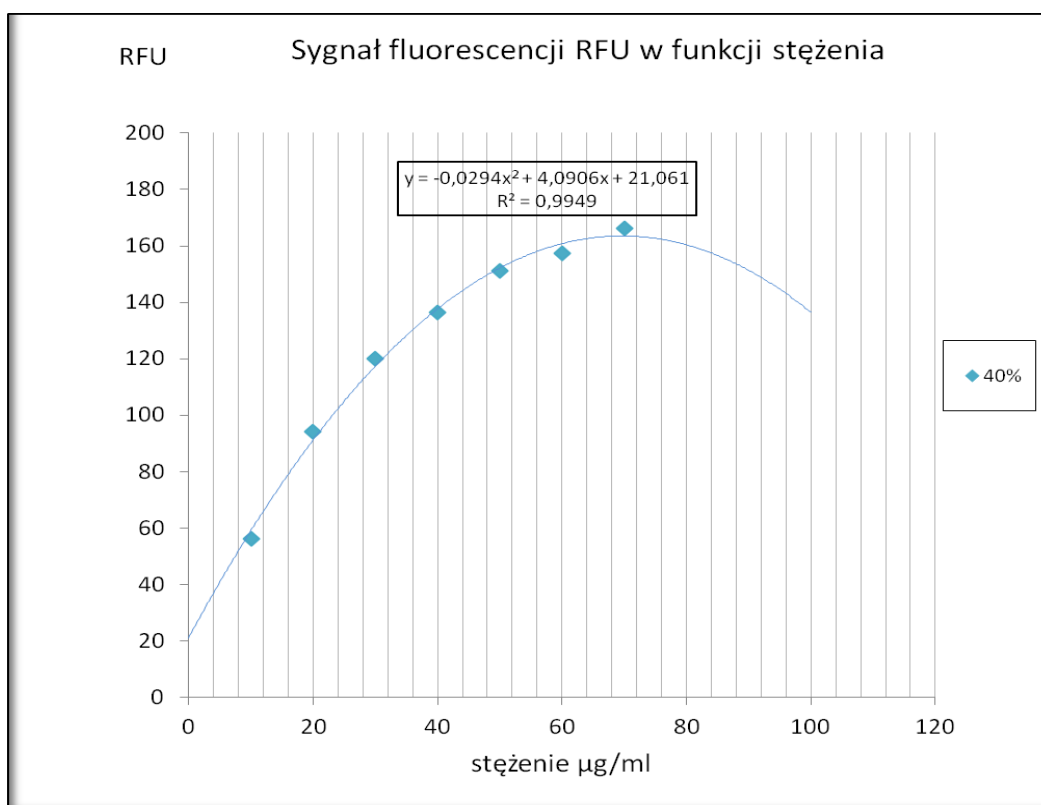
I_p - natężenie promieniowania padającego (wzbudzającego)

a - współczynnik absorpcji promieniowania wzbudzającego

c - stężenie substancji oznaczanej

l - grubość warstwy roztworu

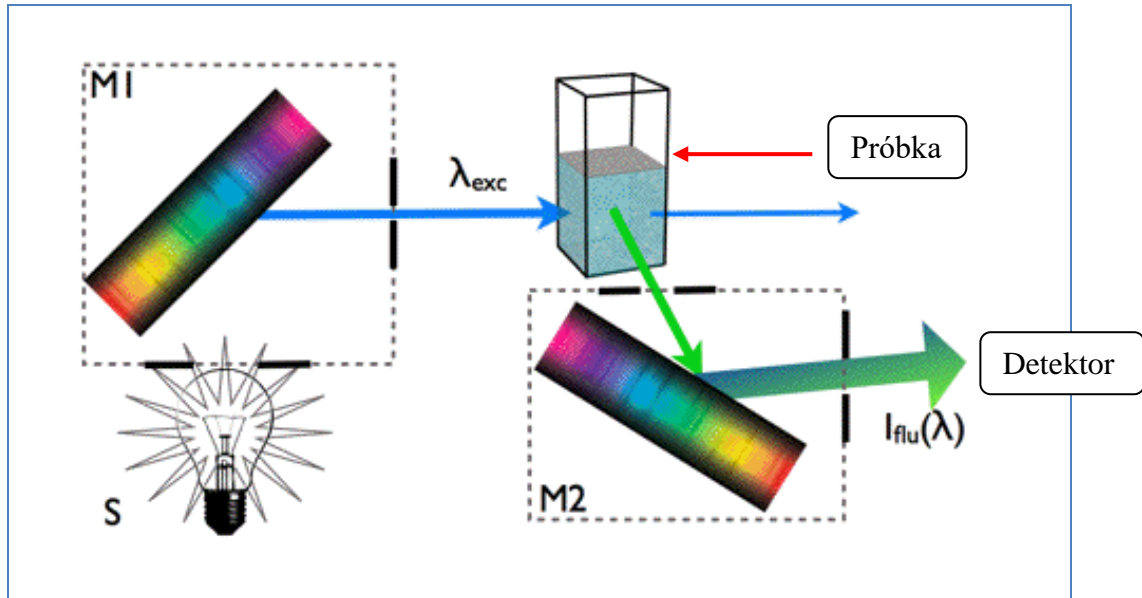
W roztworach rozcieńczonych intensywność fluorescencji jest więc liniową funkcją stężenia luminoforu. Gdy stężenie substancji oznaczanej przekroczy jednak pewną granicę, fluorescencja przestaje być liniową funkcją stężenia a nawet może maleć. Jest to zjawisko zwane zjawiskiem gaszenia stężeniowego. Tłumaczy je teoria asocjacji stężeniowej, która zakłada, że cząsteczki zasocjowane mimo tego, że pochłaniają energię, nie są zdolne do jej emisji. Zjawisko to ilustruje poniższy wykres – **ryc. 2**.



Ryc. 2. Zależność I_f w funkcji stężenia chlorowodoru chininy (zakres stężeń od 10 do 100 $\mu\text{g/ml}$ związku w 0,1 mol/l H_2SO_4). Kuweta $l=1$ cm.

Układ pomiarowy

Przyrządy stosowane w pomiarach fluorescencyjnych noszą nazwę fluorymetrów i spektrofluorymetrów (służą do otrzymywania pełnych widm fluorescencyjnych). Podstawowy układ pomiarowy przedstawia ryc. 3.



Ryc. 3. Schemat fluorymetru.

Fluorimetr zbudowany jest z następujących elementów:

1. Źródło promieniowania wzbudzającego S

- żarówka wolframowa lub lampa wolframowo-halogenowa, stosowane w zakresie światła widzialnego (400 - 800 nm)
- lampy deuterowe lub łukowe lampy ksenonowe, stosowane w zakresie nadfioletu (200 - 400 nm)
- lasery atomowe, jonowe i barwnikowe.

