

ФБГОУ ВО
«Волгоградский государственный медицинский
университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

МЕТОДЫ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА

СОЛОДУНОВА Г.Н.

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Занятие 12
IV семестр

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

ЗАНЯТИЕ № 12 IV семестр

ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

1. Спектроскопия. Классификация и основные принципы спектроскопических методов. Области электромагнитного спектра, применяемые в химическом анализе.
2. Спектры излучения и поглощения. Спектрометр с призмным монохроматором.
3. Атомно-эмиссионный анализ.
4. Качественный и количественный анализ атомно-эмиссионного анализа.
5. Молекулярно-абсорбционная спектроскопия (фотометрический анализ).
6. Люминисцентный анализ.

1 СПЕКТРОСКОПИЯ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Спектроскопия – это раздел физики, посвященный изучению спектров электромагнитного излучения, включающий в себя методы количественного и качественного анализа, основанные на взаимодействии света с живой и неживой материей.

Все химические соединения взаимодействуют с электромагнитным излучением, уменьшая интенсивность его потока. Наблюдение за изменениями в спектральных параметрах электронных спектров позволяет *устанавливать более подробные состав* проб неизвестного состава.

Спектрофотометрический метод анализа – основан на поглощении монохроматического излучения, т. е. излучения с одной длиной волны в видимой и УФ (ультро-фиолетовой) областях спектра.

Методы спектроскопии можно условно поделить на две группы:

1. Методы оптической атомной спектроскопии, основанные на изменении энергии валентных электронов свободных атомов.
2. Методы, основанные на возбуждении электронов внутренних оболочек под воздействием излучения более высокой энергии, которые находятся в рентгеновской области спектра.

Основой качественного спектрального анализа является свойство каждого химического элемента излучать *характерный линейчатый спектр*. Задачей качественного спектрального анализа сводится к отыскиванию линий определяемого элемента в спектре пробы. Доказательством того, что линия принадлежит данному элементу, являются длина волны и интенсивность линии. При уменьшении содержания элемента в пробе интенсивность линий этого элемента в спектре будет уменьшаться, некоторые линии исчезнут и число линий уменьшится. При очень малой концентрации останется всего несколько линий, по которым обычно проводится качественный анализ. Длины волн и характеристику интенсивности можно найти в специализированных таблицах и справочниках. Для расшифровки спектра и определения длины волны анализируемой линии пользуются спектрами сравнения.

Слово "спектр" в переводе с латинского означает "появление" или "схема".

- Исаак Ньютон в 1666 г. первым с помощью призмы расщепил солнечный свет на спектральные составляющие.
- В 1758 г. Маркграф впервые, используя окраску цвета пламени, открыл способ визуального определения вещества.
- В 1802 г. английский физик Волдастон объяснил эксперимент Ньютона с призмой, усовершенствовал его и впервые наблюдал многочисленные темные линии в солнечном спектре.

- В то же время Гершель и Тальбот проводили эксперименты со светом пламени, и в 1834 г. Тальбот спектрально разделил красный цвет пламени стронция и красный цвет лития, что считается зарождением аналитической оптической спектроскопии.

Этот новый метод исследования, названный оптической спектроскопией, развивается с 1834г. до настоящего времени. Особое внимание следует уделить работе в этой области физики Фраунгофера, который разработал спектроскопию на дифракционных решетках и получил 1500 линий в спектре солнечного света [4].

В 1885 г. швейцарский ученый Бальмер открыл серию так называемых спектральных "линий Бальмера" в спектре водорода. В 1897 г. английский ученый Томпсон открыл электрон, а в 1911 г. его соотечественник Эрнест Резерфорд открыл атомное ядро. В 1900 г. Макс Планк сформулировал первые законы квантовой теории. Вернер Гейзенберг (1932 г.) и Эрвин Шредингер (1933 г.) получили Нобелевскую премию за пионерские работы по квантовой механике. В дальнейшем концепцию квантовой механики развивали Поль Дирак и Вольфганг Паули (1945 г.), которые также получили Нобелевскую премию.

Классификация и основные принципы спектроскопических методов

Все спектроскопические методы основаны на взаимодействии атомов, молекул или ионов, входящих в состав анализируемого вещества, с электромагнитным излучением. Это взаимодействие проявляется в поглощении или испускании фотонов (квантов). В зависимости от характера взаимодействия пробы с электромагнитным излучением выделяют две группы методов - *эмиссионные и абсорбционные*. В зависимости от того, какие частицы формируют аналитический сигнал, различают методы *атомной спектроскопии* и методы *молекулярной спектроскопии*:

Классификация спектроскопических методов

Таблица 1

Спектроскопические методы			
Эмиссионные		Абсорбционные	
Атомно-эмиссионный спектральный анализ	Молекулярно-эмиссионный спектральный анализ	Атомно-абсорбционный спектральный анализ	Молекулярно-абсорбционный спектральный анализ

В эмиссионных методах анализируемая проба в результате ее возбуждения излучает фотоны (кванты). Важнейшие эмиссионные методы:

- атомно-эмиссионный спектральный анализ (АЭС) и
- люминесцентный анализ.

В абсорбционных методах излучение постороннего источника пропускают через пробу, при этом часть квантов избирательно поглощается атомами или молекулами. Важнейшие методы этой группы:

- атомно-абсорбционный анализ (ААС) и
- молекулярно-абсорбционная спектроскопия растворов.

Последний метод обычно называют *спектрофотометрией* или *фотометрическим анализом*.

