

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені І. І. МЕЧНИКОВА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ ТА ФАРМАЦІЇ

О. В. Устянська, А. М. І. Шкодовська

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ТА КЛАСИФІКАЦІЯ
СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ
БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ**

**Фізико-хімічні методи, які застосовуються
для дослідження біосистем людини
Спектроскопічні методи аналізу**

Частина II

**ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних занять з дисципліни**

ОДЕСА
ОНУ
2022

УДК 573.7:612.603
У832

Автори:

О. В. Устянська, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова;

А. М. І. Шкодовська, аспірант кафедри органічної та фармацевтичної хімії ОНУ імені І. І. Мечникова.

Рецензенти:

О. І. Гріцук, доктор медичних наук, професор кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова;

І. М. Радаєва, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова.

*Рекомендовано вченою радою
факультету хімії та фармації ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 7 від 12.04.2022 р.*

Устянська О. В.

У832 Загальна характеристика та класифікація сучасних методів дослідження біологічних систем. Спектроскопічні методи аналізу. Ч. II [Електронний ресурс] : метод. вказівки / О. В. Устянська, А. М. І. Шкодовська. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 84 с. – 1,7 МБ.

Методичні вказівки для проведення практичних занять з курсу «Сучасні методи дослідження біологічних систем» призначені для вивчення студентами методів дослідження біологічних систем та органів, що необхідні для діагностики різноманітних захворювань людини.

Методичні вказівки для лабораторних занять з дисципліни розроблені до розділу «Загальна характеристика та класифікація сучасних методів дослідження біологічних систем» та теми «Спектроскопічні методи аналізу».

УДК 573.7:612.603

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Лабораторне заняття «Спектроскопічні методи аналізу». Основні завдання роботи.....	6
Заходи безпеки під час виконання практичної роботи.....	6
Частина 1. Основні теоретичні відомості. Характеристика загальних методів наукового дослідження. Характеристика спеціальних методів наукового дослідження.....	10
Класифікація методів вимірювання.....	19
Фотометричні методи досліджень.....	21
Оптичні методи аналізу.....	22
Спектроскопія.....	22
Оптичні методи аналізу речовин. Оптика.....	27
Основні пристрої спектрофотометрів у видимій та ультрафіолетовій областях спектра.....	27
Спектрофотометрія	28
Реєстрація спектрів.....	28
Спектральний аналіз.....	32
Фотометричні методи аналізу.....	39
<i>Фотоколориметрія</i>	40
<i>Фотоелектроколориметри(ФЕК)</i>	40
<i>Спектрофотометрія</i>	41
<i>Схема будови спектрофотометрів у видимій і УФ-областях та основні принципи їх застосування</i>	42
Інфрачервона спектрофотометрія.....	48
Оптичні методи, які базуються на явищі розсіювання, заломлення та поляризації світла.....	49
<i>Спектроскопія комбінаційного розсіювання</i>	49

<i>Релеївське розсіювання та його використання</i>	51
<i>Нефелометричний метод аналізу</i>	52
<i>Турбідиметрія</i>	53
<i>Рефрактометрія</i>	54
<i>Поляриметрія</i>	56
<i>Полум'яна спектрометрія</i>	59
Детектори та реєстрація спектрів у методі полум'яної спектрометрії.....	61
Молекулярний спектральний аналіз.....	61
Основні пристрої спектрофлуориметрів.....	65
Будова та специфіка застосування пристроїв «лабораторія-на-чіпі».....	66
Частина 2. Лабораторна робота «Принцип роботи спектрофотометричного устаткування».....	70
<i>Принцип роботи фотометричного устаткування</i>	71
<i>Умови фотоколориметричних визначень</i>	72
<i>Характеристика фотоелектроколориметра КФК-2</i>	72
<i>Підготовка до роботи на фотоелектроколориметрі КФК-2</i>	75
<i>Порядок роботи на спектрофотометрі СФ-46</i>	76
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ.....	80
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	81

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Сучасні методи дослідження біологічних систем» вивчає методи дослідження біологічних систем та органів, що необхідні для діагностики різноманітних захворювань людини, які спрямовані на збереження, зміцнення й відновлення здоров'я людини, соціальних груп та суспільства в цілому.