2. Monochromatory M1 i M2

- pryzmaty i siatki dyfrakcyjne w spektrofluorymetrach
- filtry we fluorymetrach

Służą one do wyboru wiązki światła o danej długości fali z widma niemonochromatycznego. Stosowane są dwa monochromatory (filtry).

Pierwszy (M_1) służy do wybrania określonej długości fali światła padającego na próbkę, czyli światła wzbudzającego.

Drugi (M_2) monochromatyzuje światło emitowane przez próbkę. Umieszczony jest on zwykle za próbką pod kątem 90° w stosunku do światła padającego na próbkę, dochodzi więc do niego tylko promieniowanie emitowane a nie wzbudzające.

3. *Próbka*

Przygotowuje się ją najczęściej w postaci roztworu i umieszcza w kuwecie o grubości 1 cm. Jeżeli pomiary prowadzimy w zakresie UV używamy kuwet kwarcowych, jeżeli pracujemy w zakresie VIS stosujemy kuwety ze szkła lub plastiku.

4. *Detektory*

Do detekcji promieniowania w zakresie UV-VIS stosuje się fotopowielacze lub detektory wielokanałowe typu *diode-array*.

5. *Rejestratory i komputery*

Służą do rejestracji danych i sterowania procesem pomiarowym.

Zastosowanie i właściwości metod fluorymetrycznych

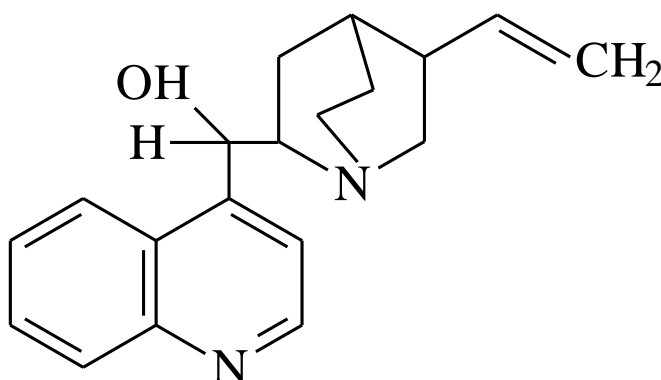
Metody fluorymetryczne stosuje się do oznaczania śladowych ilości substancji wykazujących fluorescencję. Zaletą metod fluorymetrycznych jest:

- a) możliwość oznaczania związków nieorganicznych oraz organicznych
- b) duża czułość - jest możliwe oznaczanie substancji organicznych i nieorganicznych o stężeniach 0,01 ppm
- b) duża precyzja (rozrzut wyników nie większy niż $\pm 1\%$)
- c) duża dokładność
- d) duża selektywność - np. poprzez możliwość doboru długości fali promieniowania wzbudzającego oraz emitowanego
- e) charakteryzuje się $10^2 - 10^4$ razy niższą dolną granicą wykrywalności niż spektrofotometria absorpcyjna
- f) dopuszczalność zastosowania w badaniach biologicznych i biochemicznych
- g) możliwość oznaczania związków niefluoryzujących przez tworzenie fluoryzujących kompleksów

FLUORYMETRYCZNE OZNACZENIE NISKICH STĘŻEŃ
CHLOROWODORKU CHININY ($M_m = 360,9$) PRZY UŻYCIU
FLUORYMETRU JENWAY 6285

Fluorymetria jest instrumentalną metodą analityczną, która wykorzystuje zjawisko emisji promieniowania fluorescencyjnego do oznaczania ilościowych składników. Należy do najczulszych metod instrumentalnej analizy ilościowej.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z techniką pomiarów fluorymetrycznych, w szczególności, pokaz zastosowania tej metody do oznaczania ilościowego chlorowodorku chininy w roztworze kwasu siarkowego.



Chinina

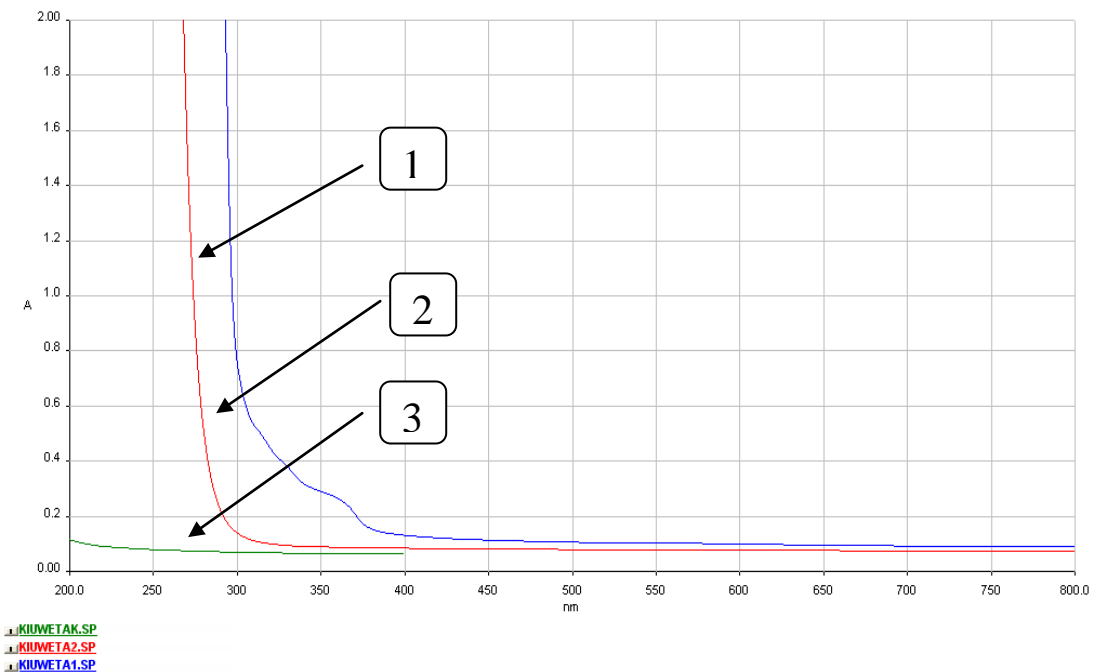
Chinina jest znaną substancją leczniczą o działaniu przeciwgorączkowym, przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwmalarycznym, a fluorescencję tego związku określa i warunkuje obecność płaskiego układu sprzężonych wiązań podwójnych pierścienia chinolinowego.

Dobór kuwet do badań fluorymetrycznych

Do badań fluorymetrycznych muszą być stosowane specjalne kuwety spełniające następujące warunki:

- a. Muszą mieć przezroczyste wszystkie ścianki boczne – pomiar promieniowania emisyjnego jest prostopadły do kierunku promieniowania wzbudzającego.
- b. Przepuszczalność kuwet musi obejmować zakres długości promieniowania wzbudzającego i emitowanego przez badaną próbkę.

