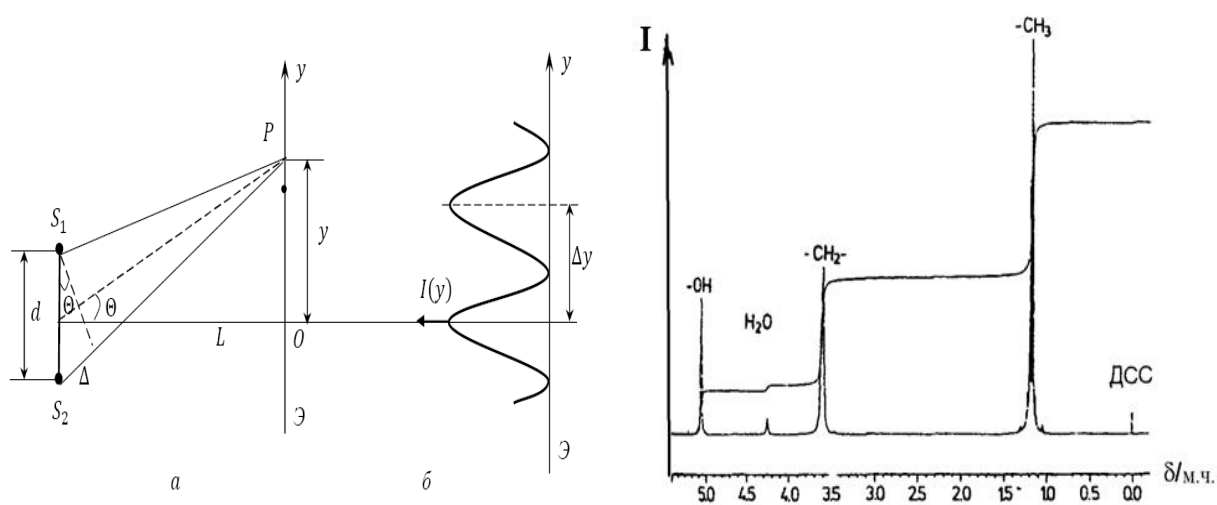


Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук, В.М. Войціцький,
В.А. Грищенко, Л.Г. Калачнюк, С.В. Хижняк,
В.І. Цвіліховський

АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ. СПЕКТРОСКОПІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ: ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ І МЕТОДИКИ

За редакцією академіка НАН України та НААН
Д.О. Мельничука



Київ–2016

УДК 577.1:547.42(075.8)

ББК 28.072

М 48

*Рекомендовано Вченою радою НУБіП України
(протокол № 11 від 24.06.2015 р.)*

Рецензенти:

Костерін С.О. – доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;

Духницький В.Б. – доктор ветеринарних наук, професор, Національний університет біоресурсів і природокористування України

Дружина М.О. – доктор біологічних наук, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Мельничук Д.О.

М 48 Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навчальний посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук, В.М. Войціцький та ін.: за ред. акад. Д.О. Мельничука. – К.: ЦП «Компринт», 2016. – 289 с.

ISBN

Посібник містить загальні питання використання в аналітичних дослідженнях спектроскопічних методів, а також їх практичне застосування. Описано оптичні методи (спектроскопія в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях, спектрофлуометрія, полум'яна спектрометрія, нефелометрія, турбометрія, рефрактометрія, поляриметрія і спектроскопія комбінованого розсіювання) та наведено відомості стосовно ядерного магнітного і електронного парамагнітного резонансів, мас-спектроскопії, мессбауерівської та фотоелектронної спектроскопій, рентгено-структурного аналізу. Рекомендується для набуття практичних навичок, які необхідні для проведення експериментальних досліджень з використанням спектрометричних методів. Для поліпшення засвоєння теоретичного матеріалу наведено ряд методик (лабораторних робіт).

Посібник розрахований на студентів, аспірантів та молодих спеціалістів які навчаються та працюють в області біології, хімії, медицини та ветеринарії та їх суміжних спеціальностях, для підготовки експертів-аналітиків з якості та безпеки продукції АПК.

УДК 577.1:547.42(075.8)

ББК 28.072

© Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук,
В.М. Войціцький, В.А. Грищенко,

Л.Г. Калачнюк, С.В. Хижняк,

В.І. Цвіліховський

© НУБіП України, 2016

ISBN

ЗМІСТ

	Вступ	8
Частина I	Загальна характеристика, теоретичні основи та області застосування спектроскопічних методів аналізу	12
1.1.	Оптичні методи аналізу речовин	12
1.1.1.	Загальна характеристика світлового потоку	12
1.1.2.	Енергетичні та світлові фотометричні показники ..	17
1.1.3.	Природа поглинання та випромінювання світла, спектри та їх характеристика	21
1.1.3.1.	Основні квантові принципи поглинання та випромінювання світла	22
1.1.3.2.	Спектри атомів	27
1.1.3.3.	Спектри молекул	30
1.1.4.	Основні закони оптики	38
1.1.4.1.	Відбиття світла	39
1.1.4.2.	Заломлення світла	40
1.1.4.2.1.	Аберація зображень, які отримують за допомогою лінз	45
1.1.4.2.2.	Принцип будови оптичного і електронного мікроскопів	46
1.1.4.3.	Дисперсія світла	48
1.1.4.4.	Поглинання світла	51
1.1.4.5.	Розсіювання світла	55
1.1.4.6.	Інтерференція світла	56
1.1.4.7.	Дифракція світла	58
1.1.4.7.1.	Принцип дії дифракційної ґратки	60
1.1.4.7.2.	Принцип будови ультрамікроскопа, в якому використовується явище дифракції світла	61
1.1.4.7.3.	Використання явищ дифракції та інтерференції світла для отримання голограм	64
1.1.4.8.	Поляризація світла	65
1.1.5.	Основні пристрої спектрофотометрів у видимій та ультрафіолетовій областях спектра	71
1.1.5.1.	Джерела світла	71
1.1.5.2.	Способи освітлення щілини	77
1.1.5.3.	Спектральна ширина щілини	81
1.1.5.4.	Кювети	83

1.1.5.5.	Виділення монохроматичного світла	85
1.1.5.6.	Реєстрація спектрів	89
1.1.5.7.	Будова та специфіка застосування пристроїв «лабораторія-на-чіпі»	95
1.1.6.	Чутливість, точність та роздільна здатність спектральних приладів	99
1.1.6.1.	Чутливість спектрального аналізу	99
1.1.6.2.	Точність вимірів у спектральному аналізі	101
1.1.6.3.	Роздільна здатність при спектральному аналізі	103
1.1.7.	Схема будови спектрофотометрів у видимій і УФ-областях та основні принципи їх застосування	108
1.1.8.	Інфрачервона спектрофотометрія	115
1.1.8.1.	Джерела світла в ІЧ-спектрофотометрах	117
1.1.8.2.	Монохроматори в ІЧ-спектрофотометрах	118
1.1.8.3.	Реєструючі пристрої в ІЧ-спектрофотометрах	119
1.1.8.4.	Приготування зразків для ІЧ-спектрофотометрії	120
1.1.8.5.	Основні умови розшифрування ІЧ-спектрів	121
1.1.9.	Оптичні методи, які базуються на явищі розсіювання, заломлення та поляризації світла	122
1.1.9.1.	Спектроскопія комбінаційного розсіювання	123
1.1.9.2.	Релеївське розсіювання та його використання	126
1.1.9.3.	Нефелометричний метод аналізу	128
1.1.9.4.	Турбідиметрія	131
1.1.9.5.	Рефрактометрія	132
1.1.9.6.	Поляриметрія	139
1.1.10.	Полум'яна спектрометрія	144
1.1.10.1.	Розпилювачі полум'я	147
1.1.10.2.	Монохроматори в полум'яних спектрометрах	148
1.1.10.3.	Детектори та реєстрація спектрів у методі полум'яної спектрометрії	148
1.1.11.	Спектрофлуориметрія	150
1.1.11.1.	Основні характеристики флуоресценції	153
1.1.11.2.	Флуоресцентні хромофори і зонди, метод флуоресцентних міток	154
1.1.11.3.	Основні пристрої спектрофлуориметрів	159
1.2.	Спеціальні спектроскопічні методи аналізу речовин	161
1.2.1.	Ядерний магнітний резонанс (ЯМР)	161
1.2.1.1.	Умови виникнення ЯМР	163

1.2.1.2.	Імпульсна фур'є-спектроскопія ЯМР	171
1.2.1.3.	Двовимірна ЯМР-спектроскопія	175
1.2.1.4.	Подвійний ЯМР-резонанс	176
1.2.1.5.	Особливості підготовки зразків, підбору розчинників і стандартів для ЯМР-спектроскопії	178
1.2.2.	Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР)	180
1.2.2.1.	Умови виникнення ЕПР	180
1.2.2.2.	Методи спінових міток і спінових «пасток»	185
1.2.2.3.	Метод подвійної ЕПР-спектроскопії	186
1.2.2.4.	Особливості приготування зразків для ЕПР-спектроскопії	188
1.2.3.	Мас-спектроскопія	188
1.2.3.1.	Умови мас-спектроскопії та її характеристика	189
1.2.3.2.	Деякі правила мас-спектрометрії	193
1.2.3.3.	Техніка і особливості досліджень методом мас-спектрометрії	194
1.2.4.	Мессбауерівська спектроскопія	196
1.2.4.1.	Умови виникнення ефекту Мессбауера	197
1.2.4.2.	Параметри мессбауерівських спектрів	203
1.2.4.3.	Техніка і особливості досліджень методом мессбауерівської спектроскопії	207
1.2.5.	Фотоелектронна спектроскопія (власне фотоелектронна, рентгеноелектронна і оже-електронна спектроскопія)	210
1.2.5.1.	Фізичні основи методів фотоелектронної спектроскопії (ФЕС, РЕС і ОЕС)	211
1.2.5.2.	Техніка і особливості досліджень методами фотоелектронної спектрометрії	215
1.2.5.3.	Комплексні фотоелектронні спектрометри	218
1.2.6.	Рентгено-структурний аналіз	219
	Контрольні питання	225
	Рекомендована література	230
Частина II	Методики аналізу речовин спектроскопічними методами	232
	<i>Лабораторна робота 1. Кількісне визначення протеїну за методом Лоурі</i>	232
	<i>Лабораторна робота 2. Визначення вмісту протеїну в м'ясі та м'ясних продуктах спектрофотометричним методом</i>	234

<i>Лабораторна робота 3. Визначення глюкози у крові, плазмі (сироватці), спинномозковій рідині глюкозооксидазним методом</i>	238
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення фруктози за реакцією Селіванова</i>	242
<i>Лабораторна робота 5. Кількісне визначення альдегідів (бензидинового числа) в тваринних жирах і рослинних оліях спектроскопічним методом</i>	243
<i>Лабораторна робота 6. Визначення анізидинового числа в тваринних жирах і рослинних оліях спектрофотометричним методом</i>	244
<i>Лабораторна робота 7. Визначення вмісту каротинів рослин спектрофотометричним методом</i>	246
<i>Лабораторна робота 8. Кількісне визначення ретинолу (вітаміну А) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом</i>	248
<i>Лабораторна робота 9. Кількісне визначення токоферолів (вітаміну Е) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом</i>	250
<i>Лабораторна робота 10. Кількісне визначення тіаміну (вітаміну В₁) в тваринних продуктах спектрофлуориметричним методом</i>	253
<i>Лабораторна робота 11. Кількісне визначення рибофлавіну (вітаміну В₂) в ікрі риб спектрофлуориметричним методом</i>	256
<i>Лабораторна робота 12. Визначення вмісту нітритів і нітратів спектрофотометричним методом молекулярної абсорбції</i>	258
<i>Лабораторна робота 13. Кількісне визначення нітритів у м'ясних продуктах спектрофотометричним методом</i>	264
<i>Лабораторна робота 14. Визначення вмісту сахарози в цукрі поляриметричним методом</i>	266
<i>Лабораторна робота 15. Визначення вмісту розчинних сухих речовин за сахарозою в продукції цукрового виробництва рефрактометричним методом</i>	271
<i>Лабораторна робота 16. Визначення вмісту розчинних сухих речовин за сахарозою у фруктових і</i>	274

овочевих соках рефрактометричним методом	
<i>Лабораторна робота 17. Визначення вмісту важких металів у харчових продуктах методом атомно-абсорбційної спектрометрії</i>	276
<i>Лабораторна робота 18. Визначення вмісту розчинених хімічних елементів у воді методом атомно-емісійної спектрометрії з індуктивнозв'язаною плазмою</i>	280
Рекомендована література	287

ВСТУП

Спектроскопічні методи аналізу речовин – це найпоширеніші та інформативніші методи, які застосовуються для ідентифікації, визначення кількості та структури речовин, вивчення механізмів перебігу хімічних реакцій тощо. Їх основа – це дослідження спектрів поглинання або випромінювання речовинами електромагнітних хвиль. Саме такі спектри являють собою сукупність значень певних величин, що характеризують систему та процеси, які в ній відбуваються. Спектроскопічні методи, крім самостійного використання в аналітичних дослідженнях, широко застосовуються для детектування (ідентифікації, визначення кількості та структурної організації тощо) ряду речовин при використанні інших аналітичних методів, зокрема хроматографічних, електрофоретичних, імунних, радіологічних та ін.

Нині існує ряд підручників і навчальних посібників, де описані спектроскопічні методи, але в них викладені, зокрема, тільки певні з них: оптичні методи або мас-спектроскопія, електронний чи ядерний магнітні резонанси, мессбауерівська чи фотоелектронна спектроскопія тощо. Проте відсутня навчальна література, в якій наведено відомості про існуючу сукупність спектроскопічних методів, їх взаємодоповнювальні можливості для якісного та кількісного аналізу речовин. Крім того, для сучасної навчальної літератури характерні певні обмеження. Насамперед, у багатьох з них наведені розрізненні відомості, які не систематизовані, а в певних випадках вони перенавантажені вторинним матеріалом, розуміння якого потребує попереднього володіння додатковими знаннями в області фізики. У більшості випадків така навчальна література орієнтована на студентів та аспірантів певних хімічних і фізичних спеціальностей вищих начальних закладів. Водночас практичне використання спектроскопічних методів як самостійно, так і у поєднанні з іншими методами в аналітичних лабораторіях, потребує підготовки спеціалістів високої кваліфікації з широким світоглядом в цій області, тих, що можуть науково-обґрунтовано обирати методи, які дозволяють досягнути мети досліджень і вирішити поставлені завдання з використанням існуючого обладнання та навичок роботи на ньому. Знання всього арсеналу спектроскопічних методів дає можливість використовувати їх

модифікації. Все це потребує створення відповідної сучасної навчальної літератури, яка за змістом, представленням навчального матеріалу і наведеною термінологією доступна для розуміння читачам, що не володіють спеціальною підготовкою, але разом з тим мають достатні знання для засвоєння і усвідомленого використання необхідних для аналітичних досліджень експериментальних підходів. Крім того, в умовах бурхливого розвитку аналітичних методів, у т. ч. спектроскопічних, виникає потреба створення навчальних посібників з точно визначеними критеріями в кожному конкретному випадку при відборі матеріалу для дослідження і вирішенні питання про те, що є важливим.

Автори навчального посібника при його написанні використали навчальні програми та провели аналіз лекційних курсів і лабораторних робіт, які проводяться в ряді вищих навчальних закладів. Особлива увага приділена підготовці експертів-аналітиків у Національному університеті біоресурсів і природокористування України. Матеріали посібника апробовано авторами-викладачами цього університету.

Навчальний посібник орієнтований не тільки на те, щоб надати огляд сучасних уявлень стосовно спектроскопічних методів, їх теоретичних основ, але і на необхідність наведення відомостей щодо практичного застосування цих методів, доцільності їх використання при певних дослідженнях.

Найбільш важливі моменти спектроскопічних методів викладено розширено, що дозволяє ці методи, з певним розумінням, використовувати в експериментальних дослідженнях. Водночас, з метою полегшеного сприйняття та засвоєння наведеного матеріалу, у деяких випадках свідомо спрощено викладення спеціального теоретичного матеріалу (особливо математичних формул), який наведено у виданнях із списку «Рекомендованої літератури».

Для самоконтролю засвоєння матеріалу представлено перелік «Контрольних питань».

Безпосередньо навчальний посібник складається з 2-х частин. У першій з них наведено відомості стосовно загальної характеристики, теоретичних основ, принципів проведення спектроскопічних досліджень, областей застосування цих методів. Особлива увага приділяється опису конкретних спектроскопічних методів. Так, при описі оптичних методів аналізу речовин наведено відомості стосовно формування електромагнітного поля та електромагнітних хвиль, їх

енергетичних і світлових характеристик, виникнення спектрів поглинання та випромінювання речовин, основних законів оптики (відбиття, заломлення, дисперсії, поглинання, розсіювання, інтерференції, дифракції та поляризації світла). Описані основні принципи та пристрої, які використовуються в спектроскопії у видимій, ультрафіолетовій та інфрачервоній областях спектра світла; наводиться визначення таких понять, як чутливість і роздільна здатність спектральних приладів та причини, які здатні на них впливати. Взаємопов'язано представлено відомості стосовно оптичних методів, які базуються на явищі розсіювання, заломлення та поляризації світла (спектроскопія комбінаційного розсіювання, релеєвське розсіювання, нефелометрія, турбометрія, рефрактометрія, поляриметрія), а також методи полум'яної спектрометрії та спектрофлюориметрії.

Надано також подібний опис спеціальних спектроскопічних методів аналізу речовин, а саме: ядерного магнітного резонансу (ЯМР), електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), мас-спектроскопії, мессбауерівської спектроскопії і фотоелектронної спектроскопії – власне фотоелектронній (ФЕС), рентгенівській (РЕС) і оже-електронній (ОЕС).

Описано також принцип та використання для структурно-аналітичних досліджень рентгено-структурного аналізу (РСА).

Наведені терміни при першому згадуванні виділяються в тексті курсивом, а деякі з них додатково наводяться мовою оригіналу з роз'ясненням.

На завершення наведено таблицю, в якій зведено всі спектроскопічні методи із зазначенням назви (типу) методу, його принципу та основної області застосування.

У другій частині навчального посібника наведені методики (лабораторні роботи), в яких використовуються конкретні спектроскопічні методи для визначення кількості певних речовин. Основна увага приділена харчовим продуктам. Обрані методи можуть бути легко відтворені в різноманітних аналітичних лабораторіях.

Наведення лабораторних робіт не тільки сприяє поліпшенню засвоєння теоретичного матеріалу, але і набуття практичних навичок, які необхідні для проведення експериментальних досліджень.

За змістом, стилем, формою текстового та ілюстративного оформлення навчальний посібник призначено для студентів, аспірантів і молодих спеціалістів в області біології, хімії, медицини

та ветеринарії, в їх суміжних спеціальностях, для підготовки експертів-аналітиків продукції АПК.

Автори висловлюють щиру подяку всім, хто сприяв виданню цього навчального посібника, висловлював критичні зауваження і побажання, які спрямовані на його поліпшення. Вони будуть також вдячні всім, хто надасть будь-які пропозиції стосовно його доповнення, які не залишаться без уваги.

ЧАСТИНА I

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ТА ОБЛАСТІ ЗАСТОСУВАННЯ СПЕКТРОСКОПІЧНИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

Одними з найпоширеніших і вагомих за отриманими результатами є *спектроскопічні методи аналізу*. Їх застосування найрізноманітніше: ідентифікація речовин, структурно-аналітичні дослідження, вивчення механізмів і кінетики хімічних реакцій тощо. Кожний з цих методів має особливості, але всі вони базуються на певних законах фізики. Для цих методів характерно те, що вони певним чином взаємопов'язані, здатні доповнювати один одного за отриманою інформацією, але разом із тим їм притаманна і самостійність. Використання конкретного методу залежить від мети дослідження і поставлених завдань.

1.1. ОПТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ РЕЧОВИН

Оптика – це розділ фізики, в якому вивчаються явища та закономірності, які пов'язані з виникненням, розповсюдженням і взаємодією з речовиною світлових електромагнітних хвиль, які породжені електромагнітним полем.

1.1.1. Загальна характеристика світлового потоку

Електромагнітне поле (ЕМП) – це особлива форма матерії, яка характеризується взаємозв'язком змінних електричного і магнітного полів: будь-яка зміна одного з них приводить до появи іншого. Зміна породженого електричними зарядами, що рухаються прискорено, *електричного поля* (ЕП), збуджує в суміжних областях простору змінне *магнітне поле* (МП), що у свою чергу, збуджує електричне поле і т. д. Поширюється ЕМП у просторі у вигляді електромагнітних хвиль (ЕМХ), які беруть початок від джерела випромінювання. В рамках *хвильової оптики*, яка є розділом класичної електродинаміки, розглядаються ЕМХ, довжина хвиль яких від 10 нм до 1 мм, а саме діапазони: ультрафіолетові (УФ) випромінювання (довжина хвилі 10–380 нм), видиме світло (380–740 нм) та інфрачервоне (ІЧ) випромінювання (від 750 нм до 1 мм).

Електромагнітні хвилі (ЕМХ) – це електромагнітні коливання, які складаються з поперечних електричної та магнітної хвиль, що перпендикулярні одна до одної і спрямовані за вектором напрямку поширення. Вони поширюються у просторі з кінцевою швидкістю, яка залежить від властивостей середовища (рис. 1.1).

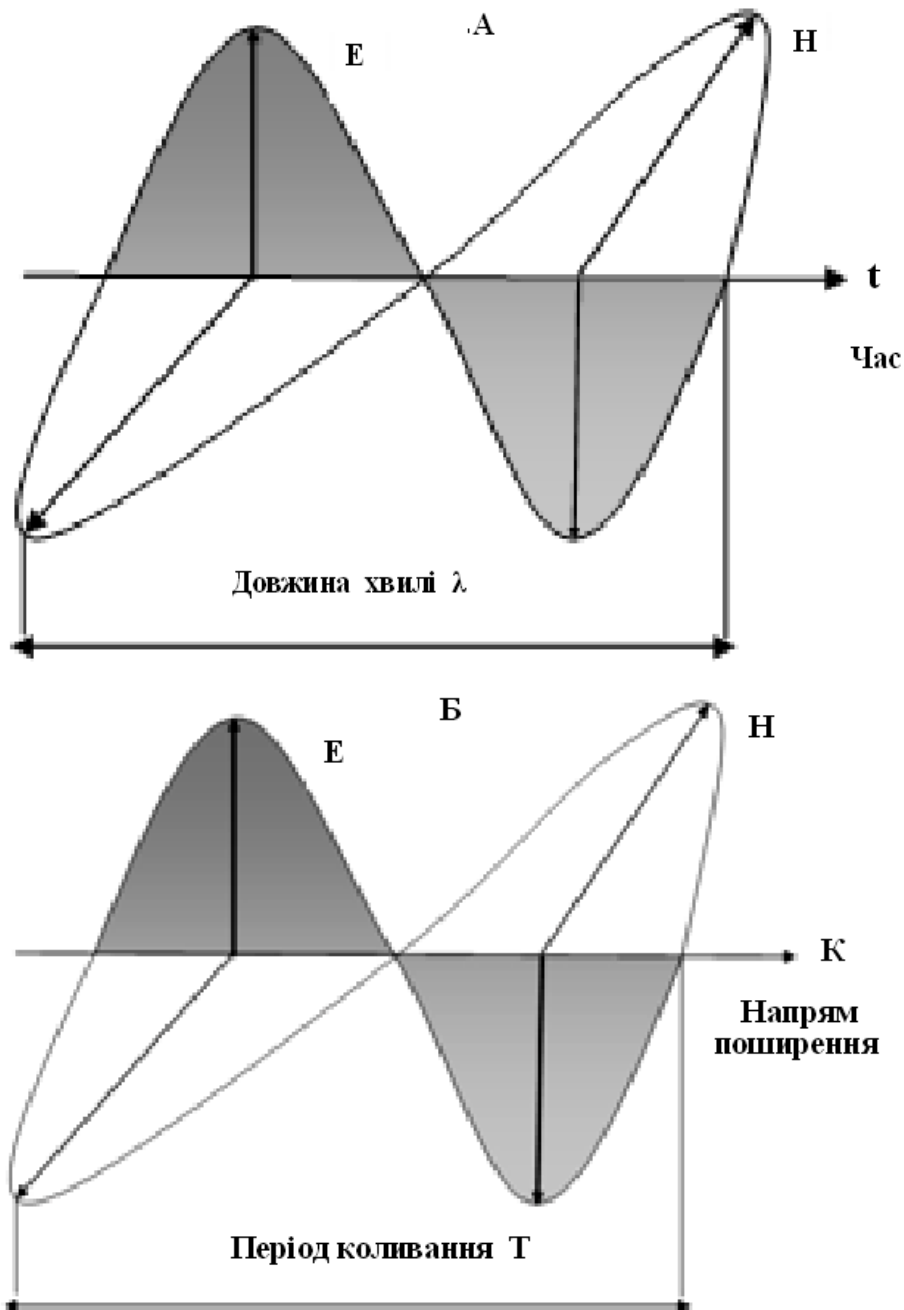


Рис. 1.1. Структура електромагнітної хвилі в часі (А) та при поширенні в просторі з часом (Б)

П р и м і т к а: E – вектор поширення електричного поля; H – вектор поширення магнітного поля; t – вектор часу; K – вектор напрямку поширення електромагнітної хвилі.

При відсутності різниці фаз ($\Delta\phi$) коливань амплітуди, напруженості електромагнітних полів додаються, що приводить до збільшення амплітуди коливань (рис. 1.2 А). За наявності деякої різниці фаз виникає часткове взаємне гасіння полів (рис. 1.2 Б), яке при $\Delta\phi = 180^\circ$ приводить до повного припинення коливань (рис. 1.2 В).

Наявність $\Delta\phi$ мінімуму двох хвиль призводить до виникнення явища інтерференції (див. підрозділ 1.4.6).

Відстань між двома найближчими точками, у яких ЕМП змінюється однаково (у одній фазі) називається *довжиною хвилі* (λ) (рис. 1.1 А). Якщо в якийсь момент часу світлова хвиля досягла певної точки простору (наприклад, де $\Delta\phi = 0$), то така ж фаза коливань буде в цій точці через період коливання T секунд (рис. 1.1 Б). Але за цей час коливання у просторі досягнуть точки, яка знаходиться від першої на відстані, що дорівнює $c \cdot T$, де c – швидкість світла у просторі, яка у вакуумі (пустоті) дорівнює:

$$c \approx 2,9979 \cdot 10^{10} \text{ см/с} \approx 3 \cdot 10^{10} \text{ см/с} = 3 \cdot 10^5 \text{ км/с.}$$

Фаза коливань у другій точці в цей момент така ж, як у першій (за прикладом теж $\phi = 0$), тобто в цих двох точках фази коливань завжди будуть однаковими, саме відстань між ними і дорівнює довжині світлової хвилі (λ):

$$\lambda = c \cdot T = \frac{c}{\nu},$$

де ν – частота коливання.

Світлові хвилі випромінюються атомами і молекулами, окремими їх групами (див. нижче), кожній з них притаманні властивості, які характерні для частинок (корпускул). Їх називають *фотонами* (грецьк. *photos* – світло). Таким чином, світло – це потік фотонів. Фотон при взаємодії з речовиною веде себе саме як частинка, здатна поглинатися речовиною цілком, при цьому віддавати свою енергію цій речовині. Тому світлове випромінювання підпорядковується законам геометричної оптики.

Таким чином, електромагнітному випромінюванню притаманний *дуалізм* (лат. *dualis* – двоїстість, подвійність) – це як хвилі, так і частинки (фотони).

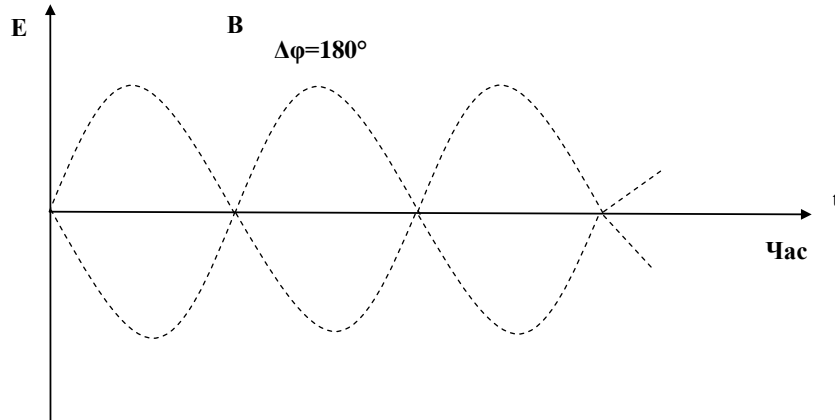
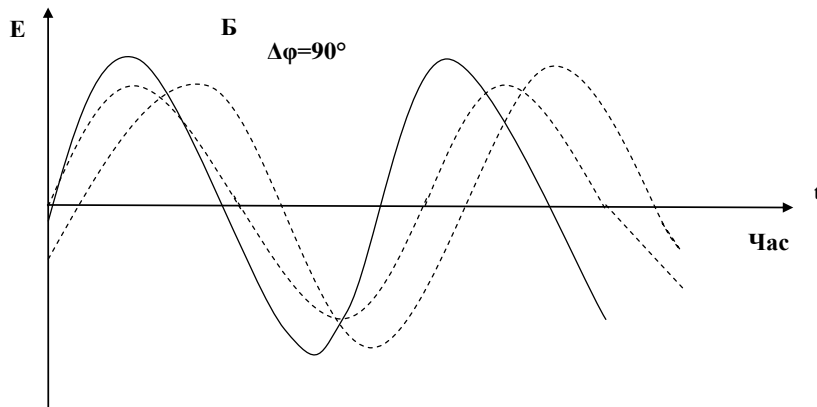
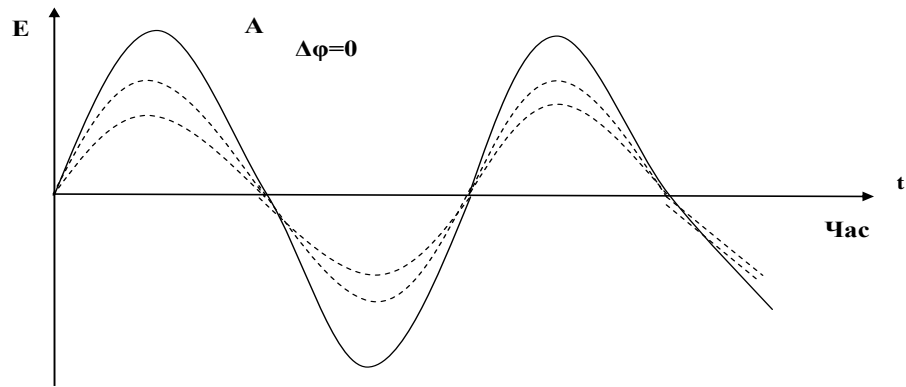


Рис. 1.2. Додавання амплітуди напруженості коливань ЕМП в одній точці в залежності від різниці фаз ($\Delta\varphi$)

П р и м і т к а: суцільна лінія – результуючі коливання; пунктирні лінії – початкові коливання; по осі ординат – напруженість ЕМП (E); А, Б, В – значення різниці фаз коливання напруженості електричного поля $\Delta\varphi = 0^0$, $\Delta\varphi = 90^0$, $\Delta\varphi = 180^0$, відповідно.

При вивченні світлових хвиль одночасно користуються хвильовими і корпускулярними уявленнями. Розповсюдження світла належить розглядати з позицій хвильової теорії, оскільки кожен фотон є групою хвиль і його рух як цілого повністю визначається розповсюдженням цих хвиль. В той же час випромінювання світла або його поглинання речовиною, де головну роль грає енергія фотона, навпаки, необхідно розглядати з позицій уявлення про світло як потік частинок (фотонів).

Значення величин частоти світлових коливань в *герцах* (одне коливання за 1 с) виражається великими числами. Тому звичайно застосовують величину, яка в одиниці *c* (швидкість світла у вакуумі) менша, яку називають *хвильовим числом* (ω):

$$\omega = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}.$$

Цю величину в Міжнародній системі одиниць (СІ) вимірюють у зворотних метрах (м^{-1}) або, звичайно, в зворотних сантиметрах (см^{-1}). В цьому випадку хвильове число – це число довжин хвиль, які вкладаються в 1 м або 1 см в залежності від величини виміру (м або см).

У табл. 1.1 наведені величини і співвідношення між величинами, які звичайно використовуються в спектральному аналізі.

Таблиця 1.1. – Одиниці виміру і співвідношення між величинами, які використовуються в спектральному аналізі

Величина	Одиниця виміру	Співвідношення між одиницями	Співвідношення між величинами
Довжина хвилі (λ)	Метр (м)	$1 \text{ м} = 10^2 \text{ см} =$	$\lambda = \frac{c}{\nu}, \lambda = \frac{hc}{E},$ $\lambda = \frac{1}{\omega},$ $\lambda_{(\text{мкм})} = \frac{10^4}{\omega_{(\text{см}^{-1})}},$ $\lambda_{(\text{Å})} = \frac{10^6}{\omega_{(\text{см}^{-1})}}.$
	Сантиметр (см)	$= 10^3 \text{ мм} =$	
	Міліметр (мм)	$= 10^6 \text{ мкм} =$	
	Мікрометр (мкм)	$= 10^9 \text{ нм} = 10^{10} \text{ Å}$	
	Нанометр (нм)		
	Ангстрем (Å)		

Частота (ν)	Герц (Гц) або с^{-1} Кілогерц (кГц) Мегагерц (МГц) Гігагерц (ГГц)	$1 \text{ Гц} = 10^{-3} \text{ кГц} =$ $= 10^{-6} \text{ МГц} =$ $= 10^{-9} \text{ ГГц}$	$\nu = c/\lambda,$ $\nu = E/h.$
Хвильове число (ω)	Обернений метр (м^{-1}) Обернений сантиметр (см^{-1})	$1 \text{ м}^{-1} = 10^{-2} \text{ см}^{-1}$	$\omega = \frac{E}{hc}, \omega = \frac{1}{\lambda}, \omega = \frac{\nu}{c},$ $\omega = \nu/c,$ $\omega_{(\text{см}^{-1})} = \frac{10^4}{\lambda_{(\text{мкм})}} = \frac{10^8}{\lambda_{(\text{А})}}.$
Енергія фотона (E)	Джоуль (Дж) Ерг (ерг) Калорія (кал) Ват в секунду (Вт·с) Електронвольт (еВ)	$1 \text{ Дж} = 10^7 \text{ ерг} =$ $= 0,239 \text{ кал} =$ $= 1 \text{ Вт}\cdot\text{с} =$ $= 6,2419 \cdot 10^{18} \text{ еВ}$	$E = h\nu, E = \frac{hc}{\lambda},$ $E = hc\omega,$ $E_{(\text{еВ})} = \frac{1,2397}{\lambda_{(\text{мкм})}} = \frac{12397}{\lambda_{(\text{А})}},$ $E_{(\text{еВ})} = \frac{\omega_{(\text{см}^{-1})}}{8066}.$

1.1.2. Енергетичні та світлові фотометричні показники

Фотометричні (грецьк. *photos* – світло та *metron* – міра, вимір) величини поділяються на два види в залежності від типу пристроїв, які реєструють світлове випромінювання: 1) *енергетичні*, які характеризують енергетичні параметри безвідносно до його спектрального складу; їх реєстрація основана на поглинанні вимірювального потоку випромінювання (термоелементи, болометри та інші теплові приймачі); 2) *світлові*, які характеризують дію світла на очі та селективні приймачі; їх реєстрація залежить від довжини хвилі або частоти (фотоелементи, фотопомножувачі, фотоопори, фотоплівки та ін.).

Енергетичні фотометричні величини. Енергія фотона (E) залежить тільки від частоти коливань (табл. 1.1):

$$E = h\nu,$$

де h – стала Планка, чисельне значення якої дорівнює $6,6252 \cdot 10^{-34}$ Дж·с, якщо енергія фотона вимірюється в джоулях, а частота ЕМХ – у герцах; ν – частота коливань.

Енергію фотона звичайно виражають в *електронвольтах* (eВ). Один електронвольт – це енергія, яку набуває електрон, який проходить в електричному полі різницю електричних потенціалів в один вольт.

В СІ (Міжнародній системі одиниць) одиницею виміру енергії є джоуль (Дж):

$$1 \text{ Дж} \approx 6,2415 \cdot 10^{18} \text{ eВ.}$$

Часто використовуються також інші енергетичні величини. Так, наприклад, *інтенсивність світлового потоку* (I_c) визначається числом фотонів (N) і потужністю енергії (P) кожного фотону, віднесених до площі (S), на яку розповсюджується потік випромінювання:

$$I_c = \frac{N \sum_{i=1}^n P_i}{S},$$

де, $n = 1, 2, 3 \dots n$ (до номера останнього фотона); P_i – потужність i -го фотона (кількість енергії в одиницю часу); S – площа поверхні, через яку переноситься випромінювання.

Одиниця виміру I_c – Вт/м² (ватт на квадратний метр).

Енергетична сила світла (I_E) – це величина, яка відповідає відношенню потоку енергії випромінювання до величини тілесного кута, в якому за заданим напрямом розповсюджується цей потік:

$$I_E = \frac{d\Phi_E}{d\Omega},$$

де $d\Phi_E$ – потік енергії (кількість енергії, яка переноситься світловою хвилею в одиницю часу через площу (S) поверхні; $d\Omega$ – тілесний кут, в якому розповсюджується випромінювання.

Одиниця виміру I_E – Вт/ср (ватт на стеріорадіан).

Повний потік випромінювання (Φ_E) визначається за формулою:

$$\Phi_E = \int_{4\pi} I_E d\Omega$$

Силу випромінювання у певному напрямі можна збільшити перерозподіленням потоку (прожектори, фари, абажури тощо; найбільшим потоком випромінювання характеризуються лазери – див. підпункт 1.1.4.8).

Енергетична світимість (R_E) – це величина, яка визначається відношенням потоку енергії, що випромінюється елементом плоскої поверхні dS за всіма напрямками (у сферу, в тілесному куті 2π), до величини площі цього елемента:

$$R_E = \frac{d\Phi_E}{dS},$$

Одиниця виміру R_E – Вт/м² (ватт на квадратний метр).

Існує ще ряд інших енергетичних величин світлового потоку, зокрема *енергетична яскравість* – величина, що чисельно дорівнює потоку енергії, який випромінюється в заданому напрямі на одиницю площі поверхні в межах одиничного тілесного кута; *енергетична освітленість поверхні* – величина, що чисельно дорівнює світловому потоку, який падає на одиницю поверхні та ін.

Світлові фотометричні величини. Міжнародна комісія по освітленості (МКО) визначила *світловий потік* (Φ_c) як потік енергії, що оцінюється по зоровому відчутті:

$$\Phi_c = \Phi_E V(\lambda),$$

де Φ_E – потік енергії; $V(\lambda)$ – відносна спектральна чутливість середнього нормального ока, тобто величина, яка зворотно пропорційна потужності монохроматичного (однієї довжини хвилі) випромінювання, що надає однакові зорові відчуття на різних довжинах хвиль випромінювання видимого діапазону (380–750 нм). Наприклад, експериментально встановлено, що випромінювання з $\lambda = 760$ нм має потужність в $2 \cdot 10^4$ разів більшу, ніж випромінювання з $\lambda = 555$ нм, для якого прийнято значення $V = 1$, щоб викликати у людини однакові відчуття яскравості світла.

Залежність $V(\lambda)$ ще має назву *крива видності* (рис. 1.3).

Всі інші світлові характеристики визначаються так само, як й енергетичні. Вони зв'язані аналогічними співвідношеннями, але для них використовуються спеціальні одиниці виміру.

До світлових фотометричних величин відносяться сила світла, світловий потік, освітленість та ін.

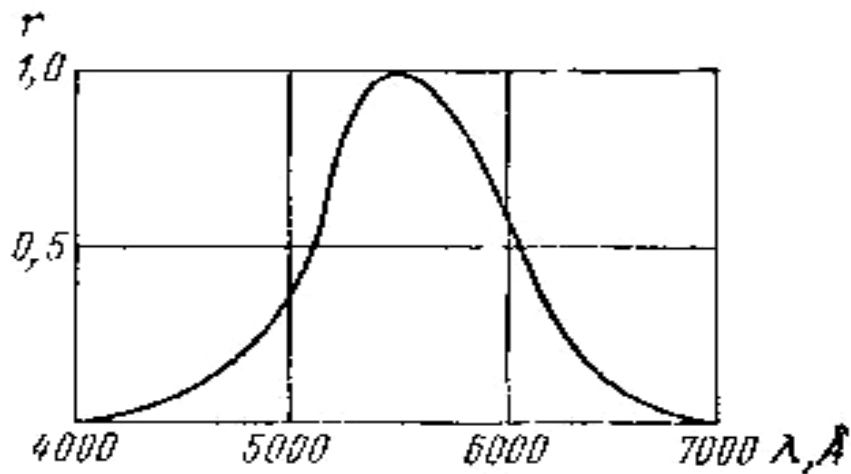


Рис. 1.3. Крива видимості за зоровим відчуттям

Сила світла – це основна величина в фотометрії. Її одиницею є *кандела* (лат. *candela* – свічка), яку позначають *кд*, її ще називають просто *свічка*. Одна кандела – це сила світла джерела, яке випромінює в заданому напрямку монохроматичне (однієї довжини хвилі або частоти) світло частотою $5,4 \cdot 10^{14}$ Гц. У зв'язку з цим, ще одне визначення *світлового потоку* (Φ_c) – це величина, яка визначається інтенсивністю світлового потоку випромінювання в межах тілесного кута:

$$\Phi_c = I_c \Omega,$$

де I_c – інтенсивність світлового потоку; Ω – тілесний кут.

Одиниця виміру світлового потоку – *люмен* (лм). Один люмен – світловий потік, який випромінюється точковим джерелом світла силою 1 кд в межах тілесного кута 1 стеріорадіан (ср):

$$1 \text{ лм} = 1 \text{ кд} \cdot 1 \text{ ср}.$$

Співвідношення величини світлового потоку і енергії фотонів змінюється з довжиною хвилі (λ). Так, наприклад, для світла з $\lambda = 555$ нм світловому потоку в 650 лм відповідає потужність 1 Вт ($1 \text{ Вт} = 1 \text{ Дж/с}$), а з $\lambda = 450$ нм потужності 1 Вт відповідає світловий потік, який рівний всього 25 лм.

Освітленість (E_c) – це величина, яка визначається відношенням світлового потоку до площі поверхні, на яку падає цей потік:

$$E_s = \frac{\Phi_c}{S},$$

де Φ_c – світловий потік; S – площа поверхні, на яку розповсюджується потік випромінювання.

Одиниця виміру освітленості – люкс (лк). Один люкс – це освітленість від точкового джерела, яке розміщене в центрі сфери і рівномірно освітлює всю її поверхню, що віднесена на 1 м^2 цієї поверхні:

$$1 \text{ лк} = 1 \text{ лм/м}^2.$$

Оскільки поверхня сфери росте пропорційно квадрату її радіуса, то освітленість поверхні сфери знижується пропорційно квадрату відстані від джерела світла.

Існує ще ряд світлових величин, зокрема яскравість та світимість. Одиниця виміру *яскравості* (B) – кандела на квадратний метр (кд/м^2 , $\text{Вт/ср}\cdot\text{м}^2$), а *світимості* (R) – люмен на квадратний метр (лм/м^2 , Вт/м^2).

У табл. 1.2 наведені деякі енергетичні і світлові величини та одиниці їх виміру.

Таблиця 1.2. – Деякі широкоживані енергетичні і світлові величини та одиниці їх виміру

Величина	Одиниця виміру	
	енергетична	світлова
Світловий потік (Φ)	Вт	люмен (лм)
Сила світла (I)	Вт/ср	кандела (кд)
Освітленість (E)	Вт/м^2	люкс (лк)
Світимість (R)	Вт/м^2	лм/м^2
Яскравість (B)	$\text{Вт/ср}\cdot\text{м}^2$	кд/м^2

1.1.3. Природа поглинання та випромінювання світла, спектри та їх характеристика

Найрізноманітніші випромінювання – γ -промені (в т. ч. космічне і рентгенівське випромінювання), ультрафіолетове випромінювання, видиме світло, інфрачервоне випромінювання і радіохвилі, за

своєю природою однакові. Всі вони – ЕМХ різної довжини хвиль (частоти).

1.1.3.1. Основні квантові принципи поглинання та випромінювання світла

Електрони в атомі мають певну енергію, що визначає їхній енергетичний рівень. Рух електрона на орбіті навколо ядра підпорядковується квантовим умовам, що приводить до появи електронної хмари – стоячої хвилі, яка характеризується певною відстанню від ядра і формою. Енергія електрона визначається, насамперед, середньою відстанню електронної хмари від ядра (рис. 1.4).

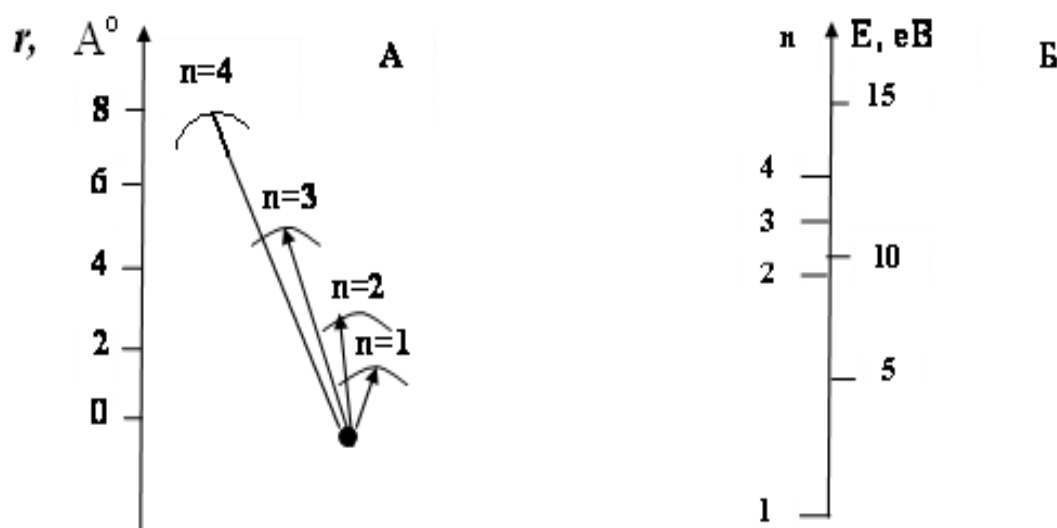


Рис. 1.4. Залежність середньої відстані r (А) електрона від ядра і енергії рівнів E (Б) для різних значень головного квантового числа n (для рівнів $l = 0$)

Ця відстань залежить від *головного квантового числа* n_i , яке може мати будь-які цілі позитивні значення: $n = 1, 2, 3 \dots$. При $n = 1$ на електронній оболонці укладається одна хвиля і електрон рухається найближче до ядра. Зі збільшенням значення n зростає середня відстань електрона від ядра, але різниця енергії між сусід-

німи рівнями весь час зменшується, оскільки сила притягання електрона до ядра зі збільшенням відстані між ними послаблюється.

Форма самої орбіти визначається *орбітальним квантовим числом* l . Кількість можливих типів орбіт залежить від головного квантового числа n – зі зростанням n з'являються орбіти все нових типів. Відповідно збільшується і кількість можливих числових значень орбітального квантового числа l , причому його значення менше, ніж значення n .

При $n = 1$ значення l приймає тільки одне – $l = 0$; при $n = 2$ можливі два значення l : $l = 0$ або $l = 1$; при $n = 3$ можливі три значення l : $l = 0$, $l = 1$, $l = 2$ і т. д.

Кожне зі значень орбітального квантового числа l характеризується певною енергією і рівень, який відповідає певному значенню n , розділяється на декілька близьких рівнів. В залежності від значення l рівні та відповідні типи орбіт позначаються літерами: s ($l = 0$), p ($l = 1$), d ($l = 2$), f ($l = 3$) та ін. Перед цими буквеними позначеннями наводять цифру, яка вказує значення головного квантового числа n . Так, наприклад, рівень, який відповідає $n = 3$ і $l = 1$, має позначення $3p$.

Схема енергетичних рівнів атома наведена на рис. 1.5. Рівні з рівним значенням головного квантового числа n для зручності трохи зсунуті на схемі відносно один одного.

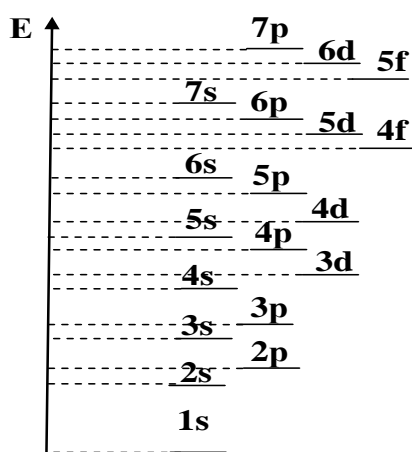


Рис. 1.5. Схема енергетичних рівнів атома

Внутрішній рух електрона, який можна умовно представити як обертання електрона навколо своєї осі з постійною швидкістю визначається як *спін* (англ. *spin* – обертання). Направлення обертання може співпадати з обертанням електрона на орбіті або бути

протилежним. Відповідно *спінове квантове число* (s) має два значення: $s = +1/2$ або $s = -1/2$.

Енергія атома для цих двох випадків буде трохи розрізнятися, що приведе до слабкого подальшого розщеплення кожного рівня на два.

Якщо розмістити атом у магнітне поле, то виникають нові рівні. Вони обумовлені взаємодією зовнішнього магнітного поля з внутрішнім – електрона, яке викликане його рухом і величина якого залежить від орбітального квантового числа l . Магнітне поле атома має певне направлення відносно зовнішнього поля. Кожному такому направленню відповідає певне значення *магнітного квантового числа* (m). Можливі значення m змінюється від $+l$ (направлення зовнішнього і внутрішнього полів співпадають) до $-l$ (поля спрямовані протилежно). Так, наприклад, при $l = 2$ значення m можуть бути рівними 2, 1, 0, -1 або -2 (рис. 1.6).

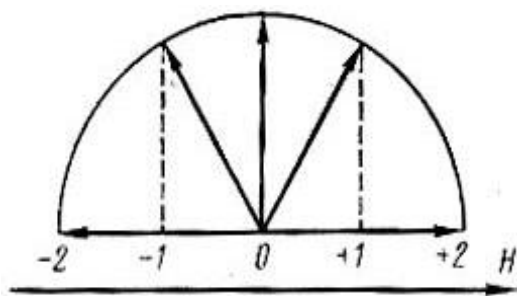


Рис. 1.6. Орієнтування магнітного поля атома у зовнішньому магнітному полі напруженістю H для випадку $l = 2$ (цифри вказують значення магнітного квантового числа m)

У зовнішньому магнітному полі рівні будуть розщеплюватися в залежності від величини орбітального квантового числа l . Так, наприклад, p -рівні розщеплюються на 3 рівні, d -рівні – на 5, а s -рівні взагалі не будуть розщеплюватися у зовнішньому магнітному полі, оскільки їм відповідає тільки одне значення m , а саме $m = 0$.

При зменшенні напруженості зовнішнього магнітного поля величина розщеплення буде зменшуватися. В його відсутності рівні з різним значенням m будуть мати однакову енергію і зіллються в один складний рівень.

Заповнення рівнів. Число рівнів велике, значно більше, ніж електронів в будь-якому атомі. Певні з них (прості) відповідають

дійсному руху електронів у звичайному стані атома, а інші – при його збудженні (передачі йому енергії).

Якщо електрон знаходиться в стані, який відповідає простому рівню, то інші електрони в цьому стані знаходитися не можуть. Таким чином, на кожному простому рівні знаходиться тільки один електрон. На складному рівні може знаходитися тільки така кількість електронів, скільки число простих рівнів, які його складають. На s -рівнях найбільше число електронів 2, на p -рівнях – 6, на d -рівнях – 10, на f -рівнях – 14 і т.п.

В атомах, які містять декілька електронів, вони займають повністю всі нижні рівні. Такий стан атома відповідає найменшій його енергії. Всі верхні рівні не заповнені, а електрони можуть знаходитися на них тільки при збудженні атома.

Порядок слідування рівнів наступний: найближчими до ядра є ті, для яких сума $n + l$ має найменше значення. Якщо для двох рівнів ці суми однакові, то більш віддаленим від ядра (менша енергія зв'язку електрона з ядром) буде рівень з меншим значенням n . Так, наприклад, рівень $4s$ ($n + l = 4 + 0 = 4$) буде нижче рівня $3d$ ($n + l = 3 + 2 = 5$), але рівень $4p$ ($n + l = 4 + 1 = 5$) розміщений вище, ніж $3d$.

Розглянемо заповнення енергетичних рівнів на прикладі атому Алюмінію (рис. 1.7). У періодичній системі елементів Д. І. Менделєєва алюміній має порядковий номер 13. На першій, найближчій до ядра оболонці ($n = 1$) знаходиться 2 електрони (рівень $1s$). Для інших електронів на першій оболонці місць вже немає. Вони займають наступну оболонку з $n = 2$. Тут два складних рівні $2s$ і $2p$, на яких розміщено 8 електронів, які повністю займають всі прості рівні. Ще 2 електрони розміщуються на наступній третій оболонці ($n = 3$), а саме рівні $3s$. Один електрон, що залишився, знаходиться на складному рівні $3p$. Так побудовані електронні оболонки незбудженого атому алюмінію. Всі рівні, які розміщені вище $3p$ ($4s$, $3d$, $4p$ та ін.) вільні, і електрон переходить на ці рівні при різних ступенях збудження атома.

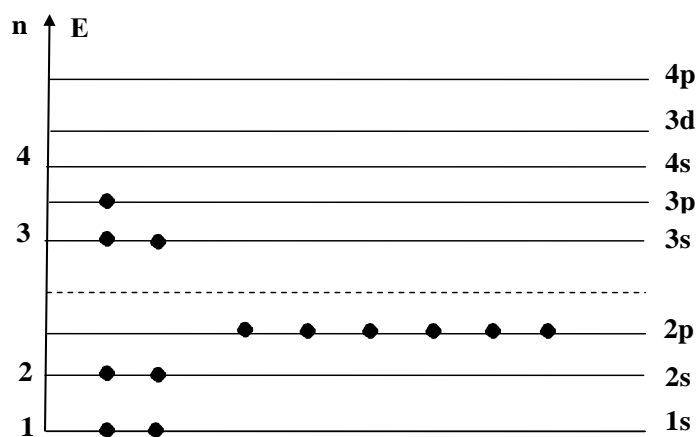


Рис. 1.7. Енергетичні рівні електронів в атомі Алюмінію

В періодичній системі елементів Д. І. Менделєєва для атомів кожного елемента показана будова зовнішньої електронної оболонки. Для незаповнених і зовнішніх оболонок наведено число електронів для кожного складного рівня. Так, наприклад, позначення $4p^5$ свідчить, що на рівні $4p$ у атома даного елемента знаходиться 5 електронів.

При сумісній присутності в атомі декількох електронів необхідно врахувати їх взаємодію одного з одним. Наприклад, якщо в атомі є два електрона з протилежно направленими спінами, то спіни компенсують один одного і утворюють зв'язану систему. Так, в атомі гелію два електрони займають положення, які мають відмінність тільки за направленістю спіна, і загальний спін цього атома рівний нулю.

Взаємодія електронів приводить до того, що в будь-якій заповненій оболонці електрони утворюють стійку систему, в якій внутрішні магнітні поля, що утворені обертанням електронів, повністю компенсують один одного. Крім того, ці оболонки розміщені ближче до ядра атома, ніж зовнішні, а збудження електронів на внутрішніх оболонках потребує більшої енергії, ніж на зовнішніх, оскільки у таких електронів сила притягання до ядра більша. Енергія збудження, наприклад, від зовнішнього джерела світла або хімічних реакцій, може бути недостатньою для збудження електронів, які знаходяться на зовнішніх рівнях. Тому всі хімічні властивості і оптичне випромінювання (спектр) залежить, головним чином, від будови незаповнених електронами зовнішніх оболонок.

1.1.3.2. Спектри атомів

Перехід електрона з одного енергетичного рівня на інший супроводжується поглинанням (у випадку переходу на більш вищий рівень) або випромінюванням (при переході з вищого рівня на нижчий) кванта світла певної енергії:

$$E = E_1 + E_2 = h\nu,$$

де E – поглинута або випромінена атомом енергія; E_1 і E_2 – відповідно, початкова і кінцева енергія електрона; h – стала Планка; ν – частота коливання, яка дорівнює: $\nu = c/\lambda$, де c – швидкість світла у вакуумі; λ – довжина хвилі.

При збудженні атомів перехід чинить, звичайно, один зі зовнішніх електронів. Електрони, які знаходяться на внутрішніх заповнених рівнях, можна, як відмічено вище, не враховувати. Так, наприклад, при збудженні атома алюмінію можна не враховувати всі електрони, крім розміщеного на рівні $3p$. Він переходить з рівня $3p$ на більш високий рівень. Такий електрон називається *оптичним*.

Для переведення електрона на більш високий рівень (збудження атома) необхідно йому передати цілком повну енергію. Її звичайно вимірюють в електронвольтах (див. вище, $1 \text{ Дж} \approx 6,2415 \cdot 10^{18} \text{ eV}$) і називають *потенціалом збудження*. Чим вище рівень, тим більше потенціал збудження.

У збудженому стані атом знаходиться недовго, всього біля 10^{-8} с. Він прагне віддати надлишкову енергію і повернутися в незбуджений стан. Перехід відбувається або зразу на нульовий рівень, або поступово з одного рівня на другий, більш низький. При переході в незбуджений (основний) стан атом випромінює фотон (квант світла) з певною енергією, оскільки кожна лінія *спектру* (лат. *spectrum* – видимий, видіння) має певний потенціал збудження.

Систему рівнів енергії атома зручно зображати графічно (рис. 1.8). Найнижчий рівень відповідає атому, який знаходиться в незбудженому стані. Його внутрішня енергія менша за енергію атома в будь-якому збудженому стані і її умовно можна прийняти за «нульове» значення. Над цим «нульовим» рівнем в певному масштабі представляють положення інших рівнів, які відповідають різним ступеням збудження атома.

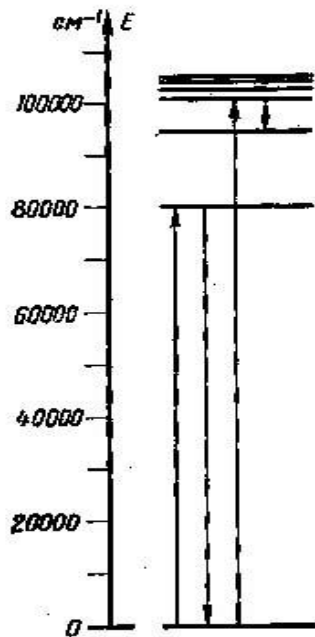


Рис. 1.8. Рівні енергії атому Гідрогену

П р и м і т к а: по осі ординат наведені числові значення хвильового числа $\omega = E/hc$, де E – енергія, h – стала Планка, c – швидкість світла у вакуумі, що є загальноприйнятим; водночас можливим є наведення по осі ординат безпосереднього значення енергії (E) в електронвольтах (eV); спрямовані вгору стрілки відповідають поглинанню енергії, а вниз – випромінюванню.

Переходи з різних верхніх рівнів на один і той же нижній приводять до появи *серії спектральних ліній*.

Атоми здатні поглинати тільки ті фотони (кванти світла), енергія яких дорівнює різниці енергій двох рівнів (фотони неподільні). Тому довжина хвиль ліній в спектрі поглинання дорівнює довжині хвиль ліній в спектрі випромінювання, яка відповідає переходу між тими же рівнями (рис. 1.9).

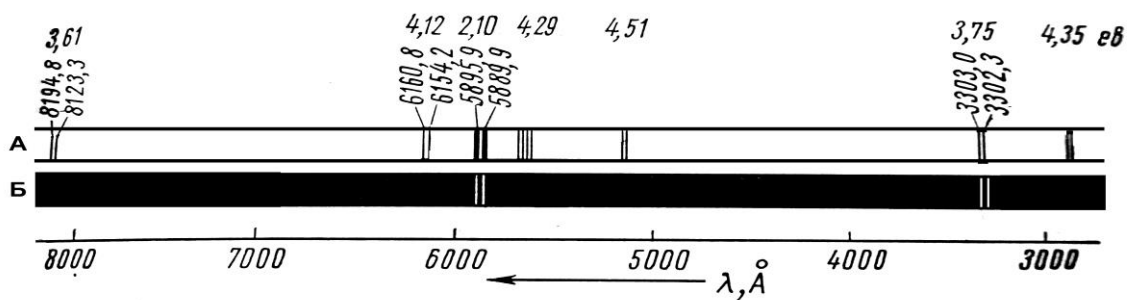


Рис. 1.9. Спектри випромінювання (А) і поглинання (Б) Натрію

П р и м і т к а: для кожної пари ліній (дуплету) в спектрі випромінювання вказана енергія (в eV) верхнього збудженого рівня.

На рис. 1.10 в загальному вигляді наведено спектри поглинання світла атомами, які зображені фотографічно і графічно.

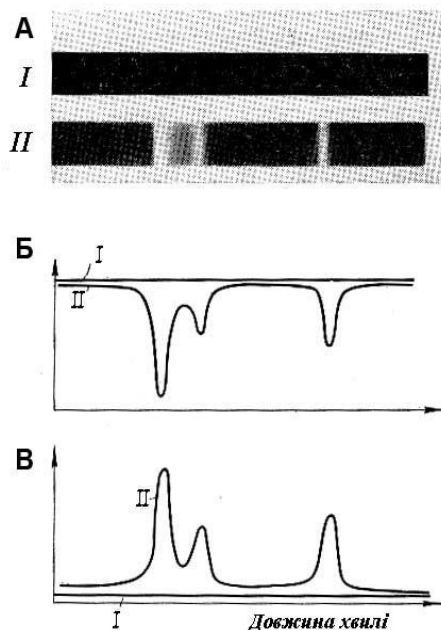


Рис. 1.10. Зображення спектрів поглинання світла атомами А – фотографічні; Б, В – графічні (по вісі ординат – інтенсивність)

П р и м і т к а: I – спектр джерела суцільного світла; II – спектр того ж світла після поглинання зразком (Б), або випромінювання збуджених атомів після проходження світла через зразок (В).

Найбільш легко збуджуються електронні рівні в атомах, які мають найнижчий потенціал збудження. Випромінювання таких спектральних ліній має, звичайно, найбільшу інтенсивність, так як відповідні їм переходи електрона будуть відбуватися найчастіше в переважній кількості досліджуваних атомів, які присутні в зразку. Але все ж таки з певною вірогідністю в інших атомах будуть потрапляти при достатній енергії збудження електрони на інші, більш верхні рівні і при їх поверненні на основний рівень (або на більш нижчі, а з них уже на основний) буде випромінюватися світло певної енергії (довжини хвиль). Все це у сукупності і складає *спектр досліджуваних атомів*. В той же час виявлено, що незважаючи на відносно низький потенціал збудження, деякі спектральні лінії відсутні або мають дуже малу інтенсивність. Встановлені спеціальні *правила відбору*, які дозволяють виявити такі спектральні лінії, які названі *забороненими*. Спектральні лінії називаються *дозволеними*, якщо при переходах орбітальне квантове число l_i

змінюється на одиницю, наприклад $s \rightarrow p$, $p \rightarrow d$ та ін. Відповідно, наприклад, перехід $4p \rightarrow 3p$ є забороненим, що і пояснює відсутність в спектрі Алюмінію лінії, яка відповідає цьому переходу (рис. 1.7).

Якщо електрону з найдалшої від ядра орбіти, де сила притягання електрону до ядра найбільше ослаблена, надати достатньо велику енергію (більшу, ніж визначається потенціалом збудження), то електрон повністю може залишити атом, виникає явище *іонізації* (див. підрозділ 2.3). Найменша енергія, яка необхідна для іонізації незбудженого атома, називається *потенціалом іонізації* і вимірюється, як правило, в електронвольтах (див. підрозділ 1.2).

Іони можуть збуджуватися так само, як і нейтральні атоми. Система рівнів у них така сама, як у нейтрального атома попереднього елемента в періодичній системі елементів Д. І. Менделєєва, оскільки вони мають однакову кількість електронів. Наприклад, іон Натрію має таку саму систему рівнів, як атом Неону. Подібні у них і спектри, тільки у іона всі спектральні лінії зміщені в короткохвильову область, оскільки заряд ядра у іона на одиницю більший, ніж у атома з таким же числом електронів.

1.1.3.3. Спектри молекул

Будова молекул значно складніша, ніж атомів, тому молекулярні спектри дуже складні. Крім того, число відомих хімічних сполук досягає сотень тисяч, тоді як різних хімічних елементів визначено всього 110 і за останніми відомостями тільки 81 стабільний елемент входить до складу живих організмів. Як і в окремих атомах, енергетичні рівні будь-якої молекули повністю визначаються її будовою. Безумовно, неможливо визначити будову всіх молекул, але в цьому немає необхідності, так як в їх будові і структурі спектрів є багато подібного. Слід зважити на те, що будова різних молекул, їх класів досліджується у відповідних розділах неорганічної, органічної, аналітичної і фізичної хімії, і отримані знання необхідні при вивченні молекулярних спектрів.

Молекули, як і окремі атоми, мають набір електронних рівнів. Ці рівні зв'язані з переходом зовнішніх електронів на більш далекі від ядра орбіти при збудженні атомів. За своєю природою вони не відрізняються від енергетичних рівнів атомів.

При утворенні молекул певні електрони атомів взаємодіють з сусідніми атомами, що спричинює виникнення хімічних зв'язків.

При цьому у зв'язаних електронів з'являються нові енергетичні рівні. Атоми в молекулі можуть коливатися навколо положення рівноваги і можливе обертання всієї молекули навколо своєї осі подібно до дзиги. Всі ці рухи є періодичними, вони приводять до появи, крім *електронних*, ще *коливальних* і *обертальних* енергетичних рівнів.

В молекулах, як і атомах, перехід електрона з одного енергетичного рівня на інший супроводжується поглинанням або випромінюванням кванта світла. У першому випадку виникає спектр поглинання, а в другому – спектр випромінювання.

Електрони в молекулі, як вже відзначалося, мають електронні, коливальні і обертальні рівні. В загальному вигляді внутрішня енергія молекули (E) дорівнює:

$$E = E_{ел.} + E_{кол.} + E_{об.},$$

де $E_{ел.}$, $E_{кол.}$, $E_{об.}$ – електронна, коливальна і обертальна енергія, відповідно.

Різниця енергії (ΔE) між двома найближчими енергетичними рівнями визначається:

$$\Delta E = \Delta E_{ел.} + \Delta E_{кол.} + \Delta E_{об.}$$

Енергія, яка необхідна для зміни спектрального стану молекули надзвичайно мала і зовсім недостатня для одночасного здійснення коливальних і тим більше електронних переходів. Тому можна отримати «чисто» обертальні спектри, тобто спектри, які зв'язані тільки з періодичною зміною швидкості обертання самих молекул.

Отримати «чисто» коливальні спектри не вдається, оскільки при збудженні коливальних рівнів одночасно змінюється і швидкість обертання молекули. Тому практично мають справу з коливально-обертальними спектрами, коли енергія збудження достатня для того, щоби викликати коливання молекул.

Неможливо також практично отримати «чисто» електронні спектри. При електронних переходах одночасно змінюється і коливальний, і обертальний стан молекули. Тому при електронних переходах виникають також коливальні і обертальні спектри (рис. 1.11).

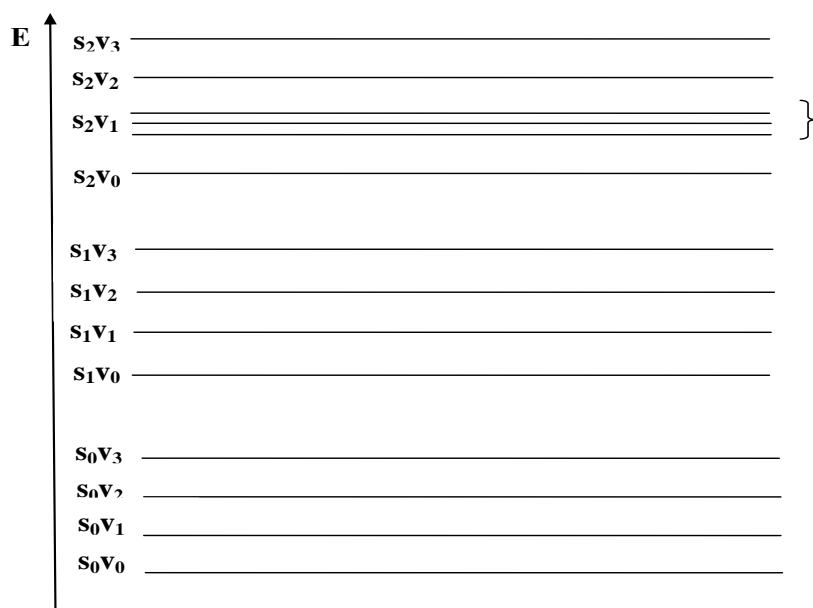


Рис. 1.11. Схема енергетичних рівнів в молекулі

П р и м і т к а: s_0 , s_1 , s_2 – основний, перший і другий збуджений електронний рівні; v_0 , v_1 , v_2 , v_3 – коливальні рівні відповідних електронних рівнів; обертальні рівні вказані тільки для коливального рівня s_2v_1 ; E – внутрішня енергія молекули.

Особливості обертальних, коливальних і електронних енергетичних рівнів зручно розглядати незалежно, але при вивченні реальних спектрів необхідно враховувати повну зміну внутрішньої енергії молекули при поглинанні чи випромінюванні квантів світла.

Обертальні спектри. Простіший випадок – це обертання двоатомної молекули навколо вісі, яка проходить через центр ваги (принцип дзиги, рис. 1.12).

Найменшу енергією при розгляді обертальних спектрів молекула має за відсутності обертання. Цьому стану відповідає нульовий (незбуджений) обертальний енергетичний рівень, за якого *обертальне квантове число* $j = 0$. Найближчому збудженому рівню ($j = 1$) відповідає певна енергія (E_1), яка переводить молекулу з нульового рівня на перший. Молекула також може знаходитися в обертальних станах з $j = 2, j = 3, j = 4 \dots$, при цьому швидкість обертання молекули в 2, 3, 4... рази більша, ніж при $j = 1$.

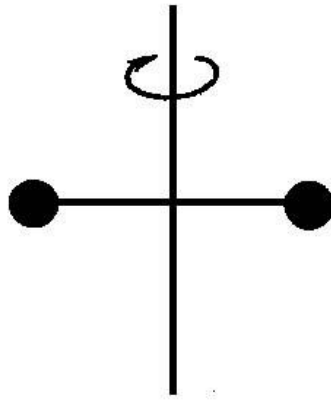


Рис. 1.12. Обертання двоатомної молекули (принцип дзиги).

Внутрішня енергія молекули зростає зі збільшенням швидкості обертання, і відстань між рівнями збільшується (рис. 1.13). Для переходу молекули з першого рівня (E_1) на другий (E_2) необхідно енергії у 2 рази більше, ніж E_1 , з другого рівня на третій (E_3) – в 3 рази більше, ніж E_1 і т.д.

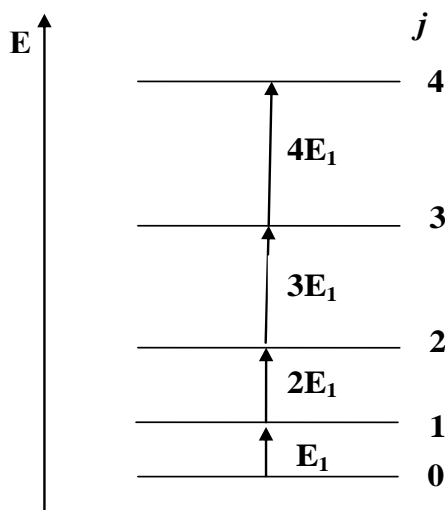


Рис. 1.13. Схема обертельних рівнів двоатомної молекули

П р и м і т к а: E – внутрішня енергія молекули; j – обертельне квантове число.

Згідно правила відбору обертельних переходів дозволені тільки ті, для яких j змінюється на одиницю, тобто переходи на сусідній рівень.

Різниця енергії між обертельними рівнями дуже мала, тому навіть при кімнатній температурі кінетична енергія молекул при їх

зіткненні вже достатня для збудження обертальних рівнів. Наслідком цього є те, що самодовільний перехід молекули на більш низький обертальний рівень з випромінюванням кванта світла відбувається дуже рідко і обертальні спектри випромінювання вдається отримати тільки за спеціальних умов.

Для несиметричних молекул обертання навколо різних осей, які проходять через центр ваги, приводить до появи різних систем рівнів. Обертальні спектри таких молекул більш складніші, ніж для симетричних.

Суттєвим обмеженням дослідження обертальних спектрів є те, що в рідинах, а тим більше твердих тілах, обертання молекул із-за зв'язку між молекулами зовсім загальмоване, або обертальні рівні значно зміщені, що не дозволяє отримати чіткі спектри. Таким чином, обертальні спектри з метою їх вивчення можна отримувати тільки у речовин, які знаходяться в газоподібному стані. Але переведення більшості речовин, що досліджується, в газоподібний стан без їх порушення становить серйозну проблему, яка обмежує використання обертальних спектрів для досліджень речовин. Слід зауважити, що в даний час з'явилися радіотехнічні методи отримання обертальних спектрів в мікрохвильовій області (радіоспектроскопія).

Коливальні спектри. Коливальні рівні, які відповідають різним значенням *коливального квантового числа* v , знаходяться приблизно на однаковій відстані один від одного. Це означає, що для переводу молекули з нульового (не збудженого) рівня на найближчий коливальний рівень і з першого рівня на другий і т. д. необхідна приблизно одна енергія.

Правило відбору коливальних переходів вимагає, щоби коливальне квантове число v змінювалося тільки до переходу на найближчий збуджений рівень. Іноді це правило порушується, і тоді можуть відбуватися переходи, наприклад з нульового рівня зразу на другий, третій і навіть більш високі, але інтенсивність відповідних смуг в коливальному спектрі поглинання дуже мала. Коливальні спектри випромінювання із-за відносно малої енергії збудження отримують тільки в спеціальних умовах. На рис. 1.14 наведена система коливальних енергетичних рівнів.

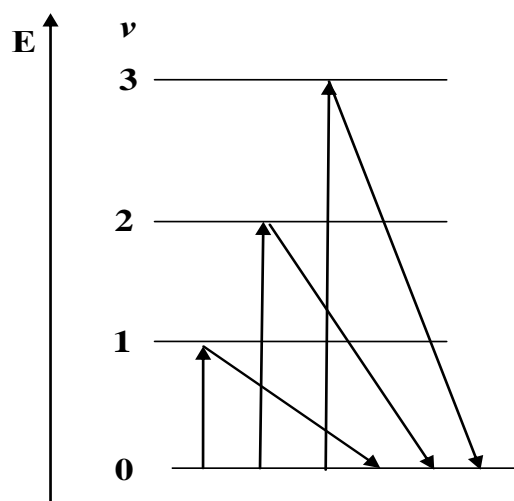


Рис. 1.14. Схема переходів між коливальними рівнями

П р и м і т к а: E – внутрішня енергія молекули; v – коливальне квантове число; спрямовані вгору стрілки відповідають поглинанню енергії, а вниз – випромінюванню.

У двоатомних молекулах можливий тільки один тип коливань, які називаються *валентними коливаннями*. При цих коливаннях змінюється відстань між атомами, які зв'язані ковалентними зв'язками, тобто такими, коли атомні орбіталі двох електронів об'єднуються з утворенням загальної молекулярної орбіталі; при цьому обидва електрони, які знаходяться на загальній орбіталі, одночасно належать обом атомам.

Коливання багатоатомних молекул значно складніші, ніж двоатомних, оскільки число можливих типів коливань швидко росте зі збільшенням числа атомів в молекулі. Так, наприклад, в лінійній триатомній молекулі вуглекислого газу (CO_2) можуть бути коливання трьох різних типів (рис. 1.15). Перші два типи коливань валентні (див. вище), одне з них симетричне, а інше – асиметричне. При коливаннях третього типу змінюються валентні кути, і атоми зміщуються в напрямках, які перпендикулярні валентним зв'язкам, довжина яких залишається майже сталою. Такі коливання називаються *деформаційними*. Для збудження таких коливань необхідно менше енергії, ніж для валентних.

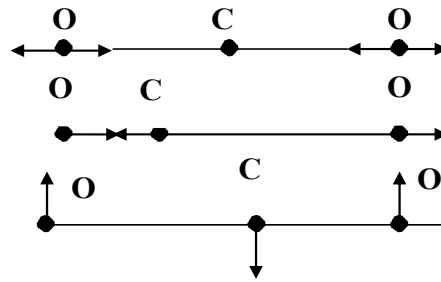


Рис. 1.15. Типи коливань молекули CO_2

В молекулі CO_2 в коливаннях беруть участь зразу всі три атома. Такі ж коливання, які торкаються всієї або майже всієї молекули, спостерігаються і в більш складних молекулах, ніж CO_2 . Відповідні їм смуги поглинання називаються *скелетними*. Вони характерні тільки для конкретної молекули і відповідні їм спектри звичайно не співпадають навіть для речовин з близькою будовою.

У складних молекулах можна виділити також коливання, в яких беруть участь тільки невеликі групи атомів, наприклад $-\text{CH}_3$, $=\text{C}=\text{CH}_2$, $-\text{O}-\text{H}$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $=\text{C}=\text{C}=\text{C}$, $=\text{C}=\text{O}$, $\equiv\text{C}-\text{N}$ та ін.

Слід зауважити, що коливальні спектри, на відміну від оберतालних, можна отримати для речовин, які знаходяться в будь-якому агрегатному стані – газоподібному, рідинному або твердому.

Електронні спектри. В молекулах, як вже відмічалось, зовнішні електрони при збудженні можуть переходити на більш високі енергетичні рівні так само, як і в окремих атомах. Молекулярні електронні спектри мають *дві суттєві відмінності* від спектрів окремих атомів:

1. Оптично активні електрони в молекулах знаходяться в іншому стані, ніж в окремих атомах, оскільки вони беруть участь в утворенні хімічних зв'язків.

2. Групі простих рівнів відповідає один і той самий електронний стан, але різні коливальні і оберतालні рівні. Таким чином, відбувається розщеплення кожного електронного рівня, що призводить до ускладнення спектра.

Так само, як і коливальні, електронні спектри можна отримати для речовин, які знаходяться в будь-якому агрегатному стані. Електронні переходи відбуваються як при поглинанні, так і при випромінюванні молекулою кванта світла.

Хвильова функція, яка характеризує результат зв'язування електронів у молекулі, називається *молекулярною орбіталлю*. У складних молекул існують орбіталі: *локалізовані*, які належать

тільки двом атомам (σ -орбіталі) і *делокалізовані*, які охоплюють більше двох атомів або навіть належать всій молекулі (π -орбіталі).

Простий одинарний зв'язок є, як правило, σ -зв'язком, що утворюється за рахунок перекривання s -орбіталей електронів атомів. Цей зв'язок розміщений вздовж осі, яка зв'язує атоми молекули.

Подвійні і потрійні зв'язки виникають за рахунок σ -зв'язку і одного або двох, відповідно, π -зв'язків. В свою чергу, π -зв'язки утворюються за рахунок перекривання p -орбіталей окремих атомів.

Ще один тип електронних орбіталей в молекулі – це n -орбіталі, які належать, як правило, одному атому в молекулі, електрони інших атомів на неї не впливають. Ця орбіталь, таким чином, є незв'язуючою.

При поглинанні кванта світла, як вже відмічалось, електрони молекули переходять на вищі енергетичні рівні і утворюють збуджені орбіталі – σ^* , π^* (рис. 1.16).

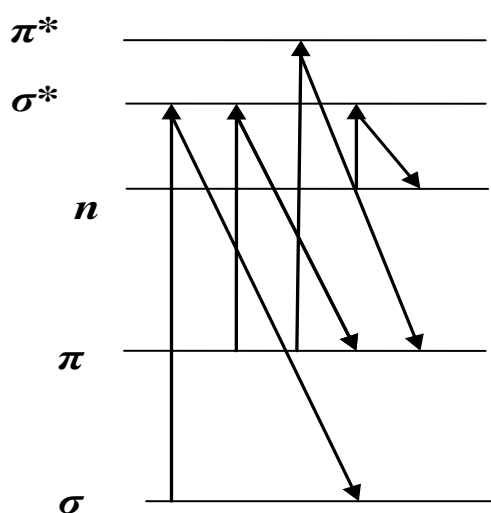


Рис. 1.16. Схема переходів між основним і збудженим станами σ -, π - і n -електронів

П р и м і т к а: спрямовані вгору стрілки відповідають поглинанню енергії, а вниз – випромінюванню.