Мета викладання дисципліни: формування у майбутніх фахівців фармацевтичної галузі наукового світогляду в області сучасних методів дослідження та діагностики біологічних систем людини, що використовують в схемах діагностики та лікування поширених патологій людини.

Завдання дисципліни:

Ознайомити здобувачів вищої освіти із загальною характеристикою сучасних методів дослідження біологічних систем.

Скласти цілісну уяву про сучасні можливості діагностики поширених захворювань при вирішенні різноманітних задач професійної діяльності фахівців фармації.

Використовувати отримані знання з сучасних методів дослідження біологічних систем у практичній діяльності фахівців фармацевтичної галузі з метою надання пацієнтам консультацій з приводу профілактики захворювань та можливостей діагностики для подальшого їх розвитку.

Зазначений модуль містить розділ «Загальна характеристика та класифікація сучасних методів дослідження біологічних систем», частину «Фізико-хімічні методи, які застосовуються для дослідження біосистем людини», тему «Спектроскопічні методи аналізу» згідно з якими і розроблені методичні вказівки до лабораторних занять з дисципліни «Сучасні методи дослідження біологічних систем» для студентів спеціальності 226 «Фармація. Промислова фармація».

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ

Розділ «Загальна характеристика та класифікація сучасних методів дослідження біологічних систем. Фізико-хімічні методи, які застосовуються для дослідження біосистем людини»

Тема «Спектроскопічні методи аналізу»

Основні завдання роботи

Заходи безпеки під час виконання лабораторної роботи

Хімічні речовини при невмілому і неправильному використанні можуть стати причиною отруєння осіб, які працюють, викликати пожежу, вибух чи хімічний опік.

З метою виключення випадків травматизму при роботах у хімічних лабораторіях необхідно виконувати наступні вимоги:

1. Кожен студент до початку досліду повинен добре ознайомитися з властивостями речовин, з якими прийдеться стикатися і необхідними умовами безпечного проведення роботи з урахуванням можливих побічних реакцій.

2. При роботі у витяжній шафі, з метою більш ефективної дії вентиляції, слід підняти дверцята витяжної шафи на $1/3 - 1/4$ її підйому. Після закінчення роботи необхідно щільно прикрити дверцята шафи.

3. У випадку перерви дії вентиляції всі роботи у витяжних шафах, які пов'язані з виділенням шкідливих газів, парів, треба негайно припинити.

4. Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток. Не робити ніяких дослідів у нечистому посуді. Посуд мити одразу ж після досліду.

5. Не залишати включених нагрівальних приладів, пальників, що горять, відкритих газових і водопровідних кранів.

Запобіжні заходи при роботі з їдкими речовинами

1. При змішуванні концентрованих сірчаної й азотної кислот користатися тільки тонкостінним хімічним чи порцеляновим посудом.

2. Щоб уникнути розбризкування при розведенні концентрованої сірчаної кислоти – приливати кислоту у воду, а не навпаки.

3. При попаданні кислот чи лугів на поверхню шкіри їх необхідно негайно змити сильним струменем води.

4. Їдкі луги дають опіки всіх ступенів. Тому при роботі з зазначеними розчинами необхідно застосовувати міри проти розбризкування і використовувати захисний спецодяг і запобіжні окуляри.

5. Наповнення піпеток концентрованими кислотами, лугами шляхом всмоктування ротом категорично забороняється, для цього потрібно користатися сифонами чи спеціальними піпетками з гумовою грушею.

Заходи безпеки при роботі з горючими і легкозаймистими речовинами

1. При роботі з горючими і легкозаймистими рідинами (сірковуглець, ефір, бензол і т. д.) необхідно виконувати такі правила:

- а) не користуватися відкритим полум'ям для нагрівання;
- б) не тримати ці сполуки на столах у великих кількостях;
- в) переливати у далині від вогню, а при переливанні великих кількостей усі нагрівачі (газові й інші пальники) у приміщенні згасити;
- г) не виливати ці речовини в раковину;
- д) не гріти на відкритому вогні, а тільки на водяній бані.