Poniżej – **ryc. 4**, przedstawiono zakresy przepuszczalności typowych kuwet pomiarowych.



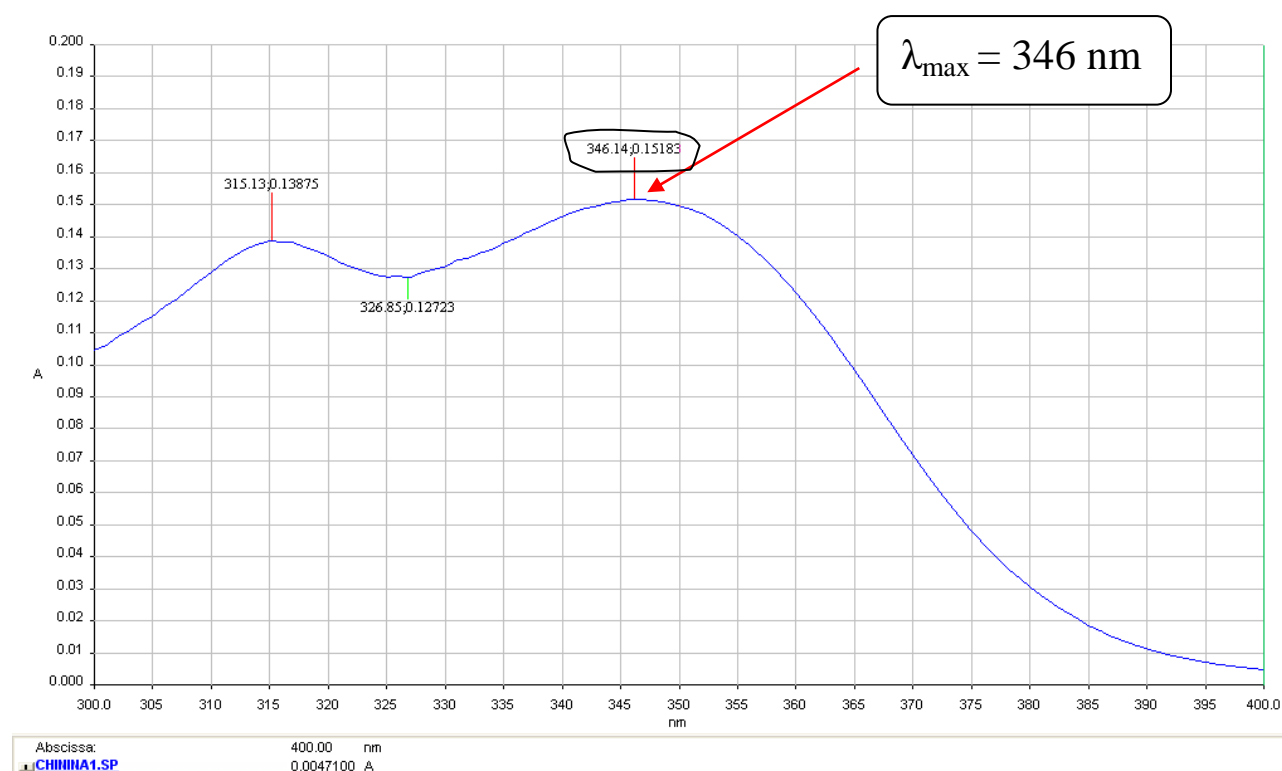
Ryc. 4. Widma absorpcyjne pustych kuwet:

- 1 – ze specjalnego tworzywa do pomiarów fluorymetrycznych (kolor niebieski)
- 2 – ze szkła (kolor czerwony)
- 3 – kwarcowa (kolor zielony)

Z **ryc. 4** widać, że pełną przepuszczalność w zakresie 200 – 800 nm ma tylko kuweta kwarcowa, kuwety szklana i z tworzywa są przepuszczalne dla $\lambda > 300$ nm i tylko w tym zakresie długości mogą być stosowane.

Dobór długości promieniowania wzbudzającego λ_{ex} i analitycznego λ_{em} przy pomiarach fluorymetrycznych

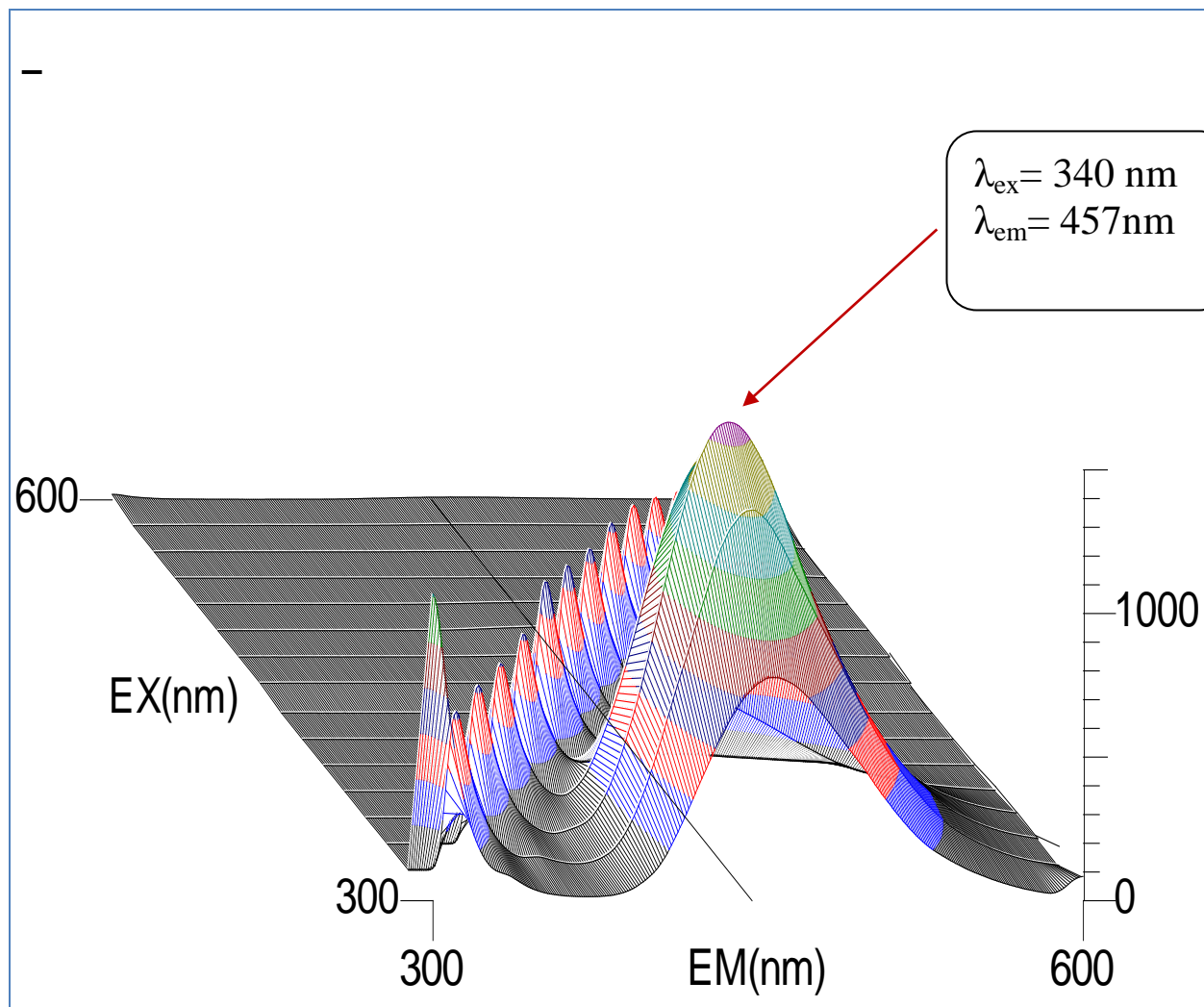
Podstawowym problemem w badaniach fluorymetrycznych jest dobór długości filtrów pomiarowych: wzbudzającego λ_{ex} oraz analitycznego λ_{em} . Właściwy ich dobór pozwala na otrzymanie maksymalnego natężenia promieniowania emitowanego przez badaną próbkę. Filtr wzbudzający dobiera się na podstawie położenia maksimum długofalowego pasma absorpcyjnego – dla chininy to $\lambda_{max} \approx 346$ nm – **ryc. 5**. Filtr analityczny można wstępnie dobrać wiedząc, że jego „długość” jest kilkadziesiąt nm większa od „długości” filtra wzbudzającego (promieniowanie emitowane przez próbkę jest bardziej długofalowe od promieniowania wzbudzającego).



