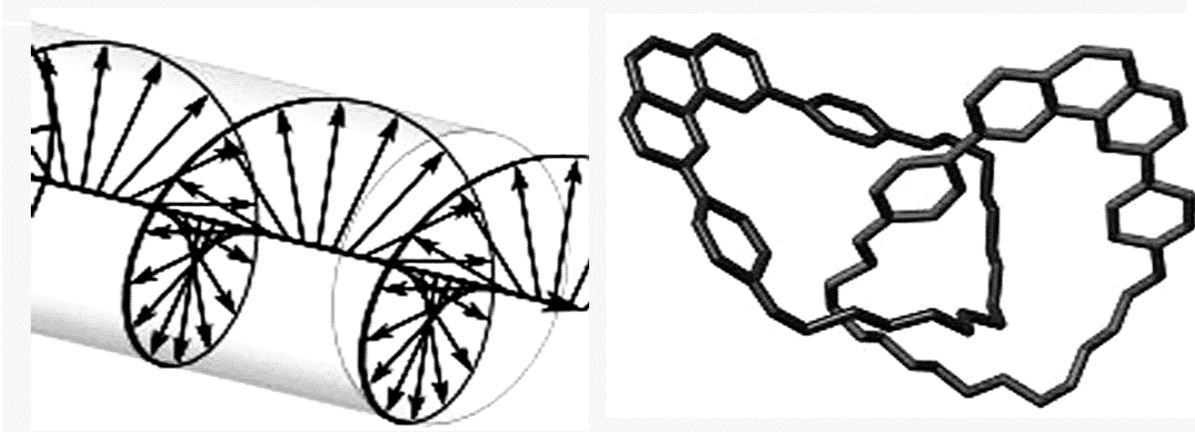
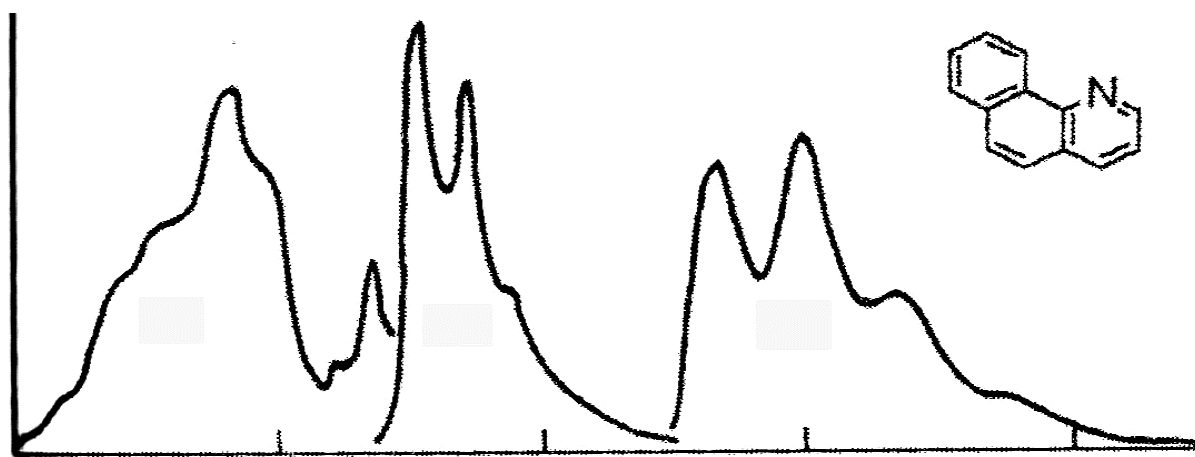


**В.С. Сибирцев**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФОТОМЕТРИЯ  
В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**



Санкт-Петербург  
2018

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**В.С. Сибирцев**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФОТОМЕТРИЯ  
В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

**РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлению подготовки 19.04.01 (биотехнология)  
в качестве учебного пособия для реализации основных  
профессиональных образовательных программ магистратуры**

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Санкт–Петербург  
2018**

**Сибирцев В.С. Молекулярная фотометрия в биотехнологических исследованиях.** Учебное пособие. -СПб: Университет ИТМО, 2018. -56 с.

**Рецензенты:** Радин М.А., канд. хим. наук, доцент кафедры физико–химических основ процессов горения и тушения Санкт-Петербургского университета государственной противопожарной службы МЧС России

Данное пособие соответствует программе дисциплины М.1.2.3. «Методологические основы исследований в биотехнологии» студентов–магистров профиля 19.04.01 (*биотехнология*); содержит избранные теоретические разделы упомянутой дисциплины, относящиеся к рассмотрению основных методов молекулярной фотометрии, применяемых в современных биотехнологических исследованиях, и предназначено для самостоятельной работы студентов по данной дисциплине.



**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2018  
© В.С. Сибирцев, 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
1. Молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ в «видимой» области спектра (ВдМАСА) .....	8
2. Устройства, используемые для ВдМАСА .....	27
3. Инфракрасный молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ (ИкМАСА) .....	41
Список литературы .....	50

## ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Методологические основы исследований в биотехнологии» является важной составляющей в системе знаний, умений и навыков, которые необходимо получить студентам–магистрам специальности 19.04.01 (*биотехнология*). В результате её освоения студенты должны получить представление об основных методах, применяемых в современных биотехнологических исследованиях, одним из наиболее широко используемых среди которых является молекулярная спектроскопия, также включающая в себя большую совокупность различных взаимосвязанных методов.

Спектроскопия – это совокупность методов физико–химического анализа, позволяющих судить о качественном и количественном составе пробы на основании анализа характера электромагнитного излучения, поглощаемого или излучаемого образцом.

При этом, под длиной волны подразумевается расстояние от одного максимума (*или минимума*) колебаний до другого.

А под частотой – время, за которое один максимум (*или минимум*) колебаний в зафиксированной точке пространства сменится следующим.

Таким образом, частота любого колебания ( $\nu$ ) равна скорости его распространения в конкретной среде ( $\nu^*$ ), делённой на длину волны ( $\lambda$ ) этого колебания:  $\nu = \nu^* / \lambda$ .

Кроме того, известно, что для электромагнитных колебаний в вакууме  $\nu^* = 3 \times 10^8$  м/с. А в других средах  $\nu^*$  тем меньше, чем плотнее среда, в которой электромагнитные колебания распространяются (*в то время как у акустико–механических колебаний – наоборот, скорость распространения тем больше, чем плотнее среда – поскольку там колеблются сами частицы среды*) и чем больше длина волны этих колебаний. На последнем эффекте, в частности, основано разложение полихроматического света (*состоящего из фотонов со множеством различных длин волн*) в монохроматический спектр (*в котором фотоны с разными длинами волн двигаются под разными углами по отношению друг к другу – как например, в случае появления радуги*).

По длине волны электромагнитные колебания подразделяются на:

- радиоволны (с  $\lambda > 1$  мм);
- инфракрасные (ИК) волны (с  $\lambda$  от 1 мм до 0,75 мкм), (подразделяемые, в свою очередь, на ближний (с  $\lambda$  от 750 до 3000 нм), средний (с  $\lambda$  от 3 до 15 мкм) и дальний (с  $\lambda$  от 15 мкм до 1 мм) ИК диапазоны);
- волны видимого диапазона (ВД) (с  $\lambda$  от 750 до 350 нм);
- ультрафиолетовые волны (УФ) (с  $\lambda$  от 350 до 50 нм), подразделяемые, в свою очередь, на ближний (с  $\lambda$  от 350 до 200 нм), средний (с

$\lambda$  от 200 до 150 нм) и дальний (с  $\lambda$  от 150 нм до 50 нм) УФ диапазоны;

- рентгеновское излучение (с  $\lambda$  от 50 до 1 нм)
- и  $\gamma$ -излучение (с  $\lambda < 1$  нм).

Энергия квантов электромагнитного излучения определяется длиной волны или частотой этого излучения как

$$E = h\nu = hc/\lambda,$$

где  $h = 6,6 \times 10^{-34}$  Дж·с – постоянная Планка (*т.е. чем меньше длина волны электромагнитного излучения, тем больше энергия его квантов, и наоборот*).

А общая энергия любой молекулы определяется:

- + энергией его внутриядерных связей в атомах
- + энергией внутренних электронных оболочек
- + энергией внешних электронных оболочек
- + энергией колебаний атомов в молекуле
- + энергией вращения атомов в молекуле.

Причем, величина энергий в данном ряду уменьшается (*т.е. наибольшая энергия нужна для того, чтобы разорвать внутриядерные связи в атомах; а наименьшая – чтобы изменить интенсивность вращения атомов в молекуле*).

И если энергии поглощенного кванта излучения достаточно для изменения какого-либо из вышеупомянутых параметров состояния молекулы – то часть этой энергии может расходоваться и на изменение менее энергоёмких состояний данной молекулы (*т.е. если изменяется, например, энергия какого-либо из внешних электронов молекулы – то одновременно с этим изменяется и интенсивность колебательных и вращательных движений друг относительно друга атомов в этой молекуле*).

Проходя через любое вещество, электромагнитное излучение, исходящее от какого-либо внешнего по отношению к анализируемому образцу источника, прежде всего, частично отражается от его поверхности (*либо близких к ней областей; либо поверхностей достаточно крупных гетерогенных частиц, присутствующих в объеме образца*). Что составляет предмет спектроскопий зеркального, диффузного и внутреннего отражения (*позволяющих судить о надмолекулярной структуре, а также атомарном и молекулярном составе исследуемых дисперсных систем; а также приповерхностных областей даже мало оптически прозрачных объектов*).

Затем, внешнее электромагнитное излучение частично рассеивается в толще образца. Причем, в тем большей степени, чем более образец неоднороден. Определение степени этого рассеяния составляет, в частности, предмет турбидо- и нефелометрии и применяется для оценки количества механических либо биологических примесей в растворе или газовой среде, диспергированности коллоидных растворов и т.п. Но и для однородных

по своему составу образцов полезно бывает снимать спектры «рэлеевского» (упругого) рассеяния (позволяющие оценить общее количество молекул в анализируемом образце, а также размер оных), и особенно, спектры «рамановского» (комбинационного, неупругого) рассеяния (позволяющие проводить не только количественный, но и качественный анализ молекулярного состава исследуемых образцов).

Помимо этого, для излучения с длинами волн, близкими к рентгеновскому диапазону, образцы с кристаллической структурой играют роль 3-мерной дифракционной решетки. И расшифровка получаемой таким образом дифракционной картины (с тем, чтобы узнать взаиморасположение атомов в исследуемом кристаллическом образце) составляет предмет рентгеноструктурного анализа.

Кроме того, проходя сквозь толщу образца, часть электромагнитного излучения может поглощаться. Но поглощаются при этом только те кванты излучения, энергия которых соответствует разности энергий между основным и возбужденным уровнями, определяющими состояние атомов, ионов, молекул и иных частиц, составляющих анализируемый образец.

В соответствии с этим,

- лишь энергии  $\gamma$ -частиц достаточно, чтобы разорвать внутриядерные связи в атомах;

- энергии квантов рентгеновского излучения достаточно для перехода внутренних электронов в атомах и молекулах из основного в возбужденное состояние;

- энергии фотонов ближнего УФ и ИК, а также видимого света достаточно для перехода внешних (*валентных, химически активных*) электронов в атомах и молекулах из основного в возбужденное состояние;

- энергии фотонов среднего ИК излучения достаточно для изменения интенсивности колебаний атомов в молекуле;

- энергии фотонов дальнего ИК излучения достаточно для изменения интенсивности вращений атомов в молекуле;

- энергии радиоволн с  $\lambda$  от  $10^{-2}$  до 10 м достаточно для изменения спинового момента электронов;

- энергии радиоволн с  $\lambda$  больше 10 м достаточно лишь для изменения спинового момента ядер атомов.

Вышеупомянутое составляет предметы, соответственно: радиометрии, рентгеновской, ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной спектроскопий; а также спектроскопий электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

И наконец, после того, как кванты внешнего излучения были поглощены веществом – они могут быть вторично испущены, в результате обратного перехода электронов из высокоэнергетического возбужденного состояния в низкоэнергетическое основное.

Это составляет предмет фотолюминесцентных методов анализа. Которые подразделяются, в свою очередь, на рентгенофлуоресцентный и атомно-эмиссионный элементный анализ; а также молекулярный фотолюминесцентный анализ.

Причем, в зависимости от времени задержки между поглощением и вторичным излучением фотонов ( $\tau_3$ ), последнее явление подразделяется ещё на флуоресценцию ( $\tau_3 < 10$  мс) и фосфоресценцию (с  $\tau_3 > 10$  мс).

Далее, если молекулы веществ, составляющих образец, предварительно разделить на атомы (*термическим или иным способом*) – то адсорбционные и эмиссионные спектры этих атомов будут линейчатые – то есть представлять собой совокупность более темных по отношению к фону (*для спектров светопоглощения или самообращенных линий в эмиссионных спектрах*) или светлых (*в эмиссионных спектрах*) полос с разной интенсивностью (*и шириной*) при нескольких длинах волн, строго определяемых (*хотя и по-разному для адсорбционных и эмиссионных спектров*) для каждого химического элемента разностью энергий разрешенных переходов их внешних (*валентных*) электронов из основного в возбужденное состояния (*для адсорбционных спектров*) и обратно (*для эмиссионных спектров*).

Такие линейчатые спектры легко анализировать. Однако, с их помощью можно определить только элементный состав анализируемого образца – т.е. из атомов каких химических элементов и в каком количестве состоят молекулы вышеупомянутого образца.

Для того же, чтобы результаты анализа учитывали то, как упомянутые атомы непосредственно соединены между собой в молекулах (*которые представляют собой наименьшую дискретную единицу любого вещества – поскольку даже одни и те же атомы, взятые в одних и тех же количествах, но соединенные между собой в молекулы по-разному, будут составлять различные вещества*) – необходимо применение молекулярных методов спектроскопии. В которых образец, не разделяя на атомы, как правило, подвергают воздействию какого-либо внешнего (*по отношению к образцу*) полихроматического, неполяризованного электромагнитного излучения.

Исключение при этом составляют случаи применения лазерной или светодиодной спектроскопии; либо использования дополнительных устройств, пропускающих только определенным образом поляризованный свет (*поляриметрия*); либо применения явлений хемо-, био-, электро-, соно- и т.п. люминесценции.



## 1. Молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ в «видимой» области спектра (ВдМАСА)

В методе ВдМАСА образец без разрушения на отдельные атомы облучают, как правило, полихроматическим, неполяризованным светом из ближней ультрафиолетовой (УФ), видимой (ВД) или ближней инфракрасной (ИК) областей спектра (*которые мы в дальнейшем для краткости будем называть просто «видимым» диапазоном*).

При этом, молекулы разных веществ (*либо одного и того же вещества – но в разных изомерных, аллотропных, по разному ионизированных, связанных с другими молекулами и т.п. состояниях*), также как и атомы разных химических элементов, избирательно поглощают фотоны с разными длинами волн (*определяемыми разрешенными для данного вида молекул переходами их внешних, валентных, химически активных электронов из основного состояния в возбужденное*).

Но получаемые при этом молекулярные электронные адсорбционные спектры (МЭАС), в отличие от атомарных – как правило, широкополосные и малоструктурированные. Происходит это потому, что вышеозначенные МЭАС определяются совокупностью значительно большего количества электронных переходов, разрешенных в анализируемых молекулах.

А кроме того, энергия, необходимая для каждого такого перехода ( $E_{\Pi}$ ), уже не точно определяется разностью энергий возбужденного и основного состояний электрона ( $E_A$ ), как в случае вещества, находящегося в атомарном состоянии – а больше оной на некоторый диапазон величин ( $E_{\Pi} = E_A + \Delta E$ ), определяемый тем, что часть энергии поглощенного фотона расходуется на увеличение тех или иных колебательных друг относительно друга и вращательных движений атомов и групп атомов в молекуле.

Это явление называется «расщеплением энергии электронных переходов по колебательным и вращательным подуровням» или (*в случае разделения широкополосного пика на несколько более узкополосных*) «проявлением тонкой колебательной структуры молекулярных электронных спектров» (*вращательную составляющую в этом случае не упоминают – поскольку её проявление значительно менее заметно – из-за того, что требует значительно меньших энергий*).

В соответствии с вышесказанным, ВдМАСА, как правило, не может быть использован для определения полного качественного состава сложных многокомпонентных образцов. Но зато, ВдМАСА чаще всего применяют в качестве быстрого, простого и дешевого инструментального метода точного количественного определения присутствия в анализируемых образцах какого-либо конкретного вещества.

Причем, концентрация вышеназванного вещества в образце ( $C$ ) определяется, в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера, при длине вол-

ны, соответствующей наиболее интенсивному светопоглощению этого вещества в анализируемом образце, выражением:  $C = A / (\varepsilon \cdot l) = \lg T / (\varepsilon \cdot l)$ , где  $l$  – длина оптического пути (*расстояние, проходимое внешним электромагнитным излучением от момента попадания его в образец и до выхода из него*);  $\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения (*поглощение образца при заданной длине волны,  $l = 1$  см и  $C = 1$  моль/л*);  $T$  и  $A$  – коэффициент светопропускания и оптическая плотность (*коэффициент светопоглощения*) образца при заданной длине волны. А светопропускание образца, в свою очередь, определяется как

$$T = I_0 / I_{\text{И}} = I_{\text{Ф}} / I_{\text{И}},$$

где  $I_0$  и  $I_{\text{И}}$  – интенсивности света с заданной длиной волны до и после его прохождения через анализируемый образец;  $I_{\text{Ф}}$  – интенсивность света с заданной длиной волны в фоновом (*либо опорном*) канале фотометра. Причем  $I_{\text{И}}$  и  $I_{\text{Ф}}$ , в наиболее точном варианте, определяются как разности выходных сигналов фотодетекторов в измерительном и опорном (*фоновом*) каналах фотометра при наличии на тех же фотодетекторах входных сигналов (*сигнал + шум*) и их отсутствии (*темновой шум*); т.е.

$$I_{\text{И}} = F_{\text{И}}^{\text{СШ}} - F_{\text{И}}^{\text{Ш}} \quad \text{и} \quad I_{\text{Ф}} = F_{\text{Ф}}^{\text{СШ}} - F_{\text{Ф}}^{\text{Ш}}.$$

Однако, поскольку не все вещества обладают значительной оптической активностью или образуют оптически активные комплексы с определёнными реагентами в определённых условиях; а кроме того, максимум поглощения каждого вещества в том или ином его состоянии всё же ограничен определённым диапазоном длин волн – то ВдМАСА в ряде случаев используют также и для качественного анализа присутствия в пробе сразу нескольких различных веществ.

При этом, следует учитывать, что значительно увеличить чувствительность и избирательность ВдМАСА можно за счёт предварительного хроматографического или электрофоретического разделения анализируемой пробы, специфической сорбции с последующим экстрагированием определяемых веществ, перегонки, перекристаллизации и других методов предварительной пробоподготовки.

Также электронные молекулярные спектры поглощения могут быть сужены или даже расщеплены на несколько более узких пиков при охлаждении образцов; либо в случае, когда достаточно высокомолекулярное анализируемое вещество помещается в растворитель с низкой диэлектрической проницаемостью (*пропанол, бутанол, гексан, октан, декан и т.п.*), «изолирующий электронное взаимодействие» различных фрагментов анализируемых молекул.

Кроме того, чувствительность и избирательность молекулярного спектрального анализа может быть существенно повышена за счёт применения косвенных методов фотометрии – использующих дополнительные реагенты (*фотоиндикаторы*), при специфическом взаимодействии которых с анализируемыми веществами светопоглощение образца существенно увеличивается, уменьшается или сдвигается по максимуму в другую область длин волн.

При этом могут применяться не только прямые индикаторные методы – в которых определяемое вещество, взаимодействуя с молекулами индикатора, изменяет интенсивность либо длину волны максимума светопоглощения последнего (*причем могут применяться как методы, в которых индикатор добавляется определяемому веществу – так и методы, в которых исследуемый образец в качестве титранта в известном количестве добавляется к известному количеству раствора индикатора*).