2. При роботі з масляними банями користатися термометром і не перевищувати температуру займання горючих сполук.

3. Не нахилятися над судиною, у якій що-небудь кипить чи у яку наливається яка-небудь рідина (особливо їдка), тому що бризки можуть потрапити в очі.

4. Пробірку, у якій нагрівається рідина, тримати отвором убік, а не до себе чи до поруч працюючого, тому що рідина внаслідок нагрівання нерідко викидається з пробірки.

5. У випадку займання горючих рідин:
- а) негайно погасити всі пальники, виключити електронагрівальні прилади;
 - б) відставити судини з вогненебезпечними речовинами;
 - в) прикрити полум'я мокрою ковдрою, а при потребі засипати піском;
 - г) виключити вентиляційні установки;
 - д) при необхідності використовувати вуглекислотний вогнегасник;
 - е) терміново повідомити пожежну охорону (тел. 01) і керівництво факультету.

Правила роботи з електричними приладами

1. Перед початком роботи слід перевірити справність електроприладу.
2. Перед включенням прилади повинні бути заземлені, якщо цього вимагають їхні інструкції.
3. Працювати з електронагрівальними приладами, що мають відкриту спіраль, у хімічній лабораторії категорично заборонено.
4. Перед включенням приладу необхідно перевірити справність розетки і цілісність шнурів, особливо від електроплиток.
5. При роботі з приладами, що генерують високу напругу, необхідно ретельно перевірити їх заземлення, а також не торкатися електронесучих вузлів.
6. При роботі з центрифугами центрифужні пробірки попарно врівноважувати на центрифужних вагах і поміщати в гнізда ротора друг напроти друга. При розливі проб гнізда ретельно очистити і висушити.
7. Після закінчення роботи необхідно виключити всі використані в роботі електроприлади [1].

Увага! Після вивчення даної інструкції у спеціальному журналі робиться відповідна відмітка, де кожен студент ставить свій підпис.

Частина 1. Основні теоретичні відомості

Характеристика загальних методів наукового дослідження

Усі методи наукових пізнань поділяються на загальні та спеціальні. Загальні методи використовуються протягом всього дослідження, незалежно від галузі знань і особливостей дослідження (рис. 1).

Загальні методи:

група А – емпіричні методи дослідження;

група Б – методи, які використовуються як на емпіричному, так і на теоретичному рівнях дослідження;

група В – теоретичні методи дослідження.

Емпіричні методи, як правило, застосовуються на етапі збору необхідних даних. Як усі методи збору вони досить прості у виконанні і можуть застосовуватись у будь-яких напрямках.

Спостереження дає змогу дослідникові не вдаватися до суцільного дослідження (обстеження), отримати узагальнюючі дані, які дозволяють правомірно відобразити характеристики всієї сукупності предметів або явищ.

Сукупність поділяється на:

- генеральну;
- вибірку.

При спостереженні науковці використовують відносні та середні показники. Відносні показники можуть бути часткою або питомою вагою цілого, середні величини необхідні для визначення середнього значення варіюючої ознаки всієї сукупності (як генеральної, так і вибіркової). Крім того, цей метод передбачає визначення похибки реєстрації та похибки самої вибірки. За допомогою цих значень похибок науковець може визначити як сам розмір сукупності, так і причини, які обумовили ці похибки.

Порівняння дає змогу встановити подібність і розходження предметів та явищ дійсності, а також встановити загальне у

порівнюваних об'єктів та особливості і властивості, які притаманні кожному з предметів або явищ.



Рис. 1. Структура методів наукового дослідження (пізнання) [2]

Головні вимоги до застосування методу:

1. Порівнювати слід ті явища, між якими може існувати визначена об'єктивна спільність;
2. Порівняння має здійснюватися за найбільш важливими істотними ознаками.

