

FLUORYMETRIA

21. Fluorymetryczne oznaczanie **Be(II)** w postaci kompleksu z moryną

Celem ćwiczenia jest wykonanie widma fluorescencyjnego kompleksu berylu z moryną oraz ilościowe oznaczenie Be^{2+} w otrzymanym do analizy roztworze.

Odczynniki i aparatura:

- Roztwór roboczy – **0,1 $\mu\text{g Be}^{2+}/\text{ml}$**
- **0,02%** roztwór alkoholowy **moryny**
- **Bufor boranowy o pH 12**
- **Spektroluorymetr** Jasco FP-6200

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotowanie roztworów wzorcowych berylu:

Do sześciu probówek o poj. 25 ml odmierzyć (w ml):

Nr próby	Ślepa próba	1 wzorzec	2 wzorzec	3 wzorzec	4 wzorzec	5 wzorzec
Roztwór roboczy	0,0	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0
0,02% roztwór moryny	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Bufor boranowy	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Woda destylowana	21,0	20,0	19,0	17,0	15,0	13,0

Tak przygotowane roztwory zawierają kolejno: 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 $\mu\text{g Be}^{2+}$ w objętości roztworu (25 ml). Roztwory wymieszać i pozostawić na 12 min.

2. Do otrzymanych od laboranta roztworów Be^{2+} o nieznanym stężeniu dodać 2 ml 0,02% roztworu moryny, 2 ml buforu boranowego uzupełnić próbę do obj. 25 ml wodą destylowaną, wymieszać i pozostawić również na 12 min.
3. Po upływie 12 minut zmierzyć intensywność fluorescencji wszystkich przygotowanych roztworów zgodnie z instrukcją obsługi aparatu.

Wykonać trzy serie pomiarowe.

Opracowanie wyników:

- 1) Wykreślić krzywą wzorcową w układzie $I_F = f(c_{\text{Be}})$, $c_{\text{Be}} = \mu\text{g}_{\text{Be}}/25\text{ml}$
- 2) Wyznaczyć z krzywej stężenie jonów Be^{2+} w analizowanych próbkach.

INSTRUKCJA OBSŁUGI SPEKTROFLUORYMETRU JASCO FP – 6200

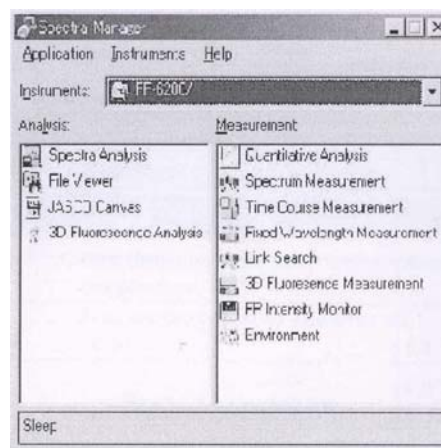
URUCHOMIENIE APARATU

1. Włączenie spektrofлуorymetru – wcisnąć przycisk zasilania znajdujący się z tyłu aparatu, pozycja „ON”

2. Włączenie komputera i monitora

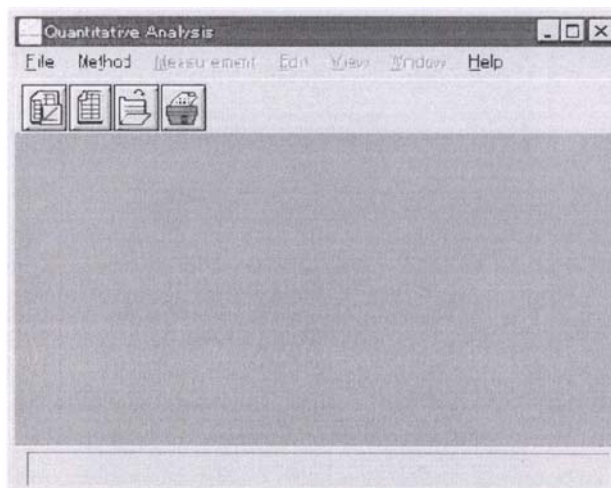
3. Uruchomienie [Spectra Manager]

Kliknąć dwukrotnie lewym klawiszem myszy na ikonę [Spectra Manager]. Pojawia się okienko [Spectra Manager] – rysunek obok.



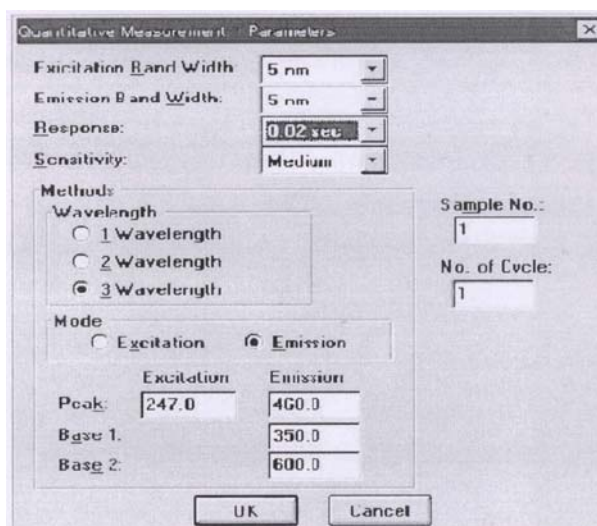
4. Uruchomienie programu do analizy ilościowej

Z menu okna [Spectra Manager] wybieramy program **Quantitative Analysis** przez dwukrotne kliknięcie myszą. Wybrany program rozpoczyna pracę - pojawia się okienko przedstawione na rysunku obok.



