

Оптические методы анализа

A series of horizontal lines in teal and light blue colors, some solid and some dashed, extending across the width of the slide below the title.

Колориметрия

- Впервые колориметрический метод введен в практику анализа К. Гейне (1845).
- В методе колориметрии определение интенсивности светового потока, прошедшего через раствор вещества, производится визуальными способами, путем сравнения с интенсивностью светового потока, прошедшего через стандартный раствор.
- Сравнение интенсивностей световых потоков осуществляют методами:
 - стандартных серий;
 - уравнивания окрасок;
 - разбавления.

Метод стандартных серий

Интенсивность окраски анализируемого раствора вещества сравнивается с интенсивностью окраски стандартных растворов различных концентраций. По закону Бугера-Ламберта-Бееера при равенстве концентраций растворов их поглощения равны (при прочих равных условиях):

$$A_1 = \epsilon C_1 l, A_2 = \epsilon C_2 l,$$

$$A_1 = A_2,$$

$$\epsilon C_1 l = \epsilon C_2 l$$

$$C_1 = C_2$$

Метод стандартных серий

- Из стандартного раствора готовят серию разведений с известной концентрацией и помещают полученные растворы в пробирки одинакового диаметра. Анализируемый раствор наливают в пробирку такого же диаметра, уравнивая тем самым толщину слоя, и сравнивают интенсивность окраски анализируемого раствора с интенсивностью окраски пробирок со стандартными растворами. При равенстве окрасок концентрации растворов равны.

Метод стандартных серий

- Метод прост по своему выполнению, не нуждается в сложной аппаратуре, однако требует определенного навыка и обладает невысокой точностью (ошибка определений составляет около 5—10%), поэтому может использоваться лишь для приблизительной оценки концентрации определяемого вещества в анализируемом растворе.
- В фармакопейном анализе вариант этого метода широко и систематически применяется при определении окраски жидкостей для оценки цветности жидких лекарственных форм и растворов, содержащих окрашенные фармацевтические препараты, при контроле их качества.

Метод уравнивания окрасок

- **Первый способ.**

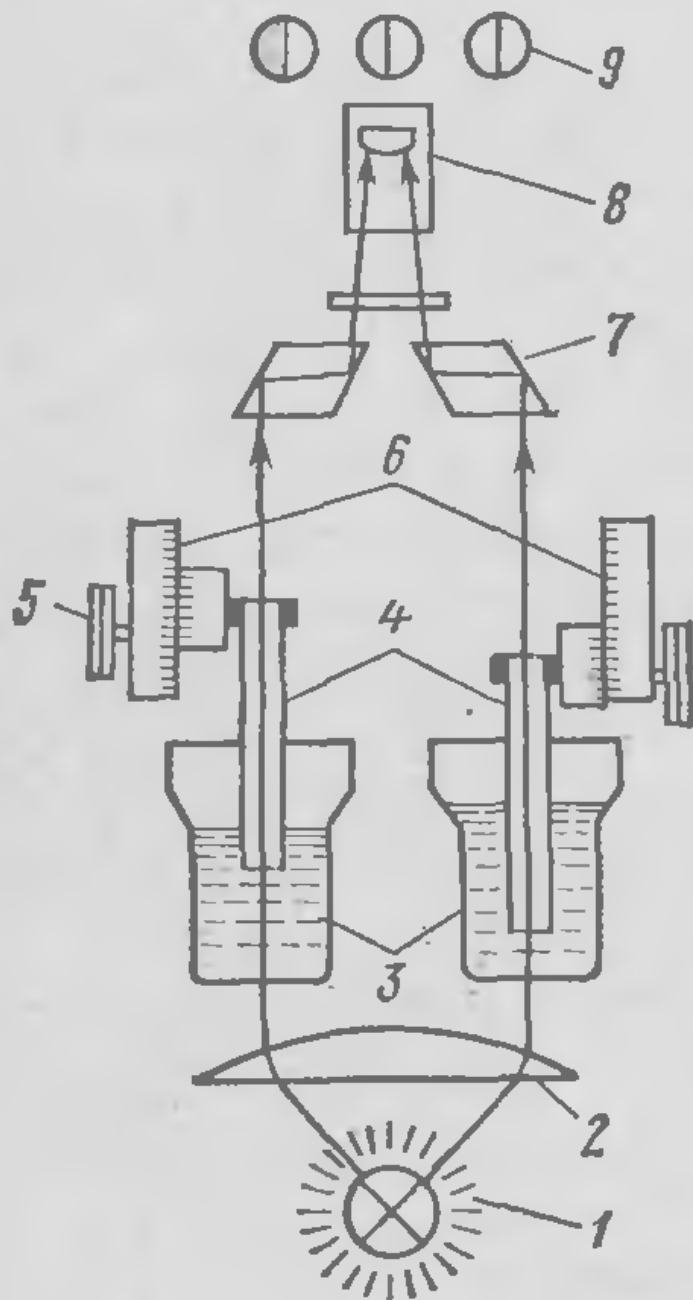
Интенсивность окраски анализируемого раствора определяемого окрашенного вещества визуально уравнивают с интенсивностью окраски раствора сравнения, содержащего все те же компоненты, что и анализируемый раствор, за исключением определяемого вещества. К раствору сравнения постепенно добавляют известные количества определяемого вещества до тех пор, пока интенсивность окраски раствора сравнения станет равной интенсивности окраски анализируемого раствора, что обычно оценивают визуально. При достижении равенства интенсивности окраски обоих растворов считают, что концентрация определяемого окрашенного вещества в этих растворах одинакова. Зная количество определяемого вещества, введенного в раствор сравнения, находят концентрацию определяемого вещества в анализируемом растворе.