Метод вимірювання є процедурою визначення числового

значення певної величини за допомогою одиниці виміру, тобто еталону.

Експеримент – це метод наукового дослідження, який припускає втручання у природні умови існування предметів і явищ, відтворює визначені сторони предметів і явищ у спеціально створених умовах з метою вивчення їх без супутніх обставин.

Сутність методу абстрагування полягає в уявному відволіканні від несуттєвих властивостей зв'язків та предметів і в одночасному виділенні та фіксуванні однієї чи кількох сторін, що становлять об'єкт дослідження.

Аналіз є методом наукового дослідження шляхом розкладання предмета на складові.

Синтез – це поєднання отриманих під час аналізу частин у ціле:

- **прямий (емпіричний) аналіз і синтез** застосовують на стадії поверхневого знайомства з об'єктом, дає змогу пізнати явище, але недостатній для проникнення в сутність явища;
- **поворотний (елементарно-теоретичний) аналіз і синтез** дає змогу на основі теоретичних суджень (припущення, причинно-наслідкових зв'язків, закономірностей) досягти сутності досліджуваного явища;
- **структурно-генетичний аналіз і синтез** дозволяє за допомогою виділення у складових явищах окремих елементів або ланок визначити всі інші сторони сутності об'єкта. Застосовується там, де користується історією об'єкта дослідження.

Дедукція дозволяє зробити висновок про певний елемент множини на підставі знання загальних властивостей усієї множини.

Індукція йде від часткового до загального, тобто на підставі знання про частину предметів 1 класу, робиться висновок про клас взагалі. При індукції думка рухається від менш загальних положень до більш загальних, таким чином дослідник може, узагальнюючи наявний емпіричний матеріал, зробити припущення про причину дослідних явищ.

Досліджувалися унікальні за характеристикою предмети, явища тощо. Це уподібнення нового одиночного явища іншому відомому і подібному до нього одиночному явищу, а також поширення на нього раніше одержаної інформації. Цей метод можливо використовувати і в економіці.

В правило аргументації входить головне в науковому дослідженні – вміння довести судження і, якщо потрібно, спростувати доводи опонентів.

Аргументація – це суцього логічний процес, сутність якого полягає в обґрунтованості істинності судження (тези, докази) за допомогою інших суджень (аргументація, доводи).

Характеристика спеціальних методів наукового дослідження

В наукових дослідженнях застосовується ряд методів, в тому числі економіко-статистичних.

До цих методів можливо віднести:

- методи групування;
- графічні методи;
- кореляційні методи (парна та багатофакторна кореляція);
- метод компонентного аналізу;
- ряди динаміки;
- методи, які часто виконують (експертні оцінки, сітьові методи, метод індексний-факторний та ін.);
- методи ранжування (кластерний аналіз, метод найменшого квадрату).

Метод **групування** дозволяє велику кількість спостережень звести до досить невеликої кількості груп, в яких згруповані спостереження за більш яскравими та вражаючими ознаками, а далі на підставі аналізу отриманих груп дослідник робить висновки про весь масив одержаної інформації, а також про особливості кожної групи.

Графічний метод частіше виконують не як самостійний метод, а метод, який супроводжує, ілюструє, пояснює інші висновки по іншим

методам.

Кореляційний аналіз дозволяє встановити залежність між ознаками і результуючим показником. Кореляційна величина встановлює зв'язок між середніми величинами.

Багатофакторна кореляція дозволяє встановити зв'язок між багатьма (декількома) ознаками і між результуючим показником, що має загальний або усереднений характер і для свого виявлення потребує масових спостережень, підпадаючих під дію закону великих чисел.

Компонентний аналіз дає змогу встановити зв'язок між досліджуваним показником і групою факторів, в які згруповані показники.

Ряди динаміки дозволяють встановити зв'язок між досліджуваним показником та його розвитком.

Коли неможливо або досить важко одержати кількісні значення показників, а також факторів, які на них впливають, в останні роки застосовується метод експертних оцінок. Цей метод передбачає наявність певної кількості експертів та досить високу їх кваліфікацію. Кількість експертів повинна бути непарною.