Но и косвенные индикаторные методы – в которых индикатор (*или несколько различных индикаторов*) изменяет интенсивность либо длину волны максимума своего светопоглощения в результате взаимодействия не с самим определяемым веществом (*или несколькими различными веществами или ионами*), а с дополнительными веществами или ионами, образующимися в результате взаимодействия с определяемым веществом какого-либо другого вещества (*или веществ*), добавляемого к исследуемому раствору в процессе титрования.

Кроме того, по типу реакций, приводящих к изменению характеристик светопоглощения определяемых веществ или ионов или индикаторов на них, методы молекулярной фотометрии делятся на: кислотно–основные, окислительно–восстановительные, комплексообразовательные и осадительные.

Причем, наиболее распространенными среди вышеназванных являются методы, использующие «цветные» (*абсорбционно–фотометрические*) индикаторы, являющиеся слабыми органическими кислотами или основаниями, которые при определенных значениях рН могут существовать как в электронейтральной (*недиссоциированной*), так и в анионной или катионной формах, обладающих разными интенсивностью и максимумами светопоглощения (*см. таблицу 1.1*).

Из остальных же индикаторных методов, применяемых в молекулярной фотометрии, для определения неорганических веществ (*или ионов*) чаще всего используют реакции образования или разрушения окрашенных комплексных соединений.

Для фотометрического определения органических веществ (*а также некоторых неорганических – таких например, как сульфиды или нитриты*) чаще всего используют реакции синтеза с их участием каких-либо окрашенных соединений (*см. рис. 1.2 и рис. 1.3*).

**Таблица 1.1.** Наиболее широкоиспользуемые в настоящее время «цветные» кислотно–основные индикаторы

Индикатор и номер его перехода	Цвет более кислой формы	pH перехода	Цвет более щелочной формы
Малахитовый зелёный [I]	жёлтый	0,1–2,0	сине–зелёный
Метиловый фиолетовый [I]	жёлтый	0,1–0,5	зелёный
Крезоловый красный [I]	красный	0,2–1,8	жёлтый
Метиловый фиолетовый [II]	зелёный	1,0–1,5	синий
Тимоловый синий [I]	красный	1,2–2,8	жёлтый
Тропеолин 00	красный	1,3–3,2	жёлтый
Метиловый фиолетовый [III]	синий	2,0–3,0	фиолетовый
(Ди)метиловый жёлтый	красный	3,0–4,0	жёлтый
Бромфеноловый синий	жёлтый	3,0–4,6	сине–фиолетовый
Конго красный	синий	3,0–5,2	красный
Метиловый оранжевый	красный	3,1–4,4	оранжево–жёлтый
Бромкрезоловый зелёный	жёлтый	3,8–5,4	синий
Бромкрезоловый синий	жёлтый	3,8–5,4	синий
Лакмод	красный	4,0–6,4	синий
Метиловый красный	красный	4,2–6,2	жёлтый
Хлорфеноловый красный	жёлтый	5,0–6,6	красный
Лакмус (азолитмин)	красный	5,0–8,0	синий
Бромкрезоловый пурпурный	жёлтый	5,2–6,8	фиолетовый
Бромтимоловый синий	жёлтый	6,0–7,6	синий
Нейтральный красный	красный	6,8–8,0	янтарно–жёлтый
Феноловый красный	жёлтый	6,8–8,4	ярко–красный
Крезоловый красный [II]	жёлтый	7,0–8,8	тёмно–красный
$\alpha$ -Нафтолфталеин	жёлто–розовый	7,3–8,7	синий
Тимоловый синий [II]	жёлтый	8,0–9,6	синий
Фенолфталеин [I]	бесцветный	8,2–10,0	малиново–красный
Тимолфталеин	бесцветный	9,3–10,5	синий
Ализариновый жёлтый ЖЖ	лимонно–жёлтый	10,1–12,0	коричнево–жёлтый
Нильский голубой	синий	10,1–11,1	красный
Диазофиолетовый	жёлтый	10,1–12,0	фиолетовый
Малахитовый зелёный [II]	сине–зелёный	11,6–13,6	бесцветный
Индигокармин	синий	11,6–14,0	жёлтый
Epsilon Blue	оранжевый	11,6–13,0	тёмно–фиолетовый

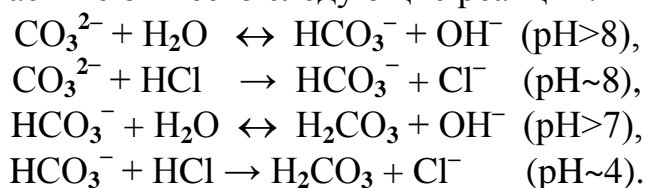
Примечания. Индикаторы в таблице приведены в порядке возрастания значений pH, вызывающих изменение их окраски. Римские цифры в квадратных скобках отвечают номеру перехода окраски (для индикаторов с несколькими точками перехода).

Помимо этого, достаточно часто в косвенном молекулярном фотометрическом анализе применяют реакции окисления или восстановления с участием анализируемых веществ и каких либо дополнительных к ним реагентов (*перманганатометрия, хроматометрия и т.п.; см. рис.1.4*).

При этом, в качестве примеров кислотно–основной фотометрии можно назвать:

- определение общей кислотности образца путем титрования его раствором щелочи с известной концентрацией в присутствии небольшого количества какого-либо из кислотно–основных индикаторов с точкой перехода окраски вблизи  $pH=7,0$  (*бромтимоловый синий, нейтральный красный, феноловый красный и т.п.; см. табл.1.1*), добавляемого к анализируемому образцу перед титрованием;

- либо определение общего количества содержащихся в образце  $CO_3^{2-}$  и  $HCO_3^-$  ионов путем титрования одного образца раствором с известной концентрацией  $HCl$  в присутствии двух индикаторов (*таких, например, как фенолфталеин и метиловый оранжевый с  $pH$  перехода окраски в районе 9 и 4, соответственно; см. табл.1.1*), добавляемых к анализируемому образцу перед последовательно перед 1-й, а затем 2-й ступенями титрования. В последнем случае имеют место следующие реакции:



В качестве примеров осадительной фотометрии можно назвать.

(1) Определение ионов растворенных тяжелых металлов путем титрования раствора, их содержащего, раствором щелочи с известной концентрацией. При этом, сначала будет происходить последовательное выпадение нерастворимых гидроксидов определяемых металлов (*обуславливаемое разницей значений произведений растворимости этих соединений*) по уравнению:  $Me^{n+} + nOH^- \rightarrow Me(OH)_n \downarrow$ , – которое может быть зафиксировано либо по изменению мутности анализируемого раствора (*для чего могут быть использованы турбидо- либо нефелометрические методики*), либо по изменению его  $pH$  (*которое может быть зафиксировано с помощью фотометрических кислотно–основных индикаторов с соответствующими диапазонами изменения окраски; см. табл.1.1*). А затем, столь же последовательное растворение этих осадков (*обуславливаемое разницей значений констант устойчивости образующихся комплексных ионов*) по уравнению:  $Me(OH)_n \downarrow + mOH^- \rightarrow [Me(OH)_{n+m}]^{m-}$ , – которое также может быть зафиксировано либо по изменению мутности анализируемого раствора, либо по изменению его  $pH$ .

(2) Тиоцианатный метод (или иначе, метод Фольгарда), применяемый для определения  $\text{Ag}^+$  ионов путем титрования раствора, их содержащего, раствором с известной концентрацией  $\text{KSCN}$  в присутствии  $\text{FeCl}_3$  (добавляемого к анализируемому раствору перед началом титрования).

При этом происходят следующие реакции:  $\text{Ag}^+ + \text{SCN}^- \rightarrow \text{AgSCN} \downarrow$  (что приводит к образованию в анализируемом растворе осадка) и  $\text{Fe}^{3+} + \text{SCN}^- \rightarrow [\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+} + [\text{Fe}(\text{SCN})_2]^+$  (что приводит к изменению цвета анализируемого раствора на кроваво-красный).

(3) Либо тиоцианатный метод определения анионов  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  и т.п. путем добавления к раствору, их содержащему, раствора с известной концентрацией  $\text{AgNO}_3$  до образования осадка. После чего, также как и в предыдущем случае, образовавшийся в анализируемом растворе избыток  $\text{Ag}^+$  ионов оттитровывают раствором с известной концентрацией  $\text{KSCN}$  в присутствии  $\text{FeCl}_3$  (добавляемого к анализируемому раствору перед началом последнего титрования).

В качестве примера комплексообразовательной фотометрии можно назвать методику определения ионов металлов. При которой к анализируемому раствору сначала добавляют хромоген черный или хром темносиний (иначе, эриохром чёрный или синий, образующие с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  при  $\text{pH}=8-10$  вишнево-красные комплексные соединения) и аммиачный буфер (для достижения  $\text{pH}=8-10$ ). А затем, оттитровывают получившуюся смесь раствором с известной концентрацией трилона Б (ЭДТА, этилендиамин-тетраацетат  $\text{Na}$ , комплексон III), образующего с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  и т.п. весьма устойчивые комплексные соединения – в результате чего освобождающийся от металлов хромоген приобретает синий цвет (см. рис. 1.5–1.6).

Аналогичным образом могут быть использованы также:

- мурексид (свободная форма которого имеет фиолетовый цвет, а связанная с ионами  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  или  $\text{I}^-$  при  $\text{pH}=10$  – красно-оранжевый),
- пирокатехиновый фиолетовый (свободная форма которого имеет желтый цвет, а связанная с ионами  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Al}^3$  или  $\text{Pb}^{2+}$  при  $\text{pH}=2-3$  – синий),
- ксиленоловый оранжевый (свободная форма которого имеет желтый цвет, а связанная с ионами  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$  при  $\text{pH}=2-6$  – красный),
- метилтимоловый синий (свободная форма которого имеет желтый цвет, а связанная с ионами  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  или  $\text{Hg}^{2+}$  – синий),
- пиридилазонафтол и пиридилазорезорцин (ПАН и ПАР, соответственно; свободные формы которых имеют желтый цвет, а свя-

занные с ионами  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  или  $Mn^{2+}$  – красный)

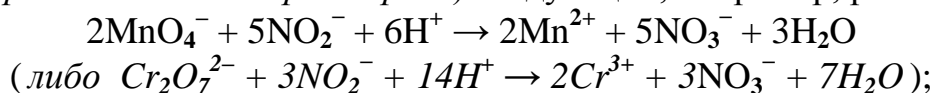
- либо хромазуrol С (свободная форма которого имеет оранжевый цвет, а связанная с ионами  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  или  $Fe^{3+}$  – голубой).

Кроме того, и комплексы некоторых ионов металлов с ЭДТА могут поглощать свет в различных диапазонах более интенсивно, нежели свободная форма трилона Б.

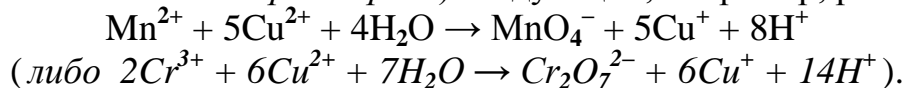
И наконец, в качестве примеров окислительно–восстановительной фотометрии можно назвать такие методики, как перманганатометрия, хроматометрия, йодометрия и т.п.

При этом, в первых двух методах регистрируется, как правило:

- либо непосредственное изменение окраски раствора, содержащего известное количество  $MnO_4^-$  (либо  $Cr_2O_7^{2-}$ ) ионов, при добавлении к нему анализируемого раствора с неизвестным содержанием различных восстановителей (как органических, так и неорганических) – вследствие протекания при смешивании вышеназванных растворов (как правило в присутствии серной кислоты и при нагреве) следующих, например, реакций:



- либо изменение окраски раствора, содержащего известное количество  $Mn^{2+}$  (либо  $Cr^{3+}$ ) ионов, при добавлении к нему анализируемого раствора с неизвестным содержанием различных окислителей – вследствие протекания при смешивании вышеназванных растворов (как правило в присутствии серной кислоты и при нагреве) следующих, например, реакций:

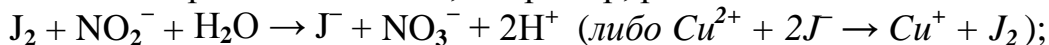


Причем данные методы, в частности, широко используются при определении ХПК (химического потребления кислорода), являющегося важным показателем органической загрязненности природных и сточных вод.

В то же время, в методе йодометрии для индикации присутствия в растворе свободного йода ( $J_2$ ), в качестве дополнительного индикатора используют раствор крахмала (дающего с  $J_2$  интенсивное синее окрашивание) либо кумарина.

При этом для определения присутствия в анализируемом растворе восстановленных (либо окисленных) форм различных химических соединений используют:

- как непосредственную регистрацию уменьшения (либо увеличения, в случае определения окисленных форм) интенсивности окраски раствора с известным содержанием  $J^-$  (либо  $J_2$ ) в присутствии крахмала и избытка КJ, вследствие протекания таких, например, реакций как:



- так и, например, оттитровывание избытка  $J_2$ , образовавшегося в результате первичного титрования, раствором с известной концентрацией тиосульфата натрия (*по уравнению  $2S_2O_3^{2-} + J_2 \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2J^-$* ) в присутствии крахмала или кумарина (*добавляемых к анализируемому раствору перед началом 2-го титрования*).

Также с помощью методов как прямой, так и косвенной молекулярной фотометрии нередко исследуют кинетику протекания различных химических реакций (*см. рис.1.7*). Причем, кинетические методы могут быть использованы, в том числе, и для значительного повышения чувствительности такого анализа. Так например, определяемое вещество (*или ион*) может вводиться в некоторую систему в качестве катализатора. В результате чего, каждая частица определяемого вещества в ходе катализируемой ею реакции приводит к появлению в системе или удалению из неё большого количества других светопоглощающих (*или светоизлучающих*) частиц.

Но при этом нужно учитывать, что при разных значениях рН, а также в присутствии примесей и вспомогательных веществ, при смене растворителя и т.п. – может измениться оптическая плотность фона; а также могут образовываться (*или разрушаться*) либо разные количества светопоглощающих (*или светоизлучающих*) веществ; либо даже разные такие вещества.

Так например, при взаимодействии ионов 3-валентного железа с сульфосалициловой кислотой ( $H_3Ssal$ ) (*комплексобразовательная фотометрия*) – ни  $Fe^{3+}$ , ни  $H_3Ssal$  сами по себе в видимой области активно свет не поглощают. А вот их комплексы поглощают свет весьма активно.

Но образуются при разных рН в разном виде и с максимумами поглощения при разных длинах волн.

А именно:

при рН от 1,8 до 2,5  $Fe^{3+} + Ssal^{3-} \rightarrow FeSsal$ ,  $lg\beta=14,4$   
(где  $\beta$  – константа устойчивости светопоглощающего комплекса),  
цвет получающегося раствора фиолетовый;

при рН от 4,0 до 8,0  $Fe^{3+} + 2Ssal^{3-} \rightarrow [Fe(Ssal)_2]^{3-}$ ,  $lg\beta=25,2$ ,  
цвет получающегося раствора бурый;

при рН от 8,0 до 11,5  $Fe^{3+} + 3Ssal^{3-} \rightarrow [Fe(Ssal)_3]^{6-}$ ,  $lg\beta=32,3$ ,  
цвет получающегося раствора желтый (*см. рис.1.8–1.10*).

Или при взаимодействии ионов 2-валентной меди со щелочами могут последовательно проходить следующие реакции, характерные для осадочной фотометрии:

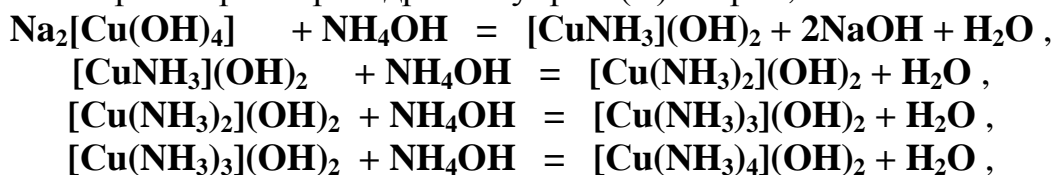


что приводит к образованию из бледно-голубого прозрачного разбавленного раствора  $CuSO_4$  синего хлопьевидного осадка  $Cu(OH)_2$ ,



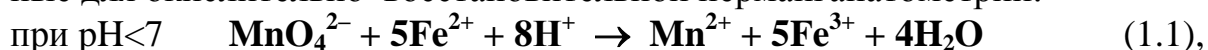


что приводит к растворению осадка  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  с образованием ярко-синего прозрачного раствора тетрагидроксокупрата(II) натрия,

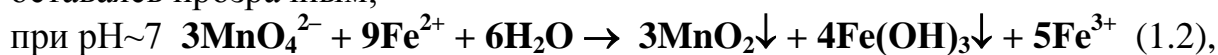


что приводит к последовательному замещению в комплексном соединении меди гидроксо-групп на амино-группы с образованием гидроксида моно-, ди-, три- или тетраамминмеди (II) (в зависимости от концентрации в растворе  $\text{NH}_3$ ) (см. рис. 1.11–1.13).

Или при взаимодействии перманганата калия ( $\text{KMnO}_4$ ) с  $\text{Fe}^{2+}$  (а также множеством других органических и неорганических восстановителей) при разных pH пробы происходят следующие реакции, характерные для окислительно-восстановительной перманганатометрии:



в результате чего красный раствор  $\text{KMnO}_4$  обесцвечивается, оставаясь прозрачным;



в результате чего красный раствор  $\text{KMnO}_4$  обесцвечивается с выпадением бурых осадков  $\text{MnO}_2$  и  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ;



в результате чего зеленый раствор  $\text{KMnO}_4$  обесцвечивается с выпадением бурых осадков  $\text{Mn}(\text{OH})_4$  и  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ .

Для учета влияния фона во всех случаях молекулярной фотометрии применяют:

- метод внешнего стандарта (при осуществлении которого светопоглощение, светотражение или светорассеяние образца сравнивают с соответствующим аналитическими сигналами, полученными от одного или нескольких стандартов, независимых по отношению к образцу);

- метод добавок (иначе «внутреннего стандарта», при осуществлении которого аналитический сигнал, полученный от образца сравнивают с аналитическими сигналами, полученными после добавления одного или нескольких стандартов, взятых в известных концентрациях, непосредственно в образце);

- метод разбавлений (при осуществлении которого известное количество анализируемой пробы разбавляют известным количеством воды или другого вещества, слабо поглощающего, отражающего или рассеивающего свет в анализируемом спектральном диапазоне – после чего сравнивают аналитические сигналы, полученные от неразбавленной и разбавленной проб методами прямой или косвенной фотометрии);

- метод опорной спектральной линии и т.п.

При этом, для иллюстрации алгоритма действий при осуществлении последнего из упомянутых методов можно привести пример определения совместного присутствия в водном растворе полинуклеотидов и белков (с чувствительностью до нескольких мкг/мл по каждому) из руководства к спектрофотометру «UNICO 2804» – которое предлагает измерять поглощение анализируемого раствора при 3-х длинах волн (260, 280 и 320 нм либо 230, 260 и 280 нм); после чего определять искомые концентрации как:

$$\begin{aligned} C_{\text{ДНК}} \text{ (мкг/мл)} &= 62,9 \times (A_{260} - A_{320}) - 36,0 \times (A_{280} - A_{320}) \\ \text{и } C_{\text{БЕЛКА}} \text{ (мкг/мл)} &= 1552 \times (A_{280} - A_{320}) - 757,3 \times (A_{260} - A_{320}) ; \\ \text{либо } C_{\text{ДНК}} \text{ (мкг/мл)} &= 49,1 \times (A_{260} - A_{320}) - 3,48 \times (A_{230} - A_{320}) \\ \text{и } C_{\text{БЕЛКА}} \text{ (мкг/мл)} &= 183 \times (A_{230} - A_{320}) - 75,4 \times (A_{260} - A_{320}) . \end{aligned}$$

Здесь  $A$  – коэффициенты поглощения анализируемого раствора при соответствующих длинах волн.  $A_{\lambda = 320 \text{ нм}}$  используется в качестве опорной длины волны, поглощение анализируемого раствора при которой принимается за фоновое.