Ryc. 5. Widmo roztworu chlorowodoru chininy ($c = 10 \mu\text{g/ml}$, $c_m = 2,771 \times 10^{-5}$ mol/l) w roztworze H_2SO_4 o stężeniu 0,1 mol/l. Kuweta kwarcowa ($l = 1$ cm). Temperatura $t = 20^\circ \text{C}$.

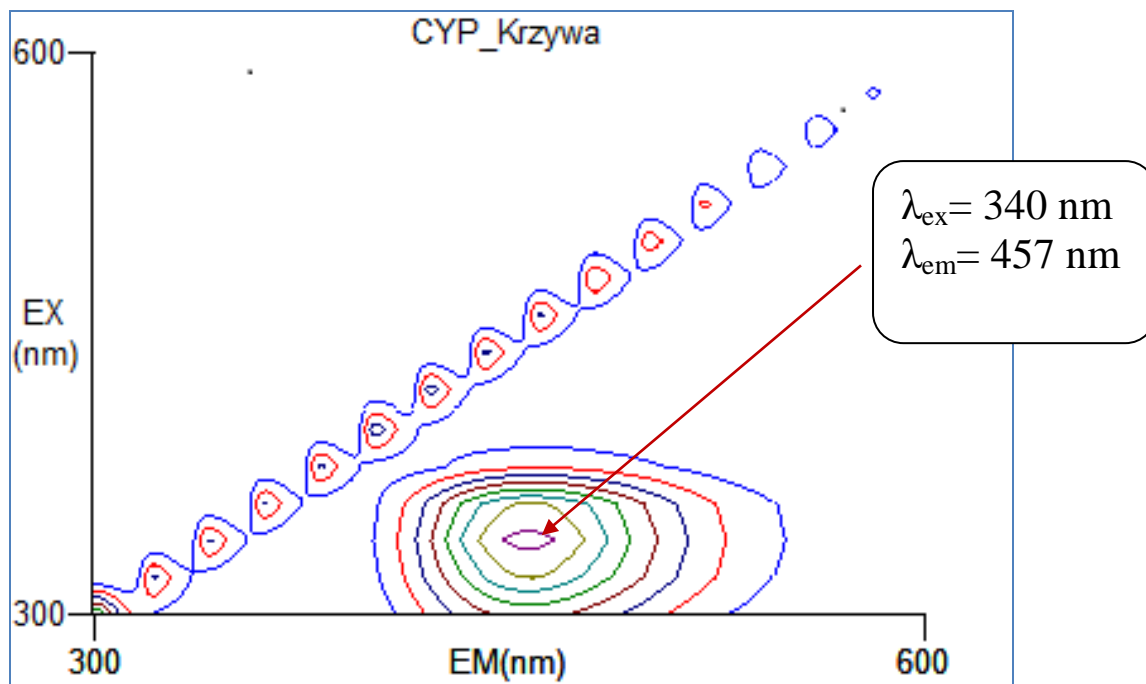
Widmo wykonane na spektrofotometrze UV/VIS Lambda 25 (PerkinElmer).

Najlepszą i zalecaną metodą doboru filtrów jest wykonanie widm 2-D i 3-D na spektrofluorymtrze. **Ryc. 6** i **7** przedstawiają takie właśnie widma zarejestrowane dla chlorowodoru chininy z zaznaczonymi wartościami λ_{ex} i λ_{em} (to współrzędne położenia maksimum najsilniejszego piku emisyjnego).



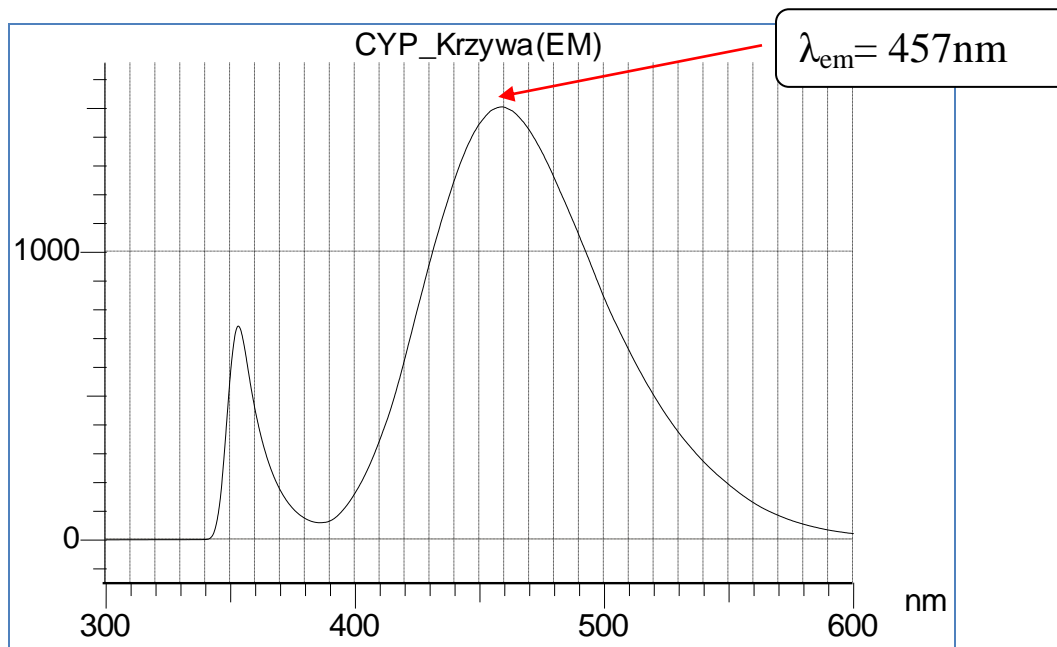
Ryc. 6. Widmo 3-D chininy: mieszanina roztworów: 5ml 0,1 $\mu\text{g/ml}$ chlorowodoru chininy w 0,1 mol/l H_2SO_4 i 5 ml H_2O . Na osi Y – jednostka RFU (Relative Fluorescence Unit). Kuweta kwarcowa $l=1 \text{ cm}$.

