

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ академика С.П. Королева»  
(Самарский университет)

**Оптические методы анализа биобъектов**

Самара 2017

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ академика С.П. Королева»  
(Самарский университет)

**Оптические методы анализа биобъектов**  
методические указания к практическим работам

Самара 2017

УДК 535.8

Составители: П.Е.Тимченко, Е.В.Тимченко

Рецензент: к.т.н. Ендуткина Е. А.

**Оптические методы анализа биобъектов:** метод. указ. / сост. П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко – Самара: Изд-во Самарский университет, 2017. – 34 с: ил.

В методических указаниях к практическим работам содержится информация об оптических методах анализа, включая молекулярную абсорбционную спектроскопию УФ- и видимой областях спектра, люминесцентный анализ, ИК-спектроскопию, приведено их практическое применение для решения биомедицинских задач.

Методические указания предназначены для студентов дневного отделения Самарского университета, обучающихся по специальностям 03.04.01 «Прикладные математика и физика» и 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии» по дисциплине «Методы измерения оптических характеристик биологических сред»

© Самарский университет, 2017

# СОДЕРЖАНИЕ

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА .....	5
1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.....	6
1.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В УФ- И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ СПЕКТРА.....	6
Анализ однокомпонентных систем.....	7
Анализ многокомпонентных смесей.....	8
Исследование химических систем спектрофотометрическими методами.....	11
Решение типовых задач.....	14
Задачи.....	15
Вопросы:.....	16
1.2. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ.....	20
Задачи:.....	23
1.3 ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ.....	28
Вопросы.....	29
Список использованных источников.....	30

# ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

К оптическим методам анализа относятся методы атомной спектроскопии, в которых основное внимание уделяется процессам испускания или поглощения света атомами и молекулярной спектроскопии, основанной на поглощении или излучении света молекулами вещества.

Некоторые примеры спектроскопических методов:

1. Атомная спектроскопия
2. Атомно-абсорбционная спектроскопия
3. Атомно-эмиссионная спектроскопия
4. Атомно-флуоресцентная спектроскопия
5. Молекулярная спектроскопия
6. Электронная спектроскопия
7. Колебательная спектроскопия
8. Масс-спектрометрия
9. Фурье-спектроскопия
10. Ядерный магнитный резонанс
11. Электронный парамагнитный резонанс.

# 1 АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

## 1.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В УФ- И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ СПЕКТРА.

Фотоколориметрический анализ (молекулярная абсорбционная спектроскопия) относится к оптическим методам анализа. Метод основан на способности вещества поглощать электромагнитное излучение оптического диапазона. Оптический спектр включает ультрафиолетовую, видимую и ИК-области. Наибольшее распространение получили фотометрические методы анализа, основанные на поглощении в видимой области спектра, т.е. в интервале длин волн 400 – 780 нм. Излучения видимой области спектра поглощают только окрашенные соединения.

Фотометрический метод анализа широко применяют для решения проблем технологического контроля; в санитарно-гигиеническом анализе для определения аммиака, нитратов, катионов различных металлов в воде; для определения витаминов в продуктах питания и т.д. Метод имеет низкий предел обнаружения ( $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  М), относительная ошибка большинства определений 1– 2 %.

В основе фотометрического метода анализа лежит избирательное поглощение света частицами (молекулами или ионами) вещества в растворе, при некоторых длинах волн светопоглощение происходит интенсивно, а при некоторых свет не поглощается. Поглощение квантов  $h\nu$  электромагнитного излучения оптического диапазона молекулой или ионом обусловлено переходом электронов на орбитали с более высокой энергией.

Цветность как способность к поглощению определенных квантов электромагнитного излучения оптического диапазона определяется электронным строением молекулы. Обычно это связано с наличием в молекуле хромофорных групп. Конкретные хромофорные группы обуславливают возможность осуществления определенных электронных переходов.

За формирование аналитического сигнала ответственными являются в основном  $d \rightarrow d^*$ - и  $\pi \rightarrow \pi^*$ - переходы.  $d \rightarrow d^*$ - Переходы характерны для аква-ионов и некоторых комплексных соединений d-элементов с неполностью заполненными d-орбиталями.  $\pi \rightarrow \pi^*$ - Переходы свойственны молекулам органических соединений и обеспечивают их окраску, наряду с малоинтенсивными  $n \rightarrow \pi^*$ - переходами. Если молекула органического соединения способна образовывать комплексы с ионами металлов, то изменение энергии  $\pi \rightarrow \pi^*$ - перехода вызывает появление или изменение окраски комплекса по сравнению с исходным состоянием.

Каждая молекула обладает определенным набором возбужденных квантовых состояний, отличающихся значением энергии, поэтому интенсивно поглощаются те кванты света, энергия которых равна энергии возбуждения молекулы. Характер поглощения зависит от природы вещества, на этом основан качественный анализ. Для количественного анализа используют зависимость светопоглощения от концентрации определяемого вещества.

Основной закон светопоглощения – закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$\lg \frac{I}{I_0} = A_\lambda = \varepsilon_\lambda l c \quad (1.1)$$

где  $I_0$  – интенсивность первоначального излучения, падающего на объект;  $I$  – интенсивность излучения, прошедшего через объект;  $A_\lambda$  – оптическая плотность раствора  $C$  – концентрация, моль/л;  $l$  – толщина поглощающего слоя, см;  $\varepsilon_\lambda$  - молярный коэффициент светопоглощения при данной длине волны.

Молярный коэффициент светопоглощения характеризует чувствительность реакции и является постоянной величиной для данного окрашенного соединения. Для повышения чувствительности определения выбирают реакцию с максимальным значением  $\varepsilon$ . (см. справочник по аналитической химии).