Кроме того, важным дополнением к основному закону светопоглощения является правило аддитивности – согласно которому суммарная оптическая плотность раствора равна сумме оптических плотностей всех его не взаимодействующих друг с другом поглощающих компонентов:

$$A_{\Sigma} = l \cdot \Sigma(\epsilon_i C_i) .$$

Это правило обычно используется в тех случаях, когда пики поглощения нескольких компонентов образца значительно перекрываются – в то время как необходимо определить концентрацию каждого из них.

В таком случае измеряют оптическую плотность образца при нескольких различных концентрациях определяемых веществ (*получаемых различными разбавлениями исходной пробы или добавками в пробу различных заранее известных их концентраций*) и составляют систему линейных уравнений, решением которой определяют концентрацию каждого из анализируемых веществ. Более подробно данная методика рассмотрена в подписи к рис.1.14.

Также нужно учитывать, что достаточная точность ВДМАСА может быть достигнута только в определенном диапазоне оптических плотностей.

Так что, если таковая плотность у анализируемого образца слишком высока – то концентрацию оптически активного вещества в нём необходимо уменьшить путем разбавления пробы.

А если оптическая плотность образца слишком мала, то нужно:

(1) либо увеличить концентрацию определяемого вещества в пробе (*например, путём экстрагирования его в другой растворитель или иными способами*);

(2) либо изменить условия анализа (*температуру, рН, ионную силу раствора и т.п.*) так, чтобы оптимальным образом изменить химическую форму и другие характеристики светопоглощающих веществ в образце;

(3) либо подобрать реагент, который будет образовывать с определяемым веществом более оптически активный комплекс;

(4) либо увеличить коэффициент умножения фотодетектора (*хотя при этом, как правило, ухудшается отношение величины аналитического сигнала к фону*).

Кроме того, для увеличения оптической плотности образцов может быть применен один из следующих специальных способов (*используемых при измерении слабых световых потоков*):

(1) Визуальная фотометрия (*в которой при выравнивании механическими или оптическими средствами яркости двух полей сравнения используется способность человеческого глаза ощущать различия в яркости*).

(2) Кюветы с увеличенной длиной оптического пути – за счёт прямоугольного сечения (*а не квадратного, как в стандартном варианте*), увеличенного объема, отражающего покрытия (*позволяющего свету от внешнего источника многократно проходить через один и тот же объем образца*) и т.п.

(3) Проточные кюветы (*позволяющие анализировать значительно больший объем пробы, чем в случае использования обычных кювет с фиксированным объемом пробы*).

(4) Лидары – при использовании которых в настоящее время длина оптического пути излучения от внешнего источника в образце может достигать десятков километров.

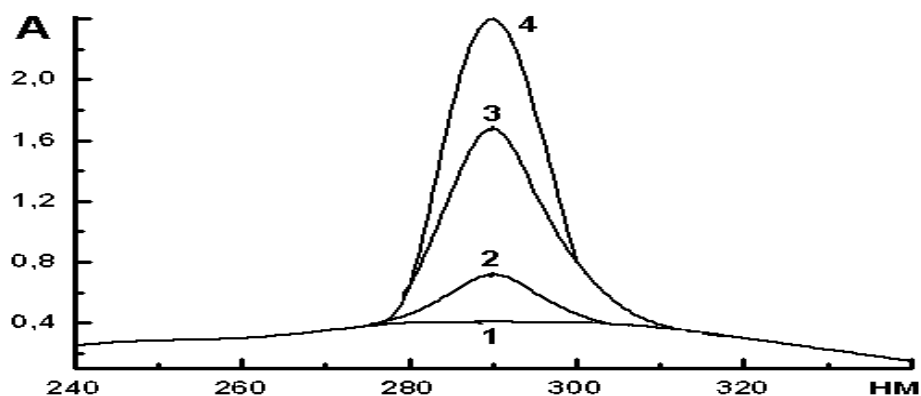
(5) Светофильтры или монохроматоры с увеличенной шириной спектральных щелей (*для аппаратного интегрирования поглощения или пропускания образца по достаточно большому диапазону длин волн – хотя при этом и может ухудшиться избирательность анализа*).

(6) Накопление фонового и аналитического сигналов, за счёт множественного их считывания с одного и того же образца (*что увеличивает как абсолютное значение суммарного аналитического сигнала, так и отношение оного к значению суммарному фоновому сигналу*).

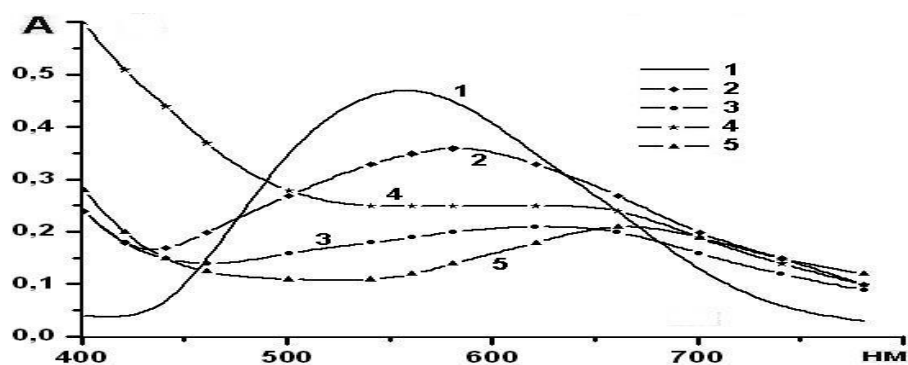
И наконец, в ряде случаев в фотометрии, помимо стандартных жидкостных, используются также:

- + герметичные или проточные газовые кюветы;
- + держатели оптически прозрачных пленок и кристаллических образцов;
- + такие специальные виды кювет, как: термостатируемые (*электрически или потоком внешнего теплоносителя*), капиллярные и т.п.

Для иллюстрации сказанного ниже приведены следующие рисунки.



**Рис. 1.1.** Прямой ВдМАСА. Здесь показаны спектры светопоглощения в ближней ультрафиолетовой области водных растворов с концентрациями молочного белка казеина: 0.01, 0.3, 0.7 и 1 масс. % (линии 1–4). При этом, по оси ординат отложены значения оптической плотности ( $A$ ), полученные для исследованных растворов относительно дистиллированной воды на спектрофотометре «UNICO-2804» при установленной спектральной ширине монохроматора 1 нм и стандартной 10 мм кювете; а по оси абсцисс – длина волны поглощаемого света.

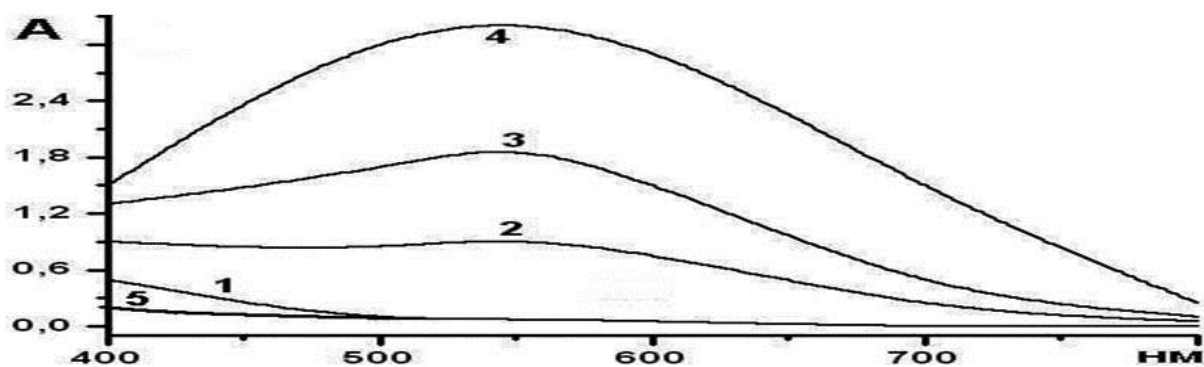


**Рис. 1.2.** Косвенный комплексообразовательный ВдМАСА. Здесь показаны спектры светопоглощения в видимой области водных растворов с концентрациями молочного белка казеина: 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 и 0.001 масс. % (линии 1–5) в присутствии 0.4 М NaOH и 0.005 М CuSO<sub>4</sub>, в результате чего, в анализируемых растворах протекает специфическая биуретовая реакция, приводящая к образованию активно поглощающих свет в видимой области спектра комплексов меди с пептидными белковыми связями (при этом, что сами белки в видимой области спектра свет практически не поглощают). Обозначения по осям здесь те же, что и на рис.1.1.

Отсюда мы видим, что осуществляя биуретовую реакцию, в водном растворе, содержащем 0.4 М NaOH и 0.005 М CuSO<sub>4</sub>, в случае, если соблюдается условие:  $A_{550} > A_{440}$ , о концентрации белка можно судить по по-

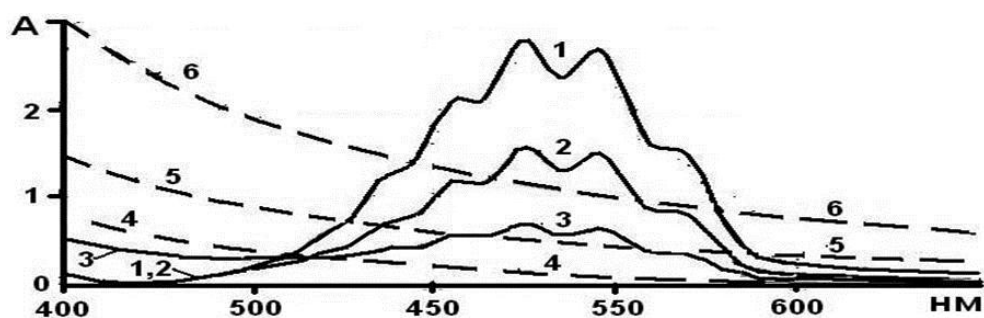
глощению одного раствора при 550 нм (которое пропорционально увеличивается при увеличении содержания белка в анализируемом растворе более 0,2 масс. %). При этом, если  $A_{550} > 4$  – пробу следует разбавить и измерить её поглощение при 550 и 440 нм снова. А если  $A_{440} > A_{550}$  – можно утверждать, что концентрация белка в пробе меньше 0,2 масс. % (либо иного значения, полученного для конкретного вида белка по предварительно построенной калибровке). И если нужно получить точное значение этой концентрации – пробу следует разбавить на 10÷15%. После чего, определить увеличилось или уменьшилось её поглощение при 400 нм.

И дальше оценивать концентрацию белка в пробе по соответствующей калибровке (нисходящей или восходящей для разных диапазонов концентраций белка по светопоглощению раствора при 400 нм).



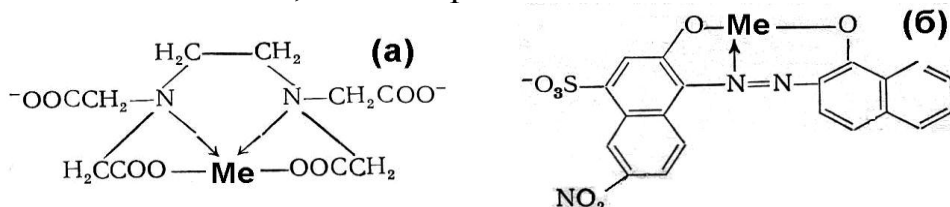
**Рис. 1.3.** Косвенный комплексообразовательный ВдМАСА. Здесь показаны спектры светопоглощения в видимой области водных растворов с концентрациями крахмала: 0.001 (линии 1 и 5), 0.02, 0.06 и 0,2 масс. % (линии 1–3) в присутствии  $10^{-9}$  (линия 5) или  $10^{-3}$  (линии 1–4) моль/л  $I_2$  (используемого, в данном случае, в качестве специфического фотометрического индикатора – образующего с крахмалом, в свободном виде, в водорастворенном состоянии слабо поглощающего свет в видимой области спектра, активно поглощающие и рассеивающие видимый свет комплексные соединения). Обозначения по осям здесь те же, что и на рис.1.1.

Таким образом, мы видим, что для того, чтобы точно определять количественное содержание бихромат-ионов в водных растворах в широком диапазоне концентраций  $Cr_2O_7^{2-}$  без достаточно трудоемкой процедуры подбора нужной степени разведения пробы при превышении её оптической плотностью верхнего предела чувствительности фотометра при заданной длине волны – можно осуществлять измерение оптической плотности таких растворов не при одной (как обычно), а при 3-х разных длинах волн



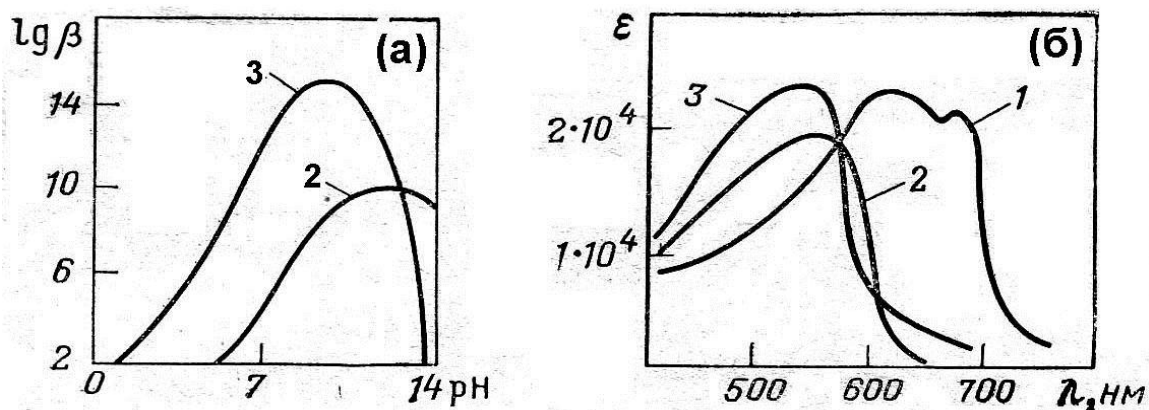
**Рис. 1.4.** Косвенный окислительно–восстановительный ВдМАСА. Здесь показаны спектры светопоглощения в видимой области водных растворов, содержащих 0,001 М  $\text{KMnO}_4$  при рН 0,3 (линии 1–4), 1,15 (линия 5) или 6,5 (линия 6) и концентрациях  $\text{FeSO}_4$ : 0,0001 (сплошная линия 1), 0,0025 (сплошная линия 2), 0,005 (сплошная линия 3) и 0,0075 М (штриховые линии 4–6), соответственно.

Отсюда видно, что светопоглощение  $\text{KMnO}_4$  в видимой области спектра снижается пропорционально увеличению содержания в анализируемых растворах различных восстановителей (таких как  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ , большинство органических соединений и т.п.). Причем, наиболее чувствительна перманганатометрия в сильно кислой среде. Поскольку с увеличением рН образуются другие продукты окисления  $\text{KMnO}_4$  (см. реакции 1.1–1.3), более эффективно поглощающие и рассеивающие видимый свет. Обозначения по осям здесь те же, что и на рис.1.1.

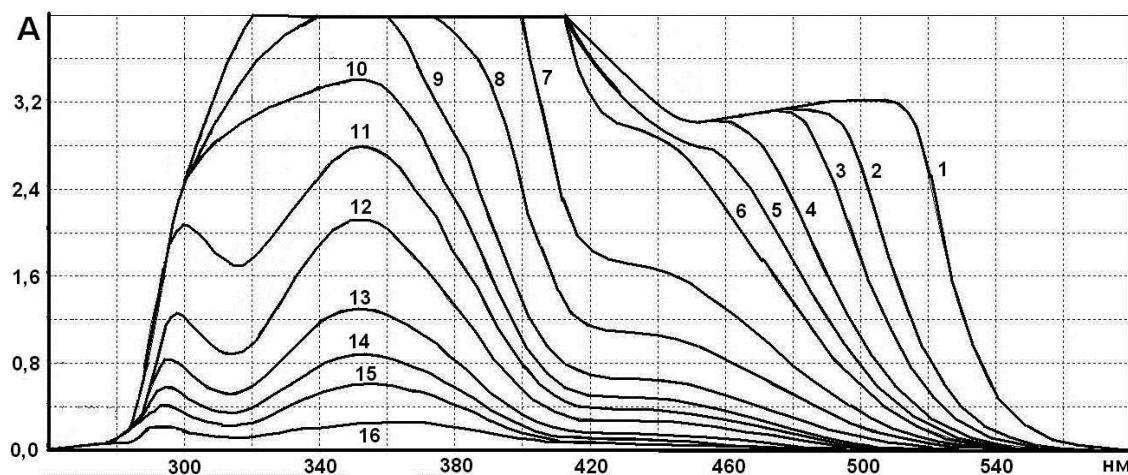


**Рис. 1.5.** Структура комплексов ионов различных металлов (Me) с ЭДТА (а) и хромогеном черным (б).

При этом, при концентрациях бихромат–ионов ( $\text{C}_{\text{БИ}}$ ) от  $10^{-4}$  моль/л (нижний предел обнаружения на спектрофотометре «UNICO-2804» при установленных спектральной ширине монохроматора 1 нм и стандартной 10 мм кювете – при увеличении спектральной ширины монохроматора, длины оптического пути луча в кювете либо при использовании прибора с большей светосилой и чувствительностью фотодетектора этот предел обнаружения может быть увеличен) до  $3 \times 10^{-3}$  М (либо иного значения  $\text{C}_{\text{БИ}}$  – при коем окажется превышен верхний предел чувствительности используемого фотометра при заданной длине волны; который для «UNICO-2804» в данных условиях составляет  $A \sim 3,2$ ) величину  $\text{C}_{\text{БИ}}$  следует определять по величине оптической плотности исследуемого раствора относительно дистиллированной воды при 350 нм.



**Рис. 1.6.** Фотометрическое определение комплексов Mg (линии 2) и Zn (линии 3) с хромогеном черным (ХЧ). На рис.а показана зависимость от pH раствора констант устойчивости ( $\beta$ ) данных комплексов. А на рис.б показаны спектры поглощения этих комплексов в сравнении со спектром поглощения чистого ХЧ (линия 1).



**Рис. 1.7.** Прямой ВДМАСА. Спектры светопоглощения нейтральных водных растворов  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  с концентрациями: 1000 (1), 330 (2), 220 (3), 150 (4), 110 (5), 80 (6), 40 (7), 30 (8), 22 (9), 18 (10), 14 (11), 11 (12), 7,5 (13), 5 (14), 3 (15) и 1 (16)  $\times 10^{-4}$  М. Обозначения по осям те же, что и на рис.1.1.

При  $S_{\text{БИ}}$  в диапазоне  $3 \div 6 \times 10^{-3}$  М концентрацию бихромат-ионов в исследуемом растворе следует определять по величине его оптической плотности относительно дистиллированной воды при 410 нм.

А при  $S_{\text{БИ}}$  от  $6 \times 10^{-3}$  до 0,1 М концентрацию бихромат-ионов в исследуемом растворе следует определять по величине его оптической плотности относительно дистиллированной воды при 500 нм. Причем, верхний предел обнаружения может быть увеличен за счёт уменьшения спектральной ширины монохроматора, длины оптического пути луча в кювете, уменьшения интенсивности света на входе в анализируемый образец либо

на выходе из него (например, за счёт применения ослабляющих светофильтров) и т.п.; а также за счёт разбавления самого анализируемого образца.