Абсорбционные методы, как и эмиссионные, используют и для обнаружения, и для количественного определения веществ.

Области электромагнитного спектра, применяемые в химическом анализе

Электромагнитное излучение может проявляться в разных формах:

- видимый свет,
- ультрафиолетовое излучение,
- инфракрасное (тепловое) излучение,
- радиоволны,
- рентгеновские лучи,
- гамма-лучи.

Если все фотоны (кванты) данного излучения имеют одну и ту же энергию, излучение называют *монохроматическим*, если их энергии различны – *полихроматическим*. Монохроматический свет имеет определенную длину волны. Полихроматическое излучение характеризуется интервалом длин волн, в который входят все компоненты данного излучения. Более полная характеристика полихроматического излучения – *спектр*. Он показывает распределение интенсивности излучения по длинам волн (или по энергиям, или по частотам).

Электромагнитное излучение охватывает очень широкий интервал длин волн, а следовательно, и энергий. Видимый свет соответствует лишь малой части этого интервала. В химическом анализе применяют не все виды излучений. Широко используют «оптический диапазон», границы которого - от 200 нм до 40 000 нм. В этот диапазон входят три области:

- ультрафиолетовая область (УФ) – 200-400 нм.
- видимая область – 400-800 нм;
- инфракрасная область (ИК) - от 800 до 40 000 нм.

Внутри каждой области иногда выделяют еще более узкие участки, имеющие собственные названия. Так, в ИК-спектрах выделяют особую «область отпечатков пальцев». Название связано с высокой информативностью этой области для опознавания индивидуальных органических веществ. В видимой области отдельные участки характеризуют цветом излучения.

В XX веке в анализе стали применять рентгеновские лучи и другие виды излучений, не входящие в оптический диапазон.

2 СПЕКТРЫ ИЗЛУЧЕНИЯ И ПОГЛОЩЕНИЯ

Как правило, анализируемая проба излучает и поглощает полихроматический свет, включающий кванты разной энергии и разной длины волны. Однако для аналитика предпочтительнее измерять испускание или поглощение света, в котором все кванты примерно одинаковы по энергии, соответствуют одной длине волны. Чтобы выделить ее из полихроматического излучения, нужно особое устройство – *монохроматор*. На рис.1. показана схема спектрального прибора с призмным монохроматором.

Спектральные приборы, снабженные монохроматорами, называют спектрометрами, спектрографами или стилоскопами, в зависимости от используемого в них приемника излучения, то есть от того, какой способ регистрации спектра (фотоэлектрический, фотографический или визуальный) применяется в этих приборах. С помощью таких приборов можно зарегистрировать спектр излучения или спектр поглощения исследуемой пробы.

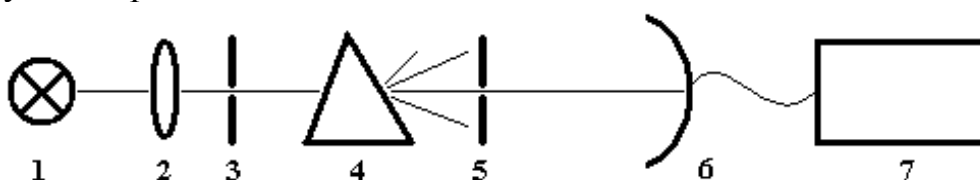


Рис.1. Схема спектрометра с призмным монохроматором

- 1 – источник света,
- 2 – фокусирующая оптика,
- 3 – входная щель,
- 4 – призма,
- 5 – выходная щель,
- 6 – приемник (фотоэлемент),
- 7 – регистрирующее устройство (микроамперметр и т.п.).

Спектр излучения пробы показывает, на каких длинах волн она преимущественно излучает свет при возбуждении (например, при сильном нагревании). Спектр излучения регистрируют в координатах:

интенсивность (I) излучения - длина волны (λ).

Спектр поглощения пробы показывает, на каких длинах волн она преимущественно поглощает излучение внешнего источника. Такие

спектры обычно регистрируют в координатах $A - \lambda$, где A - количественная характеристика поглощения света на данной длине волны, называемая *оптической плотностью*.

Спектры поглощения и излучения одного и того же вещества в некоторой области длин волн очень похожи. Чтобы понять, почему это так, надо вспомнить, что атом может находиться только в определенных состояниях, которым отвечают дискретные энергетические уровни. Переходя под воздействием внешнего излучения в более возбужденное состояние, атом должен приобрести дополнительную энергию ΔE за счет поглощения кванта. Поэтому в спектре поглощения пробы на длине волны λ , соответствующей ΔE , появится линия (пик). В атомах данного элемента возможны и другие энергетические переходы (с другими значениями ΔE). Все они реализуются одновременно, приводя к другим линиям в спектре поглощения данного элемента.

Теперь рассмотрим атомы, которые уже переведены в возбужденное состояние, например, под действием высокой температуры. Через короткое время ($10^{-7} - 10^{-8}$ сек) после возбуждения они самопроизвольно возвращаются в основное состояние, излучая кванты. Энергии этих квантов равны разностям энергий соответствующих состояний. Каждому переходу соответствует некоторая длина волны, некоторая линия в спектре испускания. Поскольку поглощение и испускание света определяются одними и теми же энергетическими переходами, в спектрах поглощения и излучения данного элемента наблюдаются одни и те же линии.

На рисунке 2 сопоставлены определенные участки спектров излучения и поглощения одного и того же элемента, зарегистрированные в одинаковых условиях. Они очень похожи, поскольку определяются однотипными энергетическими переходами в атомах данного элемента.