## **Анализ однокомпонентных систем.**

Поглощение исследуемого раствора обычно измеряют относительно раствора сравнения, поглощение которого условно принимается равным нулю. Если раствор сравнения представляет собой чистый растворитель или так называемый «раствор контрольного опыта» (т.е. раствор, подвергнутый той же обработке и содержащий все компоненты

измеряемого раствора за исключением исследуемого вещества), то такой метод измерения называют абсолютным.

целью повышения точности молекулярного абсорбционного анализа и расширения диапазона определяемых концентраций используют дифференциальные методы. Различают метод определения высоких концентраций веществ, метод определения малых концентраций веществ и метод предельной точности. В аналитической практике наибольшее распространение получил метод определения высоких концентраций веществ.

этом методе в качестве раствора сравнения используют стандартный раствор с концентрацией  $c_0$ . Измеряемая этим методом относительная оптическая плотность исследуемого раствора  $A_{отн}$  с концентрацией вещества  $c_x$  равна:

$$A_{отн} = A_x - A_0 = \varepsilon(c_x - c_0), \quad (1.2)$$

где  $A_x$  и  $A_0$  – оптические плотности исследуемого раствора и раствора сравнения, измеренные абсолютным методом.

Выбор раствора сравнения является наиболее ответственной процедурой при выполнении дифференциальных измерений. Для достижения максимальной точности определения концентрации вещества следует использовать раствор сравнения, для которого значение условной оптической плотности  $\varepsilon l c_0$  максимально. Точность дифференциальных определений приближается к точности классических методов анализа, характеризующихся погрешностями 0.2-0.5%.

## **Анализ многокомпонентных смесей.**

Если полосы поглощения двух или более веществ, находящихся в одном растворе, не перекрываются, то анализ смеси сводится к определению каждого компонента в отдельности. Оптическая плотность смеси веществ  $A^\lambda$  определяется законом аддитивности оптических плотностей:

$$A^\lambda = \sum A_i^\lambda = l \sum \varepsilon_i^\lambda c_i, \quad (1.3)$$

где  $A_i^\lambda$  – парциальная оптическая плотность  $i$ -го вещества.

случае перекрытия полос (рис.1.1) для анализа смеси используют методы, также основанные на законе аддитивности оптических плотностей. Из них наиболее известен метод Фирордта, заключающийся в измерении оптической плотности смеси при нескольких длинах волн и составлении системы уравнений, включающих неизвестные концентрации компонентов смеси. Пусть для смеси двух компонентов с концентрациями  $c_1$  и  $c_2$  измерены оптические плотности  $A_1$  и  $A_2$  при длинах волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , соответственно (рис.1.1). Тогда:

$$A_1 = \varepsilon_{1,\lambda_1} c_1 l + \varepsilon_{2,\lambda_1} c_2 l, \quad (1.4)$$

$$A_2 = \varepsilon_{1,\lambda_2} c_1 l + \varepsilon_{2,\lambda_2} c_2 l \quad (1.5)$$

система уравнений с двумя неизвестными решается обычными приемами:

$$c_1 = \varepsilon_{2,\lambda_2} A_1 - \varepsilon_{2,\lambda_1} A_2 / (\varepsilon_{1,\lambda_1} \varepsilon_{2,\lambda_2} - \varepsilon_{1,\lambda_2} \varepsilon_{2,\lambda_1}) l$$

$$c_2 = \varepsilon_{1,\lambda_1} A_2 - \varepsilon_{1,\lambda_2} A_1 / (\varepsilon_{1,\lambda_1} \varepsilon_{2,\lambda_2} - \varepsilon_{1,\lambda_2} \varepsilon_{2,\lambda_1}) l$$

Ответственным моментом при использовании метода Фирордта является выбор длин волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , называемых аналитическими. В качестве их можно использовать длины волн с максимальными значениями разностей коэффициентов поглощения веществ. Найденные значения  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  могут не совпадать с максимумами поглощения компонентов смеси, лежать в неудобных для измерений областях спектра (крутосходящие, крутоспадающие участки спектральных кривых) или наблюдаться в таких областях спектра, где значения  $\varepsilon_{1,\lambda}$  или  $\varepsilon_{2,\lambda}$  малы и измеряются с малой точностью. Поэтому при окончательном выборе аналитических длин волн следует учитывать факторы, обеспечивающие повышение чувствительности и точности анализа двухкомпонентных смесей.

Чтобы относительная погрешность определения концентраций компонентов  $\Delta c/c$  была наименьшей, значения  $A_1$  и  $A_2$  должны лежать в интервале 0.1-1.0.

Метод Фирордта может быть распространен и на многокомпонентные смеси.

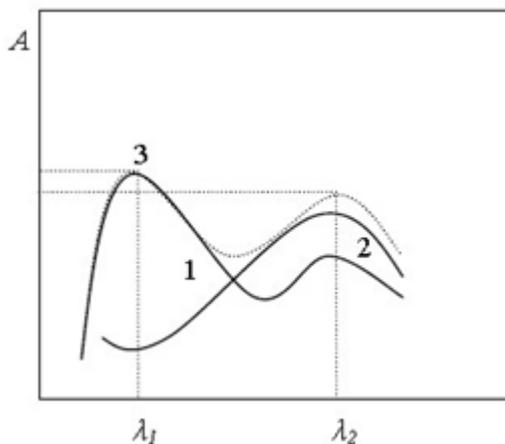


Рис. 1.1. Спектр поглощения двухкомпонентной смеси: 1 – спектр компонента, 2 – спектр компонента Б

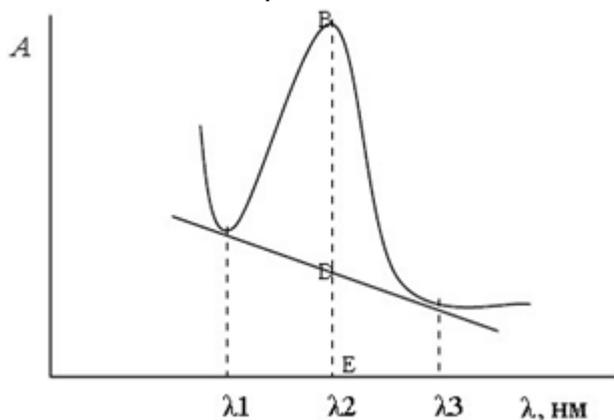


Рис.1.2 Иллюстрации метода базовой линии

Нередко в аналитической практике возникает необходимость определения одного вещества в сложной смеси, не прибегая к его выделению. Все остальные компоненты системы называют примесями, составляющими фон. В этом случае можно провести спектрофотометрический анализ без отделения примесей, используя различные методы.