Widmo wykonane na spektrofluorymtrze Hitachi F4500.



Ryc. 7. Widmo 2-D chininy: mieszanina roztworów: 5 ml 0,1 $\mu\text{g/ml}$ chlorowodoru chininy w 0,1 mol/l H_2SO_4 i 5 ml H_2O . Kuweta kwarcowa $l = 1$ cm.
Widmo wykonane na spektrofluorymetrze Hitachi F4500.

Z otrzymanych widm widać, że najsilniejszą emisję promieniowania fluorescencyjnego otrzymuje się dla pary długości fal: $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 457$ nm. Widmo emisyjne zarejestrowane dla optymalnego wzbudzenia długością $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm przedstawia **ryc. 8**.



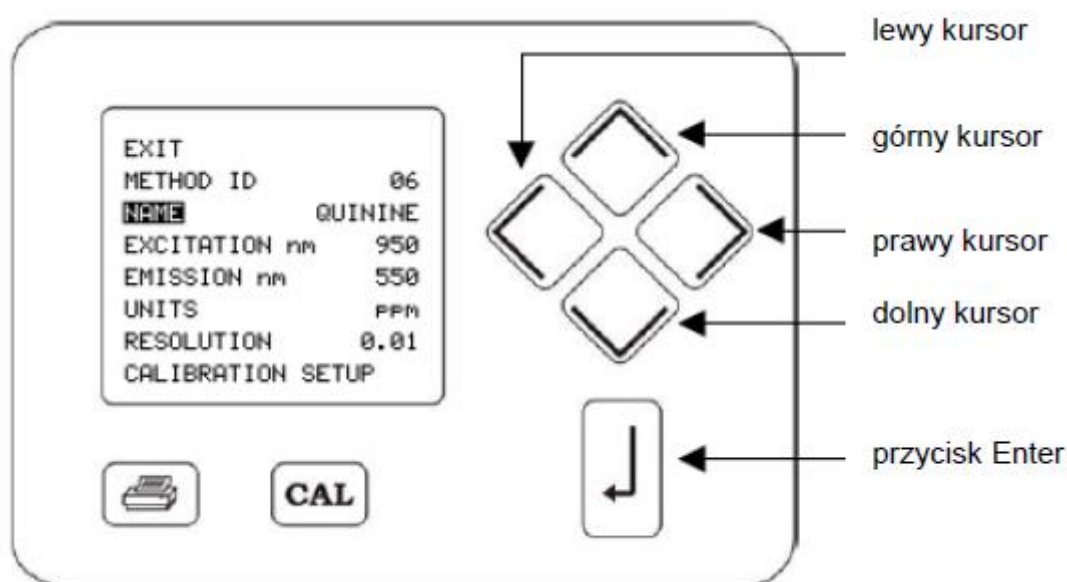
Ryc. 8. Widmo emisyjne roztworu: mieszanina 5ml 0,1 $\mu\text{g/ml}$ chlorowodoru chininy w 0,1 mol/l H_2SO_4 i 5 ml H_2O . Wzbudzenie promieniowaniem o długości $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm. Na osi Y – jednostka RFU. Kuweta kwarcowa $l=1$ cm.
Widmo wykonane na spektrofluorymetrze Hitachi F4500.

Przygotowanie roztworów

1. Roztwór odnośnikowy H_2SO_4 o stężeniu $c = 0,1 \text{ mol/l}$ i roztwór podstawowy chlorowodoru chininy o stężeniu $c = 100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ w roztworze H_2SO_4 o stężeniu $c = 0,1 \text{ mol/l}$ jest przygotowany przez asystenta.
2. W celu wykonania krzywej wzorcowej, z roztworu podstawowego chlorowodoru chininy o stężeniu $c = 100 \text{ }\mu\text{g/ml}$, studenci przygotowują 10 roztworów wzorcowych o stężeniach od 1, 2, 3 ... do $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$. Do rozcieńczania używany jest roztwór H_2SO_4 o stężeniu $c = 0,1 \text{ mol/l}$.
3. Roztwory „z” – o nieznanym stężeniu chlorowodoru chininy przygotowuje asystent. Należy je rozcieńczyć do 100 ml za pomocą roztworu H_2SO_4 o stężeniu $c = 0,1 \text{ mol/l}$

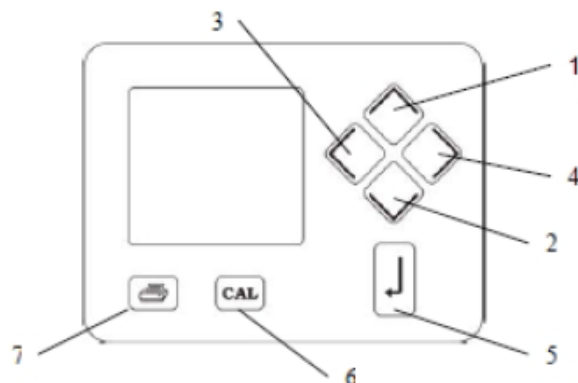
Wykonanie pomiarów I_f (natężenie fluorescencji) badanych roztworów

Pomiary są wykonywane na fluorymetrze Jenway 6285. Jego przedni panel przedstawia poniższy rysunek – ryc. 9.



Ryc. 9. Panel pomiarowy fluorymetru Jenway 6285.

Funkcje przycisków przedstawia ryc. 10.