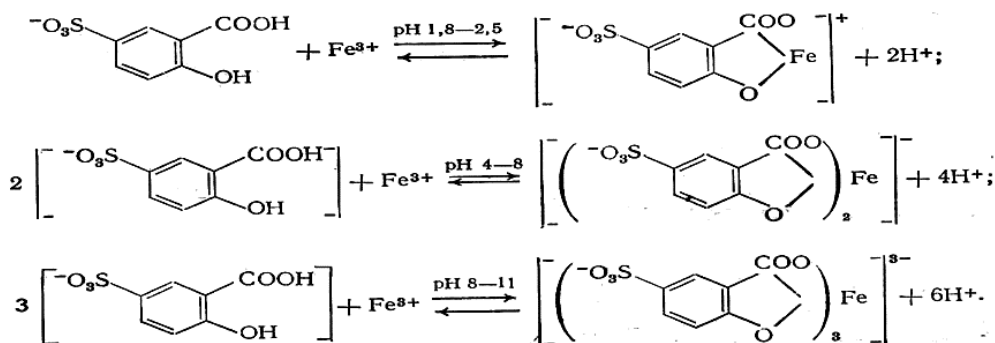


Рис. 1.8. Схема образования сульфосалицилатов железа (III).

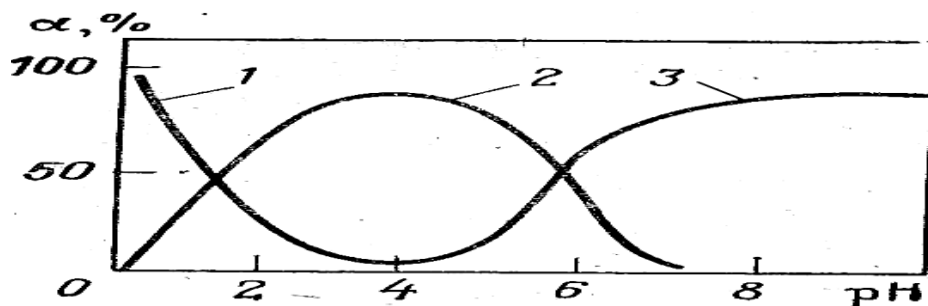


Рис. 1.9. Зависимость от pH раствора % содержания в растворе моно- (1), ди- (2) и три- (3) сульфосалицилатов железа (III).

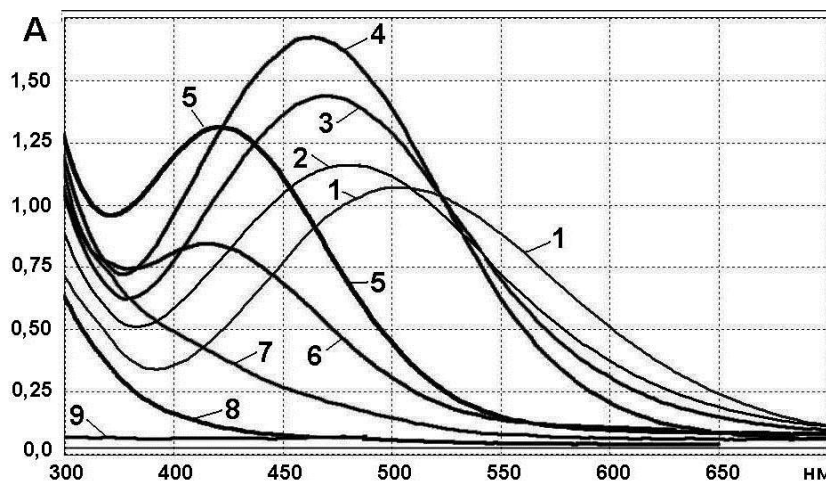
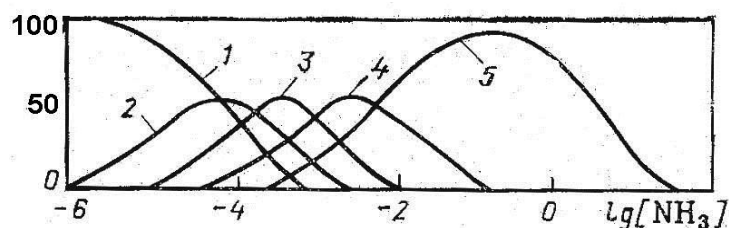
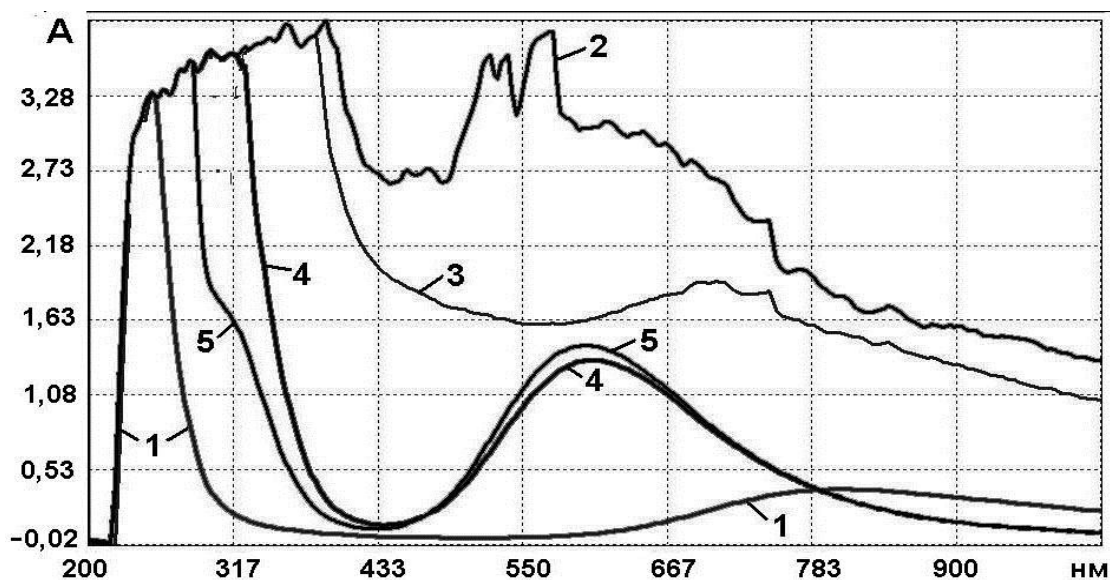


Рис. 1.10. Спектры поглощения в видимой области водного раствора, содержащего 0,001 М  $\text{Fe}^{3+}$  и 0,004 М сульфосалициловую кислоту (HSSal) при pH 1 (1), 2,5 (2), 3,5 (3), 7 (4), 8 (5), 10 (6) и 12 (7), в сравнении со спектрами поглощения водных растворов чистых 0,001 М  $\text{FeCl}_3$  (8) и 0,0004 М HSSal (9).



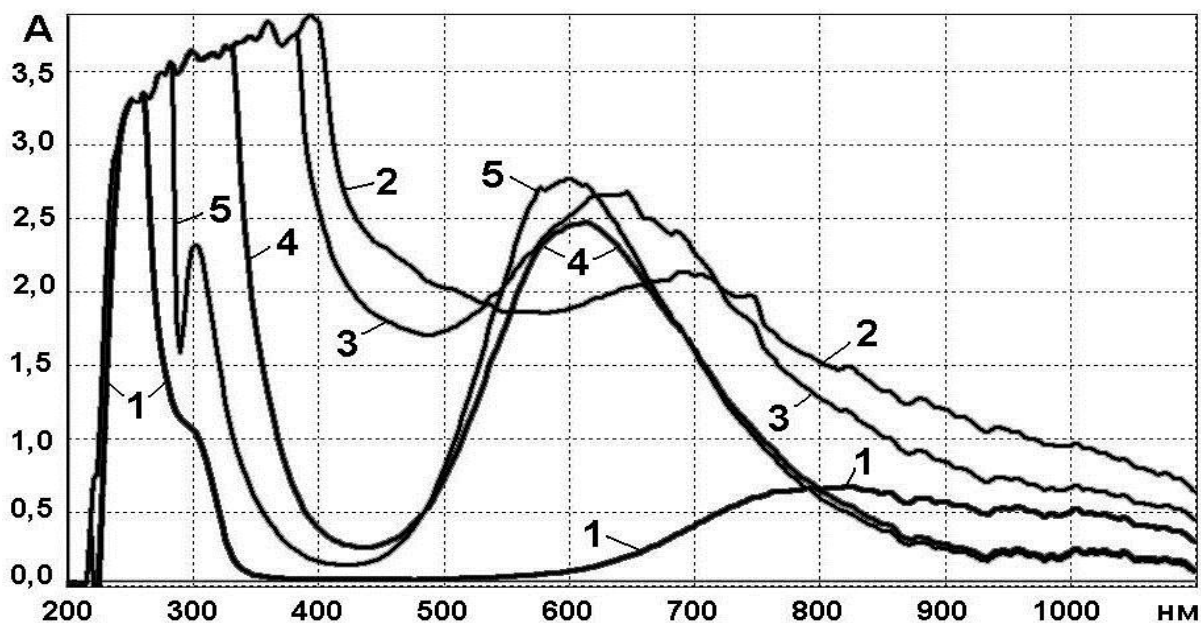


**Рис. 1.11.** Процентное распределение аммиакатов меди (II) в зависимости от молярного содержания  $\text{NH}_3$  в водном растворе  $\text{Cu}^{2+}$ . Соответствующими линиями здесь обозначены:  $\text{Cu}^{2+}$  (1),  $[\text{CuNH}_3]^{2+}$  (2),  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  (3),  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_3]^{2+}$  (4) и  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  (5).



**Рис. 1.12.** Спектры поглощения 0,05М водных растворов  $\text{CuSO}_4$ , содержащих разные количества аммиачного буфера ( $\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$ ). Линиям 1–5 здесь соответствуют концентрации  $\text{NH}_4\text{OH}$ : 0.0, 0.025, 0.05, 0.075 и 0.1–0.2 моль/л.

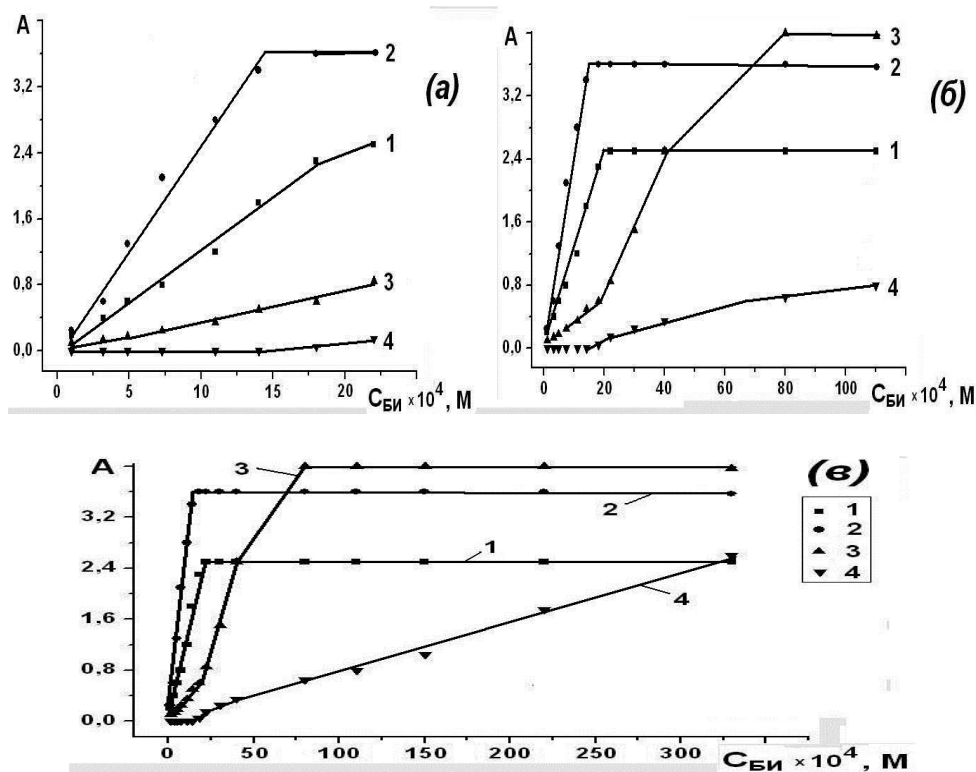
При этом, сначала, при соотношении молярных концентраций  $\text{NH}_4\text{OH}$  к  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Ca}/\text{Cm}$ ) равном 1/2 образуется голубой осадок  $\text{Cu}(\text{OH})_2\downarrow$  (см. линию 2). Затем, при  $\text{Ca}/\text{Cm} = 1/1$  наряду с осадком  $\text{Cu}(\text{OH})_2\downarrow$ , раствор начинает окрашиваться в фиолетовый цвет комплексными ионами  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  (см. линию 3). После чего, при  $\text{Ca}/\text{Cm} > 1.5/1$  осадок  $\text{Cu}(\text{OH})_2\downarrow$  полностью растворяется, замещаясь ионами  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  (см. линии 4 и 5).



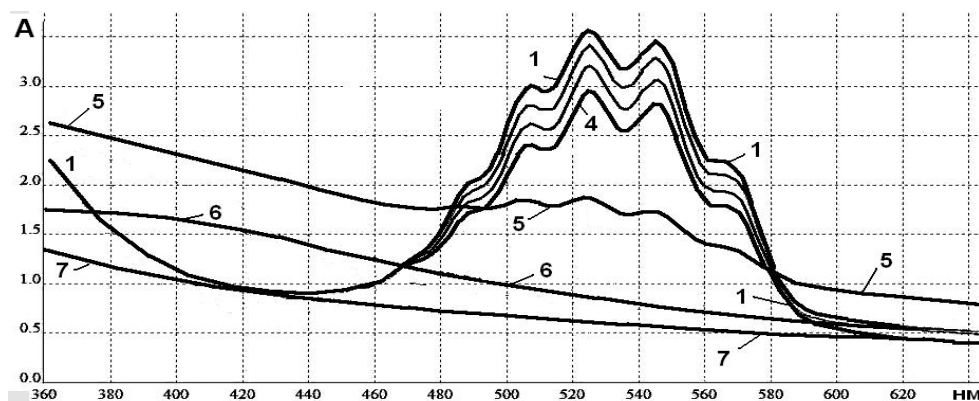
**Рис. 1.13.** Спектры поглощения водных растворов, содержащих 0,1М  $\text{CuSO}_4 + 0,1\text{М HNO}_3$  в присутствии разных количеств аммиачного буфера. Линиям 1–5 здесь соответствуют концентрации  $\text{NH}_4\text{OH}$ : 0–0.0002, 0.007, 0.017, 0.027 и более 0,037 моль/л.

Здесь, как и в предыдущем случае (см. рис.1.12), сначала образуется голубой осадок  $\text{Cu}(\text{OH})_2\downarrow$  (см. линию 2). Затем, наряду с этим осадком, раствор начинает окрашиваться в фиолетовый цвет комплексными ионами  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  (см. линию 3). После чего осадок  $\text{Cu}(\text{OH})_2\downarrow$  полностью растворяется, замещаясь ионами  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  (см. линии 4 и 5).

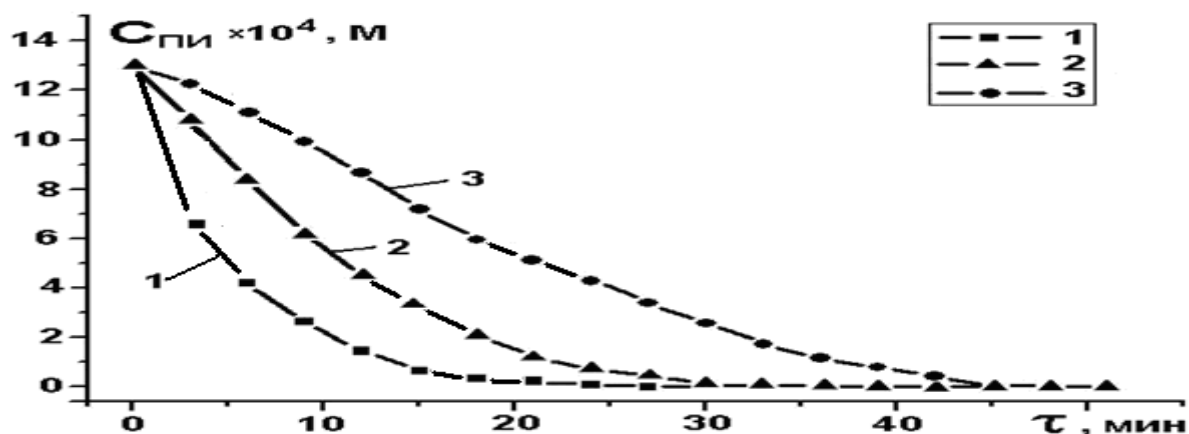
Таким образом, при фотометрическом определении совместного содержания в водных растворах перманганат- и бихромат-ионов нужно осуществлять следующую последовательность действий. Сначала, разбавляя два отдельных раствора, содержащих, соответственно, 0,1 М  $\text{MnO}_4^-$  и 0,1 М  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , строим калибровочные зависимости  $A$  при 350 и 525 нм от концентраций каждого из этих ионов. Затем, измеряем оптическую плотность анализируемого образца при 350 и 525 нм ( $A_{350}$  и  $A_{525}$ , соответственно). Далее, по калибровкам и полученной величине  $A_{525}$  определяем концентрацию в пробе перманганат-ионов и то, какой вклад они вносят в общую оптическую плотность образца при 350 нм ( $A_{350}^{\text{II}}$ ). После чего, по формуле  $A_{350}^{\text{B}} = A_{350} - A_{350}^{\text{II}}$  определяем вклад бихромат-ионов в общую оптическую плотность образца при 350 нм. И наконец, по калибровкам и полученной величине  $A_{350}^{\text{B}}$  определяем концентрацию в пробе бихромат-ионов.



**Рис. 1.14.** Калибровочные зависимости  $A$  от  $C_{БИ}$ , полученные на основании данных, показанных на рис.1.5, для света с длиной волны 300 (1), 350 (2), 410 (3) и 500 (4) нм. Точками показаны экспериментально полученные данные, а линиями – аппроксимирующие их прямые.



**Рис. 1.15.** ВдМАСА кинетики окисления перманганатом водного раствора глюкозы. Линиями 1–4 здесь показаны спектры поглощения нейтрального раствора  $4,5 \times 10^{-3}$  М  $KMnO_4$  в присутствии 0,0 (1), 0,007 (2), 0,01 (3) и 0,016 М глюкозы (4) почти сразу после добавления последней в кювету. А линиями 5–7 показаны спектры поглощения того же раствора через 15, 30 и 60 минут после добавления в кювету 0,016 М глюкозы. Обозначения по осям те же, что и на рис.1.1.



**Рис. 1.16.** Зависимости концентрации перманганат-ионов ( $C_{\text{пи}}$ , М) от времени протекания ( $\tau$ ) реакции окисления  $1,3 \times 10^{-3}$  М  $\text{KMnO}_4$  водных растворов глюкозы с исходными концентрациями последней  $30, 10$  и  $5 \times 10^{-3}$  М (линии 1–3, соответственно, где точками показаны экспериментальные данные), в присутствии  $0,1$  М  $\text{HNO}_3$ . При этом,  $C_{\text{пи}}$  рассчитывались как  $C_{\tau} = C_0 \times (A_{\tau} - A_{\text{мин}}) / (A_{\text{макс}} - A_{\text{мин}})$ , где  $A_{\text{макс}}$  и  $A_{\text{мин}}$  – максимальное и минимальное значения оптической плотности раствора в ходе протекания исследуемой реакции. После чего, для расчета порядка ( $n$ ) и константы скорости ( $k$ ) реакции экспериментально полученные зависимости  $C_{\text{пи}}$  от  $\tau$  аппроксимировались функцией  $C^{1-n} = C_0^{1-n} + (n-1) \times k\tau$ .