5. Tworzenie krzywej kalibracyjnej

- Na pasku narzędzi wybieramy opcję [File] – [New]. Pojawi się okienko [Open Parameters], w którym ponownie wybieramy opcję [New], wtedy pojawia się okno [**Quantitative Measurement Parameter**] przedstawione na rysunku obok.
- Wczytujemy parametry pomiaru: Excitation Band Width – 5 nm, Emission Band Width – 5nm, Response – 1 sec, Sensitivity – Medium, Wavelength – 1, Mode – Emission, Excitation – 436, Emission – 480.
- Aby przesłać parametry pomiaru do



spektrofluorymetru klikamy „OK”.

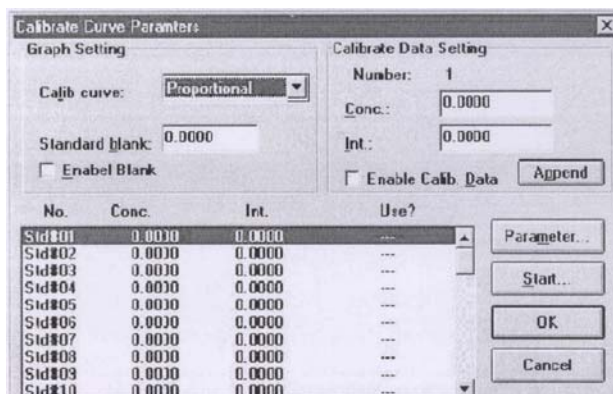
Po zakończeniu transferu pojawi się okienko dialogowe [Calibrate Curve Parameters].

- W polu [Graph Setting] wybieramy: Calib. Curve – Proportional

- Wprowadzanie stężeń wzorców i badanych próbek:

a) w polu danych klikamy na [Std # 01]

b) w polu [Calibrate Data Setting] wprowadzamy po kolei stężenia wzorców a następnie cyfry 1 i 2 oznaczające badane próbki (o nieznanym stężeniu). Tzn. w polu tekstowym [Conc.] wpisujemy np. stężenie pierwszego wzorca **0,1** i klikamy <Append>. Stężenie pojawi się w polu danych, natomiast kursor automatycznie przesunie się do następnej linii.



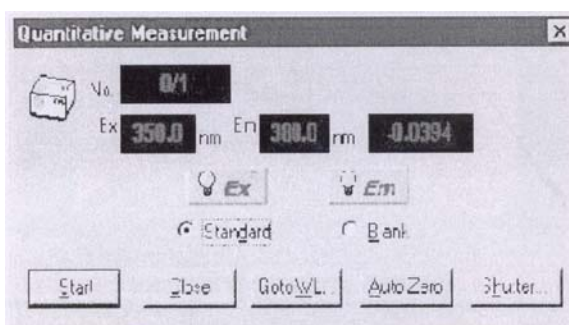
c) Klikamy <Start>. Otwiera się okno dialogowe [Quantitative Measurement] – rysunek obok. W okienku tym klikamy na przyciski **Ex** i **Em** co powoduje otwarcie obu przesłon.

d) *Pomiar ślepej próby „0”*

- w oknie [Quantitative Measurement] klikamy na [Blank], które zostaje zaznaczone kropką

- umieszczamy w uchwycie kuwety komory pomiarowej ślepej próbę „0”

- klikamy <Start>. Zmierzona wartość pojawi się automatycznie w polu tekstowym [Standard blank] w poprzednim okienku [Calibrate Curve Parameters].



e) *Pomiar intensywności fluorescencji próbek wzorcowych i roztworów badanych*

- W oknie [Calibrate Curve Parameters], ustawiamy kursor w pierwszym wierszu, klikamy na Std # 01,

- w oknie [Quantitative Measurement] klikamy na [Standard],

- w komorze pomiarowej umieszczamy kuwetę z kolejnymi roztworami wzorcowymi, a następnie z badanymi roztworami [UWAGA! Przed pomiarem kolejnych roztworów pamiętamy o przepłukaniu kuwety mierzonym roztworem.]

- klikamy <Start> w okienku dialogowym [Quantitative Measurement] – wartość intensywności pojawi się w wyświetlanym polu danych

Należy zapisać w notatniku laboratoryjnym wszystkie zmierzone wartości intensywności fluorescencji. Wykonujemy trzy serie pomiarowe. Po zakończonych pomiarach klikamy <Close> w okienku dialogowym [Quantitative Measurement] – okienko zostaje zamknięte.