Когда содержание определяемого вещества в смеси велико, а поглощением посторонних компонентов можно пренебречь, то

содержание определяемого вещества можно рассчитать по уравнению основного закона светопоглощения:

$$C = A_{\lambda} / \varepsilon_{\lambda} l, \quad (1.8)$$

2. Если вблизи максимума поглощения определяемого вещества поглощение посторонних компонентов смеси аппроксимируется линейной зависимостью от длины волны  $A = a_0 + a_1\lambda$ , концентрацию определяемого вещества можно рассчитать, используя метод базовой линии. Для этого на кривой светопоглощения анализируемого раствора между двумя минимумами по обеим сторонам от полосы поглощения определяемого вещества проводят прямую линию (рис.1.2) и считают, что отрезок BD в выбранном масштабе равен оптической плотности определяемого вещества, а отрезок DE – оптической плотности посторонних компонентов смеси. Концентрацию определяемого вещества рассчитывают по формуле:

$$c = BD / \varepsilon l \quad (1.9)$$

3. При линейном характере поглощения посторонних компонентов от длины волны концентрацию определяемого вещества в сложной смеси можно определить методом Брайса - Швайна. Для этого измеряют оптическую плотность анализируемого раствора при трех равноотстоящих длинах волн в области максимума поглощения определяемого вещества (рис.1.2). Концентрацию определяемого вещества рассчитывают по формуле:

$$c = 2 A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} - A_{\lambda_3} / (2\varepsilon_{\lambda_2} - \varepsilon_{\lambda_1} - \varepsilon_{\lambda_3})l \quad (1.10)$$

## **Исследование химических систем спектрофотометрическими методами.**

Характерное поглощение света частицами в растворах открывает широкие возможности для изучения химических систем. Все они основаны на сдвиге химического равновесия под влиянием различных факторов и изменении вследствие этого оптических характеристик растворов. Спектрофотометрические измерения позволяют определять: число поглощающих компонентов смеси; состав образующихся в растворах соединений; константы химических равновесий, в том числе

константы диссоциации и константы устойчивости комплексных соединений.

**Определение числа компонентов.** Знание числа поглощающих частиц необходимо при изучении химических равновесий и при выборе метода анализа объекта.

Существует ряд простых тестов на однокомпонентные системы. Если система однокомпонентная, то должны выполняться следующие условия:

Отношение оптических плотностей одного и того же раствора при любых двух длинах волн постоянно для всех остальных растворов исследуемой системы:

$$A_{\lambda 1} / A_{\lambda 2} = \varepsilon_{\lambda 1} / \varepsilon_{\lambda 2} = \text{const}$$

Отношение оптических плотностей двух растворов при любой длине волны постоянно:

$$A_{1, \lambda} / A_{2, \lambda} = c_1 / c_2 = \text{const}$$

В координатах  $\lg A - \lambda$  спектры любых двух растворов сдвинуты относительно друг друга по оси ординат на постоянную величину:

$$\lg A_{1, \lambda} - \lg A_{2, \lambda} = \lg c_1 - \lg c_2$$

Следовательно, эти кривые должны совпадать при наложении.

Разработаны тесты для двух-, трех- и четырехкомпонентных систем.

Для более строгой оценки числа компонентов в фотометрируемой системе привлекают методы матричной алгебры.

**Исследование комплексных соединений.** Метод молекулярной абсорбционной спектроскопии широко используется для исследования комплексных соединений: установление состава комплексов и определения констант их устойчивости.

Метод изоляриальных серий заключается в приготовлении серии растворов

переменными концентрациями металла  $c_M$  и лиганда  $c_L$ , при этом их суммарная концентрация в растворе остается одной и той же, т.е.  $c_M + c_L = \text{const}$ .

Измеряют оптические плотности приготовленных растворов и строят график зависимости оптической плотности от молярной доли лиганда  $\alpha_L$  в растворе (рис.1.3). Максимальным поглощением обладает тот раствор, в котором соотношение концентраций компонентов отвечает их стехиометрическому соотношению в комплексе. Чем менее устойчив комплекс, тем более сглажен максимум на кривой.

Метод молярных отношений. В этом методе готовят серию растворов с постоянной концентрацией одного из компонентов (обычно иона металла) и переменной концентрацией другого. Измерив поглощение приготовленных растворов, строят график зависимости оптической плотности от молярного соотношения компонентов в растворе (рис.1.4.). Полученную кривую называют кривой насыщения. Абсцисса точки пересечения двух касательных (пунктирные линии) отвечает молярному соотношению компонентов в комплексе. Горизонтальный участок кривой позволяет рассчитать коэффициент молярного поглощения.