Експерти повинні бути оціненими по ряду ознак:

- стажу роботи;
- кваліфікації;
- фаховості;
- наявності наукового звання та ступеню та ін.

При обробці результатів більшу вагу має той експерт, у якого в сукупності цих привабливих ознак більше.

Для проведення дослідження методом **експертної оцінки** необхідно логічним або іншим шляхом (наприклад, методом парної кореляції, відібрати показники, які впливають на результативний). Крім того, обов'язково розробляється **анкета**, за допомогою якої дослідник проводить опитування. Анкета може надавати найбільш впливовому фактору один бал; менш впливовому – 2; самому

невпливовому – найбільшу оцінку. Але можливе побудування анкети навпаки.

Експертне опитування можливо проводити у декілька турів (3-4 тури). Як правило, після опитування, усі показники ранжують, відбирають найбільш значущі і подальше дослідження проводять, опираючись на ці визначені показники, таким чином можливе визначення рангу показника та його питомої ваги відносно дослідження.

Перед побудовою моделі необхідно обґрунтувати фактори, які будуть включатися в модель. Для цього потрібно:

1. Логічним шляхом визначити ті фактори, які в тій чи іншій мірі впливають на показник, що аналізується;
2. Використати експертні або кореляційні методи, які б підтвердили зв'язок кожного із відібраних факторів з аналізованим;
3. Визначення впливу факторів на аналізований. Визначають абсолютний та відносний вплив;
4. Зробити висновки та розробити заходи для покращення аналізованого показника.

Визначити вплив показників-факторів на аналізований можливо:

- методом ланцюгових підстав;
- метод визначення різниці;
- метод ланцюгових індексів;
- метод ланцюгових показників.

Прогнозування

Прогнозування – це дослідження, що базується на всебічному аналізі ретроспективного розвитку та глибокому знанні об'єктивних законів і має на меті наукове обґрунтування можливого стану об'єктів у майбутньому, а також визначення альтернативних шляхів строків та умов досягнення такого стану. Отже, воно є процесом розробки наукового передбачення у формі прогнозу.

Моделювання

Для обґрунтованого визначення майбутніх характеристик

процесу чи явища необхідно знати можливі варіанти його структури та розвитку з урахуванням значної кількості факторів. Основним способом дослідження таких об'єктів є моделювання – дослідження за допомогою умовних зображень об'єктів або їх аналогів (умоглядних чи фізичних), що мають аналогічні істотно важливі характеристики. Цей спосіб ще називається процесом постановки модельного експерименту.

Модель замінює неіснуючий об'єкт або такий об'єкт дослідження, який неможливо чи недоцільно залучати до експерименту та фактично є інформаційним зображенням об'єкта. Вона обов'язково має містити ключові риси об'єкта, відповідати його структурі, відображати системні зв'язки. У ряді випадків лише модель дає змогу перевірити правильність гіпотези, пов'язуючи інформаційне зображення сучасного і майбутнього станів.

Моделювання є однією з базових категорій теорії пізнання. В економіці застосовуються економіко-математичні моделі, тобто системи формалізованих співвідношень, які описують основні взаємозв'язки елементів економічної системи будь-якого рівня – підприємства, регіону, господарського комплексу держави, міждержавного економічного союзу тощо [2].

Отже, **метод дослідження** – це спосіб отримання цільової інформації, заснований на якісному або кількісному зв'язку властивостей біосистеми з вимірювальними параметрами, що характеризують ці властивості. Для реалізації методу дослідження необхідне виконання наступних умов:

- кількісний або якісний опис зв'язку властивостей біосистеми (медико-біологічних показників);
- алгоритм проведення вимірювань;
- наявність технічних засобів проведення дослідження;
- наявність алгоритму й засобів обробки отриманої інформації [3].

В залежності від конкретного методу дослідження деякі з

перерахованих умов можуть займати основне значення, а деякі – зовсім можуть бути відсутні. Більшість методів діагностики й досліджень засновані на застосуванні фізичних принципів й ідей.