Метод уравнивания окрасок

- **Второй способ.**

Для визуального уравнивания интенсивности окраски двух жидкостей изменяют толщину поглощающего слоя сравниваемых анализируемого и стандартного растворов до совпадения интенсивности окраски обоих растворов. При этом уже требуется выполнимость основного закона светопоглощения. При равенстве интенсивности окраски обеих жидкостей их оптическую плотность A можно считать одинаковой:

$$A = \varepsilon Cl = \varepsilon C_x l_x$$
$$C_x = Cl/l_x$$



Изменение толщины окрашенного слоя можно проводить с использованием колориметра Дюбоска который состоит из двух стеклянных цилиндров 4, которые могут опускаться в стаканчики с растворами 3 — стандартным и анализируемым. Через стаканчики, растворы и стеклянные цилиндры проходят два пучка света от источника 1 и конденсора 2, интенсивность которых сравнивается в окулярном устройстве 7, 8, 9. При работе с колориметром с помощью ручек 5 с шестернями и зубчатых реек 6 регулируют высоту опускания стеклянных цилиндров, уравнивая окраски световых потоков. После уравнивания по шкалам определяют толщину слоя раствора в каждом стаканчике и рассчитывают концентрацию анализируемого раствора.

Метод уравнивания окрасок

- **Третий способ.**

Выравнивание интенсивности светопоглощения двух жидкостей можно проводить визуально с помощью фотометров, в которых уравнивание окраски осуществляется не за счет изменения толщины поглощающего слоя или концентрации сравниваемых растворов, а путем перекрывания части одного из световых потоков.

Измерения проводят в двух одинаковых кюветах, в одну из которых помещают анализируемый раствор с определяемым веществом, а в другую — раствор сравнения, содержащий растворитель и те же компоненты, что и анализируемый раствор (и в тех же количествах), за исключением определяемого вещества. Интенсивность светового потока, проходящего через обе кюветы, выравнивают, ослабляя световой поток, проходящий через раствор сравнения, путем введения диафрагмы, перекрывающей часть светового потока. Предварительно проводят градуировку отсчетного устройства фотометра по эталонным растворам с известной концентрацией определяемого вещества.

Метод уравнивания окраски обладает невысокой точностью; погрешность в определении концентрации растворов составляет около $\pm(5-10)\%$.