1. Górny kursor	Używany do nawigacji przez menu, zwiększania wartości i do przesuwania w górę zapisanych wyników.
2. Dolny kursor	Używany do nawigacji przez menu, zmniejszania wartości i do przesuwania w dół zapisanych wyników.
3. Lewy kursor	Używany do nawigacji przez menu i podświetlenia wybranej cyfry podczas ustawień.
4. Prawy kursor	Używany do nawigacji przez menu i podświetlenia wybranej cyfry podczas ustawień.
5. Przycisk ENTER	Używany do akceptowania podświetlonej opcji w menu.
6. Przycisk CAL	Rozpoczęcie kalibracji z trybu pomiarowego.
7. Przycisk PRINT	Rozpoczęcie wydruku z ekranu podglądu lub wydruku zapisanych wyników. Przesyłanie danych do portu szeregowego RS-232.

Ryc. 10. Funkcje przycisków panelu fluorymetru Jenway 6285.

1. Włączyć fluorometr i odczekać 15 minut.
2. Z menu głównego przejść do menu MEASURE SETUP wybierając wcześniej SETUP w menu głównym. Wyświetlony zostanie poniższy ekran:

```

EXIT
METHOD ID      08
NAME      Chlorophyll
EXCITATION nm  430
EMISSION nm   660
UNITS              mg/l
RESOLUTION        0.01
CALIBRATION SETUP
  
```

Przed przeprowadzeniem jakichkolwiek pomiarów należy upewnić się, że zamontowano odpowiedni filtr wzbudzający i emisyjny.

EXIT – pozwala użytkownikowi na powrót do poprzedniego menu

METHOD ID – używany do nadawania numerów poszczególnym metodom

NAME - wpisana przez użytkownika nazwa metody

3. Za pomocą kursorów po prawej stronie panelu ustawić odpowiednie wartości w nm dla filtra wzbudzającego (EXCITATION) i analitycznego (EMMISSION). Do rejestracji fluorescencji użyć filtrów o najbardziej zbliżonych do ustalonych wcześniej długości: wzbudzający $\lambda_{ex} = 350$ nm, filtr analityczny $\lambda_{em} = 470$ nm.

Wybrać jedną z możliwych jednostek pomiarowych: RFU, ppm, U/mL, mU/L, U/L, μ M/L, mM/L, M/L, μ g/mL, mg/dL, g/dL, ng/L, μ g/L, g/L, %, ppb.

W przeprowadzanym ćwiczeniu wybraną jednostką jest RFU (Relative Fluorescent Unit).

4. Wrócić do menu głównego po wciśnięciu EXIT i po przejściu w tryb pomiarowy umieścić próbkę w uchwycie kuwet w komorze próbek, zamknąć pokrywę.

5. Podświetlić na ekranie opcję READ i wcisnąć przycisk ENTER.

6. W trakcie pomiaru wyświetlany będzie komunikat „Reading...”.

7. Po zakończeniu pomiaru podana zostanie wartość I_f w jednostkach RFU z dokładnością ustawioną w menu MEASURE SETUP.

8. Wynik pomiaru zapisać lub wydrukować.

9. Przeprowadzić kolejne pomiary używając opcji READ. Wykonać trzy serie pomiarów I_f dla roztworów wzorcowych i otrzymanego zadania. Wyniki zapisać w poniższej tabeli I i obliczyć wartości średnie I_f .

Lp.	Stężenie ($\mu\text{g/ml}$) (X_i)	Natężenie promieniowania fluorescencyjnego I_f w jednostkach RFU			Wartość średnia I_f w jednostkach RFU (y_i)
		I pomiar	II pomiar	III pomiar	
1	1				
2	2				
3	3				
4	4				
5	5				
6	6				
7	7				
8	8				
9	9				
10	10				
11	Zadanie (z)				

Tabela I. Tabela otrzymanych wyników I_f dla roztworów wzorcowych i zadania.

- Narysować wykres wartości I_f w funkcji stężenia.
- Na oś rzędnych wykresu nanieść wartość średnią dla zadania i odczytać graficznie oznaczoną wartość stężenia dla zadania.
- Otrzymane wyniki wartości średnich I_f przenieść do poniższej **tabeli 2** i wykonać odpowiednie obliczenia.

Lp.	Stężenie (μg/ml) (x_i)	Wartość średnia pomiarów w RFU (y_i)	x_i^2	y_i^2	$x_i y_i$
1	1				
2	2				
3	3				
4	4				
5	5				
6	6				
7	7				
8	8				
9	9				
10	10				
	$\Sigma x_i =$	$\Sigma y_i =$	$\Sigma x_i^2 =$	$\Sigma y_i^2 =$	$\Sigma x_i y_i =$

Tabela II. Tabela obliczeniowa.

Na podstawie wyników zebranych w **tabeli II**, zakładając zależność liniową $y = bx + a$, obliczyć według poniższych wzorów wartości współczynnika kierunkowego b , wyrazu wolnego a , oraz błędy tych współczynników S_b i S_a

$$b = \frac{n \Sigma x_i y_i - \Sigma x_i \Sigma y_i}{n \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2}$$

$$a = \frac{1}{n} (\Sigma y_i - b \Sigma x_i)$$

$$S_b = \sqrt{\frac{n (\Sigma y_i^2 - b \Sigma x_i y_i - a \Sigma y_i)}{(n-2) [n \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2]}}$$

$$S_a = \sqrt{\frac{1}{n} S_b^2 \Sigma x_i^2}$$

d. Obliczyć granicę wykrywalności LOD (Limit of Detection) i granicę oznaczalności LOQ (Limit of Quantification) wg poniższych wzorów:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot S_a / b$$