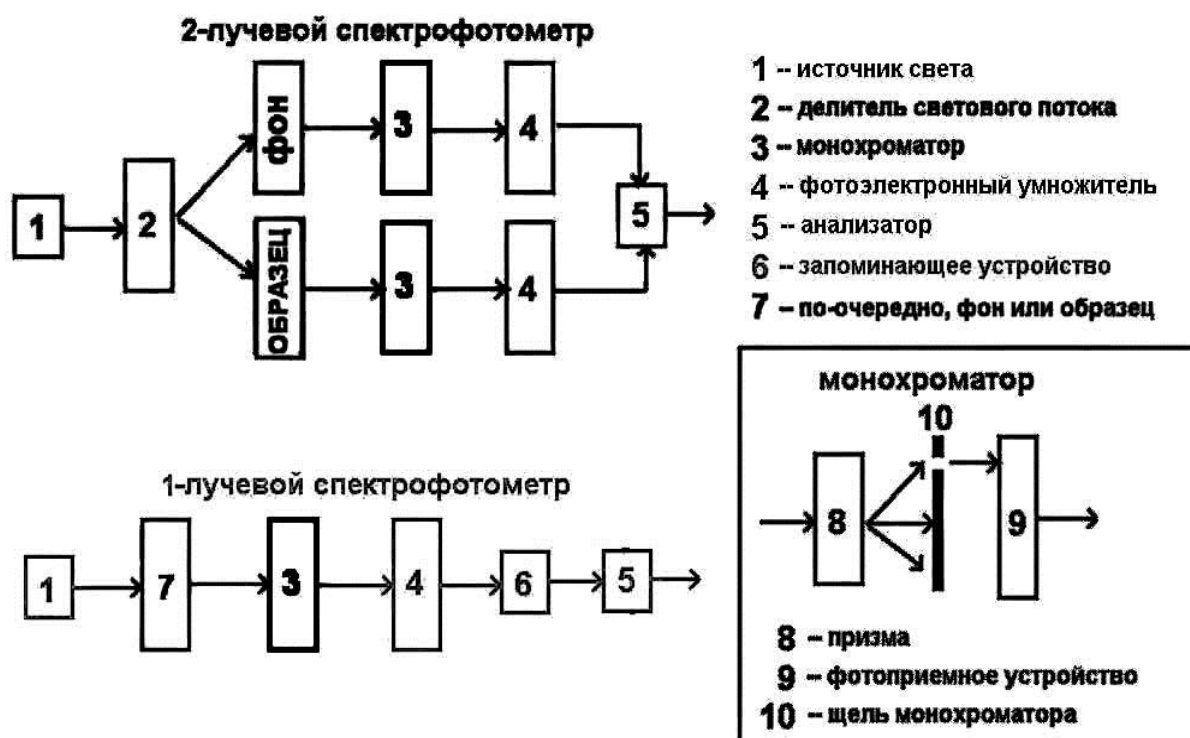
## 2. Устройства, используемые для ВдМАСА

При осуществлении ВдМАСА спектры светопоглощения образцов регистрируют, как правило, одним из двух следующих способов, показанных на рис. 2.1.

Кроме того, часто применяются промежуточные варианты, в которых:

(1) либо аналитический и фоновый (*опорный*) сигналы по-очередно проходят через один и тот же монохроматор, после чего попадают на один и тот же фотодетектор;

(2) либо в качестве «образца сравнения» используется не кювета с «фоновым раствором» (*содержащим, по-возможности, все те же компоненты, что и анализируемый образец, за исключением собственно анализируемого вещества*), а кювета с «раствором сравнения» (*содержащим известное количество другого светопоглощающего вещества*) или даже просто светофильтр с заранее установленными стабильными светопоглощающими характеристиками.



**Рис. 2.1.** Схемы устройства одно- и двухлучевого спектрофотометров, которые могут быть использованы для осуществления ВдМАСА.

При этом, одно–лучевые приборы применяются, в основном, для массовых рутинных измерений. А более сложные и дорогие двух–лучевые – для более точного прецизионного анализа (поскольку они учитывают временную нестабильность аналитических характеристик источника излучения, монохроматора, фотодетектора и регистратора – которая не может быть учтена с помощью обычной «статической» калибровки).

Помимо этого, в зависимости от задач исследования, может меняться как ширина щелей монохроматоров, так и их расположение (между источником света и образцом либо между образцом и фотодетектором), а также коэффициент фотоэлектронного умножения детекторов, материал стенок кювет с образцом <sup>\*1</sup> и т.п. Причем, обычно, в спектрофотометрах используют монохроматоры с шириной щели от 0,5 до 30 нм.

А в так называемых фотоколориметрах – сменные светофильтры, избирательно пропускающие свет в диапазоне длин волн большем 30 нм ( $\lambda \pm \Delta\lambda$ ,

<sup>\*1</sup> в качестве которого может быть использован полистирол с достаточной оптической прозрачностью, обычное стекло (в случае выполнения анализов в области только от 350 до 700 нм), кварцевое стекло, стекло со вставками из чистого кварца и т.д.

$\Delta\lambda > 15\text{нм}$  ) и включающем максимум поглощения: либо самого определяемого вещества; либо реагента, с помощью которого это вещество определяется, либо продукта реакции анализируемого вещества с вышеупомянутым реагентом, либо исходного вещества или продукта реакции, катализируемой определяемым веществом.

При этом, использование светофильтров хотя и снижает избирательность (*селективность*) анализа (*впрочем, так, как уже говорилось, весьма невысокую для методов прямого ВдМАСА – но могущую быть значительно увеличенной за счёт использования специфических реагентов на определяемые вещества*) – зато, значительно удешевляет и упрощает необходимое для измерений аналитическое оборудование; а также увеличивает чувствительность ВдМАСА в области малых концентраций определяемых веществ

**Светофильтры**, используемые в ВдМАСА, подразделяются на: абсорбционные и интерференционные.

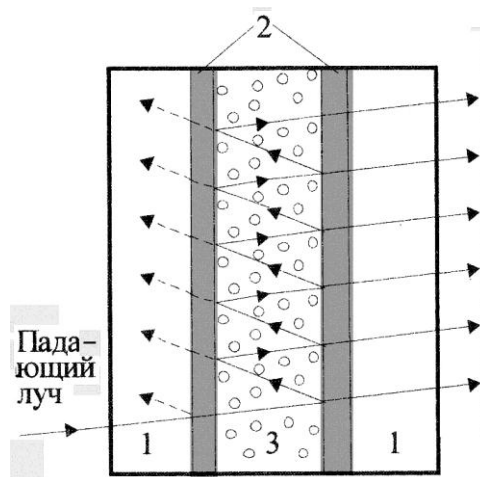
При этом, под абсорбционными светофильтрами подразумеваются устройства, пропускающие излучение только определенного интервала длин волн, поглощая излучение всех остальных длин волн.

Причем, по характеру своего интервала пропускания такие светофильтры делятся на: узкополосные (*с малым  $\Delta\lambda$* ), широкополосные и отсекающие (*с одним порогом пропускания – вместо двух, как в предыдущих случаях – т.е. пропускающие фотоны всех длин волн, больших или меньших некоторого  $\lambda_{\text{п}}$ , поглощая все остальные фотоны*).

А по исполнению данные светофильтры обычно представляют собой пластины, изготовленные из разных сортов цветного стекла, прозрачных пластмасс, пленок из окрашенного желатина и т.п. Особое распространение имеют стеклянные абсорбционные фильтры.

Хотя в ряде случаев применяют также жидкостные фильтры – изготовляемые в виде окрашенных растворов неорганических солей или органических красителей, помещаемых в кюветы со стеклянными или кварцевыми (*для УФ-диапазона*) стенками. Кроме того, для выделения УФ-участков спектра иногда применяют газовые абсорбционные фильтры – устроенные подобно жидкостным. А для выделения более узких спектральных участков применяют комбинации из нескольких светофильтров.

Интерференционными светофильтрами называются многослойные тонкопленочные структуры, с помощью которых можно выделять излучение не только в отсекающем или широкополосном варианте, но в диапазоне всего нескольких нанометров (*так называемые, полосовые фильтры*). Принцип действия этих светофильтров основан на явлении многолучевой интерференции света и состоит в следующем. Одна часть излучения, падающего на поверхность такого фильтра, отражается от металлической пленки–зеркала 2 (*как показано на рис.2.2*).



**Рис. 2.2.** Схема интерференционного светофильтра.

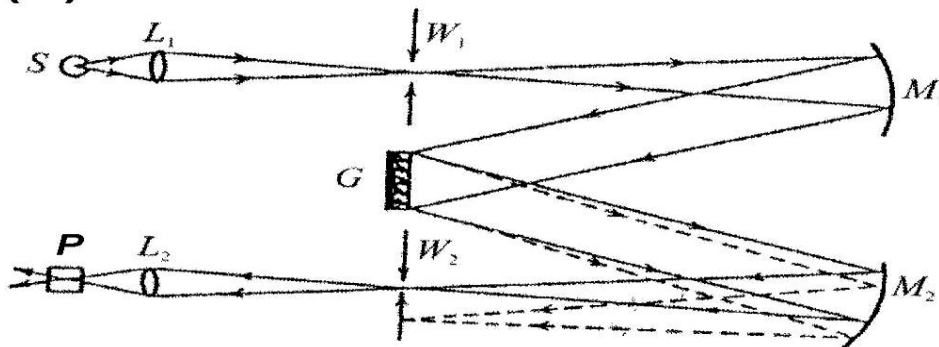
А другая часть проходит через слой диэлектрика 3 и попадает на вторую металлическую пленку–зеркало 2. Здесь снова часть светового потока отражается и попадает через слой диэлектрика 3 на 1-ю пленку–зеркало – а другая часть выходит наружу. Этот процесс повторяется многократно. И если на расстоянии между двумя пленками–зеркалами уместится точно несколько полуволн ( $\lambda_{\Phi}/2$ ) – то лучи с длиной волны  $\lambda_{\Phi}$  при совпадении их по фазе будут усиливаться; а при несовпадении – гаситься. В результате чего, из такого интерференционного светофильтра будут выходить только фотоны с длинами волн, равными  $k \times \lambda_{\Phi}/2$  (где число « $k$ », называемое порядком световых волн, равно 1, 2, 3 и т.д.).

При этом, излучение 2-го и более высоких порядков, как правило, поглощается стеклянной пластиной 1, ограничивающей рассматриваемый фильтр. Так что из данного светофильтра будут выходить только фотоны с длиной волны  $\lambda_{\Phi}/2$ .

**Монохроматоры** в настоящее время применяются в ВДМАСА, в основном, двух типов (см. рис.2.3). В этих монохроматорах свет от источника излучения **S** через конденсорную фокусирующую линзу **L<sub>1</sub>** и входную спектральную щель **W<sub>1</sub>**, коллиматорное зеркало (**M<sub>1</sub>**) или линзу (**M<sub>1</sub><sup>\*</sup>**) (делающие из разнонаправленного света параллельный его пучок) попадает на диспергирующий элемент (в качестве которого используется либо дифракционная решетка **G**, либо светопреломляющая призма **G<sup>\*</sup>**).

Из диспергирующего элемента свет с разными длинами волн ( $\lambda$ ) выходит под разными углами. При этом, в случае призмы (сделанной из материала, прозрачного для всего исследуемого диапазона длин волн) это происходит вследствие известной зависимости от  $\lambda$  угла преломления света при переходе его из одной среды в другую.

**(А)** Монохроматор с дифракционной решеткой



**(Б)** Монохроматор с диспергирующей призмой

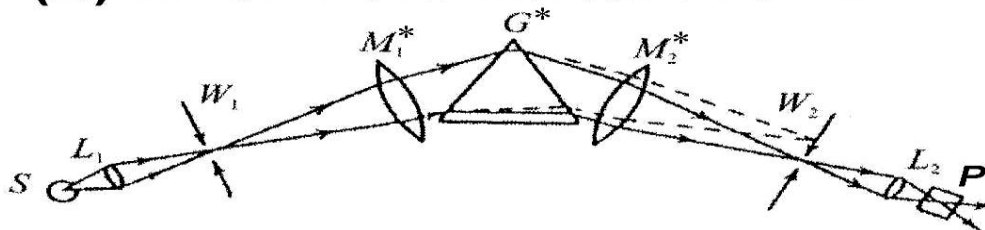


Рис. 2.3. Схемы монохроматоров, используемых в ВдМАСА.

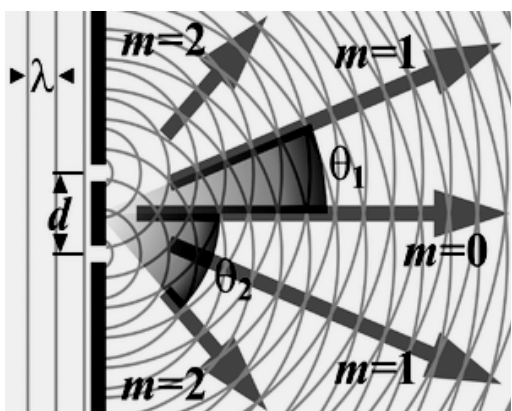


Рис. 2.4. Схема действия дифракционной решетки.

А в случае дифракционной решетки (представляющей собой совокупность множества полос разного профиля, непрозрачных и неотражающих в исследуемом диапазоне длин волн, нанесенных на точно определенном расстоянии друг от друга, называемом периодом решетки, на плоскую или вогнутую поверхность, прозрачную либо отражающую в том же диапазоне длин волн) фронт световой волны разбивается штрихами решетки на отдельные пучки когерентного (т.е. согласованного по своим колебательным характеристикам) света так, как это показано на рис.2.4. Эти пучки претерпевают дифракцию на штрихах решетки и интерферируют друг с другом. И так как для разных длин волн максимумы интерференции (показанные стрелками на рисунке) оказываются под разными углами (определяемыми разностью хода интерферирующих лучей) – то исходный полихроматический свет, также как и в ранее рассмотренном случае диспергирующей призмы, раскладывается дифракционной решеткой в линейный монохроматический спектр.

Причем для удешевления и уменьшения размеров интерференционного монохроматора в нём могут использоваться не одна большая, а несколь-



ко относительно небольших дифракционных решеток, работающих по принципу сложения дисперсии.

Вогнутые зеркальные дифракционные решетки совмещают в себе функции как диспергирующего элемента ( $G$ ), так и входного и выходного коллиматоров ( $M_1$  и  $M_2$ , соответственно).

Применение переменного шага и криволинейного штриха при изготовлении дифракционных решеток значительно уменьшает их абберационное искажение, позволяя получать высокое качество спектра в широком диапазоне длин волн.

А кроме того, в последнее время освоен способ изготовления голографических дифракционных решеток. При котором, на поверхность, покрытую фотоэмульсией, одновременно направляют два потока от одного и того же лазера. В результате чего, на фотоэмульсии получается интерференционная картина. После проявления коей, на поверхности появляется ряд темных параллельных линий – которые и составляют дифракционную решетку. Такие решетки обладают очень низким уровнем рассеянного света (по сравнению с решетками, при изготовлении которых штрихи наносятся механическим способом).

Далее, после прохождения света через диспергирующий элемент выделение в нём нужного спектрального диапазона происходит за счёт:

- (1) либо линейного смещения выходной спектральной щели монохроматора  $W_2$  относительно неподвижного диспергирующего элемента,
- (2) либо поворота самого диспергирующего элемента относительно неподвижной спектральной щели  $W_2$ .

При этом, щели монохроматора нередко имеют весьма точно регулируемую ширину. Что используется, во-первых, для изменения разрешающей способности и светосилы монохроматора. А во-вторых, для компенсации того, что вследствие явления обратной линейной дисперсии, при одних и тех же геометрических размерах такой щели ширина выделяемого ею спектрального интервала несколько изменяется при изменении световой длины волны.

И наконец, после прохождения через  $W_2$  и выходную конденсорную фокусирующую линзу  $L_2$  (между которыми, в случае использования в монохроматоре в качестве  $G$  каких-либо дифракционных решеток, обычно ещё помещают дополнительный светофильтр, отсекающий налагающиеся на основную дифракционную картину дифракционные составляющие высших порядков) свет попадает на фоторегистрирующее устройство  $P$  – которые в современных оптико-аналитических приборах также могут быть различны.

Принципы использования в качестве таких устройств глаза наблюдателя или фотопластин мы здесь рассматривать не будем. Поскольку сейчас это применяется на практике весьма редко. Хотя в ряде случаев и позволя-

ет добиваться лучших аналитических результатов (*хотя и менее обеспеченных метрологически*).

Принцип работы фотоэлектронного умножителя (ФЭУ, показанного на рис.2.5), состоит в следующем. Между положительным анодом (А) и отрицательным катодом (К) создается высокое напряжение (1–2 кВ) – которое ступенчато снижается между анодом и последующими динодами ( $D_1$ – $D_{15}$ ). В результате падения на катод квантов света от внешнего источника, из катода вырываются электроны (*первичный фотоэффект*).

Каждый из этих электронов, ускоряясь электрическим полем (за счёт разности напряжений между К и  $D_1$ ), ударяется о 1-й динод ( $D_1$ ) и выбивает из него  $q=3$ –5 вторичных электронов.

Каждый из этих электронов, ускоряясь электрическим полем (за счёт разности напряжений между  $D_1$  и  $D_2$ ), ударяется о 2-й динод ( $D_2$ ) и выбивает из него от 3-х до 5-и третичных электронов... и т.д.

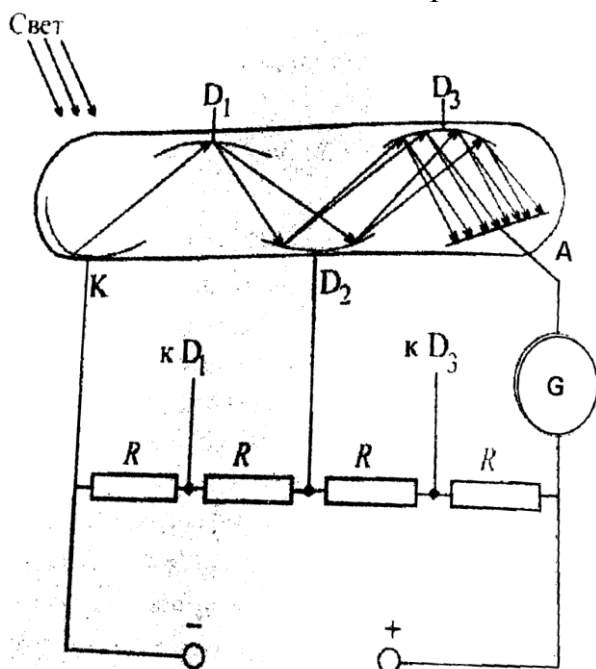


Рис. 2.5. Схема устройства ФЭУ.

Наконец, все электроны с последнего динода (которых всего в ФЭУ обычно  $n=10$ –15) собираются на аноде – в результате чего, в цепи начинает идти ток. Усиление ФЭУ равно  $q^n$ . Для чувствительности ФЭУ важно, чтобы он имел как можно меньшее значение фонового «темнового» тока (*образующегося вследствие так называемой «термоэлектронной эмиссии», под коей понимают процесс при котором электроны вырываются из катода в отсутствие внешних квантов света, просто под действием тепла и высокого напряжения*). Поэтому, для большей чувствительности ФЭУ охлаждают до  $-20^{\circ}\text{C}$  или даже  $-40^{\circ}\text{C}$ . А для стабильности работы

ФЭУ, кроме того, необходимо поддерживать постоянство температуры ФЭУ, постоянство напряжения между катодом и анодом ФЭУ, осуществлять защиту ФЭУ от посторонних электромагнитных полей и т.п.