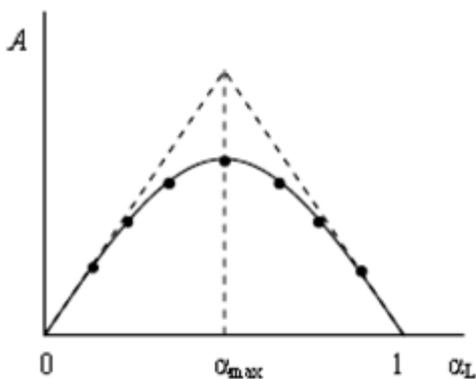


Рис.1.3. Зависимость оптической плотности

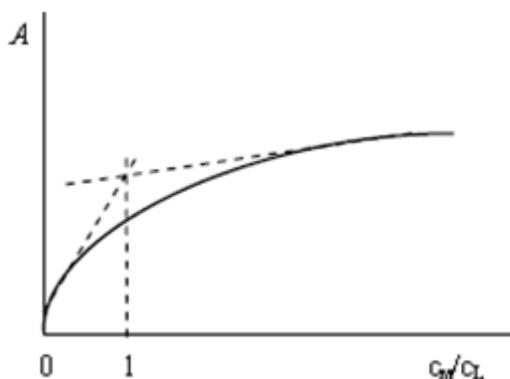


Рис.1.4. Исследование комплексообразования от состава изомолярного раствора методом молярных отношений

Константу устойчивости можно рассчитать по отклонениям экспериментальной кривой от касательных.

Метод отношения наклонов используют для определения состава малоустойчивых комплексов. В данном методе используется допущение, что в присутствии большого избытка одного компонента второй компонент практически полностью связан в комплекс. Если в избытке находится лиганд L, то для реакции комплексообразования:



можно записать, что

$$A = \varepsilon / [M_mL_n] = \varepsilon l c_M / m \quad (1.15)$$

т.е. A линейно зависит от  $c_M$ .

В избытке металла оптическая плотность линейно зависит от  $c_L$ :

$$A = \varepsilon / [M_mL_n] = \varepsilon l c_L / n \quad (1.16)$$

Отношение углов наклона прямых равно отношению M и L в комплексе:

$$\varepsilon l / m : \varepsilon l / n = n : m \quad (1.17)$$

## Решение типовых задач

**Пример.** Светопропускание исследуемого раствора равно 80%. Вычислить оптическую плотность этого раствора.

Решение. Вычисление проводится по формуле:

$$A = -LgT = -Lg(0,8) = 0,097$$

## Задачи

1. Переведите данные измерения пропускания в оптические плотности:

а) 19.4%; б) 0.863; в) 27.2%; г) 4.51%; д) 0.1000; е) 79.8%

Пользуясь приведенными данными, рассчитайте недостающие в таблице величины:

Оптическая плотность А	Молярный коэффициент поглощения $\epsilon$	Толщина слоя, см	концентрация
0,547		1	$3,64 \cdot 10^{-5}$ М
	3688	2,5	6,51 мкг/мл (мол. масса - 200)
0,229	$2,96 \cdot 10^3$		$3,86 \cdot 10^{-5}$ М
0,477	6121	1	М
0,581	$4,27 \cdot 10^3$	1,5	мкг/мл (мол. масса - 254)

3. Пропускание раствора с концентрацией 10 мкг/мл вещества, измеренное в кювете длиной 1.3 см равно 22%. Рассчитайте коэффициент поглощения вещества.

4. Определить содержание меди (%) в 10 граммах образцах, 1.0000 грамм которого растворили в мерной колбе вместимостью 100.0 мл. Оптическое поглощение полученного раствора в кювете с толщиной слоя 3 см составило 0.675, а  $\epsilon = 4.5 \cdot 10^4$ .

5. Пропускание раствора с концентрацией 3.7500 мг в 100.0 мл, измеренное в кювете длиной 1.50 см при 480 нм, равно 39.6%. Рассчитайте молярный коэффициент поглощения этого вещества.

6. Молярный коэффициент поглощения лекарственного препарата ретинола ацетата ( $C_{22}H_{32}O_2$ ) в спиртовом растворе равен  $\epsilon = 50900$  при  $\lambda = 326$  нм. Рассчитайте оптимальную концентрацию в г/л

7. Для определения в сточной воде суммарного содержания тяжелых металлов (свинец, медь, кадмий и т.д.) их извлекают из воды в виде дитизонатных комплексов четыреххлористым углеродом, далее, после удаления избытка дитизона, обрабатывают солью  $Hg^{2+}$  для перевода в дитизонат ртути, который фотометрируют. Оптическая плотность дитизоната ртути, полученного обработкой 500.0 см<sup>3</sup> воды, равна 0.110

при  $\lambda=485$  нм.  $500.0$  см<sup>3</sup> стандартного раствора, содержащего  $2.0$  см<sup>3</sup>  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  с  $T=0.00001542$  г/см<sup>3</sup>, провели через все стадии анализа аналогично исследуемому раствору. Оптическая плотность его оказалась равной  $0.280$ . Каково суммарное содержание тяжелых металлов в сточной воде (в моль/дм<sup>3</sup>)?

8. Для определения в сточной воде висмута (в мг/дм<sup>3</sup>) пробу ее  $10.0$  см<sup>3</sup> поместили в мерную колбу вместимостью  $50.0$  см<sup>3</sup>, подкислили разбавленной азотной кислотой, прибавили раствор висмута-1 (реагент на висмут), довели до метки водой. Оптическая плотность полученного раствора при  $\lambda=440$  нм в кювете с  $l=2$  см оказалась равной  $0.150$ . Оптическая плотность стандартного раствора, полученного обработкой  $1.0$  см<sup>3</sup>  $10^{-4}$  М раствора  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в аналогичных условиях, равна  $0.2000$ . Каково содержание висмута в воде? Не превышает ли оно ПДК, равную  $0.5000$  мг/дм<sup>3</sup>?

9. В результате погрешности, допущенной при градуировке шкалы пропускания спектрофотометра, величина пропускания дистиллированной воды оказалась равной  $92\%$ . Измеренное на этом спектрофотометре пропускание анализируемого раствора равно  $41.5\%$ . Каково истинное значение пропускания этого раствора?