Переходи $\pi \rightarrow \pi^*$ і $n \rightarrow \pi^*$ визначають поглинання молекул у видимій ($\lambda = 380\text{--}750$ нм) та ближній ультрафіолетовій ($\lambda = 200\text{--}380$ нм) областях. В той же час переходи $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$ і $n \rightarrow \sigma^*$ можливі тільки при поглинанні квантів світла з високою енергією, яка відповідає дальній (вакуумній) ультрафіолетовій ($\lambda = 10\text{--}200$ нм) області.

Прості і складні групи атомів в молекулах з постійним спектром поглинання або випромінювання називаються *хромософами* (грецьк. *chroma* – колір та *phoros* – той, що несе), тобто це ті групи атомів в молекулах, які обумовлюють забарвлення речовини. Такими групами є, наприклад, карбонільна ($=C=O$) і нітро- ($-NO_2$) групи, бензольне кільце (C_6H_6) та ін.

Положення та інтенсивність смуг поглинання світла в спектрі хромофорів залишаються сталими тільки при відсутності взаємодії. В цьому відношенні електронні спектри менш зручні для виявлення певних груп атомів, ніж коливальні. Але інтенсивність електронних смуг поглинання (випромінювання) звичайно значно більша, ніж коливальних. Переважно кількість практично важливих неорганічних і органічних сполук мають інтенсивні смуги в спектрі поглинання (випромінювання) в зручних для роботи ультрафіолетовій та видимій областях спектру.

Слід зауважити, що при утворенні в молекулі зв'язків між атомами енергія збудженого стану, як правило, зменшується, що призводить до поглинання світла хромофорами більшої довжини хвилі. Такий зсув в довгохвильову область спектру поглинання називається *батохромним ефектом*.

У певних випадках може відбуватися протилежний ефект – зсув спектру поглинання в короткохвильову область, тобто виникнення *гіпохромного ефекту*.

1.1.4. Основні закони оптики

Коли світло падає на будь-яке тіло, то одна його частина *відбивається* від поверхні тіла, інша може проникати всередину і розповсюджуватися в ньому далі. При цьому напрямок руху світла змінюється – світло *заломлюється*. Крім того, в обох випадках (відбиття і заломлення) енергія світлового потоку змінюється внаслідок взаємодії світла з речовиною, а також перетворення світлової енергії, наприклад, в теплову. Відбувається явище, яке отримало назву *поглинання світла* речовиною, з якою воно взаємодіє.

1.1.4.1. Відбиття світла

Відбиття світла від ідеальної плоскої поверхні продемонстровано на рис. 1.17, де MN – межа поділу двох середовищ (двох тіл). В одному з середовищ промінь L_1 потрапляє в точку O («падає») на межі поділу і відбивається у вигляді променя L_2 ; PO – перпендикуляр, відновлений в точці O до межі поділу MN . Кут α і γ – це кут падіння і кут відбивання, відповідно.

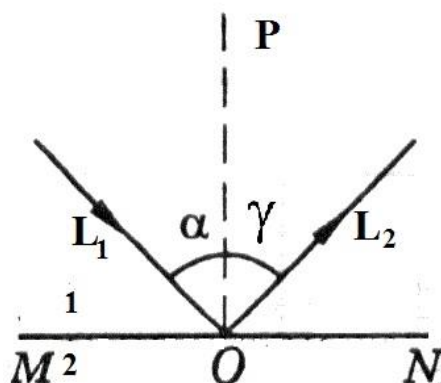


Рис. 1.17. Дзеркальне відбиття світла від плоскої поверхні (пояснення див. текст)

Закони відбиття світла:

1. Відбитий промінь світла лежить в тій же площині, що і падаючий, і перпендикулярний до межі поділу середовищ в точці падіння променя.

2. Кут відбитого світла дорівнює куту його падіння.

3. Падаючий і відбитий промені взаємозворотні.

Всі оточуючі нас тіла, які не випромінюють світло, ми бачимо в світлі, яке відбите від їх поверхонь. Відбиття може бути дифузним і дзеркальним. *Дифузне відбиття* породжується шорсткою поверхнею – точкою, яка має нерівності, що за розмірами перевищують довжину хвилі світла, що падає. При такому відбитті промені світла розповсюджуються у різних напрямках, і тоді ми бачимо предмет з усіх сторін.

Відношення швидкості світла у пустоті (вакуумі) (c) до швидкості світла в середовищі (v) називається *коефіцієнтом заломлення* (n), який визначається через *діелектричну проникність* (ϵ), яка характеризує електропровідність середовища, та *магнітну проникність* (μ), яка характеризує, відповідно, магнітні властивості середовища:

$$n = \frac{c}{v} = \sqrt{\mu\xi}.$$

Для прозорих середовищ (див. нижче) $\mu = 1$, тому:

$$n = \sqrt{\xi}.$$

Якщо коефіцієнт заломлення першого середовища (n_1) більше такого для другого середовища (n_2), тобто $n_1 > n_2$, то світлові вектори падаючої та відбитої хвилі співнаправлені, і відбита хвиля має ту саму фазу, що й падаюча. У цьому випадку світло відбивається тільки в одному напрямку.

1.1.4.2. Заломлення світла

Прозоре середовище – це таке, яке не поглинає (або відбиває) все світло, що падає на її поверхню, тобто світло у певній мірі проходить через нього. На рис. 1.18 показано хід променів у двох прозорих середовищах при падінні світла на межу їх поділу (MN): L_1 і L_2 – спадний і заломлений промені, відповідно; PO – перпендикуляр, відновлений в точці O до межі поділу MN в середовищі 1, а OQ – в середовищі 2; α – кут променя, який падає, а β – кут заломлення.

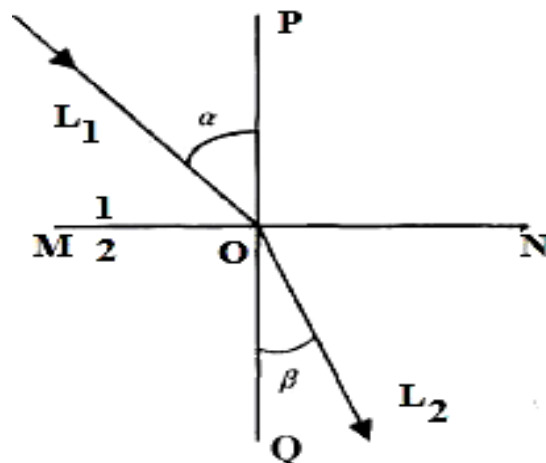


Рис. 1.18. Заломлення світла з оптично менш щільного середовища (1) в більш щільне (2) (пояснення див. текст)

Закони заломлення світла:

1. Заломлений промінь світла лежить в тій самій площині, що і спадний, і перпендикулярний до межі поділу середовищ в точці падіння променя.

2. При всіх змінах кутів падіння і заломлення відношення синуса кута падіння до синусу кута заломлення для даних двох середовищ є величиною сталою, яка називається *показником заломлення (n) другого середовища відносно першого (n_2/n_1)*

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1} = n = \text{const.}$$

3. Спадний і відбитий промені взаємозворотні.

При $n > 1$ (кут α більше кута β) друге середовище називається більш оптично щільним, ніж перше. Якщо перше середовище вакуум, то показник заломлення другого середовища (n_2) називається *абсолютним*. На практиці показник заломлення визначається відносно повітря. Для отримання абсолютного показника, значення у повітрі треба помножити на 1,003 – показник заломлення повітря відносно вакууму.

Величина показника заломлення залежить від частоти світла, яке падає. Чим більше частота світла, тим більше значення показника заломлення. Так, наприклад, при переході в оптично більш щільне середовище сині промені більше відхиляються (кут β зменшується) від першопочаткового напрямку світлових променів, ніж червоні. Таке явище називається *дисперсією світла* (див. підрозділ 1.4.3).

Якщо збільшувати кут β , як кут падіння світла з другого середовища (з більшою оптичною густиною) в перше (рис. 1.18), то у відповідності з 3-м законом заломлення настане такий момент, коли кут α буде дорівнювати 90° , тоді:

$$\sin \beta = \sin \alpha \cdot \frac{n_1}{n_2}.$$

У цьому випадку заломлений промінь пройде по межі поділу середовищ. При подальшому збільшенні кута β весь світловий потік відіб'ється від межі поділу фаз і залишиться у другому середовищі. Таке явище називається *повним внутрішнім відбиттям (ПВВ)*, а

найменший кут падіння, за якого настає ПВВ, називається *граничним (гр.) кутом ПВВ*:

$$\alpha_{гр.} = \arcsin \frac{n_2}{n_1}.$$

Явище ПВВ використовується при конструюванні різноманітних оптичних приладів: біноклів, перископів, світловодів та ін.

Явище заломлення світла лежить в основі дії широковідомого оптичного пристрою – *лінзи* (нім. *linse* – сочевиця). Лінзи – це прозорі для світла тіла, які обмежені з двох сторін поверхнями певної форми. У відповідності з формою будови поверхня лінз буває сферичною, циліндричною та ін. В свою чергу вони поділяються на ряд різновидів. Так, наприклад, сферичні лінзи можуть бути (рис. 1.19) увігнуто-опуклими (1), двоопуклими (2), плоско-опуклими (3), двоувігнутими (4), плоско-увігнутими (5), увігнуто-опуклими (6) та ін.

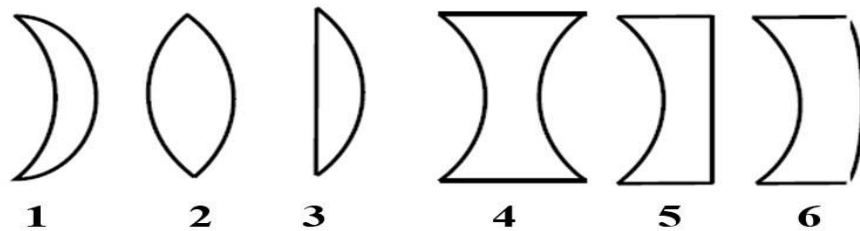


Рис. 1.19. Різні типи лінз (пояснення див. текст)

Якщо показник заломлення матеріалу лінзи ($n_{л.}$) більше за показник заломлення середовища ($n_{сеп.}$), то у *збиральних лінз* їх середина товща, а у *розсіювальних лінз* – тонша, ніж краї.

Основні характеристики тонких лінз продемонстровані на рис. 1.20:

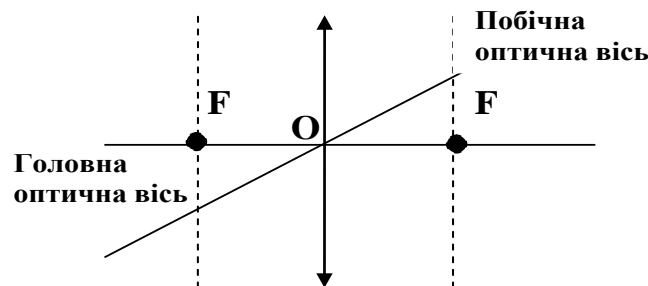


Рис. 1.20. Схематичне зображення основних характеристик лінз (пояснення див. текст)

Головна оптична вісь – пряма, яка проходить через центри кривизни поверхонь лінзи.

Оптичний центр лінзи – точка (на рис. 1.20 позначена 0), яка лежить на головній оптичній вісі, через яку промені проходять без заломлення.

Побічна оптична вісь – будь-яка пряма, яка проходить через оптичний центр (крім головної оптичної осі).

Фокус лінзи – точка F , яка лежить на головній оптичній вісі, у якій перетинаються промені, що розповсюджуються паралельно головній оптичній вісі (рис. 1.21 А).

Фокусна відстань лінзи – відстань між оптичним центром (0) лінзи та її фокусом (F).

Фокальна площина лінзи – площина, яка перпендикулярна головній оптичній вісі (на ній фокусуються паралельні пучки світла, які йдуть також вздовж побічних оптичних осей).

Оптична сила лінзи (D) дорівнює сумі оптичних сил її поверхонь і обчислюється за формулою:

$$D = \frac{1}{F} = (N - 1) \times \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) = \frac{1}{b} - \frac{1}{a},$$

де F – фокусна відстань; $N = n_{\text{л.}}/n_{\text{сер.}}$ – відносний показник заломлення ($n_{\text{л.}}$ і $n_{\text{сер.}}$ – показник заломлення лінзи і середовища, відповідно); R_1 і R_2 – радіуси кривизни сферичних поверхонь лінзи (якщо поверхні опуклі, то a і b – відстані від оптичного центру лінзи до предмета і його зображення, відповідно).

При значенні $D > 0$ лінза буде збиральною, а при $D < 0$ – розсіювальною.

Оптична сила лінзи вимірюється в діоптріях (дптр): 1 дптр = 1/1м.

Лінійним або поперечним збільшенням лінзи (γ) називається число, яке дорівнює відношенню лінійних розмірів зображення (h') і самого предмета (h):

$$\gamma = \frac{h'}{h} = \frac{b}{a},$$

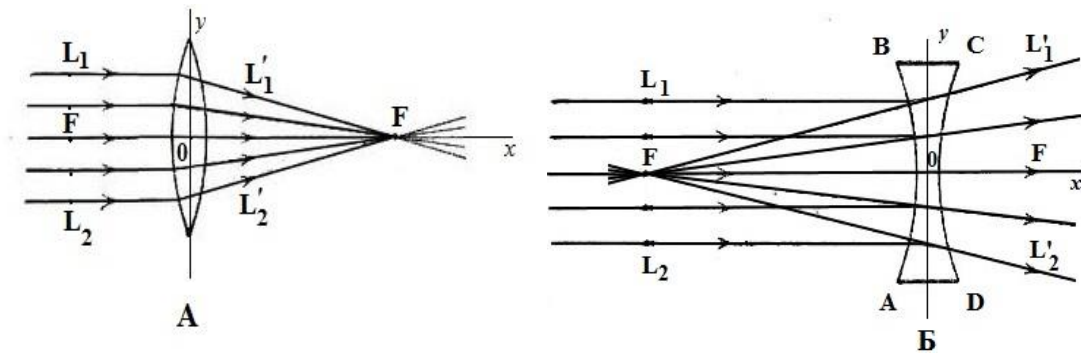


Рис. 1.21. Хід світлових променів у двоопуклій (А) та двоувігнутій (Б) лінзах

П р и м і т к а: O – оптичні центри лінз; F – фокуси лінз; Ox – головні оптичні вісі лінз; $OF = F$ – фокусні відстані лінз; Oy – слід площини, яка розсікає лінзи перпендикулярно вісі Ox через точку O ; L_1 і L_2 – межові промені, які падають на лінзу і паралельні вісі Ox ; L'_1 і L'_2 – ті самі, які пройшли крізь лінзи.

При потраплянні паралельного пучка світла на двоопуклу лінзу (рис. 1.21 А) він збирається у фокусі F .

Якщо паралельний пучок світла потрапляє на двоувігнуту лінзу (рис. 1.21 Б), то він виходить з неї пучком, що розсіюється. Продовження цих променів у бік, зворотній до напрямку їх розповсюдження, перетинаються в фокусі F увігнутої лінзи. На відміну від дійсного фокусу опуклої лінзи цей фокус уявний.

Хід світлових променів в лінзі можна прогнозувати на основі правила проходження променів через *тригранну призму* з прозорого матеріалу, наприклад, зі скла. Така призма представлена на рис. 1.22 у вигляді її перерізу – ABC (площини рисунку, яка перпендикулярна бічним ребрам призми). Промінь L_1 падає з повітряного середовища на грань AB призми паралельно грані AC (основі).

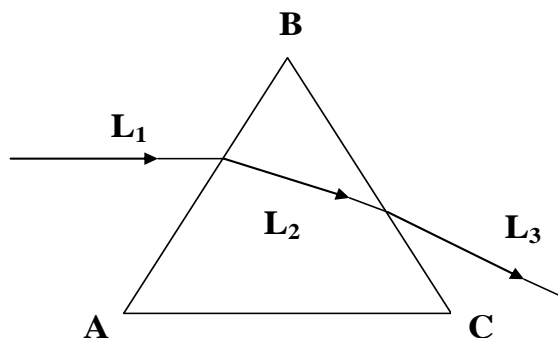


Рис. 1.22. Проходження світлового променя через тригранну призму (пояснення див. текст)

При заломленні променя в матеріалі призми, він у вигляді променя L_2 відхиляється до основи призми. При виході променя з призми через грань BC у вигляді променя L_3 він ще більше відхиляється.

1.1.4.2.1. Аберация зображень, які отримують за допомогою лінз

Якщо пучок світла, який виходить з будь-якої точки після відбиття і заломлення сходиться в одній точці, то він називається *гомоцентричним*. Викривлення зображень, які зв'язані з порушенням гомоцентричності пучків, називаються *геометричними* або *променевими аберациями* (лат. *aberratio* – відхилятися). Розрізняють наступні види абераций, які отримують за допомогою лінз:

1. *Сферичні аберации* виникають тоді, коли на лінзу падає широкий пучок світла, що розходить (рис. 1.23). В цьому випадку промені після заломлення перетинаються в точці S' (на відстані OS' від оптичної осі лінзи), а промені, які більше віддалені від оптичної осі, перетинаються в точці S'' , яка розміщена ближче до лінзи. Наслідок цього – виникнення розпливчатої плями на екрані, який перпендикулярний оптичній осі.

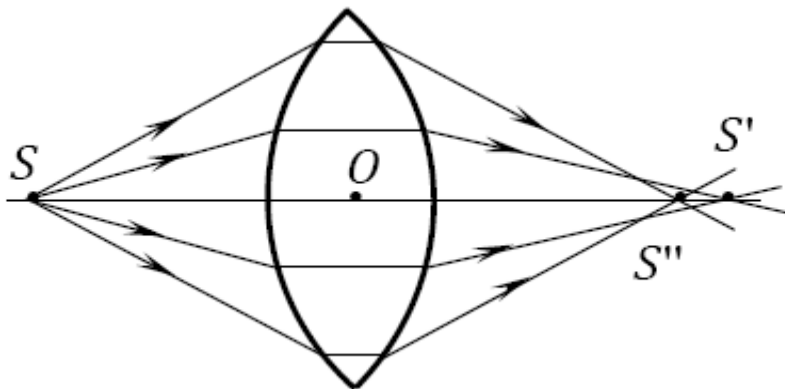


Рис. 1.23. Виникнення сферичної аберации на лінзі (пояснення див. текст)

2. *Кома* виникає тоді, коли через оптичну систему проходить широкий пучок від точкового джерела світла, який розміщений не на оптичній вісі. Наслідок цього – зображення цієї точки має вигляд освітленої плямки, яка нагадує хвіст комети.

3. *Астигматизм* (грецьк. *a* – початкова частина слова, яка має значення заперечення, та *stigma* – крапка) – похибка, яка обумовлена неоднаковістю кривизни оптичної поверхні в різних площинах перерізу світла, яке падає на неї.

4. *Дисторсія* (лат. *distortio* – викривлення) – викривлення зображення внаслідок неоднакового лінійного збільшення його частин, які знаходяться на різній відстані від оптичної осі. Внаслідок цього виникає порушення геометричної подібності між об'єктами (прямокутна, подушкоподібна, бочкоподібна дисторсія).

5. *Хроматична аберація* спостерігається при попаданні на лінзу білого (сонячного) світла, коли окремі монохроматичні промені, які його складають, фокусуються в різних точках (найбільшу фокусну відстань мають червоні промені, а найменшу – фіолетові). Внаслідок цього виникає розмиття і забарвлення по краях зображення.

Сучасні методи компенсації похибки оптичних систем і випадкових збурень хвильового фронту застосовують принципи адаптивної оптики. Класичний приклад адаптивної системи – око, яке самодовільно наводиться на гостроту за рахунок зміни кривизни кришталіка і діафрагмується при зміні зовнішньої освітленості.

1.1.4.2.2. Принцип будови оптичного і електронного мікроскопів

Здатність двоопуклих лінз збільшувати зображення предметів покладено в основу принципу будови оптичного мікроскопа (рис. 1.24 А).

Стосовно електронного мікроскопа (рис. 1.24 Б) необхідно зауважити, що він складається з елементів, які еквівалентні таким, що складають звичайний оптичний мікроскоп. Об'єкт дослідження може сам слугувати джерелом електронів (звичайно від нагрітого катода).

Довжина хвилі, яка відповідає електронам в електронному мікроскопі, має порядок декілька тисячних нанометра – в 10^4 – 10^5 разів менша, ніж у звичайних оптичних мікроскопів, оскільки звичайно використовуються електрони з високими швидкостями (відповідна прискорююча різниця електричних потенціалів 40–60 кВ). Наслідком цього є те, що роздільна здатність електронного мікроскопа переважає таку оптичного мікроскопа в декілька тисяч раз.

Так, якщо в оптичному мікроскопі вдається розрізнити певні деталі зразка, що досліджується, порядку 200–300 нм, то сучасні електронні мікроскопи володіють роздільною здатністю біля 0,1 нм.

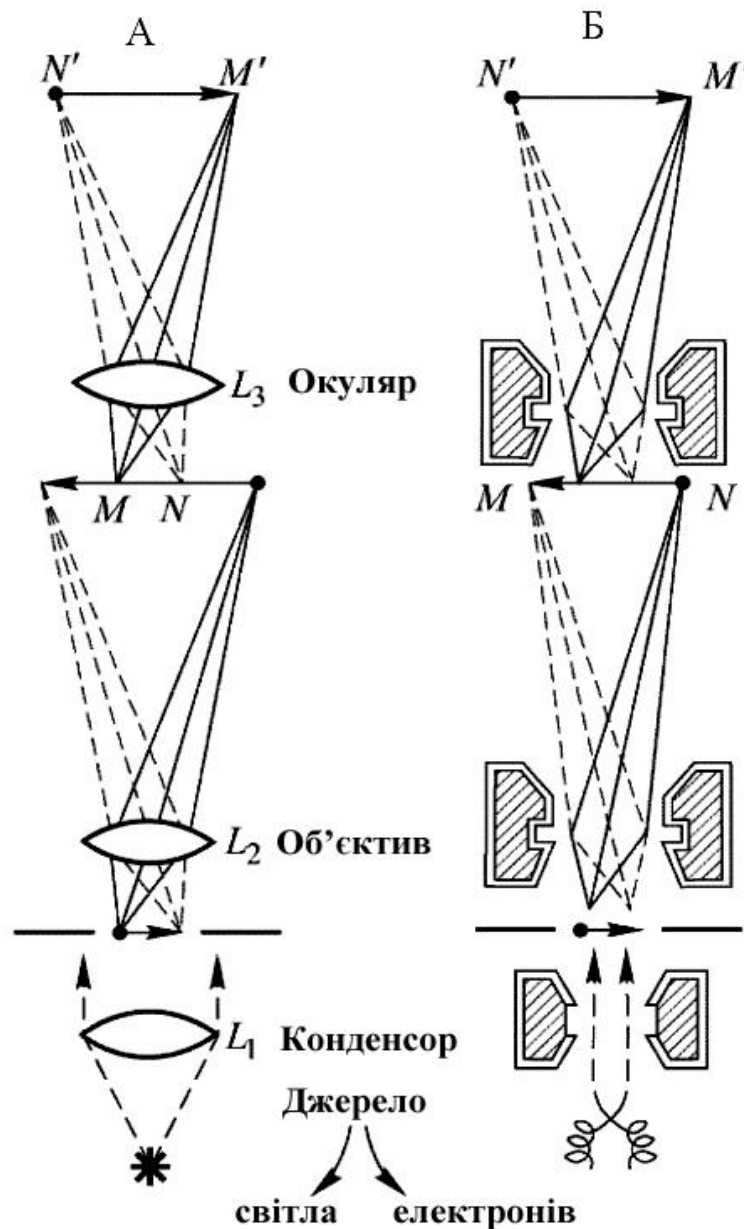


Рис. 1.24. Схема будови оптичного мікроскопа (А), а також для порівняння електронного мікроскопа (Б)

Наприклад, оптичний мікроскоп використовують при дослідженні впливу розчинів з різним осмотичним тиском на клітини, а саме вплив гіпо-, гіпер-, ізотонічних розчинів на еритроцити.

Електронна мікроскопія в поєднанні з біохімічними, цитохімічними методами дослідження, імуофлуорисценцією, а також

рентгеноструктурним аналізом надають можливість вивчати склад і функції структурних елементів клітин і вірусів.

1.1.4.3. Дисперсія світла

Залежність фазової швидкості розповсюдження світлових хвиль в середовищі від їх довжини (частоти коливань) визначає *дисперсію* (лат. *dispersus* – розсіювання). Якщо пучок білого (сонячного) світла від лінійного джерела (щілини), яке паралельне ребру тригранної призми, спрямувати на призму і спроектувати зображення щілини на екран, то буде спостерігатися не тільки відхилення зображення (заломлення в призмі), але внаслідок залежності кута заломлення від довжини хвилі зображення щілини стає розтягнутим у вигляді кольорової смуги, яка становить спектр (див. нижче рис. 1.27 та пояснення до нього).

При порівнянні спектрів, отриманих за допомогою призм з рівними кутами заломлення, але виготовленими з різних речовин, спостерігається наступне явище: спектри не тільки відхилені на різні кути, що обумовлено різними значеннями коефіцієнта заломлення (n) для однієї і тієї ж довжини хвилі (λ), але і розтягнуті на більшу чи меншу довжину внаслідок відмінностей у величинах дисперсії для різних речовин.

При вимірюванні коефіцієнта заломлення можна визначити дисперсійну здатність речовини призми, тобто залежність:

$$n = f(\lambda),$$

де $f(\lambda)$ – функціональна залежність від λ .

Наочний метод, за використання якого можна виявити характер дисперсії матеріалу призми, був розроблений ще І. Ньютоном. Це *метод схрещених призм*, який базується на тому, що світло проходить послідовно через дві призми, ребра яких, що заломлюють світло, розміщені перпендикулярно одне одному (рис. 1.25). Смужка, яка виникає внаслідок дії однієї призми, відхиляється іншою в різних своїх частинах по-різному в залежності від величини коефіцієнта заломлення. Таким чином, кінцева форма і розміщення спектра визначається дисперсією обох призм.

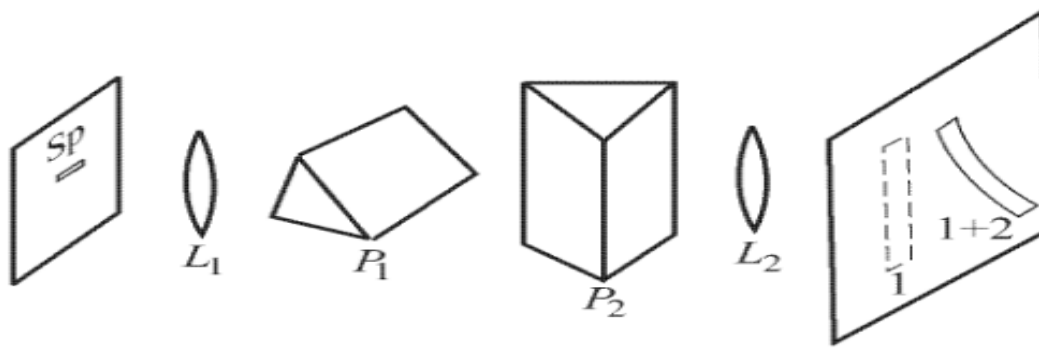


Рис. 1.25. Метод схрещених призм Ньютона

П р и м і т к а: L_1 і L_2 – лінзи; P_1 і P_2 – призми; Sp – щілина; 1 – спектр за використання однієї призми; 1+2 – спектр за використання двох призм.

Звичайно дисперсію визначають як кутову відстань ($\Delta\varphi$) між напрямленнями двох спектральних ліній, які різняться за довжиною хвилі на $\Delta\lambda$. У цьому випадку мірою кутової дисперсії (D_k) буде величина:

$$D_k = \frac{\Delta\varphi}{\Delta\lambda},$$

яка називається *кутовою дисперсією* і виражається, як правило, в кутових одиницях на ангстрем.

Оскільки часто положення ліній спектра спостерігається на екрані чи фотопластинці, то зручно кутову відстань між лініями замінити лінійною відстанню Δl , яка виражається, наприклад, в міліметрах. Якщо фокусна відстань лінзи, яка проектує спектр на екран чи фотопластинку, дорівнює F , то $\Delta S = F\Delta\varphi$. Тоді *лінійна дисперсія* (D_l) дорівнює:

$$D_l = \frac{\Delta l}{\Delta\lambda} = F D_k.$$

Розрахувати D_l можна також при використанні наступного підходу. Нехай світлові пучки, які відповідають двом спектральним лініям з різницею довжин хвиль $\Delta\lambda$ йдуть після призми чи диференційної ґратки під кутом $\Delta\beta$ один до одного (рис. 1.26). Тоді відстань між ними в фокальній поверхні (поверхні збору променів) визначається за формулою:

$$\Delta l = F \sin \beta$$

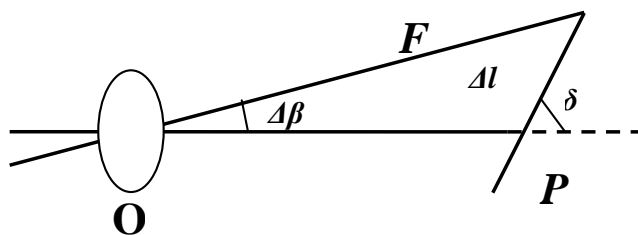


Рис. 1.26. Розміщення променів у фокальній поверхні

П р и м і т к а: О – об’єктив; F – фокусна відстань; $\Delta\beta$ – кут між лініями; δ – кут нахилу фокальної поверхні P; Δl – відстань між лініями в фокальній поверхні P.

Для спектральних ліній з близькими довжинами хвиль кут $\Delta\beta$ дуже малий і тому $\sin \Delta\beta \approx \Delta\beta$. В цьому випадку:

$$\Delta l = F \Delta\beta.$$

Якщо фокальна поверхня нахилена до оптичної осі під кутом δ , то відстань між лініями збільшується:

$$\Delta l = \frac{F \Delta\beta}{\sin \delta}.$$

Поділивши обидві частини останнього рівняння на $\Delta\lambda$, отримаємо:

$$\frac{\Delta l}{\Delta\lambda} = \frac{F}{\sin \delta} \cdot \frac{\Delta\beta}{\Delta\lambda}.$$

Лінійну дисперсію спектральних приладів прийнято характеризувати зворотною величиною – *фактором дисперсії* (або *зворотною дисперсією*), яка показує число ангстремів (мікрометрів), що доводиться на один міліметр довжини спектра в фокальній поверхні приладу.

Необхідно зауважити, що залежність $n = f(\lambda)$ має складний характер, причому зростання дисперсії не завжди зв’язано зі збільшенням коефіцієнта заломлення. Навіть загальний хід дисперсії – збільшення n при зменшенні λ не завжди має місце. Було встановлено, зокрема в рідинах, що фіолетові промені заломлюються менше, ніж червоні. Це явище було названо *аномальною дисперсією*.

Явище аномальної дисперсії тісно пов'язане з поглинанням світла: всі тіла, яким притаманна аномальна дисперсія у певній області спектра, сильно поглинають світло в цій області (рис. 1.27). Коефіцієнт заломлення поблизу смуги поглинання змінюється і його значення з боку більш довгих хвиль (точка М) більше, ніж із боку коротких (точка N).

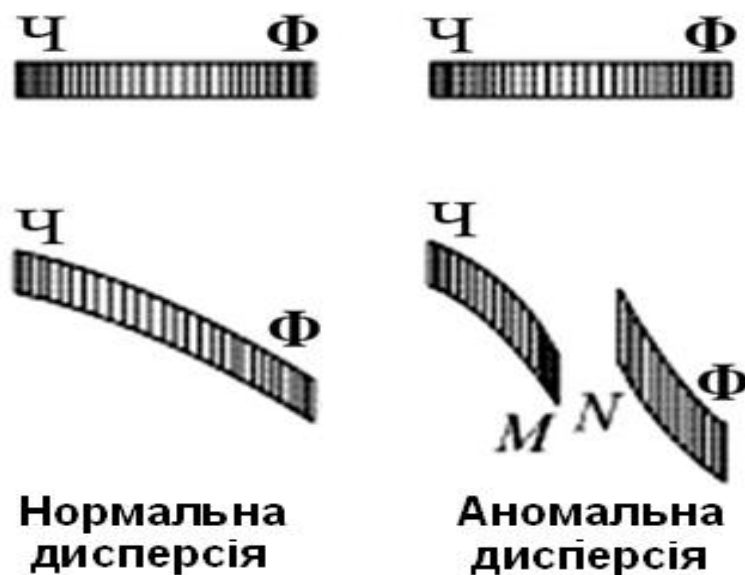


Рис. 1.27. Вигляд спектра за нормальної та аномальної дисперсії, що отримано методом схрещених призм (Ч і Ф – червоне і фіолетове світло, відповідно, М і N див. текст)

1.1.4.4. Поглинання світла

При проходженні світла через середовище відбувається його поглинання, яке називається ще *абсорбцією* (лат. *ab* – у, при та *sorbere* – поглинати, всмоктувати). Це явище пов'язане з переходом світлової енергії в інші види енергії при взаємодії світла з речовиною середовища. Це призводить до зменшення інтенсивності світла (кількості фотонів в одиницю часу через одиницю площі на певній глибині або поза межами середовища).

На рис. 1.28 наведено схему проходження світла крізь поглинальний розчин *кювети* (фр. *cuvette* – чан, тазик), яка становить собою посудину з оптично прозорого матеріалу для певного діапазону хвиль (див. підрозділ 1.1.5.4) і в яку заливають розчин речовини, що вивчається за допомогою оптичних приладів.

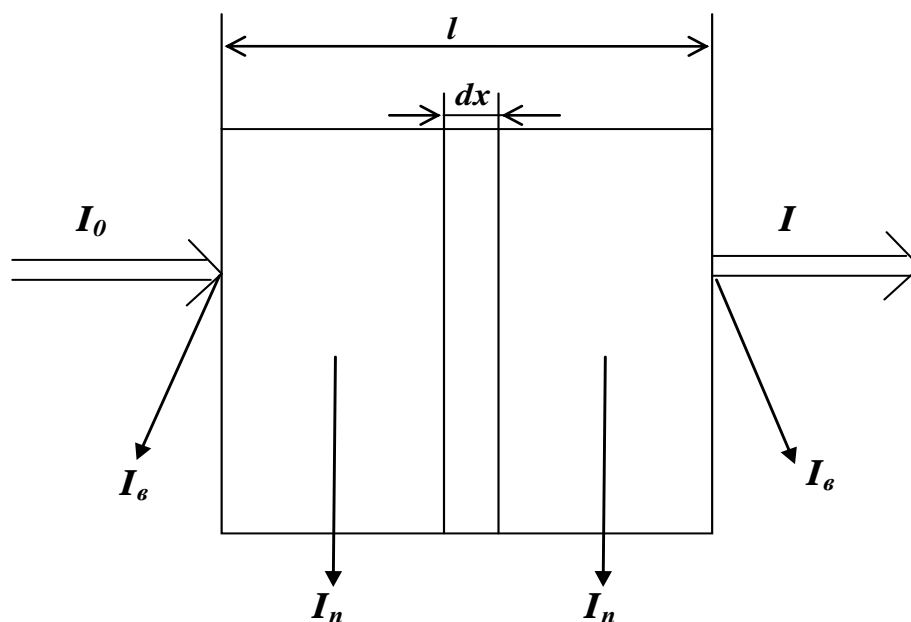


Рис. 1.28. Схема проходження світла крізь поглинальний розчин у кюветі

П р и м і т к а: I_0 – інтенсивність спадного потоку світла, I – того, що пройшов крізь розчин і стінки кювети, I_e – який відбився від стінок кювети, I_n – поглинутого розчином кювети; l – довжина кювети (шляху проходження променя в розчині кювети); dx – ширина елемента об’єму речовини кювети.

Величина I_e звичайно мала порівняно з I_n для кювет, які виготовлені з оптично прозорого матеріалу в діапазоні довжин хвиль, що використовуються у дослідженнях. Тому, звичайно, величиною I_e нехтують, якщо не ставляться специфічні завдання.

Для врахування поглинання розчинником і розсіювання світла звичайно використовують дві кювети, в одній з яких знаходиться тільки розчинник (кювета порівняння), а в іншій – розчинник і додатково ще досліджувана речовина (розчин, який аналізують). При їх порівнянні визначають тільки поглинальну здатність досліджуваної речовини (див. пункт 1.1.7 і схему будови двопробного спектрофотометра, рис. 1.50).

Для виміру поглинання і пропускання розчином, що аналізується, використовують різні величини: I/I_0 – пропускання, $I_0 - I/I_0$ – поглинання, але найчастіше за все – екстинкцію (див. нижче).

Якщо частку світлового потоку, яка поглинається елементом об’єму шириною dx , позначити через dI , то зменшення інтенсив-

ності світлового потоку ($-dI$, де знак « $-$ » позначає зменшення) при проходженні шару речовини товщиною dx дорівнює:

$$-dI = \alpha I dx$$

або

$$-\frac{dI}{I} = \alpha dx,$$

де α – коефіцієнт пропорційності, який називається *показником пропорційності*.

Показник пропорційності α не залежить від інтенсивності світла, але залежить від його частоти (ν) і для різних речовин різних.

Залежність α від ν називається *спектром поглинання* речовини, який лежить в основі *абсорбційного спектрального аналізу*.

При інтегруванні цього виразу в межах від I_0 до I (I_0 – інтенсивність світлового потоку на вході, а I – на виході шару поглинання x), а також x від 0 до певного значення x , отримуємо вираз, який називається *законом Бугера*:

$$I = I_0 e^{-\alpha x}.$$

Величина I/I_0 називається, як вже вказувалося, *пропусканням* і позначається, як правило, літерою T . Величина *поглинання* (E), або *екстинкція* (лат. *extinctio* – гасіння), тобто ослаблення світлового потоку при проходженні крізь середовище, називається ще *оптичною густиною* (позначається, як правило, літерою D). Екстинкція розраховується за формулою:

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T}.$$

Вдосконалений закон Бугера отримав назву *закон Бугера-Ламберта-Бера*, який враховує, що екстинкція пропорційна концентрації речовини, що досліджується, а також товщині шару розчину, що аналізується:

$$E = \epsilon c l,$$

де E – екстинкція, c – молярна концентрація розчину, який містить речовину, що досліджується; l – оптичний шлях (шлях проходження променя), який дорівнює товщині зразка (кювети, в яку поміща-

ють речовини); ε – коефіцієнт молярної екстинкції речовини, що поглинає світло при певній довжині хвилі світла, яке падає, фізичний зміст якого наступний: він дорівнює значенню екстинкції речовини (E), концентрація якої 1 моль/дм³ при довжині оптичного шляху 1 см (значення надається в см).

Кількісний вираз коефіцієнта молярної екстинкції (ε), як правило, має великі числові значення. Тому в довідковій літературі, звичайно, для певних довжин хвиль (λ) наводять величину E при поглинанні світла зразком товщиною 1 см, який містить 1 %-й розчин досліджуваної речовини – $E_{1\text{см}}^{1\%}$.

Закон Бугера-Ламберта-Бера лежить в основі визначення концентрації речовин за величиною їх екстинкції. Однак його можна використовувати не у всіх випадках. Лінійна залежність екстинкції (E) від концентрації речовини в пробі (c) зберігається для розведених розчинів. Справа в тому, що з підвищенням концентрації речовини в досліджуваному розчині (від нескінченно розбавленого, для якого густина дорівнює 0, до 100 %) змінюється оточення молекул речовини, а значить і значення коефіцієнта молярної екстинкції (ε) за сталого значення оптичного шляху (l), тобто за певних концентрацій речовини (c) залежність екстинкції (E) відхиляється від лінійної.

Значні відхилення від закону Бугера-Ламберта-Бера спостерігають за умов *агрегації* (лат. *aggregatus* – приєднаний) – утворення молекулами речовини *асоціації* (лат. *associatio* – сполучення), розміри яких достатньо великі, щоби викликати розсіювання світла, яке падає.

Треба ще зазначити, що закон Бугера-Ламберта-Бера встановлений для монохроматичного (однієї довжини хвилі) світла. Тому необхідно за його використання застосовують прилади, в яких виконується ця умова (застосування комбінації світлових фільтрів, призм, дифракційних ґраток тощо).

Спектрофотометричний аналіз здійснюють за поглинанням речовинами монохроматичного випромінювання в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях спектра.

Спектрофотометричні визначення ґрунтуються на законі Бугера-Ламберта-Бера, але на відміну від фотоколориметричних досліджень, можуть аналізувати не лише забарвлені, а й безбарвні розчини. В останньому випадку проводять вимірювання в ультрафіолетовій чи інфрачервоній областях спектра.

Спектрофотометричний аналіз заснований на визначенні спектра поглинання або вимірюванні світлопоглинання за певної довжини хвилі, яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини. (наприклад, білки вимірюють за $\lambda = 280$ нм, нуклеїнові кислоти – 260 нм).

Певним обмеженням щодо використання закону Бугера-Ламберта-Бера є також залежність чутливості і точності вимірювань від довжини хвилі. Для спектрометричних досліджень можна вибрати будь-яку довжину хвилі в спектрі поглинання речовини, але чутливість і точність вимірів буде найкращою при вимірюваннях в області максимуму спектра поглинання досліджуваної речовини.

Перед початком досліджень необхідно підібрати умови виконання закону Бугера-Ламберта-Бера, перевірити відповідність чутливості і точності заданим параметрам.

1.1.4.5. Розсіювання світла

Розсіювання світла – це зміна просторового розподілення інтенсивності і частоти (довжини хвилі), а також поляризації (див. підрозділ 1.4.8) світла.

Якщо частота розсіяного світла дорівнює частоті спадного, то розсіювання називається *пружним*, а в протилежному випадку – *непружним* з перерозподілом енергії між випромінюванням і частинками в середовищі, які його розсіюють.

Фізичні причини розсіювання світла – оптична неоднорідність середовища, а також інтерференція (див. пункт 1.1.4.6) вторинних хвиль, які породжені частинками середовища. Прикладом оптично неоднорідного середовища є каламутні середовища – *емульсії* (лат. *emulgere* – доїти), тобто рідини, в яких у взваженому стані знаходяться мікроскопічні краплинки іншої рідини; *суспензії* (лат. *suspensio* – підвішування) – системи, які складаються з двох фаз, в яких тверді частинки знаходяться в рідкій фазі; *колоїдні* (грецьк. *kollodes* – клейкий) розчини, які містять мікроскопічні частинки, показник заломлення яких відмінний від такого оточуючого середовища.

Характер розсіювання залежить від частоти (довжини хвилі) світла і розмірів частинок неоднорідного середовища:

1. Якщо лінійні розміри неоднорідностей менше довжини хвилі світла (не більше $0,1 \lambda$), то інтенсивність розсіяного світла $I \sim v^4$ (закон Релея).

2. У випадку, коли лінійні розміри неоднорідностей порівнянні з λ , то $I \sim v^2$.

3. Якщо лінійні розміри неоднорідностей набагато більше λ , то має місце так зване геометричне розсіювання, яке обумовлено відбиттям світла на межах неоднорідностей. В цьому випадку спектральний склад розсіяного світла і, яке падає, співпадають (цим пояснюється, наприклад, білий колір хмар).

1.1.4.6. Інтерференція світла

Вже відмічалось, що за різниці фаз двох хвиль ($\Delta\phi$), які надходять в одну точку простору, виникає явище *інтерференції* (лат. *inter* – між та *ferens* – несучий, переносячий) – чергування в просторі, де зустрічаються хвильові потоки, місць їх посилення в одних точках простору, де вони розповсюджуються, і ослаблення в інших в залежності від різниці фаз. Стійка інтерференційна картина спостерігається тоді, коли в місце її спостереження приходять хвилі однакової частоти з постійною у часі різницею фаз ($\Delta\phi$). Джерела таких хвиль, як і самі хвилі, називаються *когерентними* (лат. *cohaerentia* – зчеплення, зв'язок), тобто такими, що в них узгоджені коливні процеси в різних точках простору в різні моменти часу. На екрані, куди потрапляють когерентні хвилі з різницею ходу (Δ), по чергово будуть зустрічатися точки з цілим числом довжин хвиль:

$$\Delta = m\lambda,$$

де $m = 0, 1, 2 \dots n$ – порядок інтерференції.

У цьому випадку $I = I_{max}$, тобто утворюються інтерференційні максимуми, які на інтерференційній картині проявляються у вигляді темних плям.

Інтерференційні мінімуми утворюються, якщо різниця ходу дорівнює напівцілому числу довжин хвиль:

$$\Delta = \left(m + \frac{1}{2} \right) \lambda.$$

В цьому випадку хвилі приходять у точку зустрічі в просторі в протифазі і «гасять» одна одну. При рівності амплітуд хвиль, які складаються, $I_{min} = 0$. Якщо амплітуди цих хвиль неоднакові, то видимість (V) або контрастність інтерференційної картини буде:

$$V = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}.$$

У цьому випадку $0 \leq V \leq 1$ і інтерференційна картина проявляється у вигляді темних плям, а при $V = 0$ ($I_{min} = 0$) – плями взагалі відсутні.

При інтерференції відбувається тільки перерозподіл потоку енергії в просторі, а повний потік залишається незмінним.

Утворення інтерференційної картини двох когерентних хвиль наведено на рис. 1.29.

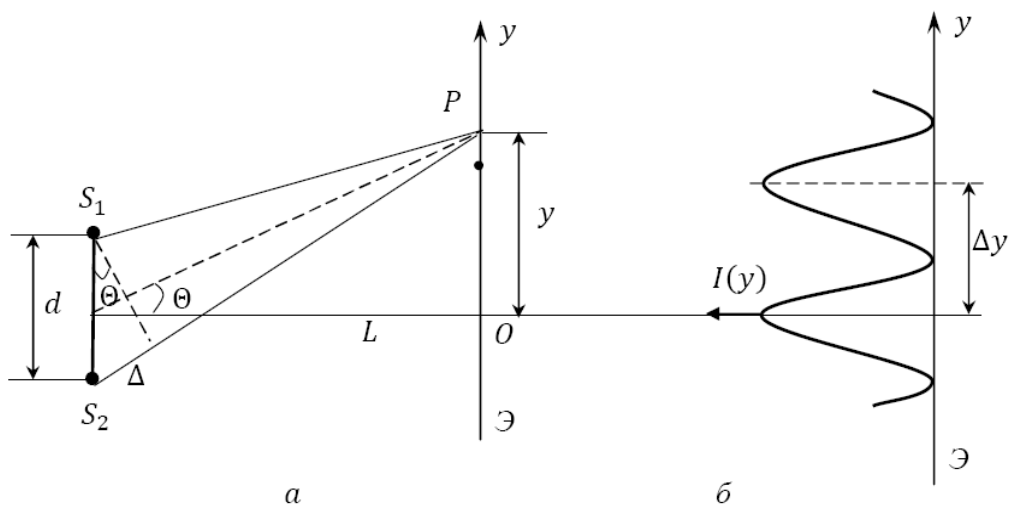


Рис. 1.29. Інтерференційна картина від двох когерентних хвиль

П р и м і т к а: S_1 і S_2 – джерела когерентних хвиль; d – відстань між джерелами когерентних хвиль S_1 і S_2 ; $I(y)$ – розподілення інтенсивності на екрані E від координати y точки спостереження P ; Δ – різниця ходу; Θ – кут, який утворюється спрямуванням на точку P з перпендикуляром, який з'єднує джерела світла; L – відстань від перпендикуляра, який з'єднує джерела світла, до екрану E (до точки O).

Направлення коливань в інтерферувальних хвилях буде практично однаковим, якщо $d \ll L$. В цьому випадку Θ буде малим, і тому $\text{tg}\Theta \approx \sin\Theta$, тобто $y/L \approx \Delta/d$. У цьому випадку:

$$\Delta \approx yd/L.$$

Ширина інтерференційних смуг або просторовий період інтерференційної картини – це відстань Δy між сусідніми максимумами (max) або мінімумами (min). При знаходженні координати m -го максимуму з урахуванням, що $\Delta = m\lambda$, отримаємо:

$$y_{max} = \frac{Lm\lambda}{d},$$

звідси:
$$\Delta y = \Delta y_{max} = \Delta y_{min} = \frac{L\lambda}{d}$$

Явище інтерференції лежить в основі створення пристроїв, які мають назву *інтерферометри*. За допомогою їх з високою точністю вимірюють лінійні та кутові розміри об'єктів, довжини хвиль джерел випромінювання, показники заломлення середовища (рефрактометрія), контролюють якість виготовлення оптичних деталей пристроїв (лінз, призм тощо в біноклях, фотоапаратах, перископах та ін.).

1.1.4.7. Дифракція світла

Одним з явищ в світловій оптиці (а також при розповсюдженні звукових хвиль та ін.) є *дифракція* (лат. *diffractus* – розламаний) – огинання хвилями за певних умов перешкод, що призводить до утворення просторово переміжних максимумів і мінімумів інтенсивності розсіяного пучка світла. Згідно принципу Гюйгенса–Френеля кожна точка хвильового фронту є джерелом вторинних сферичних хвиль, а значення інтенсивності в будь-якій точці спостереження – результат інтерференції когерентних вторинних хвиль.

Світлову рефракційну картину можна спостерігати від джерела світла, яке розміщене на відстані від місця спостереження (приймача) і в ідеальному випадку таке джерело повинно бути «точковим джерелом світла». На рис. 1.30 наведена схема досліду спостере-

ження дифракції світла на прямокутному і круглому отворі та отримані результати.

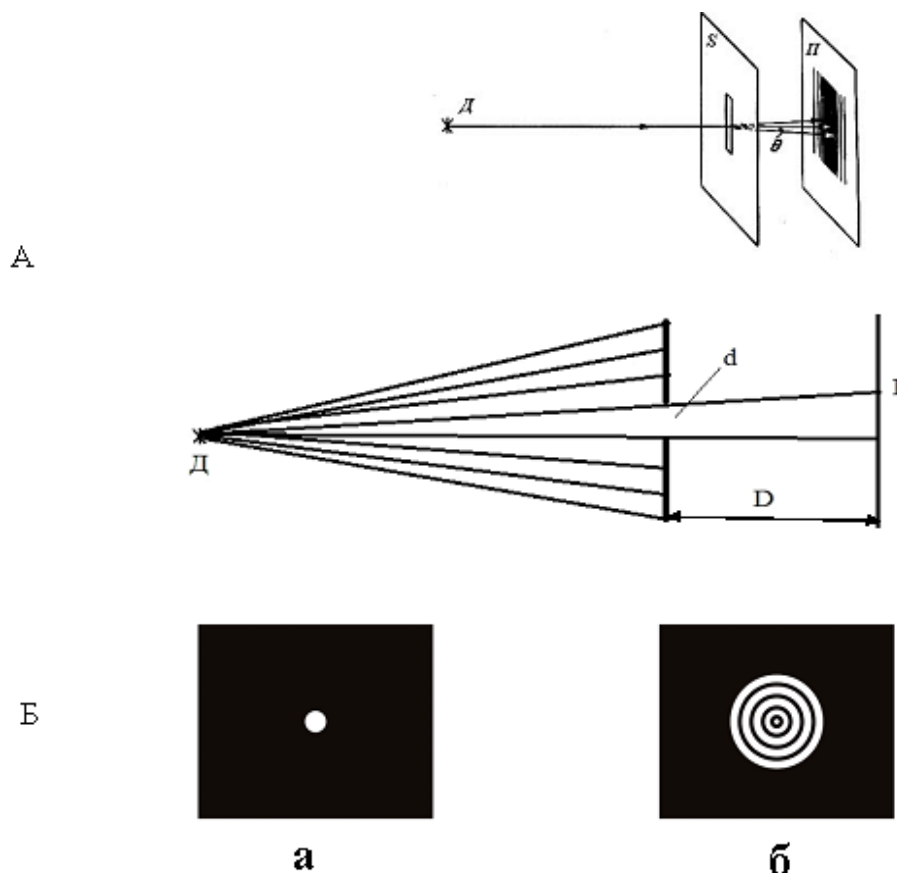


Рис. 1.30. Дифракція світла

П р и м і т к а: А – на прямокутному отворі (Д – джерело світла; S – екран з щілиною, який розташовано перпендикулярно до променя світла; П – фотографічна пластинка або інший приймач світла); Б – на круглому отворі (пояснення див. текст).

Світло, яке випромінюється від невеликого яскравого джерела D через прямокутний отвір потрапляє на приймач світла (П), який реєструє дифракційну картину (рис. 1.30 А). У випадку круглого отвору (рис. 1.30 Б), світло від джерела D потрапляє через отвір діаметром d і на екрані P дає різко окреслене світле коло на темному фоні, якщо відстань D від екрану невелика (рис. 1.30 Б, а). У цьому випадку виконуються правила геометричної оптики. Якщо ж величина D значно (у декілька тисяч разів) більша за d , то виникає інша картина. Згідно принципу Гюйгенса-Френеля вторинні хвилі, які випромінюються середовищем, проникають за

краї перешкоди, яка розміщена на шляху розповсюдження хвилі. Наслідок цього – виникає інтерференція світлових хвиль (див. рис. 1.29), що приводить до появи на екрані сукупності світлих і темних концентричних кіл (рис. 1.30 Б, б). При цьому світлові промені, що огинають краї перешкоди (краї отвору) відхиляються від прямолінійного розповсюдження на певні кути. Якщо значення d фіксоване, то відхилення тим більше, чим більша довжина хвилі наближається за своїми розмірами до розміру отвору d .

1.1.4.7.1. Принцип дії дифракційної ґратки

Явище дифракції використовується для розкладання світлового випромінювання в спектр за допомогою *дифракційних ґраток* (див. також підпункт 1.1.5.5.). Вони мають ряд переваг перед призмою, основною з яких є висока точність розкладання світлового спектру, можливість її застосування в різних областях оптичного спектру, де відсутні оптично прозорі матеріали для виготовлення призм.

Дифракційна ґратка складається з дуже великого числа (десятки і навіть сотні тисяч) щілин (штрихів) однакової ширини (рис. 1.31).

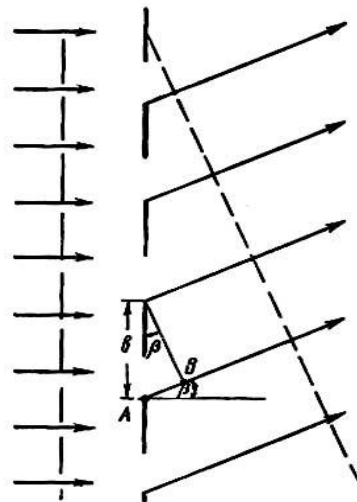


Рис. 1.31. Схематичне зображення дифракційної ґратки (пояснення див. текст)

Відстань між штрихами (b) називається *сталого ґратки* і вона суворо однакова. Ширина кожної щілини дещо перевищує довжину

світлової хвилі в робочій області оптичного спектру. Паралельний пучок світла, який падає на дифракційну ґратку, після дифракції заповнює майже весь простір за кожною щілиною.

Хвилі, які розповсюджуються в одному напрямі від різних щілин, мають різні фази і тому «гасять» одна одну. Тільки у деяких напрямках, де різниця фаз між відповідними точками усіх щілин рівна нулю (фази мають відмінність на ціле число періодів), відбувається збільшення амплітуди коливань і спостерігається максимум. Цей напрям знаходиться за умови:

$$AB = m\lambda,$$

де AB – різниця ходу хвиль, які йдуть від відповідних точок сусідніх щілин; $m = 1, 2, 3 \dots n$, порядок спектру, що спостерігається; λ – довжина хвилі.

Оскільки $AB = d \sin\beta$, то:

$$d \sin \beta = m\lambda.$$

Таким чином, максимум утворюється в тих напрямках, де різниця ходу світлових хвиль від відповідних точок сусідніх щілин складає ціле число довжин хвиль, а різниця фаз дорівнює нулю (цілому числу періодів). У всіх інших напрямках світло від різних щілин потрапляє в різних фазах. Його «гасіння» буде тим повнішим, чим більше число щілин в дифракційній ґратці. Оскільки їх дуже багато (як відмічалось, десятки і навіть сотні тисяч), то інтенсивність максимумів значна при практично повному «гасінні» світла в інших точках.

Максимуми для різних довжин хвиль, як видно з наведеної вище формули, утворюються під різними кутами. Саме завдяки цьому світло, яке падає на дифракційну ґратку, розкладається у спектр, що й використовується у відповідних спектрофотометрах.

1.1.4.7.2. Принцип будови ультрамікроскопа, в якому використовується явище дифракції світла

Існування дрібних (ультрамікроскопічних) частинок, їх положення і рух визначається за допомогою мікроскопа при спеціаль-

ному способі спостереження, який базується на явищі дифракції світла, яке виникає при розсіюванні світла на малих за розмірами частинках.

За допомогою ультрамікроскопу можна розглядати частинки розміром менші від 0,1 мкм, тобто значно менші, ніж при користуванні досконалим мікроскопом без цього пристрою. Застосовується при дослідженні дисперсних систем, для контролю чистоти повітря та води.

Схема будови простішого ультрамікроскопа, в якому використовується явище дифракції світла, наведена на рис. 1.32.

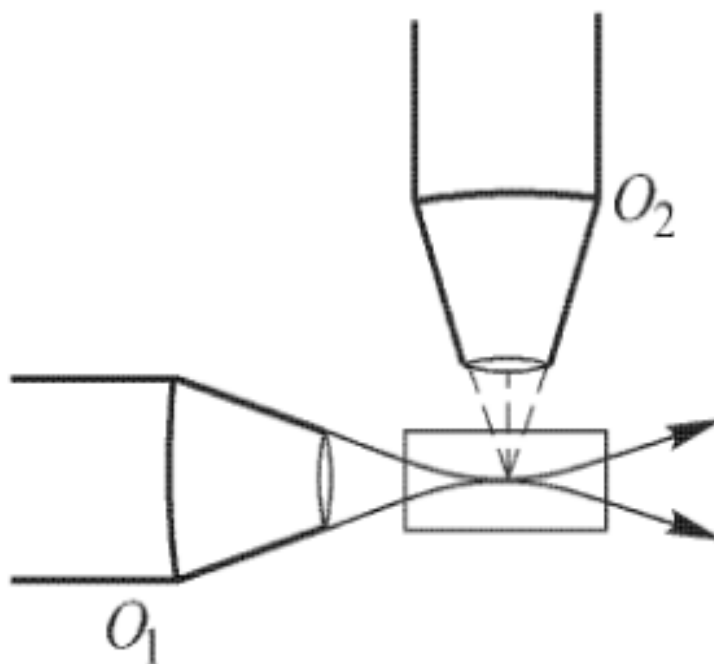


Рис. 1.32. Схема будови простішого ультрамікроскопа (пояснення див. текст)

У такому ультрамікроскопі інтенсивний пучок світла концентрується за допомогою об'єктива O_1 на кюветі (камері), де можуть бути розміщені ультрамікроскопічні об'єкти, які досліджуються. Якщо такі об'єкти відносно великі за розмірами або частинки в кюветі відсутні, то світло від об'єктива O_1 проходить в горизонтальному напрямку і не потрапляють у верхній (розміщений вертикально) об'єктив O_2 . Слід зважити на те, що молекулярне розсіювання світла в однорідному середовищі, яке не містить сторонніх частинок, настільки слабке, що його у рахунок не приймають.

У випадку, коли на шляху променів світла після об'єктива O_1 є частинки (зразок), навіть ультрарозмірів, то світло розсіюється ними (див. підрозділ 1.1.9.2), потрапляє в об'єктив O_2 і дає у вертикальному мікроскопі дифракційну картину. Це дозволяє визначити положення і переміщення ультрамікроскопічного зразка, проте лише загальні уявлення про його форму (див. нижче).

В ультрамікроскопі здійснюється принцип *темного поля*, в основі якого з поля зору усуваються прямі промені і спостерігаються лише дифракційні промені. Цей принцип реалізується в цілому ряді пристроїв, зокрема спеціальних *конденсорів* (лат. *condensare* – згущувати) – параболоїд-конденсорі, кардіоїд-конденсорі та ін. Вони створюють таке освітлення зразка, що досліджується, при якому під кутом направлений пучок світла безпосередньо в об'єктив мікроскопа не потрапляють. Центральні промені утримуються спеціальною непрозорою ширмою, а бокові промені зазнають повного внутрішнього відбиття і відбиваються від дзеркальної поверхні таким чином, що в об'єкти потрапляють тільки промені, які зазнали дифракцію на зразку (розсіяні зразком). У випадку, коли геометричні розміри зразка відносно великі (більше $\lambda/2$), то в об'єктив одночасно потрапляє значна частина дифракційних променів, спектри яких мають різні порядки. Це сприяє тому, що зображення зразка має геометричну форму цього зразка. Якщо ж значна частина дифракційних променів не потрапляє в об'єктив (а це відбувається у випадку, коли геометричні розміри зразка менше, ніж $\lambda/2$), то зображення зразка не відповідає його геометричній формі. Дуже малі зразки (наприклад, колоїдні частинки металів розміром біля $5 \cdot 10^{-6}$ мм) спостерігаються у вигляді блискучих «зірочок» на чорному фоні, які не дають уявлення про геометричну форму зразка.

Існують ще інші за конструкцією ультрамікроскопи, зокрема такі, в основі яких лежить явище рефракції – викривлення напряму розповсюдження світлових хвиль через оптичну неоднорідність, яка обумовлена відмінностями показника заломлення світла зразка і оточуючого середовища (див. підпункт 1.1.9.5). Рефракційні структури (зразок) вносять зміни не в амплітуду, а у фазу світлових хвиль, які ними розсіюються. Ті місця рефракційної структури, які дають більші зміни у фазі, можна зробити більш темними (або навпаки більш світлими). В цьому методі значно покращується контрастність зображення, тому він отримав назву *метод фазового*

контрасту, а мікроскопи, в яких застосовується цей метод, відповідно *фазово-контрастні мікроскопи*.

Фазовоконтрастна мікроскопія особливо популярна в біології, оскільки не вимагає попереднього забарвлення клітини, яке може її вбити.

1.1.4.7.3. Використання явищ дифракції та інтерференції світла для отримання голограм

Голографія (грецьк. *holos* – увесь, все та *grapho* – пишу) – спосіб запису і наступного відновлення розсіяної хвилі, який заснований на явищах інтерференції та дифракції світла.

На відміну від звичайної фотографії, де використовується лише амплітудна характеристика світлової хвилі, для отримання тривимірних оптичних копій об'єкта необхідно реєструвати не тільки амплітуду, але і фазу відбитої від об'єкта хвилі. Для цього крім об'єктної хвилі треба мати когерентну з нею хвилю, тобто таку, при складанні якої з об'єктною хвилею виникає явище інтерференції (див. підпункт 1.1.4.6). Когерентна хвиля у голографії називається *опорною*.

Принцип створення голограм вперше був сформульований Д. Габором у 1948 р. У простішому його варіанті розширене за допомогою систем лінз монохроматичне світло лазера (див. підпункти 1.1.4.8 і 1.1.5.5) спрямовується на об'єкт і дзеркало. Відбита від дзеркала хвиля (когерентна хвиля) і розсіяна об'єктом (об'єктна хвиля) потрапляють на фотопластинку, де відбувається реєстрація створеної інтерференційної картини. Оброблена спеціальним способом така фотопластинка називається *голограмою*.

За звичайної фотографії інформація про кожну точку об'єкта фіксується на окремій ділянці фотоносія, а інтерференційна картина в кожній точці голограми визначається світлом, який розсіяний всіма точками об'єкта. Саме тому з будь-якої ділянки голограми, яка містить інформацію в закодованому вигляді про весь об'єкт, можна відновити всю об'єктну хвилю.

Для відтворення тривимірного зображення об'єкта з інтерференційної картини, яка зареєстрована на голограмі, видобувають зображення наступним чином. Отриману (записану) голограму освітлюють спеціальним способом (перекривши частину світлового

поток) опорною хвилею за допомогою лазера, яка при дифракції на голограмі відновлює об'єктну хвилю, причому в дифракційній картині відновлюється як *уявне зображення*, що є точною копією об'єкта, так і *псевдоскопічне дійсне зображення*, яке має протилежний об'єкту рельєф.

Запис тривимірного кольорового зображення з можливістю відновлення голограми в білому світлі вперше провів у 1962 р. Ю.Н. Денисюк. Його голограми були записані на товстощарових фотоемульсіях, які подібні просторовим дифракційним ґраткам (див. підпункт 1.1.4.7.1): вони здатні виділяти з білого світла ті кольори, які були використані при отриманні голограм, а саме три основних кольори – червоний, зелений і синій.

Голограми ефективно використовуються як *голографічні оптичні елементи* (ГОЕ): лінзи, дифракційні ґратки, інтерференційні фільтри. Вони також здатні на малій ділянці записувати і зберігати великі об'єми інформації, одиниці якої не прив'язані до конкретних точок (пікселей матриці), що характерно для магнітних носіїв.

Метод *голографічної інтерметрометрії* забезпечує спостереження інтерференційних хвиль, які записані на голограму в різні моменти часу. Якщо між експозиціями стан об'єкта змінився, то в процесі відновлення голограми хвиль, які ідуть від об'єкта, будуть мати різницю фаз. Наслідком цього є покриття зображення об'єкта системою інтерференційних смуг, за формою яких можна робити висновки про характер змін об'єкта між моментами експозиції.

1.1.4.8. Поляризація світла

Ще одне широко застосоване в практиці оптичне явище – це поляризація світла. Як показано на рис. 1.1 (див. пункт 1.1.1), ЕМХ, в тому числі світлові хвилі, становлять собою змінне ЕМП, яке розповсюджується і в якому є одночасно два взаємно перпендикулярних напрямлення коливань напруженості електричного (E) та магнітного (H) полів. *Поляризація* (франц. *polarisation* – вісь, полюс) – це властивість ЕМХ, яка пов'язана з їх *анізотропією* (грецьк. *anisos* – нерівний та *tropos* – властивість), тобто неоднаковість орієнтації векторів E або H в площині, яка перпендикулярна напрямку поширення хвиль. У випадку монохроматичних хвиль (з однією певною довжиною хвиль чи частотою) вектори E і H , як відмічалось, *ортогональні* (грецьк.

orthogonios – утворюючі прямий кут, перпендикулярні). Це дозволяє обмежитися оглядом орієнтації тільки одного вектора E або H . Саме за вектором E зазвичай визначають поляризацію світла. Площина, в якій відбуваються коливання світлового вектора, називається *площиною поляризації*.

У поляризованого світла орієнтація світлового вектора у будь-якій точці простору з часом залишається незмінною або змінюється за певним законом. В залежності від характеру цих змін виділяють, як правило, *лінійну*, *циркулярну* та *еліптичну* поляризацію (описується відповідними формулами обертання вектора E).

Якщо направлення вектора E безладне, змінюється з плином часу (спостерігається, зокрема, в природному світлі), то площини поляризації різних світлових хвиль орієнтовані в просторі хаотично. Таке світло називається *неполяризованим* або *природним*. Але існують способи виділити з неполяризованого світлового пучка хвилі з переважною орієнтацією їх площин поляризації. Оптичні пристрої (прилади), які дозволяють це зробити, називаються *поляризаторами*. Як правило, це кристали або інші утворення, які володіють суттєвою анізотропією. Такі пристрої пропускають світло з орієнтацією вектора E , яка паралельна площині пропускання поляризатора, яку називають ще *площиною поляризатора*, але затримують (повністю чи частково) світло, у якого напрямок коливань вектора E перпендикулярний до цієї площини.

Слід зауважити, що світло, у якого є найбільш виражене направлення коливання вектора E , називається *частково поляризованим*. Його можна розглядати як суміш природного світла з поляризованим. *Ступінь поляризації* (P) частково поляризованого світла обчислюють за формулою:

$$P = \frac{I_{нов.}}{I_{нов.} + I_{пр.}},$$

де $I_{нов.}$ і $I_{пр.}$ – інтенсивність поляризованої і природної (неполяризованої) частки світла, відповідно.

Ступінь поляризації може змінюватися в межах $0 \leq P \leq 1$. Значення $P = 1$ відповідає повністю поляризованому світлу (з будь-яким типом поляризації), а $P = 0$ – природному світлу.

Визначена за наведеною вище формулою P не дозволяє встановити тип поляризації світлової хвилі. Тому на практиці використовується величина, яка називається *ступенем лінійної поляризації* (p), яку обчислюють за формулою:

$$p = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}},$$

де I_{max} і I_{min} – максимальне і мінімальне значення інтенсивності світла, відповідно, яке пройшло через поляризатор.

Якщо на поляризатор падає лінійно поляризоване світло амплітудою E_0 , а інтенсивність $I_0 \approx E_0$, то через прилад прийде світло з амплітудою:

$$E = E_0 \cos\varphi,$$

де φ – кут між площиною поляризації хвилі, яка падає, і площиною пропускання поляризатора (рис. 1.33).

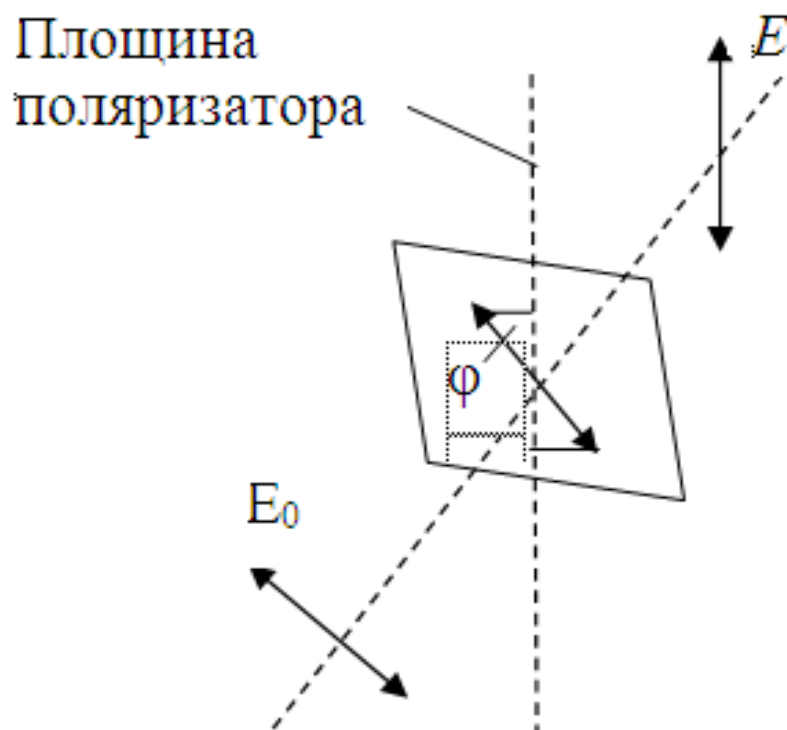


Рис. 1.33. Зсув площин поляризованого світла, яке падає на поляризатор

Інтенсивність світла, яке пройшло через поляризатор (I), обчислюється за формулою (закон Малюса):

$$I = I_0 \cos^2 \varphi.$$

У випадку, коли світло, що падає, неполяризоване, то в ньому присутні хвилі з будь-якою орієнтацією вектора напруженості ЕМП (тобто з будь-яким значенням φ). У цьому випадку для визначення інтенсивності світла, яке пройшло через поляризатор, необхідно у наведеній вище формулі провести усереднення за кутами φ .

Способи отримання поляризованого світла. Повністю поляризованим є монохроматичне випромінювання *лазерів* (LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation – підсилення світла в результаті змушеного випромінювання). Основною рисою лазерного випромінювання є когерентність світла, висока спрямованість та велика щільність потоку енергії. Також повністю поляризованим світлом може бути те, яке пройшло через поляризатор.

Відбиття і заломлення різнополяризованого світла на межі розділу двох *діелектриків* (грецьк. *dia* – через та англ. *electric* – електричний), речовин, які володіють дуже малою електропровідністю, з відмінними показниками заломлення відбувається по-різному. Це явище виникає внаслідок поперечності ЕМХ. Вихідно неполяризоване світло після відбиття або заломлення стає частково поляризованим.

Ступінь поляризації залежить від кута падіння світла на поляризатор. Коефіцієнт відбиття паралельної компоненти світла обертається в нуль, якщо відбитий промінь утворює із заломленим кут 90° . Кут падіння, за якого виникає цей ефект, називається *кутом Брюстера* (α_{Br}). Для цього випадка закон заломлення світла виражається наступним чином (див. також рис. 1.18):

$$n_1 \sin \alpha_{Br} = n_2 \sin \left(\frac{\pi}{2} - \alpha_{Br} \right),$$

і таким чином:

$$\operatorname{tg} \alpha_{Br} = \frac{n_1}{n_2}.$$

При падінні світла під кутом Брюстера відбите світло повністю поляризоване в площині, яка перпендикулярна площині падіння, а заломлене – частково, але максимально поляризоване в площині падіння світла (рис. 1.34).

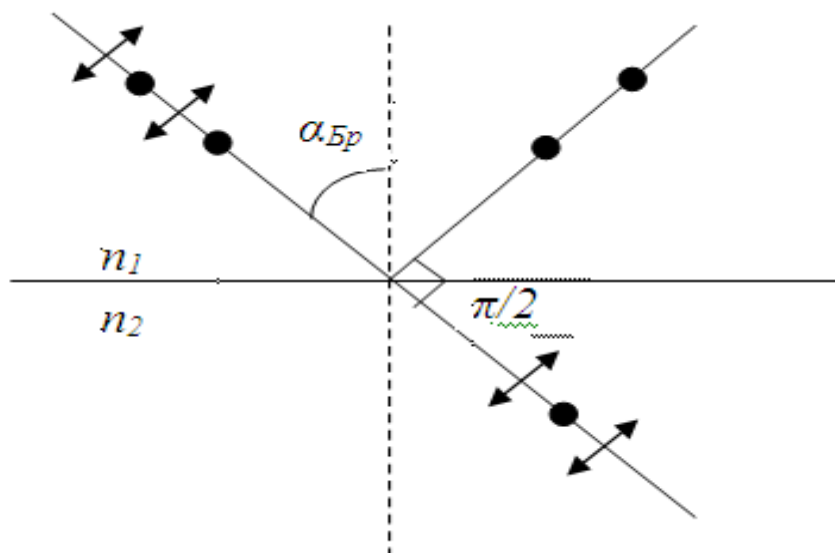


Рис. 1.34. Поляризація світла, яке падає під кутом Брюстера (α_{Br})

Ступінь поляризації заломленого світла можна значно збільшити за допомогою *стопи Столетова* – набору тонких плоско-паралельних пластинок, на кожен з яких світло падає під кутом Брюстера. Для практично повної поляризації (ступінь поляризації $P = 0,99$) світла достатньо 15 пластинок.

Той факт, що світло, яке відбите від межі діелектриків, хоча би частково поляризоване, дозволяє суттєво знизити інтенсивність відбитого світла (бліки), шляхом нанесення на межу розділу поляроїдної плівки, яка поглинає світло, коливання вектора E у якого спрямоване вздовж межі. Антиблікові покриття наносять на екрани комп'ютерних моніторів, автомобільні фари, окуляри та ін.

Поляризація світла відбувається також при подвійному променевому заломленні – розщепленні світлової хвилі в анізотропному середовищі на дві ортогонально поляризованих хвилі, які розповсюджуються в різних напрямках і з різною швидкістю.

Для одновісних кристалів (мають одне напрямлення, вздовж якого світло з будь-яким спрямуванням світлового вектора розповсюджується з однією і тією ж швидкістю) відносяться ісланд-

ський шпат, турмалін, кварц. Це направлення називається *оптичною віссю кристала*. Двовісні кристали (слюда, гіпс) мають два таких направлення.

Крім ефекту подвійного променевого заломлення деякі анізотропні середовища володіють здатністю обертати площину поляризації поляризованого світла, яке проходить вздовж оптичної вісі. Це явище називається *природною оптичною активністю*. До оптично активних речовин відносяться кристали, які здатні до явища подвійного променевого заломлення (ісландський шпат (CaCO_3), кварц, кіновар та ін.), ряд кристалічних органічних речовин (цукор, камфора та ін.), суміші органічних речовин (нафта, меляса та ін.), розчини оптично активних речовин в неактивних розчинниках (камфора в бензолі, водні розчини цукру, глюкози, винної кислоти та ін.).

Обертання площини поляризації можливе і за дії магнітного поля. Так, при розташуванні оптично неактивної речовини в поздовжнє магнітне поле виникає *ефект магнітного обертання площини поляризації*.

Застосовується явище обертання площини поляризації в пристроях, які призначаються для визначення кута обертання площини поляризації, їх називають, що вже відмічалось, *поляриметрами*. Наприклад, за допомогою поляриметрів визначають вміст сахарози у біологічних зразках (лаб. робота 14). Сучасні поляриметри мають чутливість до 10^{-12} г речовини і вони майже в 10^4 рази більш чутливі, ніж найчутливіші інтерферометри.

Оптична активність застосовується для дослідження особливостей будови речовини, визначення просторової структури молекул і біополімерів, кристалів (у т. ч. рідких) тощо. Природна оптична активність є зручним способом ідентифікації ізомерів.

Явище обертання площини поляризації лежить в основі метода визначення оптично активних речовин в розчинах, наприклад, цукру у водному розчині, крові і сечі. Поляриметри, які використовуються для цієї цілі, називаються *цукрометрами*.

Магнітне обертання площини поляризації застосовується для дослідження магнітних властивостей і структури атомів тощо.

Ефект обертання площини поляризації використовується ще в багатьох дослідженнях, а також з практичною ціллю. Так, його застосовують для модуляції світла, створення оптичних засувів, вентилів, квантових гідроскопів.

1.1.5. Основні пристрої спектрофотометрів у видимій та ультрафіолетовій областях спектра

Основні пристрої спектрофотометрів – джерела світла, конденсори, щілини, кювети, монохроматори, фотометри, реєстратори. Суттєвим моментом є оцінка чутливості, точності та роздільної здатності спектрофотометрів. Розглянемо це більш детально.

1.1.5.1. Джерела світла

Джерела світла слугують для отримання випромінювання з певним для даної речовини спектром. Їх характеристика у значній мірі визначає характеристику всього спектрального аналізу.

В спектрофотометрах, як правило, джерелом випромінювання у видимій і УФ-областях спектру є *газорозрядні джерела*.

У звичайних умовах повітря та інші гази є добрими ізоляторами. Якщо в газове середовище ввести два електроди таким чином, що між ними залишається невеликий повітряний проміжок, і підключити їх до джерела електричної напруги, то електричний ланцюг буде розірваним. Але коли у газовому проміжку з'являться заряджені частинки (іони і електрони), то під дією прикладеного електричного поля вони почнуть рухатися до відповідних електродів, виникає електричний струм, який супроводжується виникненням так званого *несамостійного розряду*, який існує доти, поки діє чинник, що спричинює іонізацію газу (наприклад, іонізуюче випромінювання).

При достатньо високій електричній напрузі між електродами виникає *самостійний розряд*. Під дією електричного поля відбувається іонізація атомів і молекул. Виниклі первинні іони і електрони набувають значної кінетичної енергії, яка передається атомам і молекулам, що викликає їх іонізацію і появу вторинних іонів і електронів, які здатні теж спричинити іонізацію і т. д. Наслідок цього – *безперервний розряд*, який сам підтримує себе і не потребує зовнішніх джерел іонізації.

Виниклі газові розряди спричинюють збудження атомів і молекул газового середовища, що супроводжується появою відповідного спектру випромінювання.

Для виникнення газового розряду необхідно до електродів прикласти високу електричну напругу. Для пробивання повітряного

проміжку в декілька міліметрів необхідна напруга біля 10 кВ. Пробивання полегшується у тих випадках, коли у газовому проміжку вже є заряджені частинки. Так, якщо кінці електродів розігріті і з них внаслідок *термоелектронної емісії* (лат. *emissio* – випускати, випромінювати) вилітають електрони, то для пробивання такого проміжку достатньо напруги біля 100 В.

Дуговий розряд. Різні типи газового розряду при атмосферному тиску розрізняються за своїми характеристиками. Так, дуговий розряд має відносно низьку температуру – від 3 500 °С до 8 000 °С. Він протікає при невеликій електричній напрузі на електродах (25–80 В) і струмі від одиниці до десятків ампер (А). Для нього характерний тривалий розряд при незмінних електричних параметрах.

Структура дугового розряду показана на рис. 1.35. Найбільшу температуру іонізований газ має в центральній частині, де досягається велика щільність електричного струму.

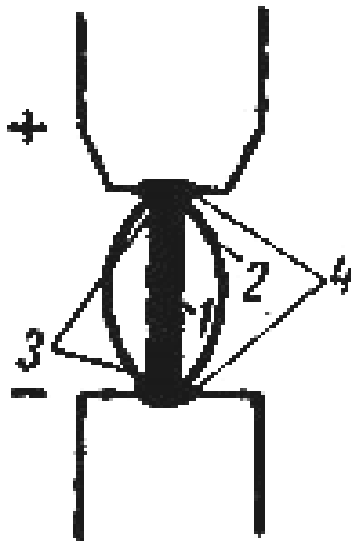


Рис. 1.35. Структура дугового розряду

П р и м і т к а: 1 – центральна область розряду; 2 – область охолоджених парів; 3 – гарячі плями на електродах; 4 – шар розплаву.