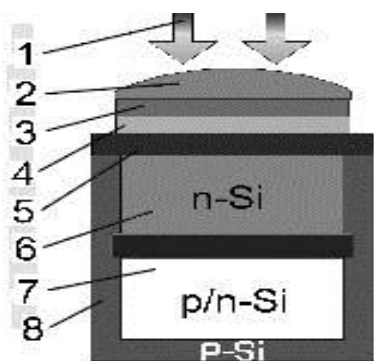
Кроме того, при малом входном сигнале – чтобы увеличить на выходе отношение величины полезного (*аналитического*) сигнала к фоновому (*темновому*) – ФЭУ используют в режиме «счетчика фотонов» – при котором на выходе ФЭУ регистрируется не общая величина тока, а количество определяющих этот ток импульсов, регистрируемых в течение заданного

промежутка времени и по своей амплитуде превышающих некоторое заранее заданное пороговое (*фоновое*) значение.

И наконец, для того, чтобы одновременно зарегистрировать весь оптический спектр образца (*что значительно уменьшает время анализа и упрощает конструкцию используемого монохроматора*) применяют матрицы, состоящие сразу из множества различных светочувствительных элементов (*сенсоров*). Причем, на сегодняшний день в производстве таких светочувствительных сенсоров применяются две основные технологии.

(1) CMOS (*или КМОП – комплементарная структура металл–оксид–полупроводник*) сенсоры делают из полевых как n-, так и p-канальных транзисторов. Которые сразу формируют цифровой сигнал, а также позволяют выполнять некоторые дополнительные обрабатывающие функции непосредственно на матрице. Что увеличивает быстродействие фоторегистрирующего устройства, а также снижает его энергопотребление.

(2) Однако у всех транзисторов наблюдается значительный разброс рабочих характеристик. А кроме того, CMOS-схемы характеризуются более сложным технологическим процессом своего изготовления и меньшей плотностью упаковки. Вследствие чего, до сих пор наиболее распространенными являются светочувствительные CCD (*или ПЗС – прибор с зарядовой связью*) матрицы. Представляющие собой кремниевый чип со множеством полупроводниковых светочувствительных элементов (ПСЭ) (*называемых в данном случае пикселями или фотосайтами*) размером от 5 до 6 мкм каждый. Перед съемкой спектра все фотосайты заряжаются электронами. И когда, после этого, свет попадает на вход вышеупомянутых фотосайтов – электроны собираются на их выходе в количестве, пропорциональном количеству фотонов, попавших на вход каждого из фотосайтов. Так что после засветки матрицы остается только измерить заряд каждого составляющего её фотосайта и перекодировать оный в некую цифру (*в соответствии с градацией интенсивности света, предусмотренной для данной матрицы*). А кроме того, чтобы уменьшить величину «темнового (*теплого*) шума» и соответственно увеличить соотношение величины полезного сигнала к шуму, в последних поколениях современных оптико-аналитических приборов применяют охлаждение таких светочувствительных матриц (*такое же, в принципе, как и в случае использования высокочувствительных ФЭУ*).



**Рис. 2.6.** Схема архитектуры субпикселя ПЗС-матрицы.

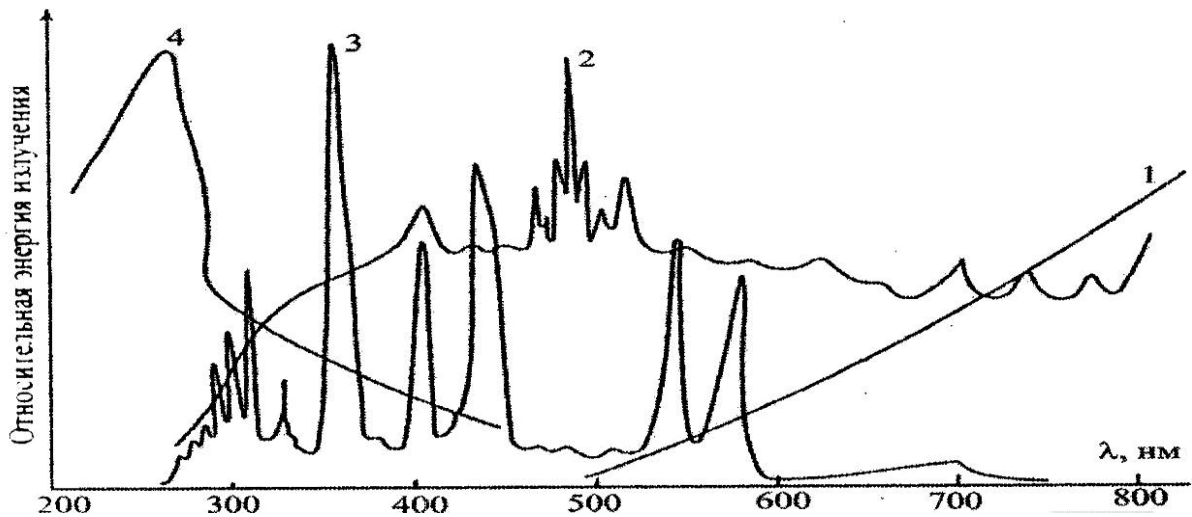
Для примера, на рис.2.6 приводится схема архитектуры субпикселя ПЗС-матрицы с карманом n-типа, где проставлены следующие обозначения: **1** – фотоны света, попадающие на вход фотосенсора; **2** – микролинза (служащая для фокусировки света на фоточувствительной части сенсора); **3** – светофильтр (в фоторегистрирующих устройствах спектрально-аналитических приборов не используется; а в цифровых фотоаппаратах, в частности, применяется для регистрации информации о цвете каждого пикселя, состоящего, например, в соответствии со схемой Байера, из 4-х субпикселей с красным, синим и зеленым светофильтрами); **4** – прозрачный электрод из поликристаллического кремния или сплава индия и оксида олова; **5** – подложка из оксида кремния; **6** – кремниевый канал n-типа (зона генерации носителей, или иначе, внутреннего фотоэффекта); **7** – карман n-типа (зона потенциальной ямы – где собираются электроны из зоны б); **8** – кремниевая подложка p-типа.

И наконец, **источники излучения**, используемые в ВдМАСА могут быть следующими.

(1) Малогабаритные низковольтные лампы накаливания с баллоном, выполненным из кварца (хорошо пропускающего, в отличие от обычного стекла, УФ-излучение) и заполненным при низком давлении парами йода или брома, и вольфрамовой нитью, через которую пропускается постоянный стабилизированный ток.

(2) Газоразрядные лампы с баллоном, выполненным из кварца и заполненным при низком, высоком (от 0,1 до 0,5 атм) или сверхвысоком (до 10 атм) давлении парами водорода, дейтерия, ртути, аргона, ксенона или криптона. При этом, чем выше давление паров в баллоне, тем больше интенсивность свечения лампы. Однако, при использовании в фотометрическом анализе газоразрядных ламп возникает проблема с достижением достаточно высокой стабильности их излучения.

На приведенном ниже рисунке 2.7 показаны спектры излучения некоторых из вышеописанных ламп. Отсюда видно, что водородные или дейтериевые лампы целесообразно применять для фотометрии или возбуждения люминесценции в УФ-области ( $\lambda = 200\text{--}300$  нм), ксеноновые лампы – в области 300–700 нм, а лампы накаливания – в ещё более длинноволновой видимой и ближней ИК областях.



**Рис. 2.7.** Спектры излучения лампы накаливания с вольфрамовой нитью (линия 1) и газоразрядных ламп, наполненных парами ксенона (линия 2), ртути (линия 3) и водорода (линия 4).

Также кроме газоразрядных ламп непрерывного действия, выпускаются импульсные газоразрядные лампы – позволяющие получать высокоинтенсивные вспышки света длительностью от  $10^{-3}$  до  $10^{-9}$  секунд и используемые, в частности, для определения времени задержки люминесценции различных веществ, а также для увеличения ресурса лампы и повышения интенсивности её свечения.

Для того же, чтобы газоразрядная ртутная (или иная) лампа спускала излучение сплошного спектра – применяют так называемые люминесцентные лампы – выполняемые также, как обычные газоразрядные, но на внутреннюю поверхность баллона которых наносится дополнительный слой люминофора, который поглощая линейчатое атомарное излучение паров ртути (или иного вещества, заполняющего баллон газоразрядной лампы), испускает собственное молекулярно–люминесцентное излучение в виде уже достаточно широкой сплошной полосы в области длин волн, определяемой составом люминофора (изменяя который, можно соответственно изменять и спектр излучения такой лампы).

(3) Помимо этого, в настоящее время в качестве дешевых и доступных источников излучения при фото- и люминометрии нередко используют светодиоды (как правило, сверхяркие либо лазерные). Эти устройства обладают целым рядом таких достоинств, как дешевизна, надёжность, долговечность, легкость, компактность, малые напряжение и ток питания, высокая светоотдача, узкий спектральный диапазон выходного излучения и малое его расхождение. В результате, отпадает необходимость в наличии в спектрофотометре либо фотолюминометре входного монохроматора – сложного, дорогого, как правило, достаточно «капризного» в эксплуатации, и к тому же, существенно уменьшающего, интенсивность света, па-

дающего на образец. А это, в свою очередь, позволяет делать спектральные приборы, использующие светодиоды, существенно более простыми (*как по устройству, так и по эксплуатации*), дешевыми, легкими и компактными. Но если нужно проводить фотометрический либо фотолюминесцентный анализ в разных спектральных областях – приходится, как правило (*таже, как и в случае применения светофильтров*), использовать несколько сменных светодиодов с разными длинами волн излучения.

Так, например, в случае фотометра «Эксперт-003» (*состоящего из отдельных кюветно–измерительного и регистрационного блоков, имеющих общий вес 1,5 кг и габариты 200×200×100 мм*), источником возбуждения оно, совмещенным с монохроматором, служат сменные светодиоды с длинами волн в стандартном наборе: 375, 400, 430, 470, 505, 525, 572, 590, 605, 615, 626, 655, 850, 880 и 940 нм.

И это ещё далеко не самый компактный из существующих в настоящее время вариантов фотометров. Так например, фотометр «АР-700» (*фирмы «Arel», Япония*) – с широкополосным светодиодом, в качестве источника излучения, встроенными светофильтрами на 405, 420, 460, 510, 540, 600, 660 нм и минимальным объемом пробы 0,5 мл – имеет габариты 118×180×60 мм и вес 800 гр (*см.: <http://nv-lab.ru>*).

(4) Также интенсивный сплошной спектр видимого и ближнего УФ излучения вплоть до 200 нм может давать искровой разряд постоянного или переменного тока, осуществляемый в водной среде между угольными или металлическими электродами.

(5) И наконец, весьма перспективным, хотя пока ещё и достаточно дорогим, источником высокоинтенсивного, монохроматического поляризованного излучения являются лазеры – твердотельные, газовые, жидкостные и т.д. Причем, в последнее время для создания полнофункциональных спектрофотометров и фотофлуориметров (*а также для целого ряда других важных практических применений*) используются лазерные устройства, позволяющие осуществлять плавную перестройку длины волны своего выходного излучения в широком спектральном диапазоне (*начиная от среднего УФ и кончая дальним ИК излучением*).

Источник излучения, детектирующее и регистрирующе–анализирующее устройства в фотометрах и фотолюминометрах могут быть выполнены как в виде моноблока (*анализируемый образец в который помещается, как правило, в фотометрической кювете – обычной, с увеличенной длиной светового пути, проточной или иного типа*), так и в виде отдельных модулей.

При этом, в последнем случае, облучение образца и регистрация излучения на выходе из него могут осуществляться как по лидарному принципу, так и посредством оптоволоконных зондов, подводимых к поверхности образца либо помещаемых вглубь него.

А, кроме того, могут использоваться схемы анализа, в которых вокруг одного источника светового облучения располагается несколько образцов (либо, с помощью оптоволоконных кабелей, излучение от одного источника подается к нескольким образцам, расположенным относительно этого источника достаточно произвольным образом) – с отдельным фотодетектором после каждого (либо подачей сигнала, получаемого после каждого образца, с помощью оптоволоконных кабелей, на один фотодетектор).

Либо вокруг одного источника излучения (оптоволоконный зонд от коего помещается внутрь образца) располагается несколько фотодетекторов (что используется, в частности, при анализе кристаллических образцов, проявляющих значительную анизотропию своих оптических и иных свойств, а также характеризующихся достаточно значительной светопрозрачностью либо светоотражающими свойствами).

Либо сигналы от нескольких фотометрических датчиков (включающих каждый – отдельный источник излучения, образец и детектор) собираются на одно регистрирующе–анализирующее устройство и т.п.

Помимо этого, при осуществлении ВдМАСА в ряде случаев используют:

- + дополнительные фильтры, пропускающие только поляризованный свет (что значительно повышает избирательность методов анализа, использующих неполяризованный свет – поскольку среди веществ, избирательно поглощающих, рассеивающих либо испускающих кванты света в заданном диапазоне длин волн лишь малая часть является ещё и опти-чески активными);
- + приставки для получения спектров диффузного и зеркального отражения, одно- либо многократного нарушенного полного внутреннего отражения и т.п., позволяющие анализировать мало- и непрозрачные твердые и жидкие образцы, а также суспензии, пасты и т.п.; а кроме того, создавать компактные переносные фотометры для анализа приповерхностных областей больших объектов (хотя аналогичные приставки изготавливаются и в качестве отдельных модулей, вставляемых в кюветное отделение стационарных фотометров).

Впрочем, как уже говорилось, наряду со стационарными (такими, например, как описываемые в <http://analit-spb.ru> или <http://bio-chim.ru>), весьма компактные переносные фотометры изготавливаются и без вышеупомянутых приставок.

А, кроме того, нужно учитывать, что следует с большой долей осторожности сравнивать между собой спектры отражения, получаемые при разных условиях. А уж тем более, сравнивать эти спектры со спектрами, получаемыми при «обычном» способе пропускания света через весь анализируемый образец.

Аналогично, с большой долей осторожности следует сравнивать между собой и спектры, получаемые с помощью различных типов оптоволоконных зондов, а также спектры, получаемые без применения оных зондов.

И наконец, спектры нарушенного полного внутреннего отражения, как правило, значительно менее интенсивны, чем «обычные» спектры пропускания – поскольку свет в данном случае проникает в образец на глубину всего лишь несколько микрон (*в результате чего, даже при многократном отражении длина оптического пути значительно меньше, чем при прохождении света через весь исследуемый образец*).

Также, если раньше для анализа образцов в ближней УФ ( $\lambda = 200\text{--}350$  нм), видимой ( $\lambda = 350\text{--}700$  нм) и ближней ИК ( $\lambda = 700\text{--}3300$  нм) областях спектра, как правило, использовались разные спектрофотометры – поскольку для каждого из вышеозначенных спектральных диапазонов требуются, как минимум, разные источники излучения, кюветы и фотодетекторы (*с максимумами интенсивности излучения, светопропускаемости и светочувствительности в разных спектральных областях*). То в настоящее время это разделение сохраняется лишь для недорогих приборов, используемых для рутинных анализов.

У приборов же исследовательского класса, как правило, один моноблок способен выполнять непрерывное сканирование светопоглощения образцов в области длин волн от 200 до 900 нм или от 180 до 1100 нм.

А в ряде случаев (*как например спектрофотометры «UV 3600 Plus» или «Solid Spec 3700 DUV» фирмы Shimadzu, Япония*) один моноблок способен выполнять непрерывное сканирование даже в диапазоне от 165 до 3300 нм – автоматически осуществляя при этом смену 2-х источников облучения образца, 3-х фотодетекторов и т.д. (см.: <http://analit-spb.ru>).

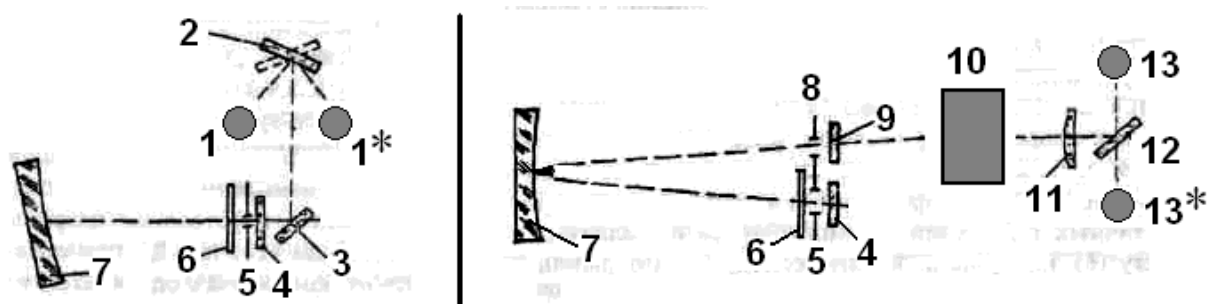
Для иллюстрации вышеизложенного приведем упрощенную схему устройства однолучевого спектрофотометра «СФ-56», до сих пор реально выпускаемого в Санкт-Петербурге (см. например <http://loto-microsystems.ru/sf56.html>) и используемого во многих лабораториях для сканирования спектров молекулярного поглощения образцов в диапазоне от 190 до 1100 нм.

В этом спектрофотометре излучение от одного из источников света (**1** или **1\*** – *роль которых играют газоразрядная лампа, заполненная дейтерием и используемая в диапазоне от 190 до 390 нм, и лампа накаливания с вольфрамовой нитью, заполненная парами йода и используемая в диапазоне от 390 до 1100 нм*) падает на зеркальный конденсор (**2**), направляющий свет на плоское поворотное зеркало (**3**), которое, в свою очередь, направляет оный дальше – через фокусирующую линзу (**4**), входную щель монохроматора (**5**) и светофильтр (**6**) на поворотную вогнутую дифракционную решетку (**7**) с переменным шагом и криволинейным штрихом.



Эта решетка изготавливается на сферической зеркальной поверхности – и потому, помимо диспергирующих свойств, обладает свойством фокусировать спектр. Применение же переменного шага и криволинейного штриха значительно уменьшает абберационное искажение решетки и позволяет получить высокое качество спектра во всем рабочем спектральном диапазоне.

Далее, световой пучок, отражаемый дифракционной решеткой, фокусируется в плоскости выходной щели монохроматора (8), расположенной над входной щелью 5. Сканирование осуществляется поворотом дифракционной решетки. При этом монохроматическое излучение различных длин волн, проходя через выходную щель 8 и конденсорную линзу (9), попадает на контрольный или исследуемый образец (10). А после прохождения его, через фокусирующую линзу (11) с помощью поворотного зеркала (12) попадает на один из фотодетекторов (13 или 13\*) – в качестве которых используются: сурьмяно–цезиевый фотоэлемент с окном из кварцевого стекла (в области спектра от 186 до 700 нм) и кислородно–цезиевый фотоэлемент (в области спектра от 600 до 1100 нм).



**Рис.2.8.** Упрощенная оптическая схема спектрофотометра «СФ-56».

Дополнительно спектрофотометр «СФ-56» комплектуется 3-мя приставками зеркального отражения (с углами падения 6, 30 и 45 градусов), приставкой диффузного отражения (с углом падения 8 градусов), оптоволоконной приставкой (предназначенной для исследования кристаллов различной формы) и 4-мя вариантами держателей кювет.

А в спектрофотометре «СФ-2000» (также выпускаемом фирмой «ЛОМО») детектором излучения служит уже матрица полупроводниковых светочувствительных элементов (что позволяет в течение менее 1 секунды регистрировать сразу весь спектр поглощения анализируемого образца без достаточно длительной процедуры его сканирования). А кроме того «СФ-2000» комплектуется более сложной приставкой «СФО-2000», позволяющей регистрировать спектры как зеркального, так и диффузного отражения образцов при различной геометрии освещения и отражения.

### 3. Инфракрасный молекулярный абсорбционный спектрофотометрический анализ (ИкМАСА)

Методами абсорбционной молекулярной спектроскопии в «видимой» области спектра, как уже говорилось в предыдущем разделе, удобно определять количественное содержание в образце того или иного вещества. А методами инфракрасной спектроскопии можно исследовать уже собственно молекулярную структуру этого вещества.