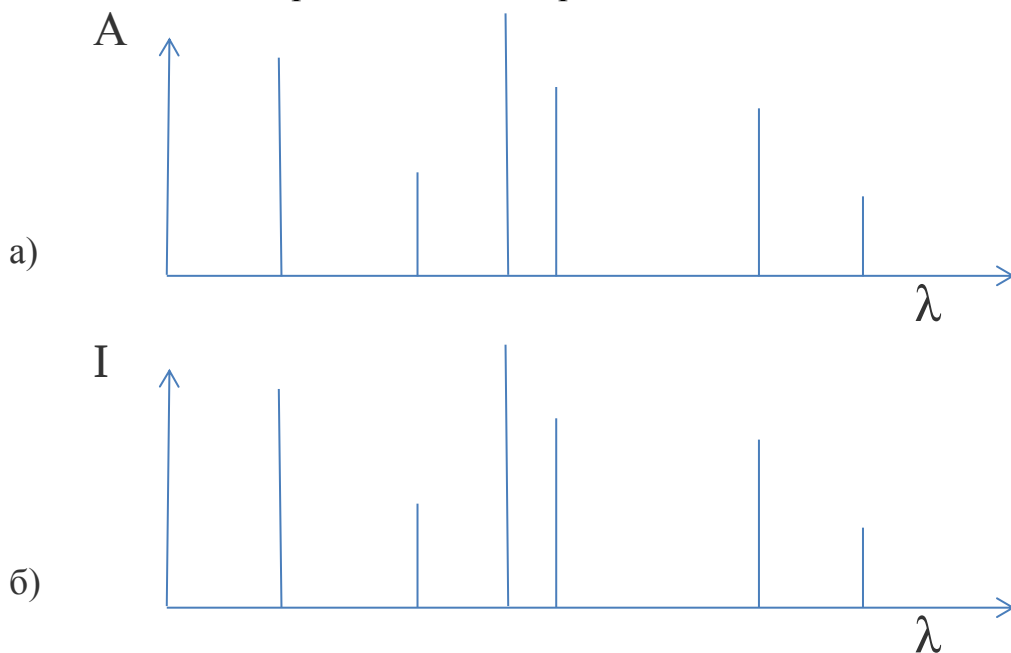


Рис.2. Атомные спектры поглощения (а) и излучения (б)

Особенности спектров разного типа и их аналитическое применение.

Атомные спектры поглощения и излучения, наблюдаемые во всем оптическом диапазоне, определяются переходами электронов, относящихся к наружным слоям («валентные электроны»). Таким образом, атомные спектры по своей природе являются *электронными*, а по внешнему виду - *линейчатыми*. Положение спектральных линий в шкале длин волн и их относительную интенсивность используют как идентификационные признаки в качественном элементном анализе.

Молекулярные спектры излучения или поглощения обычно не являются линейчатыми. Вид молекулярных спектров в разных диапазонах длин волн различен, поскольку различно происхождение соответствующих спектров. Спектры поглощения молекул в видимой или УФ-области являются *широкополосными*. Они дают сравнительно мало информации для выяснения состава и структуры поглощающих молекул. Это мешает проведению качественного анализа по спектрам в УФ- или видимой области.

3 АТОМНО-ЭМИССИОННЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

История и принцип метода

Еще в древности было замечено, что цвет пламени меняется при введении в него некоторых веществ. В XVIII веке этот эффект стали использовать в анализе; в частности, по окраске пламени различали соду (Na_2CO_3) и поташ (K_2CO_3). В XIX веке был установлен линейчатый характер спектров пламени. Спектры начали фотографировать, определять длины волн отдельных линий. Некоторые исследователи указывали, что, по наличию определенных спектральных линий можно судить о присутствии в пробе тех или иных элементов. Создателями спектрального анализа стали выдающиеся немецкие ученые – химик Р.Бунзен и физик Г.Кирхгоф. В 50–70-е годы XIX века они вели совместные исследования, используя спектрометры собственной конструкции. В результате исследований Бунзена и Кирхгофа был установлен качественный (элементный) состав многих минералов и даже небесных тел; открыт ряд ранее неизвестных элементов (таллий, индий и др.); созданы первые, еще не очень точные способы количественного спектрального анализа.

На рубеже XIX и XX веков для получения спектров стали применять электрическую дугу и искру, это позволило определять и те элементы, которые не возбуждаются в пламени. Было доказано, что спектральный анализ применим для обнаружения и определения элементов, независимо

от их степени окисления и от того, в составе каких химических соединений они находились в исходной пробе. В 20-х годах XX века удалось значительно повысить точность количественного анализа. Начался массовый выпуск спектральной аппаратуры. Были созданы надежные методики атомно-эмиссионного спектрального анализа (АЭС) для геологических и заводских лабораторий. АЭС стал основным способом аналитического контроля в черной и цветной металлургии, а также в геологии. Дальнейшее развитие метода связано с появлением новых источников возбуждения (особенно индукционно связанной плазмы) и новых способов регистрации спектров, а также с автоматизацией и компьютеризацией анализа.

Принцип метода довольно прост. Во всех вариантах атомно-эмиссионного спектрального анализа (АЭС) пробу вносят в источник возбуждения, где тем или иным способом создается высокая температура (тысячи градусов). Образуется плазма (совокупность возбужденных атомов, ионов и электронов). В ней последовательно проходят следующие процессы:

- испарение пробы;
- атомизация первоначальных продуктов испарения (молекул или ионов);
- возбуждение образовавшихся атомов;
- испускание света возбужденными атомами.