Інтенсивність спектральних ліній досягається найбільшою в різних частинах дуги в залежності від потенціалу їх збудження і іонізації (рис. 1.36). Біля катода (від’ємно зарядженого електрода)

звичайно спостерігається підвищена концентрація іонів, що приводить до посилення інтенсивності спектральних ліній. Центральна частина газового розряду оточена більш холодною областю, температура якої по мірі віддалення від центра знижується аж до кімнатної. Пари речовини електродів, які потрапляють з центральної частини газового розряду, холонуть, що може викликати самообернення деяких спектральних ліній.

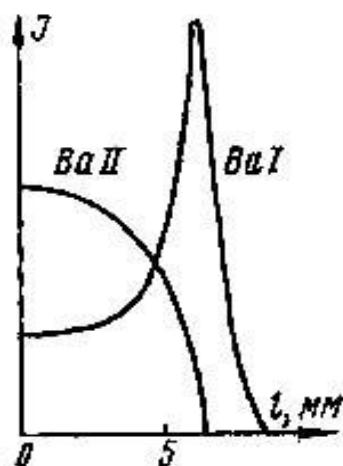


Рис. 1.36. Інтенсивність (I) дугової (BaI) та іскрової (BaII) лінії Барію (Ba) при переході від центру розряду до краю (l – відстань від центру розряду)

Кінці електродів дуже розігріті, особливо високу температуру мають місця, на які «опирається» розряд. Вони внаслідок бомбардування іонами і електронами розігріваються і мають вигляд розпечених плям. Температура більш гарячої анодної плями, яка утворюється внаслідок ударів електронів, досягає $4\ 000\ ^\circ\text{C}$, і речовини електродів випаровуються та потрапляють до газового розряду.

Електроди для дугового розряду звичайно розміщують вертикально. Це приводить до того, що газ, який їх оточує, вздовж осі розряду не порушує горіння дуги. В той же час при горизонтальному встановленню електродів потік газу відхиляє розряд вгору і форма розряду стає несиметричною.

Найбільш інтенсивні спектральні лінії, які збуджуються при дуговому розряді, розміщені у видимій області спектра (380–750 нм), а також в ближній (320–400 нм) і середній (280–320 нм) УФ-областях спектра.

Іскровий розряд. Збільшити температуру розряду (а значить і збуджуючу здатність газового середовища) без підвищення потужності джерела живлення можна, якщо від безперервного розряду перейти до окремих короточасних розрядів. Кожний раз розряд відбувається при значних значеннях електричної напруги і струму, але час його існування дуже малий і середня потужність мала. Такий тип розряду називається *іскровим розрядом*.

Структура іскрового розряду наведена на рис. 1.37.

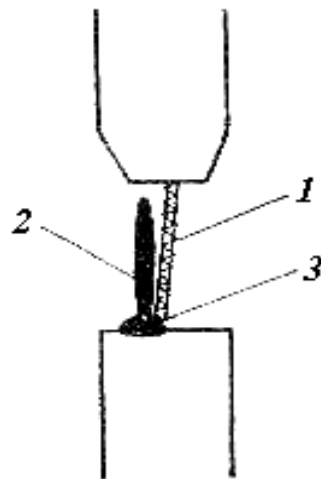


Рис. 1.37. Структура іскрового розряду

Примітка: 1 – канал іскри; 2 – факел; 3 – місце, звідки відбувається випарювання речовини електрода.

При кожному пробі газного середовища спочатку утворюється вузький канал, в який майже не потрапляє речовина електродів. Температура середовища в каналі – десятки тисяч градусів. Якщо газове середовище становить собою повітря, то спектр свічення, в основному, складається з ліній Нітрогену і Оксигену, а також інтенсивного суцільного фону. В наступний момент невелика ділянка поверхні електрода, на яку «опирається» розряд, швидко нагрівається до дуже високої температури, яка не встигає розповсюдитися на сусідні ділянки. У місці розігріву електрода виникає факел, спрямування якого може не співпадати з направленням каналу іскри. Яскравість факелу значно більша, ніж каналу. Температура факела приблизно 10 000 °С. Випромінювання факела складається, головним чином, з спектральних ліній речовини електрода. До моменту наступного розряду гарячі ділянки на поверхні електрода охолоджуються і пробивання проміжку відбувається, як правило, на новому місці.

Для виникнення іскри використовують попереднє накопичення електричного заряду на конденсаторі. Кількість електрики Q (в кулонах), яка накопичена в конденсаторі, визначається його ємкістю C (в фарадах) і електричною напругою на обкладках U (у вольтах):

$$Q = CU.$$

Для накопичення електрики в кількості Q необхідно заряджати конденсатор протягом часу t (в секундах):

$$Q = It,$$

де I – електричний струм (в амперах).

Миттєвий електричний струм іскри досягає великих значень, оскільки тривалість розряду дуже мала.

Іскровий розряд використовують, в основному, для аналізу важкозбуджуваних хімічних елементів, їх кількісного визначення.

Газовий розряд при низькому тиску. Для аналізу суміші газів, а також у деяких інших випадках застосовують як джерело світла газовий розряд при низькому тиску – від 0,1 до декількох десятків міліметрів ртутного стовпа.

При низькому тиску число співударів між частинками в газі різко зменшується. Це призводить до того, що електрони набувають в електричному полі велику кінетичну енергію, оскільки відносно рідко зустрічаються з частинками і передають їм, зокрема при пружному зіткненні, тільки незначну кількість енергії, оскільки середня кінетична енергія важких частинок значно менша, ніж електронів.

В той же час, завдяки великій кінетичній енергії електронів непружні співударяння ведуть до збудження атомів і молекул газового середовища з великою ефективністю. Таким чином, при низькому тиску незважаючи на невисоку температуру газу в розряді, відбувається збудження рівнів, які мають відносно високий потенціал збудження.

Газовий розряд при низькому тиску здійснюють у спеціальних розрядних трубках, які виготовляють із скла або кварцу з впаяними електродами. Для того, щоби виникнув розряд при низькому тиску, до електродів необхідно прикласти електричну напругу 300–800 В, іноді вище.

При живленні газорозрядної трубки постійним електричним струмом або при подачі на електроди електричної напруги високої частоти (10^6 Гц і більше) виникає *тліючий розряд*. Використовують, як правило, порожнисті катоди – це трубки, в яких катод виконаний у вигляді порожнистого циліндра. Це дозволяє аналізувати не тільки газові суміші, але і тверді проби. Пари речовини, які потрапляють всередину порожнистого катоду, знаходяться там протягом тривалого часу, за який встигають багаторазово збуджуватися і випромінювати світло. Трубки з порожнистим катодом широко використовуються при атомно-абсорбційному аналізі.

Найпоширеніші джерела світла в спектрофотометрах. У сучасних спектрофотометрах, в залежності від мети і завдань дослідження, використовуються найрізноманітніші джерела світла. У видимій області спектра звичайно застосовують *лампи розжарювання* з вольфрамовою ниткою, яка за рахунок електричного струму нагрівається до температури приблизно 3 000 °С. Лампи розжарювання дають інтенсивне випромінювання у всій видимій і ближній ультрафіолетовій (довжина хвилі до 340 нм) області, а також у ближній інфрачервоній (до 2 мкм) області. Спектр випромінювання ламп розжарювання, зокрема, вольфрамових, обмежуються скляною колбою лампи.

Все ж таки найчастіше застосовуються газорозрядні джерела світла. До них належать *водневі лампи*, які випромінюють суцільний спектр, що починається у видимій області (довжина хвилі біля 590 нм) і продовжується в УФ-області (до 165 нм).

Воднева лампа (рис. 1.38) має скляний балон з віконцем з спеціального скла *увіоля*, яке при тонкому шарі пропускає УФ-випромінювання до 210 нм.

Слід зауважити, що будь-які закриті джерела світла для УФ-випромінювання мають колби або віконця з кварцу або увіолю.

Суттєвий недолік водневих ламп випромінювання – їх мала потужність. Тому частіше використовують *дейтерієві лампи*, які ефективніші, ніж водневі, в області спектра 250–290 нм.

Газорозрядні лампи надвисокого тиску заповнені інертним газом (як правило, ксеноном або криптоном), які при виникненні дугового розряду дають інтенсивний, майже рівномірний суцільний спектр, що близький до випромінювання Сонця у видимій і близькій УФ-області. Все ж таки в УФ-області краще використо-

вувати газорозрядні лампи, які заповнені спеціальними газовими сумішами.

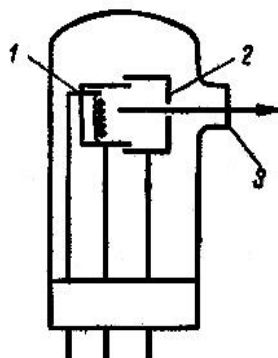


Рис. 1.38. Воднева лампа

П р и м і т к а: 1 – катод, який підігрівається за рахунок проходження електричного струму; 2 – анод; 3 – увіюльне віконце.

Крім джерел світла суцільного спектра випромінювання, в спектрометрії широко використовуються газорозрядні пристрої з лінійчатим спектром випромінювання – для отримання спектрів поглинання досліджуваної речовини, а також для перевірки градування (лат. *gradus* – крок, сходинка), тобто відповідності шкали довжин хвиль спектрофотометрів. Звичайно застосовують ртутні лампи з кварцовою колбою для видимої та УФ-областей спектра, або неонові лампи для видимої області з скляною колбою.

1.1.5.2. Способи освітлення щілини

Щілина спектрального приладу освітлюється джерелом світла. Вибір способу освітлення залежить від розмірів джерела світла, параметрів спектрального приладу і поставлених задач досліджень. Щілину спектрального приладу необхідно освітлювати так, щоби повністю світло потрапило в *коліматор* (лат. *collineare* – направляти по прямій лінії) – оптичну систему для отримання пучка паралельних променів. Тільки у цьому випадку використовується вся світлосила спектрального приладу. Для кількісного аналізу необхідно, щоби освітлення щілини було рівномірним та інтенсивність кожної спектральної лінії залишалася постійною. Для

освітлення щілини використовують випромінювання всього джерела світла або певної його ділянки.

Освітлення щілини без конденсорів. Найпростіший спосіб безпосереднього освітлення щілини джерелом світла без використання *конденсорів* (лат. *condensare* – згущати) – світлозберезувальних лінз або дзеркал, які використовуються для концентрації світлового потоку і рівномірного освітлення об'єкта. У цьому випадку світло від кожної точки джерела освітлює рівномірно всі точки щілини.

Ширина щілини значно менша її висоти, тому при розгляді питання заповнення світлом оптичної системи спектрального приладу необхідно розглядати розповсюдження світла в горизонтальному і вертикальному перетинах.

У горизонтальному перетині (рис. 1.39 а) для того, щоб був повністю заповнений коліматор світлом (його об'єктив), необхідно встановити джерело світла на такій відстані l від щілини, щоби виконувалася умова:

$$\frac{q}{l} = \frac{d}{f},$$

де позначення див. рис. 1.39 а.

Звідси відстань l обчислюється за формулою:

$$l = q \frac{d}{f}$$

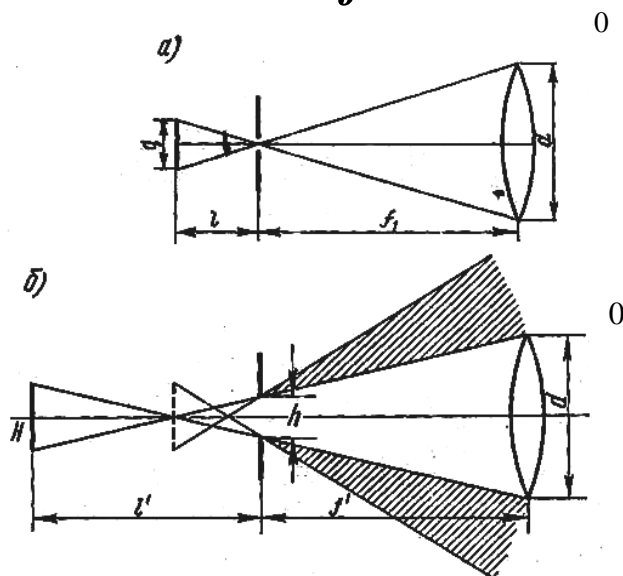


Рис. 1.39. Освітлення щілини спектрального приладу без конденсорів (пояснення див. текст)

П р и м і т к а: а – хід променів у горизонтальному перетині; б – хід променів у вертикальному перетині; О – об’єктив коліматора.

Якщо наблизити джерело світла на відстань, яка менше за визначене значення l , то частина світла буде попадати на стінки об’єктива коліматора, не потрапляючи в нього. При використанні за розмірами джерел світла (наприклад, дуги чи іскри) їх доводиться розміщувати надто близько до щілини, але це приводить до виникнення дифракції на щілині, що спричинює розширення світлового пучка в об’єктиві коліматора. Тому джерело світла у цьому випадку розміщують, як правило, далі, ніж це виходить з наведеної вище формули. В той же час віддалення джерела світла від щілини призводить до того, що її освітленість зменшується і кількість світла, яка потрапляє до спектрального приладу зменшується. Крім того, у цьому випадку об’єктив коліматора заповнюється світлом тільки частково і його можливості використовуються неповністю. Використання джерел світла великих розмірів (розрядні трубки, полум’я) дозволяє повністю заповнити світлом об’єктив коліматора.

При розгляді ходу променів у вертикальному перерізі (рис. 1.39 б) необхідно враховувати висоту щілини. Якщо встановити джерело світла приблизно на відстань l , то частина променів, яка іде від краю джерела світла, може не потрапити в об’єктив коліматора. Це призводить до того, що кінцеві спектральні лінії менш інтенсивні, ніж центральні, незважаючи на те, що щілина була освітлена рівномірно. Таке явище називається *він’єтируванням* (фр. *vignette* – звуження, зрізання).

Для усунення він’єтирування джерело світла необхідно розмістити на відстані l' , яка залежить від висоти джерела світла H і висоти щілини h (рис. 1.39 б):

$$l' = f_1' \frac{H+h}{d-h}.$$

Джерело світла, яке розміщене на відстані l' , забезпечує заповнення світлом об’єктива коліматора у вертикальному перерізі.

Слід враховувати, що при пересуванні джерела світла від щілини він’єтирування одночасно зменшується освітленість, оскільки в горизонтальному перерізі об’єктив коліматора не заповнюється світлом за рахунок дифракції при роботі з вузькими щілинами.

Освітлення щілини з конденсорами. Застосування конденсорів дозволяє більш повно використовувати світлосилу спектрально-го приладу в тих випадках, коли з одним джерелом світла не вдається заповнити весь об'єктив коліматора.

При роботі у видимій області спектра використовують, як правило, *ахроматичні* (грецьк. *achromatos* – безбарвний, незабарвлений) конденсори, які склеєні з двох скляних лінз. В УФ- (можна і у видимій) області спектра використовують ахроматичні конденсори, які створені з кварцу і флюориту або інших матеріалів, які застосовуються у зазначеній області спектра.

Конденсор звичайно розміщують так, щоби отримати від щілини максимальний потік світла, при цьому кожна точка джерела світла освітлює тільки одну точку щілини. Це дозволяє освітлювати щілину певною ділянкою джерела світла, в межах якої яскравість джерела світла змінюється незначно.

При використанні одного конденсора можливе нерівномірне освітлення щілини і труднощі щодо одночасного заповнення світлом об'єктива коліматора в горизонтальному і вертикальному перерізах. Останній недолік можна усунути, якщо перед щілиною розмістити другий конденсор, який проектує зображення першого на об'єктив коліматора (рис. 1.40).

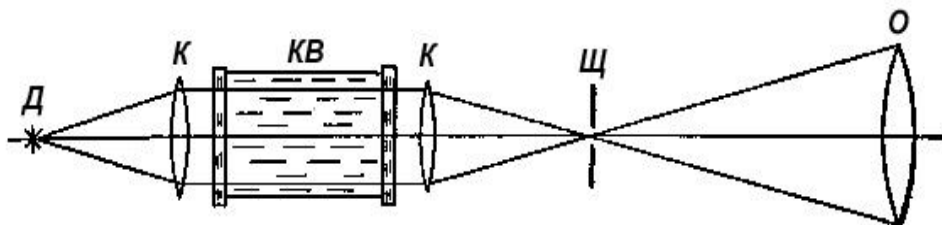


Рис. 1.40. Освітлення щілини за допомогою двох конденсорів
П р и м і т к а: Д – джерело світла; К – конденсори; КВ – кювета; Щ – щілина; О – об'єктив коліматора.

Рівномірне освітлення щілини і використання випромінювання тільки потрібної ділянки джерела світла (при його великих розмірах) найкраще досягається при використанні трьохлінзового конденсора. Перший конденсор будує зображення джерела світла на екрані, який розміщений перед другим конденсором. У цьому екрані міститься набір отворів різної висоти, які дозволяють обрати потрібну ділянку джерела світла за довжиною хвилі і регулювати

потік інтенсивності пучка світла. Другий конденсор розміщується так, щоби він проектував зображення першого конденсора на щілину у вигляді круглої плями. Так як перший конденсор освітлений рівномірно, то і щілина буде освітлена рівномірно. Третій конденсор усуває він'єстикування. Він проектує збільшене зображення другого конденсора на об'єктив коліматора.

У випадку, коли пучок світла, який виникає в його джерелі, може переміщатися (нерівномірне переміщення розряду і невеликі помилки при розміщенні електродів у газорозрядних приладах), тоді може виникати явище зміщення пучка світла. Це впливає на відносну і абсолютну інтенсивність спектральних ліній. Такі похибки можна усунути при використанні *растрового конденсора*.

Прості растрові конденсори становлять собою плоскоопуклу лінзу, на плоскій стороні якої розміщений *растр* (лат. *rastrum* – граблі) – багато невеличких лінзочок. Завдяки цьому отримується значна кількість невеликих зображень джерела світла. Це зображення звичайним конденсором проектується на об'єктив коліматора. При переміщенні джерела світла відбуваються невеликі зміщення кожного зменшеного зображення. Це дозволяє отримати рівномірне і постійне у часі освітлення щілини.

1.1.5.3. Спектральна ширина щілини

Важливим параметром спектральних приладів є *спектральна ширина щілини* (S) – діапазон довжин світлових хвиль, які потрапляють в монохроматор (вхідна щілина) і які виходять із нього та потрапляють на зразок (вихідна щілина).

Спектральні лінії мають певну ширину – тим більшу, чим ширше щілина. Одна спектральна лінія при роботі з широкою щілиною займає в фокальній поверхні (див. рис. 1.26) ділянку, на якій при вузькій щілині можуть розміститися лінії з довжиною хвилі від λ_1 до λ_2 . В цьому випадку спектральну ширину щілини (S) можна визначити як $S = \Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$. Чим ширша щілина, тим більша її спектральна ширина $\Delta\lambda$. Водночас, геометричну ширину лінії (S_T) можна розрахувати за формулою:

$$S_T = ga,$$

де $g = f_2/f_1$ (f_1 і f_2 – відповідні фокусні відстані об'єктивів до монохроматора і після нього); a – ширина щілини (рис. 1.41).

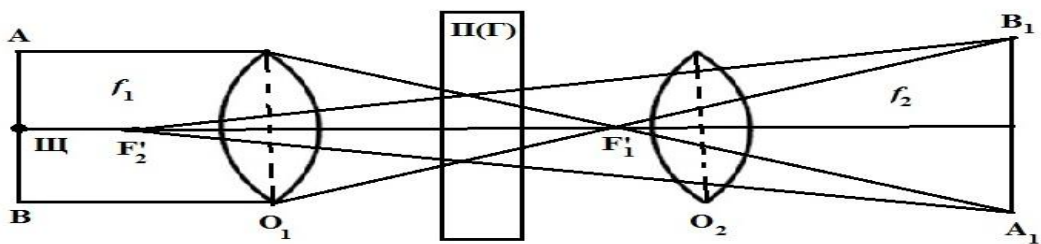


Рис. 1.41. Схематичне представлення фокусних відстаней f_1 і f_2 при визначенні збільшення розміру зображення

П р и м і т к а: AB – розмір об’єкта; A_1B_1 – розмір зображення; Щ – щілина; O_1 і O_2 – об’єктиви; F_1' і F_2' – передні і задні фокуси об’єктивів; $П(Г)$ – призма (гратка).

Різниця (Δl) між близькими лініями в спектрі при визначеному значенні лінійної дисперсії (див. підрозділ 1.4.3) обчислюється за формулою:

$$\Delta l = \frac{dl}{d\lambda} \Delta \lambda.$$

З урахуванням цього, а також того, що $\Delta l = S_r$, залежність спектральної ширини щілини від її геометричної ширини та параметрів спектрального приладу виражається рівнянням:

$$\Delta \lambda = S_r \frac{d\lambda}{dl} = ga \frac{d\lambda}{dl}.$$

Якщо замість довжини хвилі λ використовувати хвильове число ω (див. пункт 1.1.1), тоді спектральну ширину щілини також можна виразити через $\Delta \omega$:

$$\Delta \omega = \frac{ga}{\lambda} \cdot \frac{\Delta \lambda}{\lambda}$$

При роботі з вузькими щілинами результат, який отриманий за наведеними вище формулами, виявляється дещо заниженим, оскільки він не враховує збільшення ширини лінії у спектральних приладах внаслідок дифракції та інших причин.

Паралельний пучок світла, який відповідає одній спектральній лінії, розходить по осі внаслідок дифракції на вузькій щілині під кутом φ_0 , для якого:

$$\sin \varphi_0 = \frac{\lambda}{d},$$

де d – ширина щілини (діючий отвір).

Оскільки кут дифракції надзвичайно малий, то $\sin \varphi_0 \approx \varphi_0$ і

тоді:

$$\varphi_0 = \frac{\lambda}{d}.$$

Дифракційна ширина лінії (S_D) в фокальній поверхні (див. рис. 1.26 і рис. 1.41) виражається рівнянням:

$$S_D = \varphi_0 f_2 = \frac{\lambda}{d} f_2.$$

Вирахуємо так звану *нормальну дифракційну ширину щілини* (d_n), при якій геометрична і дифракційна ширина ліній рівні між собою, тобто:

$$g d_n = \frac{\lambda}{d} \cdot f_2.$$

Звідси:

$$d_n = \frac{\lambda}{d} \cdot \frac{f_2}{g}.$$

Оскільки

$$g = \frac{f_2}{f_1},$$

тоді

$$d_n = \lambda \frac{f_1}{d}.$$

При ширині щілини більше, ніж d_n , загальна ширина лінії визначається, в основному, шириною щілини. При ширині щілини менше d_n , основний внесок в ширину лінії вносить дифракція.

1.1.5.4. Кювети

Кювети (фр. *cuvette* – чан, тазик) – це посудини, які виготовляють із оптично прозорого матеріалу для певного діапазону довжин хвиль і в які заливають розчин досліджуваної речовини. Для роботи у видимій області спектра використовують кювети зі скла, у близькій УФ-області – з кварцу (кварц починає поглинати світло з

довжиною хвилі менше 190 нм), у далекій УФ-області – як правило, з літію фтористого (починає поглинати світло з довжиною хвилі менше 110 нм). За допомогою спектрофотометричного аналізу можна визначати якісно і кількісно наявність протеїну і нуклеїнових кислот у нуклеопротеїдах.

При роботі з хімічно активними речовинами або такими, що випаровуються, кювети закривають кришкою чи корком. Для безперевного аналізу розчинів, котрі, наприклад, витікають із колонок хроматографа (приладу, який розділяє суміші), використовують спеціальні проточні кювети.

Для визначення поглинання світла (екстинкцію) досліджуваною речовиною використовують, як вже відмічалось (див. підпункт 1.1.4.4), додатково *порівняльну кювету (контрольну)*, яка ідентична кюветі зі зразком і містить такий же розчин, як робоча кювета, за виключенням досліджуваної речовини.

Розчини, які заливаються в кювети, повинні бути гомогенними, некаламутними, не містити бульбашок повітря, які дуже посилюють розсіювання. Не дозволяється наливати в кювети сильно охолоджені розчини, оскільки в цьому випадку на зовнішньому боці стінок кювет буде конденсуватися пара води з повітря, і стінки кювети стануть малопрозорими.

Забруднення стінок кювет, подряпини на них тощо сприяють розсіюванню і поглинанню світла, що приводить до викривлення результатів дослідження. Зважаючи на це, кювети треба брати руками тільки за ребра.

Для роботи, як правило, використовують кювети з оптичним шляхом 1 см (поперечний переріз становить собою квадрат з довжиною бокової стінки 1 см). Такі кювети, які мають висоту 5 см, вміщують до 5 см³ розчину. Звичайно в них заливають 2,5–3,0 см³, але так, щоби все світло, яке направляється на кювету, точно потрапило на неї і пройшло розчин, але при цьому використовувався мінімально можливий об'єм досліджуваного розчину. В той же час для роботи з розбавленими розчинами або малочутливими спектральними приладами застосовуються кювети, які мають оптичний шлях 2, 3, 4 і навіть 5 см. В цьому випадку їх переріз має вигляд прямокутника, одна сторона якого має довжину 1 см, а інша, через яку проходить світло (оптичний шлях) – 2, 3, 4 або 5 см. Разом з тим при роботі з високочутливими спектральними приладами можуть використовуватися мікрокювети, для яких достатньо 0,01–

0,05 см³ розчину проби, що аналізується, при оптичному шляху 0,2–0,5 мм, що дозволяє не тільки зменшити кількість реактивів, які використовуються, і досліджуваної речовини, але суттєво зменшити розсіювання світла розчином кювети.

У спектрофотометрах кювети розміщуються в кюветотримачі, який має 2 чи 4 комірки. Кювети виготовляються з крихкого матеріалу, тому додавати в них розчини краще тоді, коли вони вставлені у витягнутий з приладу кюветотримач і при цьому не торкатися стінок піпеткою, за допомогою якої додається досліджуваний розчин у кювету.

1.1.5.5. Виділення монохроматичного світла

При фотоелектричному методі реєстрації світла для вимірювання інтенсивності спектральної лінії або смуги необхідно виділити випромінювання відповідної ланки спектра.

Виділення *монохроматичного* (грецьк. *monos* – один, єдиний та *chroma* – колір) пучка світла, тобто світла однієї довжини хвилі, як правило, проводять шляхом розкладання *поліхроматичних* (грецьк. *poly* – багато) світлових пучків за довжинами хвиль. Це явище широко застосовується в методі, який отримав назву *спектрофотометричного аналізу* – визначення властивостей і складу речовин, їх кількості за спектрами поглинання чи випромінювання.

Для монохроматизації світла використовуються явища: дифракції, дисперсії, поглинання, відбиття, заломлення та інтерференції світла.

Дифракція світла лежить в основі дії такого монохроматичного пристрою, про що вже йшла мова, як дифракційна ґратка (див. рис. 1.31 та пояснення до нього). Розкладання поліхроматичного (білого) світла за допомогою дифракційної ґратки наведено на рис. 1.42.

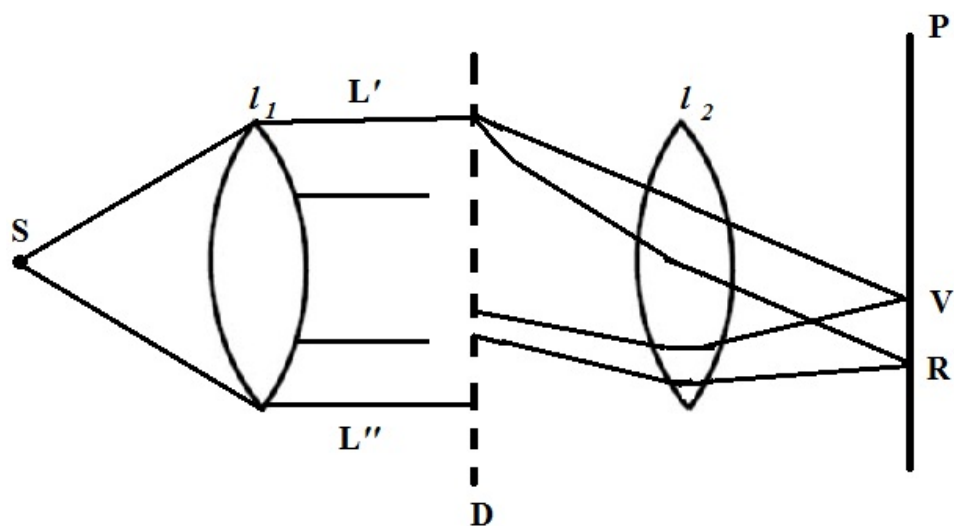


Рис. 1.42. Ілюстрація до розподілення по довжинах хвиль поліхроматичного пучка світла за допомогою дифракційної ґратки (пояснення див. текст)

Дифракційна ґратка (D) – це тонка полірована пластинка з непрозорого матеріалу (див. пункт 1.1.4.7.1), яка містить дуже велику кількість (в залежності від діапазону використовуваних довжин хвиль) від 1 200 до 3 600 на 1 мм і навіть до десятків та сотень тисяч взаємопаралельних щілин (штрихів). У випадку пропускаючої дифракційної ґратки (рис. 1.42) поліхроматичний пучок світла, який розходить від джерела S, що знаходиться на фокусній відстані від лінзи l_1 на її головній оптичній вісі, падає на цю лінзу. З неї він паралельним пучком, який обмежений межовими променями L' і L'' , потрапляє на дифракційну ґратку. Після проходження ними її (щілин $\alpha_1, \alpha_2 \dots \alpha_n$) найбільше відхилення від першопочаткового напрямлення розповсюдження світла відбувається в результаті дифракції променів червоного (R) діапазону довжин хвиль у порівнянні з фіолетовим (V). При потраплянні на лінзу l_2 вони фокусуються в її фокальній площині на екрані P, де точки R і V знаходяться на деякій відстані одна від одної. Таким чином, світло різної довжини хвилі (частоти) просторово розділені.

Подібна картина, тобто виділення хвиль певної довжини, спостерігається і у випадку проходження світла крізь тригранну призму, яка виготовлена з оптично прозорого матеріалу (рис. 1.43, також див. рис 1.22).

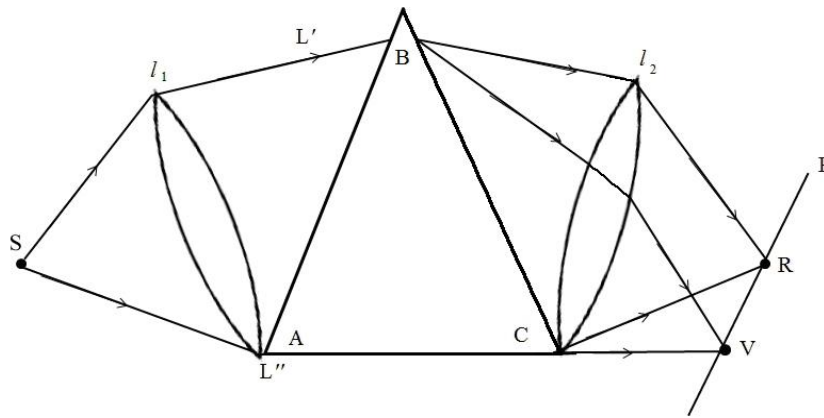


Рис. 1.43. Розкладання поліхроматичного пучка світла по довжинах хвиль тригранною призмою (пояснення див. текст)

В цьому випадку поліхроматичний пучок світла від джерела світла S , який знаходиться в фокусі лінзи l_1 на її головній осі, проходить крізь цю лінзу і потрапляє паралельним пучком $L' \dots L''$ на призму ABC (її грань AB). При заломленні в призмі він виходить з неї пучками світла різної довжини хвиль. Ці пучки фокусуються лінзою l_2 в її фокальній площині на екрані P в просторово розділених точках. У відповідності з законами дисперсії більше відхилення від першопочаткового напрямлення розповсюдження світла відбувається для фіолетового діапазону хвиль (V) у порівнянні з червоним (R). В цьому полягає відмінність дисперсійного способу розділення поліхроматичних потоків світла за довжинами хвиль від дифракційного.

Слід зауважити, що як дифракційна ґратка, так і тригранні призми дають високу ступінь монохроматизації світла. Водночас інтенсивність пучка монохроматичного світла при цьому мала. Більшої інтенсивності монохроматичні потоки світла можна отримати, якщо використовувати такі монохроматизуючі пристрої, як *світлофільтри*, хоча вони мають меншу роздільну здатність, ніж призми і тим паче дифракційні ґратки.

Будь-яке кольорове прозоре тіло, наприклад, кольорове скло, є світлофільтром, оскільки воно пропускає світло тільки певної ділянки спектра.

В основі дії світлофільтрів лежить явище поглинання/пропускання, поглинання/відбиття або інтерференції світла. Світлофільтри на основі явища поглинання/пропускання світла

дають світловий потік, який складається з потоків світла тих довжин хвиль, які не були поглинуті речовиною світлофільтра і пройшли крізь нього. Якщо мати набір таких світлофільтрів, то можна отримати дуже вузьку смугу пропускання.

Світлофільтри використовуються й у фотоколориметричному методі, який ґрунтується на вимірюванні поглинання немонохроматичного світла, що проходить крізь забарвлений досліджуваний розчин. Немонохроматичне випромінювання з вузьким діапазоном довжин хвиль одержують за допомогою світлофільтрів. Інтенсивність світла, що пройшло крізь досліджуваний розчин, вимірюється за величиною електричного струму, який виникає у фотоелементі. Шкала індикатора градуйована у величинах оптичної щільності D та у величинах коефіцієнта світлопропускання T . Величина $T = I/I_0$.

У табл. 1.3 наведені спектрофотометричні характеристики світлофільтрів, які необхідно обирати за кольором (довжиною хвилі поглинання) розчинів, які досліджуються.

У світлофільтрах, де застосовується ефект поглинання/відбиття, від поверхні фільтра-відбивача відбувається відбиття променів світла тих довжин хвиль, які були поглинуті речовиною відбивача в процесі його взаємодії з світлом. Монохроматизація світлових потоків за допомогою фільтрів-відбивачів втрачає популярність порівняно з фільтрами на основі ефекта поглинання/пропускання через меншу їх роздільну здатність.

Таблиця 1.3. – Вибір світлофільтра по кольору розчину, який досліджується

Характеристика розчину, який досліджується		Колір відповідного світлофільтру
Колір розчину	Область довжин хвиль максимального поглинання променів розчином, нм	
Жовто-зелений	400–450	Фіолетовий
Жовтий	450–480	Синій
Оранжевий	480–490	Зелено-синій
Червоний	490–500	Синьо-зелений
Пурпуровий	500–560	Жовто-зелений
Фіолетовий	560–575	Зелено-жовтий
Синій	575–590	Жовтий
Зелено-синій	590–625	Оранжевий
Синьо-зелений	625–700	Червоний

Достатньо високу монохроматизацію світла можна отримати за допомогою інтерференційних фільтрів, які вдається виготовляти з смугою пропускання декілька ангстрем ($1\text{\AA} = 10^{-10}$ м). Їх дія основана на явищі інтерференції паралельного променя, який відбивається двома дзеркалами, що розміщені на відстані довжини хвилі, або на явищі інтерференції поляризованого світла. Але монохроматизації світла в цьому випадку вдається досягти не на всіх бажаних довжинах хвиль. Це визначається складністю підбору речовини фільтра і технологією його виготовлення.

Як світлофільтри можна використовувати розчини деяких речовин, які здатні пропускати світло тільки певного спектрального діапазону. Так, розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (57 г/дм³ води) пропускає світло в діапазоні довжин хвиль 280–380 нм, HNO_3 (0,3 н. розчин) – в діапазоні 250–280 нм з максимумом при 260 нм та ін. Але такі світлофільтри не можна використовувати в приладах (монохроматорах) через дуже низьку роздільну здатність.

Таким чином, існує відносно велика кількість методів монохроматизації світла, але практичний вибір конкретного методу необхідно проводити з врахуванням їх переваг і недоліків стосовно особливостей поставлених задач. Все ж таки призмові монохроматори та дифракційні ґратки, особливо при їх комбінації, найпоширеніші в сучасних серійних спектрофотометрах.

Слід зауважити, що монохроматичне випромінювання можна отримати за допомогою спеціально створених пристроїв – *лазерів* (квантових генераторів), причому з дуже високою інтенсивністю (див. пункт 1.1.4.8). Проте їх застосування в спектрофотометрії обмежено тим, що навіть ті з них, які дозволяють змінювати довжину хвилі, роблять це в дуже обмеженому діапазоні. Крім того, ці пристрої відносно дорогі.

1.1.5.6. Реєстрація спектрів

Для проведення якісного і кількісного аналізу речовин випромінювання джерела світла, яке розкладається в спектр після взаємодії з речовиною, реєструється. При кількісному аналізі необхідно також визначити інтенсивність спектральних ліній. Це проводиться послідовно або одночасно. Наприклад, при фотографічному методі спочатку реєструють спектр, а потім визначають інтенсивність спектральних ліній за почорнінням, яке вони виклика-

ють на фотографічній пластинці після її проявлення. При фотоелектричному методі реєстрації спектра одночасно визначається склад і інтенсивність спектральних ліній.

При спектральному аналізі вимірюють, як правило, відносну інтенсивність спектральних ліній (інтенсивність однієї лінії відносно іншої). Це підвищує точність вимірів, спрощує техніку виміру, а також дозволяє враховувати багато похибок, які зв'язані як з спектральним приладом, так і з реєструючим пристроєм. Так, наприклад, якщо випадково зсунеться чи запилиться конденсор або інша оптична система, то це призведе до зміни інтенсивності кожної лінії в фокальній площині приладу, але завдяки застосуванню для аналізу відносних величин це майже не вплине на точність вимірів.

Навіть в тих випадках, коли аналіз робиться по «абсолютній» інтенсивності спектральної лінії (в люменах, ватт чи інших абсолютних одиницях), виміри фактично також носять відносний характер, оскільки основна задача – це порівняння інтенсивності однієї і тієї ж спектральної лінії в різних зразках. Однаковість і стабільність умов аналізу, в т. ч. і реєструючого пристрою, при використанні «абсолютної» інтенсивності повинна бути забезпечена протягом всього часу досліджень, тоді як при вимірюванні відносної інтенсивності стабільність характеристик оптичних пристроїв спектрального приладу необхідно зберігати тільки тоді, коли послідовно вимірюють інтенсивність ліній, які порівнюються в спектрі.

Вибір методу реєстрації залежить від ряду причин, а насамперед, від мети і задач дослідження. Реєструючий пристрій повинен володіти достатньою чутливістю і точністю (див. пункт 1.1.6). Важливе значення має також вартість і доступність відповідної апаратури. Дослідник перед початком вимірювань повинен критично оцінити можливість отримання достовірних результатів при вирішенні поставлених задач з використанням конкретних спектральних приладів.

Для загального ознайомлення наведені методи візуальної та фотографічної фотометрії, які зараз практично не використовуються, оскільки розроблено і впроваджено більш ефективний, чутливий і точний метод фотоелектричної фотометрії.

Візуальна фотометрія. Візуальні методи спостереження і фотометрії є найбільш простими і швидкими. Особливості цього методу визначаються властивостями ока (чутливість в області 400–

700 нм, здатність адаптуватися при зміні освітленості тощо). Разом з тим, візуальне визначення відносної інтенсивності спектральних ліній без допомоги *фотометра* (оптичного приладу для виміру світлових величин) неможливе, оскільки при простому порівнянні їх яскравості неможливо навіть приблизно визначити, у скільки разів одна лінія яскравіша за іншу. Візуальним методом можна тільки з певною точністю встановити рівність інтенсивностей або визначити, яка з ліній найяскравіша. В певних межах це можна зробити при використанні стилоскопічних і стилOMETричних методів.

При *стилоскопічному аналізі* не вимірюють кількісно відносну інтенсивність спектральних ліній, а тільки встановлюють рівність інтенсивності двох ліній або визначають, яка з них яскравіша.

При *стилометричному аналізі* відносну інтенсивність спектральних ліній вимірюють ослабленням за рахунок введення *фотометричного кліну* для аналізованої пари ліній, яка більш інтенсивна до тих пір, поки інтенсивності ліній не стануть рівними. Знаючи, у скільки разів довелося ослабити найяскравішу спектральну лінію, вираховують відносну інтенсивність пари ліній, які аналізуються. Рівність інтенсивностей ліній встановлюється візуально, що вносить значну суб'єктивність в результати досліджень.

Нині візуальна фотометрія, як вже відмічалось, практично не застосовується внаслідок того, що широко впроваджені методи реєстрації спектрів, які мають значно більшу чутливість і точність, автоматизовані тощо. Це, зокрема, методи, які застосовують фотоелектричну реєстрацію (див. нижче).

Фотографічна реєстрація спектрів і фотометрія. В основі цього методу лежить хімічна дія світла на галогеніди срібла (звичайно AgBr). При потраплянні світла на світлочутливий шар фотографічного матеріалу (наносять фотоемульсію на підкладку з скла чи на прозору плівку) відбувається активація галогеніду срібла, а при фотопроявленні – відновлення до металічного срібла. Картинка (почорніння), яка утворюється після проявлення, показує місце дії світла. У випадках, коли інтенсивність почорніння, яка спричинена дією світла, пропорційна світловому потоку, можна проводити визначення відносної інтенсивності спектральних ліній. Для цього порівнюється ступінь почорніння дослідного зразка (спектральної лінії) зі зразком-стандартом (це робиться на спеціальному приладі – *денситометрі*).

Більш поширеним є *метод визначення щільності почорніння* (S) – оптичної щільності обробленої фотопластинки. Для її визначення необхідно знайти відношення інтенсивності світла, що падає на фотопластинку (I_0), до інтенсивності світла I_1 , яке пройшло крізь неї:

$$S = \lg \frac{I_0}{I_1}.$$

Для врахування відбитого світла від підкладки фотопластинки (скла чи плівки) звичайно вимірюють інтенсивність не самого світла, що падає, а того, що пройшло через світле (контрольне) місце проявленої фотопластинки.

Таким чином, для визначення ступеня почорніння направляють пучок світла на прозоре (світле) місце проявленої фотопластинки і вимірюють інтенсивність світла, яке пройшло. Потім той же пучок світла спрямовують на зображення спектральної лінії і знову вимірюють інтенсивність світла, яке пройшло у даному випадку.

Десятковий логарифм (\lg) відношення визначених величин у цих дослідженнях і дасть величину щільності почорніння, яка відповідає даній спектральній лінії.

Фотографічний метод реєстрації спектральних ліній потребує великої і ретельної підготовчої роботи (вибір фотографічної емульсії, часу впливу світла на неї, визначення спектральної чутливості і контрастності емульсії тощо), акуратності та чіткості виконання правил зберігання і проявлення фотоемульсій, роботи з ними та ін. Незважаючи на описані труднощі, метод фотографічної фотометрії в свій час набув широкого розповсюдження, особливо для реєстрації великих ділянок спектрів і при застосуванні для обробки фотопластинок з почорніннями від спектральних ліній мікрофотометрів. Але все ж таки розробка і вдосконалення, здешевлення і доступність фотоелектричних методів, які мають суттєві переваги перед фотографічними методами в розділенні, чутливості, точності тощо, спричинили втрату інтересу до фотографічної фотометрії.

Фотоелектрична реєстрація спектрів і фотометрія. Світловий потік, який складає спектральну лінію, після його виділення монохроматором від всього іншого спектра можна перетво-

рити в електричний сигнал і за величиною цього сигналу (електричної напруги або струму) виміряти інтенсивність.

Перетворення світлового потоку в електричний сигнал здійснюється за допомогою електричних приймачів світла. Точність *фотоелектричних пристроїв* значно вища, порівняно з наведеними вище методами візуальної і фотографічної фотометрії, оскільки тут виключені суб'єктивні похибки ока і похибки, які зв'язані з неоднорідністю фотографічних пластинок, їх проявленням тощо.

В свій час для фотоелектричної фотометрії широко використовувалися вакуумні фотоелементи, принцип роботи яких заснований на *фотоефекті* – зміні електричних властивостей речовини під дією світлового випромінювання (видимого і ультрафіолетового, рентгенівських та інших променів). Світло, яке падає на фотокатод (сурмяно-цезієвий або ін.), вибиває з нього електрони, кількість яких пропорційна інтенсивності світла. Ці електрони потрапляють на позитивно заряджений електрод. Наслідок цього – виникнення електричного струму, який після підсилення реєструється. Такі прості фотоелементи мають дуже малу чутливість, потребують високостабільних джерел електричного струму. Їм притаманний також *темновий струм*, який протікає в електричному колі фотоелемента за відпусті дії світла. Він звичайно дуже малий, але заважає реєстрації слабких світлових потоків, тому що при наступному підсиленні він підсилюється разом з отриманим сигналом.

Нині зазвичай використовується інший тип вакуумних фотоелектричних приймачів – *фотоелектронні помножувачі* (ФЕП). На відміну від фотоелементів, які мають два електроди (негативно заряджений фоточутливий шар і позитивно заряджений електрод), ФЕП містять багатоелектродну систему (рис. 1.44). У цьому пристрої сполучені вакуумний фотоелемент і підсилювач, дія якого заснована на вторинній електронній емісії.

Світлове випромінювання (рис. 1.44 а) потрапляє на фоточутливий шар (фотокатод), вибиває з нього первинні електрони, кількість яких в одиницю часу пропорційна числу квантів світла, яке потрапляє на цей шар.

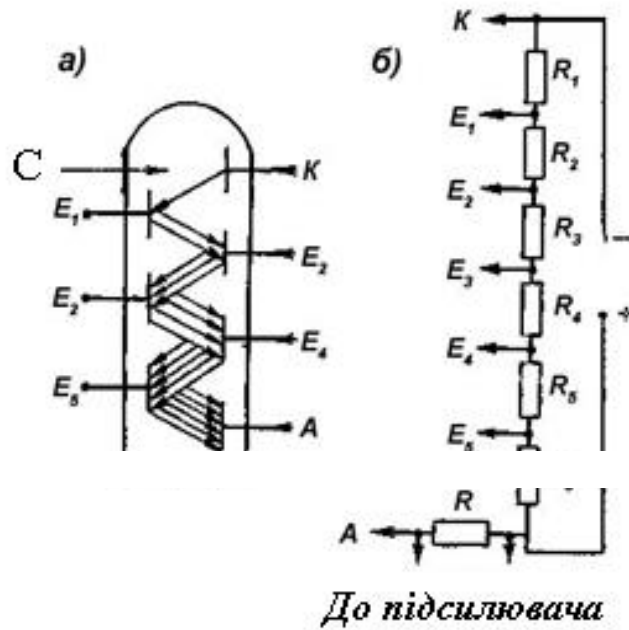


Рис. 1.44. Схема ФЕП (а) та його підключення (б)

П р и м і т к а: С – світловий потік; А – анод; К – фотокатод; E_1 – E_5 – фотоемітери; R_1 – R_6 – електричні опори, які складають дільник напруги; замість R можна підключити амперметр, якщо підсилення достатнє.

Між фоточутливим шаром і першим електродом (фотоемітером) розміщені фотоелектричні лінзи, які фокусують на електрод і електрони, що вибиті з фоточутливого шару катоду. Ці електрони викликають вторинну емісію електронів, оскільки поверхня цього електроду, як і інших, вкрита спеціальним шаром, з якого первинні електрони здатні вибивати значну кількість вторинних електронів. Між електродами ФЕП розміщені електронні лінзи, які фокусують потоки електронів, а також прикладена різниця електричних потенціалів (рис. 1.44 б), яка прискорює потік електронів у напрямі наступного електроду, де знову відбувається вторинна емісія електронів і т.д. Серійні ФЕП для видимої області спектра містять 8–20 каскадів підсилення (динодів), що забезпечує коефіцієнт помноження ФЕП у декілька мільйонів. Але все ж таки тільки в певних випадках сигнал, який знімається з приймача світла, в т. ч. і у випадку з ФЕП, можна зразу виміряти реєструвальним пристроєм.

Тому сигнал на виході ФЕП при низьких світлових потоках потребує подальшого підсилення і перетворення, що виконується додатковими електричними помножувачами. Після підсилення цей сигнал потрапляє на реєструвальний пристрій, яким, як правило, є самописець. Крім того, сигнал може подаватися на комп'ютер, де теж фіксується спектр та проводиться його обробка.

1.1.5.7. Будова та специфіка застосування пристроїв «лабораторія-на-чипі»

Сучасні біохімічні технології розвиваються в напрямі інтеграції і мініатюризації декількох стадій хімічної обробки, реакцій, процесів поділу і детектування в єдиному приладі. З введенням інтегральних мікросхем в електроніці і подальшою заміною дискретних елементів на високопродуктивні чипи, мікропроцесори та мікроконтролери, в галузях хімії та біології розвивається інтегрування біохімічних і біоаналітичних процесів. У цій галузі істотним поштовхом став розвиток *мікроелектромеханічних систем* (MEMS), зокрема рідинних і оптичних. Крім очевидних переваг мініатюризації аналітичних систем, таких як зменшення габаритів, ваги, витрат реагентів і відходів, інтегрування в одному чипі кількох реакторів, змішувачів, екстракторів, насосів, дозаторів, їх застосування дозволяє реалізувати всі стадії пробопідготовки, дозування, змішування реагентів, очищення, розділення та аналізу проби в одному пристрої. Розмір таких систем становить декілька квадратних сантиметрів. Створюються умови для появи цілого класу нових пристроїв з новими функціональними та аналітичними характеристиками.

Розвиток аналітичної техніки відкриває перед хіміками-аналітиками і біохіміками широкий вибір мікрочипів залежно від різних завдань.

«Лабораторія-на-чипі» (lab-on-chip, LOC) – це пристрій, який об'єднує одну або кілька функцій лабораторного аналізу на одному чипі розміром до декількох сантиметрів квадратних. Вона має справу з обробкою надзвичайно малих об'ємів рідини і може бути інтегрована з напівпровідниковими приладами, обробляти лабораторні дані (рис. 1.45)

Лаб-чипи підвищили чисельність випробувань, які передбачають змішування, аналіз і розділення зразків, що зазвичай складаються із суспензії клітин, нуклеїнових кислот, білків тощо.

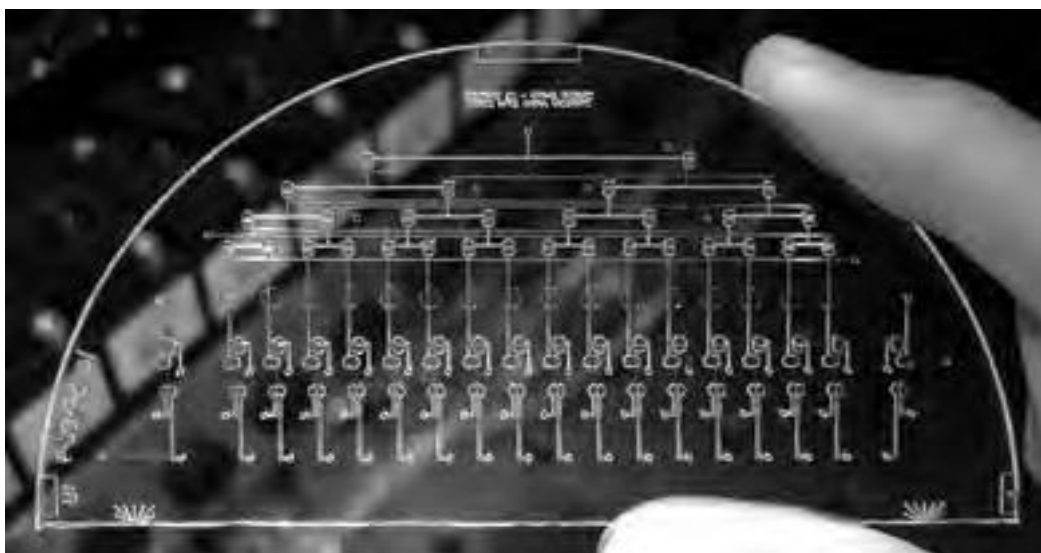


Рис. 1.45. «Лабораторія-на-чипі»

Можливі аналітичні або оптичні методи їх визначення. Електричні методи ідентифікації залежать виключно від полярних властивостей молекул рідини зразків. Більшість оптичних методів вимагають маркування, що потребує застосування хемілюмінесценції, флуоресценції або радіоактивних маркерів.

Як правило, лаб-чипи складаються з мережі каналів, побудованих на основі напівпровідникової технології.

Ці пристрої можуть бути виготовлені з багатьох видів матеріалів: полімерів, скла, кремнію або комбінацій цих матеріалів.

Лаб-чипи мають низку переваг порівняно з традиційним аналізом:

- низькі обсяги споживання рідини (знижені витрати реагентів і менші обсяги проб для проведення досліджень);
- швидкий аналіз і час відгуку через коротку відстань дифузії;
- паралелізм;
- краще управління процесом через швидший відгук системи (наприклад, тепловий контроль для екзотермічних хімічних реакцій);
- компактність системи;
- дослідження проводяться з вищим рівнем безпеки;
- висока відтворюваність даних.

Незважаючи на всі переваги, лаб-чипи мають деякі недоліки порівняно зі звичайними лабораторними аналізами:

- багато аспектів ще не повністю вивчено;

– відбите від стінок світло джерела випромінювання впливає на якість отриманого спектра;

– поєднання фізичних і хімічних процесів ускладнює виготовлення лаб-чипів.

Структура «лабораторії-на-чипі» принципово не відрізняється від будови спектрометрів. Висока продуктивність, легша інтеграція, знижене енергоспоживання робить відповідні матриці найкращими для використання в лаб-чипах.

Лаб-чипи виготовляються, як правило, з використанням фотолітографії. Спочатку в лаб-чипах планували кремнієву підкладку, але пізніше її замінили чипами на скляну. У сучасних моделях передбачені полімерні матеріали замість кремнію і скла.

Прикладом таких портативних лаб-чипів є Qstick. Це usb-спектрометр, з випромінюванням в діапазоні 360–740 нм з кроком 1 нм. Такий лаб-чип можна використовувати для хімічного аналізу, світлового аналізу, судово-медичної експертизи.

З бурхливим розвитком комп'ютерних технологій та мереж, класифікація зображень широко використовується в багатьох областях. Основна мета класифікації зображень полягає у створенні принципів, за яким вдається розрізнити класи схожих зображень. Щоб розрізнити різні класи зображень, необхідно спочатку отримати деякі особливості основних властивостей зображень. Потім використовують класифікатор для досягнення класифікації за допомогою подібності інформації в класі зображень.

Найпоширенішими методами є використання графів, кластеризації, нейронних мереж, байєсової ймовірності тощо.

При розгляді структури відповідної матриці (рис. 1.46), необхідно відмітити, що вихідними даними є цифровий сигнал, а обробку та класифікацію такого сигналу даних можна інтегрувати в один чип. Це дозволяє відмовитися від персонального комп'ютера як елемента опрацювання даних.

Для класифікації сигналу необхідно його підсилити для отримання вірогідного результату. Цифровий сигнал зберігається в частотній характеристиці, яку отримано за допомогою перетворення Фур'є. Щоб не класифікувати сигнал за всією його хвильовою довжиною, виділяють лише необхідну довжину хвилі, що збільшує швидкодію.

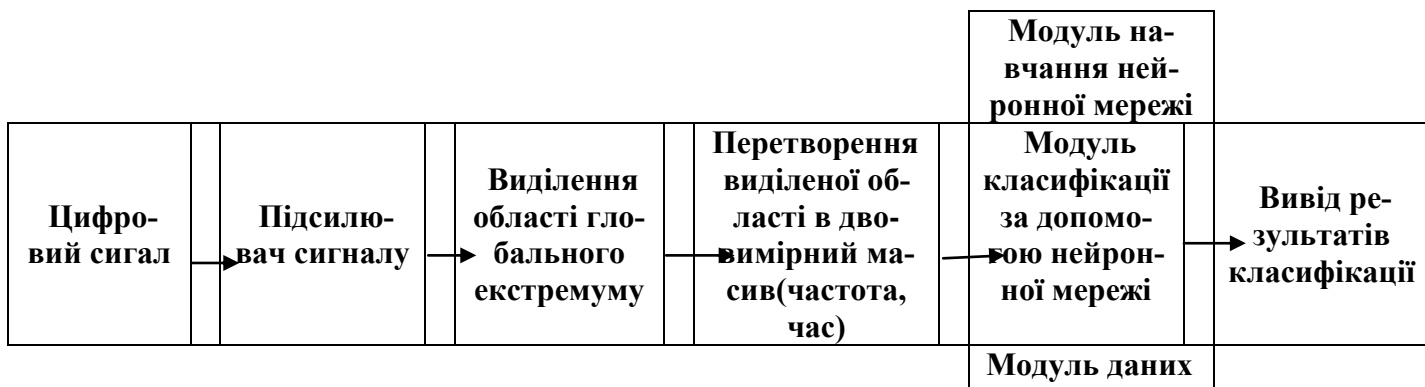


Рис. 1.46. Процес обробки та класифікації сигналу

Модуль класифікації складається з модулів:

- навчання нейронної мережі;
- класифікації за допомогою нейронної мережі;
- даних.

В якості засобу класифікації спектра обрано нейронну мережу як найпоширенішу та через велику кількість наявних моделей для класифікації сигналів, зображень тощо.

Для зручного зберігання та класифікації сигналу його перетворено на двовимірний масив, який складається з амплітуди і відповідної частоти. Невеликі масиви кодових сигналів доцільно зберігати шляхом використання регістрів. Вже за необхідності зберігати десятки сигналів, залучення регістрів призводить до невиправдано великих апаратних витрат. Для зберігання великих об'ємів сигналів найкраще використовувати *запам'ятовувальні пристрої (ЗП)* із спеціальними мікросхемами, в кожній з яких може зберігатися інформація великого об'єму. Доцільно залучати *постійний запам'ятовувальний пристрій (ПЗП)*. Цей пристрій пропонується для зберігання даних і команд, за якими цифрові пристрої функціонують. Можна залучати *перепрограмовані постійні запам'ятовувальні пристрої (ППЗП)*, але специфіка лабораторії-на-чипі робить це не доцільним.

Основна проблема використання нейронних мереж – відносно низька швидкість роботи, оскільки задачі, пов'язані з нейронними мережами, як правило, є ресурсоємними. Вибір оптимальної нейромережної моделі зазвичай пов'язаний з проведенням великої кількості експериментів, результати яких дають змогу оцінити якість окремої моделі. Особливо великих затрат часу потребує процес навчання нейронної мережі. Зважаючи на ці проблеми, найоптималь-

нішим типом для проектування та мікропроцесор є багат шаровий перцептрон, оскільки цей тип нейронної мережі використовує алгоритм зворотного поширення похибки, передбачено два проходи в усіх шарах мережі: прямий і зворотний.

Також цей тип має оптимальний метод навчання – алгоритм зворотного поширення похибки. Перевагами цього методу навчання є: локальність методу змін синоптичних ваг і порогів у багат шаровому перцептроні; ефективність методу обчислення всіх часткових похідних функцій вартості за вільними параметрами.

Інтеграція мікропроцесора з відповідною матрицею та використання нейронної мережі робить лаб-чипи автономними та більш функціональними.

Лабораторії-на-чипі можна розглядати як підмножину МЕМС, які містять багато компонентів, що вийшли з цих досліджень: мікронасоси, капіляри, клапани, датчики, важелі, сенсори тощо. Однією з найбільших переваг лабораторії-на-чипі є невеликі розміри, паралельність і швидкодія. Існують також численні проблеми, проте це можна виправити реінжинірингом на рівні функціональності традиційного лабораторного обладнання.

Структурна схема обробки даних, отриманих спектральним аналізом, дає змогу обробляти та класифікувати спектри без використання комп'ютера. Такою інтеграцією можна пришвидшити розроблення багатфункціональних лаб-чипів, що є надзвичайно важливим та актуальним завданням для прикладної біології, медицини та ветеринарії.

1.1.6. Чутливість, точність та роздільна здатність спектральних приладів

Принциповим моментом при виборі типу спектрофотометра для вирішення поставлених задач дослідження є чутливість, точність та роздільна здатність приладів.

1.1.6.1. Чутливість спектрального аналізу

Відсутність у реєстрованому спектрі певних ліній ще не означає, що речовина, якій притаманні ці лінії, відсутня у досліджуваному зразку. Може виявитися, що її концентрація недостатня для виявлення за даних умов дослідження. Тому необхідно знати

чутливість приладу, яким проводиться аналіз, до конкретних речовин (хімічних елементів).

У спеціальних таблицях, які додаються до документації на прилад (або приведені в комп'ютері, який входить до складу приладу) вказана *відносна чутливість*, тобто найменша концентрація речовин (хімічних елементів), яка може бути визначена в пробі. Цю величину звичайно і називають *чутливістю*. Тільки в окремих випадках, наприклад, коли наважка проби менша, ніж та, яку необхідно вносити до приладу, слід враховувати *абсолютну чутливість*, тобто абсолютну кількість даної речовини (хімічного елемента) в пробі.

При малій кількості досліджуваної проби чутливість аналізу обмежується тим, що не вдається отримати сигнал, який можна надійно зареєструвати. В цьому випадку чутливість можна підвищити рядом методичних підходів, наприклад, використанням більш яскравого джерела світла, збільшенням чутливості реєструвального пристрою, збільшенням тривалості дослідження тощо.

Чутливість обмежується також відношенням корисного сигналу до фону, тобто побічного сигналу, який не зв'язаний з основним сигналом від досліджуваної речовини. Якщо сигнал (спектральна лінія) менш інтенсивна, ніж випадкове збільшення фону, то його дуже важко виявити. Збільшення яскравості джерела або чутливості приймача світла в цьому випадку не вирішать проблему, оскільки відношення сигналу до фону залишається незмінним. Водночас чутливість можна підвищити за рахунок збільшення відношення сигналу до фону на основних стадіях проведення дослідження – наприклад, у спектральному пристрої при реєстрації. Збільшення ширини щілини спектрального приладу в принципі підвищує чутливість, але це може призвести до погіршення роздільної здатності, зменшення відношення інтенсивності спектральних ліній до інтенсивності суцільного фону.

Для підвищення чутливості спектрального приладу необхідно вибрати найбільш інтенсивні спектральні лінії і для них спеціально підбирати умови проведення дослідження. Робоча область спектрального приладу повинна охоплювати всі ланки спектра, де знаходяться найбільш інтенсивні лінії досліджуваної речовини (хімічного елемента).

1.1.6.2. Точність вимірів у спектральному аналізі

При будь-яких вимірах завжди існують *похибки*, які обмежують точність вимірів. Деякі з цих похибок є випадковими, а деякі – постійними.

Випадкові похибки. Абсолютне значення випадкової величини непередбачувано змінюється від одного виміру до іншого. Також випадково може змінюватися знак похибки: в одному випадку вона може призводити до збільшення величини, яка вимірюється, а в іншому – до зменшення.

Випадкові похибки окремих операцій призводять до появи *сумарної випадкової похибки* дослідження. Вона залежить від того, яку величину і який знак мають випадкові похибки при окремих операціях. Якщо всі вони мають однаковий знак, то загальна похибка може бути великою, а коли різні – то невелика або зовсім близька до нуля чи йому навіть рівна, коли похибки окремих операцій були рівними і різнонаправленими.

Таким чином, сумарна випадкова похибка залежить від окремих ситуацій, і яке значення вона буде мати, заздалегідь визначити неможливо. Проте, якщо виміри одного і того ж показника проводити багато разів, то можна з великою точністю завбачити середній результат. Багаторазове вимірювання призводить до зменшення випадкової похибки, воно визначає середнє значення з усіх отриманих результатів.

Практично неможливо кожну пробу вимірювати дуже багато разів. Тому необхідно знати, як впливають випадкові похибки при обмеженому числі повторних вимірів, або навіть при поодиноких.

Розподілення випадкових похибок підпорядковується закону Гаусса, окремий випадок якого представлений на рис. 1.47, де наведена залежність кількості вимірів, в яких зустрічається та чи інша випадкова похибка, від її значення при достатньо великій кількості вимірів.

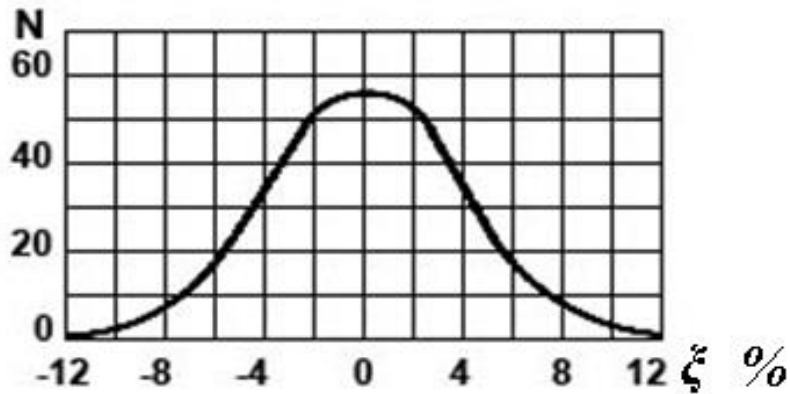


Рис. 1.47. Розподілення випадкових похибок

П р и м і т к а: ξ – випадкова похибка при поодиноких вимірах (в %); N – число вимірів, в яких з’являється випадкова похибка.

Таким чином, виміри, при яких випадкові похибки всіх операцій мають великі значення і однаковий знак, що призводять до появи значної сумарної похибки, будуть зустрічатись дуже рідко; більш ймовірним є випадок, коли випадкові похибки окремих операцій частково компенсують одна одну і отримане значення мало відрізняється від істинного значення або навіть співпадає з ним. Чим більше похибка, тим рідше вона зустрічається.

Постійні похибки. Відносні похибки характеризують *відтворюваність результатів* дослідження. Але навіть добра відтворюваність ще нічого не говорить про *правильність методики вимірювань*. Справа в тому, що може бути так: окремі виміри добре групуються біля середнього результату, але сам цей результат не співпадає з істиною, наприклад, з концентрацією речовини, що досліджується. Така методика характеризується доброю відтворюваністю, але має постійну по величині і знаку похибку, яка може бути і значною.

Для виміру постійної похибки необхідно мати хоча б один еталон, який би точно відповідав зразку і містив точно відому концентрацію речовини, що досліджується. Якщо при багаторазових вимірах виявляється відмінність між істинною концентрацією і середнім значенням, яке отримане при вимірах проб, то це вказує на наявність постійної похибки.

При кількісних спектроскопічних дослідженнях усі виміри, як правило, проводяться відносно еталону, тому постійні похибки легко виявляються і усуваються. Разом з тим, постійні похибки все ж таки можуть виникати через невідповідність складу або структури еталонів зразку, який досліджується. В цьому випадку інтенсивність спектральних ліній і, наприклад, концентрації речовини, що досліджується, буде різною для еталона і зразка. Ще можлива причина появи постійних похибок – відмінність умов вимірів еталону і досліджуваного зразка. Появу таких постійних похибок можливо своєчасно виявити, якщо час від часу перевіряти залежність інтенсивності спектральних ліній і, наприклад, концентрації речовини, що досліджується, за допомогою декількох еталонів і при умові суворого дотримання стабільності всіх умов дослідження.

Таким чином, точність вимірів (запропонованих методик) складається з її відтворюваності і правильності.

1.1.6.3. Роздільна здатність при спектральному аналізі

Наявність дуже незначної дисперсії (див. пункт 1.1.4.3) призводить до того, що незабезпечується можливість окремого спостереження двох близьких спектральних ліній λ_1 і λ_2 , якими б близькими до монохроматичних вони не були. Дисперсія визначає кутову або лінійну відстань між максимумами інтенсивності двох довжин хвиль λ_1 і λ_2 , але у будь-якому спектральному вимірювальному приладі перехід від максимуму конкретної лінії (довжини хвилі) до мінімуму відбувається відносно поступово в залежності від будови приладу. Таким чином, слід зважити на те, що лінії мають певну ширину. Якщо вони достатньо вузькі, щоб не зливатися, то вони будуть *розрізненими* (розділеними одна від одної). Навпаки, широкі спектральні лінії можуть зливатися навіть при значній відстані між їх центрами. На перший погляд, здається, що зменшенням ширини щілини приладу можна досягнути скільки завгодно малої ширини лінії і розрізнити будь-яку пару близьких спектральних ліній. В дійсності залежність ширини щілини призводить до звуження лінії тільки до певної межі, оскільки відбувається збільшення ширини лінії внаслідок дифракції світла (див. пункт 1.1.4.7). Крім того, ширина лінії може збільшуватися також у джерелах світла (див. пункт 1.1.5.1). При накладанні двох близьких спектральних ліній

однієї інтенсивності розподілення освітленості, що спостерігається, є сумою освітленості, яка створюється цими лініями (рис. 1.48).

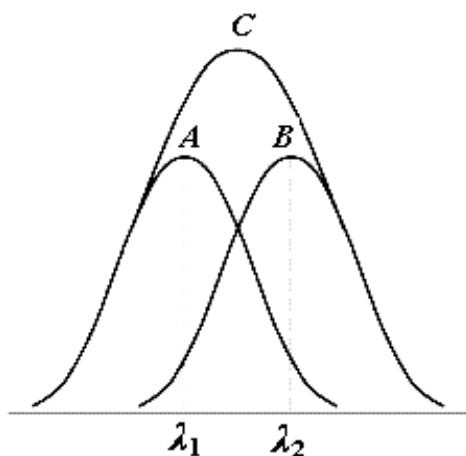


Рис. 1.48. Розподілення освітленості при накладанні двох близьких спектральних ліній однакової інтенсивності

П р и м і т к а: А і В – положення максимумів двох спектральних ліній λ_1 і λ_2 , відповідно; С – сумарна освітленість, яка створена даними спектральними лініями.

Таким чином, навіть при великій дисперсії (значній відстані АВ) неможливо визначити наявність двох довжин хвиль λ_1 і λ_2 , якщо співпадіння освітленостей відбувається так, як це представлено на рис. 1.48.

Для того, щоб спектральний прилад міг встановити наявність двох близьких спектральних ліній (розрізнити дві довжини хвилі), необхідна чітка наявність двох максимумів, навіть незважаючи на те, що «горби» від кожної з них в значній мірі перекриваються (рис. 1.49).

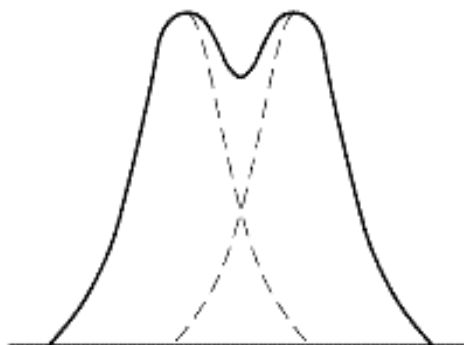


Рис. 1.49. Розподілення освітленості для двох спектральних ліній, які ще можна розділити (критерій Релея)

Безумовно, розділення двох максимумів в цьому випадку залежить, в певній мірі, від чутливості до контрасту того методу, який використовується для визначення відмінностей в інтенсивності ліній спектру.

Таким чином, можливість розрізнення двох спектральних ліній має певну невизначеність. Згідно пропозиції Дж. Релея, умовно прийнято вважати розрізнення повним, коли два «горби» розміщені так, що максимум першого «горба» співпадає з мінімумом іншого (критерій Релея).

Критерій Релея у вказаній формі непридатний для інтерференційних спектральних приладів, в яких перехід від максимуму до мінімуму має іншу кутову залежність, ніж в дифракційній ґратці (в дифракційній ґратці сумується N пучків рівної інтенсивності, а в інтерференційному спектроскопі сумується нескінченне число пучків, які поступово стають слабшими). Тому зручніше надати критерію Релея дещо інше тлумачення: якщо дві суміжні спектральні лінії мають однакову інтенсивність і форму, то критерій Релея означає, що мінімум між лініями відповідає біля 80 % від сусідніх максимумів. Даний контраст є таким, що впевнено розрізняється як при візуальних, так і фотометричних методах реєстрації. Таким чином, межу розділення у цьому випадку визначають за умови, щоби глибина «сідловини» на сумарній кривій інтенсивності двох близьких і однакової інтенсивності спектральних ліній складала не менше 20 % висоти сусідніх максимумів.

При визначенні можливості розділення двох ліній з сильно відмінними інтенсивностями необхідно виходити з ряду факторів, які характеризують кожний конкретний випадок. Але все ж таки, незважаючи на умовність критерію Релея, він корисний для порівняння роздільної здатності різних спектральних приладів. Здатність спектрального приладу до розпізнавання близьких довжин хвиль тим більша, чим далі максимуми, а також чим вони крутіше (крутіше перехід від максимуму до мінімуму).

Міра роздільної здатності (RZ) спектрального приладу – це відношення довжини хвилі λ , для якої визначається роздільна здатність, до різниці довжин хвиль двох найбільш близьких спектральних ліній ($\Delta\lambda$), які ще можуть бути розпізнані даним спектральним приладом:

$$PЗ = \frac{\lambda}{\Delta\lambda}.$$

У випадку використання дифракційної ґратки розраховано, що РЗ залежить від параметрів спектрального приладу наступним чином:

$$PЗ = d \frac{\Delta\beta}{\Delta\lambda},$$

де d – діючий отвір, який грає роль щілини, що обмежує пучок світла; $\Delta\beta$ – кут між лініями (див. рис. 1.31 та пояснення до нього); $\Delta\lambda$ – різниця довжин хвиль двох найбільш близьких ліній.

Якщо виходити з основного рівняння дифракційної ґратки (див. підпункт 1.1.4.7.1) $d\sin\varphi = m\lambda$, то умови, які дають положення максимумів m -го порядку для довжин хвиль λ_1 і λ_2 наступні:

$$d\sin\varphi_m^1 = m\lambda_1; \quad d\sin\varphi_m^2 = m\lambda_2.$$

Для переходу від m -го максимуму для довжини хвилі λ_2 до відповідного мінімуму необхідно змінити напрямок світла, яке падає, так, щоби різниця ходу змінилася на λ_2/N , де N – число штрихів на дифракційній ґратці. Таким чином, мінімум λ_2 спостерігається в напрямку φ_{\min} , що задовольняє умові:

$$d\sin\varphi_{\min} = m\lambda_2 + \frac{\lambda_2}{N}.$$

За умов Релея $\varphi_m^1 = \varphi_{\min}$, звідки:

$$m\lambda_1 = m\lambda_2 + \frac{\lambda_2}{N}$$

або

$$\frac{\lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} = mN.$$

Оскільки λ_1 і λ_2 близькі між собою, тобто $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ – мала величина, то РЗ дорівнює:

$$PЗ = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN.$$

Таким чином, РЗ диференційної ґратки при заданому числі штрихів (N) збільшується при переході до спектрів вищих порядків. Максимальне значення РЗ відповідає максимальному значенню m , яке визначається за умови, що $\sin\varphi \leq 1$. Таким чином, на основі основного рівняння дифракційної ґратки $d\sin\varphi = m\lambda$ знаходимо, що $m_{max} = d/\lambda$, і, відповідно, $PЗ_{max}$ тоді дорівнює:

$$PЗ_{max} = \frac{Nd}{\lambda}.$$

Величина Nd – це загальна ширина дефракційної ґратки. Таким чином, $PЗ_{max}$ визначається її загальною шириною або, що є точніше, максимальною різницею ходу, яка виражається в довжинах хвиль (Nd/λ) між світловими пучками, що розповсюджуються від першого і до останнього штриха дефракційної ґратки.

З наведеної вище формули випливає, що $PЗ_{max}$ не залежить від того, створена диференційна ґратка великим числом штрихів (N_1) малого періоду (d_1) або малим числом штрихів (N_2) великого періоду (d_2) за умови $N_1d_1 = N_2d_2$. Дефракційна ґратка з малим d і великим N («дрібно нарізана») має суттєву перевагу над «грубо нарізаною» дефракційною ґраткою (велике d і мале N), оскільки у другому випадку дефракційна ґратка буде мати таку ж РЗ, як у першому, тільки при відповідно значно більших порядках m , інтенсивність спектрів яких дуже мала.

Всі спектральні прилади постачаються з контрольним спектром (конкретним значенням РЗ), що дозволяє вибирати різні групи близьких спектральних ліній для конкретних досліджень. Ці спектри також використовують для перевірки правильності налагодження приладів у лабораторії.

Слід зауважити, що наведені вище підходи до визначення РЗ спектральних приладів придатні не тільки для приладів з диференційною ґраткою, але і з призми. В призмених приладах збільшення числа призм підвищує РЗ, оскільки кутова дисперсія зростає при незмінному діючому отворі (щілині).

1.1.7. Схема будови спектрофотометрів у видимій і УФ-областях та основні принципи їх застосування

Описані вище (див. пункт 1.1.5) пристрої спектрофотометрів (джерела світла, конденсори, щілини, кювети, монохроматори, фотометри, реєстратори) містять більшість приладів (рис. 1.50).

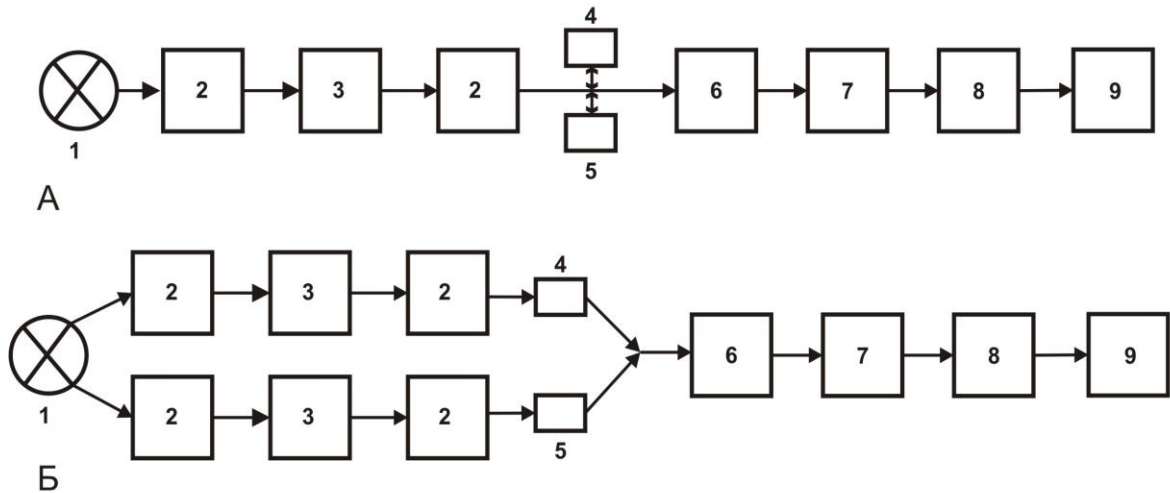


Рис. 1.50. Блок-схема однопроменевого (А) і двопроменевого (Б) спектрофотометрів

П р и м і т к а: 1 – джерело світла; 2 – конденсор; 3 – щілина; 4 – експериментальна кювета; 5 – контрольна кювета; 6 – монохроматор; 7 – приймач світла; 8 – помножувач; 9 – реєструючий пристрій.

Слід зауважити, що на рис. 1.50 наведена схема одно- і двопроменевих спектрофотометрів у дуже загальному вигляді. Так, наприклад, у спектрофотометрах для УФ області кювети з речовиною, що досліджується, розміщують, як правило, після монохроматора, щоб на них потрапляло менше світла і тільки необхідної довжини хвилі, оскільки багато речовин розкладаються під дією УФ-випромінювання. Крім того, сучасні спектрофотометри мають ще ряд додаткових пристроїв, котрі значно полегшують як реєстрацію спектрів, так і обробку одержаних результатів. Насамперед це комп'ютери, які використовуються як для управління спектрофотометром (програмування умов дослідження), так і для обробки отриманих результатів. Це також пристрої зміни ширини щілини, термостатування (підтримування стабільної температури) кюветного відділу та ін. Вибір типу спектрофотометра визначається в першу чергу метою досліджень і поставленими задачами. Насампе-

ред, як правило, це *реєструючі спектрофотометри з автоматичною розгорткою спектра*, які здатні реєструвати як зміни поглинання досліджуваної речовини, так і зміну поглинання в часі при постійній довжині хвилі.

У двопроменевих спектрофотометрах, на відміну від однопроменевих (рис. 1.50 Б), промінь за допомогою дзеркал спрямовується по чергово то в кювету зі зразком, то в кювету порівняння (контрольну). Різниця в світлових потоках, які пройшли ці кювети, вираховується автоматично і відповідає значенню поглинання (екстинкції) речовини, яка досліджується.

Багатопроменеві реєструючі спектрофотометри фіксують зміну поглинання одночасно при двох або навіть більше довжинах хвиль.