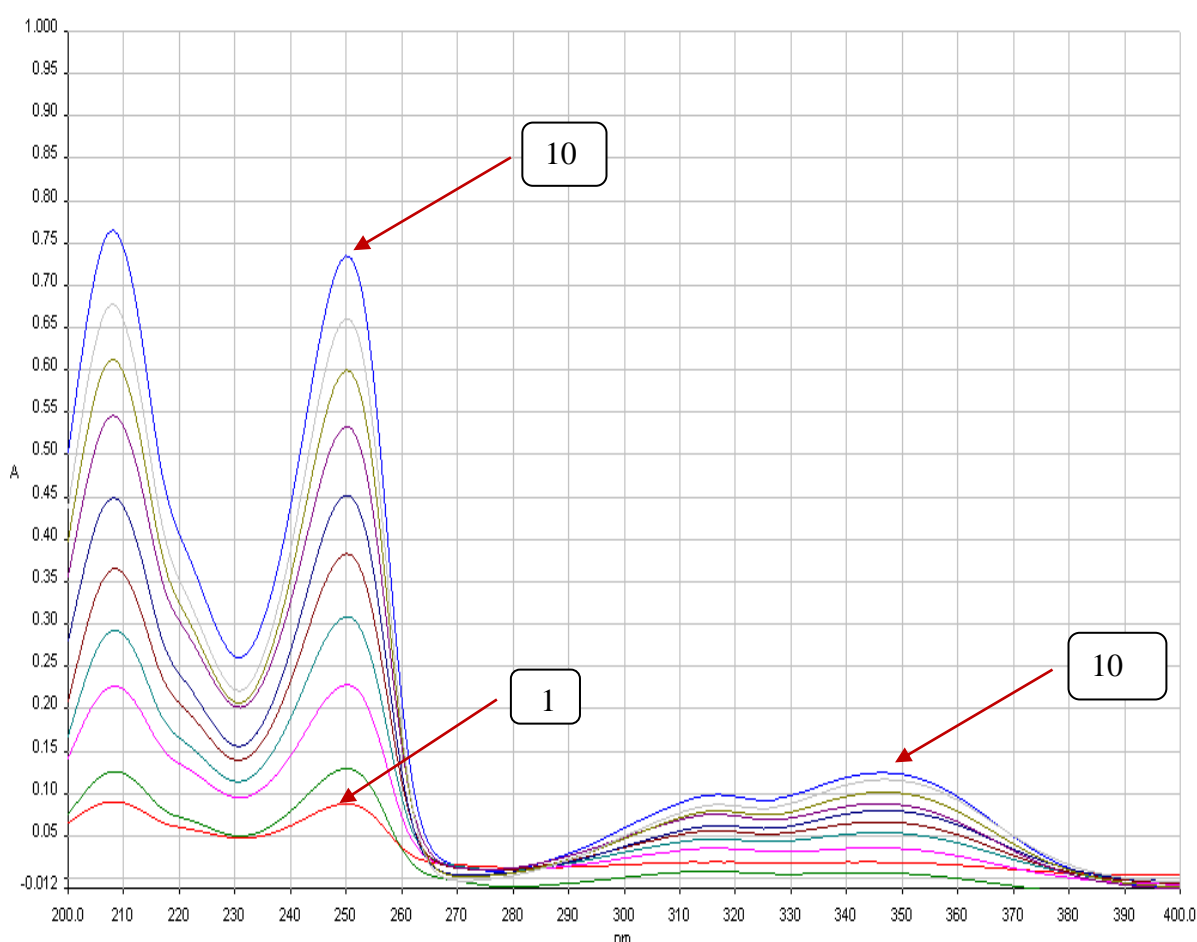
$$\text{LOQ} = 3 \cdot \text{LOD}$$

e. Znając współczynniki a i b oraz wartość średnią fluorescencji zadania, z odwrócenia funkcji liniowej $y = (bx + a)$, oblicz zawartość chlorowodoru chininy w zadaniu. Porównaj wynik z odczytem graficznym.

ZADANIE

Wyznaczenie granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) chlorowodorku chininy metodą spektroskopii UV/VIS

W celu wyznaczenia granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) chlorowodorku chininy metodą spektroskopii UV/VIS przygotowano serię roztworów chlorowodorku chininy o stężeniach z zakresu od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$, zmieniających skokowo co 1 $\mu\text{g/ml}$. Zbiór tych widm przedstawia ryc. 11.

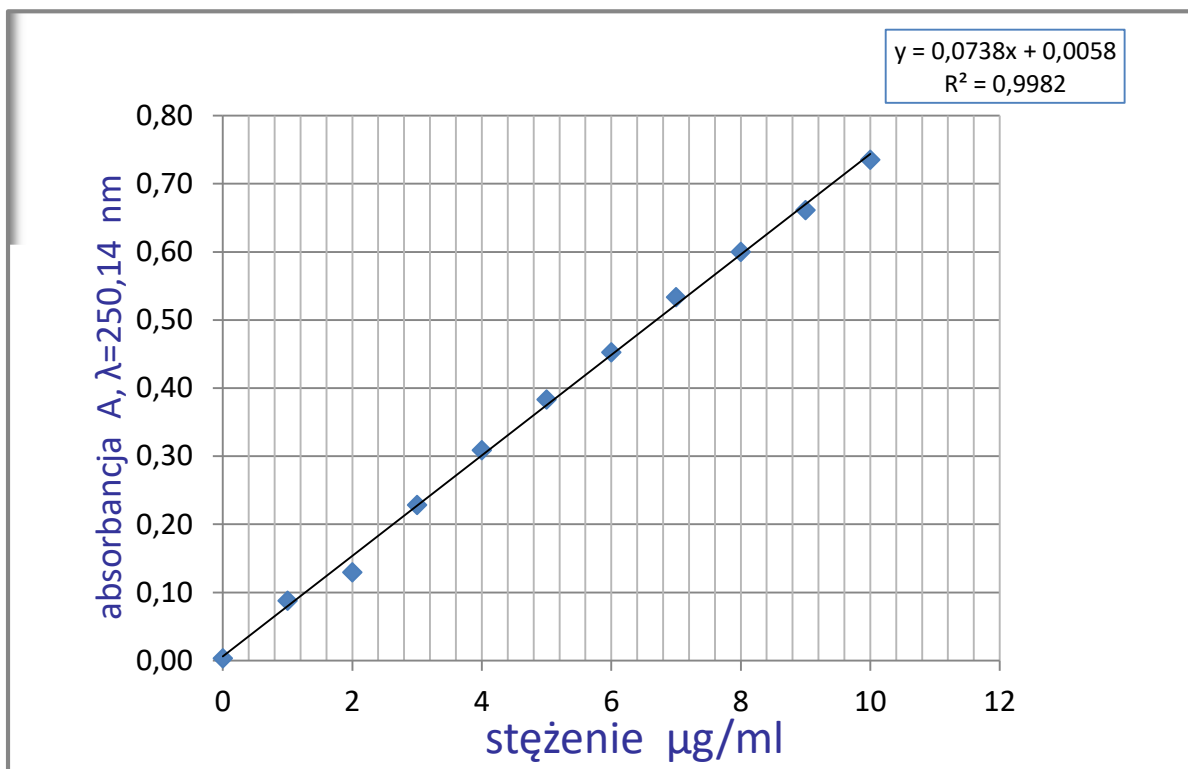


Ryc. 11. Zbiór widm chlorowodorku chininy w roztworze H_2SO_4 o stężeniu 0,1 mol/l.

Kuweta kwarcowa $l=1$ cm. Widma wykonane na spektrofotometrze UV/VIS Lambda 25 (PerkinElmer). Wyniki zebrane są w tabeli III.

Nr widma	Stężenie chininy ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancja roztworu A ($\lambda_{\text{max}} = 250,14 \text{ nm}$)
	0,0	0,003255
1	1,0	0,0878
2	2,0	0,1295
3	3,0	0,2284
4	4,0	0,3088
5	5,0	0,3832
6	6,0	0,4525
7	7,0	0,5335
8	8,0	0,6000
9	9,0	0,6613
10	10,0	0,7352

Tab. III. Zależność absorbancji A ($\lambda = 250,14 \text{ nm}$) roztworu chininy w kwasie siarkowym ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) w funkcji stężenia chininy. Kuweta kwarcowa $l = 1 \text{ cm}$. Wyniki zależności absorbancji ($\lambda = 250,14 \text{ nm}$) w funkcji stężenia chininy są przedstawione na **ryc. 12**.