Возникающее в ходе анализа полихроматическое излучение пробы фокусируют и направляют на входную щель спектрального прибора (рис.1), где оно разлагается в спектр и регистрируется соответствующим приемником (фотоэлемент, диодная линейка, фотопластинка и др.). Можно наблюдать спектр и визуально (именно так работали Бунзен и Кирхгоф), однако это небезопасно для глаз. Для качественного анализа полученный спектр сопоставляют с эталонными спектрами разных элементов. По одному спектру пробы можно быстро и надежно обнаружить многие, а то и все присутствующие в ней элементы. Для количественного анализа надо измерить интенсивность излучения пробы на некоторых заранее выбранных длинах волн. На практике измеряют не саму интенсивность излучения (число квантов, испускаемых пробой в единицу времени), а зависящие от нее другие величины - фототок, абсолютное или относительное почернение фотопластинки и др. По этим аналитическим сигналам и рассчитывают содержания разных элементов, пользуясь градуировочными графиками, заранее полученными с помощью подходящих эталонов.

Приборы для спектрального анализа включают в себя три основных блока:

- блок возбуждения,
- диспергирующее устройство и
- блок регистрации излучения.

Разные варианты АЭС различаются по способу возбуждения пробы и по способу регистрации спектра.

Источники возбуждения

В качестве источников возбуждения применяют пламя, электрическую дугу, искру, а также высокочастотную индуктивно-связанную плазму (ИСП, ИСР). Три первых источника являются «классическими». Недавно созданный метод ИСР только входит в практику работы аналитических лабораторий, но именно он обеспечивает наилучшие результаты. В научных исследованиях используют также импульсный разряд, микроволновой разряд, лазерное излучение и некоторые другие источники плазмы.

Способы регистрации спектра

➤ Фотографическая регистрация достаточно проста по технике, доступна. Этот «классический» способ позволяет получать и измерять даже очень слабые сигналы микропримесей. Одновременно регистрируются линии всех компонентов пробы. Сфотографированные спектры можно долго хранить и в любое время провести повторные измерения.

Рис. 3

Устройство призмного спектрографа

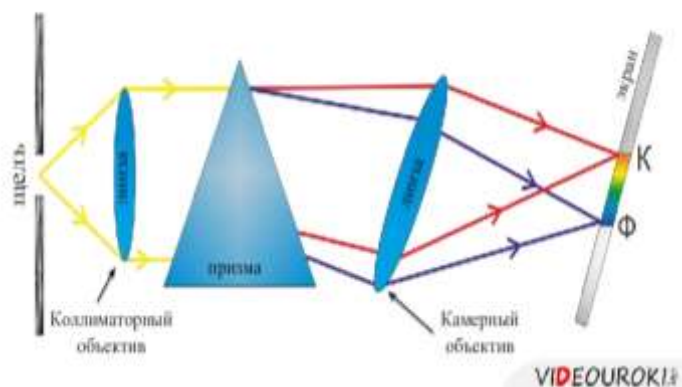


Схема спектрографа похожа на схему спектрометра, показанную на рис. 1, но выходная щель и измерительное устройство в данном случае не нужны. После разложения излучения пробы по длинам волн оно направляется на фотопластинку, содержащую в своем поверхностном слое кристаллы бромида серебра. В

местах, куда попадет излучение, образуется металлическое серебро. В результате проявления и закрепления фотопластинки ее почернение во много раз усиливается. На пластинке остается спектр пробы в виде ряда черных линий одинаковой высоты и ширины, но с разной степенью почернения (картинка напоминает штрих-код товара). На одну и ту же фотопластинку можно последовательно сфотографировать десятки спектров, размещая их друг под другом.

Почернение аналитических линий на проявленной фотопластинке измеряют с помощью вспомогательного прибора – микрофотометра.

➤ Фотоэлектрическая регистрация основана на применении фотоэффекта. Как было установлено на рубеже XIX и XX веков,

фототок приблизительно пропорционален интенсивности излучения, вызывающего фотоэффект. Фотоэлектрическая регистрация спектров более экспрессна, чем фотографическая. Исключается трудоемкая обработка фотопластинок и последующие измерения почернений, соответственно устраняются погрешности, возникающие на этих стадиях анализа. Приборы для фотоэлектрической регистрации спектров весьма разнообразны.

4 КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Существуют обширные спектральные атласы, где приведены эталонные спектры испускания большого числа элементов с указанием длин волн и относительных интенсивностей линий. Однако не все линии эталонного спектра можно найти в спектре пробы, содержащей данный элемент. По мере уменьшения концентрации компонента в пробе интенсивность излучения уменьшается настолько, что часть линий (наименее интенсивные) уже не регистрируется данным прибором. Последними при разбавлении пробы исчезают так называемые *последние линии* (как правило, наиболее интенсивные). Для каждого элемента эти линии хорошо известны. Чтобы проверить наличие некоторого элемента в пробе, проверяют наличие в спектре пробы нескольких последних линий этого элемента. Но если в спектре обнаружена линия, длина волны которой численно совпадает с длиной волны последней линии искомого элемента, то это вовсе не означает, что она действительно принадлежит данному элементу. Дело в том, что в спектрах многих элементов насчитывается очень большое число линий (у калия – несколько десятков, у железа – несколько сот, у урана – несколько тысяч). Линии разных элементов часто случайно совпадают по длине волны («межэталонные наложения»). Окончательный вывод о присутствии в пробе интересующего элемента следует делать, если в спектре пробы установлено наличие нескольких линий, совпадающих по длине волны с линиями эталонного спектра данного элемента и заведомо свободных от межэталонных наложений. Спектры пробы и эталона должны совпадать и по относительной интенсивности разных линий.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественный спектральный анализ основан на том, что интенсивность спектральных линий определяемого элемента (излучения) в атомно-эмиссионном спектральном анализе (АЭС) определяется концентрацией возбужденных атомов. Если все условия анализа одинаковы, получим прямо пропорциональную зависимость интенсивности излучения на данной длине волны от концентрации элемента в пробе (уравнение Ломакина-Шайбе):

$$I = a \cdot C^b.$$

Где:

C – концентрация

I – интенсивность излучения

a – постоянная величина, зависящая от условий возбуждения и условий испарения вещества электродов;

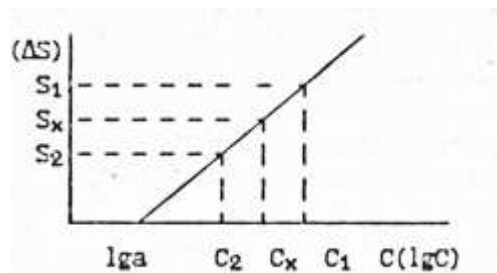
b – коэффициент, учитывающий реабсорбцию, спектральных линий и зависящий от концентрации элемента в образце; при малых концентрациях элементов и слабых спектральных линиях, для которых самопоглощение не наблюдается, коэффициент $b = 1$, при увеличении концентрации эта величина уменьшается и становится менее 1.

$$I = a \cdot C$$

Расчет концентраций ведут по предварительно построенным градуировочным графикам.

Для обеспечения единства измерений элементного состава, в частности, методом атомного спектрального анализа служат государственные стандартные образцы (ГСО).

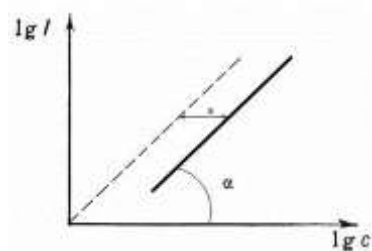
Наиболее распространенным методом количественного спектрального анализа является метод трех эталонов (рис. 4). Сущность его заключается в следующем.



Регистрируются спектры анализируемого образца и как минимум трех эталонов. По результатам регистрации спектров эталонов и проб строится калибровочный график (градуировочный график), на котором отображена зависимость

интенсивности линии спектра от концентрации элемента в пробе. Для повышения точности спектры эталонов и образца регистрируется не менее трех раз и берут средние значения ΔS . Полученные результаты наносят по оси ординат в виде значений $S (\Delta S)$, а по оси абсцисс откладываются значения концентраций $C(\lg C)$.

Если мы зарегистрируем интенсивность эмиссионной спектральной линии как минимум для трех проб с известными концентрациями (эталон) C_1 , C_2 и C_3 , то получим 3 точки лежащие на прямой. Для определения неизвестной концентрации C_x , лежащей в пределах C_1 и C_2 необходимо спроецировать значения интенсивности для данной пробы полученной экспериментальным путем на градуировочный график, а оттуда на ось абсцисс. Наклон прямой определяется коэффициентом b . При $b=1$ (самопоглощение отсутствует) угол наклона будет равен 45° .



(Рис.5). «Градуировочный график зависимости интенсивности спектральной линии от концентрации определяемого элемента»

5 МОЛЕКУЛЯРНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (фотометрический анализ)

Принцип метода

Еще в начале XIX века концентрацию окрашенных растворов научились оценивать, сравнивая на глаз интенсивность их окраски с заранее приготовленной шкалой эталонных растворов (*колориметрия*). Затем были изобретены приборы для количественного измерения поглощения света растворами; установлены закономерности, связывающие характеристики светопоглощения с концентрацией окрашенных веществ. В XX веке подобным образом стали определять и концентрацию бесцветных растворов, их поглощение измеряли в УФ- или в ИК-области. В развитие молекулярно-абсорбционной спектроскопии большой вклад внесли физики П.Бугер (Франция), К.Фирордт (Германия), У.Кобленц (США). В зависимости от того, в какой области спектра измеряют аналитический сигнал, методы молекулярно-абсорбционной спектроскопии разделяют на две группы:

- фотометрический анализ в УФ – и видимой области (*спектрофотометрия*);
- *ИК-спектроскопия*.

Соответствующие методы сильно различаются по своим возможностям, но основаны они на одних и тех же теоретических закономерностях.

Общие закономерности поглощения света

При пропускании монохроматического светового потока через кювету с раствором, содержащим молекулы или ионы X, интенсивность светового потока уменьшается. Это связано с рядом причин: часть света поглощается молекулами или ионами X, другая часть – растворителем и примесями, третья - рассеивается и отражается стенками кюветы. Чтобы учесть потери света, связанные с растворителем и кюветой, измерения проводят относительно раствора сравнения, не содержащего X. Обычно в качестве раствора сравнения используют чистый растворитель. Если поместить и фотометрируемый раствор, и раствор сравнения в одинаковые кюветы, а затем через эти кюветы пропускать свет с одной и той же длиной волны λ и одинаковой начальной интенсивностью $I_{нач}$, то потери света на отражение и рассеяние для обеих кювет окажутся одинаковы. Тогда различие в интенсивности получаемых световых потоков (I и I_0) будет определяться лишь природой и концентрацией X.