Спектрофотометри, які враховують відбивання, вловлюють світло, що розсіюється зразком у всі боки (наприклад, коли об'єктом дослідження є суспензія – зважені частинки в рідині). В цьому випадку поглинання вираховується після вимірювання всього розсіяного світла і тієї частини, яка проникла крізь зразок.

Найчастіше спектрофотометри використовуються для *колориметрії* (лат. *color* – колір та *metron* – вимірювання) – порівняння якісних і кількісних змін світлових потоків при їх проходженні крізь розчини речовин з метою визначення кількості останніх.

Багато речовин, як правило, слабо поглинають випромінювання у видимій області спектра, але після реакції з іншою сполукою утворюють забарвлені продукти реакції, концентрація яких відповідає концентрації досліджуваної речовини. Тому саме таку *кольорову реакцію* використовують для виявлення і визначення концентрації досліджуваної речовини.

Так, наприклад, при нагріванні α -амінокислот, як вільних, так і у складі білка, з нінгідрином (трикетогідринденгідратом) утворюється комплексна сполука, яка в залежності від радикала, забарвлена в жовтий, синій або червоний колір (нінгідрінова реакція); циклічних амінокислот (тирозину, триптофану, фенілаланіну) з азотною кислотою – в жовтий колір, а після охолодження – в оранжевий колір (ксантопротеїнова реакція); при додаванні до лужного розчину білка купрум сульфату (CuSO_4) – червоно-фіолетовий колір (біуретова реакція на наявність пептидних зв'язків) та багато ще інших сполук та реакцій з ними.

Кольорові реакції притаманні також вуглеводам, вітамінам, нуклеїновим кислотам. Так, наприклад, при нагріванні розчину гексоз (глюкози, фруктози та ін.) у лужному середовищі в присутності міді сульфату (CuSO_4) утворюється осад міді гідроксиду (CuOH) жовтого кольору (реакція Троммера); в реакції вітаміну С (аскорбінової кислоти) з калію гексоціанофератом ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) у присутності заліза хлористого (FeCl_3) утворюється комплексна сполука синьо-зеленого кольору; рибонуклеотиди, зокрема, у їх складі рибоза в реакції з орцином утворює комплексну сполуку синьо – зеленого кольору, а дезоксирибоза з фуксином в сульфатній кислоті – фіолетового кольору тощо.

Існує ще цілий ряд специфічних кольорових реакцій на амінокислоти та білки, прості та складні вуглеводи, нуклеотиди та нуклеїнові кислоти, а також ряд неорганічних та інших органічних сполук.

Широко застосовується спектрофотометрія у видимій і УФ-області, як вже відмічалось, для якісного і кількісного аналізу біологічних речовин (містяться в організмах). Це, зокрема, білки, які містять *хромофорні* (грецьк. *chroma* – колір та *phoros* – той, що несе) групи, які здатні поглинати світло в певній області спектра (див. вище).

Так, наприклад, пептидний зв'язок ($-\text{C}=\text{O}-\text{NH}$) у білках викликає поглинання світла при 190 нм. Ароматичні амінокислоти (триптофан, тирозин і фенілаланін), які є основними структурними компонентами більшості білків, містять хромофори (рис. 1.51), які поглинають при довжинах хвиль, які більше 220 нм (рис. 1.52).

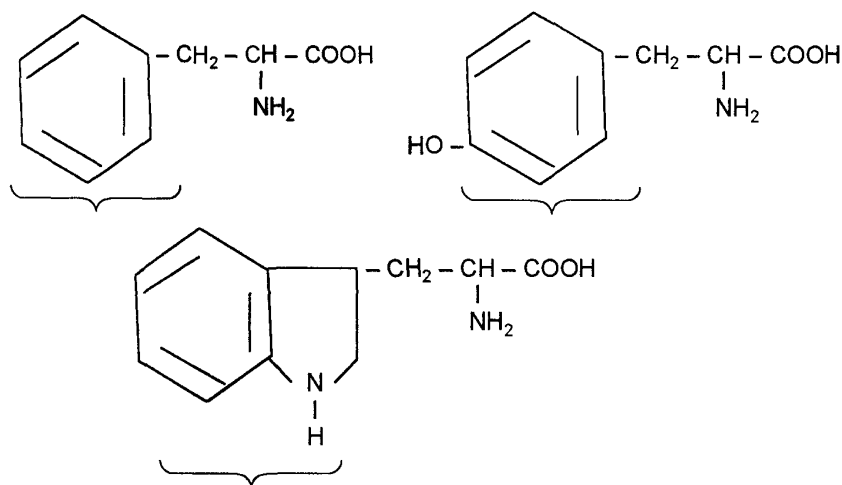


Рис. 1.51. Хромофорна група фенілаланіну (1), тирозину (2) і триптофану (3)

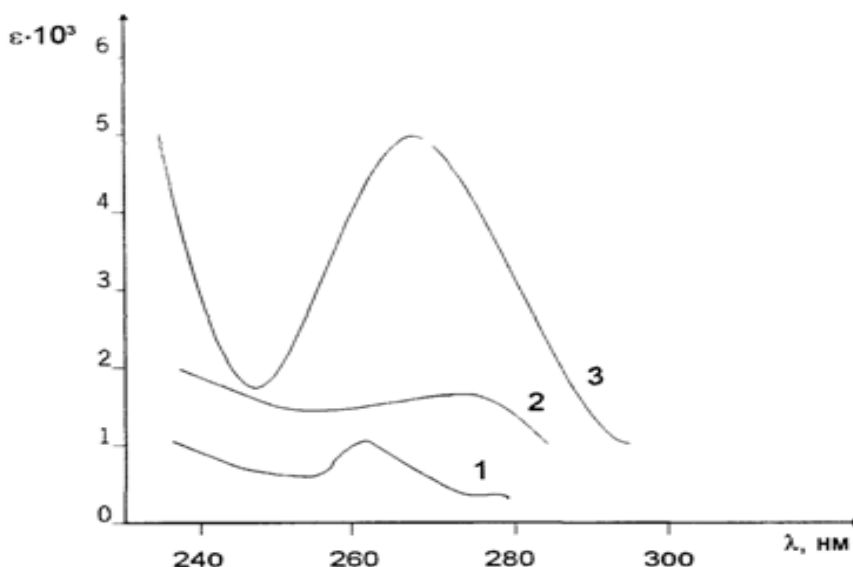


Рис. 1.52. Спектри поглинання фенілаланіну (1), тирозину (2) і триптофану (3)

Примітка: ϵ – коефіцієнт молярної екстинкції; λ – довжина хвилі.

Певний внесок у поглинання білків також роблять амінокислоти гістидин та сірковмісні амінокислоти (метіонін, цистеїн).

Хромофорні групи мають нуклеотиди, нуклеозиди і азотисті основи нуклеїнових кислот, ряд інших речовин як біологічного, так і небіологічного походження.

У спектрометрії широко застосовується метод визначення концентрації речовини, яка досліджується, за *калібрувальним графіком*. Спочатку за використання порівняльного (контрольного) зразка, який містить той же розчин, що і експериментальний, але без речовини, що досліджується, і шляхом зміни ширини щілини виставляється нульове значення екстинкції (ϵ). Потім будують калібрувальний графік. З цією метою для встановлених із усіх досліджень стандартних умов проводять виміри для проб-стандартів, які містять різну, але відому концентрацію досліджуваної речовини (від мінімально ймовірної в експериментальному зразку до максимально можливої). Після низки вимірювань будують графік залежності поглинання (екстинкції) проби-стандарту від концентрації (C) речовини, що досліджується (рис. 1.53). У подальшому вимірюють екстинкцію експериментального зразка в

тих же самих стандартних умовах і за калібрувальним графіком визначають концентрацію досліджуваної речовини.

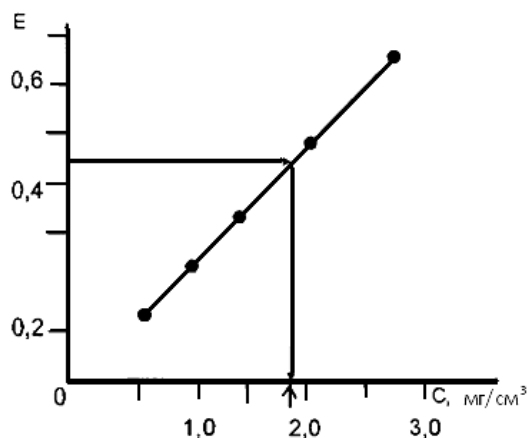


Рис. 1.53. Калібрувальний графік для визначення концентрації досліджуваної речовини

При проведенні спектрометричних досліджень із використанням калібрувального графіка слід керуватися наступними правилами:

1. В порівняльній (контрольній) кюветі при встановленні нульового значення екстинкції повинні бути всі компоненти розчину, крім речовини, що досліджується.

2. Умови для всіх досліджень повинні бути стандартними, крім концентрації речовини, що досліджується.

3. Вимірювання необхідно проводити в максимумі поглинання досліджуваної речовини, оскільки цим досягається найбільша чутливість. Якщо положення максимуму невідоме, то його необхідно визначити.

4. При побудові калібрувального графіка вимірювання екстинкції для однієї концентрації досліджуваної речовини (як і експериментального зразка) необхідно проводити декілька разів (не менше трьох) і на криву наносити всі одержані значення, а не їх середнє арифметичне. Даний спосіб побудови калібрувального графіка наочно показує точність визначення концентрації таким шляхом. Доцільно також використовувати математичні методи обробки результатів, які визначають точність проведених досліджень.

5. Якщо калібрувальний графік становить собою лінійну залежність, для її побудови необхідно не менше п'яти точок (вимірювань зразків-еталонів з не менше трьома повторами). Для побудови

нелінійного калібрувального графіка таких точок потрібно значно більше.

6. Калібрувальні графіки, які одержані з реагентами різних партій, як правило, не співпадають, тому при зміні партії необхідно знову отримати цей графік.

7. Калібрувальний графік не обов'язково повинен проходити через нуль вісі координат. Це обумовлене тим, що для розчинів порівняння рідко вдається одержати точно таке ж співвідношення всіх компонент, що і для зразка.

8. Не слід екстраполювати калібрувальну криву до значень екстинкції, які лежать вище останніх експериментально одержаних результатів. Якщо не потрібно вимірювати екстинкцію при її значеннях, що близькі до 1,0, то виміри доцільно проводити в інтервалі 0,1–0,6, оскільки в цьому інтервалі результати будуть найточнішими, тому що шкала спектрофотометра для значень екстинкції логарифмічна.

9. У випадку, коли значення екстинкції експериментального зразка лежать за верхньою межею калібрувального графіка, для його побудови необхідно приготувати зразок-еталон такої концентрації, щоби значення екстинкції експериментального зразка потрапили на калібрувальний графік. Можна також розвести експериментальний зразок тим же розчином, який міститься в порівняльній пробі. Однак слід пам'ятати, що розведення можна проводити тільки у випадку, коли поглинання зразка підпорядковується закону Ламберта-Бугера-Бера (див. пункт 1.1.4.4). Краще не розводити розчин, що містить досліджувану речовину, а скористатися кюветами з меншим оптичним шляхом.

10. Домогтися ідентичних результатів у повторних вимірюваннях можна лише тоді, коли дослідження проводяться на справній апаратурі, при суворому дотриманні умов досліджень (ретельно визначати об'єми розчинів, контролювати температуру розчинів, вологість повітря, час тощо).

Суттєвим є ідентифікація в досліджуваному зразку певних або випадкових домішок. Якщо основна речовина в зразку відома або її наявність виявлена за спектром, то для полегшення ідентифікації інших речовин (домішок) зручно повністю або хоча би частково виключити з спектру смуги вже відомої речовини. Це проводиться, як правило, при використанні двопроменевого спектрофотометра, коли в кювету порівняння додають відому речовину. Після

виявлення спектру домішки в ньому ідентифікують смуги речовин, які входять у цю домішку. Для цього використовують спектри еталонних речовин. *Еталонними* називаються зразки речовин або матеріалів з точно відомим хімічним складом. До них пред'являють ряд вимог:

1. За своїм хімічним складом, виготовленням, обробці, за формою та іншим показникам еталонні зразки повинні повністю відповідати зразкам, які аналізуються.

2. Еталони повинні бути строго однорідними за своїм хімічним складом і структурою.

3. Хімічний склад еталонів повинен бути визначений різними аналітичними методами незалежно один від одного.

Необхідно мати набір еталонів з різним вмістом речовини, що визначається. Інтервал концентрації цієї речовини в еталонах повинен відповідати або дещо переверщувати інтервал концентрацій у зразках, які аналізуються.

Часто зразок, який досліджується, становить складну суміш великої кількості індивідуальних речовин. В цьому випадку для їх ідентифікації використовують так званій *структурно-груповий аналіз*. Він зводиться до виявлення речовин з групами атомів, які мають певну структуру. В якості *аналітичних смуг*, тобто тих, які можуть однозначно характеризувати наявність певної речовини (домішки) в зразку, що аналізується, вибирають ті, які найінтенсивніші і вільні від накладання з боку смуг інших компонентів проби, що аналізується. Іноді використовують і смуги, що перекриваються, але у цьому випадку необхідно компенсувати або врахувати смуги від інших речовин з тим, щоб точно встановити, присутня або ні аналітична смуга в спектрі.

Для вибору аналітичної смуги необхідно визначити відмінність однієї від іншої молекул, які присутні в суміші. Для кожної речовини знаходять характерну для неї групу атомів або інший елемент структури.

Аналітичні смуги, які зручні для виявлення індивідуальних речовин в їх суміші, відносно легко знайти, якщо порівняти спектр зразка, що аналізується, зі зразками, в яких ця речовина присутня і в яких – відсутня. В тому випадку, коли вдається повністю компенсувати смуги спектра, які зумовлені основною і відомою речовиною зразка, то в якості аналітичної смуги можна обрати будь-яку інтенсивну смугу домішки.

Одне із застосувань спектроскопічного аналізу у видимій і УФ-областях – це визначення хімічної структури речовин, однак для точного такого аналізу необхідно, як правило, залучити інші методи – інфрачервону і полум'яну спектроскопію, електронний парамагнітний і ядерний резонанси, мас-спектрометрію тощо.

1.1.8. Інфрачервона спектрофотометрія

Інфрачервона (лат. *infra* – під) область електромагнітного випромінювання поділяється на ближню інфрачервону (довжина хвилі 750 нм – 2 мкм), власне інфрачервону (2–25 мкм) і дальню інфрачервону (25–600 мкм) області.

Для асиметричних молекул, які складаються з n атомів, згідно теорії молекулярних коливань, може бути $3n - 6$ нормальних коливань (руху атомів молекули, при якому вони одночасно проходять положення рівноваги), з яких $2n - 5$ приводять до деформації зв'язків і $n - 1$ – до їх розтягування. На рис. 1.54 (див. також рис. 1.15) ці коливання наведені для молекули вуглекислого газу (CO_2).

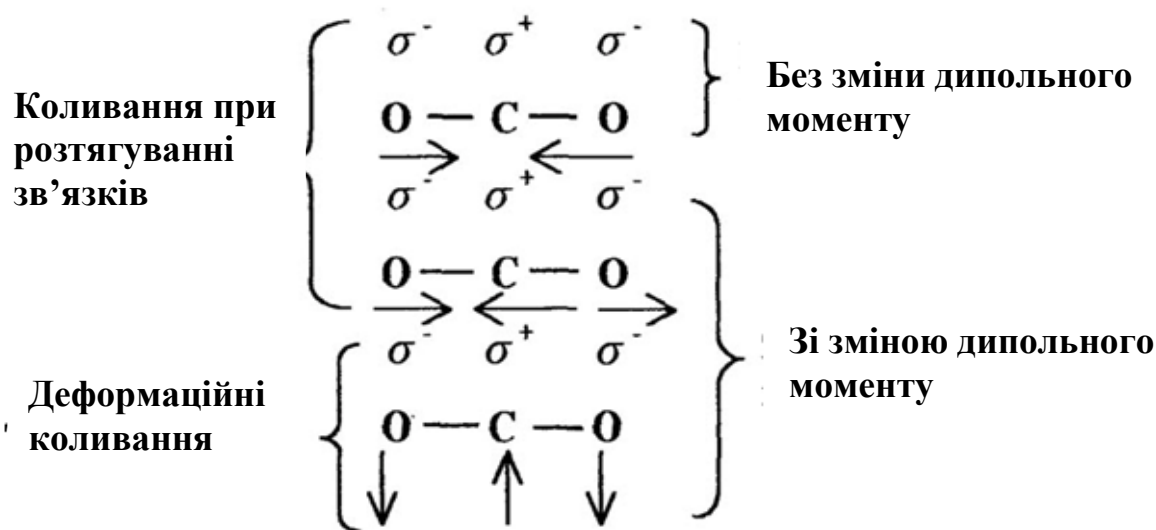


Рис. 1.54. Можливі типи коливань атомів у молекулі CO_2

Коливання атомів у складі молекули, які супроводжуються зміною дипольного моменту (зміщенням заряду), мають особисті резонансні частоти поглинання в інфрачервоній області (ІЧ-області). Інші коливання реєструються за допомогою спектроскопії комбінаційного розсіювання (рамановської спектроскопії, див. пункт 1.1.9.1).

Найпоширенішою ІЧ-областю для визначення структури речовин, просторової конформації і аналізу структурних ізомерів молекул є область з довжиною хвиль 1–25 мкм. В ІЧ-спектрометрії використовують, як правило, значення частот (хвильові числа), величина яких обернена довжинам хвиль ($\nu = 1/\lambda$). Діапазон хвиль 1–25 мкм відповідає хвильовим числам 10 000–400 см^{-1} .

Інфрачервоні спектри кожної молекули абсолютно специфічні, тому їх можна розглядати як своєрідні «відбитки пальців» молекул. Молекули, які складаються з багатьох атомів, мають велику кількість коливань, що визначають їх ІЧ-спектри. Так, наприклад, молекула, яка складається з 55 атомів має 144 таких коливань. Інтерпретація ІЧ-спектрів багатоатомних молекул полегшується тим, що положення смуг поглинання в ІЧ-області однакових груп різних молекул ідентичне. Це подібне до спектрів поглинання хромофорів (див. пункт 1.1.7). Крім того, поглинання ІЧ-випромінювання групою атомів у молекулі залежить від їх оточення, що викликає зміщення частоти (довжини хвилі) поглинання. Так, наприклад, вдається розрізнити коливання С–Н–зв'язку в групах $=\text{CH}_2$ і $-\text{CH}_3$. При збільшенні енергії зв'язку атомів, наприклад, при утворенні подвійних зв'язків, частота коливання при розтягуванні зв'язків збільшується, тобто зменшується довжина хвилі поглинання світла. Водночас збільшення *приведеної маси*, наприклад, атомів А і Б ($M_A M_B / M_A + M_B$) зменшує частоту коливання атомів, тобто поглинається світло більшої довжини хвиль. Для будь-якого зв'язку частота коливань при розтягуванні більше, ніж при деформації (рис. 1.54).

Спектрофотометри, які використовують для реєстрації ІЧ-спектрів, мають таку ж будову, як і спектрофотометри для видимої і УФ-області (рис. 1.50). Відмінності полягають лише в конструкції окремих пристроїв. Крім того, в ІЧ-спектрофотометрії використовують, як правило, двопроменеві спектрометри, котрі дозволяють автоматично компенсувати всі побічні ефекти, які обумовлені розчинником і домішками, а також сильним поглинанням ІЧ-випромінювання CO_2 і парою H_2O повітря.

Метод інфрачервоної спектроскопії дає можливість одержати відомості про відносні положення молекул протягом дуже коротких проміжків часу. Інфрачервона спектроскопія має ряд переваг перед спектроскопією у видимій та ультрафіолетовій областях, так як дозволяє простежити зміну всіх основних типів зв'язків у моле-

кулах досліджуваних речовин. При використанні інфрачервоної спектроскопії для визначення якісного і кількісного складу природних сумішей не відбувається руйнування речовин.

На основі ІЧ спектрів можна проводити якісний та кількісний аналіз речовини. Інфрачервоні спектри використовуються, наприклад, для ідентифікації лікарських препаратів.

1.1.8.1. Джерела світла в ІЧ-спектрофотометрах

Найбільш зручні джерела безперервного світла ІЧ-діапазону – нагріті тверді тіла. Атоми і молекули в твердому тілі тісно пов'язані між собою, що спричинює встановлення теплової рівноваги між енергією всіх видів руху таким чином, що випромінювання залежить, насамперед, від температури твердого тіла.

Ідеальним тепловим джерелом світла є так зване «абсолютно чорне тіло». Довжину хвилі максимуму його випромінювання при різних температурах обчислюють за формулою:

$$\lambda = \frac{2898}{T},$$

де λ – довжина хвилі максимуму випромінювання, мкм; T – абсолютна температура в градусах Кельвіна.

Випромінювання реальних твердих тіл відносно мало відрізняється від випромінювання «абсолютно чорного тіла» (рис. 1.55).

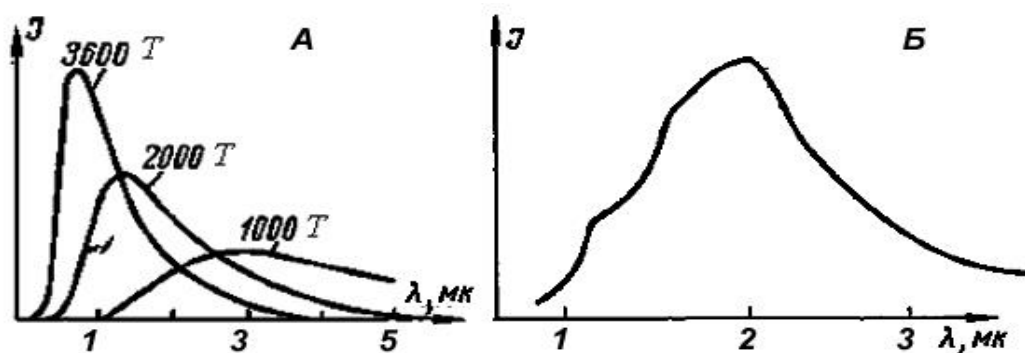


Рис. 1.55. Спектри випромінювання «абсолютно чорного тіла» при різних температурах (А) та силітового стрижня (Б)

П р и м і т к а: I – інтенсивність випромінювання; λ – довжина хвилі.

На практиці використовують, в основному, наступні джерела світла в ІЧ-області.

1. Лампи розжарювання з вольфрамовою ниткою (температура розжарювання приблизно 3 000 К), спектральна область яких лежить в межах 400–2 000 нм ($25\,000\text{--}5\,000\text{ см}^{-1}$), причому максимум у спектрі випромінювання припадає на короткохвильову частину діапазону. Лампи розжарювання з ніхромовою ниткою випромінюють промені з більшою довжиною хвилі, ніж з вольфрамовою ниткою, але вони менш потужні.

2. Силітові стрижні (штифти Глобара), які при нагріванні електричним струмом випромінюють у діапазоні 2,0–33,3 мкм ($5\,000\text{--}300\text{ см}^{-1}$). Приблизний спектр випромінювання силітового стрижня наведений на рис. 1.55 Б.

3. Штифт Нернста (спресована суміш ZnO_2 , GeO_2 , Y_2O_3 , ThO_2) із спектральним діапазоном 2,0–33,3 мкм ($5\,000\text{--}300\text{ см}^{-1}$).

1.1.8.2. Монохроматори в ІЧ-спектрофотометрах

Спочатку як монохроматори в ІЧ-спектрофотометрах використовували призми переважно з калію бромистого (KBr) або натрію хлористого (NaCl), оскільки звичайне скло непрозоре для ІЧ-випромінювання. Межа прозорості KBr-призм – до 33,3 мкм (300 см^{-1}), а NaCl-призм – до 20 мкм (500 см^{-1}). Такі призми дуже дорогі і неміцні. У деяких випадках замість них використовували дзеркала з полірованого Алюмінію, але при кожному відбитті втрачається до 20 % інтенсивності випромінювання.

Нині в ІЧ-спектрофотометрах, як правило, використовують дифракційні ґратки. Це пояснюється не тільки кращою роздільною здатністю і лінійною залежністю дисперсії від довжини хвиль, але і більшою економічністю дифракційних ґраток. На відміну від дифракційних ґраток, які використовуються у видимій і УФ-областях, такі ґратки для ІЧ-спектрофотометрії мають значно менше штрихів, як правило, 300 або 600 штрихів/мм. Звичайно для усунення інтерференції променів, які виходять з дифракційної ґратки, використовують малодисперсні призми або набір інтерференційних фільтрів.

1.1.8.3. Реєструючі пристрої в ІЧ-спектрофотометрах

Для реєстрації ІЧ-випромінювання використовують, як правило, спеціально підібрану батарею *терморезисторів* (грецьк. *therme* – тепло, жар та англ. *resistor* – опір) – пристроїв, які змінюють електричний опір при нагріванні ІЧ-випромінюванням. В якості пристроїв, які змінюють електричні властивості при нагріванні також використовують *напівпровідники*. Теплові приймачі називають *болометрами* (грецьк. *bole* – промінь та *metron* – міра). Їх розташовують у скляному балоні з відкачаним повітрям і який має «прозоре» для ІЧ-випромінювання віконце.

Застосовуються в ІЧ-спектрофотометрії також термоелементи, в яких робочим пристроєм є *термопара* – пристрій, який при нагріванні генерує електрорушійну силу (ЕРС), тобто різницю електричних потенціалів, яка після підсилення реєструється. Підвищення температури приймача ІЧ-випромінювання і ЕРС термопари пропорційні енергії поглинутого випромінювання. Для зменшення теплопередачі термоелемент розташовують в балоні з «прозорим» для ІЧ-випромінювання віконцем і з якого відкачане повітря.

Крім робочого спаю термопари, в термоелементі є ще так званий *компенсаторний спай*, на який не потрапляє випромінювання. На підсилювач подається тільки різницевий сигнал. Таким чином, при зміні температури в приміщенні лабораторії обидва спаї дають однакову ЕРС з протилежними знаками і сигнал на виході термоелемента не з'являється.

Іноді для реєстрації ІЧ-випромінювання використовують більш чутливий, але дорогий *елемент Голя* – чутливий до тиску пристрій, який складається зі запаяного балона з газом, який має «прозоре» для ІЧ-випромінювання віконце. При нагріванні ІЧ-випромінюванням газ розширюється і змінюється його тиск, що вимірюється.

В ІЧ-спектрофотометрах ширина щілини змінюється автоматично, щоби при скануванні на реєструючий пристрій від кювет зі зразком і порівняння (контрольної) потрапляла стала кількість ІЧ-випромінювання.

1.1.8.4. Приготування зразків для ІЧ-спектрофотометрії

Зразки для ІЧ-спектрофотометрії не можна приготувати у воді, оскільки вона дуже сильно поглинає в ІЧ-області. В деяких випадках знімають ІЧ-спектри одночасно у H_2O і D_2O . В певних діапазонах ці спектри не співпадають, тому при їх поєднанні можна одержати ІЧ-спектр досліджуваної речовини.

У деяких випадках в якості розчинника в ІЧ-спектрофотометрії використовують такі речовини як хлороформ, метанол, вуглець чотирихлористий, спеціальні багатокомпонентні суміші, які містять Сульфур, а також хлористоводневу, оцтову, мурашину та інші кислоти. В одному такому розчині не вдається зафіксувати більшу частину ІЧ-спектру, тому виникає потреба розчиняти досліджувану речовину в декількох таких розчинниках і визначати для кожного з них в тих же діапазонах ІЧ-випромінювання спектри, де цей розчинник «прозорий» для відповідних променів. Водночас використання всіх цих розчинників для ІЧ-спектрофотометрії все ж таки обмежене, оскільки вони здатні, хоча і менше, ніж H_2O , поглинати ІЧ-випромінювання. Крім того, в органічних розчинниках розчиняються тільки *гідрофобні* (грецьк. *hydro* – вода, *phobos* – страх) речовини, тобто ті, які нерозчинні у воді (жири та жироподібні речовини тощо). Тому існує декілька ефективних методів приготування зразків для ІЧ-спектрофотометрії:

1. *Метод приготування суспензії зразка в імерсійному середовищі.* Згідно цього методу зразок розтирають з краплиною вазелінової олії у співвідношенні, як правило, 1:100 до одержання однорідної пасти, яку рівномірно розмазують між двома пластинками з KBr або NaCl . Замість вазелінової олії можна взяти парафін. Недолік цього методу – нерівномірність товщини шару пасти і неможливість впливати на зразок.

2. *Метод пресованих пігулок (дисків).* Цей метод полягає в тому, що досліджувану речовину змішують з KBr у співвідношенні, як правило, 1:300 і пресують під тиском приблизно $5 \cdot 10^8$ Па. Недолік цього методу – при пресуванні можна порушити кристалічну структуру речовини, що досліджується, частково зруйнувати складні молекули та ін.

3. *Метод тонких плівок.* В цьому методі розчин із речовиною, що досліджується, наносять на підкладку і розчинник випаро-

вується. Недоліком цього методу є зміна складу середовища (іонної сили, рН тощо) при випаровуванні. Найкраще готувати зразки на дистильованій воді.

Всі наведені вище методи приготування зразків для ІЧ-спектрофотометрії мають недоліки, які в певній мірі обмежують використання подібних досліджень. Нині набув широкого застосування метод ІЧ-спектрофотометрії, який базується на законах відбиття світла на межі розподілу речовин зі значно відмінними коефіцієнтами заломлення.

1.1.8.5. Основні умови розшифрування ІЧ-спектрів

При розшифруванні ІЧ-спектрів необхідно враховувати (за допомогою спеціальних таблиць) характеристичні частоти (хвильові числа), які, як правило, закладені у комп'ютер, що входить до складу ІЧ-спектрофотометра. Визначають досліджувані речовини, наявність характеристичних груп і діапазони частот їхніх смуг поглинання. Слід зважити на це, що для груп, які містять водневі зв'язки ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ та ін.) необхідно враховувати умови, за яких отримані ІЧ-спектри. Ці групи можуть бути зв'язані міжмолекулярними водневими зв'язками, внаслідок чого смуги поглинання в ІЧ-спектрі розширюються порівняно зі смугами вільних груп, які спостерігаються у розведених розчинах та газовій фазі.

При порівнянні табличних значень смуг поглинання характеристичних груп зі смугами поглинання ІЧ-спектра речовини, що досліджується, необхідно зважити на те, що інтерпретувати можна тільки деяку частину смуг, яка виявлена в ІЧ-спектрі досліджуваної речовини. Це пояснюється тим, що не завжди теоретично передбачені смуги поглинання можуть бути виявлені в ІЧ-спектрі речовини, що досліджується, оскільки окремі смуги можуть перекриватися, зміщуватися за межі вказаних частот під впливом розчинника і сусідніх груп тощо.

На рис. 1.56 А наведено ІЧ-спектр, а на рис. 1.56 Б для порівняння УФ-спектр 1-метил-3-фенілндана.

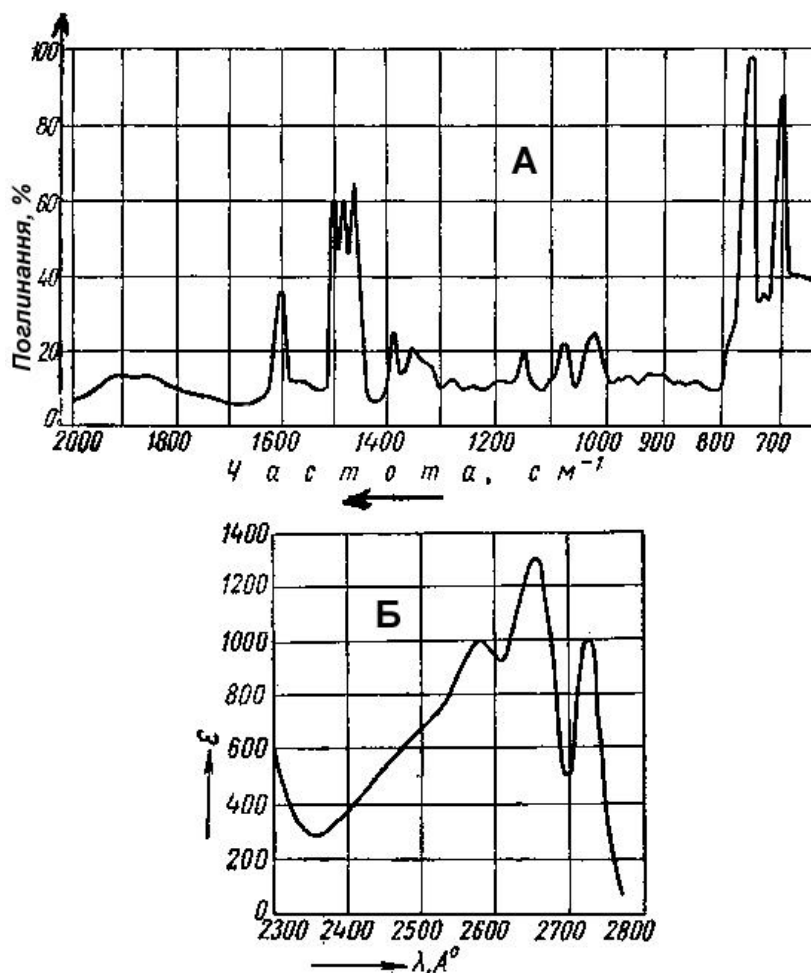


Рис. 1.56. Інфрачервоний (А) і ультрафіолетовий (Б) спектри поглинання 1-метил-3-феніліндана

Спектри речовин в ІЧ-області більш інформативні, ніж у видимій та УФ-області. Вони, звичайно, дозволяють розрізнити речовини з близькою структурою і хімічними властивостями. В той же час чутливість ІЧ-аналізу значно нижча і, як правило, не перевищує 10^{-3} – 10^{-2} %, а у видимій та УФ-областях спектру чутливість значно вища (10^{-7} – 10^{-6} %, а у деяких сучасних спектрофотометрів навіть 10^{-8} %). Але якщо в зразку містяться смолоутворювальні речовини, які сильно поглинають і розсіюють світло, то чутливість різко зменшується.

1.1.9. Оптичні методи, які базуються на явищі розсіювання, заломлення та поляризації світла

Все більше практичне застосування для аналітичних цілей отримують методи спектроскопії, які альтернативні до абсорбційного та емісійного якісного і кількісного аналізу речовин. До таких

методів, насамперед, відноситься спектроскопія комбінаційного розсіювання (раманівська спектрометрія), спектроскопія на основі релєївського розсіювання, нефелометрія, турбіметрія, рефрактометрія і поляриметрія.

1.1.9.1. Спектроскопія комбінаційного розсіювання

Коли монохроматичне світло проходить крізь прозоре середовище, то частина його поглинається, частина виходить без поглинання, а приблизно 10^{-6} частина світла, яке падає на зразок, розсіюється під прямим кутом в напрямку падіння світла. Менше 1 % розсіяного світла має іншу довжину хвилі. Це явище називається *ефектом Рамана* або *комбінаційним розсіюванням світла (КР-розсіюванням)*. Назва цього ефекту походить від того, що в КР-спектрах комбінується частота світла, яке падає, з частотою власних коливань молекул речовини, яка аналізується.

Механізм виникнення КР-спектрів можна пояснити наступним чином. Збуджені світлом молекули не завжди повертаються на висхідний рівень, оскільки:

1. При взаємодії кванта світла (фотона) з молекулою, яка знаходиться на одному з енергетичних рівнів, може статися передача енергії від цього кванта світла молекулі, яка переходить на один з коливальних підрівнів (іноді і на обертальні); наслідок цього – енергія розсіяного такого кванта світла зменшується, і в спектрі з'являються лінії, зміщені відносно до основної висхідної лінії в короткочастотну (довгохвильову) область – так звані *стоксівські лінії*.

2. У певних випадках при взаємодії кванта світла з молекулою може статися передача енергії від молекули цьому кванту і його частота збільшується, внаслідок чого в спектрі розсіювання з'являються лінії, зміщені відносно основної висхідної лінії в довгочастотну (короткохвильову) область – так звані *антистоксівські лінії*.

Вірогідність виникнення КР-спектрів значно нижча, ніж розсіювання квантів світла, які мають частоту (довжину хвилі) світла, яке падає на кювету від джерела світла (так зване релєєвське розсіювання, див. підпункт 1.1.9.2). Це спричинює те, що інтенсивність КР-спектрів дуже мала. Крім того, передача енергії збудженою молекулою кванту світла, що падає на кювету, менша,

ніж навпаки – квантом світла молекулі. Тому в КР-спектрах інтенсивність ліній стоксівської області більша, ніж антистоксівської.

Спектри комбінаційного розсіювання подібні ІЧ-спектрам, оскільки ті та інші обумовлені коливальними (у деяких випадках і обертальними) переходами в речовині, що досліджується. Проте правила відбору (див. підпункт 1.1.3.1), які визначають спектральні лінії в ІЧ-спектрі та їх інтенсивність і ліній-супутників в КР-спектрі, відмінні. Тому тільки частина ліній в КР-спектрі співпадає з такими в ІЧ-спектрі. Інша частина ліній КР-спектра відсутня в ІЧ-спектрах або має дуже малу інтенсивність. Також навпаки – не всім інтенсивним лініям в ІЧ-спектрі відповідають лінії в КР-спектрі. Також необхідно враховувати те, що на відміну від ІЧ-спектрів, які обумовлені наявністю постійно існуючих диполів (див. рис. 1.54), в КР-спектрах з'являються переходи на енергетичні коливальні підрівні (іноді і на обертальні), які обумовлені зміною поляризованості молекул.

Таким чином, при аналітичних дослідженнях КР-спектри та ІЧ-спектри доповнюють один одного, що сприяє більш широким можливостям аналізу складних сумішей. Хоча за своїм значенням для аналітичних цілей КР-спектрофотометрія дещо поступається ІЧ-спектрофотометрії, але все ж таки вона отримала широке розповсюдження як для вивчення молекулярної будови речовин, так і для кількісного аналізу. Типовий КР-спектр, зокрема, гуанозину, наведений на рис. 1.57.

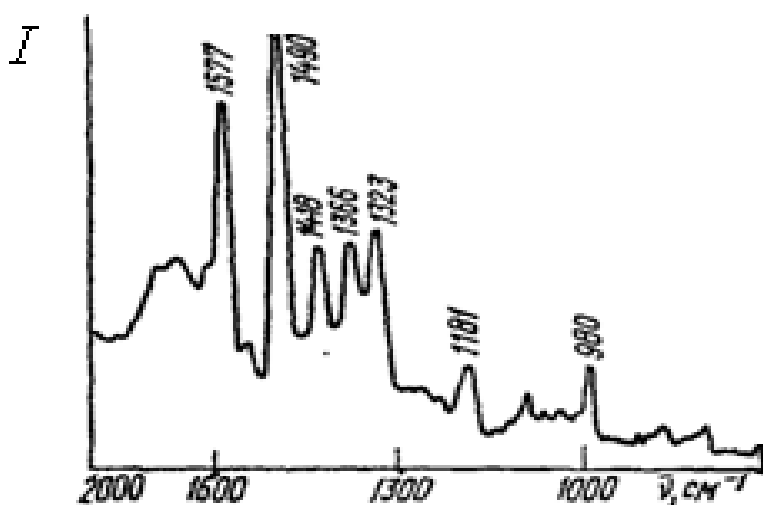


Рис. 1.57. Спектр комбінаційного розсіювання гуанозину
П р и м і т к а: I – інтенсивність; ν – хвильове число.

Важливою перевагою використання для аналізу КР-спектрів є можливість проводити дослідження у видимій і навіть у ближній УФ-області, тоді як при використанні тих же енергетичних переходів в ІЧ-спектрофотометрії необхідно скористатися менш зручними підходами в ІЧ-області. Дійсно, в КР-спектрах інтерес представляє не абсолютне значення частоти (або довжини хвилі) спектральної лінії, а різниця частоти лінії-супутника і основної незміщеної лінії, яка відповідає світлу, яке збуджує молекули. Тому за вибору зручної частоти (довжини хвилі) для збудження, отримуємо КР-спектр в тій же області. Частота спектральних ліній-супутників при цьому, звичайно, залежить від частоти світла, яке збуджує молекули, але різниця частот у всіх випадках залишається для даної речовини сталою.

Основний недолік КР-спектрофотометрії – низька чутливість. Звичайно при використанні серійних КР-спектрометрів частка речовини, яка визначаються в суміші, повинна бути не менше 0,5–1,0 %. Існують і більш чутливі такі прилади, але все ж таки не набагато. Основна причина цього – дуже мала інтенсивність ліній КР-спектру, про що вже йшла мова. Для підвищення чутливості КР-спектрометрів необхідно використовувати потужне джерело монохроматичного випромінювання для збудження молекул речовини, що досліджується. Раніше для цього використовували одну з інтенсивних ліній Меркурію. З цією метою одну або декілька потужних ртутних ламп встановлювали в освітлювачі в безпосередній близькості від кювети спеціальної форми зі зразком, що аналізується. Розсіяне світло збирали в напрямленні, яке перпендикулярне до напрямку випромінювання, яке збуджує молекули речовини, що досліджується. Це розсіяне світло проектували на щілину спектрального приладу. Між ртутною лампою і кюветою розміщувався світлофільтр, який поглинав випромінювання з іншими довжинами хвиль, а пропускав тільки те, яке і викликало збудження молекул речовини, що досліджувалася. Оскільки багато речовин, як вже відмічалось, розкладаються під дією УФ-світла, то в спектрофотометрах з ртутною лампою використовують для збудження молекул досліджуваної речовини спектральні лінії видимої області спектру.

У сучасних КР-спектрометрах як джерело монохроматичного і поляризованого світла використовують лазери (див. підпункти 1.1.4.8 і 1.1.5.5). Це збільшує вартість КР-спектрометрів, але покращує їх чутливість.

Зазвичай будова КР-спектрометрів подібна до будови спектрофотометрів, які використовуються для вимірювання іншими методами, зокрема у видимій і УФ-області. Принципова відмінність – застосування лазерів, а не комбінації призменого монохроматора і диференційної ґратки.

1.1.9.2. Релеївське розсіювання та його використання

Дослідження закономірностей розсіяння світла молекулами дає інформацію про розміри і форму цих молекул. Існує два основних методичних прийоми вимірювання світлорозсіювання розчинів. Один з них базується на закономірностях розсіювання світла малими частинками, геометричні розміри яких значно (в 10–20 разів) менші за довжину хвилі світла, яке падає на кювету, де містяться в розчині ці частинки. В цьому випадку молекули речовини, що досліджується, виступають як один центр розсіювання. Інший методичний прийом базується на закономірностях розсіювання світла великими частинками, геометричні розміри яких порівнянні з довжиною хвилі, що падає на кювету. За таких умов у складі однієї молекули може бути декілька незалежних центрів розсіювання і тому необхідно враховувати інтерференцію світла, яке розсіюється різними центрами однієї молекули.

Особливістю релеївського розсіювання є те, що на відміну від комбінаційного, воно має довжину хвилі, яка дорівнює довжині хвилі світла, яке падає.

Розсіювання світла малими частинками. Закономірності розсіювання світла малими частинками, геометричні розміри яких, як вже відмічалось, значно менші довжини хвилі падаючого світла, описав Р. Релей, тому цей ефект носить його ім'я. Було встановлено, що при опроміненні світлом таких частинок, які знаходяться в розчині, формується електричний диполь, який є джерелом вторинного випромінювання. Інтенсивність світла, розсіяного окремою молекулою як одним центром під кутом Θ описується рівнянням:

$$\frac{I_{\Theta}}{I_0} = \frac{4\pi^4 \alpha^2 (1 + \cos^2 \Theta)}{\lambda^4 r^2},$$

де I_{Θ} – інтенсивність розсіяного світла; I_0 – інтенсивність падаючого світла; r – відстань від розсіяної частинки до прийма-

ча світла; λ – довжина хвилі ($\lambda = \lambda_0/n_0$, де λ_0 – довжина хвилі у вакуумі, n_0 – показник заломлення середовища); α – поляризованість молекули (індукований момент частинки в розрахунку на одиницю напруженості електричного поля).

Можна показати, що існує така залежність:

$$\frac{Hc}{\tau} = \frac{1}{M} + 2Ac,$$

де

$$H = \frac{32\pi^3 n_0^2}{3\lambda_0^4 N_A} \cdot v^2, \quad \text{а} \quad v = \frac{n-n_0}{c},$$

λ_0 – довжина хвилі у вакуумі; n і n_0 – показники заломлення розчину і окремо розчинника відповідно; N_A – число Авогадро; τ – каламутність середовища, $\tau = \frac{32\pi^3}{3} \cdot \frac{n_0^2 (n-n_0)}{\lambda_0^4 a}$; a – число частинок в 1 см³ об'єму, $a =$

cN_A/M ; M – молекулярна маса; c – концентрація частинок; A – коефіцієнт, який враховує взаємодію частинок з розчином.

При вимірюванні залежності інтенсивності розсіяного світла від концентрації частинок, а також за використання наведеного вище рівняння, можна визначити молекулярну масу речовини в розчині. Вимірювання проводять під фіксованим кутом, як правило 90°, а також враховують розсіювання світла розчинником.

Розсіювання світла великими частинками. У випадку, коли геометричні розміри частинок в розчині порівнянні з довжиною хвилі світла, що падає на квівету, маємо:

$$\frac{Hc}{\tau} = \frac{1}{M} \cdot P(\theta) + Ac$$

де $P(\theta)$ – поправочний коефіцієнт, який враховує інтерференцію вторинного випромінювання.

Значення $P(\theta)$ для частинок різної форми будуть відмінні. Крім того, внаслідок інтерференції світла, яке розсіюється під різними кутами, його інтенсивність буде різною для частинок неоднакового геометричного розміру. Для характеристики цієї відмінності введено параметр $I_{45^\circ}/I_{135^\circ}$ – асиметрія розсіювання світла (I_{45° і I_{135° – інтенсивність розсіювання світла під кутом 45 і 135°, відповідно). При вимірі відношення $I_{45^\circ}/I_{135^\circ}$ за різних довжин хвиль можна

визначити розміри і форму частинок за відповідними калібрувальними графіками.

Релеївське розсіювання світла реєструють приладами, які залежно від використаної методики, визначають:

1. Інтенсивність світла, яке пройшло крізь зразок і порівнюють її з інтенсивністю світла, яке падає; різниця між ними дорівнює інтенсивності розсіяного світла (з врахування розсіювання світла на гранях кювет);

2. Інтенсивність світла, яке розсіюється під різними кутами.

У першому випадку можна скористатися звичайними спектрофотометрами, а в другому – спеціально сконструйованими приладами, в яких приймач світла (як правило, фотоелектронний помножувач, ФЕП) автоматично може розміщуватися під різними кутами щодо напряму падаючого світла, джерелом якого є, як правило, монохроматичне випромінювання лазера.

1.1.9.3. Нефелометричний метод аналізу

При проходженні світла крізь суспензію частинок відбувається бічне розсіювання світла, яке падає на кювету, що візуально сприймається як помутніння розчину. Якщо геометричні розміри частинок у суспензії більші, ніж довжина хвилі падаючого світла, то його розсіювання обумовлене заломленням світла на межі розподілу частинка-розчинник і відбиттям світла частинками. У випадку, коли довжина хвилі падаючого світла більша за геометричні розміри частинок, то відбувається дифракція світлових хвиль, огинання ними частинок (*ефект Тіндаля*). Саме ефект Тіндаля (або ефект «конусу світла») лежить в основі розпізнавання колоїдних розчинів від молекулярних.

Інтенсивність розсіювання збільшується з підвищенням кількості частинок, які розсіюють падаюче світло. Цей ефект лежить в основі визначення концентрації частинок суспензії – *нефелометрії* (грецьк. *perhele* – хмара) та *турбідиметрії* (лат. *turbo* – обертання, вихор).

При нефелометрії вимірюють інтенсивність розсіяного потоку світла в напрямі, який перпендикулярний (під кутом 90°) напряму падаючого світла.

Інтенсивність потоку світла, яке розсіюється частинками в розведеній суспензії (I_p), описується рівнянням:

$$I_p = k_1 I_0 \frac{Vc}{\sigma\lambda^4} \left(\frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2 + n_2^2} \right)^2,$$

де k_1 – коефіцієнт пропорційності; I_0 – інтенсивність потоку світла; V – об’єм частинок суспензії; c – концентрація частинок; σ – густина речовини частинок; λ – довжина хвилі падаючого світла; n_1 і n_2 – показники заломлення світла частинками суспензії і розчинника відповідно.

При нефелометричному аналізі значення величин V , λ , σ , n_1 і n_2 залишаються сталими, тому наведене вище рівняння можна спростити:

$$I_p = kc.$$

Таким чином, інтенсивність розсіяного світла прямо пропорційна концентрації частинок суспензії. Для двох суспензій з частинками однакової форми і розміру відношення інтенсивностей розсіяного світла пропорційне концентрації частинок:

$$\frac{I_{p1}}{I_{p2}} = \frac{c_1}{c_2},$$

звідки:

$$c_1 = I_0 \frac{I_{p1} c_2}{I_{p2}}.$$

Це рівняння використовується для нефелометричного аналізу, який проводиться за допомогою приладів, які отримали назву *нефелометри*. Вони діють за принципом урівноваження двох світлових потоків – від суспензії та від спеціального скляного розсіювача. Це забезпечується за допомогою діафрагми, яка змінює інтенсивність одного з цих потоків. Оптична схема нефелометра наведена на рис. 1.58.

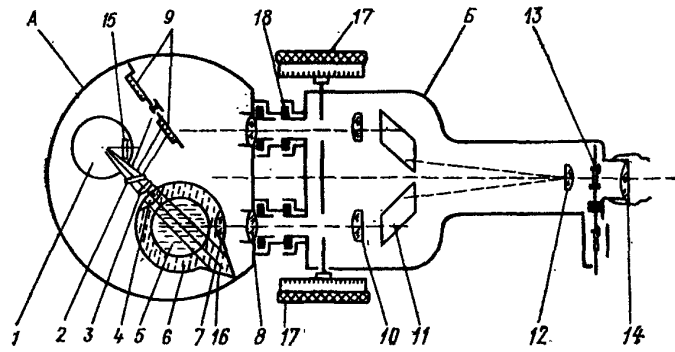


Рис. 1.58. Оптична схема нефелометра (пояснення див. текст)

П р и м і т к а: А – нефелометрична доточка; Б – фотометричний вимірювач;

1 – лампа; 2 – пластинка, що розділяє світловий потік; 3 – циліндрична лінза; 4 – конденсор; 5 – кювета; 6 – камера з дистильованою водою; 7 – об’єктив нефелометричної доточки; 8 – світлоуловлювач; 9 – лінза нефелометричної доточки; 10 – барабани діафрагм; 11 – об’єктиви фотометричного вимірювача; 12 і 13 – призми; 14 – окуляр; 15 – світлофільтр для дослідження зразків, які флуоресціюють; 16 – розсіювачі; 17 – проміжна трубка; 18 – світлофільтри.

Світло від освітлювача (1) проходить крізь прозору пластину (2), лінзу (3), конденсор (4) і потрапляє в камеру (6) з дистильованою водою (для урахування і зменшення розсіювання світла стінками кювети), в якій знаходиться кювета (5) з суспензією, що досліджується. Світловий потік, який пройшов крізь кювету, гаситься у світлоуловлювачі (8), а та частина, яка розсіювалася частинками суспензії, потрапляє крізь лінзу (9) у фотометричний вимірювач і створює яскравість однієї половинки поля зору окуляра (14). Друга частина світлового потоку, яка відбилася від скляної пластинки (2), потрапляє на розсіювач (16) і крізь лінзу (9). Далі вона потрапляє у фотометричний вимірювач і створює яскравість другої половинки поля зору окуляра (14). Світлові потоки у фотометричному вимірювачі проходять крізь діафрагми, кожна з яких зв’язана зі своїм барабаном (10) з нанесеними шкалами. Обидва світлових потоки об’єктивами (11) призм (12, 13) зводяться до вісі окуляра (14) і потрапляють в очі дослідника, який бачить поле зору у формі кола, яке розділене вертикальною рисою на дві половинки зору окуляра (14). На барабанах діафрагми нанесені дві шкали –

світлопропускання і оптичної густини (екстинкції). Обертанням барабанів урівноважуються фотометричні поля за яскравістю. При цьому відраховують показники, як правило, оптичної густини.

Для визначення концентрації частинок речовини, що досліджується нефелометричним методом, у попередніх дослідженнях будують калібрувальний графік (по вісі абсцис відкладають значення концентрації частинок, а по вісі ординат – відповідні їм значення оптичної густини). В подальшому вимірюють оптичну густину експериментального зразка, який містить ті ж самі частинки, що і зразки-стандарт, і за калібрувальним графіком згідно значень цієї величини визначають концентрацію частинок досліджуваної речовини в цьому зразку.

У практиці часто використовують нефелометричне визначення хлориду і сульфату в природних водах.

1.1.9.4. Турбідиметрія

Цей метод заснований на вимірюванні ослаблення світлового потоку, який проходить через суспензію, у напрямі, який співпадає з напрямом падаючого світла. У цьому випадку зв'язок між інтенсивністю світла, яке падає на кювету з розведеною суспензією і яке пройшло крізь неї, описується наступним наближеним рівнянням:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = k_1 \frac{lc r^3}{r^4 + \alpha \lambda^4},$$

де A – здатність до розсіювання (величина, яка аналогічна оптичній густині); I_0 – потужність світлового потоку, який падає на суспензію; I – потужність світлового потоку, який пройшов суспензію; l – товщина шару, який розсіює світло; r – середній діаметр частинок; λ – довжина хвилі; k_1 – коефіцієнт пропорційності, який залежить від природи суспензії і методу дослідження; α – константа, яка залежить від методу дослідження; c – концентрація частинок.

При турбідиметричному методі аналізу вимірювання проводять в умовах, коли k_1 , r , l і α – сталі величини, тому вищенаведене рівняння можна спростити:

$$A = klc.$$

Зазначене рівняння подібне до рівняння Ламберта-Бугера-Бера (див. підпункт 1.1.4.4). Це дозволяє в турбідиметрії використовувати для вимірів спектрофотометри.

Часом надають перевагу визначенню протеїнових фракцій сироватки крові турбідиметричним методом над електрофоретичним. Оскільки фосфатні розчини певної концентрації осаджують з утворенням дуже дрібної зависі різні протеїнові фракції сироватки крові, то за ступенем каламутності розчинів (вимірюється фотоелектроколориметрично) можна визначити концентрацію α -, β - і γ -протеїнів у досліджуваному матеріалі.

Турбідиметричний і нефелометричний методи мають велику чутливість, але вони не набули широкого застосування на практиці серед оптичних методів, оскільки важко створити такі умови дослідження, щоби відтворити однакові за розмірами частинки суспензії, не дати їм можливості коагулювати тощо. Крім того, розрахунки, які покладені в основу визначення концентрації досліджуваних частинок речовини, справедливі тільки для сильно розведених суспензій (концентрація не більше 100 мг/дм³).

1.1.9.5. Рефрактометрія

При переході променя світла з одного прозорого середовища в інше змінюється напрям променя – відбувається його заломлення (див. підпункт 1.1.4.2). Цей ефект оцінюється за величиною показника заломлення світла, який залежить від природи середовища, довжини хвилі світла, температури тощо.

Метод аналізу речовин, який базується на вимірюванні показника заломлення світла, називається *рефрактометричним* (лат. *refractus* – заломлення).

За допомогою рефрактометричного методу визначають вміст сухих речовин за сахарозою у продукції цукрового виробництва, фруктових і овочевих соках (лабораторні роботи 15, 16), а також визначення протеїну в сечі, сироватці крові за клінічних досліджень.

При збереженні сталими довжини хвиль світла та умов проведення досліджень, від яких залежить показник заломлення світла,

його значення будуть визначатися тільки природою середовищ, які контактують між собою.

Орбітальні електрони атомів здійснюють коливальні рухи на своїх орбітах під впливом дії світла (світлової хвилі). На ці електрони впливають сусідні заряджені частинки – електрони та ядра інших атомів, «заряджені групи» молекул. Чим більше таких заряджених частинок в одиниці об'єму, тим більше буде проявлятися такий вплив. Це в загальному вигляді пояснює залежність показника заломлення світла від густини речовини середовища:

$$f(n) = rd,$$

де $f(n)$ – функція, яка описує зміну показника заломлення світла n ; r – коефіцієнт пропорційності, який називається *питомою рефракцією*; d – густина речовини (кг/м³).

Функція $f(n)$, якщо виходити з уявлень про природу поляризації молекул в електричному полі (див. підпункт 1.1.4.8) можна представити в наступному вигляді:

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \text{ або } \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} = rd,$$

звідки:

$$r = \frac{n^2 - 1}{(n^2 + 1)d} \text{ (м}^3\text{/кг)}.$$

Якщо через α позначити певний коефіцієнт, значення якого характеризує величину диполя, який виникає під впливом електричного поля, то для речовини з молекулярною масою M значення питомої рефракції (r) пропорційне коефіцієнту α :

$$r = \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{N_A \alpha}{M},$$

де N_A – число Авогадро, яке дорівнює $6,023 \cdot 10^{23}$.

Коефіцієнт α залежить від природи речовини і називається *поляризованістю*, а його величина – *молярною рефракцією*.

$$R = rM = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \cdot \frac{M}{d} = \frac{4\pi N_A \alpha}{3} = 2,52 \cdot 10^{24} \alpha \text{ (моль/м}^3\text{)}.$$

Визначення величини молярної рефракції є одним із методів, які використовуються для встановлення складу речовин, структури їх молекул.

Залежність показника заломлення світла від концентрації досліджуваної речовини визначається експериментально за калібрувальним графіком. Для його побудови встановлюють значення коефіцієнта заломлення світла для зразків-стандартів. На основі одержаних результатів будують калібрувальний графік у координатах: вісь абсцис – концентрація досліджуваної речовини, а вісь ординат – значення показника заломлення світла. Для багатьох речовин спостерігається залежність:

$$n = n_0 + kc \quad \text{або} \quad c = (n - n_0)k,$$

де n і n_0 – показники заломлення світла розчину, який містить досліджувану речовину та чистого (без неї) розчинника, відповідно; c – концентрація речовини; k – експериментально встановлений коефіцієнт на основі вимірювання зразків-стандартів, який визначається за калібрувальним графіком.

Показник заломлення світла середовищ визначається за допомогою приладів, які називаються *рефрактометрами*. Найрозповсюдженішими є рефрактометри типу Аббе і Пульфриха. Вимірювання цими приладами показника заломлення світла у видимій області спектра базується на визначенні величини граничного кута заломлення світла.

Згідно із законами оптики (див. підпункт 1.1.4.2) відношення показників заломлення світла відносно повітря другого середовища (n_2) і першого (n_1) відповідає відношенню синусів кута падіння (α) і кута заломлення (β) (рис. 1.59, а також рис. 1.18). Ці величини визначають відносний коефіцієнт заломлення (n):

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1} = n.$$

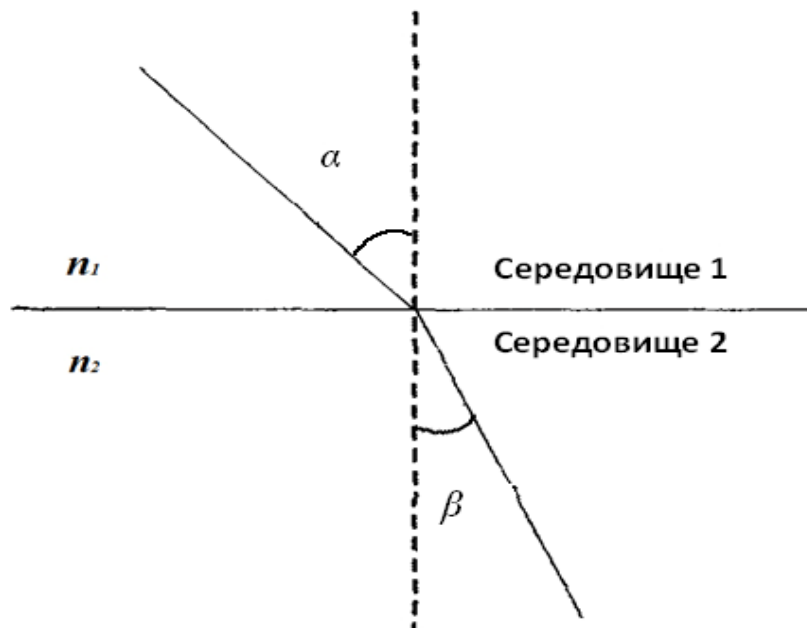


Рис. 1.59. Заломлення світла на межі розподілу середовища з меншою (1) і більшою (2) оптичною густиною

При збільшенні кута падіння α буде збільшуватися і кут заломлення β , але за умови $n_2 > n_1$ він завжди буде менше α . Таким чином, коли в цьому випадку кут падіння досягне 90° , величина кута заломлення набуває певного граничного значення, але меншого 90° . Цей кут заломлення називається *граничним кутом заломлення*. При цьому промінь який падає, буде ковзати вздовж поверхні розподілу двох середовищ. Якщо $\alpha = 90^\circ$, то $\sin\alpha = 1$. Тоді вищенаведене співвідношення можна записати:

$$\frac{\sin 90^\circ}{\sin \beta} = \frac{1}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1}$$

або

$$n_1 = n_2 \sin \beta.$$

Якщо n_2 має відоме значення (наприклад, друге середовище — це призма з скла), то для визначення n_1 достатньо вимірювати величину кута β і вираховувати $\sin \beta$.

У рефрактометрі типу Аббе (рис. 1.60) призмений пристрій складається з вимірювальної (1) та освітлювальної (2) призм, між гіпотенузними гранями яких знаходиться шар рідини, яка містить досліджувану речовину.

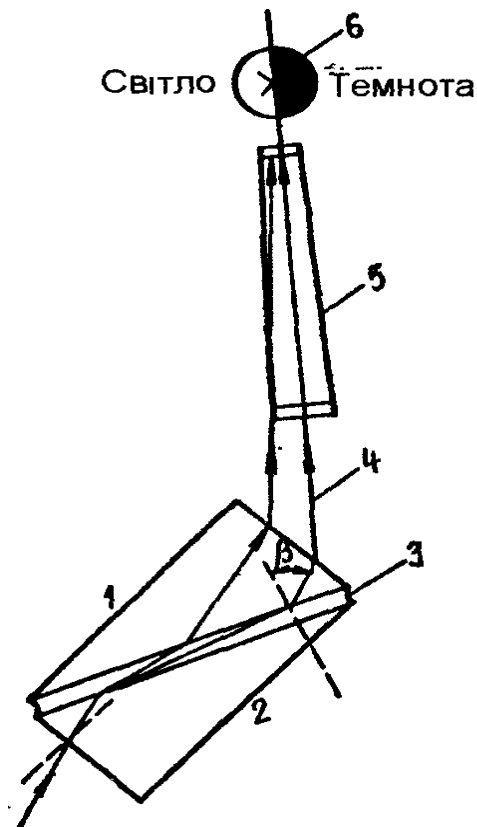


Рис. 1.60. Схема рефрактометра типу Аббе

П р и м і т к а: 1 – вимірювальна призма; 2 – освітлювальна призма; 3 – шар рідини, що містить досліджувану речовину; 5 – зорова трубка; 6 – поле зору.

Поверхня гіпотенузної грані освітлювальної призми матова і розсіює світло, яке падає на досліджуваний зразок крізь освітлювальну призму. Промені світла перетинають шар рідини з досліджуваною речовиною в різних напрямках, певна частина яких (4) потрапляє через вимірювальну призму (1) майже під кутом 90° (межові промені) у зорову трубку (5), в якій у фотометричному полі зору (6) за положенням лінії підрахунку визначають величину показника заломлення світла досліджуваної речовини. Шляхом використання спеціальних таблиць за значенням показника заломлення світла встановлюють склад досліджуваної речовини та її концентрацію у зразку.

Для зменшення дисперсії, яка викликає розкладання спадного світла, і внаслідок цього появу в зоровій трубці розмитої та забарвленої межі, в рефрактометрах використовують спеціальні пристрої – *компенсатори дисперсії*, які містять так звані *призми Амічі*, що складаються з трьох призм, виготовлених з різних сортів оптичного скла і склеєних спеціальним клеєм. Оптичні характеристики цих призм підібрані таким чином, що тільки хвилі лінії D в спектрі Натрію ($\lambda_D = 583,9$ нм, жовта лінія) проходять крізь цю призму без змін. У той же час промені лінії C ($\lambda_C = 656,5$ нм, червона лінія в спектрі Натрію) та лінії F ($\lambda_F = 486,2$ нм, синя лінія в спектрі Натрію) відхиляються на певні кути, які протилежні за знаком тим кутам, які відповідають відхиленню променів світла за рахунок дисперсії (тих же кольорів вимірювальної призми). В результаті підсумовування рівних, але протилежних за знаком відхилень довжин хвиль, дисперсія практично зводиться до нуля.

У *рефрактометрі типу Пульфріха*, схема якого наведена на рис. 1.61, кут між входною (1) і вихідною (2) призмами дорівнює точно 90° . Краї грані входної призми, через які падають промені світла, мають форму кола. На цій грані розміщують відповідну циліндричну кювету (3), в яку додають розчин, що містить досліджувану речовину. В таких рефрактометрах використовують монохроматичні джерела світлу.

До рефрактометру типу Пульфріха додаються довідкові таблиці, які дозволяють знаходити показник заломлення світла за величиною кута, який вимірюється. Якщо n – світловий показник світла рідини, яка містить досліджувану речовину, а N – показник заломлення світла вимірювальної призми, то:

$$n = N \sin\beta$$

або

$$\sin\beta = \frac{n}{N}.$$

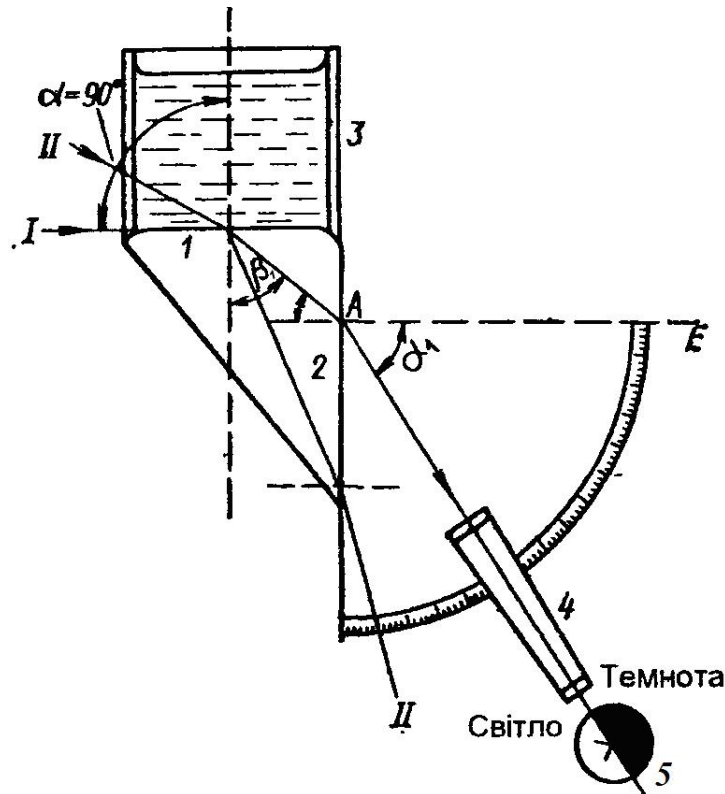


Рис. 1.61. Схема рефрактометра типу Пульфриха

П р и м і т к а: 1 – вхідна вимірювальна призма; 2 – вихідна вимірювальна призма; 3 – кювета; 4 – зорова трубка; 5 – поле зору.

Показник заломлення світла вимірювальної призми N можна визначити також відповідно до значення кутів α_1 і β_1 (рис. 1.59):

$$N = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \beta_1} \text{ або } \sin \beta_1 = \frac{\sin \alpha_1}{N}.$$

Оскільки вихідна призма рефрактометра типу Пульфриха прямокутна, то кут, який утворений перпендикулярами, до двох граней призми, також прямий. Таким чином:

$$\sin \beta_1 = \cos(90^\circ - \beta_1).$$

Оскільки $\cos^2 \beta_1 + \sin^2 \beta_1 = 1$, то:

$$\cos \beta_1 = \sqrt{1 - \sin^2 \beta_1}.$$

Якщо підставити це значення для синусу і косинусу кута β_1 (відповідно $\frac{\sin\alpha_1}{N}$ і $\frac{n}{N}$), одержуємо:

$$\frac{n}{N} = \sqrt{1 - \frac{\sin^2 \alpha_1}{N^2}} \quad \text{або} \quad n = \sqrt{N^2 - \sin^2 \alpha_1}.$$

Таким чином, за величиною кута α_1 можна визначити показник заломлення світла досліджуваної речовини. Величини показників заломлення світла змінних призм рефрактометра відомі і у вигляді довідкових таблиць додаються до приладу.

1.1.9.6. Поляриметрія

У поляризованого світла (див. підпункт 1.1.4.8) орієнтація світлового вектору в будь-якій точці простору з часом залишається незмінною або змінюється за певним законом. Коливальні рухи в усіх точках поляризованого променя виникають лише в одній площині, яка проходить крізь напрямок променя – так званій *площині коливань*, а перпендикулярна їй площина називається *площиною поляризації*.

Оптично активні речовини, як вже відмічалось, – це такі речовини, які при проходженні крізь них поляризованого світла викликають обертання площини поляризації світла на певний кут. *Поляриметричний метод аналізу* заснований саме на залежності кута обертання площини поляризації світла від концентрації оптично активних речовин у досліджуваному розчині.

Оптично активні речовини можуть бути право- і лівообертальними. Перші при проходженні крізь їх розчин поляризованого світла обертають площину поляризації світла вправо, а другі – вліво. Це явище пов'язане з асиметричною будовою молекул цих речовин.

Взяті в одній концентрації розчини право- і лівообертальних речовин в однакових умовах дають однаковий за величиною, але протилежний за знаком внесок. Тому вони можуть компенсувати оптичну активність одна одної – кут обертання площини поляризації світла у даному випадку буде дорівнювати нулю.

Величина кута обертання площини поляризації світла буде тим більша, чим більше число молекул оптично активної речовини знаходиться у розчині на шляху поляризованого променя. Таким чином, величина кута обертання площини поляризації світла залежить від концентрації оптично активної речовини в розчині, а також шляху проходження поляризованого променя в зразку. Якщо інші умови дослідження (зокрема довжина хвилі, температура тощо) не змінюються, тоді для окремої речовини маємо:

$$\beta = \alpha l,$$

де β – кут обертання площини поляризації; l – довжина шару розчину, який містить досліджувану речовину; α – коефіцієнт пропорційності, який залежить від природи речовини.

Значення величини коефіцієнта α , яке розраховують на одиницю густини речовини (d), називається *питомим обертанням площини поляризації* (α_0):

$$\alpha_0 = \frac{\alpha}{d}.$$

Тоді: $\beta = \alpha_0 l d$ або $\alpha_0 = \frac{\beta}{dl} \left(\frac{\text{м}^2}{\text{кг}} \times \text{радіан} \right)$.

У випадку розчинів питома обертання площини поляризації відноситься до одиниці концентрації і товщини шару:

$$\beta = \alpha_0 c l$$

або

$$\alpha_0 = \frac{\beta}{cl} \left(\frac{\text{м}^2}{\text{кг}} \times \text{радіан} \right),$$

де c – концентрація оптично активної речовини ($\text{кг}/\text{м}^2$).

Питома обертання площини поляризації є мірою оптично активної речовини. Якщо його розраховують для концентрації в

1 мкмоль/м³, то знайдене значення називають *молярним обертанням площини* поляризації (α_M). Між питомим і молярним обертанням площини поляризації існує таке співвідношення:

$$\alpha_M = \alpha_0 M,$$

де M – маса речовини.

Чисельні значення питомого та молярного обертання площини поляризації для ряду оптично активних речовин наведені у відповідних довідникових таблицях.

Вже відмічалось (див. підпункт 1.1.4.8), що прилади для вимірювання кута обертання площини поляризації називаються *поляриметрами*. Вони складаються з пристрою для отримання поляризованого світла (поляризатора) та пристрою (аналізатора), який дозволяє визначати напрям і величину кута, на який була повернута площина поляризації світла при його проходженні крізь розчин, що містить оптично активну речовину. Поляризатором, як і аналізатором, можуть бути, наприклад, призми Ніколя з ісландського шпату або поляроїдні плівки (див. підпункт 1.1.4.8).

Монохроматичне світло, яке пройшло крізь поляризатор, стає поляризованим. Якщо на його шляху розмістити інший поляризатор у такому ж положенні, то його площина поляризації світла співпаде з такою першого поляризатора і поляризоване світло пройде також через цей другий поляризатор. Коли ж другий поляризатор повернути на 90° навколо горизонтальної вісі, то площини, в яких вони пропускають світло, стануть взаємно перпендикулярними, і світло, яке було поляризоване першим поляризатором, не пройде крізь другий поляризатор.

У випадку, коли між схрещеними поляризаторами помістити кювету з розчином оптично активної речовини, то після проходження поляризованого світла крізь цей розчин площина поляризації світла повернеться на певний кут, який співпадає з кутом обертання площини поляризації світла досліджуваною оптично активною речовиною. Поява цього кута призводить до переривання потоку світла через другий поляризатор, але при його обертанні навколо горизонтальної вісі на певний кут відновлюється пропускання світла через цей поляризатор. Саме цей кут і відповідає куту

обертання площини поляризації світла оптично активною речовиною, що досліджується.

Наприклад, для аналізу вуглеводів у розчині використовують метод поляриметрії, що базується на властивості оптично активних речовин взаємодіяти з поляризованим світлом. У поляриметрії промінь від джерела світла проходить через два послідовно встановлених фільтри – нерухомий, поляризатор, і той, що обертається, аналізатор. Два таких фільтри знаходяться в одній фазі та безперешкодно пропускають поляризоване світло. Дві частини поля аналізатору виглядають при цьому максимально освітленими. Оптично активні речовини мають здатність обертати площину поляризованого світла праворуч або ліворуч на кут α . Якщо розчин такої речовини розмістити між двома фільтрами, робоче поле аналізатору темнішає. Обертанням аналізатору встановлюють рівність освітленості двох частин поля, кут повороту аналізатору визначають по лімбу. Вимірюваний кут обертання залежить і від типу досліджуваної сполуки, її концентрації і товщини прошарку розчину (довжини поляриметричної трубки). Отриманий за вимірювання кут α перераховується на питоме або на молекулярне обертання, відповідно $[\alpha]$ або $[M]$.

Прикладом застосування методу поляриметрії є визначення у розчині α - і β -аномерів глюкози (розрізняють лише за конфігурацією). Кут обертання 1 М розчину α -D-глюкози складає $+112^\circ$, тоді як для 1 М розчину β -D-глюкози він є рівним $+19^\circ$. У розчині ці величини змінюються самовільно до кінцевого значення $+52^\circ$, тобто в розчині за рахунок *мутаротації* досягається рівновага між α - і β -формою. Незалежно від вихідного складу зразка у рівноважному стані вміст β -форми складає 62 %, а α -форми – 38 %.

Існує декілька типів поляриметрів. Розповсюдженими є коловий і клиновий поляриметри.

Коловий поляриметр дозволяє визначити кути обертання площини поляризації світла в межах $\pm 360^\circ$ (рис. 1.62).

У цьому поляриметрі промені від джерела світла (1) через призму в кожусі освітлювача (2) проходять через монохроматор, яким, як правило, є світлофільтр (3) і через конденсор (4), що формує паралельний пучок світла, а потім потрапляє на поляризатор (5). На шляху поляризованого світла розміщена діафрагма з кварцовою пластинкою (6), яка відхиляє площину поляризованого світла на 5–7°.

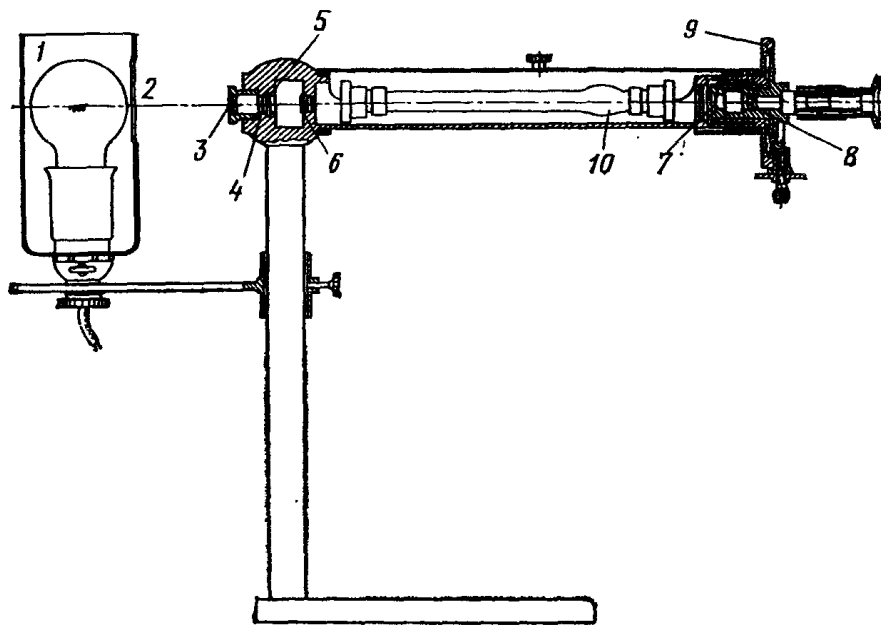


Рис. 1.62. Схема колового поляризатора (пояснення див. текст)

П р и м і т к а: 1 – джерело світла (лампа розжарювання); 2 – щілина в кожусі освітлювача; 3 – світлофільтр, який є монохроматором; 4 – лінза-конденсор; 5 – поляризатор; 6 – діафрагма; 7 – аналізатор; 8 – зорова трубка; 9 – лімб зорового поля; 10 – кювета (трубка) з речовиною, що досліджується.

Обертанням аналізатора (7) досягають ослаблення освітлення в середній частині фотометричного поля освітлення зорової трубки (8). В результаті знаходять таке положення аналізатора, при якому фотометричне поле буде рівномірно затемненим. Це положення фіксують за лімбом (9), коли в приладі відсутня кювета (трубка) з розчином (10), який містить досліджувану оптично активну речовину, та за наявності кювети.

Відновлення положення рівномірного затемнення фотометричного поля зору за наявності кювети (трубки) з досліджуваною речовиною потребує повороту аналізатора на певний кут, який саме і дорівнює куту обертання площини поляризації світла досліджуваної речовини. Величина цього кута відраховується за нанесеною на лімб шкалою.

У деяких моделях колового поляриметра на шляху світлового потоку за основним поляризатором встановлюються додаткові, що дозволяє спростити систему отримання рівномірно затемненого фотометричного поля.

У подальшому, як вже відмічалось, за відповідними довідниковими таблицями співставляють визначене значення кута обертання площини поляризації світла за наведеними в цих таблицях значеннями концентрації досліджуваної речовини і таким чином її визначають в досліджуваному зразку.

У *клиновому поляриметрі* аналізатор закріплено нерухомо. Його положення відносно поляризатора таке, що у разі відсутності кювети (трубки) з досліджуваною речовиною (не розміщена в приладі) половинки фотометричного поля затемнені однаково. Компенсаційний пристрій складається з пластинки правообертального кварцу і двох клинів з лівообертального кварцу. Один із цих клинів закріплений нерухомо, а інший обертається відносно першого. Якщо у поляриметр помістити кювету (трубку) з розчином, що містить досліджувану оптично активну речовину, то площина поляризації світла повернеться на певний кут вправо чи вліво відповідно до властивості досліджуваної речовини. Це викликає зміну затемнення однієї з половинок фотометричного поля. Для того, щоби повернути цьому полю рівномірне затемнення двох половинок, мікрометричним гвинтом зсувають рухомий клин у потрібний бік. Кут обертання площини поляризації світла вираховують за величиною переміщення рухомого клину.

1.1.10. Полум'яна спектрометрія

Полум'я було першим джерелом світла для емісійного, тобто зв'язаного з випромінюванням світла, аналізу. Забарвлення полум'я при введенні зразка сприяло відкриттю ряду металів. В *атомно-абсорбційному аналізі*, де досліджується поглинання світла речовиною, що вноситься у полум'я, воно використовується для випарювання речовини і дисоціації її молекул на атоми.

Полум'я утворюється при енергетичному окисненні багатьох газів киснем. Горіння – це складний процес, при якому відбувається цілий ряд хімічних реакцій. Кількість енергії, яка виділяється при горінні та температура полум'я залежить головним чином, від теплотворної здатності газу. Полум'я, яке використовується для полум'яної спектрометрії, має температуру від 1500 до 3100 °С, але можливо отримати полум'я і з вищою температурою – до 5000 °С (табл. 1.4).