## Вопросы:

1. Укажите, какое из нижеперечисленных выражений характеризует связь между коэффициентом пропускания ( $T$ , %) и оптической плотностью ( $A$ ):

1)  $A = 2 - \ln T$ ; 2)  $A = 2 - \lg T$ ; 3)  $A = - \lg T$ ; 4)  $A = 2 \cdot \lg T$

2. Какой фактор не влияет на молярный коэффициент поглощения?

- a) температура
- b) длина волны проходящего света
- c) концентрация раствора
- d) природа вещества

3. Можно ли по цвету вещества предсказать его спектр поглощения в видимой и УФ- области? И наоборот – можно ли по спектру вещества предсказать его цвет? Приведите примеры для обоснования своего ответа. Некоторое вещество имеет один максимум поглощения при  $380$  нм. Какой цвет оно может иметь? Рассмотрите случаи разной формы спектра.

5. Обсудите возможности применения метода спектрофотометрии в видимой и УФ-области для качественного анализа химических соединений и их смесей. Возможно ли применить этот метод, например, для анализа смеси алифатических спиртов? Смесей алифатических кетонов? Отличить растворы нафталина и антрацена? Приведите другие примеры.

6. Что вы можете сказать об использовании метода спектрофотометрии в видимой и ультрафиолетовой области для анализа примесей в веществе? Можно ли таким способом определить процентное содержание воды в спирте? От чего зависит чувствительность этого метода и как ее можно повысить? Приведите другие примеры.

11. Почему при записи спектров в ультрафиолетовой и видимой области практически не используют такой распространенный в ИК-спектроскопии прием, как вычитание полос поглощения растворителя путем помещения чистого растворителя в кювету сравнения?

12. Почему практически все современные спектрофотометры двулучевые?

13. Ваш образец слегка мутный, отфильтровать его не удастся. Как это может отразиться на его спектре поглощения в видимой и ультрафиолетовой области? Какие меры можно предпринять, чтобы этот спектр улучшить?

14. У спектрофотометра, на котором вы работаете, сбита настройка шкалы длин волн, а вы об этом не знаете. Например, в области 600 – 700 нм прибор завывает все показания на 10 – 15 нм, а в области 250 – 300 нм – занижает на 5 – 6 нм. Каковы могут быть последствия этого незнания? Что можно предпринять, если у вас появились такие подозрения?

15. В ИК-спектрометрах кювета с образцом, как правило, расположена между источником излучения и монохроматором, и это весьма облегчает работу с нестандартными образцами; например, можно использовать различные громоздкие держатели образцов и при этом не закрывать крышку кюветного отделения. В то же время в спектрофотометрах, работающих в УФ и видимой области, кювета с образцом обычно располагается между монохроматором и приемником излучения; при этом крышка кюветного отделения должна быть плотно закрыта (иначе прибор не будет работать). В чем причина такого различия и как оно сказывается на практической работе с указанными приборами?

16. Чем будут отличаться спектры поглощения соединения в УФ- и видимой области при их записи на приборе, дающем линейную развертку по длинам волн, и на приборе, дающем линейную развертку по волновым числам?

17. Дайте определения, и поясните следующие термины: спектр, интенсивность излучения, длина волны, волновое число, спектральная ширина линии, поглощение, испускание, основное состояние, возбужденное состояние.

18. Дайте классификацию методов спектрального анализа (по изучаемым объектам, по характеру взаимодействия электромагнитного излучения с веществом, по используемой области электромагнитного спектра, по природе энергетических переходов).

19. Как изменится оптическая плотность и пропускание раствора при увеличении толщины светопоглощающего слоя?

20. На рис.1.5. приведены электронные спектры поглощения трех растворов вещества В различной концентрации. Обозначьте оси координат на рисунках.

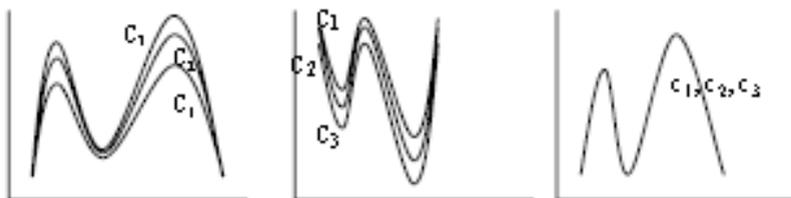


Рис. 1.5. Электронные спектры поглощения соединения В.

18. Какой из графиков, приведенных на рис.1.5., отвечает основному закону светопоглощения?.

19. Как выбрать оптимальную длину волны для проведения фотометрического анализа, если в спектре поглощения наблюдается несколько максимумов?

20. В каких единицах выражается коэффициент поглощения, если концентрация выражена в мкг/мл?

21. Перечислите основные причины погрешностей в спектрофотометрии?

22. Что является основной характеристикой величины поглощения среды (раствора) при данной длине волны?

интенсивность падающего излучения;  
молярный коэффициент поглощения;  
коэффициент пропускания;  
оптическая плотность;  
интенсивность прошедшего излучения.

23. В каком случае тангенс угла наклона градуировочного графика в методе спектрофотометрии будет наибольшим?

при малом значении  $\epsilon$  и монохроматическом излучении;  
при работе с источниками возбуждения со сплошным излучением;  
при возбуждении монохроматическим излучением и большом

значении  $\epsilon$ .

24. Что нельзя использовать в качестве монохроматора в спектрофотометрах?;

- b) призма и щель;
- c) дифракционные решетки.

25. В какой области спектра целесообразно использовать приборы с кварцевой оптикой?

- a) УФ область;
- b) видимая область;
- c) ближняя ИК;
- d) дальняя ИК.

26. Что используют в качестве раствора сравнения в дифференциальном спектрофотометрическом методе в случае соблюдения основного закона светопоглощения?