Метод разбавления

- Не требуется выполнимость основного закона светопоглощения.
- Анализируемый раствор разбавляют в мерном цилиндре растворителем до тех пор, пока интенсивность окраски раствора не уравнивается с окраской стандартного раствора, налитого в цилиндр с таким же диаметром. В этом методе справедливо равенство:

$$\begin{aligned} C_1V_1 - C_2V_2 \\ C_2 = C_1V_1 / V_2 \end{aligned}$$

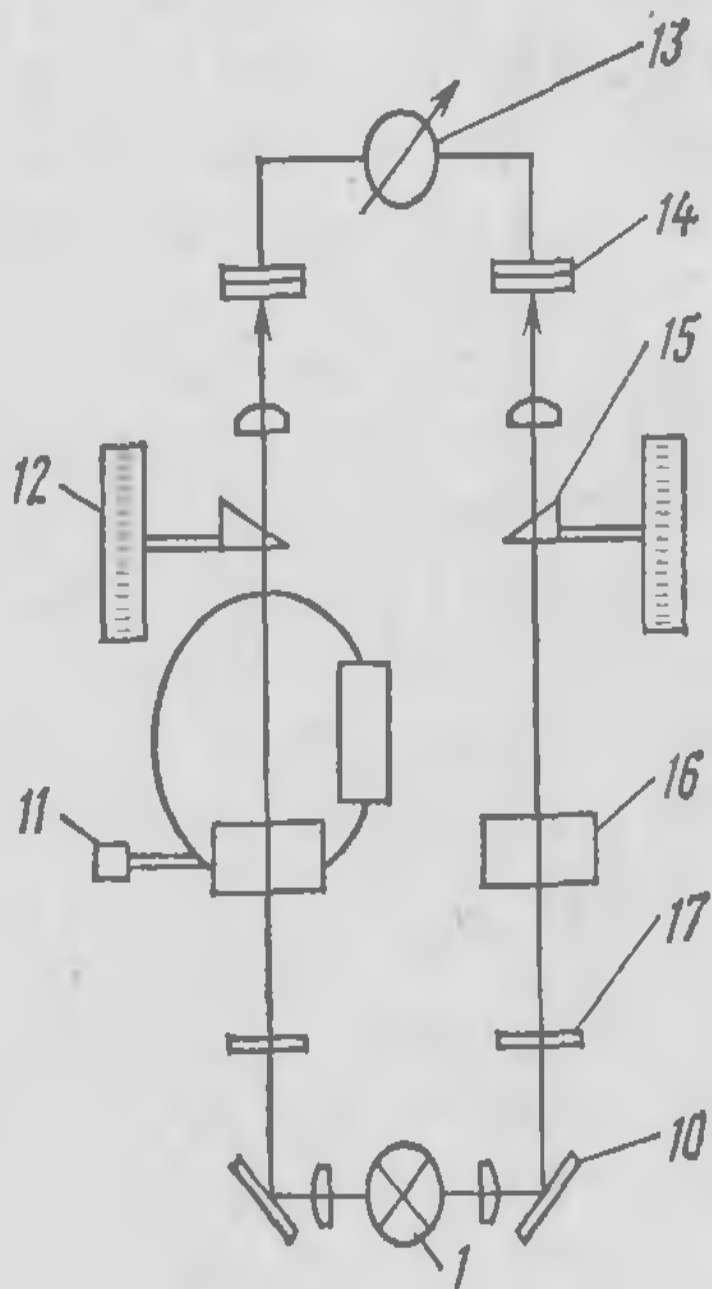
- Точность метода невелика; как и в предыдущих случаях, ошибка определений составляет около $\pm(5-10)\%$.

Фотоколориметрия

- Метод основан на измерении интенсивности некохроматического светового потока, прошедшего через анализируемый раствор, с помощью фотоэлементов в фотоколориметрах и в фотоэлектроколориметрах. Световой поток от источника излучения (обычно — лампы накаливания) проходит через светофильтр, пропускающий излучение лишь в определенном интервале длин волн, через кювету с анализируемым раствором и попадает на фотоэлемент, преобразующий световую энергию в фототок, регистрируемый соответствующим прибором. Чем больше светопоглощение анализируемого раствора (т.е. чем выше его оптическая плотность), тем меньше энергия светового потока, попадающего на фотоэлемент.