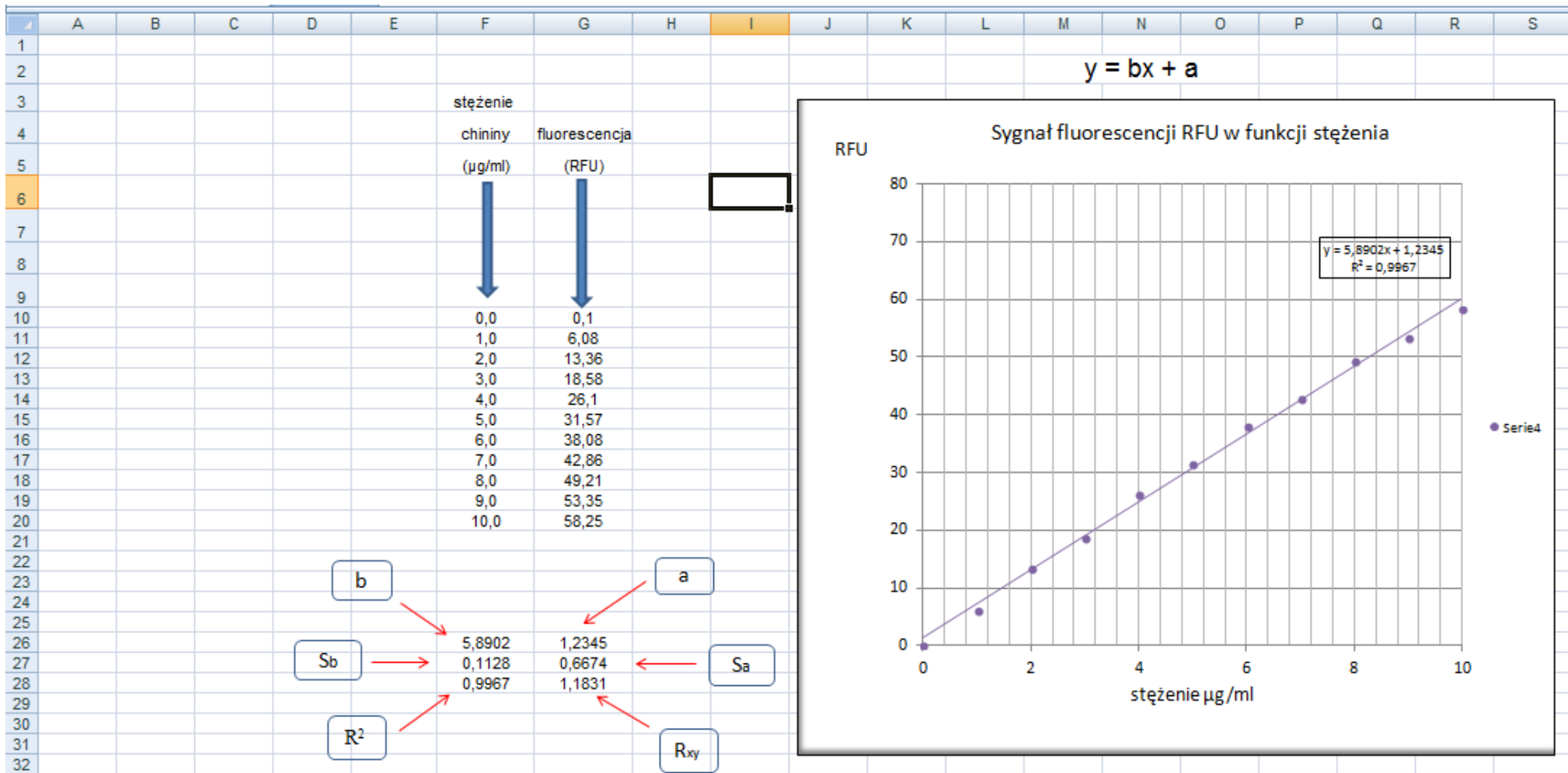


Ryc. 12. Wykres zależności absorpcji A ($\lambda = 250,14$ nm) roztworu chininy w kwasie siarkowym ($c = 0,1$ mol/l) w funkcji stężenia chininy. Kuweta kwarcowa $l = 1$ cm.

Na podstawie wyników w **tabeli III**, analogicznie jak w metodzie fluorymetrycznej, oblicz LOD i LOQ metodą spektrofotometryczną. Do obliczeń wykorzystaj arkusz kalkulacyjny EXCEL – opis i wizualizacja przykładowych obliczeń dla pomiarów fluorymetrycznych przedstawiona jest poniżej. Wyniki porównaj z odpowiednimi wynikami uzyskanymi metodą fluorymetryczną.

Zastosowanie arkusza EXCEL i funkcji REGLINP do obliczeń

1. Wprowadzić do arkusza **EXCEL**, w postaci dwóch sąsiadujących kolumn, zebrane dane pomiarowe X_i i Y_i (X_i – stężenie, Y_i – wartość I_f).
 2. Obok wprowadzonych danych zaznaczyć sześć komórek leżących obok siebie w trzech wierszach i dwóch kolumnach.
 3. Z paska zadań wybrać: **FORMUŁY** → **WIĘCEJ FUNKCJI** → **STATYSTYCZNE** → **REGLINP**
 4. W oknie wprowadzania parametrów należy podać parametry funkcji.
 5. W wierszu **znane_y** zaznaczyć zakres komórek zawierających wartości Y_i
 6. W wierszu **znane_x** zaznaczyć zakres komórek zawierających wartości X_i
 7. W wierszu **STAŁA** wpisać wartość logiczną **PRAWDA**
 8. W wierszu **STATYSTYKA** wpisać wartość logiczną **PRAWDA**
 9. Po zamknięciu okna wprowadzania parametrów kliknąć **OK**
 10. Kliknąć wskaźnikiem myszy na pasek formuł znajdujący się nad arkuszem tak, aby pojawił się tam i zaczął mrugać kursor tekstowy.
 11. Trzymając jednocześnie wciśnięte **Ctrl** i **Shift** wcisnąć **Enter** – w sześciu zaznaczonych komórkach w kroku 2 pojawią się obliczone metodą najmniejszych kwadratów wartości:
b, **a**, **S_b**, **S_a**, **R²** i **R_{xy}** – patrz **ryc. 13**.
-



Ryc. 13. Wizualizacja rachunków wykonanych w arkuszu kalkulacyjnym EXCEL dla pomiarów fluorymetrycznych.