- a) чистый растворитель;
- b) раствор реагента;
- c) раствор поглощающего соединения любой концентрации.

## 1.2. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

### Интенсивность люминесценции и концентрация люминофора.

Если интенсивность люминесценции характеризовать числом квантов, испускаемых люминофором в единице объема в единицу времени, то зависимость интенсивности люминесценции от концентрации люминофора в растворе будет выражаться формулой:

$$I = \phi_x I_0 (1 - T) = \phi_x I_0 (1 - 10^{-klc}) \quad (1.1)$$

где  $I_0$  – интенсивность возбуждающего излучения (число возбуждающих квантов, падающих на единицу объема в единицу времени);  $T$  – пропускание

люминофора при длине волны возбуждения;  $k$  – коэффициент поглощения при длине волны возбуждения.

Если доля поглощенного люминофором возбуждающего излучения мала ( $klc \ll 0.05$ ), то уравнение (1.18) упрощается:  $I = 2.303 \phi_k I_0 klc$  (1.19)

Таким образом, интенсивность люминесценции пропорциональна квантовому выходу, интенсивности возбуждающего излучения, коэффициенту поглощения и концентрации люминофора. Уравнение (1.19) является математическим основанием количественного люминесцентного анализа. Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации люминофора часто сохраняет линейный характер в пределах трех-четырех порядков величины концентрации. Отклонения от линейности вызваны рядом причин:

невыполнением соотношения  $klc \ll 0.05$ ;

явлением концентрационного тушения, ограничивающим верхний диапазон линейности концентраций на уровне  $10^{-4}$  М.

эффектами внутреннего фильтра – экранирующим эффектом и эффектом реабсорбции.

Под реабсорбцией понимают поглощение квантов в толще раствора. Испускаемые люминофором фотоны люминесценции могут поглощаться как самим люминофором, так и молекулами других веществ, присутствующих в растворе. Реабсорбция минимальна в случае:

слабо поглощающих растворов;

если возбуждение люминесценции проводят при длине волны, соответствующей максимуму поглощения люминофора.

**Тушение** люминесценции. Выход люминесценции зависит от концентрации люминофора в растворе, температуры, присутствия посторонних веществ. Уменьшение выхода люминесценции под влиянием этих факторов называют тушением люминесценции.

*Концентрационное тушение* проявляется при довольно высоких концентрациях люминофора, начиная с некоторой «пороговой» концентрации  $c_0$ . При этом имеет место экспоненциальная зависимость выхода люминесценции от концентрации:

$$\varphi = \varphi_0 e^{-\theta(c-c_0)} \quad (1.20)$$

где  $\varphi_0$  – выход люминесценции при бесконечном разбавлении;  $\theta$  – константа.

Величина «пороговой» концентрации  $c_0$  и константа  $\theta$  специфичны для различных веществ. При  $c \ll c_0$   $\varphi = \varphi_0 = \text{const}$ . Эффект концентрационного тушения обратим: при разбавлении концентрированных растворов выход люминесценции вновь достигает максимального значения, указывая на отсутствие сложных физико-химических превращений молекул люминофоров.

Уменьшение квантового выхода с увеличением концентрации люминофора вызвано, с одной стороны, ассоциацией молекул люминофора с образованием нелюминесцирующих агрегатов различного состава, а с другой - миграцией энергии от возбужденных молекул к невозбужденным. Концентрационное тушение может развиваться вследствие миграции энергии от возбужденных молекул на нелюминесцирующие агрегаты молекул люминофора.

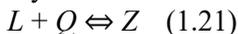
*Температурное тушение.* Повышение температуры вызывает уменьшение выходов флуоресценции и фосфоресценции. Это связано с тем, что безызлучательная дезактивация электронно-возбужденных состояний осуществляется преимущественно при соударениях излучающих молекул, а частота таких соударений в растворах прямо пропорциональна температуре. Охлаждение, наоборот, увеличивает выходы флуоресценции и фосфоресценции. В области комнатных температур выход флуоресценции обычно возрастает на несколько

процентов при уменьшении температуры на 1°C. Увеличение выхода флуоресценции по мере охлаждения раствора наблюдается до того момента, когда температура и вязкость раствора становятся благоприятными для испускания квантов фосфоресценции. При дальнейшем охлаждении раствора выход флуоресценции остается постоянным,

выход фосфоресценции возрастает до тех пор, пока их сумма не приблизится к единице.

*Тушение посторонними веществами.* Выход люминесценции может уменьшаться в присутствии посторонних веществ, называемых тушителями. Взаимодействие тушителя с люминофором по своей природе может иметь либо химический (статическое тушение), либо физический (динамическое тушение) характер.

в первом случае тушение обусловлено образованием нелюминесцирующих продуктов взаимодействия  $Z$  между люминофором  $L$  и тушителем



Если поглощение люминофора  $L$  и комплекса  $Z$  одинаково, то можно записать:

$$\frac{\varphi}{\varphi_0} = 1 + \beta[Q] \quad (1.22)$$

где  $\varphi$  и  $\varphi_0$  - выход люминесценции в отсутствие и в присутствии тушителя, соответственно;  $\beta$  - константа устойчивости нелюминесцирующего комплекса. Если поглощение комплекса отлично от поглощения люминофора, то уравнение (1.28) не соблюдается. Однако для слабо поглощающих растворов справедливо отношение

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \beta[Q] \quad (1.23)$$

Отличительными признаками химического тушения являются:

уменьшение доли молекул люминофора, обладающих люминесценцией;

изменение спектров поглощения и люминесценции люминофора в присутствии тушителя;

неизменность выхода люминесценции раствора люминофора, содержащего тушитель, при разбавлении;

наличие стехиометрии между количествами люминофора и

тушителя.