В качестве аналитического сигнала в молекулярно-абсорбционной спектроскопии используют *оптическую плотность* (A). Это десятичный логарифм отношения интенсивности монохроматического света, прошедшего через раствор сравнения, к интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор

$$A = \lg \frac{I_0}{I}$$

Оптическая плотность – безразмерная величина. Она не зависит от $I_{нач}$, а определяется природой и концентрацией частиц, поглощающих свет на данной длине волны, а также толщиной поглощающего слоя в кювете. Связь этих величин описывает основной закон светопоглощения, который принято называть *законом Бугера – Ламберта - Бера*:

В соответствии с этим законом, оптическая плотность раствора, измеренная на некоторой длине волны, прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества, поглощающего свет на этой длине волны, и толщине слоя раствора.

$$A = \varepsilon l C$$

C - концентрация поглощающих частиц, [моль/л]

l - толщина слоя [см],

ε - молярный коэффициент поглощения (коэффициент

пропорциональности), его величина зависит от природы X и длины волны, на которой измеряют оптическую плотность.

Аппаратура

Для измерения оптической плотности растворов и регистрации спектров поглощения используют спектрофотометры (рис.3). Важнейшая их часть - монохроматор. Другие узлы - источник света, приемник излучения и регистрирующее устройство.

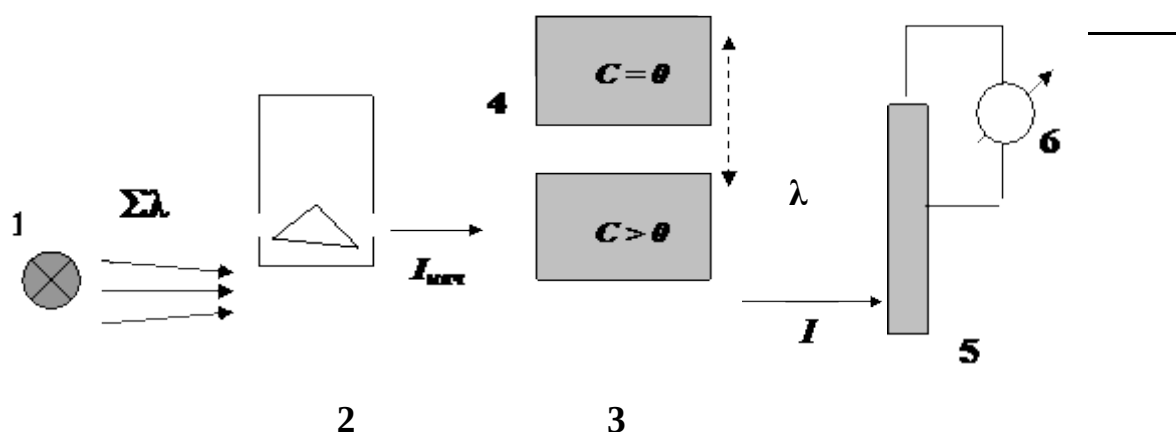


Рис. 6 Принципиальная схема однолучевого спектрофотометра

- 1 – источник света;
- 2 – призмный монохроматор;
- 3 – кювета с исследуемым раствором;
- 4 – кювета с раствором сравнения;
- 5 – приемник света (фотоэлемент);
- 6 – микроамперметр

Источники света. В зависимости от оптической области, в которой работает прибор, источниками света служат:

- в УФ-области – водородная или дейтериевая газоразрядные лампы, дающие сплошной спектр излучения;
- в видимой области – обычная лампа накаливания с вольфрамовой нитью,
- в ИК-области – *глобар*. Это керамический стержень, нагреваемый до температур порядка 1600 °С.

Монохроматоры. В спектрофотометрах применяют призмные монохроматоры или дифракционные решетки. Материал, из которого изготавливают оптическую систему прибора, должен хорошо пропускать свет в рабочем диапазоне длин волн:

- В УФ-области используют кварц,
- в видимой области – стекло,
- в ИК-области – кристаллические соли, галогениды щелочных и щелочноземельных металлов (NaCl, KBr, CaF₂).

Прибор настраивают на нулевую оптическую плотность по кювете с раствором сравнения (4), а затем вместо нее вводят в световой поток кювету с исследуемым раствором (3). В результате меняется интенсивность светового потока, падающего на приемник излучения (фотоэлемент), меняется и величина фототока.

Фотометрический анализ

Чтобы выбрать оптимальные условия анализа, после проведения фотометрической реакции исследуют спектр поглощения полученного соединения. Спектр поглощения отдельного раствора строят в координатах $A - \lambda$. При изменении концентрации раствора спектральная кривая будет сдвигаться по вертикали (рис.8), но число максимумов на этой кривой и их положение в шкале длин волн не изменятся. Длину волны, при которой наблюдается максимальное поглощение, обозначают как $\lambda_{\max}$, а молярный коэффициент на этой длине волны – как $\epsilon_{\max}$. Зависимость ϵ от λ (или $\lg \epsilon$ от λ) характеризует все растворы данного состава. Она не меняется при изменении концентрации растворенного вещества или толщины поглощающего слоя. Именно такие «обобщенные» спектры поглощения индивидуальных веществ приводят в спектральных

атласах (рис.4, справа). Чем больше $\varepsilon_{\max}$, тем меньшие концентрации X можно определять по данной методике.