Фотоэлектроколориметры

- Разработаны различные конструкции фотоэлектроколориметров, предназначенных для работы в ближней УФ и в видимой (преимущественно) области спектра. Светофильтры (чаще всего это стекла различного состава и окраски) пропускают излучение шириной в несколько десятков нм — примерно от 20 до 50 нм.
- Фотоэлектроколориметры снабжаются несколькими светофильтрами, имеющими максимум светопропускания при различных длинах волн.
- Наиболее распространенными являются фотоэлектроколориметры с одним или с двумя фотоэлементами. Фотоэлектроколориметры с одним фотоэлементом предусматривают измерение энергии однолучевого светового потока. Приборы с двумя фотоэлементами измеряют энергию двух световых потоков (двухлучевая схема), один из которых проходит через анализируемый раствор, а другой — через раствор сравнения («нулевой» раствор).
- Фотоэлектроколориметры позволяют проводить измерение оптической плотности или пропускания раствора только с несколькими светофильтрами, поэтому с их помощью нельзя получить непрерывный спектр поглощения в том или ином спектральном диапазоне.



Свет от лампы накаливания (или ртутно-кварцевой лампы) **1** с помощью двух зеркал **10** делится на два параллельных световых потока одинаковой интенсивности. Каждый световой поток проходит через светофильтр **17**, кювету **16** с раствором вещества или растворителем (раствором сравнения) и попадает на фотозлемент **14**. Электрический ток фотозлементов поступает на измерительный прибор **13**, где фиксируется разность электрических токов. Интенсивность световых потоков уравнивают с помощью оптических клиньев **13**, связанных с отсчетным барабаном **12** со шкалой. В момент равенства световых потоков измерительный прибор **13** устанавливается на нуле и по шкале отсчетного барабана **12** отсчитывают поглощение раствора. При работе на фотокolorиметрах используют три кюветы. В две кюветы наливают раствор сравнения, в третью — анализируемый раствор. Сначала на пути световых потоков ставят кюветы с растворами сравнения, уравнивают интенсивность световых потоков (по нулю измерительного прибора), затем в правый поток ручкой поворота кювет **11** вводится кювета с анализируемым раствором и производится измерение поглощения.

Фотоколориметрия

- Концентрацию определяемого вещества в анализируемом растворе находят либо с использованием основного закона светопоглощения, предварительно установив концентрационный интервал его выполнимости при заданных светофильтре и толщине поглощающего слоя, либо методом градуировочного графика. В последнем случае строгая выполнимость основного закона светопоглощения необязательна.
- Относительная ошибка фотоколориметрического определения концентрации обычно не превышает $\pm 3\%$.
- Фотоэлектроколориметрия получила широкое распространение в аналитической практике, например, при анализе таких лекарственных препаратов, как диэтилстильбэстрол, левомецитин, ментол, новокаин, пилокарпина гидрохлорид, рутин, стрептомицин, этакридина лактат и многие другие.

Спектрофотометрия

- Метод основан на использовании специальных спектральных приборов — спектрофотометров, позволяющих регистрировать световые потоки в широком интервале изменения длин волн от 185 нм до 1100 нм, т.е. в УФ, видимой и ближней ИК области спектра, и обеспечивающих высокую степень монохроматичности света (0,2—5 нм), проходящего через анализируемую среду.

Спектрофотометры

- В большинстве спектрофотометров, применяемых в аналитической практике, монохроматизация светового потока осуществляется за счет использования диспергирующих (разлагающих свет в спектр) элементов—призм или дифракционных решеток. Разработаны различные конструкции спектрофотометров, работающих как по однолучевой (одноканальной), так и по двухлучевой (двухканальной) схеме.

Блок-схема спектрофотометра



Свет от источника излучения 1 попадает в монохроматор 2, в котором он разлагается в спектр. Монохроматизированный световой поток проходит после этого через кюветное отделение 3, в котором устанавливаются кюветы с анализируемым раствором и раствором сравнения («нулевым» раствором). Пройдя через кюветы с растворами, световой поток попадает на фотоэлементы приемника излучения 4, в котором энергия светового потока преобразуется в фототок, усиливаемый в блоке усилителя 5, после чего усиленный электрический сигнал регистрируется в блоке регистратора 6 либо в виде спектральной кривой, либо по показанию отсчитывающего устройства.