Таблиця 1.4. – Склад газових сумішей і температура їх горіння

Склад газової суміші	Температура полум'я, °С
Повітря-природний газ	1 500
Повітря-пропан	2 000
Повітря-водень	2 100
Повітря-ацетилен	2 500
Водень-кисень	2 600
Метан-кисень	2 700
Оксид азоту-ацетилен*	3 000
Ацетилен-кисень	3 100
Ціан-кисень	4 600

П р и м і т к а: * – використовують тільки в методі атомно-абсорбційної полум'яної спектрометрії.

Нині методи спектрального аналізу з використанням полум'я широко розповсюджені. Вони отримали назву – *полум'яна спектрометрія*. В першу чергу ці методи використовуються для визначення вмісту металів у біологічних зразках, зокрема, в клінічній біохімії для визначення металів у крові, сечі, слині, спинномозковій рідині, материнському молоці та ін. Також полум'яна спектрометрія широко застосовується для аналізу зразків на вміст металів у ґрунті, воді, рослинах, продукції тваринництва тощо. Методами полум'яної спектрометрії можна визначити вміст металів у тканинах, клітинах, органах і макромолекулах, при цьому в кожному випадку необхідно правильно підібрати з самого початку спосіб спалювання речовини, що досліджується. Але це слід робити обережно, щоби не випарити зі зразка хімічні елементи, які аналізуються.

Атоми речовин, які випаровуються в полум'ї зі зразка, випромінюють або поглинають світло з певною довжиною хвилі, що відповідає найближче розміщеним енергетичним рівням. Полум'яна спектрометрія дозволяє не тільки за положенням спектральних ліній визначити певні хімічні елементи, але також за інтенсивністю цих ліній в спектрі дізнаватися про кількість окремих хімічних елементів у досліджуваній речовині.

Для калібрування полум'яних спектрометрів використовують еталонні (стандартні) речовини. В певних випадках використовують внутрішній еталон, яким, як правило, є Літій.

Для кількісного вимірювання металів у зразку, коли спектри перекриваються, проводять *циклічний аналіз*. Із цією метою готують еталонні зразки, які містять відому кількість аналізованих хімічних елементів. Потім проводять декілька оцінок при модифікації складу еталонного зразка і поступово наближають його за складом, який відповідає відношенню аналізованих елементів в експериментальному зразку. Звичайно, для визначення складу зразка буває достатньо двох-трьох циклів.

Речовини, які аналізуються, вводять у полум'я, головним чином, у вигляді розчинів, які розпилені в струмені повітря чи кисню.

Серед позитивних характеристик полум'я необхідно назвати високу стабільність. Інтенсивність спектральних ліній в добре відрегульованому полум'ї зберігає стабільність з точністю до десятих часток відсотку.

Число спектральних ліній при полум'яній спектрометрії відносно невелике, оскільки із-за відносно низької температури полум'я в ньому збуджуються і мають відносно велику інтенсивність спектральні смуги тільки з низьким потенціалом збудження – приблизно 5 еВ (див. пункт 1.1.2), а найінтенсивніші смуги – з потенціалом збудження до 3,5 еВ.

Простота спектрів, велика інтенсивність спектральних ліній і стабільність свічення полегшує реєстрацію спектрів і дозволяє отримати високу чутливість і точність аналізу в методі полум'яної спектроскопії.

Фон у полум'яній спектроскопії обумовлений, в основному, випромінюванням деяких молекул і вільних радикалів, які не дисоціюють через недостатньо високу температуру. Їх випромінювання захоплює окремі ділянки спектру. Воно суттєво залежить від температури і складу газової суміші. Так, наприклад, у суміші повітря-ацетилен (температура полум'я близько 2500 °С) максимум фону лежить в області близько 480 нм.

Вже відзначалося, що існує дві основні модифікації методу полум'яної спектрометрії – атомно-емісійна і атомно-абсорбційна. За використання методу *атомно-емісійної полум'яної спектрометрії* при дослідженні вмісту металів у біологічних зразках необхідно

спочатку спалити органічні молекули, але так, щоби, як вже відмічалось, не випарувати з ними елементи, що досліджуються.

Основні пристрої полум'яного емісійного спектрометра наведені на рис. 1.63.

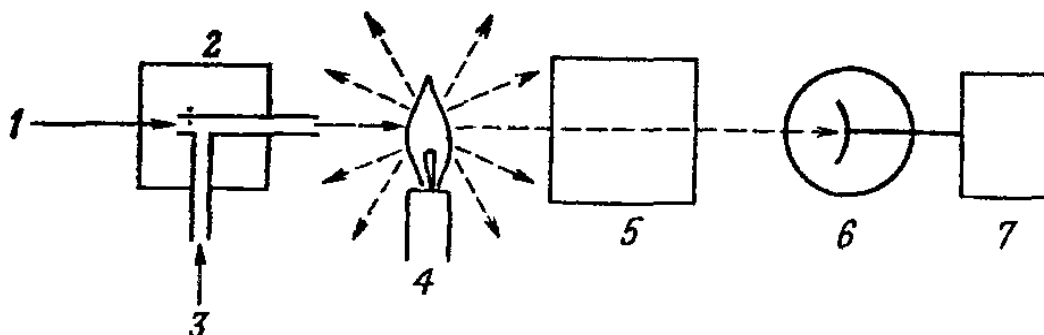


Рис. 1.63. Схема будови полум'яного емісійного спектрометра (основні пристрої)

П р и м і т к а: 1 – повітря від компресора; 2 – розпилювач; 3 – зразок; 4 – пальник; 5 – монохроматор; 6 – детектор; 7 – реєструючий пристрій.

1.1.10.1. Розпилювачі полум'я

В емісійних полум'яних спектрометрах як розпилювач використовують пульверизатор, в якому стиснене повітря, що проходить крізь капіляр, захоплює розчин з досліджуваною речовиною. Краплини цього розчину разом з повітрям потрапляють у полум'я пальника. Осадження краплин великого розміру, які не встигають повністю випаритися за час знаходження в полум'ї, проводять у камері з насиченими парами досліджуваного розчину.

Розпилювач і полум'я абсорбційних полум'яних спектрометрів мають ті ж особливості, що і в атомно-емісійному полум'яному спектрометрі. Для збільшення оптичного шляху використовують, як правило, один пальник з десятисантиметровим полум'ям, хоча існують прилади з декількома пальниками, але при цьому збільшуються витрати зразка і виникає додатковий шум, що треба враховувати. Склад газової суміші, що горить, наведено в табл. 1.4. Він має принципове значення для визначення металів методом емісійної полум'яної спектрометрії. Так, наприклад, для визначення Na, K і Ca використовують, як правило, суміш повітря-природний

газ (температура полум'я 1 500 °С), тільки Са – повітря-пропан (2000 °С), Са, Mg і Fe – повітря-ацетилен (2500 °С), Ti і V – ацетилен-кисень (3100 °С) тощо.

1.1.10.2. Монохроматори в полум'яних спектрометрах

Для поточного визначення ряду металів, зокрема, Na, K, Ca використовують світлофільтри, але для точніших вимірів – призми чи диференційні ґратки (див. підпункт 1.1.4.7). Прилади в діапазоні довжин хвиль 200–1000 нм мають роздільну здатність 0,1–0,2 нм.

1.1.10.3. Детектори та реєстрація спектрів у методі полум'яної спектрометрії

Сучасні атомно-абсорбційні полум'яні спектрометри є, як правило, двопроменеві (див. пункт 1.1.7), які мають пристрій, що виключає реєстрацію розсіяного світла. Вимірювання проводяться у діапазоні довжин хвиль 190–850 нм.

Детекторами атомних абсорбційних полум'яних спектрометрів, як і емісійних, є фотоелементи, а у сучасних – ФЕП (див. підпункт 1.1.5.6).

Після підсилення і перетворення сигнал потрапляє на реєструючий пристрій, яким, як правило, є самописець, у сучасних приладах – також комп'ютер, де фіксуються та обробляються спектри.

Основною метою методу атомно-абсорбційної полум'яної спектрометрії є визначення спектрів поглинання світла атомами в полум'ї, а атомно-емісійної – випромінювання світла, і на основі цього якісний та кількісний аналіз речовин, що досліджуються.

У табл. 1.5 наведено довжини хвиль деяких хімічних елементів, які використовуються для визначення цих елементів в атомній емісійній та абсорбційній полум'яній спектрометрії, а також їх мінімальна частка, яку можна визначити цими методами.

Атомно-абсорбційні полум'яні спектрометри мають, як правило, більшу чутливість, ніж емісійні (виняток становлять лужні метали та Кальцій). За їх допомогою можна визначати більше хімічних елементів, особливо важкі метали, коли їхня частка в зразку становить не менше 10^{-6} .

Таблиця 1.5. – Довжини хвиль, які використовуються в атомній емісійній та абсорбційній полум'яній спектрометрії для визначення різних хімічних елементів, а також мінімальний їх вміст, який можна встановлювати*

Хімічний елемент	Емісійна полум'яна спектрометрія		Абсорбційна полум'яна спектрометрія	
	довжина хвилі, нм	мінімальна частка хімічного елементу в зразку, яка визначається ($\times 10^{-6}$)	довжина хвилі, нм	мінімальна частка хімічного елементу в зразку, яка визначається ($\times 10^{-6}$)
Алюміній	484,2	30	309,3	1,0
Сурьма	-	-	217,5	0,5
Миш'як(Арсен)	-	-	-	-
Барій	493,4	0,2	553,6	0,4
Кадмій	326,1	10	228,8	0,03
Цезій	852,1	1,0	-	-
Кальцій	422,7	0,005	422,7	0,1
Хром	425,6	0,5	357,9	0,2
Кобальт	352,7	0,5	240,7	0,2
Мідь (Купрум)	324,8	0,1	324,8	0,1
Індій	451,1	0,2	304,0	1,0
Залізо (Ферум)	372,0	0,5	248,3	0,2
Свинець (Плюмбум)	-	-	283,3	0,5
Літій	670,7	0,001	670,7	0,03
Магній	285,2	0,1	285,2	0,01
Марганець (Манган)	403,3	0,02	279,5	0,05
Ртуть (Меркурій)	-	-	253,8	10,0
Молібден	-	-	313,3	0,4
Нікель	-	-	341,5	0,2
Калій	766,5	0,001	766,5	0,03
Натрій	589,0	0,0001	589,0	0,03
Олово (Станум)	-	-	286,3	2,5
Титан	-	-	364,3	5,0
Ванадій	-	-	318,4	1,5
Цинк	-	-	213,9	0,03
Стронцій	460,7	0,01	460,7	0,06

П р и м і т к а: наведені загальноприйняті назви хімічних елементів, а в дужках – хімічні назви українською мовою тих елементів, для яких вони вже введені; * – завдяки появі більш досконалих

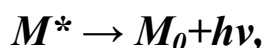
полум'яних спектрометрів вдається виявляти ще менший вміст хімічних елементів.

Метод атомно-абсорбційної спектрометрії застосовується у визначенні вмісту важких металів у харчових продуктах.

1.1.11. Спектрофлуориметрія

При кімнатній температурі більшість молекул перебувають в основному енергетичному стані (рис. 1.64, позначено символом S_0). Поглинання квантів світла, яке здійснюється за час 10^{-15} с, супроводжується переходом електрона на вищий енергетичний рівень – відбувається збудження молекули. Час життя збуджених $\pi \rightarrow \pi^*$ і $n \rightarrow \pi^*$ переходів (див. підпункт 1.1.3.3) становить приблизно 10^{-9} – 10^{-10} с. Після поглинання кванта світла (отримання додаткової енергії), молекула внаслідок теплового руху і зіткнення з іншими молекулами втрачає частину енергії і переходить на нижній коливальний рівень першого збудженого стану (S_1). Такий перехід відбувається без випромінювання квантів світла. Енергія в цьому випадку переходить у внутрішню коливальну енергію молекули. Можливі також переходи електронів без випромінювання між рівнями однієї мультиплетності (триплет \rightarrow триплет, синглет \rightarrow синглет) – внаслідок *внутрішньої конверсії* (ВК), а також між рівнями різної мультиплетності (синглет \rightarrow триплет, триплет \rightarrow синглет) – внаслідок *інтеркомбінаційної конверсії* (ІКК) (рис. 1.64).

Водночас існує інший спосіб переходу молекули зі збудженого стану, зокрема, в основний (S_0) – це випромінювання кванта світла:



де M^* і M_0 – молекула в збудженому і основному стані відповідно; $h\nu$ – квант енергії (світла) випромінювання.

Цей процес відбувається внаслідок переходу молекули з першого збудженого стану (S_1) в основний (S_0) і проходить за час 10^{-9} – 10^{-8} с.

Явище випромінювання квантів світла збудженою молекулою називається *люмінесценцією* (лат. *lumen* – світло та суфікс *escentia*, що означає слабку дію). Цим терміном позначають випромінювання

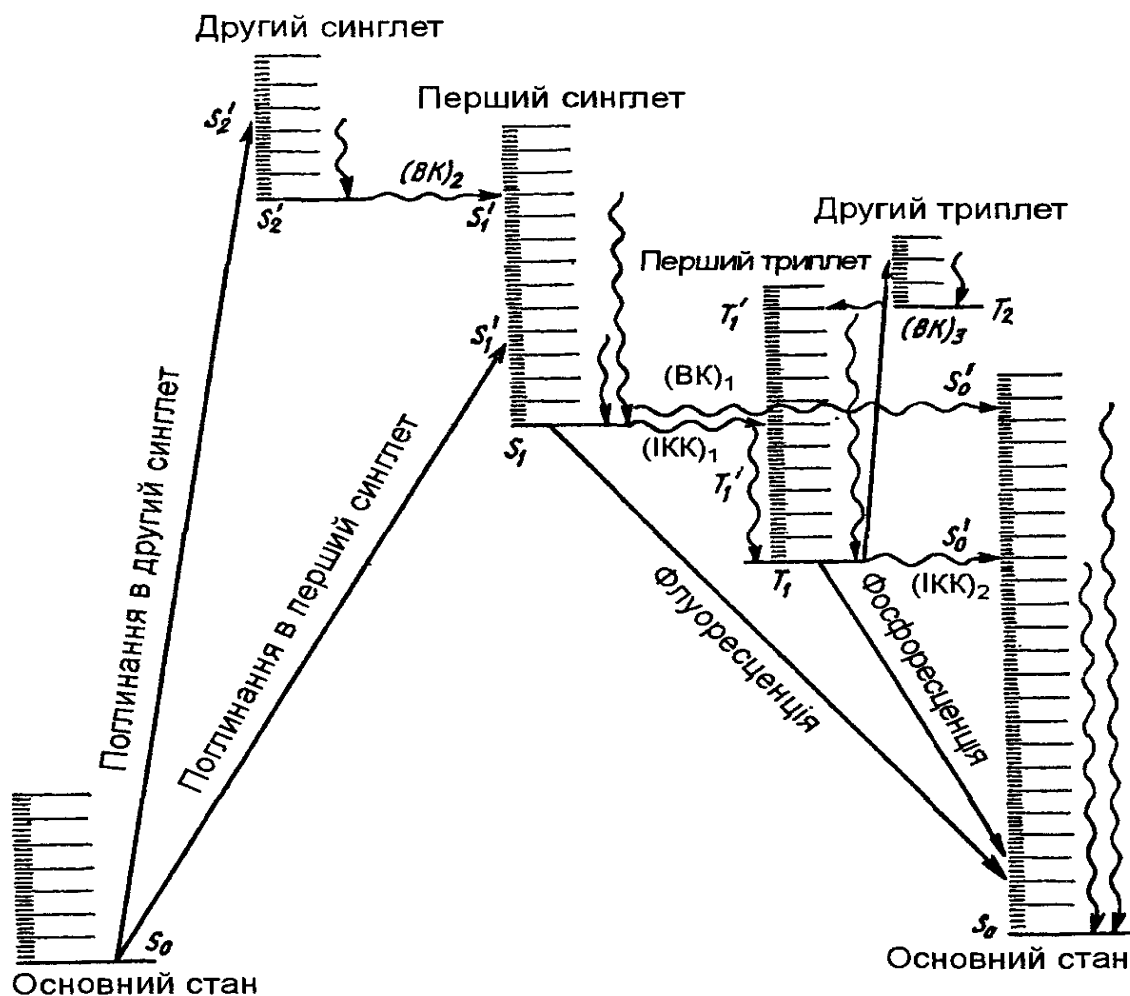


Рис. 1.64. Схема виникнення флуоресценції

Примітка: S_0, S_1, S_2 – синглетні стани; T_1, T_2 – триплетні стани; S_1', S_2' – коливальні рівні синглетних станів; T_1, T_2' – коливальні рівні триплетних станів; ВК – внутрішня конверсія; ІКК – інтеркомбінаційна конверсія; хвилястими стрілками показані переходи без випромінювання.

світла молекулами, що збуджуються будь-яким джерелом енергії, але не за рахунок нагрівання.

Одна з класифікацій люмінесценції заснована на джерелі енергії поглинання. Так, якщо перехід між рівнями здійснюється за рахунок енергії, яка виділяється в процесі хімічної реакції, то явище випромінювання збуджених молекул у цьому випадку називають *хемілюмінесценцією*, а якщо за рахунок поглинання світла у видимій і УФ-областях – *фотолюмінесценцією*, а більш розповсюджена назва – *флуоресценція* (лат. *fluor* – потік та суфікс *escentia*, що означає слабку дію).

Саме завдяки впровадженню флуоресцентної детекції був значно вдосконалений метод секвенування ДНК за Сангером. Крім прямого секвенування (за методом Сангера), флуоресценція продовжує використовуватись у методах секвенування ДНК наступних поколінь.

Розробка нових *флуоресцентних зондів* – речовин, що змінюють флуоресценцію, коли до них приєднується певна молекула, – дозволила детально досліджувати хімічний склад живих клітин і навіть організмів, а також його зміни у часі і просторі, що поклало початок флуоресцентній молекулярній візуалізації.

Флуорисцентні зонди також використовують у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) в реальному часі, що оптимізує використання ПЛР у молекулярній діагностиці.

В той же час застосовується метод рентгено-флуоресцентної спектроскопії, в якому збудження флуорофорів відбувається рентгенівськими променями (короткохвильовим електромагнітним випромінюванням з довжиною хвилі менше 0,1 нм, яке виникає при гальмуванні в речовині електронів у так званих рентгенівських трубках, див. пункт 1.2.6).

Енергія кванта світла, що випромінюється в процесі флуоресценції збудженої молекули, менша, ніж енергія поглинутого кванта світла. Це пояснюється тим, що частина енергії поглинутого кванта світла витрачається на переходи з вищерозміщених рівнів на коливальні рівні першого збудженого стану, а з них на основний рівень цього стану без випромінювання. Наслідком того, що енергія випроміненого кванта світла менша, ніж збуджуючого кванта світла є зсув спектра флуоресценції у довгохвильову область відносно спектра поглинання (так званий *стоксівський зсув*).

Існує також явище *фосфоресценції* (грецьк. *phos* – світло і *phoros* – той, що несе, а також суфікс *escentia*, що означає слабку дію). Це теж один з видів люмінесценції, але на відміну від флуоресценції, у цьому випадку, після попереднього освітлення деяких речовин, світіння зберігається від декількох мікросекунд до секунд і навіть більше. Таким світінням володіють, наприклад, сульфатні сполуки Барію, Кальцію і Стронцію.

Вже відмічалось, що за час життя збудженого стану можливі переходи з синглетного на триплетний рівень і навпаки (інтеркомбінаційна конверсія). Переходи з триплетного рівня (T_1) в основний (S_0) заборонені правилами відбору квантової механіки, але вони все

ж таки з дуже малою вірогідністю відбуваються. Час «життя» першого триплетного рівня (T_1) через малу вірогідність переходів з нього в основний стан (S_0) великий – від 10^{-3} с до одиниці секунди і навіть більше. Саме випромінювання, яке обумовлене переходом $T_1 \rightarrow S_0$ і спричинює фосфоресценцію.

Явище уповільненої флуоресценції обумовлене тим, що за рахунок інтеркомбінаційної конверсії молекула може перейти в триплетний рівень і перебувати в ньому відносно довго, оскільки, як вже відмічалось, вірогідність переходу з нього в основний стан (S_0) дуже мала. За цей час збуджена молекула може поглинути ще один квант світла і завдяки цьому перейти на синглетний рівень, а з нього – в основний стан.

Крім зазначених вище механізмів використання збудженою молекулою енергії на випромінювання, існують також інші. Так, наприклад, енергія збудження може бути використана на енергозабезпечення хімічних перетворень, або ж мігрувати на сусідні молекули, де може використовуватися одним із зазначених способів.

Флуоресценція дала новий поштовх для розвитку клітинної біології. Завдяки конфокальній флуоресцентній мікроскопії та розробці нових флуоресцентних міток на базі зеленого флуоресцентного протеїну (GFP) та його аналогів з'явилася можливість отримувати специфічні контрастні забарвлення та робити фотознімки з високим розділенням багатьох внутрішньоклітинних протеїнових структур.

1.1.11.1. Основні характеристики флуоресценції

Основними характеристиками флуоресценції є спектр випромінювання, енергетичний вихід і квантовий вихід.

Спектр випромінювання флуоресценції – залежність інтенсивності випромінювання від довжини хвилі. Параметри спектра випромінювання: λ_{\max} – довжина хвилі, при якій спостерігається максимальна інтенсивність; $\Delta\lambda_{1/2}$ – напівширина спектра ($\Delta\lambda_{1/2} = \lambda_2 - \lambda_1$, де λ_1 і λ_2 – довжина хвиль, при якій інтенсивність флуоресценції дорівнює максимальній з одного та з другого краю спектра).

Енергетичний вихід (E_B) – відношення випроміненої енергії ($E_{\text{вип.}}$) до поглинутої ($E_{\text{погл.}}$) протягом певного часу:

$$E_B = E_{\text{вип.}} / E_{\text{погл.}}$$

Квантовий вихід (Q) – відношення числа випромінених за одиницю часу квантів світла ($N_{\text{вип.}}$) до числа поглинутих ($N_{\text{погл.}}$):

$$Q = N_{\text{вип.}} / N_{\text{погл.}}$$

Встановлено, що кількість молекул при поглинанні світла збуджується, як правило, за експоненціальним законом:

$$N = N_0 e^{-t/\tau_0},$$

де N і N_0 – число збуджених молекул на даний час і в початковий момент, відповідно; t – час спостереження (в початковий момент $t = 0$); τ_0 – час «життя» збудженого стану (визначається часом, за який число збуджених молекул зменшується в e (2,72 ...) рази. Значення величини τ_0 теж є однією з характеристик флуоресценції.

1.1.11.2. Флуоресцентні хромофори і зонди, метод флуоресцентних міток

У складі речовин виділяють наступні *флуоресцентні хромофори* (групи атомів у молекулі, які здатні до поглинання і випромінювання світла):

1. Власні флуоресцентні хромофори.
2. Флуоресцентні хромофори, які приєднані до молекул, що вивчаються, за допомогою ковалентних зв'язків – так звані флуоресцентні мітки.
3. Флуоресцентні хромофори, які приєднані до молекул, що вивчаються, нековалентними зв'язками – флуоресцентні зонди.

Прикладом *власних флуоресцентних хромофорів* амінокислот є ароматичні амінокислоти – триптофан, тирозин і фенілаланін, спектри поглинання яких наведені на рис. 1.52, а флуоресценції – на рис. 1.65.

При кімнатній температурі спектр флуоресценції триптофану має такі характеристики: $\lambda_{\text{max}} = 350$ нм, $\Delta\lambda_{1/2} = 60$ нм, $Q = 0,2$ (рН 7,0). Характеристики тирозину при кімнатній температурі: $\lambda_{\text{max}} = 303\text{--}304$ нм, $\Delta\lambda_{1/2} = 34$ нм, $Q = 0,42$ (рН 7,0). Фенілаланін при кім-

натній температурі характеризується довжинами хвиль спектру флуоресценції: 275, 289 і 304 нм та Q у межах 0,038–0,045 (рН 7,0).

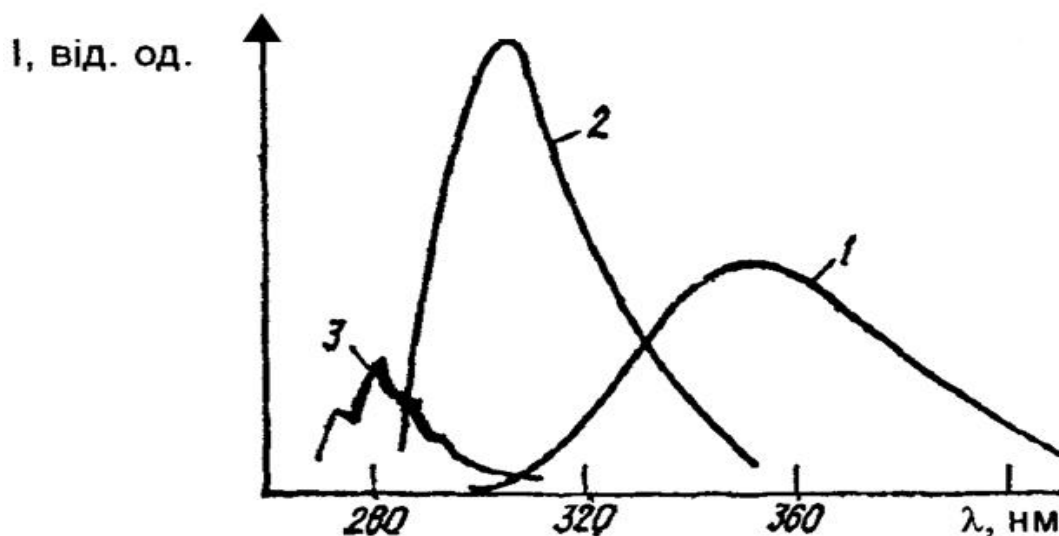


Рис. 1.65. Спектри флуоресценції водних розчинів триптофану (1), тирозину (2) і фенілаланіну (3)

П р и м і т к а: I – інтенсивність випромінювання; λ – довжина хвилі.

Існує ще низка власних флуоресцентних хромофорів, які дозволяють проводити якісний і кількісний аналіз досліджуваних речовин, визначати просторову організацію молекул тощо.

Метод флуоресцентних міток (хромофорів), в якому мітки ковалентно (за рахунок спарених електронів) зв'язані з досліджуваними молекулами, використовується не тільки для визначення речовин, які містять ці молекули (зокрема, протеїнів, флуоресценція яких визначається переважно триптофаном, тирозином і фенілаланіном), але і для інших цілей. Так, його широко застосовують для вивчення просторової організації молекул, тих же протеїнів – локальної конформаційної перебудови молекул, їх полімеризації та зв'язування з іншими сполуками тощо.

Крім зміни мікрооточення на флуоресценцію міток впливає також міжхромофорна міграція енергії. В протеїнах найефективніша така міграція в напрямі:

Фенілаланін → Тирозин → Триптофан.

Один із методичних підходів дослідження міграції енергії в молекулах полягає в гасінні флуоресценції. *Гасіння флуоресценції* – це явище, коли енергія збудження молекул переходить не в світлову, а в теплову енергію їх руху і зіткнення з іншими молекулами. Як гасники власної флуоресценції протеїнів використовуються Γ , Cs^+ , N_2 , NO_2 та ін.

Згідно рівнянню Штерна-Фольмера маємо:

$$F / F_0 = 1 / (1 + KC) \quad \text{або} \quad Q / Q_0 = 1 / (1 + KC),$$

де F_0 і F – інтенсивність флуоресценції без гасника і з гасником, відповідно; Q_0 і Q – квантовий вихід флуоресценції без гасника і з гасником, відповідно; K – константа гасіння; C – концентрація гасника.

Рівняння Штерна-Фольмера можна перетворити наступним чином:

$$E = KC,$$

де $E = F_0 / F - 1$ – ефективність гасіння.

Наведене вище рівняння справедливе, якщо в розчині, що досліджується, є одна форма хромофорів за доступністю. У випадку, коли в розчині є дві форми – «доступні» та «приховані» хромофори – рівняння Штерна-Фольмера модифікується наступним чином:

$$F = \frac{\alpha_1 F_0}{1 + K_1 C} + \frac{\alpha_2 F_0}{1 + K_2 C},$$

де α_1 і α_2 – відповідно, внески «доступних» і «прихованих» флуорофорів у сумарну інтенсивність флуоресценції F_0 ; K_1 і K_2 – відповідні константи гасіння; C – константа гасіння.

При наявності в протеїновій молекулі великої кількості хромофорів одного типу використовують модифіковане рівняння Штерна-Фольмера:

$$F_0 / F - F = 1 / \alpha KC + 1 / \alpha.$$

У цьому випадку залежність $F_0/F_0 - F$ від $1/C$ представляє пряму лінію, для якої нахил буде мати значення $1/\alpha K$. Таким чином, якщо побудувати графік у координатах $F_0/F_0 - F$ від $1/C$, можна одержати інформацію про внесок «доступних» і «прихованих» хромофорів у сумарну флуоресценцію протеїну.

Зв'язок між ступенем поляризації флуоресценції і часом «життя» збудженого стану описується рівнянням Перрена-Вавілова:

$$1/P - 1/3 = (1/P_0 - 1/3) \cdot (1 + 3\tau/\Theta),$$

де P – ступінь поляризації флуоресценції; P_0 – граничний ступінь поляризації; τ – час «життя» збудженого стану; Θ – час релаксації.

Для сферичних частинок, що флуоресціюють:

$$Q = \frac{3\eta V}{RT},$$

де V – об'єм частинки; η – в'язкість розчину; T – абсолютна температура; R – газова стала.

Рівняння Перрена-Вавілова можна переписати у вигляді:

$$1/P - 1/3 = (1/P_0 - 1/3) \times (1 + \tau RT / \eta V).$$

Таким чином, якщо побудувати графік залежності $1/P$ від T/η з відомим значенням τ , то можна визначити об'єм молекули, що флуоресціює.

Як вже зазначалося, одним із методів дослідження просторової організації біополімерів (у т. ч. й протеїнів) є вивчення спектральних характеристик флуоресцентних міток – хромофорів, які ковалентно зв'язані з досліджуваною молекулою. Цей метод використовується, в основному, для вивчення міграції енергії між різними хромофорами.

Як правило, досліджується *індуковано-резонансне перенесення енергії*, яке спричинене електростатичною взаємодією між донором і акцептором. Виділяють, як правило, три типи міграції енергії: синглет-синглетний, триплет-синглетний (відбуваються на відстані до 6,5 нм), а також триплет-триплетний (на відстані до 1,5 нм).

Процес перенесення енергії між хромофорами-мітками (донорами і акцепторами) відбувається у такій послідовності: 1) поглинання молекулою донора кванта енергії (світла) з переходом її у збуджений стан; 2) передача енергії збудження від донора до акцептора; 3) коливальні переходи без випромінювання в донорі до встановлення рівноваги з оточенням та коливальна рівновага або внутрішня конверсія в молекулі акцептора; 4) випромінювання кванта енергії (світла) акцептором.

Згідно з теорією Фьорстера ефективність перенесення енергії (E) між донором і акцептором визначається рівнянням:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6},$$

або відстань між донором і акцептором (R) дорівнює:

$$R = \frac{R_0}{(Q_0/Q - 1)^{1/6}},$$

де R_0 – ефективна відстань, на якій вірогідність синглет-синглетного перенесення енергії дорівнює 50 % – радіус Фьорстера; Q_0 і Q – квантові виходи флуоресценції донора без акцептора та в його присутності, відповідно.

Таким чином, на основі величин Q_0 і Q можна визначити відстань між донором і акцептором.

Як флуоресцентну мітку використовують цілий ряд сполук. Для вивчення просторової організації протейнів, дослідження проводять, зокрема, з малеїнізоїдородоамаїном Б (МІР), флуоресцеїн-димеркурїацетатом (ФДКА), флуоресцеїн-ізотіоціанатом (ФІТЦ) та ін.

Широко використовується для визначення структури речовин метод *флуоресцентних зондів* – відносно малих за розмірами молекул, які здатні до флуоресценції як до, так і після приєднання нековалентними зв'язками з молекулами, що досліджуються. Ці зонди, залежно від хімічної будови і фізичних властивостей, зв'язуються з певними ділянками досліджуваної речовини (наприклад, протейнів чи нуклеїнових кислот) і змінюють параметри своєї

флуоресценції (положення λ_{max} , квантовий вихід, час «життя» збудженого стану та ін.). Прикладом флуоресцентних зондів можуть бути барвники-флуоресценти: 1,8-АНС (1-анілінонафтален-8-сульфонат, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 360 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 470 \text{ нм}$), ДМХ (4-диметил-амінохалкон, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 340 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ випр.} = 520 \text{ нм}$) та багато інших. Крім барвників, флуоресцентними зондами можуть виступати й інші речовини, в т. ч. аналоги природних речовин, наприклад ϵ -АТФ (етеноаденозинтрифосфат, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 340 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ випр.} = 376 \text{ нм}$) та ін.

1.1.11.3. Основні пристрої спектрофлуориметрів

Схема спектрофлуориметра (основні пристрої) наведена на рис. 1.66.

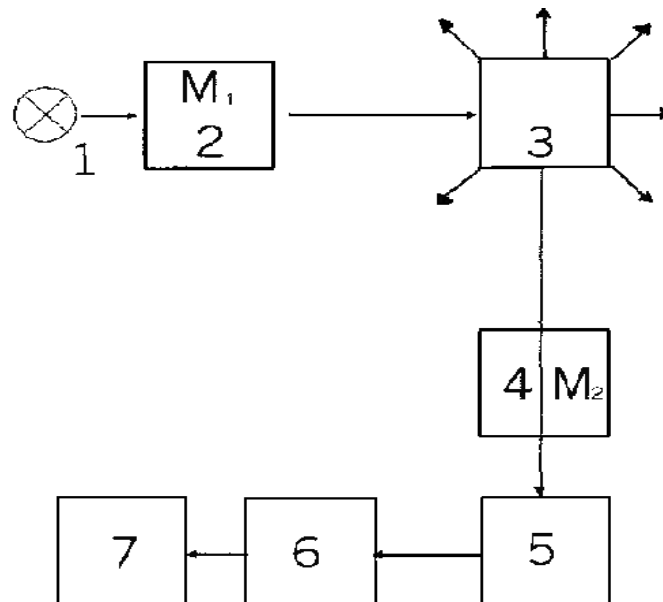


Рис. 1.66. Схема будови спектрофлуориметра (основні пристрої)

Примітка: 1 – джерело випромінювання; 2 – монохроматор збудження; 3 – кювета зі зразком; 4 – монохроматор випромінювання; 5 – приймач випромінювання (детектор); 6 – підсилювач; 7 – реєструючий пристрій.

У серійних спектрофлуориметрах, як правило, використовують джерела світла з широким спектральним діапазоном (наприклад, ртутні або ксенонові лампи). Монохроматор збудження виділяє

світло певної довжини хвилі для переведення молекул досліджуваної речовини, яка знаходиться в кюветі, в збуджений стан, а за допомогою монохроматора випромінювання визначають спектр флуоресценції за сталої довжини хвилі збудження. Як монохроматор використовують, передусім, призми або дифракційні ґратки, їх поєднання. Вони аналогічні таким, що використовуються в спектрофотометрах (див. пункт 1.1.5).

Приймачем випромінювання (детектором) у спектрофлуориметрі є фотоелемент або, як правило, фотоелектронний помножувач (ФЕП). Сигнал із детектора в режимі виміру постійного струму подається на підсилювач постійного струму, а потім на реєструючий пристрій (самописець та, найчастіше, комп'ютер). В імпульсному режимі виміру сигнал із детектора подається на імпульсний підсилювач, потім на інтегрувальний пристрій і вже з нього – на самописець та зв'язаний з ним комп'ютер.

На рис. 1.66 наведені тільки основні пристрої спектрофлуориметра. Сучасні спектрофлуориметри додатково укомплектовані ще пристроями, зокрема, комп'ютером, автоматичними розгортками довжини хвилі збудження і вимірювання, термостатом для кювети тощо. Одним із таких пристроїв ще є пристосування для проведення *імунофлуоресцентного аналізу*. Аналітичні методи, які ґрунтуються на використанні явища флуоресценції, широко застосовуються у клінічній хімії та молекулярній діагностиці. Зокрема були розроблені та впроваджені чутливі методи для швидкого аналізу стероїдних гормонів, порфіринів, катехоламінів, метаболітів медичних препаратів та інших діагностично важливих хімічних речовин у сечі та плазмі крові. За допомогою імуноферментного аналізу (ELISA) із використанням флуорогенних субстратів проводять детекцію біомаркерів різних захворювань.

Крім класичного методу спектрофлуориметрії на практиці також широко використовується метод *флуоресцентної атомної спектрометрії*. Саме це явище подібне молекулярній флуоресценції, відмінність лише в тому, що флуоресціюють атоми після поглинання світла в газі, а не молекули в розчині. Цей метод має дуже високу чутливість. Так, наприклад, за використання цього методу можна визначити вміст Цинку в зразку, коли його частка складає $1 \cdot 10^{-10}$, а Кадмію – $2 \cdot 10^{-10}$.

1.2. СПЕЦІАЛЬНІ СПЕКТРОСКОПІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ РЕЧОВИН

Усі попередньо розглянуті методи атомного і молекулярного аналізу відносилися до оптичних (оптичної області спектра: УФ-випромінювання – довжина хвилі у діапазоні 10–380 нм, видиме світло – 380–750 нм, ІЧ-випромінювання – від 750 нм до 1 мм). Зокрема з'ясовано, що в радіохвильовій області (довжина хвилі 30– $3 \cdot 10^3$ см) у певних умовах можна отримати цінні відомості про структуру хімічних, передусім органічних, сполук. Серед ряду методів, в яких використовується ця область, найважливішими є ядерний магнітний резонанс (ЯМР), електронний парамагнітний резонанс (ЕПР) та мас-спектрометрія. Цінну структурно-аналітичну інформацію про речовини надають також методи мессбауерівської та фотоелектронної спектроскопії, рентгено-структурного аналізу.

1.2.1. Ядерний магнітний резонанс (ЯМР)

Цей метод широко застосовується в структурно-аналітичних дослідженнях, вивченні швидких процесів, визначенні реакційної здатності атомів і молекул, хімічних реакцій тощо. За розповсюдженістю і значимістю ЯМР-спектроскопію можна порівняти, мабуть, із ІК-спектроскопією, хоча коло об'єктів, які досліджуються методами ЯМР дещо обмежене, оскільки не всі ядра володіють магнітним моментом, тобто величиною, яка характеризує магнітні властивості (див. нижче).

Ядра атомів складаються з протонів і нейтронів (за винятком атому Нітрогену, ядро якого складається тільки з одного протона).

Протон (1_1p) – стабільна елементарна частинка з масою 1,00758 атомної одиниці маси (1 а.о.м. = $1,6724 \cdot 10^{-24}$ г, 1/12 маси ізотопу ${}^{12}\text{C}$) і електричним зарядом +1 (позитивної $4,8 \cdot 10^{-10}$ абсолютної електричної одиниці). Кількість протонів в атомному ядрі називається *атомним номером* або *зарядовим числом* (Z), що відповідає порядковому номеру хімічного елемента у періодичній системі елементів Д. І. Менделєєва.

Нейтрон (1_0n) – електронейтральна елементарна частинка з масою 1,00898 а.о.м. ($1,6874 \cdot 10^{-24}$ г). У вільному стані нейтрони –

нестабільні частинки, які з періодом напіврозпаду 14,78 хв розпадаються на протон, електрон та антинейтрино.

Сума протонів (відповідає зарядовому числу Z) і нейтронів (N) в ядрі атома називається *масовим числом* (A): $A = N + Z$. Атоми хімічних елементів прийнято позначати символами цього елемента у формі індексів: ${}^A_Z X$, де x – символ хімічного елемента.

Атоми, які мають однакову кількість протонів в ядрі (однаковий атомний номер), але різняться за кількістю нейтронів (масовим числом) називаються *ізотопами* (грецьк. *isos* – однаковий і *topos* – місце).

Протони і нейтрони мають *спін* (англ. *spin* – обертатися), який характеризує механічний момент руху (обертання). Магнітний момент ядра характеризується вектором (P) спіна ядра (кутовим моментом кількості руху):

$$P = \hbar J,$$

де $\hbar = h/2\pi$, h – стала Планка, чисельне значення якої дорівнює $6,6252 \cdot 10^{-34}$ Дж·с; J – сумарний спін ядра.

Наявність або відсутність спіна ядра і його значення визначається, як вже відзначалося, числом протонів і нейтронів, тобто зв'язані із зарядом ядра (атомним номером чи зарядовим числом хімічного елемента), а також масовим числом. Існують наступні залежності спіна ядра від цих величин:

1. При парних значеннях атомного номеру і масового числа, тобто при парних числах протонів і нейтронів ядерний спін $J = 0$, наприклад, у таких ізотопів як ${}^{12}\text{C}$, ${}^{16}\text{O}$, ${}^{32}\text{S}$ та ін.

2. У всіх хімічних елементів з непарним масовим числом при будь-якому атомному номері, тобто коли число протонів і нейтронів різної парності, ядра мають напівцілочисельний спін: $J = 1/2, 3/2, 5/2$ та ін., наприклад, у ізотопів ${}^1\text{H}$, ${}^{11}\text{B}$, ${}^{13}\text{C}$, ${}^{17}\text{O}$, ${}^{19}\text{F}$, ${}^{27}\text{Al}$, ${}^{31}\text{P}$ та ін.

3. При парному масовому числі та непарному атомному номері, тобто непарному числі як протонів, так і нейтронів, ядро має цілочисельний спін: $J = 1, 2, 3$ і т.д., наприклад, у ізотопів ${}^2\text{H}$, ${}^{10}\text{B}$, ${}^{14}\text{N}$, ${}^{30}\text{P}$ та ін.

1.2.1.1. Умови виникнення ЯМР

Згідно законів класичної *електродинаміки* обертання електрично зарядженої частинки навколо деякої вісі продукує магнітне поле, яке співпадає за напрямом з віссю обертання. Така система характеризується магнітним моментом, який пропорційний кутовому моменту кількості руху. Для ядер, які володіють спіном, взаємозв'язок магнітного моменту ядра (μ_n) і кутового моменту кількості руху виражається співвідношенням:

$$\mu_n = \gamma_n P = \gamma_n \hbar J,$$

де γ_n – коефіцієнт пропорційності, який називається *гіромагнітним* або *магнітомеханічним відношенням ядра* (відношення магнітного моменту до кутового).

Одним з найпоширеніших методів ЯМР є *протонний магнітний резонанс* (ПМР), оскільки протони (H) не тільки надзвичайно поширені в хімічній структурі атомів і молекул, але і володіють найвираженішими магнітними властивостями. Магнітний момент протона називається *ядерним магнетоном* (β_n) і дорівнює:

$$\beta_n = \frac{e_n \hbar}{2m_n c} = 5,05 \cdot 10^{-27} (A \cdot m^2),$$

де e_n – заряд протона; m – маса протона; c – швидкість світла у вакуумі.

Ядерний магнітний момент (μ_n) може бути виражений також через так званий ядерний *g-фактор*, який представляє собою безрозмірну постійну g_n , а також ядерний магнетон (β_n) і сумарний спін (J):

$$\mu_n = g_n \beta_n J.$$

В одиницях ядерного магнетона (β_n як одиниця виміру) ядерний магнітний момент дорівнює:

$$\mu_n = g_n J.$$

Чисельні значення J , γ_n і g_n сталі для кожного атомного ядра, що має власний магнітний момент. Чим більші ці величини, тим більший магнітний момент ядра, а звідси, і величина магнітного поля, яке створюється ядром, що має магнітний момент. Магнітні властивості ядер деяких ізотопів наведено в табл. 1.6.

Таблиця 1.6. – Магнітні властивості деяких ядер

Ізотоп	Спін J	γ_n <i>радіан</i> · <i>c</i> ⁻¹ · <i>A</i> ⁻¹ · <i>m</i>	g_n	μ_n в одиницях β_n
¹ H	1/2	336,19	5,585	2,792
² H	1	51,61	0,857	0,857
¹³ C	1/2	84,55	1,405	0,702
¹⁴ N	1	24,30	0,403	0,404
¹⁵ N	1/2	-34,08	-0,56	-0,283
¹⁷ O	5/2	-45,59	-0,757	-1,893
¹⁹ F	1/2	316,41	5,25	2,627
²⁹ Si	1/2	-66,84	-1,111	-0,555
³¹ P	1/2	136,22	2,26	1,131
³⁵ Cl	3/2	32,87	0,54	0,822
³⁷ Cl	3/2	27,44	0,45	0,683

При відсутності зовнішнього магнітного поля будь-які орієнтації вектора ядерного магнітного моменту в просторі рівновірогідні. Такий спіновий стан називається *виродженням*.

Магнітне поле прийнято характеризувати його *індукцією* (лат. *inductio* – збудження, навіювання) – векторною величиною, яка дорівнює силі, з якою магнітне поле діє на одиничний елемент електричного струму, розміщений перпендикулярно до вектора індукції. Одиницею виміру індукції магнітного поля (B) в Міжнародній системі одиниць (СІ) є тесла (Тл). Позасистемна одиниця виміру індукції магнітного поля – гаус (Гс): 1Тл = 10⁴ Гс.

При характеристиці магнітного поля використовується також поняття *напруженості магнітного поля* (H). Одиницею виміру H в СІ є $A \cdot m^{-1}$. Позасистемна одиниця виміру H – ерстед (Е): $1E = 79,58 A \cdot m^{-1}$.

Індукція магнітного поля (B) зв'язана з напруженістю цього поля (H) наступним співвідношенням:

$$H = B / \mu.$$

де μ – магнітна проникність середовища.

При накладанні постійного магнітного поля (індукцією B) на зразок, що містить атоми, ядра яких мають магнітний момент, виникає взаємодія між цим зовнішнім магнітним полем і магнітним моментом ядра. Енергія такої взаємодії залежить від орієнтації вектора магнітного моменту відносно напрямку зовнішнього магнітного поля. Можливий лише деякий *дискретний* (лат. *discretus* – переривчастість) набір компонент вектора магнітного моменту в будь-якому заданому напрямі в просторі, який визначається магнітним квантовим числом m_I , (див. підпункт 1.1.3.1), яке приймає $2I + 1$ значень, тобто від $+I$ до $-I$.

Енергетичний зв'язок μ_n і B виражається рівнянням Зеємана:

$$E = -\mu_n \beta \cos(\mu \wedge B),$$

де $(\mu \wedge B)$ – кут між векторами μ_n і B .

Коли вектор μ_n орієнтований паралельно вектору B («за полем»), то $\cos(\mu_n \wedge B) = 1$ і $E = -\mu_n B$ такий стан позначається $|\alpha\rangle$; коли вектор μ_n орієнтований антипаралельно вектору B («проти поля»), то $\cos(\mu_n \wedge B) = -1$ і $E = \mu_n B$, такий стан позначається $|\beta\rangle$. Так, наприклад, для протона, який має спін $1/2$, можливі тільки два значення квантового числа $m_I + 1/2$ і $-1/2$, тобто два спінових стани з енергіями:

$$E_\alpha = -\mu_n B = -\frac{1}{2} \gamma_n \hbar B = -\frac{1}{2} g_n \beta_n B,$$

$$E_{\beta} = \mu_n B = \frac{1}{2} \gamma_n \hbar B = \frac{1}{2} g_n \beta_n B.$$

Як і в будь-якому спектроскопічному методі, переходи між енергетичними, а у випадку ЯМР спіновими, рівнями супроводжуються зміною енергії системи, якій задовольняє загальне рівняння (див. пункт 1.1.2):

$$\Delta E = h\nu,$$

тобто можуть відбуватися з поглинанням чи випромінюванням кванта електромагнітного випромінювання частотою ν . При нерівноважно високій «залежності» верхнього енергетичного рівня виникають спектри випромінювання, а нижнього – спектри поглинання. При однаковій «залежності» рівнів, ніяких сигналів (спектрів) ЯМР не буде спостерігатися, оскільки ймовірність переходу в обох напрямках однакова ($|\alpha\rangle \rightarrow |\beta\rangle$ і $|\beta\rangle \rightarrow |\alpha\rangle$).

Для збудження енергетичних переходів на зразок (ядерний магнітний момент), який розміщений у постійне однорідне магнітне поле (B), необхідно вплинути змінним магнітним полем (B_{ν}), яке за енергією зрівняне з ΔE , що визначається за рівнянням Зеємана. У випадку, коли змінне магнітне поле перпендикулярне постійному ($B_{\nu} \perp B$), виникає явище *резонансу* (лат. *resonans* – той, що дає відгук). Це відбувається тоді, коли частота змінного магнітного поля буде дорівнювати частоті обертання магнітного моменту в зовнішньому магнітному полі. Для найпростішої дворівневої системи умова ядерного магнітного резонансу виражається рівнянням:

$$\Delta E = h\nu = \gamma_n \hbar B = g_n \beta_n B.$$

Порядок значень ΔE спінових станів ядер у зовнішніх магнітних полях біля 1 Тл такий, що резонансні частоти методу ЯМР лежать в радіохвильовому діапазоні (зокрема, в області 1–100 МГц для поширених ЯМР-спектрометрів).

Чисельні значення резонансних частот (ν) для деяких ізотопів наведені в табл. 1.7.

Таблиця 1.7. – Резонансні частоти ядер деяких ізотопів у магнітному полі 2,35 Тл

Ізотоп	ν , МГц	Ізотоп	ν , МГц	Ізотоп	ν , МГц
^1H	100,00	^{14}N	7,22	^{19}F	94,07
^2H	15,35	^{15}N	10,13	^{29}Si	19,88
^{13}C	25,14	^{17}O	13,56	^{31}P	40,48

З вищенаведеного рівняння випливає, що умови резонансу в методі ЯМР можна досягти двома шляхами: 1) змінювати частоту (розгортка за частотою) змінного магнітного поля (ν), наприклад, за рахунок переключення частоти діапазонів джерел (приймачів) при незмінному (постійному) зовнішньому магнітному полі; 2) змінювати індукцію (напруженість) постійного магнітного поля (розгортка за полем) при постійній частоті змінного поля. Саме цей, другий, спосіб досягнення резонансу найчастіше використовується в ЯМР-спектрометрах. У них, звичайно, джерела електромагнітного випромінювання мають частоту порядку 10^7 – 10^9 Гц (60, 100, 200, 500 МГц).

Частота магнітного поля (ν) зв'язана з індукцією постійного поля (B) співвідношенням:

$$\nu = \frac{\gamma_n B}{2\pi},$$

або кутова резонансна частота (ω) дорівнює:

$$\omega = 2\pi\nu = \gamma_n B.$$

Одиницею вимірювання ω є радіан·с⁻¹.

Величина магнітного моменту всіх ядер одного ізотопу однакова, тому на перший погляд здається, що в ЯМР-спектрі повинна бути присутня тільки одна лінія поглинання. Насправді це не так. Крім зовнішнього магнітного поля, в будь-якій молекулі існує внутрішнє магнітне поле, яке обумовлене рухом електронів. У залежності від положення, яке займає даний атом і його ядро в молекулі, на нього діє певне внутрішнє магнітне поле. Тому для ядер, які знаходяться в молекулі в різних положеннях (місцях),

умови резонансу настають при різних значеннях зовнішнього магнітного поля залежно від того, який внесок у цьому положенні внутрішнього магнітного поля. Цей внесок дуже малий, оскільки внутрішні магнітні поля приблизно в 10^6 разів слабші від зовнішнього магнітного поля. Але сучасні ЯМР-спектрометри мають дуже високу роздільну здатність і дають окремі лінії поглинання для ядер, яким відповідають зміни в напруженості зовнішнього магнітного поля. Тому замість одного сигналу для цього ядра отримують цілий спектр, число ліній в якому відповідає числу різних положень зазначеного ядра в молекулі. Так, наприклад, в ЯМР-спектрі етилового спирту ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) з'являються три сигнали, які відповідають трьом різним положенням, що займають атоми Гідрогену в молекулі (рис. 1.67). При даній частоті генератора хвиль радіохвильового діапазону умови резонансу для протону $-\text{OH}$ групи будуть при більш слабкому зовнішньому полі, ніж для протонів $-\text{CH}_2-$ і тим більше $-\text{CH}_3$ груп, оскільки електрон в атомі Гідрогену, який екранує зовнішнє магнітне поле, зсунутий в сторону Оксигену. Ці зміни положення ЯМР-сигнала називаються *хімічним зсувом* (δ), оскільки вони обумовлені особливістю хімічної будови молекул.

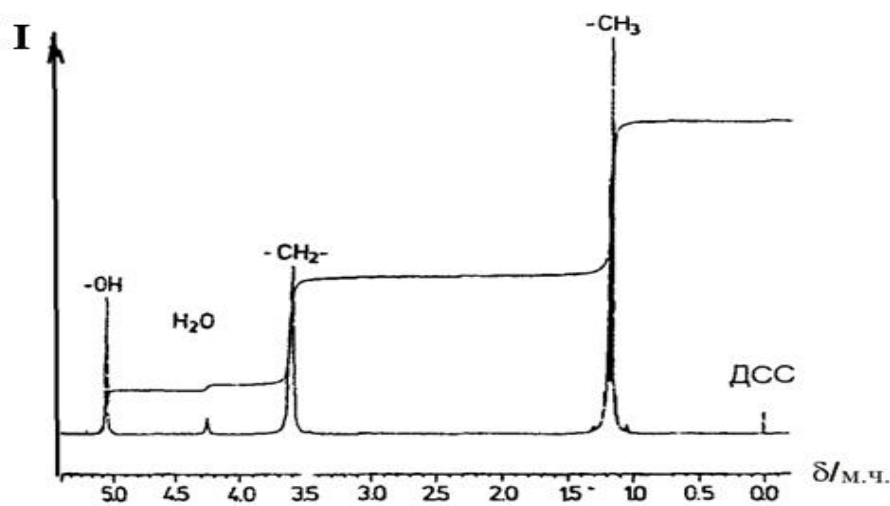


Рис. 1.67. ЯМР-спектр протонів (500 МГц) 95 % етилового спирту ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

П р и м і т к а: I – інтенсивність ЯМР-сигнала; δ – хімічний зсув, який вимірюється в м. ч. – мільйонних (10^{-6}) частках зовнішнього магнітного поля; сигнал при 0,00 м. ч. відповідає метильній групі стандарту 2,2-диметилм-2-силапентан-5-сульфонової кислоти (ДСС).

Величина δ вимірюється в безрозмірних величинах – мільйонних частках (м.ч.) зовнішнього магнітного поля. За початок підрахунку ($\delta = 0,00$) приймають положення ЯМР-сигналів, наприклад, метильної групи стандарту 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонієвої кислоти (ДСС), а позитивне значення шкали направлене у бік слабшого зовнішнього магнітного поля. За цією шкалою положення ЯМР-сигналів у спектрі етилового спирту наступне: $-\text{CH}_3 - 1,16$; $-\text{CH}_2 - 3,58$; $-\text{OH} - 5,17$ м.ч.

Крім зовнішнього магнітного поля і внутрішнього магнітного поля електронів на ядра атомів впливають також магнітні поля сусідніх ядер атомів, що теж приводить до розщеплення спектральних ліній, тобто мультиплетності сигналів ЯМР.

Пряма дія магнітних полів ядер атомів одного на одне дуже мала, оскільки ці поля швидко зменшують свою напруженість з відстанню. Але електрони, які здійснюють хімічний зв'язок атомів у молекулі і які рухаються за орбітами, при орієнтації в полі одного ядра, діють і на друге. Таким чином, відбувається спін-спінова взаємодія ядер атомів, які входять до складу молекули. Величина цієї взаємодії (так звана *константа спін-спінової взаємодії J*) вимірюється в герцах. Помітну взаємодію проявляють тільки ядра сусідніх груп і хоча вона дуже мала, але призводить до розщеплення відповідних ЯМР-сигналів (спектральних ліній). Так протони груп, що знаходяться поряд з групою, яка має поодинокий атом Гідрогену, розщеплюється в дублет, тому що спін протона може мати тільки дві орієнтації в зовнішньому магнітному полі з приблизно однаковою вірогідністю. Групи з двома протонами, наприклад $=\text{CH}_2$, розщеплюють сигнали сусідніх груп в триплети, так як спіни двох протонів можуть бути спрямовані двоє за полем, двоє проти поля або у різні боки.

Хімічний зсув (δ) і константа спін-спінової взаємодії (J) тісно пов'язані з будовою молекули. Вони дуже чутливі до малих змін в її структурі. Метод ЯМР має високу чутливість і роздільну здатність. Все це, а також ще ряд інших показників, сприяють тому, що ЯМР-спектроскопія набула дуже широкого застосування для дослідження структури речовин, конформаційного стану їх молекул тощо.

При хімічних реакціях можлива так звана *хімічна поляризація ядер* (ХПЯ), яка викликана нерівномірною «заселеністю» спінових рівнів в томах речовин, які утворюються в процесі хімічних реакцій або внаслідок утворення певних станів атомів (триплетних,

радикальних пар та ін.). У таких ситуаціях будуть спостерігатися не зовсім звичайні ЯМР-спектри. Так, аномально висока інтенсивність сигналів поглинання відповідає підвищеній «заселеності» вищих рівнів (негативна хімічна поляризація ядер). Будь-які ЯМР-спектри містять унікальну інформацію про утворення речовин, які мають такі ядра із «заселеними» рівнями, про ці речовини, їх попередників тощо.

Спостереження ефектів ХПЯ в ЯМР-спектрах можливе лише при проведенні реакцій безпосередньо в магнітному полі ЯМР-спектрометрів і при неперервній реєстрації спектрів, оскільки надрівноважна «заселеність» спінових рівнів ядра зберігається тільки протягом часу ядерної (1–30 с) релаксації. Буває ХПЯ двох типів – *інтегральна* (для сигналу в цілому) і *мультиплетна* (спостерігаються різні знаки поляризації у бік вищої та нижчої від центру мультиплету індукції магнітного поля).

Дослідження ХПЯ відкриває великі можливості аналізу механізмів і кінетики хімічних реакцій.

На рис. 1.68 наведені основні пристрої так званого стаціонарного ЯМР-спектрометра з розгорткою за полем.

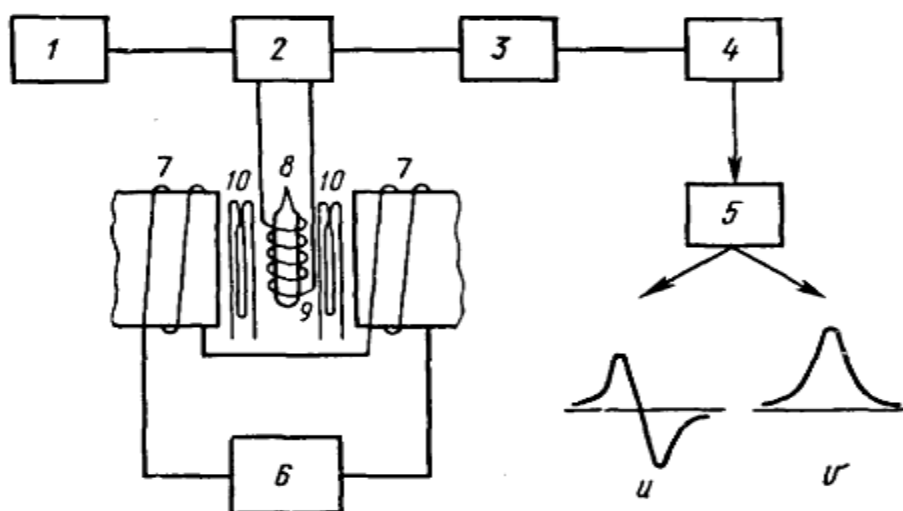


Рис. 1.68. Схема будови стаціонарного ЯМР-спектрометра зі змінною індукцією магнітного поля (розгортка за полем)

Примітка: 1 – генератор високочастотного випромінювання; 2 – радіочастотний міст; 3 – підсилювач; 4 – детектор (приймач); 5 – реєструючий пристрій (u – сигнал дисперсії, v – сигнал поглинання); 6 – генератор розгортки поля (живлення електромагніта); 7 –

полюса електромагніта; 8 – зразок в кюветі (ампулі); 9 – катушка; 10 – шиміруюча (самоколивна) катушка.

В ЯМР-спектрометрах зразок у кюветі (ампулі) розміщують у сильне однорідне постійне магнітне поле індукцією 1–10 Тл, яке створюється електромагнітом. Для зміни електромагнітного поля в межах 10^{-2} Тл використовують додатковий так званий *свіп-електромагніт*. Джерелом радіохвиль є радіочастотний генератор (осцилятор). У випадку ЯМР-спектрометра з розгорткою у полі при сталому значенні частоти генератора ($\nu = \omega/2\pi$) здійснюють повільне сканування в резонансній області за рахунок плавної зміни магнітного поля (B). При досягненні умов резонансу виникає поглинання енергії випромінювання заданої частоти, яке фіксується реєструючим приладом.

В ЯМР-спектрометрах з розгорткою за частотою лінійно змінюється частота (ω) в часі, а постійне магнітне поле (B) не змінюється.

ЯМР в біохімії як аналітичний метод для ідентифікації відомих і невідомих речовин. ЯМР-спектроскопія біологічних макромолекул. За допомогою ЯМР-спектроскопії вивчають будову і структуру протеїнів та динамічні процеси в них. Поряд з цим ЯМР-спектроскопія використовується у структурних і функціональних дослідженнях нуклеїнових кислот, полісахаридів і ліпідів, а саме: склад і структура нуклеїнових кислот та дослідження методом ЯМР нуклеїнових кислот і комплексів нуклеїнових кислот з протеїнами. Окремими ланками практичного використання ЯМР-спектроскопії є вивчення складу і структури полісахаридів та дослідження біологічних мембран.

Найросповсюдженими є ЯМР-спектрометри зі змінним діапазоном частот, які генеруються, що дозволяє працювати з різними ядрами. Це відноситься як до спектрометрів стаціонарного типу, так і до імпульсних фур'є-спектрометрів, які відрізняються способом генерації високої частоти (див. нижче).

1.2.1.2. Імпульсна фур'є-спектроскопія ЯМР

Сучасна ЯМР-спектрометри призначені для досліджень різних ядер, що досягається зміною діапазону частот, які генеруються. Це відноситься як до спектрометрів, що описані вище, так і до

імпульсних фур'є-спектрометрів, які відзначаються способом генерування високочастотних коливань. Саме можливість отримання спектрів ЯМР високої роздільної здатності була реалізована шляхом фур'є-перетворень (спеціальних математичних перетворень, запропонованих Ж. Б. Фур'є) так званого *сигналу спаду вільної індукції* (ССИ) після дії короткого (порядку 10^{-5} – 10^{-6} с) потужного (від 1 кВт) імпульсу електромагнітного поля з несучою частотою ν . Виникає ССИ внаслідок загасання індукованих компонент вектору намагніченості (M), який представляє собою суму окремих магнітних моментів ядер:

$$M = \sum_{i=1}^n \mu_{n_i}.$$

Частота ν не обов'язково повинна співпадати з резонансною частотою, оскільки при малій тривалості імпульсу його можна представити як цілий інтервал частот $\Delta\nu$ або суму безкінцевого числа *гармонік* (грецьк. *harmonikos* – злагодженість, співрозмірний), які є членами розкладення в ряду Фур'є. Цей інтервал обернено пропорційний тривалості імпульсу (t_p).

В інтервалі $\Delta\nu$ завжди знайдеться частота, яка співпадає з резонансною (ν_p). Так, наприклад, мікросекундний імпульс може викликати збудження всіх переходів ядер з резонансними частотами в інтервалі близько 50 кГц.

Практично здійснюється багатоімпульсна (з проміжками між серіями імпульсів в декілька секунд) послідовність накопичення сигналу ССИ і фур'є-перетворень, тобто отриманої інтерферограми за допомогою спеціальних комп'ютерних програм. Інтерферограма представляє собою суперпозицію ССИ, є функцією часу $f(t)$ і залежить від спектра резонансних переходів ядер (ЯМР-спектрів), який позначається як функція $F(\nu)$. Для отримання ЯМР-спектрів необхідно вирішити оборотну задачу, що досягається фур'є-перетворенням функції $f(t)$ в $F(\nu)$:

$$F(\nu) = 2\pi \int_0^{\infty} e^{i\nu t} f(t) dt.$$

На рис. 1.69 наведено сигнал ССІ і отриманий з нього після фур'є-перетворення спектр ЯМР.

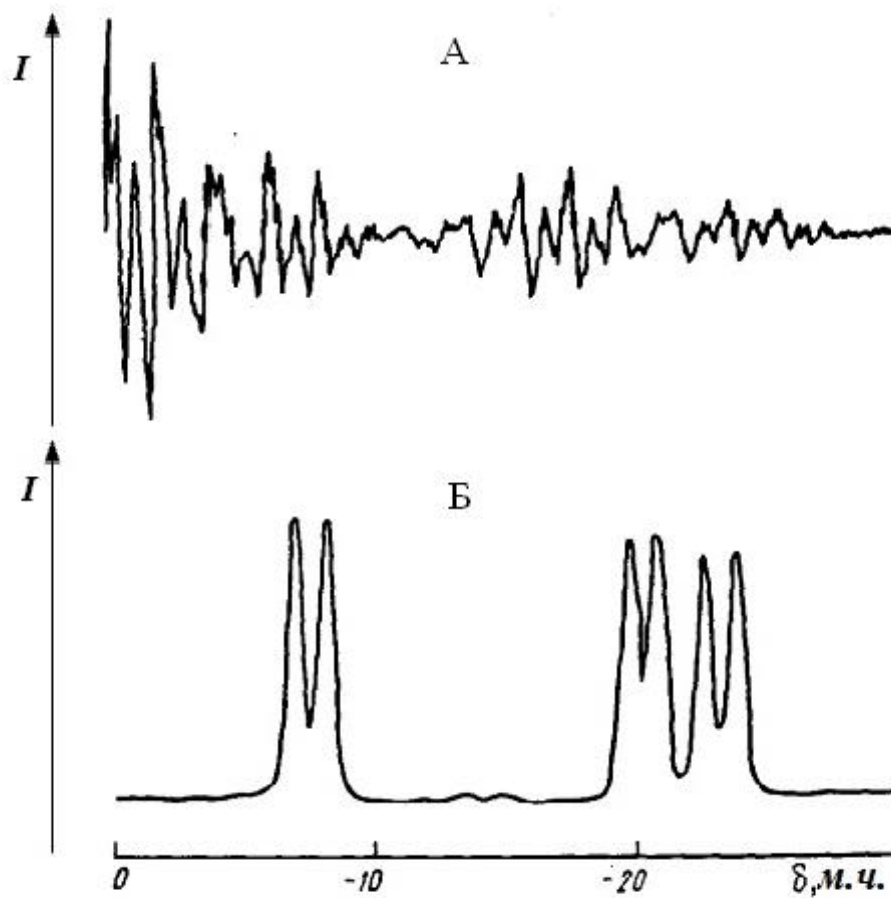


Рис. 1.69. Сигнал ССІ (А) і отриманий його фур'є-перетворенням спектр ЯМР ядра ^{11}B в шкалі δ , м.ч. (Б)

Примітка: I – інтенсивність сигналу.

Реєстрація сигналів ССІ потребує в сотні разів менше часу, ніж запис ЯМР-спектра на стаціонарному спектрометрі (рис. 1.67). Час фур'є-перетворення інтерферограми за допомогою комп'ютера також малий. Таким чином, за короткий час може бути накопичено і усереднено багато ЯМР-спектрів, що дає багаторазовий (десятки – сотні разів) вигравш у чутливості методу (відношення сигнал/шум).

Використання імпульсної фур'є-спектроскопії ЯМР особливо ефективно при вивченні спектрів ізотопів з низьким природним вмістом. Високочутливі імпульсні фур'є-спектрометри ЯМР із надпровідними соленоїдами дозволяють реєструвати ЯМР-спектри

практично всіх ізотопів, які володіють ядерним магнітним моментом.

Схема імпульсного фур'є-спектрометра ЯМР (основні пристрої) наведена на рис. 1.70.

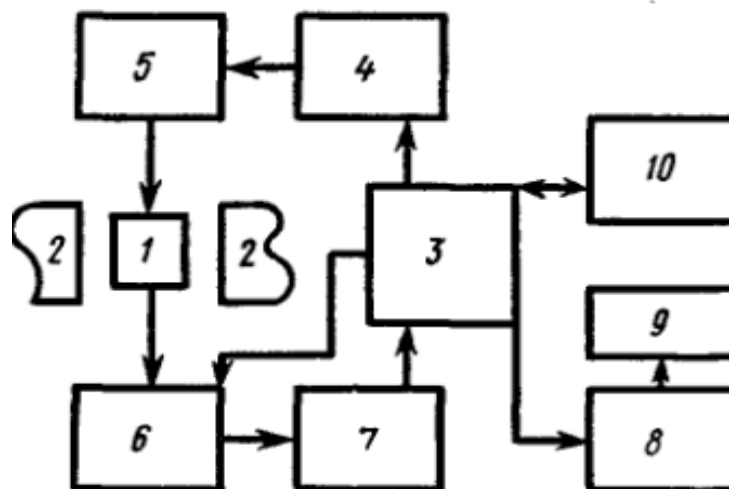


Рис. 1.70. Схема імпульсного фур'є-спектрометра ЯМР (основні пристрої)

Примітка: 1 – зразок; 2 – полюси магніту; 3 – ЕОМ; 4 – генератор; 5 – підсилювач потужності; 6 – детектор (приймач); 7 – аналого-цифровий перетворювач; 8 – цифрово-аналоговий перетворювач; 9 – реєструючий пристрій (самописець або ін.); 10 – теле-тайп.

Основні переваги імпульсного фур'є-спектрометра ЯМР – це, насамперед, висока потужність генератора (до 1 кВт, тоді як в стаціонарному ЯМР-спектрометрі частки Ватт) імпульсів електромагнітного поля (порядку 0,1–1,0 Тл). Для формування всіх видів імпульсів є модулятор і програмний блок. Фазочутливий детектор забезпечує високе відношення сигналу до шуму. На ЕОМ, яка є невід'ємною частиною спектрометра, покладаються функції як управління спектрометром за заданою програмою або у відповідності до команд, так і накопичення сигналу ССИ, перетворення його в спектр, зберігання, упорядкування і систематизація інформації тощо.

1.2.1.3. Двовимірна ЯМР-спектроскопія

При багатоімпульсній послідовності проміжки між імпульсами впливають на вигляд ЯМР-спектра, який отримується. В кожному з таких спектрів, які отримані звичайним фур'є-перетворенням, інтенсивність представлена як функція частот ν . Після цього при фіксованому значенні частот в цьому наборі ЯМР-спектрів можна провести ще одне перетворення сигналу ССІ, при цьому представити інтенсивність як функцію часу (t) затримки імпульсів. Якщо це зробити для всіх частот, то в результаті буде отриманий «двовимірний спектр» як функція двох змінних: частоти імпульсу (ν) і частоти слідування імпульсів ($1/t$). Це стало основою розробки так званої *двовимірної ЯМР-спектроскопії*, яка має ще назву *2D – ЯМР* (англ. *two-dimensional* – двовимірний).

Найбільш інформативним варіантом двовимірної ЯМР-спектроскопії є так звана двовимірна δ -*J*-спектроскопія ЯМР, в якій наводиться залежність інтенсивності спектральних ліній від хімічного зсуву δ і константи спінової взаємодії J . Ці показники відкладаються на взаємно перпендикулярних вісях координат. У цьому випадку фактично тривимірне зображення має вигляд, який наведено на рис. 1.71.

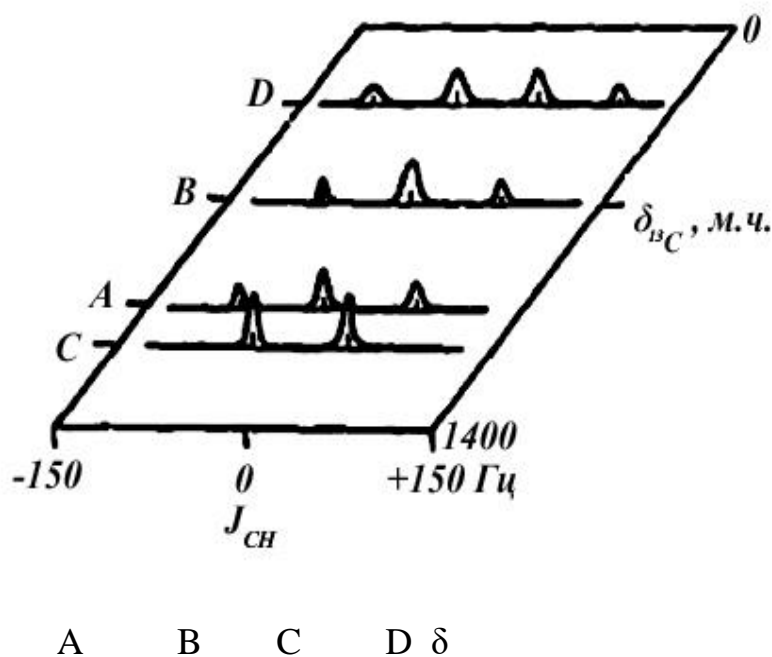


Рис. 1.71. Вигляд спектра ^{13}C ЯМР сполуки $\text{HOCH}_2\text{—CH}_2\text{—CH(OH)—CH}_3$, отриманий методом двовимірної δ - J -спектроскопії

При сталій величині δ отримується інформація про константу спін-спінової взаємодії (J -перетин), а при сталій величині J – про набір синглетних сигналів (δ -перетин).

Перевагою двовимірної ЯМР-спектроскопії є не тільки отримання більшої кількості інформації в одному вимірі, але і високе розрізнення ліній спектра. Разом із тим, цей метод потребує дуже високоякісних пристроїв і більш довгого часу для проведення експерименту, ніж в звичайній імпульсній фур'є-спектроскопії, що обумовлено необхідністю більшого числа сигналів ССІ.

Нині розробляються методи більш, ніж двовимірної спектроскопії, зокрема 3D-ЯМР.

1.2.1.4. Подвійний ЯМР-резонанс

Більшість сучасних ЯМР-спектрометрів дають можливість проводити дослідження в умовах подвійного резонансу, коли додатково до поля реєстрації B_{v_1} накладається друге магнітне поле збудження B_{v_2} , причому як B_{v_1} , так і B_{v_2} перпендикулярні до постійного магнітного поля B . Якщо спостерігається ЯМР-спектр ядер A на частоті ν_1 для системи взаємодіючих ядер $[AB]$, то частоту ν_2 магнітного поля збудження обирають у резонансній області ядер B . Позначається це наступним чином: $A - \{B\}$, наприклад, позначення $^{13}\text{C} - \{^1\text{H}\}$ означає, що ядра ^{13}C спостерігаються, а ^1H – опромінюються.

За ЯМР-спектром, який спостерігається методом подвійного резонансу, крім даних про ядра A отримують також інформацію і про ядра B без прямого спостереження ЯМР-спектрів цих ядер. Деякі результати досліджень можуть бути отримані тільки цим методом.

Якщо в системі $[AB]$ відбувається вплив «заселеності» рівнів одного ядра, наприклад, A на «заселеність» іншого – B , то відбувається так званий *ядерний ефект Оверхаузера* (ЯЕО). На цьому ефекті базується метод *спектроскопії між'ядерного подвійного резонансу* (СМПР або INDOR, від англ. *internuclear double resonance*). У цьому методі при спостереженні тільки ЯМР-спектрів ядер, наприклад, A можна визначити і резонансні частоти ядер B .

Вигляд спектрів подвійного ЯМР-резонансу для ядер A_1 , A_2 , і B_1 , B_2 системи [AB], наведений на рис. 1.72.

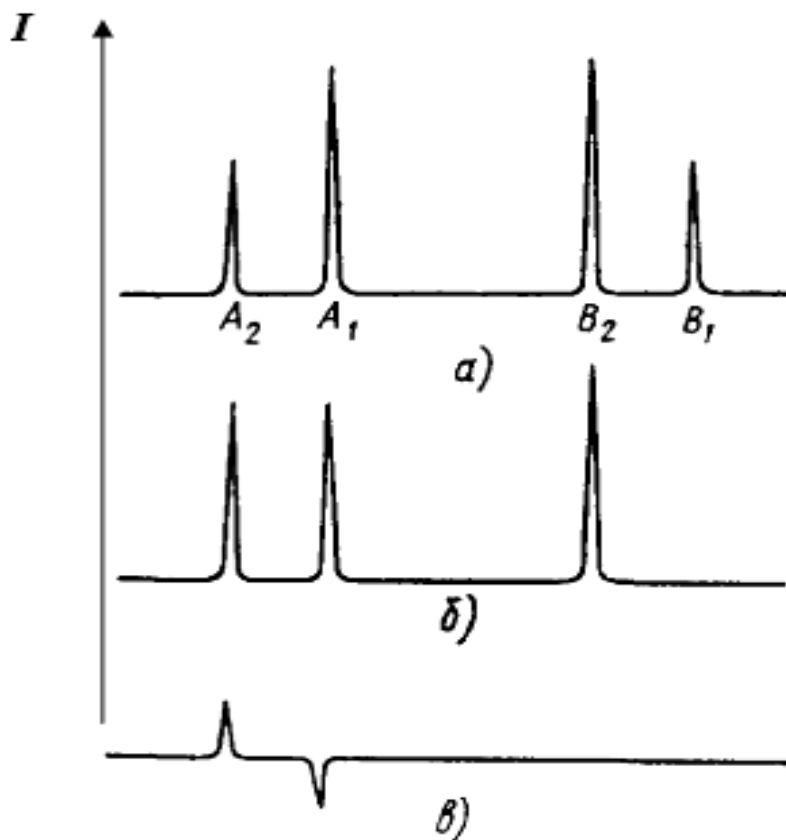


Рис. 1.72. Вигляд спектрів подвійного ЯМР-резонансу спінової системи [AB] для ядер A_1 , A_2 і B_1 , B_2

Примітка: *a* – спектр разового резонансу; *б* – ефект Оверхаузера при «заселеності» переходів ядра B_1 ; *в* – спектр між'ядерного подвійного резонансу, який еквівалентний різниці спектрів *a* і *б*; *I* – інтенсивність сигналу.

Крім методу між'ядерного подвійного резонансу використовуються також інші варіанти цього методу, наприклад, *метод Тиклінга* супроводжується, як правило, ядерним ефектом Оверхаузера і дублетним розщепленням спектральних ліній. В методі *селективного подвійного резонансу* (СПР) відбувається спрощення ЯМР-спектра за рахунок часткового *коласу* (лат. *collapsus* – ослаблений; той, що впав) розщеплення ліній спектра. Метод *тотального подвійного резонансу* (ТПР) потребує подальшого підвищення

потужності другого магнітного поля і характеризується можливістю повного колапсу розщеплення спектральних ліній, які зв'язані з опроміненням ядром.

Для реєстрації ЯМР-спектрів подвійного резонансу застосовуються як стаціонарні, так і імпульсні фур'є-спектрометри ЯМР, які мають різноманітні відмінності за реалізацією принципу роботи.

Розроблено також метод подвійного резонансу, в якому крім магнітного поля реєстрації B_{v_1} на зразок накладаються ще два перпендикулярних магнітних поля – B_{v_2} та B_{v_3} .

1.2.1.5. Особливості підготовки зразків, підбору розчинників і стандартів для ЯМР-спектроскопії

Агрегатний стан речовини, що досліджується, має велике значення в ЯМР-спектроскопії. Основні труднощі – дипольне розщеплення ліній ЯМР-спектра в твердих зразках і в'язких рідинах. Нині вже розроблено методи дослідження ЯМР-спектрів високого розділення для таких зразків при застосуванні спеціальних прийомів їх приготування, зокрема для ^1H , ^{13}C , ^{14}N і ^{29}Si , інших ядер.

Обмеження в дослідженні ЯМР-спектрів газів, які обумовлені низькою інтенсивністю ліній спектрів, також усуваються використанням високочутливих фур'є-спектрометрів ЯМР. Але все ж таки в більшості випадків ЯМР-спектроскопія застосовується для розчинів нев'язких рідин. При цьому підготовлення для досліджень зразка передбачає вибір кювети, розчинника, методу концентрації розчину, стандарту для визначення хімічного зсуву (δ) і, якщо необхідно, калібрувальних еталонів (стандартів) та інших добавок. Суттєвим є також контроль температури.

Розчин чи рідина, яка досліджується, повинні бути ретельно очищені і відфільтровані від гетерогенних частинок, особливо від парамагнітних і феромагнітних домішок, які викликають сильне розширення ЯМР-спектральних ліній, можливе також їх зникнення. Все ж таки, деякі парамагнітні комплекси, які є реагентами, що зсувають спектральні лінії, можуть підвищувати роздільну здатність, їх склад строго регламентований і вони застосовуються тільки в певних дослідженнях.