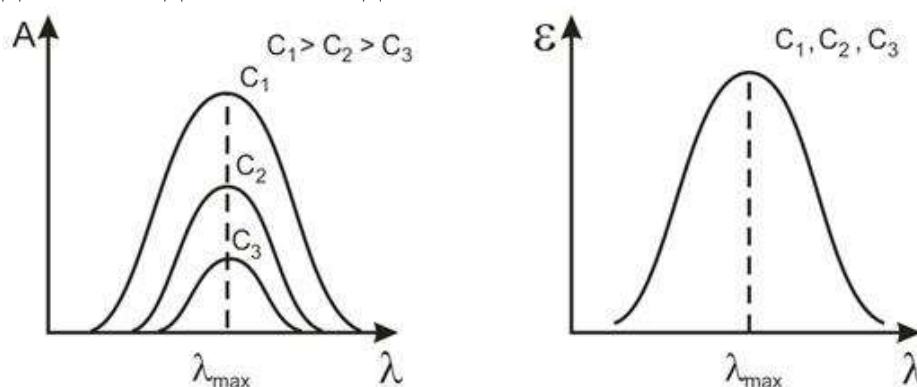


Рис.7. Спектры поглощения растворов с разной концентрацией X и их обобщение

Аналитические возможности

Простота оборудования и самих фотометрических измерений сделали спектрофотометрию одним из самых распространенных методов анализа. Этот метод, в отличие от АЭС, не требует применения высоких температур, высокой квалификации исполнителей, его область применения не ограничена задачами элементного анализа. Сегодня фотометрическим методом аналитики решают задачи и элементного, и молекулярного, и вещественного, и структурно-группового анализа. Для идентификации веществ этот метод применяют редко; спектрофотометрия – это, прежде всего, способ количественного анализа.

Фотометрический анализ широко применяют в контрольно-аналитических лабораториях на предприятиях химической, пищевой, нефтеперерабатывающей промышленности, в криминалистике, в сельском хозяйстве, в клиническом анализе и научных исследованиях. Особенно важен данный метод для контроля за выбросами токсичных веществ и для мониторинга состояния окружающей среды.

6 ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Принцип метода и области его применения

В определенных условиях часть поглощенной веществом энергии может выделяться в виде вторичного излучения. Это явление называют люминесценцией. Кванты вторичного излучения, испускаемого люминесцирующими атомами, молекулами или ионами, имеют меньшую энергию, чем кванты, которые те же частицы поглощали при своем возбуждении. Виды люминесценции классифицируют по способу возбуждения. Наиболее известны:

- *Катодолюминесценция* (свечение под действием потока электронов, например, свечение экрана кинескопа или жидкокристаллического экрана, свечение ламп дневного света).
- *Хемилюминесценция* (свечение за счет химической реакции, например, у светлячков).
- *Фотолюминесценция*. В этом случае проба светится за счет облучения невидимым УФ-светом от внешнего источника. Именно этот вид люминесценции обычно применяют в химическом анализе.

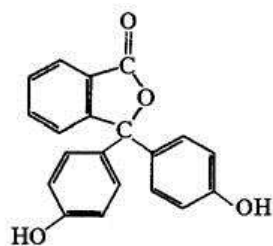
Виды люминесценции классифицируют и по времени жизни возбужденного состояния. В анализе преимущественно используют:

- *флуоресценцию* – в этом случае возбужденное состояние молекулы неустойчиво, и вторичное излучение пробы в УФ- или видимой области спектра прекращается сразу после удаления источника возбуждения;
- *фосфоресценцию* (иногда используют) – в этом случае свечение вещества продолжается в течение нескольких секунд, минут или даже часов после прекращения возбуждения.

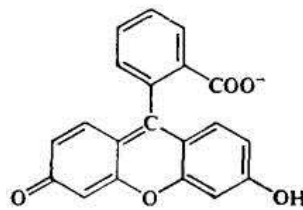
Явление люминесценции известно с давних времен, но физики стали изучать его лишь во второй половине XIX века. В 1864 г. Дж. Стокс (Англия) установил связь интенсивности свечения с концентрацией флуоресцирующих веществ в растворе и предложил использовать такую связь в аналитических целях, подчеркнув высокую чувствительность нового метода. В настоящее время в качестве аналитического сигнала используют интенсивность вторичного излучения на некоторой длине волны.

По спектрам люминесценции опознают особо опасные органические вещества в объектах окружающей среды (на уровне $10^{-6}\%$ и ниже). В частности, так находят содержание полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), многие из которых являются канцерогенами. Эти вещества определяют в природных и сточных водах, воздухе, почвах, продуктах питания. Тот же метод используют для обнаружения других токсикантов (диоксины, нитрозамины, пестициды), а также многих биологически активных веществ (витамины, гормоны, антибиотики). Люминесцентные детекторы применяют в хроматографическом анализе, измеряя интенсивность свечения веществ, по очереди выходящих из хроматографической колонки. Люминесцентный анализ применяют в криминалистической экспертизе и для диагностики заболеваний.

Люминесцировать могут далеко не все молекулы, поглощающие свет. Большая часть органических веществ, способных люминесцировать, – это ароматические соединения, имеющие жесткую структуру молекулы.



Фенолфталеин



Флуоресцеин

Так, фенолфталеин и флуоресцеин имеют сходное строение молекул (см. схему). Но у фенолфталеина все три бензольных кольца могут свободно колебаться друг относительно друга, и это соединение не люминесцирует. У флуоресцеина же возможность внутримолекулярных колебаний гораздо меньше (кислородный мостик жестко фиксирует два бензольных кольца), и это соединение интенсивно светится в видимой области при облучении его раствора УФ-светом.