Спектрофотометры

- В качестве источника излучения в спектрофотометрах используют лампы накаливания при работе в видимой области спектра, в которой они обеспечивают непрерывный световой поток (а не линейчатый, даваемый ртутной лампой), и водородные либо дейтериевые лампы — при работе в УФ диапазоне спектра (200—350 нм).
- Для разложения светового луча в спектр в монохроматоре чаще всего используют призмы или дифракционные решетки. При работе в видимой и в ближней ИК области используют стеклянные призмы, а также стеклянные конденсоры (линзы) и кюветы. При работе в УФ диапазоне 200—400 нм применяют кварцевую оптику (призмы, конденсоры, кюветы), так как стекло поглощает УФ лучи.

Спектрофотометрия

- При использовании спектрофотометров, работающих по однолучевой схеме, в световой поток в кюветном отделении попеременно вносят кювету с раствором сравнения (нулевым раствором) и кювету с анализируемым раствором. В кюветное отделение спектрофотометров, работающих по двухлучевой схеме, устанавливают одновременно обе кюветы: кювет - с нулевым раствором — в канал сравнения, кювет)' с анализируемым раствором — в измерительный канал.
- Обе кюветы —с нулевым и с анализируемым растворами — должны быть совершенно одинаковыми, с равной толщиной поглощающего слоя. При толщине поглощающего слоя $l = 1$ см допустимое отклонение не должно превышать $\Delta l = \pm 0,005$ см при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. Обе кюветы, заполненные чистым растворителем, должны иметь одинаковую оптическую плотность при одной и той же длине волны.

Спектрофотометрия

Разработаны различные приемы спектрофотометрии:

- Прямая
- Дифференциальная
- Производная спектрофотометрия
- Спектрофотометрическое титрование.

Концентрацию определяемого вещества в анализируемом растворе при спектрофотометрических измерениях находят, как и в фотоэлектроколориметрии, с использованием либо основного закона светопоглощения, либо градуировочных графиков.

Спектрофотометрия

- Спектрофотометрические методы обладают, по сравнению с фотоэлектрокolorиметрическими, большей точностью и чувствительностью, позволяют проводить анализ многокомпонентных систем без разделения компонентов, определять вещества, не поглощающие в видимой области спектра (но имеющие полосы поглощения в УФ диапазоне). Относительные ошибки спектрофотометрических определений не превышают $\pm 2\%$.
- В отличие от фотоколориметрии и фотоэлектрокolorиметрии, спектрофотометрия позволяет не только проводить измерение оптической плотности при фиксированной длине волны, но и получать спектры поглощения в широком спектральном диапазоне.

Количественный фотометрический анализ

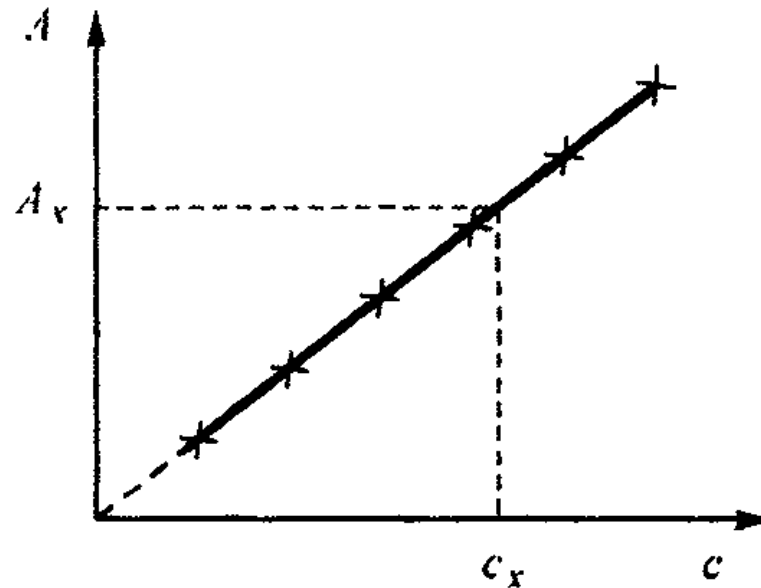
Условия фотометрического определения:

- Фотометрическая реакция (если это необходимо)
- Выбор аналитической длины волны,
- Выбор концентрации измеряемого раствора, Выбор толщины поглощающего слоя
- Выбор раствора сравнения (нулевой раствор)

Нахождение концентрации определяемого вещества

1. Метод градуировочного графика (метод калибровочных кривых).

Графический способ нахождения концентрации применим и тогда, когда наблюдаются кажущиеся отклонения от основного закона светополощения.



2. Метод одного стандарта.

Должен выполняться основной закон светопоглощения.

Готовят стандарт (стандартный раствор) — раствор с точно известной концентрацией определяемого вещества $c(ст)$ — и измеряют его оптическую плотность $A(ст)$ при аналитической длине волны по отношению к раствору сравнения. Затем в той же кювете и в тех же условиях измеряют оптическую плотность $A(x)$ анализируемого раствора с неизвестной концентрацией $c(x)$ определяемого вещества.

$$A(ст) = \epsilon c(ст)l,$$

$$A(x) = \epsilon c(x)l,$$

$$c(x) = \frac{A(x)}{A(ст)} c(ст).$$

3.Определение концентрации по молярному или удельному коэффициенту погашения.

- Должен выполняться основной закон светопоглощения.
- Численное значение молярного ϵ или удельного E коэффициента погашения должно быть известно.
- Измеряют оптическую плотность $A(x)$ анализируемого раствора с искомой концентрацией $c(x)$ определяемого вещества при аналитической длине волны в кювете с толщиной поглощающего слоя l . По измеренному значению $A(x)$ рассчитывают концентрацию $c(x)$, исходя из основного закона светопоглощения:

$$A(x) = \epsilon c(x)l, \quad c(x) = A(x)/\epsilon l$$

$$A(x) = EW(x)l, \quad W(x) = A(x)/El.$$

4. Метод добавок стандарта.

Метод применим, если выполняется основной закон светопоглощения.

Готовят два раствора: первый — анализируемый $c(x)$ определяемого вещества и второй — анализируемый раствор, к которому прибавили точно известное количество (добавка стандарта) определяемого вещества, так что его концентрация во втором растворе равна $c(x) + c$, где c — точно известное увеличение концентрации за счет прибавления добавки стандарта.

Измеряют последовательно оптическую плотность A_1 и A_2 соответственно первого и второго растворов в одной и той же кювете при аналитической длине волны. С учетом выполнимости основного закона светопоглощения можно написать

$$A_1 = \varepsilon c(x)l,$$

$$A_2 = \varepsilon [c(x) + c]l,$$

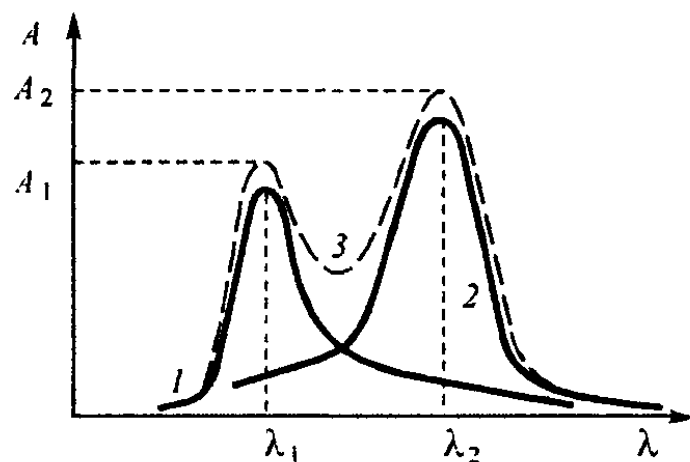
$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{c(x)}{c(x) + c}; \quad A_1 c(x) + A_1 c = A_2 c(x),$$

$$c(x)(A_2 - A_1) = A_1 c,$$

$$c(x) = \frac{A_1}{A_2 - A_1} c.$$

Определение концентрации нескольких веществ при их совместном присутствии

В основе метода лежит закон аддитивности оптической плотности при соблюдении основного закона светопоглощения