В ЯМР-спектроскопії, особливо за використання ПМР, для розчинення висококонцентрованих зразків застосовують стандартні розчинники, які не містять атомів Гідрогену: трихлорид вуглецю CCl_3 , дейтерохлороформ CD_3Cl , дейтероацетон $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, дейтеробензол C_6D_6 та ін. Водночас, якщо застосовується не ПМР, то можна використовувати розчинники, які містять атом Гідрогену, зокрема ацетон $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, диметилсульфоксид $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, хлороформ CHCl_3 та ін. У випадку вибіркової розчинності зразків використовують як розчинники, наприклад, CH_3COOH , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, D_2O та ін. Різні спеціальні розчинники використовуються для проведення досліджень при високих і низьких температурах, наприклад, дейтеродиметилсульфоксид, фреон-12 та ін.

Оптимальну концентрацію зразка обирають із врахуванням допустимого відношення сигнал/шум і його розчинності. Наважку речовини m (г), яка потрібна для приготування розчину з концентрацією C визначають за рівнянням:

$$m = \frac{V\rho M_B C}{M_p(1-C)},$$

де V – об'єм розчинника; ρ – густина розчинника; M_p і M_B – молярні маси розчинника і речовини, що досліджується, відповідно.

Мінімальна концентрація речовини зразка для ЯМР-спектроскопії складає приблизно 10^{-3} – 10^{-2} моль/дм³.

У ПМР-спектроскопії вміст речовини зразка в розчині виражають, як правило, в молярних частках (%), що зручно при оцінці відносних інтенсивностей спектральних ліній.

Стандарти, які використовуються для виміру хімічних зсувів (δ) різноманітні. Поширеними є тетраметилсилан $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (скорочено ТМС) та 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонієва кислота (ДСС), про яку вже йшла мова. На практиці застосовують метод внутрішнього або зовнішнього стандарту. В першому методі стандарт (наприклад, 1–2 краплі ТМС) вводиться безпосередньо в розчин досліджуваного зразка. При цьому необхідно, щоби стандарт був інертним (не утворював асоціатів, не впливав на структуру і т.п. розчинника та речовини, що досліджується). У протилежному, використовують метод зовнішнього стандарту. Для цього розчином стандарту заповнюють ідентичну до вимірювальної кювету меншого

діаметра, яка розміщується в основну кювету і центрують її там певним способом. При цьому методі необхідно вводити поправку на різниці в об'ємах стандарту і розчину, що містить досліджувану речовину.

Для зменшення впливів коливання напруженості зовнішнього магнітного поля зразок, що досліджується, поміщають в кювету у вигляді трубки дуже точного розміру і швидко її обертають.

В ЯМР-спектроскопії різних ядер є свої методичні особливості приготування зразків для дослідження. Так, наприклад, для ЯМР-спектроскопії ^{13}C потрібні, як правило, кювети великого діаметра (8–25 мм), ніж для ПМР (приблизно 5 мм). Існують і інші особливості приготування зразків для дослідження методом ЯМР.

1.2.2. Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР)

Метод ЕПР є одним із методів, що доволі широко застосовуються, але не так, як ЯМР-метод. Цей метод використовується тільки для дослідження речовин, яким притаманні *парамагнітні* (грецьк. *para* – біля, при та *Magnetis lithos* – буквально «камінь з міста Магнесії, який проявляє здатність притягувати залізо», тобто є магнітом) властивості. До таких речовин відносяться такі, що мають неспарені електрони – вільні радикали, іон-радикали, комплекси перехідних металів, сполуки у збудженому стані тощо, а також зразки, які містять вільні електрони та інші парамагнітні центри.

Спектроскопію електронного парамагнітного резонансу застосовують у різних дослідженнях медицини і біології, зокрема в фармації ідентифікують та оцінюють якість і безпеку оригінальних і відтворених лікарських засобів, визначають зміни транспортних властивостей в альбуміновмісній пробі з метою здійснення діагностики і контролю альбуміновмісних препаратів, а також досліджують наноструктури препаратів, виготовлених за допомогою сучасних методик нанотехнології тощо.

1.2.2.1. Умови виникнення ЕПР

Електрони (e^-) – стійкі елементарні частинки з масою 0,000548 а.о.м. ($9,1 \cdot 10^{-28}$ г) та електричним зарядом – 1 (негативний $4,8 \cdot 10^{-10}$ абсолютної електричної одиниці). Залежно від енергії, яку вони мають, електрони в атомі групуються, про що вже йшла мова

(див. пункт 1.1.3), на певних *електронних орбітах*. Водночас існують також в середовищах вільні електрони.

Оскільки електрони мають електричний заряд і спін (механічний момент обертання), то їм притаманний *магнітний момент* (μ_e), як і ядрам (див. підпункт 1.1.3.1.). Явище ЕПР і ЯМР основані на одному і тому же принципі – магнітному резонансі. Різниця між ними полягає в тому, що величина електронного магнітного моменту μ_e набагато більша (майже в 10^3 разів) величини ядерного магнітного моменту μ_n , а також у знаках магнітних моментів і взаємодій. Все це призводить до серйозних відмінностей в теорії ЕПР і ЯМР, а також в експериментальних дослідженнях.

Наявність магнітного моменту електрона (μ_e) обумовлює можливість появи спінових переходів, які індуковані дією зовнішнього магнітного поля. Ці резонансні переходи з нижчого енергетичного рівня на вищий відбуваються з поглинанням енергії електромагнітного випромінювання в діапазоні 9–35 ГГц (інтервал значень індукції постійного магнітного поля 0,34–1,25 Тл). Саме це явище і називається *електронним парамагнітним резонансом* (ЕПР).

Умови ЕПР – збіг різниці енергій рівнів, між якими відбувається перехід, що залежить від зовнішнього магнітного поля (з індукцією B), з енергією кванта електромагнітного випромінювання ($h\nu$), тобто:

$$\Delta E = h\nu = g\mu_B B,$$

де h – стала Планка, чисельне значення якої дорівнює $6,6252 \cdot 10^{-34}$ Дж·с; ν – частота електромагнітного випромінювання; g – константа, яка має назву *фактор спектроскопічного розщеплення* (g -фактор Ланде), який для вільного електрона рівний 2,0032; μ_B – магнітний момент електрона, який має назву *магнітон Бора* ($\mu_B = eh/2mc = 9,27 \cdot 10^{-24}$ А·м², e – заряд електрона, m – маса електрона, c – швидкість світла у вакуумі); B – індукція зовнішнього магнітного поля.

З наведеного вище рівняння виходить, що частота поглинання такого радіочастотного випромінювання (ν) залежить від величини магнітного моменту (парамагнетизму) досліджуваного зразка (μ_B) і індукції магнітного поля (B). Звичайно в серійних ЕПР-спектромет-

рах підтримують сталою частоту поля і реєструють залежність поглинання квантів електромагнітного поля (пік ЕПР) від індукції магнітного поля. Спектр піка ЕПР відповідає парамагнетизму досліджуваного зразка. Водночас площа ЕПР-піка залежить від концентрації неспарених електронів у зразку. Цю концентрацію можна визначити, якщо попередньо зняти ЕПР-спектр і визначити площу ЕПР-піку зразка, який містить відому концентрацію неспарених електронів і потім з цим ЕПР-піком порівняти ЕПР-пік зразка, що досліджується (прокалібрувати ЕПР-спектрометр).

Резонансний сигнал ЕПР звичайно реєструють у вигляді залежності від індукції магнітного поля першої похідної інтенсивності спектра поглинання (рис. 1.73), що дозволяє краще виявляти особливості і розділити (ідентифікувати) структуру спектра.

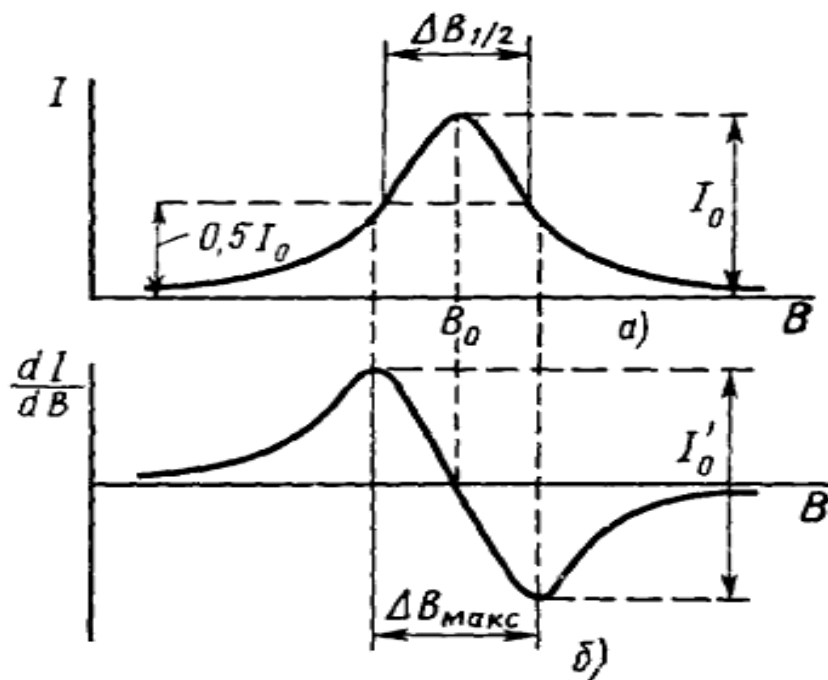


Рис. 1.73. Лінія (сигнал) спектра ЕПР: залежність інтенсивності поглинання (I) квантів електромагнітного поля (а) і першої похідної (б) від індукції зовнішнього магнітного поля (B)

Для вільного (делокалізованого) електрона, як відмічалось, фактор спектроскопічного розщеплення (g) дорівнює 2,0023, а для зв'язаних електронів, особливо в перехідних металах, цей параметр інший, і величина його зміни характеризує ступень зв'язування електрона в молекулі.

У хімічних реакціях при утворенні сполук у певних електронних станах (триплетному та ін.) можлива нерівномірна «заселеність» спінових рівнів електронів атомів. Таке явище називається *хімічною поляризацією електронів* (ХПЕ), яке подібне хімічній поляризації ядер (ХПЯ), що розглянуто при описуванні методу ЯМР (див. пункт 1.2.1)

У випадку аномально високої «заселеності» низьких спінових рівнів електронів виникає підвищена інтенсивність сигналів поглинання в ЕПР спектрах (позитивна ХПЕ), а вищих рівнів – підвищена інтенсивність випромінювання (негативна ХПЕ).

Спектри ЕПР, які отримані при ХПЕ, несуть унікальну інформацію про механізми і кінетику хімічних реакцій, про структуру сполук, які утворюються в хімічних реакціях, та їх попередників тощо.

Спостереження ефектів ХПЕ проводять, як і ХПЯ, за неперервної реєстрації ЕПР-спектрів, безпосередньо при проходженні хімічної реакції в магнітному полі ЕПР-спектрометра.

Взаємодія неспарених електронів з іншою частиною молекули викликає так звану *спін-гратчасту взаємодію*, яка призводить до розширення ЕПР-піку. Величина такого розширення також надає інформацію про структуру молекул.

Результатом взаємодії неспарених електронів з магнітним полем ядер атомів є виникнення *надтонкого розщеплення ЕПР-піків*, яке надає інформацію про розташування атомів у молекулах.

Надтонке розщеплення у вільних радикалах на протонах (ядрах атому Гідрогену) спостерігається в магнітному полі напруженості 300 мТл і надає інформацію, яка аналогічна отриманій за допомогою ЯМР з високим розділенням (див. пункт 1.2.1). Тому методи ЕПР і ЯМР взаємно доповнюють один одного.

Принцип устрою і дії ЕПР-спектрометрів подібні з ЯМР-спектрометрами, а відмінності зв'язані, в основному, з різними областями частот і діапазону індукції (напруженості) зовнішнього магнітного поля. Звичайно серійні ЕПР-спектрометри розраховані на отримання ЕПР-спектрів при частотах 9,5 ГГц (Х-смуга), 25 ГГц (К-смуга) і 35 ГГц (Q-смуга), а індукція магнітного поля змінюється в діапазоні 0,34–1,25 Тл. Дослідження на Х-смугі проводяться, звичайно, з розчинами та при вивченні систем, які не потребують дуже високого розділення спектрів. При більш високих частотах та індукції

зовнішнього магнітного поля найчастіше досліджуються тверді зразки малого розміру при низьких температурах.

На рис. 1.74 наведена схема ЕПР-спектрометра.

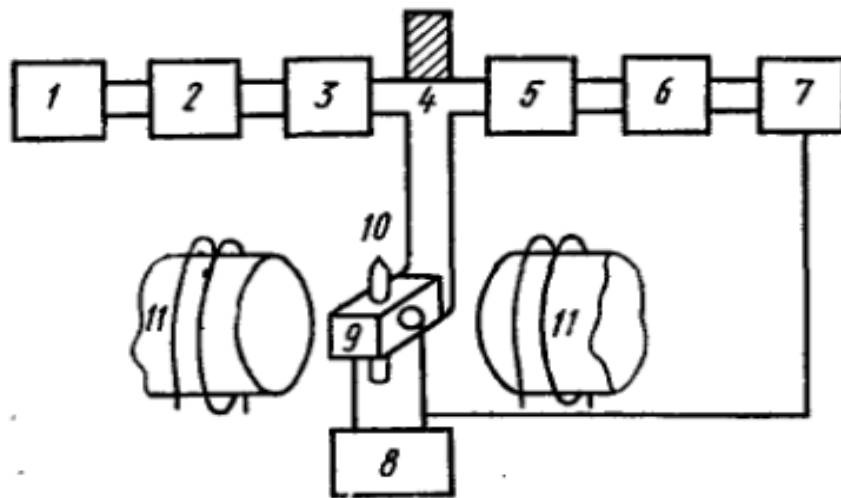


Рис. 1.74. Схема будови ЕПР-спектрометра (основні пристрої)

П р и м і т к а: 1 – клітрон; 2 – феритовий ізолятор; 3 – атенюатор (послаблювач); 4 – радіочастотний міст; 5 – детектор (приймач); 6 – підсилювач; 7 – реєструючий пристрій; 8 – модулятор; 9 – запона резонатора; 10 – зразок у кюветі (ампулі); 11 – електромагніт.

Від надвисокочастотного джерела хвиль, в якості якого використовують *клітрон* (грецьк. *klýzo* – прибій хвилі та *elektron* – смола, бурштин, той що має відношення до електрики), який є одним із типів надвисокочастотних ламп, потік електромагнітного випромінювання спрямовується за хвилеводом до феритового ізолятора, який попереджує зворотний потік випромінювання, і після його проходження та атенюатора (послаблювача), цей потік потрапляє в радіочастотний міст. На одному плечі цього моста знаходиться кювета зі зразком, яка розміщена між полюсами електромагніта. Кювету розміщують в запону резонатора, її розмір обирають таким, щоби утворювалася стояча хвиля. Зразок, що досліджується, розміщують в області найбільшої щільності енергії, а запону зі зразком встановлюють так, щоби положення зразка відповідало також області однорідності зовнішнього магнітного поля. При виконанні умов резонансу і поглинання енергії випромінювання виникає розбалансу-

вання радіочастотного моста і радіочастотний сигнал, який проходить, потрапляє на детектор (як правило, кристалічний). Отриманий з нього сигнал підсилюється та реєструється самописцем і сполучений з приладом комп'ютером. Використовують звичайно модуляцію магнітного поля малою частотою, а також фазочутливий детектор, який перетворює сигнал на першу його похідну кривої поглинання. В ЕПР-спектрометрах, в яких стабілізована частота, для досягнення умов резонансу, розгортка ведеться за магнітним полем.

1.2.2.2. Методи спінових міток і спінових «пасток»

Значно розширюються межі використання ЕПР-спектроскопії за використання методів *спінової мітки* і *спінових «пасток»*. У першому з них стабільний нереакційноздатний вільний радикал з характерним ЕПР-спектром приєднують до молекули, яка не містить неспарених електронів, тобто не має ЕПР-спектра. Такою міткою може бути, наприклад $(R_1R_2)-N-O$. В залежності від характеру зв'язку мітки та її оточення, вона може бути зв'язана жорстко з молекулою, тоді виникає *анізотропія* (грецьк. *anisos* – нерівний та *tropos* – властивість), тобто зміна властивості в плані ЕПР-спектроскопії даної молекули, або мати деякий ступінь вільного обертання. Вигляд ЕПР-спектра в будь-якому випадку слугує джерелом інформації про вихідну молекулу. Можуть застосовуватися відразу і дві мітки, які приєднуються до різних частин молекули.

У методі спінових «пасток» у досліджувану систему вводиться непарамагнітна «пастка», яка реагує з короткоіснуючим радикалом, наслідком чого є утворення стабільного радикала. За допомогою дослідження його ЕПР-спектрів отримують інформацію про процеси утворення нестабільного радикала, участі його в хімічних реакціях тощо. Прикладом «пастки» може слугувати нітробензол, який фіксує радикали в ході реакції окиснення:

За ЕПР-спектрами утвореного радикала судять про нестабільний радикал (R).

1.2.2.3. Метод подвійної ЕПР-спектроскопії

Існує декілька методів множинної ЕПР-спектроскопії, основними з яких є *подвійний електрон-ядерний резонанс* (ПЕЯР) і *електрон-електронний подвійний резонанс* (ЕЕПР). Основною метою розвитку даних спеціальних методів є підвищення спектрального розділення.

У методі ПЕЯР одночасно діють на систему при нерозділеній надтонкій структурі в ЕПР-спектрі двох змінних магнітних полів, одне з яких викликає електронні, а інше ядерні переходи.

Спектри ПЕЯР, які залежать від магнітних властивостей ядер, із якими здійснюється надтонка взаємодія неспарених електронів, можуть використовуватися для ідентифікації ядер і структурно-аналітичних досліджень подібно ЯМР. Основне їх застосування – вивчення систем із складними і «розмитими» ЕПР-спектрами, оскільки ефект ПЕЯР спрощує завдання інтерпретації спектрів та дозволяє проводити ідентифікацію і вимір слабких взаємодій.

На рис. 1.75 наведені спектри ЕПР і ПЕЯР замороженого розчину комплексу титану з циклооктатетраєном і циклопентадієном.

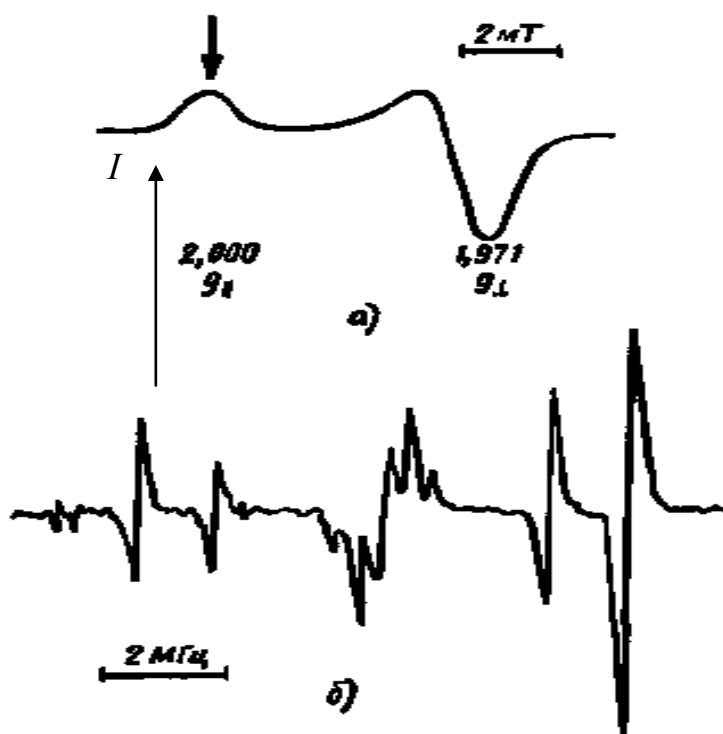


Рис. 1.75. Спектри ЕПР (а) і ^1H – ПЕЯР (б) при встановленому значенні індукції магнітного поля (помічено стрілкою) для замороженого розчину $[\text{Ti}(\text{C}_8\text{H}_8) \cdot (\text{C}_5\text{H}_5)]$ в толуолі

Примітка: I – інтенсивність сигналу.

У дослідженнях ПЕЯР встановлюється індукція постійного магнітного поля, яка відповідає сигналу ЕПР для паралельної компоненти g -фактора (g_{\parallel} , помічено стрілкою на рис. 1.75), і проводиться розгортка за областю частот ПМР (^1H) при цій індукції магнітного поля. Таким чином, отримується спектр подвійного електрон-протонного резонансу (^1H -ПЕЯР) з добре розділеною структурою. На рис. 1.75, де наведений цей спектр, представлені два широкі дублети, з яких безпосередньо визначається взаємодія компоненти константи g_{\parallel} локалізованого неспареного електрона з ^1H циклів C_8H_8 і C_5H_5 (центральна група лінії обумовлена ^1H розчинника – толуолу). Якщо провести такий же експеримент із визначенням сигналу ЕПР, який відповідає g_{\perp} , то встановлюються перпендикулярні компоненти взаємодії.

У методі ЕЕПР також на систему діють двома змінними магнітними полями, які викликають електронні переходи. Ефект у цьому випадку полягає в зміні відносної інтенсивності ліній багатоконтактного ЕПР-спектра.

Сpektри ЕЕПР отримують для одного електронного переходу при опроміненні («накачці») частотою іншого електронного переходу. Зміна інтенсивності лінії ЕПР (R) на частоті ν_0 при насиченні іншого переходу з частотою ν_p визначається, як ефект ЕЕПР, відношенням:

$$R = \frac{I_0 - I}{I_0},$$

де I і I_0 – інтенсивність лінії спектра при наявності і відсутності опромінення («накачки»), відповідно.

У відповідності з принципами методів подвійної ЕПР-спектроскопії технічне забезпечення цих методів має свої особливості. Так, в спектрометрах, де реалізуються ці методи, є два джерела мікрохвильового випромінювання (спостереження та «накачки») і дві реєструючі системи. Необхідна також можливість перебудови частоти джерел випромінювання в широкому діапазоні, тобто розгортка за частотою, на відміну від звичайних ЕПР-спектрометрів, де, як правило, здійснюється розгортка за магнітним полем. Існують також імпульсні ЕПР-спектрометри, які подібні фур'є-спектрометрам ЯМР (див. підпункт 1.2.1.2) з реєстрацією електронного спінового сигналу.

1.2.2.4. Особливості приготування зразків для ЕПР-спектроскопії

В ЕПР-спектроскопії важливим є спосіб приготування зразків для досліджень. Цим методом можна досліджувати гази, розчини, заморожені розчини, монокристали, порошки. Найзручнішими для ЕПР-спектроскопії є зразки, в яких генеруються при опроміненні парамагнітні центри. В цьому плані для досліджень найбільш підходять тверді тіла та заморожені у рідкому азоті ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Слід зауважити, що зниження температури дозволяє стабілізувати на тривалий час навіть надзвичайно реакційноздатні радикали, наприклад, $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$ та ін.

При дослідженні іонів перехідних металів часто застосовують техніку вирощування монокристалів з ізоморфно заміщеною парамагнітним іоном ґраткою діамагнітної речовини. Коли монокристал не вдається виростити, то досліджують порошки, які містять парамагнітні іони і отримані осадженням.

При доборі розчинників для розчинів, які заморожуються, необхідно пам'ятати, що вода і спирти мають високу діелектричну проникність, тому сильно поглинають енергію мікрохвильового випромінювання.

Слід мати на увазі також те, що скло «Пірекс», із якого можуть бути виготовлені кювети (ампули) для зразка, що досліджується, в певній мірі теж здатні поглинати радіочастотне випромінювання, а також давати ЕПР-сигнал. Тому, коли відношення сигнал/шум мале, то краще використовувати кювети для зразка з кварцу.

1.2.3. Мас-спектроскопія

Мас-спектроскопія є одним з високоефективних методів експрес-аналізу і встановлення будови як індивідуальних сполук (природних і синтетичних), так і їх сумішей. Завдяки високій чутливості (для аналізу необхідно всього 10^{-9} – 10^{-6} г досліджуваної речовини, навіть тоді, коли її частка становить 10^{-6} %) і можливості використовувати в комбінації з газовою і рідинною високоефективною хроматографією, цей метод набув широкого застосування в органічній, біоорганічній, біологічній, фізичній, аналітичній і медичній хімії, в нафтохімії, фармакології, токсикології, судово-

медичній експертизі, охороні навколишнього середовища, контролі виробництва та ін.

Успішне застосування мас-спектрометрії для встановлення будови органічних сполук засноване на використанні як фундаментальних теоретичних розробок, так і емпіричних закономірностей і правил, які отримані при дослідженні великої кількості сполук, що відносяться до різних структурних класів.

Одним із способів встановлення будови сполук, які досліджуються методом мас-спектроскопії, є автоматичне порівняння спектра, який отримується, з банком спектрів, що введені в пам'ять потужного комп'ютера. Ідентифікація речовини, яка досліджується, можлива тільки тоді, коли в цьому банку міститься спектр саме цієї речовини. Тому даний спосіб не придатний для встановлення будови нових сполук, які синтезовані або виділені з природних джерел. Нині існують спеціальні програми для автоматичної інтерпретації мас-спектрів за допомогою комп'ютера.

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) – мас-спектрометрія, яка базується на матрично активованій лазерній десорбційній іонізації з час-прольотним аналізатором. Завдяки інформативності, точності та високій продуктивності, вона стала незамінним методом дослідження високомолекулярних біологічних сполук, включаючи протеїни, нуклеїнові кислоти та ліпіди. Можливість ідентифікувати протеїни за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії обумовило розвиток протеоміки і дотепер використовується як один із важливих її інструментів. MALDI-TOF мас-спектрометрія успішно застосовується також для дослідження протеїн-протеїнових взаємодій, взаємодії протеїнів із нуклеїновими кислотами і вивчення модифікації цих сполук.

1.2.3.1. Умови мас-спектроскопії та її характеристика

Метод мас-спектроскопії базується на явищі *іонізації* (грецьк. *іон* – той, що іде) – перетворенні нейтральних атомів або молекул в іони, яке протікає за час 10^{-15} – 10^{-17} с, і викликається дією іонізуючого випромінювання (α -, β -, γ - та інших випромінювань), високих температур, під впливом хімічних реакцій, електричного поля та ін.

Зазвичай в мас-спектрометрах для іонізації сполук використовується метод *електронного удару* (ЕУ), оскільки він найрозробленіший. Якщо енергія таких «ударяємих» електронів $(1-2) \cdot 10^{-18}$ Дж,

то утворюються однозарядні іони (молекули втрачають один електрон). Утворені молекулярні іони мають відношення маси до заряду m/e , яке відповідає масі молекул висхідної речовини. Низька енергія електронів, що викликають іонізацію молекул, зменшує вірогідність іонізації певної частини молекул, потенціал іонізації яких за різних причин може бути вищим. Крім того, однобічна інформація зменшує можливість аналізу. Тому, як правило, для іонізації молекул речовини, яка досліджується, використовують електрони з енергією $1,12 \cdot 10^{-17}$ Дж (70 еВ), що дозволяє отримувати заряджені фрагменти різної маси. Це збільшує аналітичні можливості. Спосіб, яким фрагментуються молекули досліджуваної речовини (утворення фрагментів), є індивідуальною характеристикою кожної речовини. Іонізацію молекул речовин, що досліджуються, можна викликати, як відмічалось, не тільки бомбардуванням електронами, але, наприклад, сильним електричним полем (*польова іонізація*), опроміненням УФ-світлом із довжиною хвилі менше 20 нм (*фотоіонізація*) та ін. У певних випадках це підвищує чутливість мас-спектроскопічного методу. Поряд з іонами вихідної речовини, виникають іонізовані «уламки» меншої молекулярної маси. Утворені іони, як правило, мають позитивний заряд. Їх розділяють за величиною відношення маси до заряду (m/e), яка називається *масовим числом*. Більшість іонів, які утворюються при іонізації досліджуваної речовини, є однозарядними, тобто молекули та їх «уламки» (фрагменти) втрачають по одному електрону. Такі іони можна розрізнити за масою. В певних випадках можуть утворюватися багатозарядні іони. Очевидно, що для тих із них, які мають однакову масу, відношення m/e , буде у стільки разів менше, у скільки разів їх заряд більше.

Мас-спектри представляють собою великий набір піків різної висоти, розміщених відповідно до m/e іонів молекул речовин, що досліджуються, та їх «уламків». Система координат становить, як правило, таку, що по вісі абсцис відкладають значення m/e , які калібровані відносно значення m/e іона вихідної речовини (у мас-спектрі пік, що відповідає найбільшій масі, основний пік), а по вісі ординат – значення у відсотках амплітуди інтенсивності піків відносно амплітуди основного піка.

При кількісному визначенні проводять відповідні перерахунки на результати дослідів з еталонами.

Типи іонів, які реєструються в мас-спектрометрії. Іони, які утворюються при іонізації молекул, називаються *молекулярними іонами з масовими числами M^+* . Вони мають «час життя» біля 10^{-5} с. Масове число (m/e) таких однозарядних іонів дорівнює молекулярній масі молекули речовини, що досліджується. Інтенсивність піків цих іонів залежить від стабільності і варіює в широких межах. Найбільша стабільність притаманна M^+ , сполуки яких мають π -електронні системи (див. підпункт 1.1.3.3). Якщо пік M^+ відсутній в спектрі, що знятий при бомбардуванні електронами з енергією $1,12 \cdot 10^{-17}$ Дж (70 еВ), то його, звичайно, не вдається зафіксувати і в спектрі, який знятий при більш низьких значеннях іонізуючої напруги. В цьому випадку визначити молекулярну масу іноді можна і в результаті часткової інтерпретації мас-спектру в області високих масових чисел.

У деяких випадках, коли утворюються малостабільні M^+ (етери, аміни, нітрили та ін.), доцільно підвищувати тиск в джерелі іонів. Але в цьому випадку можливе виникнення в спектрі піків $[M+1]^+$ і $[M+2]^+$, що необхідно враховувати. Слід зауважити, що хоча інтенсивність таких піків, які можуть виникати і за інших умов, у відношенні до такої у M^+ значно менша, але вони уточнюють елементарний склад речовини, що досліджується.

У мас-спектрометрах низького і середнього розділення (з малою і середньою роздільною здатністю, див. нижче) масове число піка M^+ має цілочисельні значення, тому воно дає можливість визначити лише молекулярну масу сполуки в розрахунку на найбільш розповсюджені ізотопи хімічних елементів, які входять у молекули речовини, що досліджується. В мас-спектрометрах з високим розділенням, масове число M^+ визначається, як правило, з точністю до 0,001 а.о.м. (атомної одиниці маси, $1 \text{ а.о.м.} = 1,6724 \cdot 10^{-17}$ г) і менше, що дозволяє встановлювати хімічний елементарний склад іонів.

Розглянемо, як приклад, мас-спектр CO_2 . При іонізації цієї молекули утворюються наступні іони: CO_2^+ , CO^+ , O_2^+ , O^+ , C^+ . У мас-спектрі їм відповідають піки зі значеннями m/e : 44, 28, 32, 16 і 12, а також піки, які відповідають природним ізотопам тих же «уламків», наприклад, $^{13}\text{C}^+$ ($m/e = 13$) і $^{13}\text{CO}^+$ ($m/e = 45$). Амплітуди цих «ізотопних» піків дуже малі, оскільки ці ізотопи присутні в дуже малій кількості, а самі піки надзвичайно вузькі (так звані *мінорні піки*). Виключення становить стабільний ізотоп ^{12}C , вміст якого великий у біологічних зразках.

Здатність мас-спектрометра розділити два іони з маловідмінними масами m_1 і m_2 та з однаковим зарядом, визначає *роздільну здатність* (R). Вона обчислюється за формулою:

$$R = \frac{m_2}{m_2 - m_1}.$$

Роздільна здатність залежить від конструкції мас-спектрометрів і для однофокусних вона досягає 10^4 , а з подвійним фокусуванням – 10^5 .

«Уламкові» іони. Такі іони можуть утворюватися в результаті простого гетеро- або гемолітичного розриву хімічних зв'язків (відщеплення алкільного радикалу, вихід аліфіна з алкільного іона, алільний, бензойний і ретродієвий розрив, утворення онієвих і ацильних іонів тощо). Інший шлях – перегрупування хімічних елементів або цілих груп атомів від однієї частини молекули до іншої, що приводить до розриву хімічних зв'язків, які не притаманні цій молекулі (міграція атомів Гідрогену, окремо чи у складі групи атомів, зокрема H_2S , CH_3OH , CH_3COOH тощо, скелетні перегрупування та ін.).

Метастабільні іони. Основні іони, які обумовлюють мас-спектр сполуки, що досліджується, виникають безпосередньо в іонізаційній камері, звідки вони за час 10^{-6} с направляються в безпольовий простір між іонним джерелом і магнітним аналізатором. Якщо іон розпадається не в іонізаційній камері, а в цьому просторі, то виникають так звані *метастабільні іони*. Це іони, які заново виникають і мають відмінності за швидкістю від тих, що утворилися в іонізаційній камері. В мас-спектрі такі іони проявляються у вигляді *дифузних* (лат. *diffusio* – розповсюдження, розтікання) *піків*, форма яких має відмінності у порівнянні з формою основних піків. Масові числа таких піків мають дробні значення. Маса іона (m^*), який формує дифузний пік, визначається рівнянням:

$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1}$$

де m_1 – маса більш важкого іона, а m_2 – менш важкого іона.

Це означає, що «уламковий» іон з масою m_2 утворюється при розпаді іона з масою m_1 .

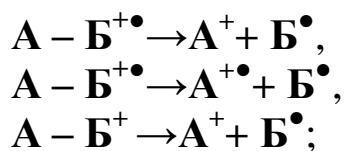
Багатозарядні іони. Поряд з піками звичайних, однозарядних іонів, в мас-спектрах, як вже відмічалось, зустрічаються піки дво- і навіть трьохзарядних іонів. Їх поява обумовлена видаленням з атомів при їх іонізації двох або трьох електронів. Найчастіше багатозарядні іони утворюються при іонізації ароматичних сполук.

1.2.3.2. Деякі правила мас-спектрометрії

Більшість хімічних елементів, які входять до складу органічних молекул, мають або парну масу основних хімічних елементів і парну валентність (C, O, S, Si, Ge, Pb та ін.), або непарну масу і непарну валентність (H, F, Cl, Br, I, As, Sb та ін.). Тільки Нітроген (N) має парну масу і непарну валентність. Тому сполуки, які містять у молекулі непарне число атомів азоту, мають непарне масове число M^+ , а для сполук з парним числом атомів азоту, характерне парне масове число M^+ . Це так зване «азотне» правило мас-спектрометрії.

У залежності від числа атомів N і числа хімічних зв'язків, які розриваються при утворенні «уламків» іонів, вони мають парну чи непарну масу.

«Парно-електронне» правило мас-спектрометрії полягає в тому, що іон-радикали (непарне число електронів) можуть елімінувати (лат. *eliminare* – видалення, виганяти за поріг) як радикали так і парно-електронні нейтральні молекули, тоді як тільки іони (парне число електронів) можуть втрачати лише нейтральні парно-електронні частини, але не радикали:



де індекс «+» означає позитивний заряд, «+●» – позитивно заряджений радикал, «●» – електронейтральний радикал.

Існують певні виключення з цього правила. Одне з них – розпад полігалогенідів шляхом поступового викиду атомів галогену.

Правило Стівенсона-Одье полягає в тому, що при розпаді молекул при їх бомбардуванні електронами позитивний заряд

локалізується в «уламці», який характеризується найменшою енергією іонізації.

В ненасичених системах утруднений розрив зв'язків. Розрив зв'язків, які належать арильній, вінільній або етинільній групам, звичайно відбувається внаслідок низької стабільності насиченості іонів чи радикалів, які утворюються. В мас-спектрах аліфатичних олефінів і ацетиленових сполук є спектри іонів, які формально відповідають розриву С–С-зв'язків біля подвійного чи потрійного зв'язку. Насправді їх виникнення обумовлене складними перегрупуваннями молекул при їх бомбардуванні електронами, що супроводжується міграцією кратних зв'язків.

1.2.3.3. Техніка і особливості досліджень методом мас-спектрометрії

Існують мас-спектрометри з одинарним і подвійним фокусуванням. Останні більш чутливі. Схема такого мас-спектрометра (основні пристрої) наведена на рис. 1.76.

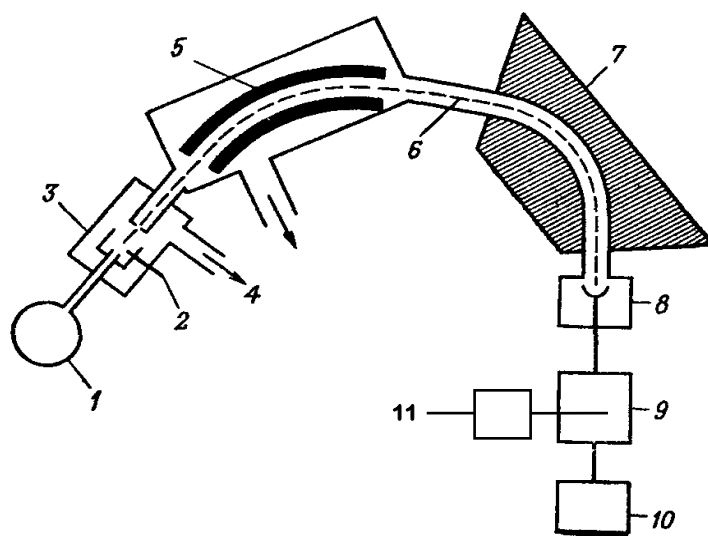


Рис. 1.76. Схема будови мас-спектрометра з подвійним фокусуванням (основні пристрої)

Примітка: 1 – резервуар з парою зразка; 2 – твердий зразок; 3 – іонізаційна камера; 4 – вакуумний насос; 5 – електростатичне поле; 6 – траєкторія іонів; 7 – магніт; 8 – детектор (приймач); 9 – помножувач; 10 – реєструвальний пристрій (самописець, комп'ютер); 11 – ЕОМ, яка містить банк мас-спектрів та програми їх автоматичної інтерпретації.

Для того, щоб іони досліджуваної речовини не взаємодіяли з молекулами повітря і не утворювали внаслідок цього побічні продукти, дослідження проводять у високому вакуумі (тиск не більш 10^{-5} Па).

Речовини, які легко випаровуються (при 100–200 °С мають тиск 1,3 Па або менше) можна розмістити в резервуарі, який зв'язаний з іонізаційною камерою. Із-за різниці тиску між парами зразка в резервуарі та іонізаційній камері (в ній тиск 10^{-5} Па) молекули зразка через діафрагму потрапляють в іонізаційну камеру.

Зразки малолетких речовин вміщують безпосередньо в іонізаційну камеру і там їх випаровують електроспіральним методом.

Розділення після іонізації іонів, що виникли, у відповідності зі значеннями m/e проводять наступним чином. Спочатку їх прискорюють електричним полем, а потім подають в магнітне поле, де вони відхиляються від своєї першопочаткової орбіти. При зміні напруженості магнітного поля і (або) прискорюючого електричного поля змінюється траєкторія іонів і на щілину детектора (приймача) потрапляють іони з певним значенням m/e . При скануванні потоку іонів у поперечній його площині отримують весь спектр іонів.

Роздільна здатність мас-спектрометрів, крім способів приготування зразків для дослідження, умов в іонізаційній камері, напруженості магнітного поля і прискорюючого електричного поля, способів фокусування іонів на щілину детектора тощо, залежить також від розміру цієї щілини – чим вона менша, тим ця здатність більша. Але при зменшенні ширини щілини детектора знижується чутливість приладу, оскільки зменшується кількість іонів, які потрапляють у детектор. Тому, необхідно з урахуванням мети і поставлених завдань обирати оптимальні розміри щілини детектора.

Детекторами мас-спектрометрів, як правило, слугують спеціальні електронні помножувачі. Електричний струм після детектора підсилюється і реєструється самописцем, а також дані вводяться в комп'ютер де, як вже відмічалось, проводиться аналіз (порівняння з банком мас-спектрів) цілого ряду речовин.

Сучасні мас-спектрометри наділені мікропроцесорами комп'ютерів, які керують роботою спектрометра та проводять обробку спектрів.

Для правильної інтерпретації мас-спектрів важливо, щоби речовини, які досліджуються, були чистими. Для цього мас-спек-

трометри, як правило, поєднують з газорідними хроматографами. Після розділення суміші на хроматографі, досліджувані речовини потрапляють для аналізу в мас-спектрометр.

Досить ефективними, як для хроматографії, так і для мас-спектрометрії, виявилися хромато-мас-спектрометри – одні з найпоширеніших сучасних аналітичних приладів. У них різні типи газових, рідинних або іонних хроматографів забезпечують попереднє розділення речовини, а індикацію розділених речовин та вимірювання їх змістів здійснює мас-спектрометр. Тому мас-спектрометри в хромато-мас-спектрометрах здебільшого мають справу не з сумішшю сполук, а з індивідуальними сполуками, які на короткий час надходять на джерело іонів.

Одним з найперспективніших хроматографічних методів є високоефективна рідинна хроматографія, яка застосовується для розділення, встановлення та кількісного визначення лікарських препаратів у фармацевтичному та хіміко-токсикологічному аналізі.

1.2.4. Мессбауерівська спектроскопія

В основі методу *мессбауерівської спектроскопії*, який ще називають *спектроскопією ядерного γ -резонанса* (ЯГР) лежить вивчення поглинання γ -випромінювання якогось ядра-джерела ядром того ж ізотопу, яке знаходиться в зразку, що досліджується.

Гамма (γ)-випромінювання – це такий тип іонізувального випромінювання, що виникає при переході збудженого ядра в основний стан, і який не супроводжується зміною масового числа та атомного номера. Воно становить собою потік електромагнітного випромінювання (γ -квантів) з довжиною хвилі менше 0,01 нм.

Можливість ЯГР залежить від різниці енергій основного і збудженого станів ядра, так і усунення втрат на віддачу (ефекту віддачі ядер) при випромінюванні і поглинанні γ -квантів, а також скомпенсованості ефекту Доплера (див. підпункт 1.2.4.1).

Застосування ефекту Мессбауера в структурно-аналітичних дослідженнях базується на залежності енергії енергетичних переходів в ядрі (різниці енергій станів ядер, між якими відбувається перехід), від хімічного оточення ядра, тобто взаємодії ядра з цим оточенням. Зв'язані з цим відмінності в енергіях переходів дуже малі – в 10^{10} разів менші у порівнянні з енергіями самих γ -квантів (переходів), які мають значення порядку 10^4 – 10^5 еВ, що відповідає області

частот 10^{12} – 10^{13} МГц. Разом із тим роздільна здатність методу достатньо велика і тому його можна успішно використовувати в структурно-аналітичних дослідженнях. Цьому сприяє висока монохроматичність випромінювання: ширина лінії $\Gamma_\gamma = \Delta\nu_{1/2}$ (ширина на напіввисоті піка) звичайно лежить в межах 10^{-10} – 10^{-15} від значення енергії γ -променів.

Крім структурно-аналітичних досліджень за допомогою мессбауерівської спектроскопії, цей метод в аналітичній хімії знайшов широке застосування при вивченні ступеня окиснення атомів, ядра яких здатні до мессбауерівських переходів, їх валентних станів, визначення розподілу електронної густини, характеру хімічних зв'язків тощо. Мессбауерівська спектроскопія знайшла своє застосування в фізиці твердого тіла, біології, геології, аналітичній хімії.

Ефект Мессбауера отримано для декількох десятків хімічних елементів, але не для всіх з них він знайшов застосування. Найбільш широко використовуються наступні ізотопи: ^{57}Fe , ^{119}Sn , ^{121}Sb , ^{125}Te , ^{129}I , ^{129}Xe і ^{197}Au .

1.2.4.1. Умови виникнення ефекту Мессбауера

Існує ряд певних умов, які повинні виконуватися, щоби спостерігався ефект Мессбауера. Не в усіх хімічних елементів вони виконуються, хоча збуджені стани ядра хімічного елемента можуть бути відомі.

Для простоти спочатку розглянемо систему з вільних атомів у газовій фазі. Ядра цих атомів можуть бути в основному (енергія рівня E_g) і збудженому (енергія рівня E_e) станах. Різниця енергій цих рівнів дорівнює енергії переходу ядра (E_T):

$$\Delta E = E_e - E_g = E_T.$$

Енергетичний перехід відбувається з випромінюванням або поглинанням γ -випромінювання (γ -кванта), причому в першому випадку ядро переходить в основний, а в другому в збуджений стан. Енергія γ -кванта ($E_\gamma = h\nu_\gamma$) приблизно дорівнює енергії переходу (відрізняється на енергію віддачі E_R , див. нижче). Вона настільки велика, що на відміну від більш довгохвильового випромінювання, наприклад, УФ-випромінювання, видимого чи ІЧ-випромінювання,

при звичайних атомних масах суттєве значення набуває ефект віддачі, тобто швидкістю v і енергією E_R не можна знехтувати (рис. 1.77).

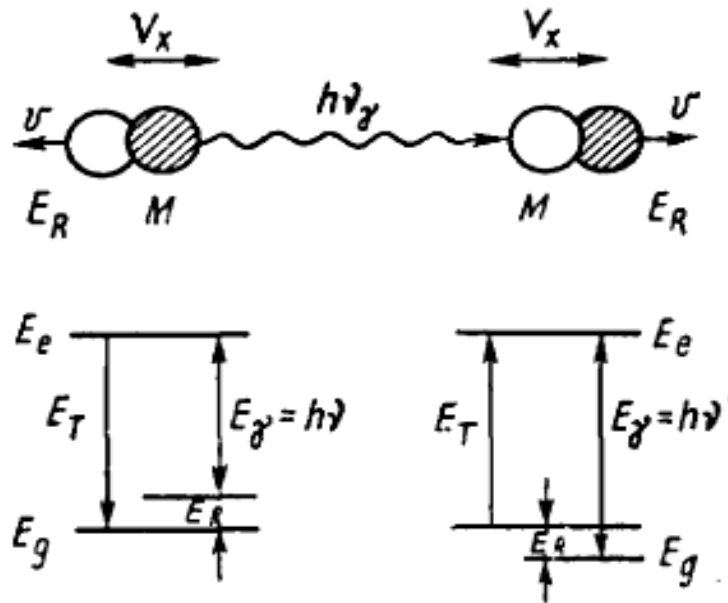


Рис. 1.77. Схема взаємодії ядер вільних атомів в основному (енергія E_g) і збудженому (енергія E_e) станах (пояснення див. текст)

Випромінювання γ -кванта ядром, яке є його джерелом (радіоактивним ізотопом, якому притаманне γ -випромінювання) і віддача його ядра відбувається в протилежних напрямках, а спрямування руху γ -кванта і віддачі ядра, здатного його поглинути, співпадають. У момент випромінювання γ -кванта енергія ядра-джерела γ -квантів ($E_{дж.}$) понад енергії спокою в основному стані визначається рівнянням:

$$E_{дж.} = E_T + \frac{1}{2} M V_x^2,$$

де M – маса ядра; V_x – швидкість теплового руху ядра; E_T – енергія переходу.

Після випромінювання γ -кванта виникає система з цього γ -кванта та ядра в основному стані з додаванням швидкості руху (швидкості віддачі v), і енергія цієї системи ($E_{сист.}$) дорівнює:

$$E_{сист.} = E_\gamma + \frac{1}{2} (V_x + v)^2.$$

Згідно закону збереження енергії:

$$E_T + \frac{1}{2}MV_x^2 = E_\gamma + \frac{1}{2}M(V_x + v)^2 = E_\gamma + \frac{1}{2}MV_x^2 + MV_x v + \frac{1}{2}Mv^2.$$

З цього рівняння витікає, що енергія переходу (E_T) і енергія γ -квантів різняться на величину:

$$E_T - E_\gamma = \frac{1}{2}Mv^2 + MvV_x = E_R + E_D.$$

Перший доданок і є *енергія віддачі* (E_R), а другий, який зв'язаний з швидкістю поступального руху V_x , є *енергія ефекту Доплера* (E_D) (див. нижче).

Енергія γ -кванта (E_γ) в принципі залежить від напрямлення руху ядра і того, як воно співвідноситься зі спрямуванням руху γ -кванта. Енергія розподілення γ -квантів, які випромінюються, визначається рівнянням:

$$E_\gamma = E_T - E_R - E_D,$$

а крива розподілення цих γ -квантів має вигляд (рис. 1.78):

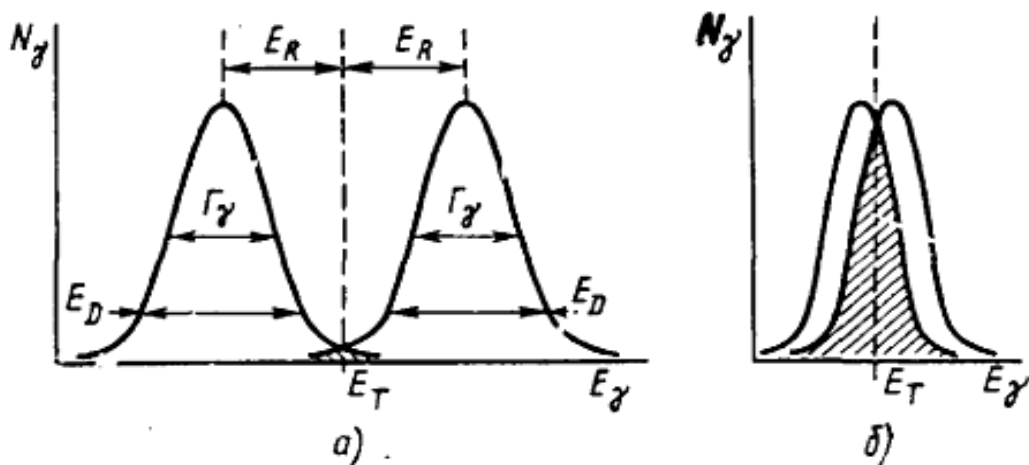


Рис. 1.78. Розподілення γ -квантів (N_γ), які випромінюються ядром-джерелом і поглинаються ядром зразка при ефекті Мессбауера

П р и м і т к а: за енергіями: а – для вільних атомів; б – для ядер в кристалічній ґратці при низьких температурах (пояснення див. текст).

Ефект Доплера базується на тому, що частота хвильового процесу буде різною, якщо її оцінювати за допомогою приймачів, які нерухомі відносно джерела випромінювання або рухаються відносно нього. Це означає, що частота електромагнітної хвилі, яка сприймається приймачем, залежить не тільки від внутрішньоатомних процесів, що призводять до випромінювання хвиль, але також від величини і напрямлення швидкості як джерела, так і приймача відносно середовища, в якому розповсюджуються хвилі. Закономірності ефекту Доплера встановлені на основі *спеціальної теорії відносності* (СТВ). В рамках цієї теорії математичний вираз, який зв'язує частоту ω_0 електромагнітного випромінювання, яке випромінюється джерелом, і частоту випромінювання ω , яке сприймається приймачем, має вигляд:

$$\omega = \omega_0 \frac{\sqrt{1 - \frac{V^2}{c^2}}}{1 - \frac{V}{v} \cos \theta},$$

де V – швидкість джерела випромінювання відносно приймача; v – фазова швидкість хвиль; θ – кут між вектором \vec{V} і хвильовим вектором \vec{k} хвилі, який вимірюється в системі підрахунку, що зв'язана з приймачем; c – швидкість світла у вакуумі.

Слід зауважити, що енергію віддачі ядра можна виразити через *імпульс віддачі ядра* (P_R), який рівний імпульсу γ -кванта (P_γ), але протилежний за знаком:

$$E_R = \frac{1}{2} M v^2 = M v / 2M = P_R / 2M = E_\gamma^2 / 2M c^2,$$

а в кінцевому вигляді:

$$E_R = E_\gamma^2 / 2M c^2.$$

З урахуванням того, що енергія теплового руху приблизно дорівнює $\frac{1}{2} M v^2 \approx \frac{1}{2} kT$ (k – стала Больцмана, T – абсолютна температура), то можна записати:

$$V_x = (2kT / M)^{1/2},$$

а при підставленні цієї величини у вираз для енергії ефекту Доплера отримуємо:

$$E_D = MvW_x = (2MvkT)^{1/2} = 2(E_RkT)^{1/2},$$

а в кінцевому випадку:

$$E_D = E_\gamma (2kT / Mc^2)^{1/2}.$$

У мессбауерівській спектроскопії ядра джерела випромінювання і зразка однакові і мають відмінність тільки в енергетичних станах. Щоби ядро, яке чинить теплові рухи і знаходиться в основному стані, змогло поглинути γ -квант, що випромінюється джерелом, і перейти в збуджений стан, при цьому зазнати віддачу, енергія γ -кванта (E_γ) повинна бути:

$$E_\gamma = E_T + E_R + E_D.$$

Крива розподілення поглинутих γ -квантів співпадає з такою кривою для γ -квантів, які випромінюються при ефекті Мессбауера (рис. 1.78).

Основні умови виникнення ефекту Мессбауера:

1. Наявність процесу релаксації ядер, які збуджуються, з випромінюванням γ -квантів і в якому задіяна достатня частина ядер.

2. Енергія γ -квантів відповідає межах $10 < E_\gamma < 150$ кеВ, тобто з відносно великою енергією переходів ядер, але енергія віддачі не повинна перевищувати коливальних квантів кристалічної ґратки, в якій фіксовані ядро-випромінювач і ядро-поглинач.

3. Період напіврозпаду ($t_{1/2}$) мессбауерівського збудженого ядра повинен бути в межах $1 < t_{1/2} < 100$ нс, тобто, з однієї точки зору, необхідно, щоб він був достатньо великим, щоби принцип невизначеності (див. підпункт 1.1.3.1) не міг суттєво впливати на зміну E_γ , а з іншої достатньо малим, щоби отримати інтенсивні і широкі лінії, оскільки дуже малі лінії важко, а деколи неможливо спостерігати.

4. У випромінювача (мессбауерівського ядра, яке збуджене) повинний бути довгоіснуючий попередник – радіоактивний ізотоп, який зручний в поводженні. Важливо, щоб розпад цього ізотопу проходив через стадію утворення мессбауерівського енергетичного рівня.

5. Стан радіоактивного ізотопу ядра, який є джерелом випромінювання γ -квантів, відрізняється відносною стійкістю, а здатність ізотопу(ядра)-приймача поглинати γ -кванти – достатньо великою.

На рис. 1.79, як приклад, наведена схема розпаду радіоактивного ізотопу, що широко застосовується в мессбауерівській спектроскопії як материнський ізотоп – ^{57}Co :

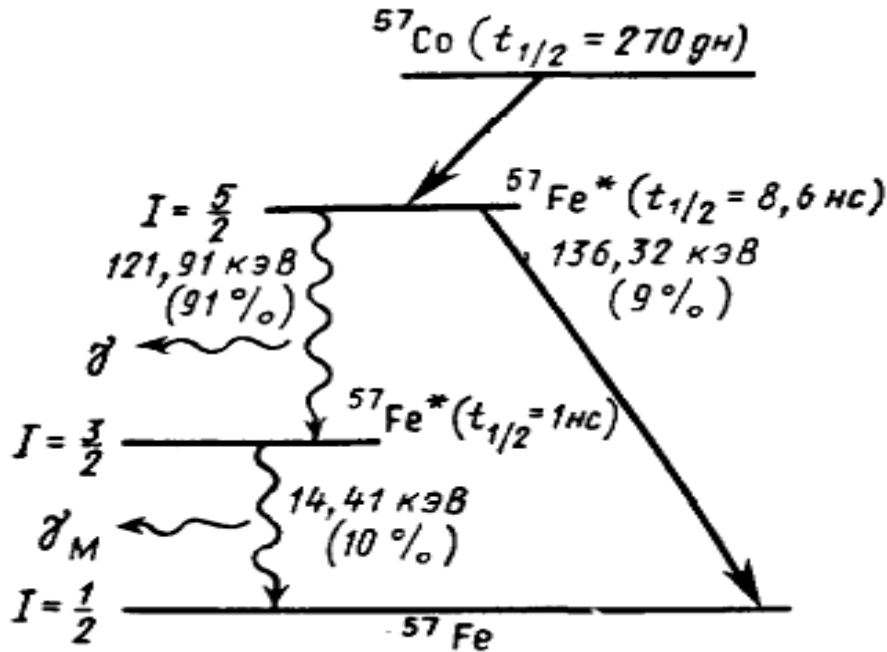


Рис. 1.79. Схема радіоактивного розпаду ^{57}Co з утворенням мессбауерівських атомів ^{57}Fe (пояснення див. текст)

При захопленні електрона ^{57}Co перетворюється у ^{57}Fe у збудженому стані ($^{57}\text{Fe}^*$). Менша частина ядер $^{57}\text{Fe}^*$ (9 %) із верхнього рівня безпосередньо переходить в основний стан ^{57}Fe із випромінюванням γ -квантів високої енергії (136,32 кеВ), а більша частина (91 %) – у нижчий збуджений стан (мессбауерівський рівень), який задовольняє наведеній вище третій умові. З цього стану і відбувається мессбауерівський перехід. Радіоактивний ізотоп ^{57}Fe в основному стані задовольняє п'яту умову, хоча його природний вміст всього 2,17 %, але цього достатньо для мессбауерівської спектроскопії. Саме таке ядро ^{57}Fe здатне поглинати γ -квант (який випромінює $^{57}\text{Fe}^*$) і переходити в збуджений стан.

1.2.4.2. Параметри мессбауерівських спектрів

Найбільший вплив на зміну енергії поглинання зразком ($E_{\gamma(\text{зразка})}$) у порівнянні з енергією випромінювання ($E_{\gamma(\text{джерела})}$) проявляють три головні типи взаємодій ядра-зразка з його хімічним оточенням:

1. Ізмерний (хімічний) зсув (взаємодія ядра з електронами);
2. Квадрупольна взаємодія за наявності градієнта електричного поля на ядрі (для ядер з спіном $J > 1/2$);
3. Магнітні взаємодії.

Ізмерний хімічний зсув. Зміна енергії переходу в ядрі (δ), тобто енергії поглинання зразком γ -кванта, що випромінюється джерелом, пов'язана з відмінностями електронного оточення ядер в зразку і джерелом випромінювання наступним чином:

$$\delta = E_{\gamma(\text{зразка})} - E_{\gamma(\text{джерела})}.$$

Це явище називається *ізмерним хімічним зсувом* і вимірюється в одиницях ($\text{мм} \cdot \text{с}^{-1}$) як значення швидкості руху джерела, при якій спостерігається максимум поглинання γ -квантів. При експериментальному визначенні δ у центрі сигналу використовують термін *центровий зсув*, а ізмерний (хімічний) зсув відрізняється від нього на невеликий доплерівський внесок від теплового руху ядер, яким притаманний ефект Мессбауера.

Електрони, які взаємодіють з ядром атома, впливають на відносне розміщення основного і збудженого станів ядра. Енергія цієї електростатичної (кулоновської) взаємодії залежить як від електронної густини (перекриття об'єму ядра електронною хмарою), так і густини заряду ядра:

$$\delta = E_{\gamma(\text{зразка})} - E_{\gamma(\text{джерела})} = \frac{2}{3} \pi e^2 z [\langle r^2 \rangle_e - \langle r^2 \rangle_g] \times [|\psi(0)|_{\text{зразка}}^2 - |\psi(0)|_{\text{джерела}}^2],$$

де e – одиничний заряд (електрона); Z – порядковий номер хімічного елемента; $|\psi(0)|^2$ – квадрат модуля електронної хвильової

функції; $\langle r^2 \rangle = \frac{\int_0^\infty \rho(r)r^2 dv}{\int_0^\infty \rho(r)dv}$ – квадрат ефективного радіусу ядерного

заряду; $\rho(r)$ – густина ядерного заряду.

Цей вираз може було спрощено, якщо: 1) вважати основну роль в утворенні δ мають, насамперед, s -електрони (див. підпункт 1.1.3.1), а інші орбіталі електронів незначно впливають на s -електронну щільність; 2) прийняти, що ядро сферичне; 3) ефективний радіус ядра в основному стані дорівнює R , а різниця ефективних радіусів ядер в збудженому і основному станах дорівнює ΔR , то:

$$\delta = (4\pi / 5)(e^2 ZR^2) \times (\Delta R / R) [|\psi_s(0)|_{\text{зразка}}^2 - |\psi_s(0)|_{\text{джерела}}^2].$$

Ізомерний (хімічний) зсув δ може приймати як позитивні, так і від'ємні значення в залежності від знака $\Delta R/R$. Якщо ефективний радіус збудженого ядра більше, ніж ядра в основному стані, тобто густина заряду ядра $P_g > P_e$, а $\Delta R/R > 0$, то при збільшенні s -електронної щільності на ядрі в зразку порівняно з джерелом, буде спостерігатися позитивний зсув ($+\delta$). Навпаки, коли $P_g < P_e$, а $\Delta R/R < 0$, то цей зсув буде від'ємним ($-\delta$).

Квадрупольне розщеплення (Δ). Квадруполь (лат. *quadrum* – чотирьохкутник та грецьк. *polus* – полюс) – це нейтральна система з чотирьох електричних зарядів, яку розглядають як систему двох близько і протилежно розміщених *диполів* (грецьк. *di(s)* та *polus* – полюс), тобто сукупності двох рівних за величиною зарядів різного знаку, які розміщені на деякій відстані один від одного.

Наслідком електричної квадрупольної взаємодії в мессбауерівському спектрі є виникнення тонкої мультиплетної структури сигналів, яка залежить від спіна ядра в основному і збудженому станах і від градієнта електричного поля на ядрі. Ядро, в якому відбувається мессбауерівський перехід, може в одному стані, а часто в двох (основному і збудженому) володіти спіном $J > 1/2$, а значить мати *квадрупольний момент* eQ . Якщо при цьому є ще градієнт електричного поля, який створюється оточенням на ядрі ($eQ \neq 0$), то рівні ядра розщеплюються на декілька підрівнів. Характер і величина розщеплення залежать від константи квадрупольної взаємодії (e^2qQ). На рис. 1.80 наведена схема енергетичних рівнів

для ядра ^{129}I , яке має в основному стані спіні $J_g = 7/2$, $eQ \neq 0$, а в збудженому $J_e = 5/2$, $eQ \neq 0$.

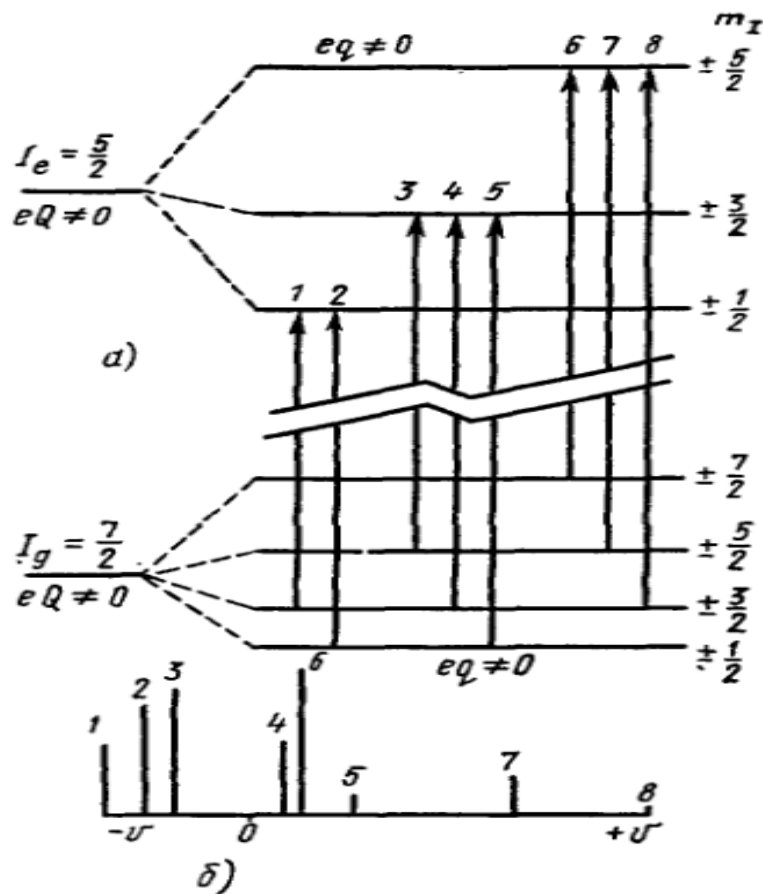


Рис. 1.80. Схема енергетичних рівнів і переходів ізотопу ^{129}I за наявності електричного поля на ядрі (а) і якісний вигляд мессбауєрівського спектра (б) (m_i – квантові числа)

Надтонка структура магнітних взаємодій. Якщо на ядро з спіном $J \neq 0$ діє магнітне поле, то відбувається розщеплення ядерних рівнів на $2J + 1$ підрівні (див. підпункт 1.2.1.1). В мессбауєрівському переході беруть участь два стани ядра (основний і збуджений), які характеризуються спінами J_g і J_e , від яких залежить розщеплення рівнів енергії E_g і E_e на відповідне число підрівнів. Переходи в ядрах підпорядковуються правилам відбору зі значенням квантового числа $m_I = 0, \pm 1$. Наслідком цих переходів є надтонка структура (НТС) мессбауєрівського спектра. Для її спостереження необхідні магнітні поля з індукцією $B > 1$ Тл.

Магнітне поле на ядрі може утворюватись як зовнішніми джерелами (електромагнітами), так і магнітними моментами атомів у самому зразку. Останнє може відбуватися тільки у феромагнітних

(магнітні моменти сусідніх атомів направлені назустріч один одному і взаємно не скомпенсовані) речовинах. Для парамагнітних (здатних намагнічуватися у зовнішньому магнітному полі у напрямі, що співпадає із спрямуванням цього поля) речовин мессбауерівські спектри спостерігати значно складніше із-за швидкої релаксації електронних спінів, звичайно це можливо тільки при дуже низьких температурах.

На рис. 1.81 наведена схема підрівнів двох станів ядра ^{119}Sn і переходів між ними у магнітному полі, а також вид спектра при відсутності градієнта електричного поля і квадрупольного розщеплення, коли направлення магнітного поля і γ -випромінювання співпадають.

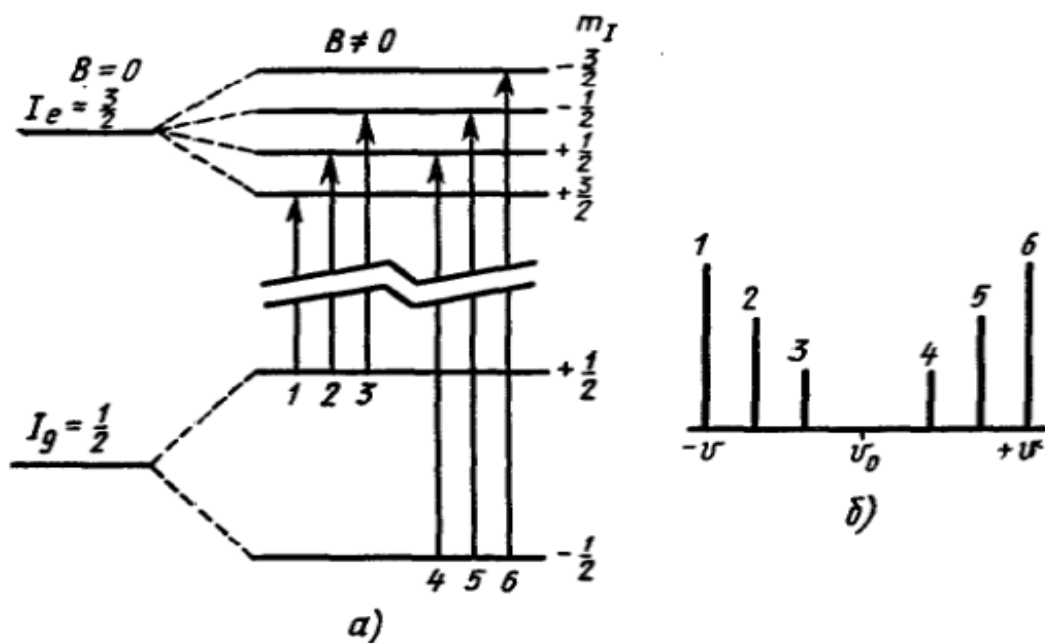


Рис. 1.81. Схема енергетичних рівнів і переходів для ядра ^{119}Sn у магнітному полі (а) і вигляд надтонкої магнітної структури мессбауерівського спектра (б)

Лінії спектра, який спостерігається, розміщені симетрично відносно центрального зсуву δ (тобто швидкості v_0) при відсутності магнітного поля.

Інтерпретація мессбауерівських спектрів при одночасних квадрупольних і надтонких магнітних взаємодіях надзвичайно складна. Для цього використовують зовнішнє магнітне поле, за допомогою

якого визначають напрямлення градієнта електричного поля на ядрі (eq) і параметр асиметрії (η).

1.2.4.3. Техніка і особливості досліджень методом мессбауєрівської спектроскопії

Принципова схема двох типів спектрометра Мессбауєра наведена на рис. 1.82.

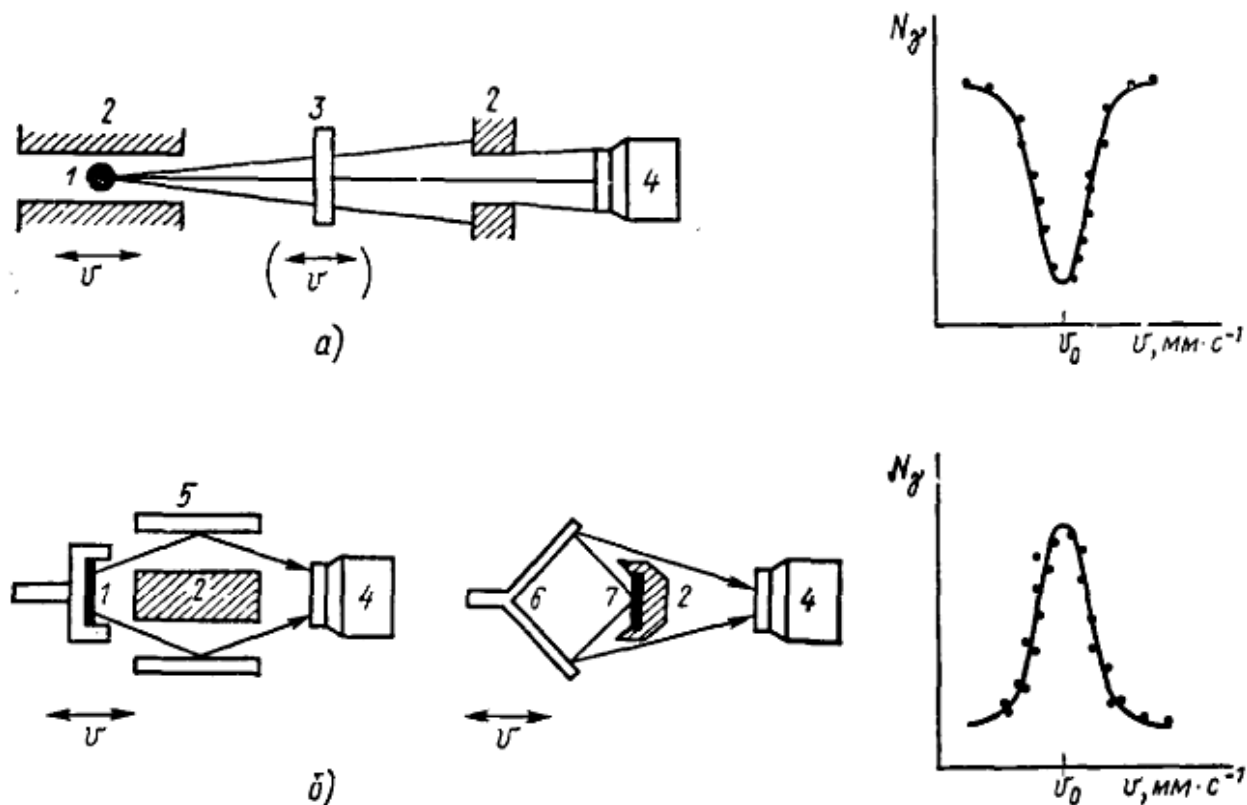


Рис. 1.82. Схема двох типів (пояснення див. текст) спектрометра Мессбауєра

Примітка: 1 – джерело γ -квантів, яке рухається; 2 – коліматор та екрани (Pb); 3 – нерухомий зразок; 4 – детектор і лічильник імпульсів; 5 – нерухомий циліндричний розсіювач (зразок); 6 – конічний розсіювач (зразок), який рухається; 7 – нерухоме джерело γ -квантів; окремо наведені для даних варіантів спектрометра Мессбауєра залежності числа сигналів (N_γ) від швидкості руху джерела (зразка) γ -квантів.

При використанні мессбауєрівської спектроскопії важливими є вимоги до джерела γ -квантів. Це повинна бути доступна і чиста речовина, за можливістю без упорядкованої структури, завдяки якій

отримуються вузькі лінії. Так, наприклад, для дослідження мессбауерівських спектрів ^{57}Fe загальноприйнятим стандартом є сполука цього ізотопу $\text{Na}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ або же металевий Ферум (Fe); для $^{119}\text{Sn} - \text{SnO}_2$ тощо.

Джерело квантів та їх поглинач (зразок) у мессбауерівській спектрометрії містять одні і ті ж ядра атомів, але можуть бути і виключення. Так, для ^{119}Xe часто використовують як джерело γ -квантів ^{129}I в аніоні IO_4^- . Це є штучний радіоактивний ізотоп йоду, але він довгоживучий і може бути накопичений у великій кількості.

Джерело γ -квантів (або зразок-поглинач) рухається спеціальним вібратором, у якого контролюється і вимірюється швидкість у різних напрямках (до зразка і від нього). Речовина-поглинач (зразок), в одному з варіантів спектрометра Мессбауера (рис. 1.82 а), розміщується на шляху γ -випромінювання, яке може поглинатися зразком або частково просто проходить крізь нього. В іншому варіанті (рис. 1.82 б) γ -випромінювання потрапляє на зразок під певним кутом і це призводить до того, що ядра зразка, які поглинають γ -кванти і збуджуються, потім їх розсіюють.

Пропущені або розсіяні після поглинання (в залежності від варіанту спектрометра Мессбауера) γ -кванти потім *колінуються* (лат. *collineare* – направляти за прямою лінією), тобто формується пучок паралельних променів, які потрапляють на детектор, за яким розміщено лічильник імпульсів. Криві, які є результатом виміру залежності числа імпульсів від швидкості руху джерела (зразка) γ -квантів також наведені на рис. 1.82. Швидкість руху джерела (зразка) γ -квантів відповідає максимуму поглинання (мінімуму пропускання) або розсіювання, тобто ізомерному (центровому) зсуву, який позначається ν_0 .

Положення спектроскопічної лінії (сигналу) вимірюється в серійних спектрометрах Мессбауера з точністю $\pm 0,01 \text{ мм} \cdot \text{с}^{-1}$. Різниця ізомерних (хімічних) зсувів ($\Delta\delta$) і квадрупольне розщеплення (Δ) можуть несуттєво відрізнитися за величиною звичайної ширини сигналів. Тому можливе перекривання сигналів, що створює певні труднощі при ідентифікації спектрів. У певних випадках цьому допомагають модельні розрахунки спектрів, а також порівняння експериментальних спектрів з стандартними.

Необхідність вести дослідження в мессбауерівській спектроскопії у широкому діапазоні температур, а часто і за дуже низьких, приводило до використання спеціальної дорогої апаратури. З роз-

витком *методу матричної ізоляції* (ММІ), який дозволяє проводити дослідження при низькій температурі, частково зняли цю проблему. Зокрема, досліджені атоми Fe в різних матрицях (в Хе, СН₄ та ін.), а також інші об'єкти.

Отримали розвиток дослідження мессбауерівських спектрів при високих тисках (до мегабар). Хоча високий тиск порівняно мало впливає на електронні оболонки атома, але параметри мессбауерівської спектроскопії, які вимірюються при високому тиску (зокрема, ізомерний зсув) несуть нову інформацію про взаємодію ядра з електронним оточенням. Цей метод підвищує чутливість порівняно зі звичайним, але подовжує час вимірів, ускладнює самі виміри.

Існує метод, який називається *мессбауерівською спектроскопією електронів конверсії* (МСЕК). Він базується на реєстрації електронів, які виникають при *конверсії* (лат. *conversio* – передавання, зміна), тобто тих електронів, які вилітають з атома при передачі їм надлишкової енергії збудженого ядра атома (енергії γ -квантів). Випромінювання електронів конверсії з оболонок атома обумовлена розсіюванням енергії при збудженні ядер атома. Величина, що вимірюється за методу МСЕК, яка характерна для кожного ізотопу хімічного елемента, є коефіцієнт конверсії (α):

$$\alpha = \alpha'(1 - \alpha'),$$

де α' – відношення числа конвертованих переходів до загального числа переходів.

Метод МСЕК ефективний і переважно використовується для дослідження поверхні і шарів товщиною 5–300 нм, що, як і в методі власне фотоелектронної, а також рентгеноелектронної спектроскопії (див. пункт 1.2.5) зв'язано з глибиною виходу електронів, які мають певну кінетичну енергію. Цей метод може також застосовуватися для вивчення взаємодії між поверхнею твердих тіл і рідкої фази. Таким чином, метод МСЕК має значення як аналітичний метод для дослідження явищ адсорбції, корозії, утворення пасивних шарів, у каталізі реакцій.

Слід зауважити ще раз, що методи мессбауерівської спектроскопії не так поширені, як, наприклад, оптичні, ЯМР, мас-спектрометрія та деякі інші. Це, мабуть, пов'язано з їх малою доступністю і складністю обладнання, а також обмеженістю кола об'єктів і тих

задач, які вирішуються цими методами. Разом із тим, вони дають цінну інформацію про будову речовин, електронні ефекти, ступінь окиснення атомів та їх валентних станів, характер хімічних зв'язків, передачу взаємного впливу груп у різних молекулах, структуру і динаміку твердих фаз, фазові переходи, рухомість молекул у кристалах тощо. З розвитком експериментальної техніки деякі обмеження мессбауерівської спектроскопії, без сумніву, будуть усунуті.

1.2.5. Фотоелектронна спектроскопія (власне фотоелектронна, рентгеноелектронна і оже-електронна спектроскопія)

Для структурних досліджень, зокрема отримання інформації про електронну структуру речовини, прямого виміру енергетичних характеристик електронних станів атомів і молекул, вивченні поверхні твердих тіл, тонких плівок і шарів, аж до моношарів, визначенні особливостей каталізу хімічних реакцій, процесів адсорбції речовин, структурно-аналітичних досліджень, кількісного аналізу тощо, використовується група методів фотоелектронної спектроскопії, зокрема власне (безпосередньо) фотоелектронної, рентгеноелектронної та оже-електронної спектроскопії.

Усі методи базуються на явищі *фотоефекту* (грецьк. *phos* – світло та лат. *effectus* – дія, результат чогось), який виникає при використанні монохроматичного (однієї певної довжини хвилі) електромагнітного випромінювання і вторинній електронній *емісії* (лат. *emissio* – випромінювання). Власне *фотоелектронною спектроскопією* (ФЕС) називають метод, в якому речовину, що досліджується, опромінюють електромагнітними хвилями у короткохвильовій УФ-області (довжина хвилі менше 200 нм). Це УФ-випромінювання викликає іонізацію (при довжині хвилі 200 нм енергія квантів УФ-випромінювання 6 еВ, а 20 нм – 60 еВ).

В *рентгеноелектронній спектроскопії* (РЕС) або її ще називають *електронна спектроскопія для хімічного аналізу* (ЕСХА) використовують для створення явища емісії електронів рентгенівське випромінювання (довжина хвилі 10^{-3} –5 нм). Воно становить собою сукупність *гальмівного* (виникає під час гальмування заряджених частинок в електричному полі орбітальних електронів і зумовлене енергетичними переходами внутрішніх електронів атомів після їх збудження), а також *характеристичного* (виникає при переході

орбітальних електронів з вищих оболонок на нижчі, які звільняються внаслідок відриву електронів нижчих оболонок, причиною чого є поглинання гальмівного випромінювання).

В *оже-електронній спектроскопії* (ОЕС) використовується випромінювання, яке утворюється внаслідок перерозподілу енергії орбітальних електронів. Перехід електрона зі зовнішньої оболонки на більш близьку до ядра супроводжується випромінюванням електрона з цієї внутрішньої оболонки. Цей електрон (оже-електрон, названий на честь французького фізика Ж. Оже) через відносно малу енергію здатний іонізувати тільки сусідні атоми.

В *індукованій електронній емісії спектроскопії* (ІЕЕС) для явища емісії електронів використовують пучок електронів.

1.2.5.1. Фізичні основи методів фотоелектронної спектроскопії (ФЕС, РЕС і ОЕС)

Методами ФЕС, РЕС і ОЕС вимірюють кінетичну енергію ($E_{кін.}$) фото- і оже-електронів, що дозволяє визначити енергію зв'язку електронів $E_{n,l}$ де n і l квантові числа рівнів (див. підпункт 1.1.3.1) в атомах на всій сукупності електронних оболонок. Для твердих зразків визначають саме $E_{n,l}$, яка і відповідає енергії зв'язку електрона ($E_{зв.}$), а для газів, як правило, енергію іонізації ($E_{іон.}$).