Аппаратура для люминесцентного анализа

Для идентификации индивидуальных соединений и для выбора оптимальных условий измерения их аналитического сигнала надо изучать спектры возбуждения и спектры испускания люминесценции. С этой целью используют различные спектрофлуориметры.

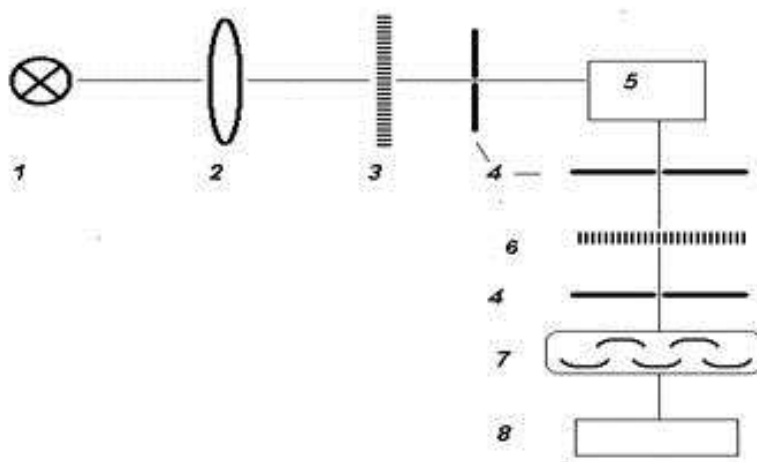


Рис.8. Принципиальная схема спектрофлуориметра

Это более сложные и дорогие приборы, чем спектрофотометры. Принципиальная схема спектрофлуориметра включает:

- 1 – источник возбуждающего света,
- 2 – фокусирующую линзу,
- 3 – первичный монохроматор,
- 4 – входные и выходные щели,
- 5 – кюветное отделение,
- 6 – вторичный монохроматор,
- 7 – приемник люминесцентного излучения,
- 8 – регистрирующее устройство.

В качестве источников возбуждения чаще всего используют мощные УФ-лампы (ртутные, ксеноновые и др.), а также лазеры. Первичные и вторичные монохроматоры включают дифракционные решетки или призмы, изготовленные из кварца, а также щели регулируемой ширины. Длину волны излучения, выходящего из первичного или вторичного монохроматора (соответственно λ_1 или λ_2), можно менять.

Спектры люминесценции

В обычных условиях любые спектры люминесценции индивидуальных веществ являются широкополосными. Спектры испускания люминесценции похожи на спектры поглощения соответствующих молекул. Однако возбужденные молекулы X успевают растратить некоторую часть ранее поглощенной энергии (на так называемые безизлучательные переходы,), прежде чем испустят кванты вторичного излучения. Именно поэтому спектр испускания люминесценции смещен по отношению к спектру поглощения в более длинноволновую область. Чаще всего вещество поглощает возбуждающий свет в УФ-области, а люминесцирует – в видимой..

Если вещество способно и флуоресцировать, и фосфоресцировать, то его спектр испускания фосфоресценции сдвинут в длинноволновую сторону еще сильнее, чем спектр флуоресценции (рис.6.).

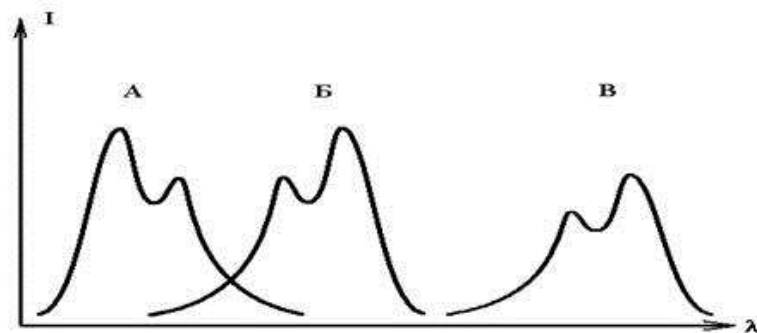


Рис 9. Спектры поглощения (А), флуоресценции (Б) и фосфоресценции (В) одного соединения

Качественный люминесцентный анализ

По появлению люминесценции при УФ-облучении пробы, а также по характерному цвету люминесценции можно визуально опознавать некоторые элементы, например, уран, находящийся в растворе в виде ионов. Известен целый ряд качественных реакций, приводящих к образованию люминесцирующих соединений. Так, например, можно открывать (а затем и определять) субмикрограммовые количества ионов кадмия по реакции с кальцеином, ионы бериллия и циркония – по реакции

с морином, ионы цинка – с салициловой кислотой, ионы алюминия - с 8-оксихинолином.

По характерному цвету люминесценции выявляют и присутствие некоторых органических соединений. Например, полиароматические углеводороды (ПАУ) дают синее свечение, а смолы и асфальтены – синезеленое. В этих случаях люминесценцию наблюдают визуально, облучая анализируемый образец ультрафиолетовым светом ртутной лампы. Нелюминесцирующие соединения при этом не мешают. Чтобы выявить присутствие одного люминесцирующего соединения в присутствии другого, придется снимать спектр возбуждения или испускания исследуемой пробы и сопоставлять их с атласом соответствующих спектров. Но спектры люминесценции структурно-родственных соединений (например, спектры разных ПАУ) весьма близки. Идентифицировать индивидуальные соединения в их неразделенной смеси по обычным (широкополосным) спектрам люминесценции удастся крайне редко, спектры разных веществ накладываются друг на друга.