1 — полоса поглощения компонента 1; 2 — полоса поглощения компонента 2; 3 — суммарный спектр поглощения раствора

$$A_1 = \epsilon(1)_{\lambda_1} c_1 l + \epsilon(2)_{\lambda_1} c_2 l,$$

$$A_2 = \epsilon(1)_{\lambda_2} c_1 l + \epsilon(2)_{\lambda_2} c_2 l,$$

$$c_1 = \frac{\epsilon(2)_{\lambda_2} A_1 - \epsilon(2)_{\lambda_1} A_2}{[\epsilon(2)_{\lambda_2} \epsilon(1)_{\lambda_1} - \epsilon(2)_{\lambda_1} \epsilon(1)_{\lambda_2}] l},$$

$$c_2 = \frac{\epsilon(1)_{\lambda_1} A_2 - \epsilon(1)_{\lambda_2} A_1}{[\epsilon(1)_{\lambda_1} \epsilon(2)_{\lambda_2} - \epsilon(1)_{\lambda_2} \epsilon(2)_{\lambda_1}] l}.$$

Дифференциальная спектрофотометрия (фотометрия).

- Если светопоглощение анализируемого раствора измеряют по отношению к среде сравнения (раствор сравнения, диафрагма, оптический клин), оптическая плотность A которой существенно больше нуля, то такой спектрофотометрический метод называют дифференциальной спектрофотометрией.
- Одно из основных достоинств дифференциальной спектрофотометрии состоит в уменьшении ошибки спектрофотометрических определений. Поэтому дифференциальную спектрофотометрию иногда называют прецизионной спектрофотометрией.

Сущность метода

- Готовят ряд (пять—десять) эталонных растворов определяемого вещества с различной, точно заданной концентрацией
- Вначале при выбранной длине волны в оба канала спектрофотометра помещают одинаковые кюветы с одним и тем же эталонным раствором (концентрация определяемого вещества равна c_0), относительно которого будут проводить последующие измерения, и устанавливают шкалу оптической плотности в положение $A = 0$.
- Затем при той же постоянной аналитической длине волны измеряют оптическую плотность A , каждого эталонного раствора и оптическую плотность A_x анализируемого раствора относительно эталонного раствора с концентрацией c_0 и собственной оптической плотностью A_0 (относительно чистого растворителя), после чего находят концентрацию c_x определяемого вещества в анализируемом растворе следующими способами.

Расчетный способ

В соответствии с основным законом светопоглощения:

$$A_x = \epsilon l (c_x - c_0),$$

$$c_x - c_0 = A_x / \epsilon l,$$

$$c_x = c_0 + A_x / \epsilon l,$$

$$F = 1 / \epsilon l,$$

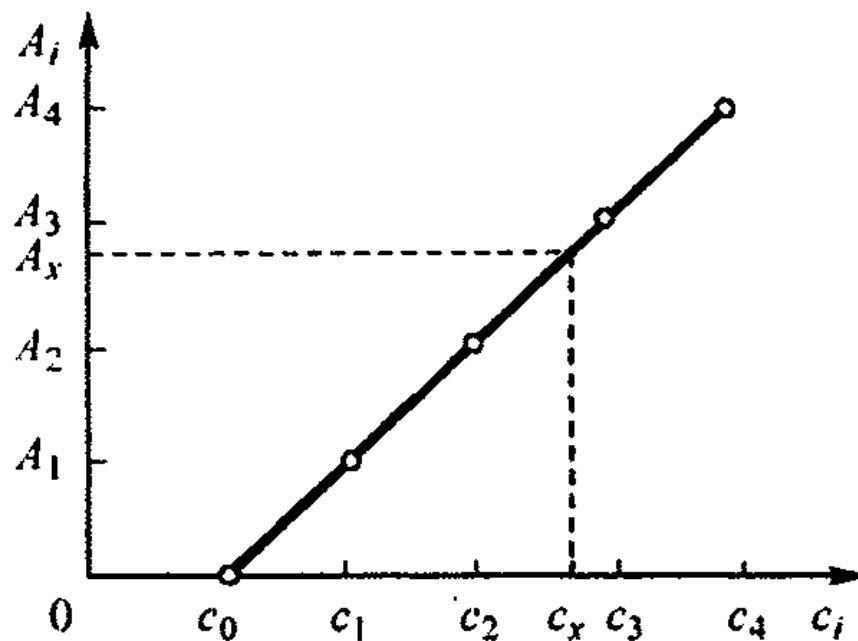
$$c_x = c_0 + F A_x.$$

$$A_i = \epsilon l (c_i - c_0),$$

$$F = 1 / \epsilon l = (c_i - c_0) / A_i$$

$$\bar{F} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} \frac{c_i - c_0}{A_i},$$

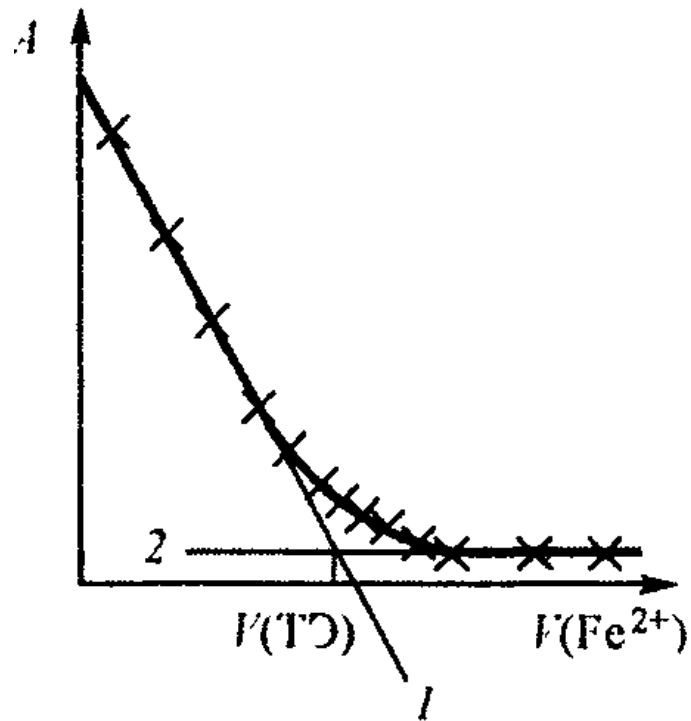
Способ градуировочного графика



Фотометрическое титрование

- Метод основан на определении конца титрования по резкому изменению светопоглощения титруемого раствора в точке эквивалентности или вблизи ее. Титрование проводят, последовательно измеряя светопоглощение титруемого раствора при прибавлении к нему титранта при аналитической длине волны, соответствующей максимуму в спектре поглощения либо титруемого вещества, либо титранта, либо продукта титриметрической реакции (безындикаторное титрование), либо прибавленного индикатора (индикаторное титрование).

Фотометрическое титрование



По результатам измерения светопоглощения титруемого раствора строят кривую титрования в координатах оптическая плотность A — объем прибавленного титранта $V(T)$. Резкий излом на кривой титрования, соответствующий концу титрования, наблюдается сравнительно редко. Чаще конец титрования находят экстраполяцией линейных участков кривой титрования. Точка пересечения экстраполяционных прямых отвечает концу титрования.

Фотометрическое титрование

- Метод обладает селективностью, большей чувствительностью по сравнению с другими титриметрическими методами, более высокой точностью, чем непосредственная фотометрия растворов с постоянной концентрацией, позволяет использовать реакции с не очень высокими константами равновесия при температуре титрования и малостойкими продуктами реакции, проводить определение при длине волны, при которой поглощают и другие компоненты раствора (поскольку конец титрования фиксируется по изменению светопоглощения, а не по абсолютному значению оптической плотности раствора).