Енергія короткохвильового УФ-випромінювання ($E_{УФ} = h\nu < 100$ еВ), як відмічалось, достатня для того, щоби вибити електрон (валентний) з найвищої оболонки або з молекулярних рівнів (орбіталей). Рентгенівське випромінювання, а також електронний пучок в оже-електронному методі мають достатню енергію ($E = h\nu > 10^3$ еВ) для того, щоби викликати емісію електронів із внутрішніх оболонок.

При фотоелектронній емісії кінетична енергія ($E_{кін.}$) електрона, який «вибитий» квантом випромінювання ($h\nu$) з електронної оболонки, яка характеризується квантовими числами n і l , згідно закону збереження енергії дорівнює:

$$E_{кін.} = h\nu - E_{n,l} - \varphi,$$

де $E_{n,l}$ – енергія зв'язку електрона на конкретній оболонці (рівні), φ – робота виходу електрона (для твердого тіла) або енергія віддачі (для газу).

Величина φ дуже мала (за виключенням атому H), якою можна знехтувати, або її можна врахувати як сталу величину для конкретного спектрометра. Таким чином, у спрощеному варіанті при зміні $E_{кін.}$ і відомої частоти монохроматичного випромінювання ν , енергія зв'язку електрона ($E_{зв.}$) визначається за рівнянням:

$$E_{зв.} = h\nu - E_{кін.}$$

В енергетичному спектрі фотоелектронів, який становить собою залежність числа фотоелектронів від $E_{кін.}$ (або $E_{зв.}$) спостерігаються чіткі вузькі смуги, кожна з яких відповідає певному рівню (рис. 1.83 а). Інтенсивність смуг пропорційна вмісту атомів хімічного елемента (з врахуванням хімічної будови, оточення). Подібна картина спостерігається і при проходженні через шар зразка рентгенівського випромінювання (рис. 83 б). Стосовно рентгенівського випромінювання необхідно зазначити, що його потік ослаблюється не тільки за рахунок поглинання рентгенівських променів, але і розсіювання. Це явище подібне тому, яке відбувається в оптичному діапазоні електромагнітних хвиль (в УФ-, видимій і ІЧ-областях).

Якщо здійснюється перехід електрона з якоїсь зовнішньої оболонки на виниклу вакансію внутрішньої оболонки, то при цьому може відбуватися рентгенівське випромінювання – виникає явище рентгенівської флуоресценції, яке лежить в основі *рентгенфлуоресцентного аналізу* (РФА) (див. підрозділ 1.11). При заповненні вакансії в L-оболонці в результаті переходу електронів із M-оболонки, виникає L-серія ліній рентгенівського спектра і т.д. (рис. 1.83 б, в).

Подібні спектри отримуються і при оже-електронній спектрометрії (рис. 1.83 г). У цьому випадку слід мати на увазі те, що, на відміну, наприклад, від рентгенівської флуоресценції, вірогідність оже-процесу зменшується зі збільшенням енергії первинного іонізуючого випромінювання або пучка електронів, а також атомного номера Z хімічного елемента.

У всіх розглянутих методах, як і в інших спектроскопічних методах, про що вже йшла мова, спостерігається пропорційність інтенсивності спектральних ліній числу атомів, що випромінюють. Це і лежить в основі кількісного аналізу, де всі ці методи використовуються.

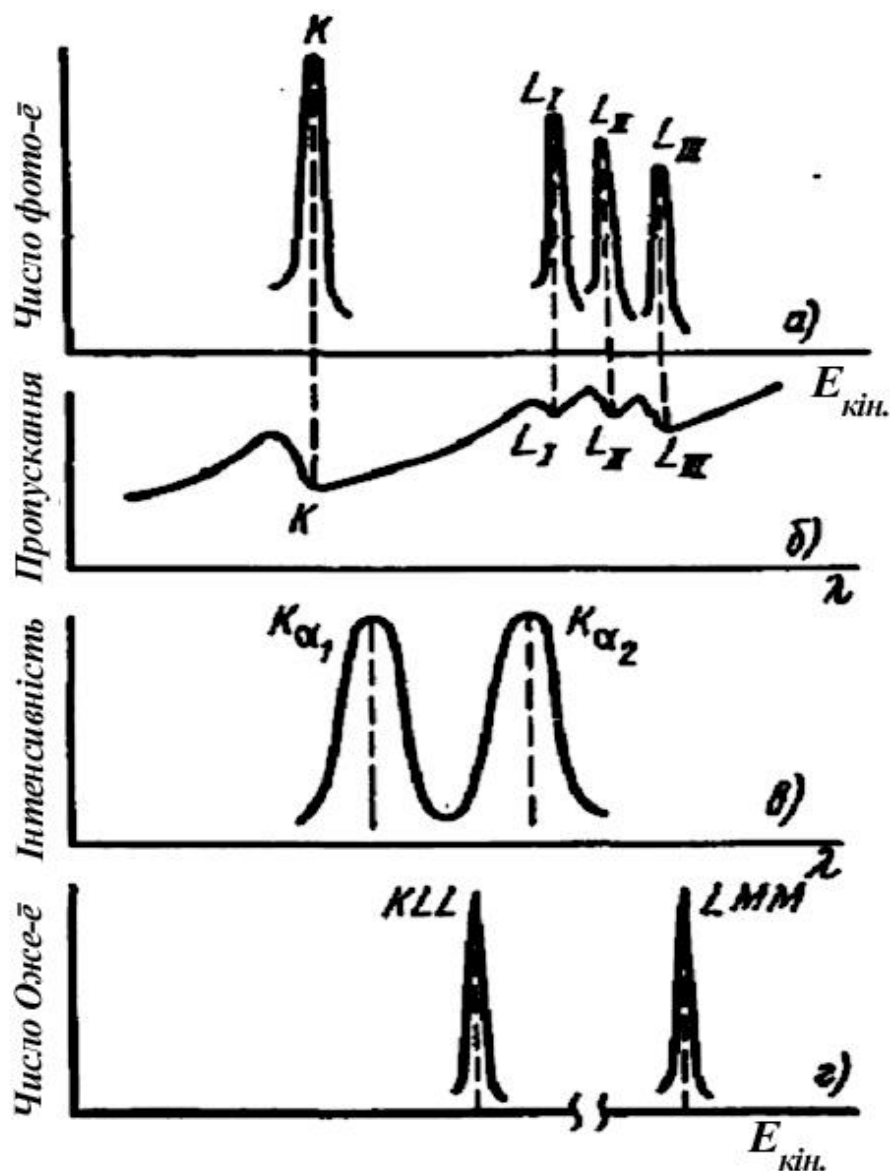


Рис. 1.83. Загальний вигляд спектрів

П р и м і т к а: – фотоелектронів; б – рентгенівського поглинання; в – рентгенівської флуоресценції; г – оже-електронів (*K, L, M* і т.д. – електронні рівні (оболонки), які характеризуються квантовим числом *n*, яке дорівнює, відповідно 1, 2, 3 і т.д.).

Молекули мають, як вже відмічалось (див. підпункт 1.1.3.3), крім електронних, також коливальні та обертальні переходи з відповідних станів. Відношення для енергії цих станів стосовно енергії зв'язку електрона на молекулярній орбіталі і виражається рівнянням:

$$E_{зв.} = h\nu - E_{кін.} = I + \Delta E_{кол.} + \Delta E_{об.}$$

де I – енергія *адиабатичної* (грецьк. *adiabatos* – непрохідний) *іонізації*, яка становить собою енергію переходу між основними (нульовими коливальними) станами вихідної та іонізованої молекулами; $\Delta E_{\text{кол.}}$ і $\Delta E_{\text{об.}}$ – можливі при фотоіонізації зміни коливальної і обертальної енергії, відповідно.

Звичайно $\Delta E_{\text{об.}}$ не враховується, оскільки обертальна структура фотоелектронних спектрів не спостерігається навіть у газі (недостатнє розділення цими методами).

Коливальні переходи в фотоелектронних спектрах чітко проявляються тільки у малих за розмірами молекулах. У багатоатомних молекулах, які мають $3N - 6$ ($3N - 5$) коливальних ступенів свободи (N – число атомів), навіть якщо коливальна структура розділена у фотоелектронному спектрі, інтерпретація її становить складну задачу. Але з неї також отримують інформацію як про коливні частоти, так і про структуру.

У фотоелектронній спектроскопії існує ще багато ускладнень. Це, зокрема, інтерпретація фотоелектронних піків у спектрах і глибина виходу електронів (довжина вільного пробігу фотоелектрона). Ці проблеми вирішуються за використання спеціальних підходів, які базуються на теоретичних розрахунках і емпіричних даних, і розв'язуються з певною наближеністю. Разом із тим, існує ряд інших ускладнень. Так, при інтерпретації спектрів, які отримуються цими методами, слід враховувати, особливо при кількісному аналізі, можливість *релаксаційних* (лат. *relaxatio* – ослаблення, зменшення напруги) процесів – безпроменевого переходу електронів з зовнішньої валентної оболонки на вакансію у внутрішній оболонці атома. Енергія, яка вивільняється в такому процесі, може привести до емісії електрона з одного з рівнів зовнішньої оболонки. Подібні процеси можна врахувати при додаткових експериментальних дослідженнях. Існує ще цілий ряд певних обмежень цих методів, наприклад, виникнення *сателітної* (супутникової) *структури* внаслідок нестійкості атомів у фотоіонізованому стані, втрати енергії при непружних співударах тощо. В принципі, все це ускладнює інтерпретацію спектрів, що обмежує широке використання подібних методів, особливо при аналізах, які потребують високої точності. Разом із тим, необхідно зауважити, що застосування сучасних методів інтерпретації спектрів із використанням ЕОМ, сприяло нагромадженню значного обсягу емпірич-

ного матеріалу. Це дозволяє суттєво полегшити розшифрування подібних спектрів.

1.2.5.2. Техніка і особливості досліджень методами фотоелектронної спектроскопії

Спектрометри, які використовуються для отримання фотоелектронних спектрів, мають суттєві конструктивні відмінності в залежності від конкретного призначення. Але принцип дії, схема збудження і аналізу енергії електронів подібні. На рис. 1.84 наведена принципова схема фотоелектронного спектрометра.

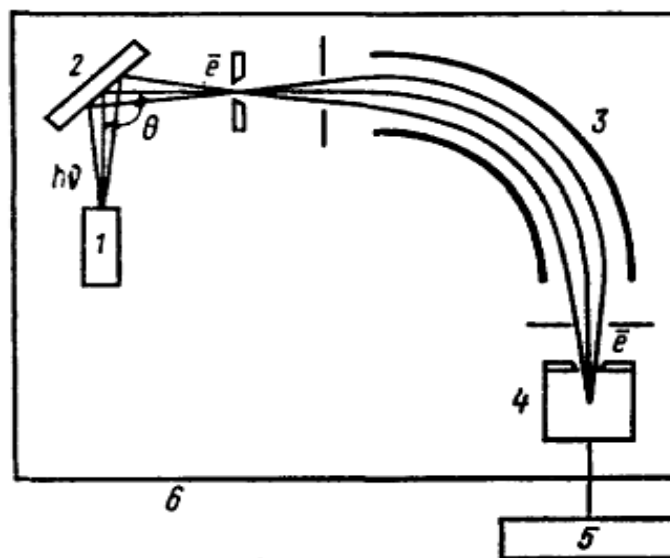


Рис. 1.84. Схема фотоелектронного спектрометра (основні пристрої)

Примітка: 1 – джерело хвиль для збудження електронів; 2 – зразок; 3 – аналізатор електронів; 4 – детектор (приймач); 5 – реєструючий пристрій; 6 – захист від зовнішніх полів (магнітного поля Землі, електромереж тощо).

Джерела хвиль збудження. В методі власне ФЕС, як вже відмічалось, джерелом збудження є короткохвильове УФ-випромінювання, як правило, це гелієва лампа (розрядна трубка) з капілярним коліматором, який спрямовує на зразок вузький пучок випромінювання. Використовуються лінії HeI – 21,2 еВ і HeII – 40,8 еВ (ширина лінії порядку 10^{-2} еВ).

У методі РЕС для збудження електронів внутрішніх оболонок, як відмічалось, є рентгенівське випромінювання (рентгенівська

трубка). Звичайно використовують монохроматичне випромінювання з енергією 1253,6 еВ ($K_{\alpha}\text{Mg}$) або 1486,6 еВ ($K_{\alpha}\text{Al}$). Ширина лінії збудження порядку 1 еВ. Якщо необхідно отримати більш високе розділення, використовують додатковий кристалічний монохроматор, що призводить до звужування лінії збудження і, цим самим, збільшення роздільної здатності.

У методі ОЕС для збудження електронів використовують електронну «гармату», яка дає вузький (менше 10^{-4} м) первинний пучок електронів з енергіями до 50 еВ. Оже-процес відбувається також поряд з емісією фотоелектронів при використанні зазначеного вище рентгенівського випромінювання, але спектри оже-електронів можна розрізнити, оскільки на відміну від фотоелектронів їх $E_{\text{кін.}}$ не залежить від енергії випромінювання, яке збуджує електрони внутрішніх оболонок. Електронний пучок в методі ОЕС звичайно падає на зразок вертикально, а при РЕС γ -промені – під певним кутом (звичайно 45°).

Аналізатори. Вибиті випромінюванням електрони через вхідну щілину потрапляють в електронний аналізатор-монохроматор, в якому відбувається розділення електронів за швидкостями (моментами). Електрони з відповідною $E_{\text{кін.}}$ потрапляють через вихідну щілину на детектор (приймач).

Аналізатори електронів бувають з магнітним або електростатичним фокусуванням. Останні мають ряд переваг, основна з яких – захист від зовнішніх електромагнітних впливів. Тому саме аналізатори з електростатичним фокусуванням типу електростатичного конденсатора використовуються в сучасних фотоелектронних спектрометрах. Режим пропускання через аналізатор електронів може бути різним залежно від конструкції. Звичайно проводять попереднє гальмування електронів на вході, а між зразком і аналізатором створюють певний електричний потенціал. Це сприяє кращому розділенню, хоча і за рахунок втрати деякої чутливості.

Роздільна здатність електростатичного аналізатора визначається співвідношенням $\Delta E/\Delta E_{\text{кін.}}$. В серійних фотоелектричних спектрофотометрах розділення сигналів фотоелектронів із внутрішніх оболонок до 0,2 еВ, а із зовнішніх – до 0,02 еВ, яке буває достатнім для спостереження коливальних структур спектра, тобто роздільна здатність спектрометрів, які дають вузьку лінію випромінювання збудження, має порядок 10^{-3} .

Детектори (приймачі). Звичайно в якості детекторів електронів використовують фотометричні помножувачі (ФЕП) (див. підпункт 1.1.5.6). Підсилений після детектора сигнал потрапляє на самописець і на сполучений з приладом комп'ютер.

Спектр фотоелектронів отримують при скануванні поля аналізатора або поля гальмування електронів. Для збільшення відношення сигнал/шум проводять усереднення чисельних сканів при неперервній реєстрації або збільшують час рахунку імпульсів у кожній точці при східчастій реєстрації спектрів. Сучасні спектрофотометри наділені мікропроцесорами і комп'ютерами, які керують роботою спектрометра, забезпечують накопичення сигналів, розкладання складних контурів на окремі, вирахування фону, диференціювання, інтегрування та іншу обробку спектрів.

Зразки. Для отримання фотоелектричних спектрів використовують твердотільні або газоподібні (при низькому тиску) зразки. Рідини для дослідження заморожують. При вивченні твердих зразків особливо необхідній високий вакуум для запобігання забруднення поверхні частинками, які абсорбуються, а іноді необхідне охолодження.

Навіть свіжоприготовлені зразки часто бувають для ФЕС сильно забрудненими. Так, наприклад, металеві поверхні в атмосферному повітрі покриваються оксидними плівками. Навіть у високому вакуумі виявляються плівки масла від вакуумного насоса. Спеціальні камери для підготовки зразків для фотоелектронної спектрометрії дозволяють без винесення на повітря обробляти зразки, чистити («протравлювати») їх поверхні електронним або іншим бомбардуванням, змінювати їх та ін.

Стандарти для врахування зарядження зразків і калібровки спектрометрів. Поверхневий шар зразка може заряджатися як позитивно, так і негативно у відношенні до спектрометра. Таким чином, виникає необхідність врахування різниці електричних потенціалів поверхневого шару зразка і матеріалу спектрометра у вигляді поправки на цей електричний заряд ($\pm E_{зар.}$) до величини, яка вимірюється ($E_{зв.}$). Для оцінки цієї поправки використовують різноманітні зовнішні та внутрішні стандарти.

Серед зовнішніх стандартів найбільш розповсюдженим є так званий сигнал $C1s$ (285,0 eV) від вуглеводневої плівки, яка утворюється на зразку внаслідок проникнення у спектрометр, про що вже йшла мова, парів масла від вакуумного насоса, дегазації прокладок

тощо. Іноді як зовнішній стандарт на поверхні зразка використовують лінії від напилених плівок хімічно інертних металів, наприклад, Ауруму і Платини, або абсорбованих іонів аргону.

Використовується також *зовнішній стандарт від добавки*, зокрема, лінії F1s від доданого до зразка LiF. Вибір подібного зразка і спосіб підготовки проби потребує особливої уваги, так що цей метод менш надійний.

Як *внутрішній стандарт* може бути сигнал від певного атома у речовинах, що досліджуються, якщо величина $E_{зв.}^{cm.}$ для цього атома в цих речовинах не змінюється. У цьому випадку всі інші значення $E_{зв.}$, які вимірюються, нормуються до значення $E_{зв.}^{cm.}$ обраного атома. Наприклад, в сполуках $[P(C_6H_5)_3]_2PtX_2$, де X – різні ацидоліганди, за значення $E_{зв.}^{cm.}$ приймають енергію зв'язку електрона C1s у фенольних групах.

1.2.5.3. Комплексні фотоелектронні спектрометри

Перспективними є спектрометри, які об'єднують декілька методів в одному приладі. Це може бути PEC і OES, а додатково також ФЕС та деякі інші методи, наприклад, мас-спектрометрія. Співставлення результатів двох-трьох різних методів для одного і того ж зразка (ділянки поверхні) без його переміщення в камері приладу дозволяє отримати більш різносторонню і численну інформацію, що полегшує інтерпретацію результатів.

При необхідності дослідити зміну складу зразка залежно від глибини проводять пошаровий аналіз, який виконують при спільному використанні PEC і OES або OES з електронним чи іонним «травленням», про що вже йшла мова. Пошарові спектри PEC отримують при послідовному чергуванні «травлення» і реєстрації спектра. Суттєве значення має рівномірність «травлення» уздовж всієї ділянки, яка аналізується. Ця ділянка поверхні зразка задається діаметром пучка електронів або іонної «гармати» (діаметр 2–3 мм). У сполученні з високою чутливістю детектора спектрометра швидке «травлення» дозволяє профілювати на глибину шар товщиною до 1 мкм упродовж декількох хвилин.

При використанні OES «травлення» і реєстрацію спектра проводять одночасно. Зразок бомбардують сфокусованим пучком електронів (*оже-електронів*), а при одночасному іонному «травленні» отримують пошарові профілі.

При скануванні електронного пучка, яке відбувається достатньо швидко (*метод скануючої оже-мікроскопії*, СОМ), отримують результати двохвимірною розподілення елементів за площею (растр), а в сполученні з іонним «травленням» – тривимірний аналіз поверхневого шару зразка.

Методи фотоелектронної спектроскопії (ФЕС, РЕС, ОЕС та їх модифікації) не так поширені, як оптичні, ЯМР, ЕПР, мас-спектрометрія та деякі інші. Це, ймовірно, пов'язано з певною складністю ідентифікації отриманих спектрів (зокрема, врахуванню хімічних зсувів, та ін.), а також доступністю і складністю апаратури. Але вони дають цінну інформацію, отримання якої іншими методами ускладнене або, навіть, неможливе.

1.2.6. Рентгено-структурний аналіз

Крім використання для структурно-аналітичних досліджень спектроскопії в оптичному і радіохвильовому діапазонах, використовується також рентгенівське випромінювання. Частково його застосування вже розглянуто при описі методів рентгенофлуоресцентної спектроскопії (див. пункт 1.1.11) і рентгеноелектронної спектроскопії (див. пункт 1.2.5).

Широко також застосовується *метод рентгено-структурного аналізу* (РСА). Основне його призначення – це проведення атомного аналізу речовини, що досліджується, оскільки поява рентгенівських спектрів пов'язана зі збудженням електронів внутрішніх оболонок, будова яких зберігається майже незмінною для атома кожного хімічного елемента у будь-яких хімічних сполуках.

Можливість використання рентгено-структурного аналізу для дослідження широкого класу речовин і велика цінність цих досліджень стимулювали розвиток методів розшифрування структур. Роботи з дослідження просторової структури протеїнів, розпочато в 30-х роках ХХ століття у Великобританії Джоном Берналом і успішно продовжені Джоном Кендрю, Максом Перуцем та ін. зіграли важливу роль у становленні молекулярної біології. У 1953 році дані рентгеноструктурного аналізу, отримані Морісом Вілкінсом і Розаліндою Франклін, дозволили Джеймсу Ватсону і Френсісу Кріку створити модель молекули дезоксирибонуклеїнової кислоти. З 50-х років минулого століття почали бурхливо розвива-

тися методи обробки дифракційної інформації і аналізу цих даних за допомогою комп'ютерів.

Для досліджуваного зразка можливо отримати рентгенівські спектри як емісійні, так і абсорбційні, але частіше в практиці використовують емісійні рентгенівські спектри. Їх поява зв'язана з тим, що за рахунок дії, як правило, потоку прискорених електронів електричним полем напругою в декілька десятків тисяч вольт «вибивається» один із внутрішніх орбітальних електронів атома. На звільнене місце переходить один із електронів з вищого енергетичного рівня, що супроводжується випромінюванням. При переході такого електрона на перший енергетичний рівень (K -оболонку) виникають лінії K -серії, на другу (L -оболонку) – лінії L -серії і т. д. (рис. 1.85).

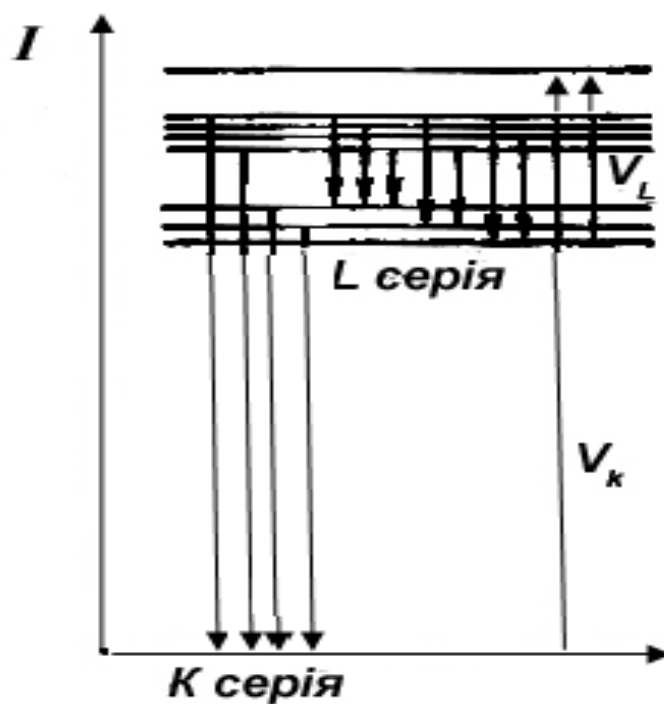


Рис. 1.85. Схема електронних рівнів виникнення рентгенівського випромінювання

Примітка: V_L і V_K – потенціали збудження для ліній L - і K -серії; I – інтенсивність випромінювання

Довжина хвилі для ліній, які відповідають одному і тому же переходу, зменшується зі збільшенням порядкового номера хімічного елемента у періодичній системі елементів Д. І. Менделєєва. В атомів хімічних елементів початку періодичної системи немає

глибоких внутрішніх електронних оболонок і при переходах електронів на існуючі у них нижче локалізовані електронні оболонки випромінюються електромагнітні хвилі УФ-області (довжина хвилі 5–200 нм). Для збудження рентгенівського випромінювання застосовують, як вже відмічалось, розігнані електричним полем електрони. Утворення рентгенівського випромінювання, яке збуджує атоми досліджуваної речовини, відбувається в рентгенівських трубках, про що вже йшла мова (див. пункти 1.1.11 і 1.2.5).

Утворене в рентгенівських трубках випромінювання вико ристовують для опромінення зразка, що досліджується. Оскільки повітря непрозоре для більшості рентгенівських променів (за винятком короткохвильових), то зразок, що досліджується, розміщують у камері, звідки відкачують повітря, перед вихідним віконцем рентгенівської трубки.

Для розкладання в спектр рентгенівського випромінювання, яке випромінюється досліджуваним зразком, після активації його атомів рентгенівським випромінюванням, використовують спектральні прилади з дифракційною ґраткою (див. підпункт 1.1.4.7) для відносно великих довжин хвиль або зі кристалом, який завдяки впорядкованому розміщенню в ньому окремих груп атомів працює як дифракційна ґратка з дуже малою сталою такої ґратки – десятки частки нанометра. Прилади з кристалом розраховані на роботу в короткохвильовій області рентгенівського випромінювання і для них не треба підтримувати вакуум, оскільки для таких хвиль повітря прозоре (на відміну від більш довгохвильового, для розкладання якого використовують дифракційні ґратки).

Дія приладів рентгено-структурного аналізу принципово не відрізняється від оптичних.

Для реєстрації рентгенівського випромінювання використовуються, як правило, електричні методи. Детектором слугує наповнена інертним газом чи спеціальною газовою сумішшю трубка-лічильник, в якій настає короткочасний пробій при прольоті кожного рентгенівського кванта, який іонізує газ. Спеціальні електротехнічні перелічувальні пристрої дозволяють перерахувати число рентгенівських квантів, які потрапляють у лічильник. Поворотом диференційної ґратки чи кристала здійснюють розгортку спектра і одночасно автоматично вимірюють і реєструють інтенсивність ліній спектра, як це робиться в реєструючих спектрофотометрах.

Зведені дані про оптичні та спеціальні електроскопічні методи наведено в табл. 1.8.

Таблиця 1.8. – Зведена таблиця оптичних та альтернативних їм методів

Тип методу	Принцип методу	Основна область застосування
Спектрометрія у видимій та ультрафіолетовій (УФ) областях (емісія і абсорбція)	Енергетичні переходи зовнішніх електронів між їх оболонками в атомах і молекулах речовини, що досліджується, після її опромінення світлом	Якісний і кількісний аналіз речовин, визначення їх структури в поєднанні з іншими методами
Інфрачервона (ІЧ) спектроскопія	Коливання атомів в молекулі речовини, що досліджується, які викликають зміну дипольного моменту, в інфрачервоній області спектра	Якісний і кількісний аналіз речовин, визначення їх структури в поєднанні з іншими методами
Полум'яна спектрометрія (емісія і абсорбція)	Енергетичні переходи зовнішніх електронів атомів між їх оболонками після випарювання речовини, що досліджується в полум'ї	Якісний і кількісний аналіз речовин на вміст у них металів
Спектрофлуориметрія	Випромінювання світла збудженим світлом молекулами; довжина хвилі випроміненого світла більша, ніж того, яке опромінює речовину, що досліджується	Якісний і кількісний аналіз речовин, встановлення структури і просторової організації сполук
Спектроскопія комбінаційного розсіювання (раманівська спектроскопія)	Коливання у деяких випадках і обертання атомів в молекулі, яке комбінується з частотою падаючого світла на речовину, що досліджується; з'являються коливальні переходи, які обумовлені змінною поляризованістю молекули з довжиною хвилі, яка відмінна від такої світла, що падає	Якісний і кількісний аналіз речовин, визначення їх структури в поєднанні з іншими методами

Рефрактометричний метод аналізу	Заломлення променя світла при переході з одного прозорого середовища в інше з різними оптичними густинами	Визначення складу речовин, їх концентрації
Релеєвське розсіювання світла	Розсіювання світла частинками суспензії; довжина хвилі розсіюваного світла дорівнює такій падаючого на суспензію	Визначення розмірів і форми частинок у суспензії
Нефелометричний метод аналізу	Бічне розсіювання світла, що падає на суспензію, яка містить частинки речовини, що досліджується	Визначення концентрації частинок у суспензії
Турбідиметричний метод аналізу	Ослаблення світла за рахунок розсіювання світлового потоку, який проходить через суспензію у напрямі, що співпадає з таким падаючого світла	Визначення концентрації частинок у розведених суспензіях
ЯМР-спектроскопія	Реєстрація магнітних моментів ядер атомів з непарним числом протонів	Визначення структури речовин, реакційної здатності атомів і молекул, механізмів хімічних реакцій
ЕПР-спектроскопія	Реєстрація магнітних моментів неспарених орбітальних електронів атомів	Визначення речовин, які містять перехідні метали та їх комплекси, вільних радикалів, сполук у збудженому стані
Мас-спектроскопія	Іонізація речовин з утворенням позитивно заряджених іонів цих речовин та їх фрагментів	Встановлення будови речовин; кількісний аналіз малої кількості речовин (10^{-9} – 10^{-6} г); зручно використовувати в поєднанні з газорідною хроматографією
Мессбауерівська спектроскопія	Реєстрація поглинання γ -випромінювання	Структурно-аналітичний аналіз речовин; визначення ступеня окиснення атомів, їх вален-

		тних станів; встановлення розподілення електронної густини, характеру хімічних зв'язків
Фотоелектронна спектроскопія (власне фотоелектронна, рентгеноелектронна і оже-електронна спектрометрія)	Фотоефект (вторинна електронна емісія)	Структурно-аналітичний аналіз речовин; кількісний аналіз; визначення електронної структури речовин; вимір енергетичних характеристик електронних станів атомів і молекул; вивчення поверхні твердих тіл, тонких плівок і шарів; дослідження процесів адсорбції, особливостей каталізу хімічних реакцій
Рентгено-структурний аналіз	Реєстрація рентгенівських спектрів	Атомний аналіз речовин, встановлення їх структури

КОНТРОЛЬНІ ПИТАНЯ

1. Що таке світло?
2. Загальна характеристика променів світла.
3. Дайте визначення, що таке електромагнітне поле і електромагнітні хвилі.
4. Дайте визначення понять «частота коливань», «період коливань», «довжина хвилі».
5. На чому базуються уявлення про хвильову і корпускулярну природу світла?
6. Сформулюйте уявлення про дуалістичну природу світла.
7. Наведіть основні енергетичні фотометричні величини, їх фізичний зміст, взаємозв'язок.
8. Наведіть основні світлові одиниці, їх фізичний зміст, взаємозв'язок.
9. Основні принципи поглинання та випромінювання світла.
10. Що таке спектри поглинання (абсорбції) світла речовиною?
11. Що таке спектри випромінювання (емісії) світла речовиною?
12. Межі спектральних діапазонів рентгенівського, ультрафіолетового, видимого, інфрачервоного і радіохвильового випромінювання.
13. Основні напрями застосування оптичних методів дослідження.
14. Дайте загальну характеристику електронним, коливальним та оберतालним енергетичним рівням молекул.
15. Основні уявлення про закони відбиття світла.
16. Основні уявлення про закони поглинання світла.
17. Суть закону Бутера-Ламберта-Бера, умови його виконання.
18. Емісійний спектрофотометричний аналіз, його застосування.
19. Абсорбційний спектрофотометричний аналіз, його застосування.
20. Поняття екстинкції та світлопропускання, їх взаємозв'язок.
21. Основні уявлення про заломлення світла.
22. Основні уявлення про розсіювання світла.
23. Основні уявлення про інтерференцію світла.
24. Основні уявлення про дифракцію світла.
25. Основні уявлення про поляризацію світла.

26. Які є джерела світла в оптичних приладах?
27. Які джерела світла найпоширеніші в УФ-, видимій та ІЧ-областях?
28. Дайте загальну характеристику як джерелам світла дуговому та іскровому розряду, лампам розжарювання, газорозрядним лампам.
29. Які є способи освітлення щілин спектральних приладів?
30. Конденсори в спектральних приладах, їх особливості для дослідження в УФ-, видимій та ІЧ-областях.
31. В чому полягає суть явища він'єтирування?
32. Побудувати хід променів при освітленні щілини за допомогою двох і трьох конденсорів.
33. Растрові конденсори, їх застосування для освітлення щілин спектрофотометрів.
34. Спектральна ширина щілини спектрофотометра, значення цього показника.
35. Застосування кювет в спектральних приладах.
36. Особливості матеріалу кювет для дослідження в УФ-, видимій та ІЧ-областях.
37. Мікрокювети, їх використання.
38. Експериментальна і порівняльна (контрольна) кювети, необхідність її використання.
39. Характеристика монохроматичного світла.
40. Способи отримання монохроматичного світла: тригранні призми, диференційні ґратки, світлофільтри, лазери.
42. Характеристика електронних методів реєстрації спектрів.
43. Чутливість спектроскопічних приладів, методи її поліпшення.
44. Точність вимірів спектрів спектроскопічними приладами, методи зменшення випадкової і врахування постійної похибки.
45. Роздільна здатність спектроскопічних приладів, методи її поліпшення.
46. Критерій Релея, його застосування для оцінки роздільної здатності спектроскопічних приладів.
47. Міра роздільної здатності спектроскопічних приладів та її практичне визначення.
48. Схема будови одно- і двопроменевих спектрофотометрів, відмінність їх будови.

49. Загальна характеристика хромофорів в УФ- і видимій області спектра.

50. Принципи побудови і застосування калібрувальних графіків.

51. Еталонні речовини в спектрофотометрії, основні вимоги до них.

52. Суть структурно-групового аналізу в спектрофотометрії.

53. Інфрачервона спектрометрія: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

54. Особливості будови ІЧ-спектрофотометрів: джерела світла, монохроматори, реєструючі пристрої.

55. Приготування зразків для ІЧ-спектрофотометрії.

56. Особливості розшифрування ІЧ-спектрів.

57. Загальна характеристика методів, які базуються на явищі розсіювання світла.

58. Комбінаційне розсіювання світла (раманівська спектрометрія): принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

59. Релеєвське розсіювання: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки. Особливості розсіювання світла малими і великими частинками суспензії.

60. Нефелометричний метод аналізу речовин: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

61. Турбідиметричний метод аналізу речовин: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

62. Рефрактометричний метод аналізу речовин: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

63. Особливості будови рефрактометрів типу Аббе і Пульфриха.

64. Поляриметричний метод аналізу речовин: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

65. Особливості будови колових і клинових полярометрів.

66. Принцип методу полум'яної спектрометрії, її застосування.

67. Атомно-емісійна і атомно-абсорбційна полум'яна спектрометрія: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки. Розпилювачі і полум'я, монохроматори, реєстрація спектрів.

68. Загальна характеристика явища флуоресценції, принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

69. Загальна характеристика явищ фосфоресценції та уповільненої флуоресценції.

70. Спектри випромінювання флуоресценції, особливості їх розшифровки.

71. Характеристика хромофорів, які спричинюють явище флуоресценції: власні флуоресцентні хромофори, флуоресцентні мітки і зонди.

72. Схема спектрофлуориметра, характеристика основних пристроїв.

74. Будова та специфіка застосування пристроїв Lab-chip?

75. Як забезпечується аналіз портативних спектральних систем?

76. Концептуальна структура обробки даних спектроскопічного аналізу?

77. Метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР): принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

78. Чим обумовлено широке застосування методу протонного магнітного резонансу (ПМР)?

79. Особливості ідентифікації ЯМР-спектрів.

80. Чим обумовлений хімічний зсув (δ) в спектрах ЯМР?

81. Чим обумовлена хімічна поляризація ядер і як вона впливає на ЯМР-спектри?

82. Схема ЯМР-спектрометра, характеристика основних пристроїв.

83. Особливості будови і переваги фур'є-спектрометрів ЯМР.

84. В чому полягає суть подвійного ЯМР-резонансу?

85. Метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР): принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

86. Особливості ідентифікації ЕПР-спектрів.

87. Чим обумовлена хімічна поляризація електронів і як вона впливає на ЕПР-спектри?

88. Схема ЕПР-спектрометра, характеристика основних пристроїв.

89. Охарактеризуйте методи спінових міток і спінових «пасток», їх застосування в ЕПР.

90. Охарактеризуйте метод подвійної ЕПР-спектроскопії, переваги його застосування перед звичайним методом ЕПР.

91. Метод мас-спектрометрії: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

92. Особливості ідентифікації мас-спектрів.

93. Типи іонів, які реєструються в мас-спектрометрії.

94. Схема мас-спектрометра, характеристика основних пристроїв.

95. Метод мессбауерівської спектрометрії: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

96. Які повинні виконуватися умови, щоби для певних ядер хімічних елементів спостерігався ефект Мессбауера?

97. Чим обумовлене явище мессбауерівської електронної конверсії і чим воно відрізняється від фотоелектронного ефекту?

98. Які головні фактори визначають ізомерний (хімічний) зсув при ефекті Мессбауера?

99. Які головні фактори визначають квадрупольне розщеплення мессбауерівських спектрів?

100. Які головні фактори визначають надтонку структуру мессбауерівських спектрів?

101. В чому полягає ефект Доплера і як він впливає на характер мессбауерівських спектрів?

102. Охарактеризуйте аналітичні фотоелектронні методи (ФЕС, РЕС і ОЕС).

103. Від чого залежить інтенсивність піків ліній в фотометричних спектрах?

104. В чому полягають основні відмінності між методами власне фотоелектронної, рентгеноелектронної і оже-електронної спектрометрії?

105. Які переваги дає комплексне використання методів фотоелектронної спектрометрії?

106. Рентгено-структурний аналіз: принцип методу та його застосування, переваги і недоліки.

107. Особливості будови і застосування оптичного і електронного мікроскопів.

108. Принципи будови і застосування ультрамікроскопа, в якому використовується явище дифракції світла.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Барковский В. Ф., Городенцева Т. Б., Топарова Н. Б. Основы физико-химических методов анализа. – М.: Высшая школа, 1983.

Вилков Л. В., Пентин Ю. А. Физические методы исследования в химии. Резонансные и электрооптические методы. – М.: Высшая школа, 1989.

Виноградова Р. П., Цудзевич Б. А., Храпунов С. Н. Физико-химические методы в биохимии. – К.: Вища школа, 1983.

Вульфсон Н. С. Заикин В. Г., Микая А. И. Масс-спектрометрия органических соединений. – М.: Химия, 1986.

Дубініна А. А., Малюк Л. П. Селютіна Г. А. та ін. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення. – К.: ВД «Професіонал», 2007.

Запорожець О. А. Комбіновані спектроскопічні та візуальні тест-методи аналізу. Конспект лекцій вибраних розділів спецкурсу «Фотометричні та люмінесцентні методи аналізу для студентів хімічного факультету». – К.: ВПЦ «Київський університет», 2006.

Квасов Н. Т., Савилова Ю. И., Зарембовская Т. А. Оптика. – Минск: БРУИР, 2009.

Кустанович И. М. Спектральный анализ. – М.: Высшая школа, 1972.

Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войціцький В. М. Сучасні методи біохімічних досліджень. – К.: Фітосоціоцентр, 2001.

Лансберг Г. С. Оптика. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003.

Лобур М., Матвійків О., Файтас О. Методи спектроскопії та обробка даних спектрального аналізу: Lviv Polytechnic National University Institutional Repository, 2011: <http://ena.lp.edu.ua>.

Макаренко О. В. Методичні вказівки «Основи колориметрії». – К.: ВПЦ «Київський університет», 2007.

Мельничук Д.О., Грищенко В.А., Томчук В.А. та ін. Ветеринарна клінічна біохімія: навч. посібник. – К. : НУБіП України, 2014.

Мельничук Д.О., Томчук В.А., Янчук П.І. та ін. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібн. для підготовки студентів ВНЗ. – К. : НУБіП України, 2015 с.

Мельничук С. Д., Мельничук Д. О., Мельникова Н. М., Вовкотруб М. П. Основні методи та прилади лабораторних досліджень. – К.: ВЦ НАУ, 2004.

Мельничук С. Д., Хижняк С. В., Цвіліховський В. І. Методичні вказівки до лабораторних занять з дисципліни «Сучасні методи та прилади біохімічних досліджень» для підготовки експертів-аналітиків за спеціальністю «Лабораторна справа» ОКР «Магістр». – К.: ВЦ НУБіП України, 2013.

Мельничук Д. О., Мельничук С. Д., Калачнюк Л. Г. та ін. Біохімія: практикум / За загальною редакцією академіка НАН України і НААН України Д.О. Мельничук – К.: ВЦ НУБіП України, 2013.

Методы практической биохимии / Под ред. *Б. Уильямса, К. Уилсона.* – М.: Мир, 1978.

Стафеев С. К., Боярский К. К., Башнина Г. Л. Основы оптики. – СПб.: Питер, 2006.

Стащук В. С., Охріменко Б. А. Методичні вказівки до спецкурсу «Спектроскопія атомів і молекул». – К.: В-во Українського Міжнародного відділення товариства оптичної техніки SPI_E/UKRAINE, 2003.

Одарич В. А., Поперенко Л. В., Стащук В. С. та ін. Прикладна оптика. Оптична система: теорія, розрахунок, конструювання, технологія. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2010.

Петренко П. В. Дифракційні методи структурного аналізу. Кінематичне наближення. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2005.

Погорелов В. С. Спектроскопія комбінованого розсіювання. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2004.

Якунов А. В. Методичні вказівки «Техніка та методи спектральних досліджень». – К.: ВПЦ «Київський університет», 2007.

ЧАСТИНА II

МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ РЕЧОВИН СПЕКТРОСКОПІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Лабораторна робота 1. Кількісне визначення протеїну за методом Лоурі

Принцип методу. Метод Лоурі є одним з найчутливіших оптичних методів визначення протеїну. Він ґрунтується на здатності протеїнів утворювати забарвлені в синій колір комплекси в реакції Фоліна (відновлення протеїнами суміші фосфорно-вольфрамової та фосфорно-молібденової кислот). Реакція ініціюється комплексними сполуками міді, які виникають при взаємодії протеїнів з лужним розчином міді сульфату.

Для визначення концентрації протеїну в досліджуваному розчині за методом Лоурі необхідно попередньо побудувати калібрувальний графік – залежність інтенсивності забарвлення (екстинкції, оптичної густини) від концентрації протеїну – стандарту, який такий же, як протеїн, концентрацію якого необхідно визначити. За його відсутності в якості стандартів використовують протеїни з близькою молекулярною масою до досліджуваного протеїну.

Матеріал для дослідження: розчин протеїну, зокрема козеїну молока або іншого протеїну, який аналізується, що містить 0,25–0,5 мг/см³; розчини-стандарти цього ж протеїну, які містять від 0,1 до 3,0 мг/см³ протеїну.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; витяжна шафа; годинник; свіжоприготовлений лужний розчин міді (50 см³ 2 %-го розчину натрію карбонату в 0,1 моль/дм³ розчині натрію гідроксиду змішують з 1 см³ 0,55 %-го розчину міді сульфату в 1 %-му розчині натрію тартрату); реактив Фоліна-Чокальтеу (20 г натрію фосфорно-вольфрамового і 5 г натрію фосфорно-молібденового в 140 см³ дистильованої води; до розчину додають 10 см³ 80 %-го розчину ортофосфатної кислоти і 20 см³ концентрованої хлористоводневої кислоти; отриману суміш кип'ятять у колбі зі зворотнім холодильником Лібіха протягом 10 хв.; після цього додають 30 г літію сульфату, 10 см³ дистильованої води, 2–3 краплини бром; отриману суміш кип'ятять у колбі без зворотнього холодильника у

витяжній шафі 10 хв; розчин охолоджують, об'єм доводять дистильованою водою до 200 см^3 і фільтрують; перед роботою суміш розбавляють у два рази дистильованою водою); скляні палички; пробірки мірні на $5\text{--}10\text{ см}^3$; штатив для пробірок; піпетки мірні, в т. ч. мікропіпетки; мірні колби і циліндри на $50, 100$ і 250 см^3 ; мірна колба на 200 см^3 ; зворотній холодильник Лібіха.

Хід роботи:

До $0,2\text{ см}^3$ розчину протеїну, який аналізується, а також до протеїну-стандарту додають 1 см^3 лужного розчину міді. Суміш ретельно перемішують і дають відстоятися при кімнатній температурі 10 хв, потім швидко вносять $0,08\text{ см}^3$ реактива Фоліна-Чокальтеу, перемішують. Через 30 хв суміш забарвлюється в синій колір. Інтенсивність забарвлення (екстинкцію) визначають на спектрофотометрі (або фотоколориметрі) при довжині хвилі 750 нм . Проби, які аналізуються, порівнюють з холостою, яка замість розчину протеїну містить дистильовану воду.

Проведення розрахунків:

Концентрацію білка в розчині, який аналізується, визначають за калібрувальним графіком, загальний вигляд якого наведено на рис. 2.1.

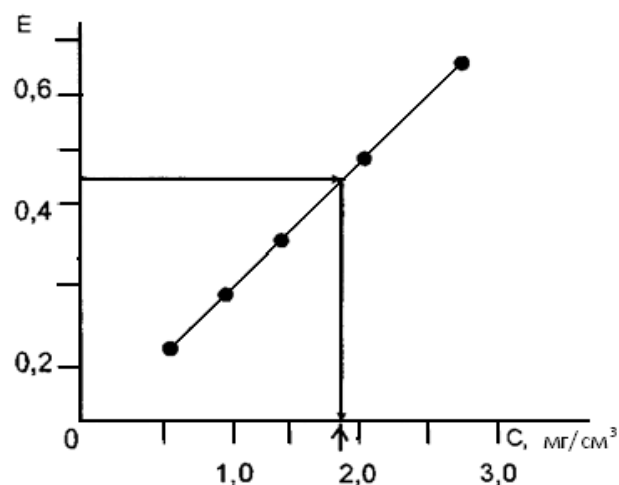


Рис. 2.1. Калібрувальний графік для визначення концентрації протеїну в розчині

На цьому графіку на вісі ординат відкладають значення екстинкції (оптичної густини) ряду розчинів з відомою

концентрацією протеїну, а на вісі абсцис – відому концентрацію протеїну. Калібрувальний графік будується заздалегідь за розчинами стандартів протеїну.

Незалежне вимірювання екстинкції проб проводять не менше 3-х разів (для кожної з них виконують всю послідовність операцій). Потім вираховують середнє арифметичне значення і вже його використовують для визначення концентрації протеїну за калібрувальним графіком. Наприклад, на наведеному вище рис. 2.1 середнє арифметичне значення екстинкції (E) для протеїну, який аналізується, має 0,45. Це означає, що концентрація протеїну в пробі дорівнює $1,82 \text{ мг/см}^3$.

Якщо неможливо використати протеїн-стандарт аналогічний протеїну, що аналізується, то калібрувальний графік будують за результатами дослідження інших хімічно чистих протеїнів (отриманих у кристалічному вигляді) з близькою молекулярною масою.

Лабораторна робота 2. Визначення вмісту протеїну в м'ясі та м'ясних продуктах спектрофотометричним методом

Принцип методу. Метод К'ельдалю, який базується на мінералізації проби і фотометричному вимірі екстинкції (оптичної густини) індофенолового синього, яка пропорційна кількості аміаку в мінералізаті.

Матеріал для дослідження: м'ясо, м'ясопродукти.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд, матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності; витяжна шафа; м'ясорубка побутова або електром'ясорубка з отворами решітки діаметром 3 мм; побутовий холодильник; скальпель, мішалка; вода дистильована; кислота сульфатна ($\rho_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1,84 \text{ г/см}^3$); хлористоводнева кислота 0,1 моль/дм³; амонію сульфат; натрію гідроксид; вапно хлорне; гідрогену пероксид; фенол; натрію нітропрусид; натрію тіосульфат; натрію гіпохлорит або натрію дихлорізоціанурат; калій йодистий; натрій вуглекислий безводний; амонію сульфат; промивалка; пробірки скляні місткістю 20 см³ і штатив для них; колби конічні місткістю 25 і 50 см³; колби мірні 100, 250 і 1000 см³; піпетки місткістю 1 і 5 см³; воронки скляні; бюкси; колби К'ельдаля місткістю 750 см³; стакани скляні місткістю 500 см³; скляні банки місткістю 200 см³ із кришками;

фільтри паперові «синя стрічка» з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Перед початком роботи готують ряд робочих розчинів:

1. Приготування реактиву 1. В мірну колбу місткістю 1 дм^3 поміщають 10 г фенолу і 0,05 г натрію нітропрусида, об'єм колби доводять до мітки дистильованою водою. Зберігають розчин не більше 2-х місяців.

2. Приготування реактиву 2. В мірну колбу місткістю 1 дм^3 поміщають 5 г натрію гідроксиду і його розчиняють в 40–50 см^3 дистильованої води. Після охолодження додатково додають 0,2 г натрію дихлорізоціанурата або натрію гіпохлориту з розрахунку його вмісту $0,42 \text{ г/дм}^3$, доводять об'єм колби до мітки дистильованою водою. Зберігають реактив не більше 2-х місяців.

3. Приготування вихідного розчину натрію гіпохлориту. В першу склянку місткістю 500 см^3 поміщають 150 г вапна хлорного і 250 см^3 дистильованої води, а в другій склянці в 250 см^3 дистильованої води розчиняють 105 г натрію вуглекислого. Ці розчини зливають при постійному перемішуванні. Отриману суспензію залишають на 1–2 доби для відстоювання. Потім рідину зливають і відфільтровують. Отриманий розчин може зберігатися в скляному посуді з темного скла до 1 року.

В отриманому розчині визначають концентрацію активного хлору. Для цього 1 см^3 фільтрату розбавляють у колбі місткістю 100 см^3 дистильованою водою до об'єму 40–50 см^3 , добавляють 2 г калію йодистого і 10 см^3 хлорводневої кислоти $0,1 \text{ моль/дм}^3$. Йод, який утворився, відтитровують $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчином натрію сульфату, який готують з фіксаналу до зникнення вишневого забарвлення (1 см^3 $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію сульфату відповідає 0,00355 г хлору).

Визначення вмісту натрію гіпохлориту у вихідному розчині. З урахуванням нестійкості розчину натрію гіпохлориту при зберіганні виникає необхідність визначення вмісту цього реактиву у вихідному розчині. Це проводиться шляхом встановлення витраченого на титрування натрію тіосульфату. Наприклад, на титрування 1 см^3 вихідного розчину натрію гіпохлориту витрачено $12,09 \text{ см}^3$ $0,1 \text{ моль/дм}^3$ натрію тіосульфату. Еквівалентна маса натрію гіпохлориту дорівнює половині молекулярної маси цього реактиву, а саме

74,4:2=37,2 г. Таким чином, кількість натрію гіпохлориту у вихідному розчині складає $1,209 \cdot 37,2 = 44,97$ г.

Реактив 2 (див. вище) повинен містити 0,42 г натрію гіпохлориту, то з пропорції:

$$\begin{array}{l} \text{в } 1000 \text{ см}^3 \text{ вихідного розчину} - 44,97 \text{ г} \\ X \text{ см}^3 - 0,42 \text{ г} \end{array}$$

знаходимо:

$$X = \frac{1000 \cdot 0,42}{44,97} = 9,4 \text{ см}^3.$$

Таким чином, для приготування 1 дм³ реактиву 2 необхідно 9,4 см³ вихідного розчину натрію гіпохлориту.

4. Приготування стандартного розчину амонію сульфату для побудови калібрувального графіка. Попередньо висушеного при температурі 60 °С до постійної маси 0,236 г амонію сульфату поміщають у мірну колбу місткістю 500 см³, розчиняють в 200–300 см³ дистильованої води і доводять об'єм розчину до мітки. Отриманий розчин є стандартним і містить 0,1 мг Нітрогену в 1 см³.

У подальшому в мірні колби місткістю 100 см³ вносять наступні кількості стандартного розчину амонію сульфату (в см³), відповідно: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 і 5,0. Після доведення об'єму колб до мітки дистильованою водою отримують серію робочих стандартних розчинів масової концентрації (в мкг Нітрогену/см³): 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 і 5,0.

Для проведення кольорової реакції в пробірки додають по 1 см³ робочих стандартних розчинів, по 5 см³ реактиву 1 і 5 см³ реактиву 2 (див. вище), перемішують і через 30 хв вимірюють величину екстинкції (оптичної густини) на спектрофотометрі при довжині хвилі 625 нм або фотоколориметрі з червоним світлофільтром у кюветі товщиною 1 см у відношенні до холостої проби (не містить стандартний розчин амонію сульфату). Повторюють виміри при температурі не нижче 20 °С три рази, кожного разу готують новий робочий стандартний розчин. З трьох вимірювань обчислюють середньоарифметичне значення, яке і використовують для побудови калібрувального графіку: на вісі абсцис відкладають значення величини концентрації Нітрогену (мкг/см³), а вісі ординат – відповідну екстинкцію (оптичну густину).

При проведенні безпосереднього аналізу відібрані проби м'яса або м'ясних продуктів (200–400 г) двічі подрібнюють на побутовій або електричній м'ясорубці з отворами решітки діаметром 3 мм і ретельно перемішують. Підготовлену для аналізу пробу поміщають у склянку місткістю 200 см³, при цьому заповнюють її повністю і закривають кришкою. Пробу зберігають при температурі 3–5 °С до закінчення аналізу, але не довше однієї доби.

Наважку продукту розраховують наступним чином: частину подрібненої проби поміщають у бюкс, закривають кришкою і зважують з похибкою 0,0002 г. Потім з бюксу скальпелем відбирають 0,4–0,5 г продукту на листок фільтру і разом із ним обережно вміщують у колбу К'ельдаля. Бюкс закривають, зважують і розраховують точну масу продукту, взятого для аналізу.

Такий же листок фільтру поміщають у контрольну колбу К'ельдаля. Потім в обидві колби додають 10 см³ концентрованої сульфатної кислоти, 1–2 г калію сульфату і проводять мінералізацію, при цьому періодично додають для прискорення процесу гідрогену пероксид (5–7 см³) протягом усієї мінералізації.

Після мінералізації колби охолоджують і вміст переносять у мірні колби місткістю 250 см³, після охолодження об'єм колб доводять до мітки дистильованою водою і ретельно перемішують.

У мірну колбу місткістю 100 см³ переносять 5 см³ первинно розведеного мінералізату і доводять до мітки дистильованою водою. Для проведення кольорової реакції 1 см³ вторинно розведеного мінералізату вносять в пробірку, а потім послідовно додають по 5 см³ реактиву 1 і реактиву 2 (див. вище) і ретельно перемішують. Через 30 хв визначають екстинкцію (оптичну густину) на спектрофотометрі при довжині хвилі 625 нм або на фотоколориметрі з червоним світлофільтром у кюветі товщиною 1 см у відношенні до контрольної проби, яку готують одночасно з використанням контрольного мінералізату. Температура реактивів при проведенні кольорової реакції повина бути не нижче 20 °С.

Після визначення екстинкції повторно розведеного мінералізату за допомогою калібрувального графіку, визначають у ньому вміст Нітрогену.

Проведення розрахунків:

Відсоткову масову частку протеїну розраховують за формулою:

$$C_x = \frac{C_k \cdot 250 \cdot 100}{m \cdot 5 \cdot 10^6} 6,25 \cdot 100 ,$$

де C_x – відсоткова масова частка протеїну в пробі, яка аналізується, %;

C_k – концентрація Нітрогену, яка знайдена за калібрувальним графіком у відповідності до визначеної екстинкції (оптичної густини), мкг/см³;

m – наважка проби, яка аналізується, г;

250 – об'єм первинно розведеного мінералізату, см³;

5 – об'єм первинно розведеного мінералізату для повторного розведення, см³;

100 в чисельнику – об'єм повторно розведеного мінералізату, см³;

1 – об'єм розчину, який взятий для проведення кольорової реакції, см³;

10⁶ – коефіцієнт перерахунку грамів у мікрограми;

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки;

6,25 – коефіцієнт перерахунку Нітрогену на протеїн.

Лабораторна робота 3. Визначення глюкози у крові, плазмі (сироватці), спинномозковій рідині глюкозооксидазним методом

Принцип методу. Глюкоза окиснюється киснем повітря у присутності ферменту глюкозооксидази з утворенням у ході реакції гідрогену пероксиду. Останній окиснює *o*-толідин з утворенням забарвленої сполуки, інтенсивність забарвлення якої пропорційна концентрації глюкози.

Матеріал для дослідження: плазма (сироватка) крові або спинномозкова рідина.

Устаткування, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; рН-метр (іономір); годинник; скляні палички; пробірки мірні об'ємом на 5 і 10 см³; мірні колби об'ємом 100 см³,

500 і 1 000 см³; штатив для пробірок; лійка Бюхнера; вакуум-ексикатор; холодильник.

Реактиви:

1. Глюкозооксидаза (бета-Д-глюкоза: оксидоредуктаза 1.1.3.4). Кристалічний препарат. Вітчизняна глюкозооксидаза випускається з активністю в основному 90–120 тис. глюкозооксидазних одиниць на 1 г препарату. Зберігають при низких температурах у герметичній упаковці.

2. Пероксидаза (гідроген пероксиду: оксидоредуктаза 1.11.1.7). Кристалічний препарат. Пероксидаза з ступенем очищення 0,6 (R.Z.) придатна для визначення глюкози. Зберігають при низких температурах у герметичній упаковці.

3. 0,9 % розчин натрію хлористого.

4. 0,25 М розчин натрію оцтовокислого. 17 г натрію оцтовокислого (NaCH₃COO · 3H₂O) розчиняють у невеликому об'ємі дистильованої води в мірній колбі на 500 см³ і доводять до мітки.

5. 0,25 М розчин оцтової кислоти. У мірну колбу на 500 см³ наливають невелику кількість води, додають 7,75 см³ льодяної оцтової кислоти і доводять об'єм дистильованою водою до мітки.

6. 0,25 М ацетатний буфер, рН – 4,8. 0,25 М розчин натрію оцтовокислого змішують з 0,25 М розчином оцтової кислоти у співвідношенні 6:4. Перевіряють рН на рН-метрі. Стабільний при зберіганні у холодильнику впродовж місяця.

7. 5 % розчин цинку сірчанонокислого. 50 г цинку сульфатнокислого (ZnSO₄ · 7H₂O) розчиняють в 1 дм³ дистильованої води. Стабільний при кімнатній температурі.

8. 0,3 н. розчин їдкого натра. Розчини цинку сульфатнокислого і їдкого натра беруть для реакції в еквівалентних кількостях, тобто вони повинні нейтралізувати один одного. Для цього розчин цинку сульфатнокислого титрують розчином їдкого натра до нейтральної реакції за фенолфталеїном (слабо-рожеве забарвлення). Якщо на титрування пішла однакова кількість розчинів, то вони придатні для реакції.

9. Орто-толідін (азоамін синій К: 3,3-диметилбензидин) чда. Орто-толідін, що у продажу, перекристалізовується з гарячого абсолютного етилового спирту додаванням дистильованої води з наступним швидким відсмоктуванням кристалів, які утворилися, на лійці Бюхнера та висушиванням о-толідину в вакуум-ексикаторі над кальцієм хлористим.

10. Абсолютний етиловий спирт (комерційний).

11. 1 % розчин *o*-толідину в абсолютному етиловому спирті. 1 г *o*-толідину розчиняють у невеликому об'ємі теплового етилового спирту. Після охолодження доводять об'єм етилового спирту до 100 см³ у щільно закритому посуді з темного скла.

12. Ензимо-хромогенний реактив. У мірну колбу на 500 см³ поміщають 300–400 см³ 0,25 М ацетатного буфера рН– 4,8, додають 10 г глюкооксидази (наважку взято із розрахунку активності – 92 000 Од. на 1 г препарату: при використанні препарату з іншою активністю фермента відповідно буде змінюватися величина наважки), перемішують до повного розчинення, додають 5 мг пероксидази. Суміш перемішують до повного розчинення. Додають 5 см³ 1 % розчину *o*-толідину і доводять об'єм до мітки ацетатним буфером, фільтрують. Стабільний впродовж 3–4 тижнів при зберіганні в холодильнику у щільно закритому посуді з темного скла.

Свіжоприготовлений реактив безбарвний або забарвлений у слабо-зелений колір. Придатний до використання через 2 год після приготування. Якщо реактив має інтенсивно зелений колір, то це свідчить про забруднення *o*-толідину. В цьому випадку *o*-толідін необхідно перекристалізувати.

13. 0,2 % розчин бензойної кислоти. Розчин готують при нагріванні.

14. Стандартний розчин Д-глюкози 10 ммоль/дм³. Висушену до постійної ваги при 37 °С Д-глюкозу зберігають в ексікаторі. 180 мг глюкозу розчиняють у мірній колбі на 100 см³ у 0,2 % розчині бензойної кислоти. Залишають стояти на світлі протягом 12–16 год.

Хід роботи:

Інгредієнт	Дослідна проба, см ³	Стандартна проба, см ³	Холоста проба, см ³
0,9 % розчин натрію хлористого	1,1	1,1	-
Капілярна кров (плазма, сироватка, спинномозкова рідина)	0,1	-	-
Розчин глюкози	-	0,1	-
5 % розчин цинку сульфатнокислого	0,4	0,4	-
0,3 н. розчин їдкоого	0,4	0,4	-

натра			
Перемішують і через 10 хв центрифугують при 2 500 об/хв. протягом 10 хв. Відразу відбирають над осадову рідину (НОР)			
НОР	1,0	1,0	-
Дистильована вода	-	-	1,0
Ензимо-хромогенний реактив	3,0	3,0	3,0

Обережно перемішують і колориметрують на 20–23 хвилині в кюветі з товщиною шару 10 мм при довжині хвилі 625 нм проти холостої проби.

Проведення розрахунків

Концентрацію глюкозу в крові (сироватці/плазмі) визначають за формулою:

$$C_{\text{дос.}} = E_{\text{дос.}}/E_{\text{ст.}} \cdot C_{\text{ст.}}$$

де $C_{\text{дос.}}$ – концентрація глюкози в крові, ммоль/дм³;

$C_{\text{ст.}}$ – концентрація глюкози у стандартному розчині, ммоль/дм³;

$E_{\text{дос.}}$ – екстинція дослідної проби;

$E_{\text{ст.}}$ – екстинція стандартної проби.

Оскільки результати визначень значно залежать від умов досліду і часу утворення забарвленого комплексу, стандартну пробу готують паралельно з дослідною і обробляють аналогічно останній.

На кожну серію з 10–15 дослідних проб готують свою стандартну пробу, за якою проводять розрахунок результатів тільки для цієї серії проб.

Лінійна залежність між оптичною густиною і концентрацією глюкози зберігають від 0 до 22,2 ммоль/дм³.

Нормальні величини:

в крові – 2,77–5,55 ммоль/дм³

у спинномозковій рідині – 2,75–3,85 ммоль/дм³.

Примітка:

1. Цільна кров досліджується негайно після відбору.

2. У кожну наступну пробу серії ензимо-хромогенний реактив додається з інтервалом в 1 хв.

3. За три доби до проведення дослідження виключити приймання аскорбінової кислоти, антибіотиків тетрациклінового ряду.

4. Для дослідження глюкози ферментативним методом зручно використовувати комерційні набори реактивів.

Лабораторна робота 4. Кількісне визначення фруктози за реакцією Селіванова

Принцип методу. Визначення вмісту фруктози в розчинах оснований на реакції Селіванова: при нагріванні фруктози з хлористоводневою кислотою утворюється оксиметилфурфурол, який з резорцином утворює сполуку (продукт конденсації) вишнево-червоного кольору. Швидкість утворення оксиметилфурфуrolа у реакції фруктози з хлористоводневою кислотою при нагріванні у багатого разів більша, ніж для альдогексоз, що обумовлює специфічність реакції Селіванова для фруктози.

Матеріал для дослідження: розчин фруктози, що досліджується ($10\text{--}50\text{ мкг/см}^3$); стандартний розчин фруктози (25 мкг/см^3).

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; водяна баня; лабораторний термометр; годинник; 0,1 %-й розчин резорцина в 96 %-му етиловому спирті; 30 %-й розчин хлористоводневої кислоти; дистильована вода; скляні палички; пробірки з пришліфованим повітряним зворотним холодильником об'ємом 10 см^3 ; штатив для пробірок; піпетки мірні об'ємом $1\text{--}5\text{ см}^3$.

Хід роботи:

В одну пробірку з пришліфованим зворотним холодильником вносять 2 см^3 розчину фруктози, який досліджується, в другу – 2 см^3 стандартного розчину фруктози, а в третю – 2 см^3 дистильованої води. Потім у пробірки додаються по 2 см^3 розчину резорцину і по 6 см^3 30 %-го розчину хлористоводневої кислоти. Вміст пробірок ретельно перемішують і нагрівають на водяній бані протягом 8 хв при температурі $80\text{ }^\circ\text{C}$. Після цього розчини охолоджують і на спектрофотометрі або фотоколориметрі визначають екстинкцію при 490 нм розчину, який аналізується, та стандартного розчину відносно вмісту третьої пробірки, яка містить тільки реактиви.

Проведення розрахунків:

Концентрацію фруктози у розчині, який аналізується, обчислюють за формулою:

$$C = C_0 \cdot E_1 / E_2 \cdot V,$$

де C – концентрація фруктози в пробі, яка аналізується, мкг/см³;

E_1 і E_2 – екстинкція розчину, що досліджується, і стандартного розчину фруктози, відповідно;

C_0 – концентрація фруктози в стандартному розчині (мкг/см³);

V – об'єм проби, що досліджується, см³.

Лабораторна робота 5. Кількісне визначення альдегідів (бензидинового числа) у тваринних жирах і в рослинних оліях спектроскопічним методом

Принцип методу. Наслідком пероксидного окиснення ліпідів є псування харчових продуктів – поява гіркоти. Це обумовлено утворенням альдегідів. В альдегідах карбоксильна група (=C=O) зв'язана з атомом Гідрогену і вуглеводневим радикалом (RCHO). Виняток становить найпростіший мурашиний альдегід – HCHO.

Одним із методів визначення вмісту альдегідів – це визначення так званого бензидинового числа (Б.ч.), яке вираховується за кількістю кольорового комплексу бензидину з альдегідами.

Матеріал для дослідження: тваринні жири та рослинні олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності з межею зважування 200 г; годинник; хлороформ; спирт етиловий; бензидин; льодяна оцтова кислота; колби мірні на 25 см³; піпетки мірні об'ємом 10 см³.

Хід роботи:

Наважку проби масою 0,5–1,0 г вносять у мірну колбу на 25 см³, розчиняють у суміші етилового спирту з хлороформом (1:1) та доводять до мітки. Отриманий розчин через 15 хв наливають у суху чисту кювету шириною 10 мм і визначають екстинкцію (оптичну густину) на спектрофотометрі або фотоколориметрі при довжині хвилі 360 нм у відношенні до розчинника (спирт : хлороформ у співвідношенні 1:1). Отримане значення екстинкції характеризує забарвлення проби (E_1).

Потім у колбу з притертим корком вносять піпеткою 10 см³ розчину проби, в іншу колбу – 10 см³ розчинника (спирт : хлороформ у співвідношенні 1:1). У кожену колбу додають по 1 см³ 0,5 %-го свіжоприготовленого розчину бензидину (в суміші 1:1 етилового спирту та льодяної оцтової кислоти).

Вміст колб ретельно перемішують і витримують 15 хв, після чого визначають екстинкцію (оптичну густину) даного розчину за відношенням до розчинника, обробленого бензидином (E₂).

Проведення розрахунків:

Вміст альдегідів (бензидинове число, Б.ч.) на 100 г проби обчислюють за формулою:

$$\text{Б.ч.} = \frac{1,1(E_2 - E_1)0,0094 \cdot V}{m} \cdot 100,$$

де Б.ч. – бензидинове число (мг коричневого альдегіду на 100 г проби);

0,0094 – стала величина, яка вказує на кількість коричневого альдегіду, яка доводиться на одиницю оптичної густини при довжині хвилі 360 нм;

V – об'єм, в якому розчинена наважка проби жиру, см³;

1,1 – поправка на зміну об'єму при додаванні до 10 см³ дослідного розчину 1 см³ 0,5 %-го розчину бензидину;

100 – коефіцієнт, який визначає розрахунок на 100 г проби;

E₁ і E₂ – екстинкція (оптична густина) проби, яка аналізується, а також розчинника, що оброблений бензидином, відповідно.

Лабораторна робота 6. Визначення анізидинового числа в тваринних жирах і рослинних оліях спектрофотометричним методом

Принцип методу: Анізидинове число – це міра концентрації вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які зустрічаються в оліях і жирах. Високе анізидинове число жиру свідчить про тривалий час чи незадовільні умови його зберігання, або про те, що його піддавали тривалій механічній і термічній обробці. Навіть якщо готовий продукт із завищеним анізидиновим числом отримає високу дегустаційну оцінку, при зберіганні може відзначатися

реверсія смаку. У світовій практиці якісний жир не перевищує анізидинове число зі значенням 3.

Матеріал для дослідження: тваринні жири і рослинні олії.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності; лабораторний термометр; ізооктан (2,2,4-триметилпентан з нульовим поглинанням у діапазоні довжин хвиль від 300 до 380 нм); льодяна оцтова кислота; *n*-анізидин (4-метоксіанілін); дистильована вода; колби мірні об'ємом 25 см³; піпетки мірні об'ємом 1 см³, 5 і 10 см³; штатив для пробірок.

Хід роботи:

Наважку проби (0,4–4,0 г), взяту з точністю до 1 мг, переносять безпосередньо в мірну колбу об'ємом 25 см³. Підігрівають тверді зразки (проби) до температури на 10 °С вище їх точки плавлення. Розчиняють пробу в 5–10 см³ 2,2,4-триметилпентану (ізооктану) і доводять до мітки тим самим розчином.

Готують ряд розчинів:

1. Нереагуючий аналітичний розчин: піпеткою переносять 5 см³ розчину розчиненої проби в пробірку № 1 об'ємом 10 см³. Додають 1 см³ льодяної оцтової кислоти і після закриття пробірки корком ретельно перемішують.

2. Контрольний розчин: переносять 5 см³ чистого ізооктану в іншу пробірку № 2.

3. Проба для кольорової реакції: переносять 5 см³ розчину розчиненої проби у пробірку № 3.

Піпеткою додають до кожної з пробірок № 2 та № 3 1 см³ анізидинового реактиву (розчин *n*-анізидину в льодяній оцтовій кислоті (2,5 мг/см³)). Закривають обидві пробірки корками і добре струшують. Витримують пробірки в темноті протягом 8 хв.

Протягом наступних 2 хв переносять кожний з розчинів у суху чисту кювету спектрофотометра або фотоколориметра. Через 10 хв після додавання анізидинового реактиву проводять вимірювання.

Вимірюють екстинкцію (оптичну густина) на спектрофотометрі або фотоколориметрі при довжині хвилі 350 нм нереагуючого, кольорового та контрольного розчинів у відношенні до ізооктану.

Якщо виміряна екстинкція кольорового розчину не знаходиться в межах від 0,2 до 0,8, повторюють визначення, відповідно змінивши величину наважки проби.

Проведення розрахунків:

Анізидинове число (А.ч.) проби обчислюють за формулою:

$$A.ч. = \frac{Q \cdot V}{m} 1,2 \cdot (E_1 - E_2) - E_a \cdot 100$$

де А.ч. – анізидинове число, у.о.;

m – маса проби, г;

V – об'єм, в якому розчинена проба, см³ (V = 25 см³);

Q – вміст досліджуваної речовини в пробі, що аналізується, на основі якого виражається анізидинове число, у грамах на см³ (Q = 0,01 г/см³);

E₀ – екстинкція нереагуючого аналітичного розчину;

E₁ – екстинкція забарвленого розчину, який аналізується;

E₂ – екстинкція контрольного розчину;

1,2 – поправка на зміну об'єму при додаванні анізидинового реактиву;

100 – коефіцієнт, який визначає розрахунок на 100 г (см³) проби.

Лабораторна робота 7. Визначення вмісту каротинів рослин спектрофотометричним методом

Принцип методу. Каротини – жиророзчинні оранжево-жовті пігменти рослин із групи каротиноїдів. Вони – попередники вітаміну А. За хімічною будовою це поліненасичені сполуки терпенового ряду. Розрізняють λ-, β-, γ- і Δ-каротини, які різняться між собою характером і числом іононових кілець, що входять до їх складу. Серед каротинів саме β-каротин є найактивнішим попередником вітаміну А.

Метод базується на відокремленні екстрагованих каротинів від інших пігментів з наступним спектрофотометричним (фотоколориметричним) визначенням їх вмісту.

Матеріал для дослідження: морква.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; скляна хроматографічна колонка (довжина 15 см, діаметр 1,5–2,0 см); насос для відсмоктування рідини; терези аналітичні 2-го класу; фарфорова ступка з товкачиком; дистильована вода; безводний натрію сульфат; магнію карбонат; натрію оксалат; калію дихромат; високоочищений бензин; тальк; тампони з скловати; колба Бунзена місткістю 500 см³; мірна колба об'ємом 100 см³; піпетки об'ємом 1–5 см³; скляна колонка (довжина 15 см, діаметр 1,5–2,0 см).

Хід роботи:

Наважку 1 г моркви розтирають в ступці з 2 г безводного натрію сульфату і 0,5 г магнію карбонату. Після отримання, розтерту суміш залишають на 5 хв для підсушування.

Для відокремлення каротинів від інших пігментів використовують скляну хроматографічну колонку (довжиною 15 см, діаметром 1,5–2,0 см), яку попередньо готують наступним чином: в нижню частину вміщують тампон із скловати, потім насипають 10 г розтертої в ступці суміші натрію оксалату: тальк (1:1) і ущільнюють; зверху цієї суміші вміщують тампон із скловати. Приготовлену колонку прилаштовують до колби Бунзена, а саму її приєднують до насосу. В подальшому в колонку вносять розтерту суміш моркви з натрію сульфатом і магнію карбонатом. Ступку, де відбувалося розтирання зразка моркви, ополіскують 5 см³ високоочищеного бензину і його вливають у колонку. Потім вмикають насос і відсмоктують бензиновий елюат (містить екстракт зразка, що аналізується) з швидкістю 50–60 крапель за хвилину. Колонку промивають декількома порціями бензину по 3 см³ до повного видалення нижньої яскраво-жовтої смуги каротинів, яка передуює іншим пігментам (ксантофілам – блідножовта смуга і хлорофілу *a* – синя смуга). Розчин каротинів доводять до об'єму 10 см³ бензином і спектрофотометрують (фотоколориметрують), тобто визначають екстинкцію, при довжині хвилі 490 нм.

Екстинкцію бензинового елюата порівнюють з екстинкцією стандартного розчину. Ним може бути стандартний розчин каротинів або розчин калію дихромату (K₂Cr₂O₇), забарвлення якого подібне забарвленню каротинів (яскраво-жовте). Стандартний розчин K₂Cr₂O₇ готують наступним чином: 72 мг цієї речовини вносять у мірну колбу об'ємом 100 см³, розчиняють у 10–20 см³

дистильованої води і ретельно перемішують, а потім доводять до мітки і ще раз перемішують, 1 см³ такого розчину має 0,00416 мг каротинів.

Проведення розрахунків:

Вміст каротинів у пробі, яка аналізується, розраховують за формулою:

$$C_x = \frac{E_1 \cdot C_{ст} \cdot V}{m \cdot E_2} \cdot 100,$$

де C_x – вміст каротинів у пробі, яка аналізується, мг %;

$C_{ст}$ – вміст каротинів у стандартному розчині, мг/см³;

E_1 – екстинкція розчину каротинів, який аналізується;

E_2 – екстинкція стандартного розчину каротинів або $K_2Cr_2O_7$;

V – об'єм бензинового елюату каротинів, см³;

m – маса проби, яка аналізується, г;

100 – коефіцієнт, який визначає перерахунок на 100 г проби.

Лабораторна робота 8. Кількісне визначення ретинолу (вітаміну А) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом

Принцип методу. Групу вітамінів А складають вітамін A_1 (ретинол) і A_2 (дегідроретинол). Із печінки китів виділена речовина, яка володіє А-вітамінною активністю, її назвали вітаміном A_3 . Це жиророзчинні речовини, які за хімічною структурою є ненасиченим спиртом, що містить β -іононове кільце та залишки ізопрену.

Метод заснований на лужному гідролізі та екстракції вітаміну А подрібненої тканини за допомогою слабколетких розчинників та наступному спектрофотометричному вимірі поглинання світла розчином до і після руйнування вітаміну А ультрафіолетовими променями при довжині хвилі 328 нм.

Матеріал для дослідження: печінка, пташинні яйця.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр; ультрафіолетова лампа типу ПРК-4; центрифуга (1 500–2 000 об/хв); водяна баня; вентилятор настільний; лабораторний термометр; фарфорова ступка з товкачиком; годинник; пробірки зі скла «Пірекс», що пропускає ультрафіолетові промені, розміром 55x8 мм; центрифужні пробірки; штатив для пробірок; піпетки

градуєвані на 1, 5 і 10 см³; скляні палички; 96 %-й спирт етиловий, ксилол або проксилол; октан; 1 н. розчин калію гідроксиду в 96 %-му етиловому спирті; дистильована вода.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень спочатку готують необхідний розчин калію гідроксиду і ксилоло-октанову суміш:

1. До 1 об'єму 11 н. розчину калію гідроксиду (11 н. розчин калію гідроксиду: 617,16 мг калію гідроксиду вносять у мірну колбу об'ємом 1 дм³ і доводять до мітки дистильованою водою) слід додати 10 об'ємів етилового спирту. Розчин готується в день проведення аналізів.

2. Ксилоло-октанова суміш (1:1), готують у день проведення аналізів.

Для дослідження використовують свіжу печінку або ту, що зберігалася в замороженому стані. Пробу печінки ретельно розтирають у фарфоровій ступці, потім зважують 2,0 г отриманої гомогенної маси. У такий же спосіб готують для аналізу пробу жовтка пташиних яєць, але жовток у кількості 2 г зважують безпосередньо в центрифужну пробірку.

Наважку гомогенізованої печінки 2 г або 2 г жовтка пташиних яєць, кількісно переносять у центрифужну пробірку і доливають 2 см³ 1 н. спиртового розчину калію гідроксиду. Перемішують скляною паличкою до утворення однорідної суміші і ставлять для гідролізу на водяну баню при температурі 60 °С на 30 хв. Після цього пробірки охолоджують у холодній воді ($t \approx 4^{\circ}\text{C}$) протягом 5–10 хв і додають у кожену 8 см³ ксилоло-октанової суміші. Пробірки закривають корками і ретельно струшують протягом 2 хв, після чого центрифугують 5 хв при 1 500 об/хв. Верхній шар центрифугату переносять піпеткою в кварцову кювету спектрофотометра і визначають екстинкцію (оптичну густину) шляхом дворазового виміру, до і після опромінення проб ультрафіолетовими променями при довжині хвилі 328 нм. Для опромінення досліджувані проби переносять із кювет у пробірки зі скла «Пірекс» і опромінюють 45–60 хв ультрафіолетовою лампою ПРК-4 на відстані 15–19 см. Для того щоб пробірки не нагрівалися, під час опромінення їх охолоджують за допомогою настільного вентилятора.

Проведення розрахунків:

Концентрацію ретинолу (вітаміну А) в пробі, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C = \frac{6,37 \cdot (E_1 - E_2) \times k}{2},$$

де C – кількість ретинолу (вітаміну А) в пробі, мкг/г;

6,37 – коефіцієнт перерахунку для вітаміну А;

2 – коефіцієнт перерахунку на 1 г проби;

E_1 – екстинкція розчину вітаміну А до опромінення при довжині хвилі 328 нм;

E_2 – екстинкція розчину вітаміну А після опромінення при довжині хвилі 328 нм;

k – коефіцієнт розведення (кількість см³ ксилоло-октанової суміші).

Лабораторна робота 9. Кількісне визначення токоферолів (вітаміну Е) в тваринних продуктах спектрофотометричним методом

Принцип методу. Вітамін Е – це загальна назва токоферолів (α -, β -, γ -, δ -токоферолу), які є похідними токолу і відрізняються за числом та розташуванням метильних груп у бензольному кільці; найбільш активним є α -токоферол.

Метод визначення вітаміну Е заснований на фотометричному визначенні інтенсивності забарвлення при кольоровій реакції вітаміну Е (α -токоферолу) із залізодипіридиловим реактивом.