И определяется это тем, что энергии поглощаемых веществом квантов среднего ИК–диапазона хватает только на изменение интенсивности колебательных и вращательных процессов атомов в молекулах. Причем основной вклад в получаемые таким образом спектры в среднем ИК диапазоне вносят колебательные переходы, имеющие большую энергию, чем вращательные (*расщепление по последним определяет уширение полос в ИК–спектрах – впрочем, всё равно гораздо более узких и структурированных, чем молекулярные электронные спектры, в которых расщепление основных полос идёт не только по вращательным, но и по колебательным уровням*).

При этом, хотя с увеличением температуры колебательные и вращательные процессы атомов в молекулах интенсифицируются – эти процессы имеют место даже при 0 К.

Колебания, происходящие в многоатомной молекуле, делят на два основных типа: (1) «скелетные» (*в которых все атомы молекулы участвуют примерно в одинаковой степени*) (2) и «характеристические» (*при которых сильные смещения испытывает лишь малый фрагмент молекулы*).

Совокупность всех «скелетных колебаний» (*определяемая частотами пиков поглощения в ИК–спектре, а также интенсивностью этих пиков друг относительно друга*) – как отпечатки пальцев, единственным уникальным образом идентифицирует не только любое вещество (*вернее то, в котором атомы разных химических элементов связаны между собой ковалентными связями – так что при изменении интенсивности их колебаний изменяется и дипольный момент молекулы, определяемый мгновенным локальным распределением в ней взаимонескомпенсированных электрических зарядов*), но даже его агрегатное состояние и аллотропную модификацию (*поскольку межмолекулярные связи также дают пики в ИкМАСА*).

В то время как, частоты «характеристических колебаний» зависят, в основном, только от наличия в ней тех или иных функциональных групп атомов – и используются для изучения строения молекул неизвестных веществ. Хотя последнее нередко осложняется тем, что ни одна группа не является в полной мере изолированной от колебаний остальной части молекулы.

А это, в свою очередь, приводит к некоторым изменениям характеристических частот и интенсивностей ИК полос поглощения, в зависимости

от химического окружения в молекулах каждого конкретного вещества функциональных групп, ответственных за вышеупомянутые полосы поглощения.

В ИКМАСА (в отличие от ВдМАСА) для удобства интерпретации, спектры, как правило, записывают так, чтобы по оси ординат откладывалась интенсивность пропускания ( $T$ ) или поглощения образцом ИК-света; а по оси абсцисс – волновое число этого излучения ( $\nu^* = 1/\lambda$ ), обычно измеряемое в  $\text{см}^{-1}$ . В качестве примера, на рис.3.1 приведен спектр, полученный методом ИКМАСА для тонкой пленки этанола – где полосы поглощения, соответствующие «скелетным колебаниям» атомов в анализируемых молекулах в «области отпечатков пальцев», как обычно, расположены при  $\nu^* < 1500 \text{ см}^{-1}$ .

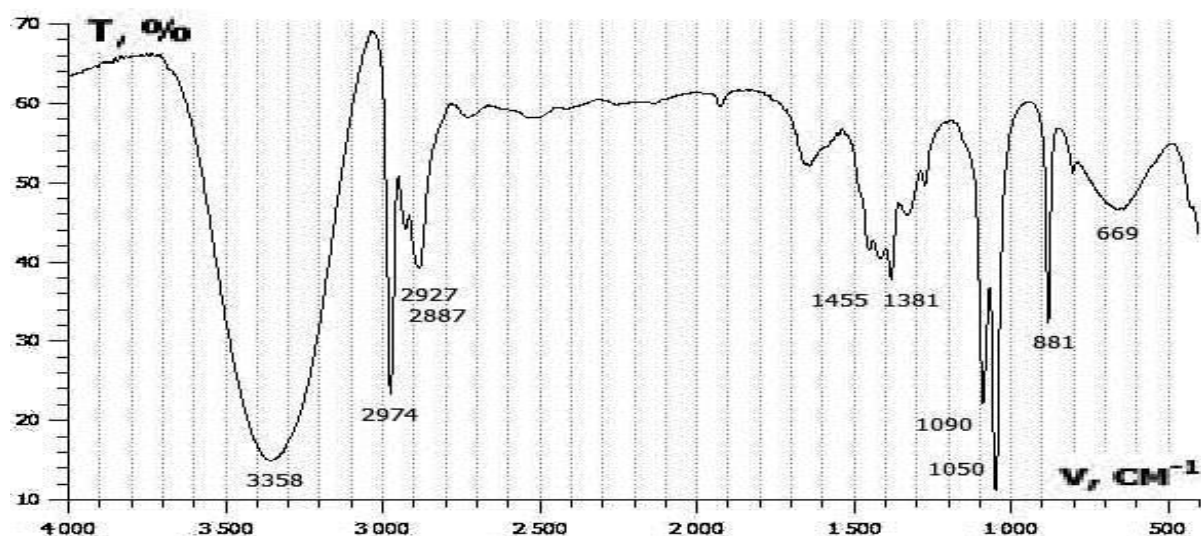


Рис. 3.1. ИК-спектр этанола.

При этом, качественное и количественное определение веществ при ИКМАСА методически проводят так же, как при ВдМАСА. В 1-м случае, по длинам волн (или волновым числам) «скелетных колебаний», дающих наиболее интенсивные полосы поглощения в «области отпечатков пальцев» (по которым, в настоящее время, накоплен уже весьма большой объем справочной литературы и компьютерных баз данных). А во 2-м случае, по наиболее интенсивной полосе пропускания или поглощения, характерной для спектра только одного из веществ, присутствующих в исследуемом образце – интенсивность которой, в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера, прямо пропорциональна количеству анализируемого вещества.

Похожа, в целом, на спектрофотометры, используемые для ВдМАСА, и оптическая схема дисперсионного ИК-спектрометра. Но так как диапазон внешнего облучения образца тут другой – есть и ряд особенностей.

(1) В качестве источника ИК–излучения используют: штифт Нернста (*сплав щелочных металлов*), глобар (*стержень из карбида кремния*), ни-хромовую проволоку и другие подобные материалы– нагреваемые электро-током до 1500<sup>0</sup>С или более.

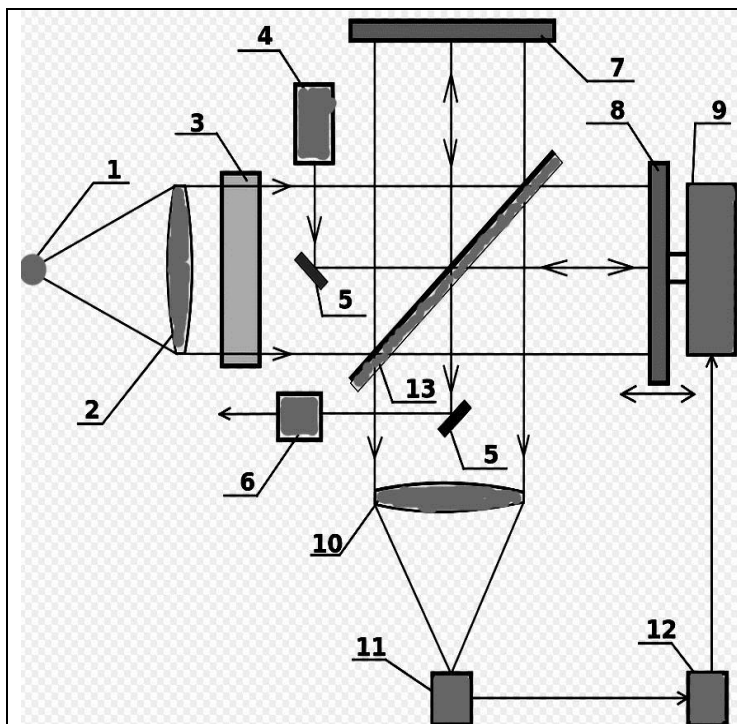
(2) Приемниками ИК–излучения служат термопары и терморезисторы.

(3) Поскольку как обычное, так и кварцевое стекло интенсивно поглощают ИК–излучение – вместо линз, для организации светового потока в ИК–спектрометрах используют вогнутые (*фокусирующие*) и выпуклые (*рассеивающие*) сферические зеркала.

(4) Материал кювет и растворители (*жидкий или твёрдый*), используемые для ИкМАСА, не должны поглощать ИК–излучение. Поэтому, кюветы здесь изготавливаются, чаще всего, из кристаллических металлических галоидов (NaCl, KBr, AgCl, CaF<sub>2</sub>, CoBr и т.д.). А в качестве растворителя в жидких образцах используется не вода (*интенсивно поглощающая излучение в среднем и дальнем ИК–диапазонах*), а чаще всего, CCl<sub>4</sub> или CS<sub>2</sub> (*хотя их пары и токсичны*). Причем, показатели преломления (**n** – равен отношению скоростей распространения излучения в образце и в вакууме) растворителя и материала кюветы должны быть близки (*Иначе, на границе раздела сред будет иметь место интерференция. А также, вблизи сильных полос поглощения n сможет меняться – что будет приводить к эффекту переменного фона*).

Кроме того, поскольку при ИкМАСА интенсивность излучения как на входе, так и на выходе из образца, как правило, достаточно мала, в настоящее время активно используют ИК–Фурье–спектрометры. Либо стараются регистрировать ИК–спектры исследуемых образцов при повышенных температурах (*при которых увеличивается интенсивность колебаний атомов в молекулах*). Но в этом случае приходится учитывать возможность теплового разложения либо денатурации (*обратимого либо необратимого изменения пространственной структуры*) анализируемых веществ и материалов.

При этом, в Фурье–спектрометрах, как показано на рис.3.2, исходный поток фотонов от источника излучения **1**, проходя через колиматор **2** (*в качестве которого, как уже говорилось, в случае ИК–спектроскопии используется не линза, а сферическое зеркало*) и анализируемый образец **3**, на систему, состоящую из наклонного полупрозрачного центрального зеркала **13** и полностью отражающих боковых зеркал **7** и **8** – делится оной на два смещенных по фазе световых потока (*за счёт того, что зеркало **8** с помощью мотора **9**, управляемого компьютером **12**, перемещается относительно остальных зеркал рассматриваемого спектрометра со строго заданной скоростью*).



**Рис. 3.2.** Схема устройства ИК–Фурье–фотометра.

Последние, суммируясь (что приводит к интерференции с усилением или ослаблением излучения в зависимости от длины его волны), через конденсор 10 (также как и 2, в случае ИК–спектрометрии, состоящего не из линз, а из сферических зеркал) попадают затем на вход детектирующего устройства 11. Информация с выхода коего подаётся на компьютер 12 – запоминающий и расшифровывающий общую исходную картину поглощения образцом внешнего излучения с помощью обратного Фурье–преобразования.

Главное при этом, соблюдать механическую точность движения зеркала 8 на уровне микрометров в течение некоторого времени (например, 1-й секунды), осуществляя постоянное быстрое считывание получаемого сигнала (например, через каждую 0,001 сек). А кроме того, в качестве «сигнала сравнения» (аналогичного используемому в 2-лучевом спектрофотометре) в данной схеме используется излучение от эталонного гелий–неонового лазера или светодиода 4, с помощью вспомогательных зеркал 5 попадающего на эталонный фотоприемник 6.

В результате же всего этого, можно:

(1) считывать сигнал не по одной длине волны в каждый момент времени – а сразу параллельно по 1000 и более длин волн (что позволяет увеличить отношение сигнал–шум до 60 раз);

(2) выиграть в светосиле (т.к. нет щелей монохроматора) – что позволяет уменьшить предел обнаружения веществ до 200 раз (а также регистрировать мало интенсивные полосы и даже эмиссию образца в ИК–области);

(3) выиграть во времени анализа (10–15 секунд – вместо 10 минут, необходимых для записи всего спектра на обычном, диспергирующем спектрометре);

(4) увеличить разрешающую способность прибора по длинам волн (при этом у Фурье–спектрометров она ещё и постоянна на всём спектральном диапазоне);

(5) автоматизировать многие операции с помощью компьютера;

(6) и наконец, накапливать сигнал от многих последовательных быстрых измерений одного образца (*что позволяет увеличить отношение сигнал–шум ещё в 10 или более раз*).

При этом, однако, Фурье–спектрометр – достаточно дорогой, а также сложный и деликатный в обращении прибор. Вследствие чего, использование его для рутинных массовых анализов, как правило, нецелесообразно.

Кроме того, поскольку методом ИкМАСА могут исследоваться не только жидкости, но и газы, а также твёрдые образцы – для исследования последних применяют следующие специальные методы:

(1) приготовление таблеток с КВг и другими наполнителями, не поглощающими в ИК–диапазоне;

(2) приготовление суспензий (*взвесей*) образца в вазелиновом масле или других иммерсионных средах (*имеющих показатель преломления близкий к образцу – в противном случае, будет иметь место большое светорасеяние*);

(3) исследование тонких слоёв образца на различных подложках;

(4) исследования полимерных пленок;

(5) исследования, с использованием специальных приспособлений (*монокристаллов, волокон и т.п.*).

В качестве конкретных приёмов, используемых в настоящее время для записи ИК–спектров можно привести следующие.

В настоящее время, существует три основных приёма для записи спектров жидкостей: в ячейках с фиксированными или съёмными спейсерами (*прокладками между стеклами*) либо из плёнки непосредственно между стеклами. Для количественных измерений предпочтительно использование фиксированных ячеек (*где спейсером служит амальгама, обеспечивающая постоянный оптический путь*). В разборных ячейках эту функцию выполняет прокладка из металлической фольги или тефлона.

Стекла в таких ячейках можно разбирать для очистки или изменения длины оптического пути – но обычно после каждой сборки такой кюветы оптический путь в ней немного изменяется. Согласно же третьему способу, каплю жидкости можно поместить на одно стекло и прижать её другим. При этом оптический путь регулируется прилагаемым усилием. Это удобно для количественных оценок, но неудобно для летучих веществ. Впрочем, если образец неустойчив или легко испаряется, для записи его спектра можно использовать кюветы с водяным охлаждением.

Для получения спектров твёрдых веществ их нужно измельчить в мелкий порошок и диспергировать в матрице. При этом, в качестве такой матрицы обычно используется бромид калия. В количестве 200–300 мг он смешивается с образцом (1–2 мг), растирается (*для получения качественных спектров желательно, чтобы размер частиц не превышал длины волны излучения*), вакуумируется (*для удаления воды*) и прессуется ручным

гидравлическим прессом (обычно мощностью 15 или 25 тонн) в таблетку (обычно, имеющую диаметр ~ 13 мм и толщину ~ 1 мм). Кроме того, перед использованием бромид калия обычно дополнительно прогревают до 40°C (для того, чтобы на нём не конденсировалась вода). Также растворимые вещества можно нанести на стекло в виде раствора – после чего удалить растворитель под инфракрасной лампой.

Альтернативой вышеописанной матрицы служит вазелиновое масло. Образец в этом случае готовится растиранием в ступке с несколькими каплями такого масла. Получаемая смесь помещается в разборную кювету. После чего записывается её ИК–спектр.

А если образец представляет собой тонкий однородный материал – спектр записывают в проходящем ИК–излучении, закрепив образец в специальном держателе (который представляет собой пластинку с прямоугольным отверстием, к коему прижимается образец, накрываемый сверху магнитной пластинкой с отверстием в центре).

И наконец, ИК–измерения для газообразных веществ требуют гораздо более длинных оптических путей, чем обычно. Кроме того, особенностью спектроскопии газообразных образцов является проявление вращательного движения молекул; а также уширение спектральных линий (вследствие теплового движения и соударения частиц). Также, с данным видом спектроскопии связан ряд других проблем. Например, из-за очень большой длины оптического пути существенную роль начинает играть расходимость светового пучка – из-за чего между центральными и краевыми лучами пучка возникает дополнительная разность хода.

Помимо этого, для неразрушающего анализа малопрозрачных твердых и жидких образцов, смол, резин, паст, суспензий и т.п. в ИК–спектроскопии, также как и в ВдМАСА, применяются различные приставки, служащие для получения спектров диффузного и зеркального отражения, одно- либо многократного нарушенного полного внутреннего отражения и т.п.

Либо, наряду со стационарными ИК–спектрофотометрами (описываемыми, например на сайтах <http://bio-chim.ru> или <http://analit-spb.ru>), изготавливают компактные БИК–спектрофотометры, работающие исключительно на принципе диффузного отражения и позволяющие, вследствие того, анализировать количественный и качественный химический состав не только дозируемых газообразных, жидких или твердых образцов (включая определение содержания влаги, толщины полимерного покрытия различных образцов и т.п.); но и поверхностей весьма крупных объектов; а также образцов, герметично закрытых светопроницаемой полимерной или стеклянной упаковкой.



**Рис. 3.3.** Внешний вид БИК–спектрометра «MicroPHAZIR RX» .

В частности, подобный БИК–спектрометр «MicroPHAZIR RX» (см.: <http://ccsservices.ru> и рис.3.3), имеет вес всего 1,3 кг; габариты 250×200×100 мм; спектральный диапазон от 900 до 2400 нм; вольфрамовую лампу накаливания, в качестве источника облучения образца; дополнительные насадки для засыпания или наливания в них образцов; оптоволоконный зонд с длиной кабеля до 2 м и т.п.

Однако, как уже говорилось при рассмотрении ВдМАСА, нужно учитывать, что следует с большой долей осторожности сравнивать между собой спектры отражения, получаемые при разных условиях. А уж тем более, сравнивать эти спектры со спектрами, получаемыми при «обычном» способе пропускания света через весь анализируемый образец. Аналогично, с большой долей осторожности следует сравнивать между собой и спектры, получаемые с помощью различных типов оптоволоконных зондов, а также спектры, получаемые без применения оных зондов.

Тем более, что и современные ИК–Фурье–спектрометры, работающие по принципу пропускания света через весь исследуемый образец (такие например, как «Agilent Cary 630» – см.: <http://ccsservices.ru> или <http://agilent.com>), могут иметь вес порядка 3,8 кг при габаритах 160×310×130 мм и спектральном диапазоне от 1500 до 28600 нм.

Помимо этого, ИК–спектрометры (работающие как на просвет образцов, так и на отражение от них монохроматического инфракрасного света) в ряде случаев совмещают с микроскопом – что позволяет проводить точный пространственный анализ распределения различных веществ на поверхности или в глубине прозрачных для ИК–излучения исследуемых образцов.

Также в настоящее время, помимо ИК–спектроскопии поглощения, разработаны методы инфракрасной спектроскопии испускания (ИкМЭСА) – в которой регистрируются ИК волны, излучаемые анализируемыми образцами. При этом, ИкМЭСА демонстрирует большую чувствительность, чем ИкМАСА – поскольку имеет значительно меньший уровень фонового излучения, воспринимаемого детектором. Но для проведения таких экспериментов изучаемый образец должен иметь температуру, отличную от температуры спектрометра (причем, желательно, чтобы температура образца была выше насколько возможно большей – поскольку с повышением температуры возрастает и интенсивность ИК–излучения образца).

А кроме того, необходимо учитывать, что любой нагревающийся элемент спектрометра (помимо самого образца) может быть источником фонового ИК–излучения.



Типичными областями применения ИкМЭСА являются исследования атмосферы Земли и инфракрасная астрономия. Кроме того, существуют многочисленные методы регистрации ИК–спектров испускания отдельных газов, жидкостей и твёрдых тел; а также регистрации интенсивности ИК излучения различного промышленного оборудования, органов живых организмов и т.п. В результате чего, имеется возможность получать информацию не только о качественном и количественном химическом составе – но и, в частности, о разности температур различных участков исследуемого объекта. Что, в свою очередь, даёт информацию о динамике функционирования этих участков – как в случае, например, тепловой компьютерной томографии живых объектов или регистрации энергоутечек при функционировании различного промышленного и бытового оборудования, включая тепловые и электросети (*причем, в последнем случае системы «тепловидения» сочетают с регистрацией интенсивности УФ–излучения, возникающего в результате протекания коронных электрических разрядов в местах утечек электроэнергии*) и т.п.