Когда взаимодействие люминофора и тушителя имеет физический характер, тушение люминесценции осуществляется за счет передачи энергии от электронно-возбужденных молекул люминофора к частицам тушителя. В этом случае степень тушения люминесценции частицами тушителя выражается уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{\varphi}{\varphi_0} = 1 + K[Q] \quad (1.24)$$

где  $K$  - константа тушения.

Если в присутствии тушителя поглощение люминофора не изменяется, уравнение (1.30) можно представить в виде:

$$\frac{I}{I_0} = 1 + K[Q] \quad (1.25)$$

Уравнения (1.24) и (1.25) идентичны уравнениям (1.22) и (1.23), соответственно.

Отличительными признаками физического тушения являются:

неизменность спектров поглощения и люминесценции люминофора в присутствии тушителя;

отсутствие стехиометрии между количествами люминофора и тушителя;

сокращение длительности люминесценции (или среднего времени жизни возбужденного состояния) молекул люминофора.

## Задачи:

1. Ниже приведены результаты измерения квантового выхода флуоресценции органолюминофора X с увеличением его концентрации в водном растворе:

$C_x \cdot 10^4, M$	1.00	3.00	5.00	7.00	9.00	11.00	13.00	15.00
$\varphi$	0.9-10	0.8990	0.9000	0.5710	0.3530	0.2320	0.1410	0.0900

Как можно интерпретировать полученные результаты?

**Пример 2.** В присутствии вещества Q интенсивность флуоресценции люминофора F снижается:

$CQ \cdot 10^3, M$	0	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.60	0.80	1.00
$I, \text{ у. е.}$	100.0	80.0	66.7	50.2	40.0	33.3	25.1	20.0	16.6



CQ*103, M	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.60	0.80	1.00
I/IQ .....	1.25	1.50	1.99	2.50	3.00	3.98	5.00	6.02

Спектры поглощения и флуоресценции люминофора F в отсутствие и в присутствии тушителя Q не изменяются. Какую информацию можно извлечь из приведенных результатов? Можно ли использовать этот эффект для аналитических целей?

3. Для различных значений оптической плотности люминесцирующего раствора ( $\epsilon l c$ : от 0.001 до 2.000) рассчитайте величины относительной погрешности, обусловленной использованием вместо точной формулы (1.18) упрощенной формулы (1.19) и представьте результаты расчета в виде таблицы. По данным таблицы постройте график зависимости относительной погрешности от оптической плотности люминесцирующего раствора. При каком значении оптической плотности относительная погрешность: а) не превышает 1%; б) не превышает 5%.

4. При флуориметрическом определении пенициллина в моче его предварительно экстрагируют хлороформом. К экстракту добавляют смесь бензола, ацетона, уксусной кислоты и производного акридина. Последний образует с пенициллином продукт конденсации, который реэкстрагируют подкисленным водным раствором. Реэкстракт обладает интенсивной желтой флуоресценцией. При анализе указанным способом двух проб мочи ( $V_a = 10.0$  мл) с добавками 1.0000 и 2.0000 мкг пенициллина измеренные значения интенсивности флуоресценции составили 59.5 и 77.5 у.е., соответственно. Рассчитайте концентрацию пенициллина (мкг/мл) в пробе мочи, если контрольная проба дает сигнал 9.5 у.е.

Вопросы.

1. Что такое люминесценция?

а) Свечение атомов, ионов, молекул или других более сложных комплексов, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в основное.

б) Избирательное поглощение однородной нерассеивающей системой электромагнитных излучений различных участков спектра.

с) Излучение атомов, молекул, возникающее в результате электронных переходов между энергетическими уровнями возбужденных атомов или ионов.

2. Является ли люминесценция равновесным процессом?

а) Не является.

б) Является.

с) Является при комнатной температуре (25°C).

3. Сколько типов люминесценции различают С.И. Вавилов и В.Л. Левшин по механизму свечения?

а) Один.

б) Два.

с) Три.

4. К какой из приведенных классификаций относятся термины: фотолюминесценция, рентгенолюминесценция, хемилюминесценция, катодолюминесценция?

а) По механизму свечения.

б) По источнику возбуждения.

с) По спектральному составу и длительности свечения.

5. Какой вид люминесценции преимущественно используют в аналитической химии?

а) Кратковременную флуоресценцию.

б) Замедленную флуоресценцию.

с) Фосфоресценцию.

6. Что такое спектр флуоресценции?

а) Графическая зависимость интенсивности флуоресценции от частоты (длины волны) излучения.

б) Графическая зависимость интенсивности флуоресценции от частоты (длины волны) возбуждающего света.

с) Графическая зависимость интенсивности возбуждающего света от частоты (длины волны) излучения.

7. Что представляет собой спектр возбуждения и что он характеризует?

а) Графическая зависимость интенсивности флуоресценции от частоты или длины волны возбуждающего света; эффективность поглощения флуоресцирующими молекулами возбуждающего излучения.

б) Графическая зависимость интенсивности флуоресценции от частоты или длины волны излучения; спектральное излучение флуоресцирующих частиц.

в) Графическая зависимость интенсивности возбуждающего света от его частоты или длины волны; активное возбуждение флуоресцирующих частиц.

8. Какое из приведенных выражений характеризует энергетический выход флуоресценции?

а)  $E_{\text{л}}/E_{\text{п}}$

б)  $E_{\text{п}}/E_{\text{л}}$

в)  $E_{\text{п}} - E_{\text{л}}$

$E_{\text{л}}$  – излучаемая веществом энергия;

$E_{\text{п}}$  – поглощенная энергия возбуждающего излучения.

9. Какая из характеристик люминесценции зависит от длины волны возбуждающего света?

а) Спектр люминесценции.

б) Выход (квантовый, энергетический) люминесценции.

в) Величина стоксовского смещения.

10. Какая из приведенных формулировок выражает закон Стокса-Люммеля?

а) Спектр излучения в целом и его максимум смещены относительно спектра поглощения и его максимума в сторону больших длин волн.