Матеріал для дослідження: печінка, пташині яйця.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; ступка фарфорова з товкачком; терези аналітичні 2-го класу точності; центрифуга (1 500–2 000 об/хв); годинник; лабораторний термометр; водяна баня; ацетон; петролейний етер (40–60); 85 %-а сульфатна кислота; 2 %-й розчин калію гідроксиду; бензол; залізодипіридиловий реактив (спосіб приготування: 250 мг заліза хлорного і 500 мг 2,2-дипіридилу розчиняють у 1 дм³ льодяної оцтової кислоти, реактив стабілізується на 7–10 добу, зберігається при кімнатній температурі в посу-

дині з темного скла); дистильована вода; ділильна лійка місткістю на 250–500 см³; колба на 50 см³; центрифужні пробірки; балон газу азоту; фільтрувальний папір «синя стрічка» з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Наважку печінки або жовтка пташиних яєць 2 г ретельно подрібнюють і розтирають у фарфоровій ступці, заливають 30 см³ ацетону, знову розтирають, дають відстоятися і верхній шар декантують, одночасно фільтруючи через паперовий фільтр. Повторно вітамін Е екстрагують в 30 см³ суміші (15 см³ ацетону і 15 см³ петролейного етеру), третій раз сумішшю (10 см³ ацетону і 20 см³ петролейного етеру). Екстракти, зібрані в ділильну лійку, 2 рази промивають 2–3-кратним об'ємом дистильованої води. Екстракт з петролейним етером переносять у колбу і на водяній бані при температурі 60 °С випаровують у струмі газу азоту до об'єму 1,5–2 см³. Залишок виливають у градуйовану пробірку (центрифужну). Колбу обполіскують 1–2 см³ петролейного етеру, що зливають у центрифужну пробірку, і об'єм рідини в пробірці доводять петролейним етером до 5 см³.

Для осадження вітаміну Е в пробірку до екстракту додають 2–3 см³ 85 %-ї сульфатної кислоти, ретельно перемішують вміст пробірки протягом 2–3 хв (струшуванням), а потім для поділу шарів центрифугують 5 хв при 1 500 об/хв. Надосадову рідину піпеткою переносять в іншу центрифужну пробірку в кількості 3,0 см³ і залишок кислоти в ній нейтралізують 2 %-м розчином калію гідроксиду. Ретельно перемішують 1–2 хв, потім центрифугують 5 хв, 3 см³ надосадової рідини випарюють на водяній бані при температурі 60 °С у струмі газу азоту. Осад розчиняють у 1 см³ бензолу, додають 2,0 см³ залізодипіридилового реактиву. Витримують 20 хв у темноті і спектрофотометрують (фотоколориметрують) при довжині хвилі 490 нм, у кюветі з робочою відстанню 5 мм проти контролю. Контролем слугує розчин бензолу і залізодипіри-диловий реактив.

Для визначення концентрації вітаміну Е в пробі необхідно попередньо побудувати калібрувальний графік – залежність інтенсивності забарвлення (оптичної густини) від концентрації стандарта вітаміну Е.

Приготування розчинів α -токоферолу для побудови калібрувального графіка:

1) 200 мг кристалічного α -токоферолу розчиняють у мірній колбі об'ємом 10 см³ бензолом і доводять бензолом до мітки (концентрація – 20 мг/см³) – основний розчин;

2) 2,5 см³ основного розчину переносять у мірну колбу об'ємом 25 см³ і доводять бензолом до мітки (концентрація – 2 мг/см³);

3) до 5 см³ розчину 2 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 1 мг/см³);

4) до 5 см³ розчину 1 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 0,5 мг/см³);

5) до 5 см³ розчину 0,5 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 0,25 мг/см³);

6) до 5 см³ розчину 0,25 мг/см³ додають 5 см³ бензолу (концентрація – 0,125 мг/см³).

Далі в пробірки до 1 см³ кожного розведеного розчину додають 1 см³ бензолу і 2 см³ залізодипіридилового реактиву. Контроль: 2 см³ бензолу і 4 см³ залізодипіридилового реактиву.

Проведення розрахунків:

Вміст вітаміну Е обчислюють за формулою:

$$E = \frac{a \cdot v \cdot 1\,000}{m},$$

де E – концентрація вітаміну Е в пробі, мг/кг;

a – вміст вітаміну Е в пробі, яка знайдена за калібрувальним графіком, мг;

v – ступінь розведення;

m – наважка проби, г;

1 000 – коефіцієнт перерахунку концентрації вітаміну Е з мг/г проби в мг/кг проби.

Лабораторна робота 10. Кількісне визначення тіаміну (вітаміну В₁) в тваринних продуктах спектрофлуориметричним методом

Принцип методу. Тіамін (вітамін В₁) за хімічною будовою складається з піридинового і тiazолового кілець, які з'єднані між собою метильним містком. В організмі тварин і людини тіамін знаходиться як у вигляді вільного тіаміну (1–10 %), так і його фосфорильованих похідних – тіамінмонофосфату (до 5 %), тіаміндифосфату (70–80 %) і тіамінтрифосфату (до 10 %). Тіамінпірафосфат є кофактором ряду ферментів, який виконує функцію проміжного переносника альдегідної групи.

Метод базується на окисненні тіаміну в лужному середовищі у тіохром, який екстрагується з проби розчинником, і в порівнянні інтенсивності флуоресценції розчинів, які аналізуються, з окисненими стандартними розчинами тіаміну.

Матеріал для дослідження: печінка або червоні м'язи.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофлуориметр; гомогенізатор або фарфорова ступка з товкачиком і кварцевий пісок; термостат; водяна баня; годинник; водяний розчин сульфатної кислоти (0,1 моль/дм³); толуен; водяний розчин натрію ацетату (2,5 моль/дм³), що містить фермент фосфатазу (рН 4,0–4,5); 20 %-й водяний розчин трихлороцтової кислоти; 30 %-й водяний розчин натрію гідроксиду; 2 %-й водяний розчин калію гексаціано (III)–ферату (K₃[Fe(CN)₆]); ізоаміловий і етиловий спирт; стандартний водяний розчин тіаміну (1 мкг/см³); дистильована вода; конічна колба об'ємом 100 см³, лійка для фільтрування; мірний циліндр об'ємом 50 см³; ділильні лійки об'ємом 100 см³; пробірки з притертим скляним корком об'ємом 10 см³; крапельниця; градуйовані піпетки об'ємом 5 і 10 см³; штатив для пробірок; фільтрувальний папір «синя стрічка» з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Наважку 2 г свіжої тканини (печінки чи червоних м'язів) гомогенізують або перетирають у фарфоровій ступці з кварцевим піском при додаванні невеликими частками 10 см³ 0,1 моль/дм³ розчину сульфатної кислоти.

Отриманий гомогенат переносять у конічну колбу і доводять об'ємом суміші приблизно до 75 см³ 0,1 моль/дм³ розчином сульфатної кислоти. Вміст колби нагрівають на киплячій водяній бані при частому

перемішуванні проягом 45 хв. Після охолодження в колбу додають 2–3 краплини толуену і 5 см^3 $2,5 \text{ моль/дм}^3$ розчину натрію ацетату, що містить ензим фосфатазу (рН 4,0–4,5). Для перебігу ферментативної реакції, внаслідок якої звільняється зв'язаний тіамін, колбу поміщають у термостат при температурі $40 \text{ }^\circ\text{C}$ на 2 год. Після охолодження до колби вносять 10 см^3 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти і через 10 хв переносять у мірну колбу об'ємом 100 см^3 , доводять об'єм суміші дистильованою водою до мітки, ретельно перемішують і фільтрують через складчастий паперовий фільтр у плоскодонну колбу. Отриманий фільтрат в об'ємі 50 см^3 переносять у ділильну лійку, додають 25 см^3 ізоамілового спирту і струшують (в ручну) протягом 2 хв. Після розшарування суміші, спиртову фазу відкидають. Цю операцію повторюють 2–3 рази і водні фази об'єднують і в подальшому працюють з водною витяжкою.

Кількість $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, яка необхідна для окиснення тіаміну, визначають наступним чином. У 6 пробірок з притертими скляними корками вносять по 2 см^3 30 %-го розчину натрію гідроксиду і по 5 см^3 отриманої профільтрованої витяжки тіаміну. В 5 пробірок додають свіжоприготовлений 2 %-й розчин $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, об'ємом $0,1 \text{ см}^3$; $0,2$; $0,3$; $0,4$ і $0,5 \text{ см}^3$, відповідно. Ще одна (6-та) пробірка слугує контролем, в яку замість $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ додають $0,5 \text{ см}^3$ дистильованої води.

У деяких із 5-ти пробірок виникає жовте забарвлення. В тій з сумішей, де доданий об'єм окисника викликає найяскравіше забарвлення, яке не зникає протягом 30 с після струшування, і є оптимальною для подальших досліджень.

За наявності спектрофотометра або фотоколориметра найкраще оптимальний об'єм $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ визначати за показником екстинкції (оптичної густини) при довжині хвилі 360 нм проти контролю (вмісту 6-ї пробірки).

На наступному етапі у дві ділильні лійки вносять по 2 см^3 30 %-го розчину натрію гідроксиду і в одну з них, яка буде пробою що аналізується, – визначений оптимальний об'єм 2 %-го розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, ретельно перемішують. У подальшому обидві лійки (друга з них, яка не містить $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ буде контрольною) швидко вносять по 5 см^3 отриманого екстракту тіаміну, вміст лійок ретельно струшують, у кожну з них додають по 10 см^3 ізоамілового спирту і протягом 2 хв інтенсивно струшують. На завершенні розшарування суміші водну фазу видаляють, а ізоаміловий шар ще раз промивають 5 см^3 дистильованої

води. В обидві ділильні лійки додають по 2 см³ етилового спирту для просвітлення розчинів. Суміш, яка аналізується, і контрольну знову ретельно струшують і визначають їх флуоресценцію (див. нижче).

Стандартний водний розчин тіаміну, який містить 1 мкг/см³, окиснюють таким же чином як і той, що містить дослідну пробу (екстракт із тканин). Для цього використовують 0,05 см³ 2 %-го розчину K₃[Fe(CN)₆]. Для визначення можливого впливу домішок у стандартній пробі, які здатні впливати на флуоресцентні характеристики, як контроль використовують 1 см³ стандартного водного розчину тіаміну, який обробляють вищенаведеним способом, але без додавання K₃[Fe(CN)₆].

При визначенні вмісту тіаміну в пробі, яка аналізується флуоресцентним методом, довжина хвилі збудження ($\lambda_{\text{збуд.}}$) – 360 нм, а довжина хвилі випромінювання ($\lambda_{\text{вип.}}$) – 460 нм.

Проведення розрахунків:

Концентрацію тіаміну в пробі мкг, яка аналізується, визначають за формулою:

$$C = \frac{(E_1 - E_2) \cdot V \cdot 1000}{(E_3 - E_4) \cdot m \cdot V_1},$$

де С – концентрація тіаміну в пробі, яка аналізується, мкг/кг;

E₁ – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується, після окиснення тіаміну в тіохром K₃[Fe(CN)₆];

E₂ – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується, без окиснення тіаміну в тіохром K₃[Fe(CN)₆];

E₃ – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину тіаміну, що містить 1 мкг вітаміну, після окиснення тіаміну в тіохром K₃[Fe(CN)₆];

E₄ – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину тіаміну, що містить 1 мкг вітаміну, безокиснення тіаміну в тіохром K₃[Fe(CN)₆];

V – загальний об'єм вітамінного екстракту, см³;

V₁ – об'єм вітамінного екстракту, відібраний для аналізу, см³;

m – маса проби (тканини), яка взята для аналізу, г;

1 000 – коефіцієнт перерахунку концентрації тіаміну з мкг/г проби у мг/кг проби.

Лабораторна робота 11. Кількісне визначення рибофлавіну (вітаміну В₂) в ікрі риби спектрофлуориметричним методом

Принцип методу. Рибофлавін (вітамін В₂) за хімічною будовою складається із з'єднаних між собою бензольного, піразинового і піримідинового кілець, до якого (піразинового кільця) приєднаний залишок спирту рибітолу.

Рибофлавін входить до складу флавінмононуклеотиду (ФМН) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), які є коферментами флавінзалежних дегідрогеназ.

Метод визначення вмісту рибофлавіну базується на його вивільненні зі зв'язаної форми в коферментах шляхом кислотного гідролізу і обробки препаратом фермента фосфатазою, а також порівнянні інтенсивності флуоресценції розчинів (екстрактів), які аналізуються із стандартними розчинами рибофлавіну.

Матеріал для дослідження: ікра риби.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофлуориметр; гомогенізатор або фарфорова ступка з товкачиком; водяна баня; термостат; годинник; водний розчин сульфатної кислоти (0,1 моль/дм³); толуен; водний розчин натрію ацетату (2,5 моль/дм³), що містить фермент фосфатазу (рН 4,0–4,5); 4 %-й водний розчин калію перманганату; 3 %-й розчин гідрогену пероксиду; насичені розчини SnCl₂ і Na₂SO₄; стандартний водний розчин рибофлавіну (10 мкг/см³); дистильована вода; конічні колби об'ємом 100 см³; калібровані пробірки об'ємом 10 см³; градувальні піпетки об'ємом 5 і 10 см³; крапельниця; лійка для фільтрування; фільтрувальний папір «синя стрічка» з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Наважку 2 г ікри риби ретельно гомогенізують, розтирають у фарфоровій ступці з 10 см³ розчину сульфатної кислоти (0,1 моль/дм³), яку додають невеликими порціями. Гомогенат переносять в конічну колбу місткістю 100 см³ і доводять об'єм суміші приблизно до 75 см³ розчином сульфатної кислоти (0,1 моль/дм³). Вміст колби нагрівають протягом 45 хв на киплячій водяній бані при частому перемішуванні. Після охолодження в колбу додають 2–3 краплі толуену і 5 см³ розчину натрію ацетату (2,5 моль/дм³), що містить фермент фосфатазу (рН 4,0–4,5). Для

перебігу ферментативної реакції, внаслідок якої звільнюється зв'язаний рибофлавін, колбу поміщають на 2 год в термостат при температурі 40 °С. Після охолодження вміст цієї колби переносять у мірну колбу місткістю 100 см³, доводять об'єм суміші дистильованою водою до мітки, ретельно перемішують і фільтрують через складчастий фільтр у колбу.

Основний стандартний розчин рибофлавіну готують наступним чином: 10 мг розтертого в ступці рибофлавіну розчиняють в 100 см³ (у мірній колбі місткістю 100 см³). В цьому випадку стандартний водний розчин рибофлавіну містить цей вітамін в концентрації 10 мкг/см³.

У подальшому в одну з калібрувальних пробірок вносять 8 см³ профільтрованої витяжки, а в іншу – 7 см³ дистильованої води і 1 см³ стандартного розчину рибофлавіну. Потім в обидві пробірки краплинами додають однакові кількості 4 %-го розчину калію перманганату до появи блідо-рожевого забарвлення. Через 10 хв у ці пробірки для руйнування надлишку калію перманганату додають також краплинами (2–5 крапель) 35 %-й розчин гідрогену пероксиду, доводять об'єм в обох пробірках дистильованою водою до 10 см³ і ретельно перемішують.

Наступний етап – це вимір інтенсивності флуоресценції сумішей обох пробірок за умов: довжина хвилі збудження ($\lambda_{зб\text{уд}}$) – 430 нм, а довжина хвилі випромінювання ($\lambda_{\text{випр}}$) – 565 нм. Після визначення інтенсивності флуоресценції в ці обидві пробірки додають по 0,2 см³ насиченого розчину SnCl₂ і 0,1 см³ Na₂SO₄ для гасіння флуоресценції рибофлавіну і вимірюють можливу флуоресценцію домішок за тих же умов.

Проведення розрахунків:

Концентрацію рибофлавіну в пробі, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C = \frac{(E_1 - E_2) \cdot V \cdot V_1 \cdot a \cdot 1000}{(E_3 - E_4) \cdot V_2 \cdot m},$$

де С – концентрація рибофлавіну в пробі, яка аналізується, мкг/кг;

E_1 – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується;

E_2 – інтенсивність флуоресценції екстракту проби, яка аналізується, після гасіння флуоресценції;

E_3 – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину рибофлавіну;

E_4 – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину рибофлавіну після гасіння флуоресценції;

a – концентрація рибофлавіну в стандартному розчині, мкг/см³;

V – загальний об'єм витяжки рибофлавіну, см³;

V_1 – об'єм екстракту проби, яка аналізується, що взятий для вимірювання флуоресценції, см³;

V_2 – відібрана аліквота екстракту проби для аналізу, см³;

m – маса проби (ікри), яка взята для аналізу, г;

1 000 – коефіцієнт перерахунку концентрації рибофлавіну з мкг/г проби в мг/кг проби.

Лабораторна робота 12. Визначення вмісту нітритів і нітратів спектрофотометричним методом молекулярної абсорбції

Принцип методу. Нітрати – це солі нітратної кислоти (HNO_3), які є продуктами обміну азотистих речовин. Вони не проявляють вираженої токсичної дії, але здатні відновлюватися до нітритів – солей нітритної кислоти (HNO_2). Ці сполуки при взаємодії з гемоглобіном крові викликають утворення метгемоглобіну, який не здатний зв'язувати і транспортувати кисень. Крім того, з нітритів у присутності амінів можуть утворюватися N-нітрозоаміни, які проявляють канцерогенну дію.

Основне джерело надходження нітратів і нітритів в організм людини – продукти рослинного походження (60–85 % добового надходження нітратів припадає на овочі). Ця проблема пов'язана зі зростаючим і часто безконтрольним застосуванням азотистих добрив (неправильне дозування і терміни внесення), використанням деяких гербіцидів (наприклад, дихлорфеноксоцтової кислоти, 2,4-Д), дефіцитом молібдену в ґрунті та ін., що порушує обмін речовин у рослинах і сприяє накопиченню ними нітратів.

Крім рослин, джерелами нітратів і нітритів є м'ясні продукти, а також риба і сири, в які додають натрій або калій нітрит як консервант і для збереження природного кольору м'ясопродуктів.

Метод визначення нітратів і нітритів базується на екстрагуванні проби, яка аналізується, горячою водою, осадження протеїнів калію фероціанідом (калію залізосинеродистим (II), $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) і ацетатом цинку. Нітрати відновлюють до нітритів металевим кадмієм, а при додаванні до них хлориду сульфаніламідів і N-(1-нафтил) дигідрохлоридетилендіаміну утворюється забарвлена в червоний колір комплексна сполука, кількість якої визначають спектрофотометрично.

Матеріал для дослідження: буряки столові, капуста білоголова, цибуля перо, петрушка або інші овочі.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр; терези аналітичні 2-го класу точності; водяна баня; лабораторний термометер; мішалка вертикальна механічна; термостат; шпатель, кінець якого покритий політетрафторетиленом (ПТФЕ); паличка для перемішування, кінець якої розплющений і покритий ПТФЕ; годинник; рН-метр (іономір); натрію тетраборнокислий; калій фероціанід (калію залізосинеродистий (II) тригідрат; концентрований розчин аміаку; цинку ацетат; сульфаніламід; кислота хлористоводнева; кадмію сульфат; N-(1-нафтил) дигідрохлоридетилендіамін; металевий цинк; амонію хлорид; натрію нітрат; дистильована вода; циліндр мірний об'ємом 50 см^3 ; колби мірні об'ємом 50 см^3 , 100 , 200 і 1000 см^3 ; колби конічні з притертими скляними корками об'ємом 25 см^3 ; скляна хімічна склянка об'ємом 250 см^3 ; піпетки об'ємом $1-10 \text{ см}^3$; лійка; папір фільтрувальний гафрований без нітратів і нітритів.

Хід роботи:

Перед проведенням досліджень готують необхідні розчини реактивів:

1. Розчин натрію тетраборнокислий: розчиняють 50 г натрію тетраборнокислового ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) в 1 дм^3 теплої ($30-40 \text{ }^\circ\text{C}$) води і охолоджують до кімнатної температури.

2. Розчин калію фероціаніду (II): в мірній колбі об'ємом 1 дм^3 розчиняють 106 г калію фероціаніду (калію залізосинеродистого (II), $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) і доводять дистильованою водою до мітки.

3. Розчин цинку ацетату: в мірній колбі об'ємом 1 дм³ розчиняють 200 г цинку дігідрат ацетату ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) і 30 см³ льодяної оцтової кислоти і доводять дистильованою водою вміст колби до мітки.

4. Реактив для розвитку забарвлення складається з трьох розчинів:

Розчин I: у мірній колбі об'ємом 200 см³ розчиняють 0,4 г сульфаніламід у 100 см³ дистильованої води і нагрівають на водяній бані до температури 80–90 °С; розчин охолоджують, за необхідності фільтрують, потім під час збовтування додають 20 см³ хлористоводневої кислоти ($\rho_{20} = 1,19 \text{ г/см}^3$), доводять дистильованою водою до мітки і ретельно перемішують.

Розчин II: у мірній колбі об'ємом 100 см³ розчиняють 0,1 г N-(1-нафтил) дигідрохлоридетилендіаміну ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$) доводять дистильованою водою до мітки і перемішують.

Розчин III: у мірній колбі об'ємом 1 дм³ розводять 445 см³ хлористоводневої кислоти ($\rho_{20} = 1,19 \text{ г/см}^3$).

5. Розчин кадмію сульфату: в мірній колбі об'ємом 1 дм³ розчиняють 40 г кадмію октагідрат сульфату ($\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) дистильованою водою доводять до мітки і перемішують.

6. Розчин аналітичний буферний (рН 9,6): в мірній колбі об'ємом 1 дм³ розчиняють 37,4 г амонію хлориду (NH_4Cl) в 0,9 дм³ дистильованої води; концентрованим розчином аміаку ($\rho_{20} = 0,88 \text{ г/см}^3$) регулюють рН до 9,6; доводять дистильованою водою до мітки.

7. Стандартний розчин натрію нітриту: наважку натрію нітриту (NaNO_2), який заздалегідь висушений при температурі 115 °С до постійної маси, вносять у мірну колбу об'ємом 1 дм³, розчиняють в 50 см³ дистильованої води і ретельно перемішують; доводять дистильованою водою до мітки; 5 см³ цього розчину переносять у мірну колбу об'ємом 1 дм³ і доводять дистильованою водою до мітки. В 1 см³ цього стандартного розчину міститься 10 мкг нітрит-іонів.

За методикою визначення вмісту натрію нітрату його відновлюють в нітрити металевим кадмієм. За відсутності металевого кадмію його можна отримати з кадмію сульфату. Для цього в скляну хімічну склянку об'ємом 250 см³ додають розчин кадмію сульфату (див. вище), поміщають стрижні металевого цинку

(довжина 150 мм, діаметр 5–7 мм) і залишають на 1 год. Регулярно зішкрібають шпателем відновлений кадмій і його подрібнюють паличкою. Отриманий і зібраний кадмій з цинкових стрижнів обробляють хлористоводневою кислотою ($0,1$ моль/дм³), кілька разів промивають дистильованою водою, подрібнюють і зберігають у дистильованій воді.

Визначення вмісту нітритів:

Наважку проби від 1 до 10 г після подрібнення (або від 1 до 10 см³ рідини після розмороження в закритій посудині заморожених продуктів у залежності від припустимого вмісту нітритів) вносять у скляну хімічну склянку об'ємом 250 см³ і додають 5 см³ розчину натрію тетраборнокислого і приблизно 100 см³ гарячої (70–80 °С) дистильованої води. Потім нагрівають стакан 15 хв на киплячій водяній бані, час від часу струшуючи. Послідовно додають по 2 см³ розчину калію фероціаніду і цинку ацетату, струшують кожний раз.

Після охолодження вміст хімічного стакану переносять у мірну колбу об'ємом 200 см³, ополіскують дистильованою водою склянку і цей розчин додають в ту ж мірну колбу. Об'єм колби доводять дистильованою водою до мітки, ретельно премішують.

Отриманий розчин фільтрують крізь гафрований фільтрувальний папір, а у разі потреби фільтрування повторюють.

У подальшому аліквоту фільтрату (не менше 10 см³) переносять у мірну колбу об'ємом 50 см³ і розводять приблизно 30 см³ дистильованої води. Потім до цього розчину додають 5 см³ розчину I і 3 см³ розчину III для розвитку забарвлення, ретельно перемішують і на 3–5 хв залишають у захищеному від світла місці при кімнатній температурі. В подальшому додають 1 см³ розчину II для розвитку забарвлення; ретельно перемішують і залишають протягом 3–5 хв при кімнатній температурі в захищеному від світла місці. Вміст колби доводять дистильованою водою до мітки.

Протягом 15 хв вимірюють екстинкцію (оптичну густину) отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 538 нм.

Проводять також приготування контрольної проби, як і дослідної, але замість проби, яка аналізується, беруть 10 см³ дистильованої води. Вимірюють за тих же умов її екстинкцію.

Від числових значень екстинкції екстракту дослідної проби віднімають значення отриманої екстинкції контрольної проби.

Отримані значення екстинкції і будуть такими, що використовуються для визначення вмісту нітритів у дослідній пробі за використання калібрувального графіка.

Для побудови калібрувального графіка у шість мірних колб об'ємом 50 см³ поміщають, відповідно 0 см³; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 і 3,0 см³ стандартних розчинів натрію нітриту, які містять 0,5 мг; 10; 20; 25 і 30 мг натрію нітриту, а також відповідно 30 см³; 29,5; 29,0; 28,0; 27,5 і 27,0 см³ дистильованої води. З отриманими розчинами стандартів натрію нітриту проводять всі ті ж процедури, що із профільтованим екстрактом дослідної проби, починаючи з додавання реактиву для розвитку забарвлення. Після проведення всіх процедур, отримані калібрувальні розчини спектрофотометрують при тій же довжині хвилі (538 нм).

При побудові калібрувального графіка на вісі абсцис відкладають значення маси нітритів (в мкг) у калібрувальних розчинах, а на вісі ординат – відповідні значення екстинкції, яку вимірювали на спектрофотометрі.

Проведення розрахунків:

Масову частку нітритів у міліграм нітрит-іону (NO₂⁻) на кілограм проби або міліграм нітрит-іону (NO₂⁻) на дециметр кубічний (за рідкого стану проби), яка аналізується, обчислюється за формулою:

$$C = m_1 \cdot \frac{200}{V_1 \cdot m_0}$$

або

$$C = m_1 \cdot \frac{200}{V_1 \cdot V_0},$$

де С – масова частка нітритів, мг NO₂⁻/кг або мг NO₂⁻/дм³;

m₀ – маса проби яка аналізується, г;

m₁ – маса нітрит-іонів (NO₂⁻), що міститься в аліквоті проби (V₁) фільтрату і визначена за калібрувальним графіком, мкг;

V₀ – об'єм проби, яка аналізується (за її рідкого стану);

V₁ – об'єм досліджуваної аліквати проби фільтрату екстракту, см³;

200 – коефіцієнт перерахунку згідно методики.

Визначення вмісту нітратів:

Відбір проби, яка аналізується, а також отримання профільтованого екстракту проводять таким же чином, як і при визначенні вмісту нітритів (див.вище).

У подальшому аліквату профільтованого екстракту проби (10 см³ або менше в залежності від припустимого вмісту нітратів у цій пробі) додають в конічну колбу місткістю 25 см³, до неї поміщають також 2 г металевого кадмію і 5 см³ розчину аналітичного буферного (див. вище). Колбу закупорюють скляним корком та струшують на вертикальній механічній мішальці протягом 5 хв. У цьому процесі відбувається відновлення нітратів у нітрити.

У подальшому вміст цієї колби фільтрують через фільтрувальний папір, який не містить нітритів, фільтрат збирають у мірну конічну колбу об'ємом 50 см³. Дистильованою водою декілька разів ополіскують фільтрувальний папір і зливи додають у туж колбу. Об'єм цієї колби доводять дистильованою водою до мітки.

Потім відбирають 10 см³ цього фільтрату і в ньому визначають утворені нітрити (що виникли при відновленні нітратів), як описано в ході лабораторної роботи щодо визначення нітритів (див.вище).

Проведення розрахунків:

Масову частку нітратів (міліграм нітрат-іонів (NO₃⁻) на кілограм або міліграм нітрат-іонів (NO₃⁻) на дециметр кубічний (за рідкого стану проби) в пробі, яка аналізується, обчислюють за формулою:

$$C = 1,348 \cdot \frac{m_2 \cdot 10\,000}{V_2 \cdot V_3 \cdot m_0} - \frac{m_1 \cdot 200}{V_1 \cdot m_0}$$

або

$$C = 1,348 \cdot \frac{m_2 \cdot 10\,000}{V_2 \cdot V_3 \cdot V_0} - \frac{m_1 \cdot 200}{V_1 \cdot m_0},$$

де C – масова частка нітратів, мг NO₃⁻/кг або мг NO₃⁻/ дм³;
m₀ – маса проби яка аналізується, г;
m₁ – маса нітрит-іонів (NO₂⁻), що містяться в аліквоті проби (V₁) фільтрату і визначена за калібрувальним графіком, мкг;

m_2 – загальна маса нітритів, яка виражена в міліграмах нітрит-іонів (NO_2^-), яку містить об'єм (V_2) дослідного розчину, мг;

V_0 – об'єм проби, яка аналізується (за її рідкого стану);

V_1 – об'єм досліджуваної аліквоти проби фільтрату екстракту, см^3 .

V_2 – об'єм дослідного розчину, який був використаний для спектрометричного вимірювання, см^3 ;

V_3 – об'єм аліквоти проби фільтрату, який використовували для приготування розчину, який аналізується, см^3 ;

1,348 – коефіцієнт перерахунку нітритів у нітрати, який дорівнює відношенню молекулярної маси нітрат-іонів (NO_3^-) до молекулярної маси нітрит-іонів (NO_2^-);

10 000 і 200 – коефіцієнт перерахунку згідно методики.

Лабоарторна робота 13. Кількісне визначення нітритів у м'ясних продуктах спектрофотометричним методом

Принцип методу. Нітрити при взаємодії з гемоглобіном сприяють утворенню метгемоглобіну, який не здатний зворотно зв'язувати кисень. Це може викликати розвиток гіпоксії.

В основі методу визначення нітритів у м'ясних продуктах лежить кількісна реакція нітрит-іона (NO_2^-) з сульфаніловою кислотою з наступним утворенням при взаємодії з α -нафтиламіном комплексної сполуки, яка має червоно-фіолетове забарвлення.

Метод базується на визначенні нітритів за попередньо побудованим із стандартними розчинами нітритів калібрувальним графіком, де на вісі абсцис відкладають концентрацію нітритів, а на вісі ординат – відповідні їм значення екстинкції (оптичної густини).

Матеріал для дослідження: ковбаси, шинка або інші м'ясні продукти.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: спектрофотометр або фотоколориметр; терези аналітичні 2-го класу точності; лабораторний термометр; водяна баня; штатив для пробірок; оцтова кислота (льодова і 12 %-ва); хлороформ; розчин цинку сульфату (10 %-й); основний стандартний розчин нітриту, який готують наступним чином: наважку 1,4970 г натрію нітритокиислового (NaNO_2) розчиняють у мірній колбі об'ємом 1 дм^3 в 10–20 см^3 дистильованої води і доводять водою до мітки, ретельно премішу-

ють (1 см^3 цього розчину містить 1 мг нітритів); розчин консервують з додаванням 1 см^3 хлороформу та зберігають у склянці з темного скла протягом 2-х – 3-х місяців; робочий стандартний розчин готують наступним чином: 1 см^3 основного стандартного розчину переносять в мірну колбу об'ємом 1 дм^3 і доводять об'єм до мітки дистильованою водою, ретельно перемішують (в 1 см^3 такого розчину міститься 1 мкг нітритів), використовують свіже приготовлені розчини; реактив Грісса, який готують наступним чином: 10 г сухого реактиву Грісса (містить λ -нафтиламін) розчиняють в 100 см^3 12% -го розчину оцтової кислоти; дистильована вода; пробірки об'ємом 5 і 10 см^3 ; мірні колби об'ємом 50 і 250 см^3 ; градуйовальні піпетки об'ємом 1 – 5 см^3 ; склянка з темного скла об'ємом 500 см^3 ; фільтрувальний папір; синя стрічка з усім необхідним для фільтрування.

Хід роботи:

Перед початком роботи готують водні витяжки з м'ясних продуктів. Для цього в склянку вносять наважку масою 5 г подрібненого м'ясного продукту (ковбаси, шинки тощо) і додають 30 – 40 см^3 дистильованої води, яка підігріта до $60 \text{ }^\circ\text{C}$, ретельно перемішують протягом 10 хв . Потім вміст склянки відстоюють 30 хв , щоб над осадом утворилася витяжка з м'ясного продукту.

У подальшому водну витяжку переносять у мірну колбу місткістю 50 см^3 і доводять об'єм до мітки дистильованою водою, причому залишки наважки змивають. Вміст колби ретельно перемішують. Потім у склянку додають 20 см^3 отриманої водної витяжки, 10 см^3 розчину калію гідроксиду (або натрію гідроксиду) з молярною концентрацією $0,1 \text{ моль/дм}^3$, а також 40 см^3 10% -го розчину цинку сульфату, все ретельно перемішують. Отриману суміш нагрівають на водяній бані при температурі $60 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 7 – 8 хв , охолоджують, фільтрують у мірну колбу об'ємом 100 см^3 , додають 4 см^3 реактиву Грісса, доводять до мітки і перемішують. Дана суміш і є підготовленою пробою для вимірів.

Для побудови калібрувального графіка готують розчини наступним чином: у пронумеровані мірні колби об'ємом 50 см^3 вносять 0 см^3 ; $0,5$; $1,0$; $2,0$; $5,0$; $10,0$ і $15,0 \text{ см}^3$ робочого стандартного розчину (містить 1 мкг/см^3 нітритів). Потім у колби додають приблизно 30 см^3 дистильованої води, їх вміст перемішують і в кожну з них додають по $2,0 \text{ см}^3$ розчину реактиву Грісса, доводять

до мітки і знову премішують. Отримані розчини містять нітриту в концентрації 0 мг/см³; 0,01; 0,02; 0,04; 0,10; 0,20 і 0,30 мг/см³ відповідно.

Мірні колби з калібрувальними розчинами, і також підготовленою пробою, що досліджується, поміщають у водяну баню, нагрівають до 50–60 °С протягом 10 хв, ретельно перемішують, охолоджують і фотометрують при довжині хвилі 520 нм у відношенні до розчину порівняння, який не містить нітритів.

За результатами вимірів екстинкції (оптичної густини) робочих стандартних розчинів нітритів будують калібрувальний графік: на вісі абсцис відкладають концентрацію нітритів у пробах-стандартах (мг/см³), а на вісі ординат – відповідні значення оптичної густини (екстинкції).

Проведення розрахунків:

Масову концентрацію нітритів у досліджуваному продукті обчислюють за формулою:

$$C = (100 \cdot C_2 \cdot 100) / (1000 \cdot m),$$

де C – масова концентрація нітритів у досліджуваному м'ясному продукті, мг/100 г м'ясопродуктів;

C_2 – концентрація нітритів, яка знайдена за калібрувальним графіком, мг/см³;

m – маса наважки м'ясного продукту, яка взята для дослідження, г;

100 і 1 000 – коефіцієнти перерахунку для визначення масової концентрації нітритів в одиницях мг/100 г м'ясопродукту.

Лабораторна робота 14. Визначення вмісту сахарози в цукрі поляриметричним методом

Принцип методу. Сахароза – буряковий або тростинний цукор (α -глюкопіранозил–1,2– β -фруктофуранозид) становить собою дисахарид, який складається із залишків глюкози і фруктози. Розчини сахарози обертають площину поляризації світла праворуч на 66,5°.

Метод визначення сахарози в цукрі базується на вимірюванні кута обертання площини поляризації світла розчином сахарози (цу-

кру) поляриметром (цукрометром) і розрахунку масової частки сахарози (у %).

Матеріал для дослідження: цукор-пісок, цукор-рафінад, цукор-сирець.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: цукрометр (цукрополяриметр) з кварцевим компенсаційним клином або компенсатором, що обертається, з міжнародною цукровою шкалою або автоматичний поляриметр; поляриметричні кювети довжиною 200 мм з накривним склом із прозорого оптичного скла товщиною 1–2 мм із паралельними, рівними поверхнями; контрольна кювета з кварцевими поляриметричними пластинами; терези аналітичні 2-го класу точності та терези лабораторні; ареометр із діапазоном вимірювання густини 1 000–2 000 кг/м³; термостат; нейзельберова і фарфорова ступки з товкачиком; годинник або секундомір; термометр; водяна баня; скло годинникове; вугілля деревне порошкоподібне; етер етиловий; свинцю ацетат; свинцю оксид; алюмінію сульфат; фенолфталеїн; дистильована вода; циліндри мірні об'ємом 10, 100 і 1 000 см³; колба мірна об'ємом 100 см³; лійка; крапельниця; скляна склянка об'ємом 250 см³, бутель об'ємом 2 дм³, палички скляні та дерев'яні; піпетка або шприц об'ємом 5 см³; папір фільтрувальний «синя стрічка»; рН-лакмус.

Хід роботи:

Пред проведенням досліджень готують відповідні розчини реактивів:

1. Розчин свинцю ацетату: 300 г свинцю ацетату ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ретельно розтирають у фарфоровій ступці з 100 г свинцю оксиду (PbO) та 100 см³ дистильованої води; фарфорову ступку з сумішшю вміщують у киплячу водяну баню і нагрівають при перемішуванні до моменту набуття білого або світло-рожевого кольору, який спочатку був жовтим; потім під час премішування додають частинами 900 см³ горячої (70–80 °С) дистильованої води і поміщають суміш у бутель, який залишають у теплом (25–30 °С) місці на 3–5 діб і зрідка перемішують дерев'яною паличкою.

Після освітлення отриманий розчин фільтрують. Розчин повинен мати сильнолужну реакцію на рН-лакмусі і слабколужну на фенолфталеїні. Відфільтрований розчин зберігають у бутлі, закритому корком.

Густина розчину свинцю ацетату при 20 °С повинна бути $\rho_{20} = 1\ 235\text{--}1\ 240\ \text{кг/м}^3$, вміст свинцю в перерахунку на РbО – $100\pm 2\ \text{кг/м}^3$.

2. Розчин алюмінію сульфату (основний): до 122 г алюмінію сульфату (основного) додають $1,0\ \text{дм}^3$ дистильованої води, залишають на одну добу і потім ретельно премішують.

Необхідно також пред початком досліджень перевірити шкалу цукрометра (з компенсатором, що обертається) за допомогою кварцевої пластини з відомим значенням кута обертання площини поляризації (або просто поляризації так званого «цукрового» градусу, °Z). Вимірювання проводять при $20,0\pm 0,5\ \text{°C}$ (Z_{20}). Якщо за цієї температури вказане вимірювання неможливо провести, значення °Z кварцевої пластини обчислюють за формулою:

$$Z_t = Z_{20} \cdot [1 + 0,00014 \cdot (t - 20)],$$

де Z_t – значення кута обертання площини поляризації кварцевої пластини (°Z) за температури вимірювання $t\ \text{°C}$;

Z_{20} – значення кута обертання площини поляризації кварцевої пластини (°Z) за температури 20 °С;

0,00014 – коефіцієнт перерахунку.

У подальшому проводять безпосереднє вимірювання поляризаційним методом вмісту сахарози в пробі, що аналізується. Для цього у нейзільберовій ступці зважують 20 г цукру (цукор-рафінад попередньо подрібнюють у фарфоровій ступці), розчиняють невеликими ($20\text{--}30\ \text{см}^3$) порціями теплої ($30\text{--}40\ \text{°C}$) дистильованої води і через лійку переносять у суху мірну колбу об'ємом $100\ \text{см}^3$. Цукор розчиняють легкими коливанням колби.

При дослідженні цукру-сирцю у розчин в мірній колбі додають краплями розчин (див. вище) свинцю ацетату (не більше $4\ \text{см}^3$) або основний розчин алюмінію сульфату (до $10\ \text{см}^3$) до часу, поки не випаде осад.

У подальшому в мірну колбу додають дистильовану воду (ополіскують і шийку колби) в об'ємі, щоби рівень розчину сягнув приблизно 2 см до мітки. Колбу з розчином вміщують на 15 хв у термостат до досягнення температури $20,0\pm 0,1\ \text{°C}$. Піну, що утворилася на поверхні розчину, видаляють краплею етилового етера, а внутрішні стінки шийки колби до мітки обтирають досуха фільтрувальним папером. Потім розчин у колбі доводять до мітки дистильованою водою при температурі $20,0\pm 0,1\ \text{°C}$ шприцем або пікет-

кою. Колбу накривають годинниковим склом і витримують 30 хв, закривають корком і ретельно перемішують легким обертанням.

За необхідності розчин фільтрують через подвійний паперовий фільтр при запобіганні випаровування і зміни концентрації розчину. Для цього найпростіше фільтрувальну лійку прикрити пластинкою скла. Перші 10 см³ фільтра зливають.

При використанні алюмінію сульфату вміст колби вливають у суху склянку, додають 2,0 г активованого вугілля, перемішують скляною паличкою приблизно 30 с і фільтрують через подвійний паперовий фільтр.

Після отримання фільтрату, ним ополіскують поляриметричну кювету і наповнюють її цим фільтратом так, щоби не утворилися бульбашки повітря. Кювету вміщують у камеру поляриметра (цукрометра), в якій підтримується температура 20,0±0,1 °С. Проводять не менше п'яти вимірювань і обчислюють середнє арифметичне значення.

У разі використання автоматичного поляриметра вимірювання проводять згідно «Інструкції по експлуатації» з урахуванням поправок на температуру та об'єм.

Поправку на об'єм визначають наступним чином. Спочатку обчислюють масу розчину m_r (г) без поправки на зважування за формулою:

$$m_r = m_2 - m_1,$$

де m_1 —маса порожньої мірної колби, г;

m_2 — маса мірної колби з розчином, г.

Одержаний результат переводять в об'єм за таблицею, яка надається в «Інструкції по експлуатації» цукрометра і за такою таблицею визначають поправку в «цукрових» градусах (°Z).

Наприклад: $m_r = m_2 - m_1 = 109,667$ г; за даними таблиці цьому m_r відповідає $V = 100,010$ см³, а вже цьому V — поправка +0,10 °Z.

Кут обертання площини поляризації (або просто поляризацію), скорегований та температуру в «цукрових» градусах обчислюють за формулою:

$$Z_t = \frac{^{\circ}Z - Y}{Q - X} \cdot Q_1 \cdot [1 + 1,44 \cdot 10^{-4} \cdot (t_p - 20)],$$

де Z_t – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) розчину цукру, який аналізується, за температури вимірювання t ($^{\circ}C$);

Z – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) вразі встановленої поляриметричної кювети з розчином;

Y – показник поляриметра ($^{\circ}Z$) в разі встановленої порожньої (без розчину) поляриметричної кювети;

Q – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) в разі встановленої кварцевої пластини;

X – показання поляриметра ($^{\circ}Z$) в разі порожнього відділення поляриметричної кювети;

Q_1 – поляризаційна здатність (кут обертання площини поляризації) кварцевої пластини в одиницях $^{\circ}Z$, за паспортними даними цієї пластини;

t_p – температура кварцевої пластини ($^{\circ}C$);

20 – температура повітря за нормальних умов ($^{\circ}C$);

$1,44 \cdot 10^{-4}$ – коефіцієнт перерахунку.

Дійсний кут обертання площини поляризації (дійсну поляризацію) обчислюють за формулою:

$$Z_d = Z_t + Z_r,$$

де Z_d – дійсна поляризація ($^{\circ}Z$);

Z_t – поляризація, яка скорегована на температуру ($^{\circ}Z$);

Z_r – поправка поляризації на об'єм ($^{\circ}Z$).

Проведення розрахунків:

Масову відсоткову частку сахарози (C , %) обчислюють за формулою:

– у разі використання цукрометрів (поляриметрів) із клинвою компенсацією:

$$C = Z_t \cdot [1 + 0,000611] \cdot (t - 20)];$$

– у разі використання цукрометрів (поляриметрів) із компенсатором, що обертається:

$$C = Z_t \cdot [1 + 0,000467] \cdot (t - 20)],$$

де Z_t – середнє арифметичне значення відліків за шкалою цукрометра (в одиницях °Z) за температури вимірювання t °C;

20 – температура повітря за нормальних умов (°C);

0,000611 або 0,000467 – коефіцієнти переахунку.

Масову відсоткову частку в переахунку на суху речовину сахарози ($C_{с.р.}$, %) обчислюють за формулою:

$$C_{с.р.} = \frac{C \cdot 100}{100 - W},$$

де C – результат вимірювання масової відсоткової частки сахарози (%);

W – масова частка вологи в цукрі, (%);

100 – коефіцієнт переахунку.

Лабоарторна робота 15. Визначення вмісту розчинних сухих речовин за сахарозою в продукції цукрового виробництва рефрактометричним методом

Принцип методу. Рефрактометрія – це метод аналізу речовин, який базується на вимірі коефіцієнта заломлення світла, що називається ще коефіцієнтом рефракції:

$$n = \frac{\sin \lambda}{\sin \beta}$$

де n – коефіцієнт заломлення світла;

λ і β – кут падіння і заломлення світла, відповідно, при переході променя світла з одного середовища в інше.

Коефіцієнт заломлення світла залежить від різних факторів: природи речовин, температури зовнішнього середовища, довжини хвилі світла і концентрації речовини. Для більшості речовин, у т. ч. сахарози, для коефіцієнта заломлення світла характерна пряма залежність.

Коефіцієнт заломлення світла розчином або твердим тілом за використання імерсійної рідини (має таке значення коефіцієнта заломлення, за якого це тіло не впливає на прозорість рідини) вимірюють за допомогою спеціального приладу – рефрактометра згідно

«Інструкції по експлуатації», яка надається до кожного типу цих приладів.

В основу роботи деяких типів рефрактометрів покладено метод визначення коефіцієнта заломлення світла речовиною, яка аналізується, за граничним кутом заломлення світла або повним внутрішнім відбиттям .

На основі закону граничного заломлення:

$$n = n_0 \sin \gamma,$$

де n – коефіцієнт заломлення світла пробою, яка аналізується;

n_0 – коефіцієнт заломлення світла оптичного скла, з якого виготовлена вимірювальна призма;

γ – граничний кут заломлення (повного внутрішнього відбиття).

Основне завдання проведення досліджень продуктів цукрового виробництва – визначення відсотка розчинних сухих речовин за сахарозою (% розчинних сухих речовин). Для цього визначене числове значення коефіцієнта заломлення світла переводять за спеціальними таблицями у відсотках розчинних сухих речовин за сахарозою – в масову частку, тобто кількість за сахарозою. За шкалою переводу цей показник змінюється від 0 ($n^{20} = 1,33299$) до 95 % ($n^{20} = 1,5298$). Масову частку розчинних сухих речовин за сахарозою виражають, як правило, в грамах сахарози на 100 г проби.

Рефрактометричний метод знайшов широке розповсюдження також для визначення чистоти цукру за сахарозою, з чутливістю принаймі до 0,1 %.

Матеріал для дослідження: водний розчин продукту цукрової промисловості, який аналізується.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: рефрактометр, еталонні (калібрувальні) проби; дегазована дистильована вода; етиловий спирт; петроленний етер; пробірки об'ємом 10 см³; пастерівська піпетка або мікрошприц; фільтрувальний па-пір або м'яка серветка.

Хід роботи:

Перед початком роботи вимірювальну камеру з призмами ретельно ополіскують дистильованою водою і сушать, а потім

протирають фільтрувальним папером або м'якою серветкою, які змочені сумішшю етиловий спирт : петролейний етер (8:2) і насухо протирають знову фільтрувальним папером або м'якою серветкою.

Юстировку (вивірення точності) рефрактометра проводять перед кожним сеансом вимірювань за дистильованою водою (для неї при $20,0 \pm 0,1$ °C $n_{H_2O}^{20} = 1,33299$) або за еталонними (калібрувальними) пробами з відомим значенням n . За наявності рефрактометра, у якого є шкала з поділками вмісту сахарози (принаймі до 0,1 %), то для юстировки, використовують еталонні проби з відомим вмістом сахарози та ідентичні за наявністю інших речовин аналізуємої проби.

За наявності в рефрактометрі термостатованої вимірювальної камери, температуру в ній виставляють, як і при юстировці за дистильованою водою при $20,0 \pm 0,1$ °C (див. вище). Якщо в рефрактометрі є пристрій для температурної компенсації, то вимірювання можна проводити за іншої, ніж 20 °C температури, але в межах між 10 і 30 °C. За відсутності такого пристрою необхідно враховувати поправку на температуру за спеціальними таблицями таким же чином, як для коефіцієнта заломлення світла n , так і для відсоткового вмісту сухих речовин за сахарозою що, як вже відмічалось, зв'язані між собою певними числовими залежностями, які наведено також у спеціальній таблиці. Створено рефрактометри, у яких існує шкала з поділками до 0,1 % сахарози. За їх використання, результати аналізу вмісту розчиненої сухої речовини в пробах визначають одразу, без попереднього користування спеціальними таблицями, в яких наведені числові співвідношення значень коефіцієнта заломлення світла і відсотка розчинених сухих речовин за сахарозою.

При проведенні аналізу обережно, не торкаючись поверхні нижньої призми, на її поверню наносять 2–3 краплини розчину, який аналізується. Після з'єднання призм необхідно переконатися, що розчин проби рівномірно покриває поверхню призми. Вимірювання проводять після досягнення цим розчином температурної рівноваги (0,5–1 хв) не менше 3-х разів і вираховують середнє арифметичне значення, яке і є кінцевим результатом вимірів.

Слід зазначити, що вимірювання коефіцієнта заломлення світла (n) прозорих розчинів проводять у прохолодному світлі, а в'язких забарвлених або каламутних – у відбитому світлі з використанням спеціальної вимірювальної призми. У випадку нев'язких забарвлених розчинів вимірювання можна проводити як і прохолодному, так і

відбитому світлі. Це визначається експериментально в залежності від природи речовини, яка аналізується, і чутливості рефрактометра.

Для аналізу в прохідному світлі темних забарвлених цукрових розчинів використовується червоний світлофільтр, який розміщується перед освітлювачем зі сторони камери рефрактометра.

Після закінчення роботи вимірювальну камеру рефрактометра необхідно ретельно промити дистильованою водою та висушити.

Проведення розрахунків:

Визначення масової частки сухих розчинних речовин за сахарозою в продукції цукрової промисловості (в одиницях грам сахарози на 100 г проби, які носять ще назву «Вгіх») проводять за спеціальними таблицями при співставленні визначеного коефіцієнта заломлення світла зі шкалою зв'язаного з цим коефіцієнтом відсотка сухих речовин з урахуванням, за необхідності, поправки на температуру. В сучасних рефрактометрах це здійснюється автоматично шляхом використання спеціальних програм, або вони містять шкалу, поділки якої відповідають принаймні до 0,1 % сахарози. Ці прилади обов'язково містять також пристрій для визначення температури вимірювальної камери з точністю до 0,5 °С.

Аналогічним чином визначається масова частка сахарози в розчині цукру.

Лабораторна робота 16. Визначення вмісту розчинних сухих речовин за сахарозою у фруктових і овочевих соках рефрактометричним методом

Принцип методу. В основу методу покладено визначення коефіцієнта заломлення світла у фруктових і овочевих соках, їх концентраціях та близьких до них напоях за допомогою рефрактометра. За його використання визначають вміст розчинених сухих речовин, як масову частку сахарози у її водному розчині, що за даних умов має такий же самий коефіцієнт заломлення світла, що і проба, яка аналізується.

Матеріал для дослідження: свіжоотриманий фруктовий або овочевий сік.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: рефрактометр; дегазована дистильована вода; етиловий спирт; петролейний етер; пробірки об'ємом 10 см³; пастерівська піпетка або мікрошприц; фільтрувальний папір або м'яка серветка.

Хід роботи:

Перед початком роботи вимірювальну камеру з призмами ретельно ополіскують дистильованою водою і сушать, а потім протирають фільтрувальним папером або м'якою серветкою, які змочують сумішшю етиловий спирт: петролейний етер (8:2) і насухо протирають фільтрувальним папером або м'якою серветкою.

Юстировку (вивірення точності) рефрактометра проводять перед кожним сеансом вимірювань за еталонними (калібрувальними) пробами, які готують згідно «Інструкції по експлуатації» приладу, яка надається до кожного типу рефрактометрів. Згідно неї проводяться вимірювальні роботи.

Вміст розчинних сухих речовин за сахарозою в пробі та еталонних зразках звичайно визначають за температури $20,0 \pm 0,1$ °С. Якщо в рефрактометрі є пристрій для температурної компенсації, то вимірювання можна проводити за іншої, ніж 20 °С температури, але в будь-якому випадку між 10 і 30 °С. За відсутності такого пристрою необхідно враховувати поправку на температуру за спеціальними таблицями.

За наявності у рефрактометрі шкали з поділками, які відповідають принаймні до 0,1 % сахарози, вміст розчинної сухої речовини в пробах визначають одразу, без попереднього користування спеціальними таблицями, в яких наведені числові співвідношення значень коефіцієнта заломлення світла і відсотка розчинених сухих речовин за сахарозою.

При проведенні аналізу 2–3 краплини розчину, який аналізується, обережно, не торкаючись поверхні, наносять на нижню призму рефрактометра. Після з'єднання необхідно переконатися, що проба рівномірно покриває поверхню призми. Вимірювання проводять після досягнення цим розчином температурної рівноваги (0,5–1 хв) не менше 3-х разів і враховують середнє арифметичне значення.

Виміри прозорих розчинів проводять у прохідному світлі, а в'язких забарвлених або каламутних – у відбитому світлі з використанням спеціальної вимірювальної призми, а нев'язких забарвлених розчинів вимірювання можна проводити як і прохідному, так і відбитому світлі (визначається експериментально в залежності від чутливості рефрактометра).

Для соків цитрусових і концентратів соків цитрусових при визначенні вмісту розчинних сухих речовин за сахарозою необхідно враховувати так звану «кислотну поправку», обчислені значення

якої надані в спеціальній таблиці. Її вираховують із загального вмісту кислоти (рН 8,1), з розрахунку на безводну цитринову (лимонну) кислоту (грам кислоти на 100 г соку). Так, наприклад, при загальному вмісті кислоти 0,2 г/100 г соку числове значення цієї поправки дорівнює 0,04; 1,0 г/100 г соку – 0,2; 5,0 г/100 г соку – 0,97; 7,0/100 г соку – 1,34. Числові значення «кислотної поправки» необхідно додати до визначених показників рефрактометра (виражених у грамах сахарози на 100 г соку), які одержані при 20 °С.

Проведення розрахунків:

Визначення масової частки сухих розчинних речовин за сахарозою у фруктових і овочевих соках, їх концентратах та у споріднених із ними напоях проводять в одиницях грам сахарози на 100 г проби (інша назва цієї одиниці – «Brix») після врахування, за необхідності, температурної «кислотної поправки» за даними відповідних таблиць, а в сучасних рефрактометрах це робиться автоматично з використанням спеціальних програм.

Лабораторна робота 17. Визначення вмісту важких металів у харчових продуктах методом атомно-абсорбційної спектроскопії

Принцип методу. Метод атомно-абсорбційного аналізу речовин базується на принципах полум'яної спектроскопії.

Азотнокислі мінералізати досліджуваного зразка і проб-стандартів, які отримують сухим озоленням або кислотною екстракцією з озоленням, розпиляють в ацитиленово-повітряному полум'я. Молекули, які містять метали і потрапили в полум'я, дисоціюють на атоми, що поглинають світло від його джерела (випромінювача) при довжині хвилі їх резонансних ліній спектра. Ступінь поглинання світла атомами пропорційна їх концентрації в досліджуваних пробах.

Матеріал для дослідження: харчові продукти, зокрема, овочі, плодово-овочеві соки тощо.

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали: атомно-абсорбційний спектрометр; іономір; терези аналітичні 2-го класу точності; фарфоровий тигель об'ємом 50 см³; сушильна шафа; електронагрівач (до температури 150 °С); муфельна піч (до температури 450 °С); штативи для пробірок; нітратна кислота (10 і 30 %-а);

хлористоводнева кислота (3,7 %-а); натрію гідроксид (4 %-й); амонію гідроксид (концентрований і 4 %-й); магнію нітрат (50 %-й); свіжоприготовлений амонію піролідиндитіокарбонат ($C_6H_{12}S_2N_2$, АПДК), який готують наступним чином: 2,0 г амонію піролідиндитіокарбонату розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі об'ємом 100 см^3 і доводять об'єм до мітки; альтернативним до АПДК є 2,5 %-ний розчин натрію диетилдитіокарбамату (ДДТК-Na); кислота цитринова (лимонна) для приготування буферного розчину з рН 3, який готують наступним чином: 2,101 г цитринової кислоти ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) розчиняють у 20 см^3 розчину натрію гідроксиду (4 %-у) в мірній колбі об'ємом 100 см^3 і дистильованою водою доводять об'єм до мітки, потім $40,3\text{ см}^3$ отриманого розчину переносять у мірну колбу об'ємом 100 см^3 і доводять об'єм до мітки розчином хлористоводневої кислоти (0,37 %-ї); метиловий оранжевий (2 %-й спиртовий розчин) або бромкрезоловий зелений (0,1 %-й спиртовий розчин); метилізобутилкетон безводний або бутилацетат; бромтимоловий синій (0,1 %-й); стандартні розчини Плюмбуму, Кадмію, Купруму, Цинку, Феруму; дистильована вода; ацетиленово-повітряна суміш регульованого співвідношення; мірні колби об'ємом 50 і 100 см^3 ; пробірки об'ємом 5 і 10 см^3 ; градуювальні піпетки об'ємом 1–5 см^3 ; склянки об'ємом 25 см^3 .

Хід роботи:

Підготовка проб, які аналізуються, включає процес мінералізації. Тверді проби (0,5–1 г) одразу обвуглюють у фарфоровому тиглі до припинення виділення диму при температурі близько $150\text{ }^\circ\text{C}$ на електронагрівальному приладі, а рідкі (25 см^3 розчину, який містить 0,5–1 г) попередньо випаровують нагріванням до сухого залишку в сушильній шафі, а потім проводять обвуглення.

Після закінчення обвуглення, до тигля з залишком проби додають по краплинам 30 %-й розчин нітратної кислоти (5–10 крапель, а потім при необхідності ще декілька) і продовжують мінералізацію на електронагрівачі до повного випалення проби.

Потім пробу поміщають у муфельну піч із температурою 200–250 $^\circ\text{C}$, поступово на $50\text{ }^\circ\text{C}$ кожні 30 хв підвищують температуру до 450 $^\circ\text{C}$. Мінералізацію при цій температурі продовжують до отримання сірої золи (проводять озолення). Час озолення складає 10–15 год.

Тигель із золюю виймають із муфельної пічі та охолоджують до кімнатної температури.

При застосуванні способу сухого озолення (див. нижче) або кислотної екстракції з озоленням у тиглі розчиняють золу при нагріванні у 30 %-й нітратній кислоті (1:1) за об'ємом із розрахунку 1–5 см³ кислоти на наважку в залежності від зольності проби. Отриманий розчин випаровують, а осад розчиняють у 15–20 см³ хлористоводневої кислоти (як правило 3,7 %-й), переносять у мірну колбу об'ємом 25 см³ і доводять до позначки тією ж кислотою.

Проби-стандарти (зокрема Плюмбуму, Кадмію, Феруму, Купруму, Цинку) готують згідно існуючих правил за відповідними ДСТУ. При просто сухому озоленні у мірні колби об'ємом 100 см³ додають по 2,0 см³ 50 %-го розчину магнію нітрату і такий же об'єм робочого розчину металу, щоби концентрація цього металу забезпечувала лінійні межі градуовального графіка (для Плюмбуму 0,1–2,0 мг/см³; Кадмію 0,02–1,0 мг/см³; Купруму 0,05–5 мг/см³; Цинку і Феруму 0,1–10,0 мг/см³). Потім доводять вміст колби до мітки 10 %-м розчином нітратної кислоти. Контрольний (нульовий) градуовальний розчин містить тільки розчини магнію нітрату і нітратної кислоти, його готують таким же чином, як проби, що досліджуються і проби-стандарти, але додають тільки реактиви, без додавання металів (замість їх розчину додається відповідний об'єм дистильованої води).

У разі використання попередньої екстракції до градуовальних розчинів додають по 3 краплі 2 %-вого розчину метилового оранжевого (при використанні АПДК), або 0,1 %-вого розчину бромкрезолового зеленого (при використанні ДДТК-Na).

Для побудови калібрувальних графіків допускається використання готових комерційних розчинів металів на основі нітратної або хлористоводневої кислот з масовою часткою не менше 1 % (як правило, 10 і 3,7 %-й розчини, відповідно). Таким же чином готують і контрольні (нульові) стандартні проби.

Готують, як правило, 5 см³ проб-стандартів металів, що досліджуються, послідовним розбавленням основних (найбільш концентрованих) розчинів контрольним (нульовим) розчином. Проби-стандарти за концентрацією досліджуваного металу повинні бути в лінійних межах калібрувального графіка, в які потрапляє досліджувана проба.

Градувальний графік будують наступним чином: на вісі абсцис відкладають концентрацію металу в пробах-стандартах (мг/кг або мг/дм³), а на вісі ординат – відповідні їм значення екстинкції (оптичної густини).

У випадку, коли концентрація металу в пробі, що досліджується, вище верхньої межі діапазону робочої концентрації, то проводиться розбавлення досліджуваної проби контрольним розчином (нульовим). Коефіцієнт розчинення (K_p) повинний бути таким, щоби концентрація металу у розведеному розчині знаходилася приблизно в середині робочого діапазону. Він обчислюється за формулою (при $K_p > 1$):

$$K_p = V_2/V_1$$

де V_1 і V_2 – об'єми (см³) проби, взятої для розведення, та розведеного розчину, відповідно.

При екстракційному концентруванні в склянки об'ємом 25 см³ поміщають досліджувальний розчин у залежності від необхідного ступеня концентрації, об'ємом 5–10 см³, а також такий же об'єм контрольного розчину, яким об'єм склянок доводять до 20 см³. Одночасно в такі ж склянки поміщають по 20 см³ калібрувальних розчинів.

Коефіцієнт концентрування (K_k) обчислюється за формулою:

$$K_k = V_2/V_1$$

де V_1 і V_2 – об'єми (см³) проби, взятої для концентрування, та з концентрованого розчину, відповідно.

Для кількісного визначення досліджуваних металів методом градувального графіка приготувані проби-стандарти вводять в атомно-абсорбційний спектрометр після побудови калібрувального графіка. Всі виміри проводять згідно «Інструкції по експлуатації» конкретного атомно-абсорбційного спектрометра.

Спочатку проводять виміри з контрольним (нульовим) стандартом, потім з пробами-стандартами і будують калібрувальний графік, а вже на останок – з пробами, що досліджуються.

Виміри кожної проби проводять не менше 3-х разів, вираховують середнє арифметичне значення.

Для вимірювання вмісту металів використовують найбільш чутливі лінії спектра поглинання металів. Так, наприклад, для Плюмбуму 288,3 нм або 217 нм у залежності від технічних характеристик спектрометра, для Кадмію – 288,8 нм, для Купруму – 324,8 нм, для Цинку – 213,9 нм, для Феруму – 248,3 нм. Вибір резонансних ліній спектру поглинання обирають за максимальним відношенням сигнал/шум при мінімальному дрейфі нульової лінії і максимальній стабільній чутливості. Точне співвідношення потоків ацетилен/повітря і висоту пальника встановлюють за такими ж критеріями при розпиленні в полум'ї будь-якого градуйованого розчину в робочому діапазоні концентрацій металів, що досліджуються.

Проведення розрахунків:

Масову концентрацію метала проби, що досліджується, обчислюють за формулою:

$$C = \frac{C_r \cdot V \cdot 1000}{m},$$

де C – масова концентрація метала в пробі, яка аналізується, мг/г (або мг/см³);

C_r – концентрація метала в пробі, що аналізується, яка знайдена за калібрувальним графіком, мг/г (або мг/см³);

V – об'єм мінералізату, см³;

m – маса наважки речовини, що досліджується, г (або її об'єм, взятий для мінералізації, см³);

1 000 – коефіцієнт перерахунку концентрації метала з мг/г (або мг/см³) в мг/кг (або мг/дм³).

Сучасні атомно-абсорбційні спектрометри мають комп'ютерні системи розрахунку концентрації металів, що досліджуються, з використанням рекомендованих програм.

Лабораторна робота 18. Визначення вмісту розчинених хімічних елементів у воді методом атомно-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою

Принцип методу. Основа методу – атомну емісію вимірюють методом оптичної спектрометрії. Пробу розпилюють, утворений ае-

розоль транспортують у плазмовий пальник, де відбувається збудження. Характеристичні атомно-емісійні лінії генерує радіочастотна індуктивно-зв'язана плазма. Спектр випромінення розкладається на дифракційній ґратці спектрометра, а інтенсивність ліній реєструють детектори. Сигнали від детекторів контролюють та обробляють комп'ютерною системою. Щоб компенсувати змінний внесок фону, використовують метод коригування.

За використання цього методу можна визначити вміст у природних, стічних та питних водах наступних хімічних елементів: Ag, Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti, V, W, Zn, Zr.

У табл. 2.1 наведені ці хімічні елементи з рекомендованими довжинами хвиль та типовими межами виявлення у разі пневматичного розпилення проби.

Матеріали для дослідження: природна, стічна або питна вода.

Таблиця 2.1 – Рекомендовані довжини хвиль вимірювання емісії хімічних елементів і типові межі їх виявлення

Хімічний елемент	Довжина хвилі, нм	Межа виявлення, мг/дм ³	Хімічний елемент	Довжина хвилі, нм	Межа виявлення, мг/дм ³
Ag	328,068	0,02	Mo,	202,030	0,03
	338,289	0,02		204,589	0,05
Al	308,25	0,1	Na	589,592	0,1
	396,152	0,1		588,995	0,02
	167,080	0,04		330,237	0,02
As	193,696	0,1	Ni	231,64	0,1
	197,197	0,1		P	178,287
	189,042	0,08	213,618		0,1
B	208,959	0,005	214,914		0,1
	249,678	0,006	177,428	0,5	
	247,773	0,01	Pb	220,353	0,2
Ba	233,527	0,004		383,306	0,07
	455,403	0,002	S	182,036	0,5
	493,409	0,003		180,669	0,5
	313,042	0,002			
	234,861	0,005			

Bi	232,061	0,04	Sb	206,833	0,1	
	306,772	0,08		217,581	0,1	
Ca	315,887	0,1	Se	196,026	0,1	
	317,933	0,01		203,985	0,1	
	393,366	0,002	Si	251,611	0,02	
Cd	214,438	0,01		212,412	0,02	
	226,502	0,01		288,158	0,03	
	228,802	0,01	Sn	235,848	0,1	
Co	228,616	0,01		189,980	0,1	
	Cr	205,552	0,01	Sr	407,771	0,005
267,716		0,01	421,552		0,01	
283,563		0,01	460,733		0,1	
284,325		0,01	Ti	334,941	0,005	
Cu	324,754	0,01		336,121	0,01	
	327,396	0,01		337,280	0,01	
	K	769,90		2	368,520	0,01
Mg		279,079	0,03	V	290,882	0,01
		279,553	0,0005		292,4020,	0,01
	Mn	257,610	0,002		310,2300,	0,01
293,308		0,02	311,071		0,01	
Zn	206,191	0,01	W	207,911	0,03	
	213,856	0,005		209,860	0,06	
	Zr				239,709	0,06
				222,589	0,06	
			202,998	0,06		
			Zr	343,823	0,01	
				354,262	0,05	

Устаткування, реактиви, лабораторний посуд і матеріали:
атомно-емісійний спектрометр з індуктивно-зв'язаною плазмою (ICP-AES), керований комп'ютером з корекцією фону, з радіо частотним генератором і системою подачі аргону, з пневматичним розпиленням проби; терези аналітичні 2-го класу точності; рН-метр (іономір); електроплитка; пристрій для фільтрування; вода деіонізована; газ аргон з об'ємною часткою Аргону не менше 99,999 %;

кислота нітратна ($\rho = 1,40 \text{ г/см}^3$); кислота хлористоводнева ($0,2 \text{ моль/дм}^3$); кислота сульфатна ($\rho = 1,84 \text{ г/см}^3$); стандартні розчини хімічних елементів (одно- або багатоелементні; пробірки об'ємом 10 см^3 і штатив для них; колби мірні об'ємом 100 і $1\,000 \text{ см}^3$; склянки хімічні об'ємом 50 см^3 ; флакони поліетиленові або політетрафторетиленові (ПТФЕ) об'ємом 250 або 500 см^3 ; градуювальні піпетки об'ємом $1\text{--}10 \text{ см}^3$; мікрошприци або дозатори автоматичні з регульованим об'ємом від $0,1$ до $1,0 \text{ см}^3$; від $1,0$ до $5,0 \text{ см}^3$; від $1,0$ до $10,0 \text{ см}^3$; мембранні фільтри з діаметром пор $0,45 \text{ мкм}$.

Хід роботи:

Перед початком роботи готують ряд робочих розчинів хімічних елементів і змішаних багатоелементних розчинів із розчину стандартних зразків 1 мг/см^3 ($1\,000 \text{ мг/дм}^3$) з урахуванням можливих спектральних завад, які обумовлені перекриванням спектральних ліній хімічних елементів, а також беруть до уваги хімічну сумісність, можливий гідроліз вихідних сполук. Щоб запобігти таким завадам, до стандартних розчинів зазвичай додають певні реактиви – нітратну, сульфатну або хлористоводневу кислоти, їх суміш «царську горілку» – 5% -і розчини.

Робочі стандартні розчини хімічних елементів готують і зберігають в поліетиленових або політетрафторетиленових флаконах при температурі $4\text{--}8 \text{ }^\circ\text{C}$ до 2-х місяців.

1. Робочий елементний стандартний розчин Бору (10 мг/дм^3). В мірну колбу об'ємом 1 дм^3 додають 10 см^3 стандартного розчину Бору (В) 1 мг/см^3 , 50 см^3 нітратної кислоти ($\rho = 1,40 \text{ г/см}^3$) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

2. Елементний стандартний розчин Барію (10 мг/дм^3). У мірну колбу об'ємом 1 дм^3 додають 10 см^3 стандартного розчину Барію (Ва) 1 мг/см^3 , 50 см^3 нітратної кислоти ($\rho = 1,40 \text{ г/см}^3$) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

3. Елементний стандартний розчин Аргентуму (10 мг/дм^3). У мірну колбу об'ємом 1 дм^3 додають 10 см^3 стандартного розчину Аргентуму (Аг) 1 мг/см^3 , 50 см^3 нітратної кислоти ($\rho = 1,40 \text{ г/см}^3$) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

Примітка: робочі стандартні розчини 1–3, тобто В, Ва, і Аг за значених умов спричиняють утворення осаду, тому їх готувати потрібно в окремих флаконах.

4. Багатоелементний розчин Ca, Mg, K, Na, S і P (10 мг/дм³). У мірну колбу об'ємом 1 дм³ додають по 10 см³ кожного 1 мг/см³ стандартного розчину із вказаних хімічних елементів, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho = 1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

5. Багатоелементний розчин Sn, Ti, As, Se, Sb (10 мг/дм³). У мірну колбу об'ємом 1 дм³ додають по 10 см³ кожного 1 мг/см³ стандартного розчину із вказаних хімічних елементів, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho = 1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

6. Багатоелементний розчин Al, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mn, Mo, Ni, Zn, V, Bi, Sr, Zr, W (10 мг/дм³). У мірну колбу об'ємом 1 дм³ додають по 10 см³ кожного 1 мг/см³ стандартного розчину із вказаних хімічних елементів, 50 см³ нітратної кислоти ($\rho = 1,40$ г/см³) і об'єм доводять до мітки деіонізованою водою.

7. Неробочий розчин з реактивом (азотною кислотою). В поліетиленовий або політетрафторетиленовий флакон вносять 1 см³ нітратної кислоти з $\rho = 1,40$ г/см³ і 100 см³ деіонізованої води.

Перед визначення хімічних елементів пробу води фільтрують крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм відразу після її відбору. Перші від 50 см³ до 100 см³ проби використовують для промивання фільтрувального пристрою.

У подальшому проби води підкислюють 0,5 см³ нітратної кислоти ($\rho = 1,40$ г/см³) на кожні 100 см³ проби (до рН менше 2) під час відбирання проби.

Якщо в процесі підкиснення (при додаванні кислоти, зокрема, нітратної), транспортування або зберігання проб, які аналізуються, утворився осад, то перед аналізуванням його розчиняють, додаючи кислоту та (або) нагріваючи проби на електроплитці.

Початок аналізу пригволеної проби води починають з підключенням атомно-емісійного спектрометра до електромережі, його прогрівання 30 хв, встановлюють робочі параметри і продувають аргоном 30–60 хв. Задають відповідну робочу конфігурацію комп'ютера, налаштовують та проводять калібрування спектрометра згідно «Інструкції по експлуатації» з використанням елементних і багатоелементних робочих стандартних розчинів.

Систему спектрометра перед початком роботи і після кожного контрольного зразка промивають неробочим розчином із реактивом

(див. вище). Цим же розчином промивають ситему приладу до і після кожної проби, яка аналізується.

Через кожні 10 проб аналізують контрольну пробу, яка містить розчиненні контрольні хімічні елементи. Якщо отримані значення вмісту хімічних елементів не перебувають в межах $\pm 5\%$ від очікуваних значень або нижче встановлених меж, то аналіз припиняють до усунення проблеми та проводять перекалібрування спектрометра.

Для перевірки міжелементних та фонових чинників корекції аналізують контрольні зразки перед початком, наприкінці та періодично під час аналізу експериментальних проб. Результати аналізу мають бути в межах двох стандартних відхилень середнього значення. В іншому випадку припиняють аналіз, усувають проблему та перекалібрують спектрометр.

В основу визначення вмісту розчинних хімічних елементів у воді покладено метод стандартних домішок, який полягає у приготуванні стандартних зразків з матрицею проби, яка аналізується, додаванням відомих кількостей стандартного розчину з одним або кількома (з найбільшим вмістом очікуваних хімічних елементів в аналізуємій пробі) елементами. Цей метод компенсує вплив компонентів проби, що посилюють або зменшують сигнал, який реєструється спектрометром.

При проведенні безпосереднього аналізу профільованої проби води (див. вище) беруть дві однакові аліквоти проби об'ємом V_x . До першої аліквоти (позначеної як А) додають відносно малий об'єм (декілька см³) стандартного розчину з вмістом хімічного елемента, який визначається (C_{CT}). Друга аліквота (позначається як В) не містить робочого стандартного розчину.

У подальшому вимірюють аналітичні сигнали від аліквот А і В і корегують їх з урахуванням сигналу від неробочого розчину з реактивом (див. вище).

Проведення розрахунків:

Вміст розчиненого хімічного елемента у воді обчислюють за формулою:

$$C_x = \frac{S_A \cdot V_{CT} \cdot C_{CT}}{(S_A - S_B) \cdot V_X},$$

де C_x – масовий вміст розчинного хімічного елемента в пробі, яка аналізується, мг/дм³;

$C_{СТ}$ – масовий вміст розчинного хімічного елемента в робочому стандартному розчині, мг/дм³;

S_A – величина аналітичного сигналу в розчині А за вирахуванням сигналу неробочої проби;

S_B – величина аналітичного сигналу в розчині В за вирахуванням сигналу неробочої проби;

$V_{СТ}$ – об'єм домішки робочого стандартного розчину, см³;

V_X – об'єм аліквотних частин проби, яка аналізується, см³.

Вибирають $V_{СТ}$ і $C_{СТ}$ такими, щоб S_A був приблизно у два рази більший ніж S_B . Краще, щоб $V_{СТ}$ був менший за V_X та, відповідно, $C_{СТ}$ більший за C_x . Це дозволяє запобігти надлишковому розведенню матриці проби.

Для того, щоб результати аналізу були надійними, необхідно дотримуватися наступних умов:

- 1) аналітичний сигнал має бути лінійним;
- 2) розчинний хімічний компонент стандарту повинен бути такий же, як і в пробі, що аналізується;
- 3) побічні впливи мають бути постійними у всьому робочому діапазоні;
- 4) аналітичний сигнал потрібно корегувати з урахуванням усіх завад.

При визначенні загального вмісту хімічних елементів непрофільтрованих 100 см³ підкисленої 0,5 см³ нітратною кислотою ($\rho = 1,40$ г/см³) проби, яка аналізується, випарюють майже до сухого стану, не допускаючи повного випаровування рідини на дні склянки (це може призвести до зниження результатів).

У разі наявності нерозчинного матеріалу додають трохи деіонізованої води (2–3 см³) і повторюють обробку.

Залишок розчиняють в 1 см³ нітратної кислоти ($\rho = 1,40$ г/см³) та 10–15 см³ деіонізованої води, доводять цією водою до об'єму 100 см³ і розчин аналізують як описано вище.

Деякі хімічні елементи або їх сполуки (наприклад Стибій, Силіцій, Станум, Тітан, алюмінію оксид) лише частково розчиняються за даної процедури і це необхідно враховувати при інтерпретації результатів аналізу.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Бойків Д.П., Іванків О.Л., Кобилянська Л.І. та ін. Приктакум з біологічної хімії за редакцією О.Я. Склярова. – К: Зроров'я, 2002.

ГОСТ 2501 – 814. Мясо и мясные продукты. Методы определения белка.

ГОСТ 26929 – 94. Сырьё и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов.

ГОСТ 30178. Сырьё и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсических элементов.

ДСТУ 3661 – 97 (ГОСТ 12571 – 98). Цукор. Методи визначення сахарози.

ДСТУ ISO 6885:2002. Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення анізидинового числа.

ДСТУ ISO 5555:2003. Жири тваринні і рослинні та олії. Відбирання проб.

ДСТУ EN 12143:2003. Соки фруктові та овочеві. Визначення вмісту розчинних сухих речовин. Рефрактометричний метод.

ДСТУ ISO 661:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Готування випробного зразка.

ДСТУ ISO 6635:2004. Фрукти, овочі та продукти їх переробки. Визначення вмісту нітритів та нітратів спектрометричним методом молекулярної абсорбції.

ДСТУ ISO 11885:2005. Визначення 33 елементів методом атомно-емісійної спектрометрії з індуктивно-зв'язаною плазмою (якість води).

Дубініна А.А., Малюк Л.П., Селютіна Г.А. та ін. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення. – К.: ВД «Професіонал», 2007.

Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. та ін. Біохімія. Практикум. – К.: Либідь, 1995.

Мельничук Д.О., Грищенко В.А., Томчук В.А. та ін. Ветеринарна клінічна біохімія: навч. посібник. – К. : НУБіП України, 2014.

Мельничук Д.О., Томчук В.А., Янчук П.І. та ін. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібн. для підготовки студентів ВНЗ. – К. : НУБіП України, 2015 с.

Мельничук С.Д., Грищенко В.А. Методичні вказівки до занять із дисципліни «Спеціальна біохімія» для підготовки експертів-аналітиків за спеціалізацією «Лабораторна справа» ОС «Магістр». Ч. IV. «Диференційна лабораторна діагностика та методи дослідження порушень метаболізму при системних захворюваннях тварин». – К.: Видавн. центр НУБіП України, 2014.

Мельничук С.Д., Мельничук Д.О., Мельникова Н.М. та ін. Основні методи та прилади лабораторних досліджень. – К.: ВЦ НАУ, 2004.

Мельничук С.Д., Хижняк С.В., Цвіліховський В.І. Методичні вказівки до лабораторних занять з дисципліни «Сучасні методи та прилади біохімічних досліджень» для підготовки експертів-аналітиків за спеціальністю «Лабораторна справа» ОКР «Магістр». – К.: ВЦ НУБіП України, 2012.

Мельничук С.Д., Мельничук Д.О., Калачнюк Л.Г. та ін. Біохімія: практикум: за загальною редакцією академіка НАН України та НААН України Д.О. Мельничука. – К.: ВЦ НУБіП України, 2013.

Мельничук С.Д., Хижняк С.В., Цвіліховський В.І. та ін. Спеціальна біохімія: навч. посібник за ред. С.Д. Мельничука. – К.: НУБіП України, 2014

Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии: под. ред. Ю.Б. Филипповича. – М.: Просвещение, 1982.

EN ISO 3696:1995. Water for analytical laboratory use. – Specification and test methods.

EN ISO 12147:1996. Fruct and vegetable juscts. – Determination of titratable acidity.

АВТОРИ

Мельничук Дмитрій Олексійович, д-р біол. наук, професор, академік НАН України та НААН, професор кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Мельничук Сергій Дмитрович, д-р біол. наук, професор, член-кореспондент НААН.

Войціцький Володимир Михайлович, д-р біол. наук, професор, провідний науковий співробітник Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України

Грищенко Вікторія Анатоліївна, д-р вет. наук, професор кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Калачнюк Лілія Григорівна, д-р біол. наук, професор кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Хижняк Світлана Володимирівна, д-р біол. наук, професор, провідний науковий співробітник Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Цвіліховський Валерій Іванович, канд. біол. наук, доцент кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.