Кроме того, инфракрасный спектрофотометрический анализ (*также как и ВдМАСА*) в настоящее время активно применяют не только для изучения состояния статических физико–химических систем – но и для исследования динамики взаимодействия между различными компонентами этих систем; а также взаимопереходов одних форм веществ в другие, в зависимости от действия на них различных внешних факторов (*термических, химических, акустических, электрических, магнитных, механических и т.п.*). При этом, помимо обычных двумерных спектров, с развитием использования матричных детекторов и Фурье–спектрометров (*позволяющих значительно быстрее снимать сразу весь спектр поглощения или испускания образца*) появилась возможность регистрировать также трехмерные спектры (*где по 3-ей оси откладывается время от начала реакции либо какого-либо внешнего воздействия на анализируемый образец*).

И наконец, ИкМАСА (*также как и ВдМАСА*) нередко совмещают с хроматографическими и электрофоретическими методами разделения различных многокомпонентных химических систем.

Однако, применение ИК–спектроскопии в настоящее время всё же достаточно ограничено тем, что, как уже говорилось:

(1) интенсивные ИК–спектры дают только молекулы веществ, в которых есть атомы разных химических элементов, связанные между собой ковалентными связями – так что при изменении интенсивности колебаний этих атомов друг относительно друга изменяется общий мгновенный дипольный момент молекулы;

(2) молекулы воды, являющейся основной составляющей большинства анализируемых систем, интенсивно поглощают электромагнитное излучение в средней и дальней ИК–областях; а кроме того, разрушают большин-

ство материалов призм, линз и кювет, используемых в ИК–спектрофотометрии.

Для преодоления последнего ограничения приходится применять сложные методы предварительной пробоподготовки – например, экстрагируя, сорбируя или испаряя анализируемые органические вещества из их водных растворов. В частности, в настоящее время выпускают так называемые парофазные дозаторы – в виде отдельных модулей, располагаемых отдельно от спектрометра либо помещаемых в его кюветное отделение – где производится термическое испарение анализируемых веществ из жидких или твердых образцов. После чего, полученные пары либо сразу анализируются на спектрометре – либо сорбируются дополнительными «твердофазными ловушками» (*выпускаемыми не только в стационарном, но и в переносном вариантах – в случаях, когда парофазный дозатор используется отдельно от ИК–спектрометра*), в которых анализируемые вещества могут длительно храниться в сорбированном состоянии и лишь при конкретной необходимости их дальнейшего спектрального анализа термически десорбироваться.

Причем, при такой термической десорбции могут использоваться ещё и дополнительные «криоловушки» – конденсирующие только часть испаренных веществ – и таким образом, дополнительно увеличивающие селективность анализа.

Помимо этого, к «неудобным» для ИкМАСА образцам в настоящее время активно применяют методы, основанные на получении для этих образцов спектров комбинационного рассеяния – которые по своим возможностям, во многом, являются обратным аналогом ИК–спектроскопии (*т.е. те системы, которые дают малоинтенсивные ИК–спектры, демонстрируют весьма интенсивные КР–спектры, и наоборот*), а также позволяют исследовать количественный и качественный состав непосредственно водных растворов. Но приборы, позволяющие осуществлять КР–спектроскопию, в настоящее время ещё достаточно дороги и не слишком чувствительны к малым концентрациям определяемых веществ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

- 1 Аналитическая химия. / под ред. Ю.А.Золотова. -М.: Академия, 2010. - 528с.
- 2 Аналитическая химия. Т.1 и Т.2. / под ред. Л.Н.Москвина. -М.: Академия, 2008. -878с.
- 3 Аналитическая химия. Физические и физико–химические методы анализа. / под ред. О.М.Петрухина. -М.: Химия, 2001. -496с.
- 4 Бахшиев Н.Г. Введение в молекулярную спектроскопию. -Л.: Изд-во ЛГУ, 1987. -236с.
- 5 Беккер Ю. Спектроскопия. / Пер. с нем. -М.: Техносфера, 2009. -528с.
- 6 Бенуэлл К. Основы молекулярной спектроскопии. / Пер. с англ. -М.: Мир, 1985. -384с.
- 7 Васильев В.П. Аналитическая химия. Т.1 и Т.2. -М.: Высшая школа, 1989. -823с.
- 8 Васильева В.И., Стоянова О.Ф., Шкутина И.В., Карпов С.И. Спектральные методы анализа. Практическое руководство. -СПб.: Лань, 2014. -413с.
- 9 Ландсберг Г.С. Оптика -М.: Физматлит, 2003. -848с.
- 10 Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1. Молекулярная спектроскопия. -М.: Изд-во МГУ, 1994. -319с.
- 11 Лесс, В.Р. Практическое руководство для лабораторий: специальные методы. -СПб.: Профессия, 2011. -472с.
- 12 Мак-Махон Дж. Аналитические приборы. Руководство по лабораторным, портативным и миниатюрным приборам. -СПб.: Профессия, 2013. -338с.
- 13 Пентин Ю.А., Курамшина Г.М. Основы молекулярной спектроскопии. -М.: Мир: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. -398с.
- 14 Пилипенко А.Т., Пятницкий И.В. Аналитическая химия. Т.1 и Т.2. -М.: Химия, 1990. -815с.
- 15 Рабек Я. Экспериментальные методы в фотохимии и фотофизике. Т.1 и Т.2. -М.: Мир, 1985. -1150с.
- 16 Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. -М.: Мир, 1989. -608с.
- 17 Васильев В.П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. Кн. 2. -М.: Дрофа, 2005. -384с.
- 18 Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия. Кн. 2: Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. -М.: Высшая школа, 2005. -559с.

- 19 Балюстин, А.А. Аналитическая химия. В 3 т. Т. 1: Методы идентификации и определения веществ / под ред. Л.Н. Москвина. -М.: Академия, 2008. -576с.

### Дополнительная

- 1 Аналитическая лазерная спектроскопия. / под ред. Н.Оменетто. -М.: Мир, 1982. -606с.
- 2 Введение в фотохимию органических соединений. / под ред. О.Беккера и А.В.Ельцова. -Л.: Химия, 1976. -384 с.
- 3 Индикаторы. Т.2. / под ред. Э.Бишопа. -М.: Мир, 1976. -616с.
- 4 Методы исследования быстрых реакций. / под ред. Г.Хеммиса. -М.: Мир, 1977. -403с.
- 5 Основы аналитической химии. Т.1 и Т.2. / под ред. Ю.А.Золотова. -М.: Высшая школа, 2000. -1012с.
- 6 Прикладная инфракрасная спектроскопия. / Под ред. Д.Кендалла, пер. с англ. -М., 1970.
- 7 Спектральный анализ чистых веществ. / под ред. Х.И.Зильберштейна. -СПб.: Химия, 1994. -336с.
- 8 Спектроскопические методы определения следов элементов. / под ред. Д.Вайнфорднера. -М.: Мир, 1979. -494с.
- 9 Физические и физико-химические методы анализа. / под ред. Л.Н.Москвина. -СПб.: Из-д-во СПбГУ, 2002. -142с.
- 10 Антонов В.С., Беков Г.И. и др. Лазерная аналитическая спектроскопия. -М.: Наука, 1986. -318с.
- 11 Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. -М.: Мир, 1987. -462с.
- 12 Баффингтон Р., Уилсон М. Детекторы для хроматографии. -М.: Мир, 1993. -79с.
- 13 Борн М., Вольф Э. Основы оптики / Пер. с англ. -М., 1973.
- 14 Бражников В.В. Детекторы для хроматографии. -М.: Машиностроение, 1992. -320с.
- 15 Демтредер В. Лазерная спектроскопия: Основные принципы и техника эксперимента. -М.: Наука, 1985. -607с.
- 16 Дмитриев М.Т., Казнина Н.И., Пинигина И.А. Санитарно-химический анализ загрязняющих веществ в окружающей среде. М.: Химия, 1989. 368 с.
- 17 Другов Ю.С., Муравьев А.Г., Родин А.А. Экспресс-анализ экологических проб: практическое руководство. -М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. -425с.
- 18 Другов, Ю.С., Родин А.А. Анализ загрязненной воды: практическое руководство. -М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. -684с.

- 19 Другов, Ю.С., Родин А.А. Мониторинг органических загрязнений природной среды: 500 методик, практическое руководство. -М.: Бинном. Лаборатория знаний, 2013. -897с.
- 20 Дубровкин И.М., Беликов В.Г. Производная спектрометрия. - Ростов на Дону: Изд-во Ростовского университета, 1988. -143с.
- 21 Дьяков А.О., Новаковская Э.Г., Новочихин А.В., Халонин А.С. Физико–химические методы анализа. Спектральные методы анализа. Учебное пособие. -СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999. -163с.
- 22 Егоров В.В., Воробьева Н.И., Сильвестрова И.Г.. Неорганическая и аналитическая химия. Аналитическая химия. -СПб.: Лань, 2014. - 143с
- 23 Ишанин Г.Г., Панков Э.Д. и др. Источники и приемники излучения. - СПб.: Политехника, 1991. -240с.
- 24 Кизель В.А. Практическая молекулярная спектроскопия. - М.: Изд-во МФТИ, 1998. -254с.
- 25 Немодрук А.А., Безрогова Е.В. Фотохимические реакции в аналитической химии. -М.: Химия, 1972. -74с.
- 26 Персонов Р.И. Селективная спектроскопия сложных молекул в растворах и её применение. -Троицк. 1981. -66с.
- 27 Сайдов Г.В., Свердлов О.В. Практическое руководство по молекулярной спектроскопии. -СПб.: Изд-во СПбГУ, 1995. -236с.
- 28 Сакодынский К.И., Бражников В.В. и др. Аналитическая хроматография. -М.: Химия, 1993. -464с.
- 29 Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия: основы, техника, аналитическое применение. / Пер. с англ. -М.: Мир, 1982. -328с.
- 30 Стенхольм С. Основы лазерной спектроскопии. -М.: Мир, 1987. - 312с.
- 31 Турро Н. Молекулярная фотохимия. -М.: Мир , 1967. -328с.
- 32 Умланд Ф., Янсен Ф., Тириг Д., Вюнш Т. Комплексные соединения в аналитической химии. -М.: Мир, 1975. -531с.
- 33 Отто М. Современные методы аналитической химии: учебник для студентов вузов / Пер. с нем. А.В. Гармаш. -М.: Техносфера, 2008. - 544с.
- 34 Жуков А.Ф., Колосова И.Ф., Кузнецов В.В. и др. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа: учебник для вузов / Под ред. О.М. Петрухина. -М.: Химия, 2001. -496с.
- 35 Слепушкин В.В., Стифатов Б.М., Рублинецкая Ю.В., Мощенская Е.Ю. Аналитическая химия. Ч.2. Физико-химические методы анализа: Практикум. – Самара: Самар. гос. тех. ун-т, 2011. – 286 с.
- 36 Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов. Кн.2. Оптические методы анализа. – М.: Колос, 2005. 288 с.

- 37 Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. -Л.: Химия, 1986.
- 38 Булатов М.И., Маматнабиев Т.Э. Фотометрические методы анализа: учебное пособие. -СПб.: СПбГТИ(ТУ), 2008. -92с.
- 39 Свердлов О.В. Электронные спектры в органической химии. -Л.: Химия, 1985. -248с.
- 40 Вязьмин С.Ю., Рябухин Д.С., Васильев А.В. Электронная спектроскопия органических соединений. -СПб.: СПбЛТА, 2011. -43с.
- 41 Колесник И.В. , Саполетова Н.А. Инфракрасная спектроскопия. -М.: МГУ, 2011.
- 42 Тарасевич Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. -М.: МГУ, 2012. -55с.

**Электронные ресурсы:**

e-library.ru + e.lanbook.com + nglib.ru + xumuk.ru

**Миссия университета** – генерация передовых знаний, внедрение инновационных разработок и подготовка элитных кадров, способных действовать в условиях быстро меняющегося мира и обеспечивать опережающее развитие науки, технологий и других областей для содействия решению актуальных задач.

---

### **КАФЕДРА ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ТОПЛИВНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА**

Кафедра химии входила в состав первых 14 кафедр ЛИТМО, сформированных в 1930 году. В 1930–1960 годах кафедра работала в рамках факультета Точной механики; в период деятельности Инженерно-физического факультета (ИФФ) с 1946 года по 1954 год кафедра входила в состав ИФФ. С 1933 года – кафедре возглавлял известный специалист в области оптического стекла профессор В.Г. Воано, позже – известный русский ученый-химик профессор С.А. Щукарев. С 1954 по 1972 год кафедру возглавлял доцент Г.С. Кошурников.

С момента второго рождения инженерно-физического факультета в 1976 г. кафедра химии вошла в его состав. В это время на кафедре стали развиваться, в основном, три научно-технологических направления: создание новых композиционных оптических материалов; разработка химических сенсоров; технология оптического волокна.

В последующие годы сотрудники кафедры, прежде всего, профессора Новиков А.Ф. и Успенская М.В., существенно переработали методику преподавания курса химии, адаптировав ее к активно внедрявшейся тогда в Университете системе дистанционного обучения. В результате, преподавание курса химии в Университете ИТМО вышло на новый более высокий уровень.

В дальнейшем на кафедре под руководством профессора М.В. Успенской активно развивалось научно-техническое направление в области химии и физики сорбирующих полимерных материалов и нанокompозитов. В частности, на основе акриловых супервлагоабсорбентов разработан ряд новых материалов многофункционального назначения: сенсоры, жидкие линзы, раневые повязки, искусственные почвы для сельского хозяйства, огнестойкие конструкционные элементы и др.

В связи с этим в 2011 году данная кафедра (исторически – кафедра химии) позиционировала себя как отдельное структурное подразделение Национального исследовательского университета ИТМО в качестве кафедры “Информационных технологий топливно-энергетического комплекса”.

С переходом отечественных предприятий на международные стандарты продукции, повышением требований к охране окружающей среды и внедрением сложных аналитических автоматизированных систем контроля качества и мониторинга, с 2008 года в рамках направления «Техническая физика» кафедра проводит подготовку магистров и бакалавров по профилю «Физико-технические аспекты аналитического приборостроения».

Подготовка включает в себя следующие разделы:

- Компьютерные комплексы для автоматизированного контроля физических, химических, механических, термических, реологических и некоторых других свойств нефтяного сырья и продуктов нефтепереработки;
- Встроенные микропроцессорные комплексы для управления технологическими процессами и измерением широкого круга параметров энергетических установок и систем энергоснабжения;
- Физико-математическое моделирование технологических процессов нефтепереработки и топливно-энергетического комплекса;
- Информационно-аналитические системы и комплексы различного профиля, адаптированные под специфические условия работы на предприятиях ТЭК.

Уникальная программа обучения сочетает фундаментальную подготовку в области информационных систем, физической оптики, молекулярной спектроскопии, аналитической и физической химии, компьютерной метрологии, общехимической технологии и автоматики.

В рамках специальных дисциплин изучаются приборы и методы контроля качества продукции и принципы построения автоматизированных аналитических систем для предприятий ТЭК, нефтяной и химической промышленности.

Такие системы как основа информационных технологий контроля качества и мониторинга безопасности могут успешно применяться практически на всех предприятиях и лабораториях химического и нефтехимического профиля, а также в металлургической, пищевой и фармацевтической промышленности.

Выпускники кафедры имеют широкие перспективы трудоустройства в современных крупных компаниях ТЭК, таких как Роснефть, ПТК, Газпром, Киришинефтеоргсинтез, Лукойл, ТНК-ВР, а также на предприятиях и лабораториях пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности.

Практика эксплуатации предприятий ТЭК подтверждает необходимость создания и применения эффективных систем контроля за безопасностью и систем экологического мониторинга.

В связи с этим с 2011 года были разработаны и открыты бакалаврская и магистерская программы по направлению подготовки 241000 " Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии ". Основной целью образовательной магистерской программы "Информационные ресурсосберегающие технологии и экологические аспекты на предприятиях ТЭК" является подготовка высококвалифицированных специалистов, соответствующих современным требованиям к выпускникам вуза, с учетом потребностей рынка труда Санкт-Петербурга и регионов России. Будущие магистры будут способны использовать информационные технологии и математическое моделирование для описания различных физических и физико-химических процессов, для контроля качества продукции нефтепереработки, работать на современном оборудовании в научных, научно-производственных и производственных лабораториях по исследованию выпускаемой продукции и т.д.



Основными направлениями научной деятельности в рамках магистерской программы являются:

- Создание приборов и датчиков физических величин и физико-химических параметров углеводородного сырья и продуктов (в том числе на основе нанотехнологий);
- Разработка приборов для измерения параметров качества нефтепродуктов и пищевых продуктов на основе компьютерных технологий;
- Создание эффективных информационных систем контроля качества продукции и коммерческого учета на предприятиях ТЭК на основе приборов и устройств различного назначения;
- Создание эффективных информационных систем мониторинга безопасности эксплуатации объектов ТЭК.

Подготовка магистров ведется с участием ряда промышленных предприятий, научно-производственных объединений, научно-исследовательских институтов и вузов Санкт-Петербурга, что дает возможность получить отличные знания и неоценимый опыт в различных сферах деятельности: производственной, научно-исследовательской, административной и т.д.

Биотехнология и биоинженерия являются приоритетными направлениями современной науки и промышленного производства. Продукты биотехнологии и биоинженерии востребованы в медицине, фармации, биологии, и других высокотехнологичных отраслях народного хозяйства. Разработка новых источников энергии, создание биосовместимых материалов и синтез биологически активных веществ – главные составляющие этих двух наук и отраслей производства. В частности, интенсивно развиваются производство и применение ферментов в переработке различных видов сырья и в получении биопрепаратов. Ферментные технологии имеют преимущества с экономической, технологической и экологической точек зрения, поэтому годовой оборот ферментных препаратов составляет десятки миллионов долларов США и он непрерывно растёт. По объёму производства ферментные препараты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков. Ферментативные процессы, применяемые в технологиях, аналогичны природным, но они более безопасны и для здоровья человека и для окружающей среды.

Развитие этих отраслей сдерживается недостатком специалистов высшего уровня, подготовленных в области информационного обеспечения и средств измерения живых систем и биологических структур.

Для решения проблемы подготовки магистров на стыке информационных технологий, биологии и инженерии объединены усилия двух кафедр: Кафедра химии и молекулярной биологии ИХиБТ и кафедра ИТТЭК, имеющих опыт подготовки специалистов бакалавров и магистров в информационных технологиях и биотехнологии.

В учебный план предлагаемой программы включены, наряду с общеобразовательными, дисциплины по информационной, биологической, химической, технологической подготовке и ряду других отраслей знаний, необходимых в подготовке специалистов заявленного уровня.

В настоящее время на каф. ИТТЭК под руководством проф. Успенской М.В., ведутся работы по направлениям, связанных с созданием материалов для

фармакологии и регенеративной медицины, предметов санитарно-гигиенического назначения, а также биосовместимых и биodeградируемых материалов.

Также на кафедре под руководством проф. Неелова И.М. активно развивается моделирование полимеров и биополимеров, начиная от структуры веществ и физико-химических процессов, протекающих в живых организмах до физико-механических и эксплуатационных характеристик материалов и биосистем.

Профессорско-преподавательский состав на кафедре насчитывает 18 человек, из них 6 профессоров и докторов наук.

В настоящее время на базе кафедр НИУ ИТМО создан Международный научно-исследовательский институт биоинженерии, возглавляемый проф. М.В. Успенской, что значительно расширяет экспериментальную базу и научный потенциал кафедр и способствует повышению уровня подготовки кадров высшей категории.

В настоящее время на кафедре трудятся 18 преподавателей, шестеро из них являются докторами наук, профессорами, признанными на международном уровне, членами ученых советов в России и за рубежом.

Владимир Станиславович Сибирцев

**Молекулярная фотометрия  
в биотехнологических исследованиях**

Учебное пособие

В авторской редакции  
Редакционно–издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО  
Подписано к печати  
Заказ №  
Тираж  
Отпечатано на ризографе

Н.Ф. Гусарова

**Редакционно–издательский отдел**  
**Университета ИТМО**  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49