б) Выход флуоресценции зависит от длины волны возбуждающего света, концентрации флуоресцирующего вещества, посторонних примесей, температуры.

в) Нормированные спектры поглощения и излучения зеркально симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения обоих спектров.

г) Спектр люминесценции всегда имеет большую длину волны, чем возбуждающий свет.

11. Зависит ли интенсивность люминесценции от температуры?

а) Не зависит.

б) Зависит.

в) Зависит только молекулярная люминесценция.

г) Зависит только фосфоресценция.

12. Как меняется интенсивность люминесценции большинства веществ с понижением температуры?

- a) Уменьшается.
- b) Уменьшается только фотолюминесценция.
- c) Увеличивается.
- d) Увеличивается только у кристаллофосфоров.
- e) Сначала уменьшается, а затем остается постоянной.

13. какой выход флуоресценции больше?

- a) Энергетический.
- b) Квантовый.
- c) Квантовый или энергетический в зависимости от свойств люминесцирующей частицы.

14. Объясните, почему градуировочный график при флуориметрических определениях линеен только в ограниченной области концентраций?

15. Почему люминесцентный метод анализа является более чувствительным, чем спектрофотометрический в УФ- и видимой областях? Чем объясняется более высокая селективность люминесцентного метода анализа по сравнению со спектрофотометрическим в УФ- и видимой областях?

16. Как добиться повышения чувствительности флуориметрических определений?

17. Дайте определение следующих терминов: экранирующий эффект, эффект реабсорбции, эффект внутреннего фильтра.

18. Что понимают под термином тушение люминесценции? Какие виды тушения существуют?

19. Чем объяснить, что диапазон линейности градуировочного графика в методе фосфориметрии значительно шире, чем в методе флуориметрии?

20. Почему при проведении люминесцентного анализа предъявляются повышенные требования к чистоте реактивов и посуды?

Приведите формулы 5-6 люминесцентных реагентов, наиболее часто применяемых для флуориметрических определений. Для определения каких элементов указанные реагенты могут быть использованы?

## 1.3 ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

*ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ* (ИК-спектроскопия), раздел молекулярной оптической спектроскопии, изучающий спектры поглощения и отражения электромагнитного излучения в ИК области, т.е. в диапазоне длин волн от  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  м. В координатах интенсивность поглощенного излучения - длина волны (или волновое число) ИК спектр представляет собой сложную кривую с большим числом максимумов и минимумов. Полосы поглощения появляются в результате переходов между колебательными уровнями основного электронного состояния изучаемой системы. Спектральные характеристики (положения максимумов полос, их полуширина, интенсивность) индивидуальной молекулы зависят от масс составляющих ее атомов, геометрического строения, особенностей межатомных сил, распределения заряда и др. Поэтому ИК спектры отличаются большой индивидуальностью, что и определяет их ценность при идентификации и изучении строения соединений.

ИК-спектроскопию широко применяют для анализа смесей и идентификация чистых веществ. Количественный анализ основан на законе Бугера – Ламберта - Бера, т. е. на зависимости интенсивности полос поглощения от концентрации вещества в пробе. При этом о количестве вещества судят не по отдельным полосам поглощения, а по спектральным кривым в целом в широком диапазоне длин волн. В ближней ИК-области работают, как правило, с разбавленными растворами, поэтому особых осложнений при использовании формулы (1.1) не возникает. За пределами этой области ощущается недостаток в прозрачных для ИК-излучений растворителях, поэтому приходится уменьшать длину оптического пути и увеличивать концентрацию; при этом возможны отклонения от закона Бугера – Ламберта - Бера, что требует тщательной градуировки прибора по серии растворов с известной концентрацией.

Для определения концентрации обычно применяют метод градуировочного графика. Для измерения интенсивности полос исследуемого компонента и фона используют метод базовой линии. Базовая линия проводится через крайние точки полосы (касательная к спектральной кривой по краям полосы, рис.1.2). Выбор точек, через которые проводят базовую линию, в известной степени произволен,

необходимо лишь, чтобы эти точки были выбраны так же для спектра эталона. Полосы должны быть изолированными (или с минимальным перекрытием) и не самыми сильными.

### **Вопросы.**

1. Какие типы колебаний наблюдаются у многоатомных молекул?
2. В каких областях спектра проявляются характеристические частоты колебаний «тяжелых» и «легких» молекулярных групп?
3. Перечислите основные особенности анализа вещества по ИК-спектрам.
4. Назовите основные источники излучения в ИК-спектроскопии. В чем заключаются основные преимущества Фурье-спектроскопии.

## Список использованных источников

1. Пешкова В.М., Громова М.И. Методы абсорбционной спектроскопии в аналитической химии. М., 1976.
2. Барковский В.Ф., Горелик С.М., Городенцева Т.Б. Физико-химические методы анализа. М., 1972.
3. Алесковский В.Р., Бардин В.В. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство. Л., Химия. 1988.
4. Петрухин О. М. Практикум по физико – химическим методам анализа. М., Химия. 1987.
5. Основы аналитической химии. Практическое руководство. Под ред. Ю.А.Золотова. М., Высшая школа. 2001.
6. Основы аналитической химии. Задачи и вопросы. Под ред. Ю.А.Золотова. М., Высшая школа. 2004.
7. Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия. М.:Мир. 1976.
8. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-обсорбционный анализ. Л.: Химия, Ленинградское отделение. 1983.

Учебное издание

**Оптические методы анализа биообъектов**

методические указания к практическим работам  
Составители: Тимченко Павел Евгеньевич  
Тимченко Елена Владимировна

Самарский государственный национальный университет имени  
академика С.П. Королева» (Самарский университет)  
443086 Самара, Московское шоссе, 34

---

Издательство Самарский университет  
443086 Самара, Московское шоссе, 34