Реалізація методу дослідження являє собою біотехнічну систему (апарат) – сукупність біологічних і технічних елементів, що виконують єдину цільову функцію визначення медико-біологічних параметрів.

Існує кілька класифікацій методів досліджень: за видом живого організму, за типом функціональних систем або органів, за видом захворювання, за типом діагностичних апаратів. Прийнято класифікацію, засновану на розходженні способів одержання інформації про біооб'єкт, що якнайбільш повно відбиває специфіку медичної спрямованості й можливих технічних рішень.

Методи **фізіологічних** досліджень засновані на проявах і властивостях життєдіяльності біологічних систем. До них відносять дослідження: **механічних проявів** (механокардіографія, сфігмографія, аускультация й т. д.); **електропровідності біоструктур** (реографія, електропунктурна діагностика й т. д.); **електричної й магнітної активності організмів** (електрографія, магнітографія й т. д.); **оптичних властивостей** (оптична плетизмографія, медична фотографія, діафаногія й т. д.); **процесів теплопродукції й теплообміну** (термометрія, біокалориметрія й т. д.).

Активні методи досліджень припускають **попередній зовнішній вплив на біологічну систему з метою прояву її властивостей**. До цієї групи відносять **методи, засновані на впливі зовнішніх фізичних полів** (рентгенівська й гамма-інтроскопія, ультразвукова ехографія, ядерна магніторезонансна томографія й т. д.), **застосуванні фармакологічних препаратів** (ангіографія, радіоізотопні методи й т. д.), а також **функціональні методи** (психофізичні тести, комплексна оцінка стану організму й т. д.).

Аналітичні методи досліджень припускають обчислення кількісних параметрів, що характеризують біосистему, концентрацій компонентів, у тому числі й на основі біологічних проб. До цих методів

належать всі види *лабораторних медичних досліджень* й *аналізів* (седиментація, поляриметрія, віскозиметрія й т. д.). Деякі реальні методи досліджень містять ознаки декількох груп класифікації й можуть бути віднесені до однієї з їх по перевазі тієї або іншої ознаки [3].

Класифікація методів вимірювання

Більшість вимірювань у медицині є визначенням фізичних або фізико-хімічних величин. Тому різні медико-біологічні вимірювання можуть бути класифіковані за належністю до відповідного розділу фізики.

Механічні вимірювання: антропологічні параметри тіла; переміщення, швидкість і прискорення частин тіла; акустичні вимірювання; тиск крові, біорідин в організмі; вимірювання вібрацій і шуму й т. д.

Теплофізичні вимірювання: температура органів, частин тіла й навколишнього середовища; калориметричні вимірювання; дослідження теплопровідності й теплообміну біологічних об'єктів і т. д.

Електричні й магнітні вимірювання: дослідження електричних біопотенціалів; вимірювання біомагнітних полів; реєстрація випромінювання електромагнітних полів біосистемами; вимірювання імпедансу біосередовищ і т. д.

Оптичні вимірювання: колориметричні вимірювання; спектральні дослідження; фотометрія; поляриметрія й т. д.

Атомні і ядерні вимірювання: дозиметрія; вимірювання інтенсивності іонізуючих випромінювань біосередовищ; електронна парамагнітна резонансна та ядерна магнітна резонансна спектроскопія і т. д.

Фізико-хімічні виміри: визначення компонентного складу біосередовищ; дослідження кількісної сполуки вдихаємого і видихаємого повітря; рН крові й інших біологічних рідин й т. д.

За ступенем взаємодії засобу вимірювання з об'єктом розрізняють контактні (електрометрія, ультразвукова ехолокація й т. д.) і безконтактні (тепlobачення, ємнісна й оптична плетизмографії й т. д.) вимірювання.

За впливом на цілісність досліджуваного об'єкта методи вимірювань бувають руйнуючими (прямі методи визначення тиску крові) і неруйнуючими (аускультация, баллістокардіографія й т. д.).

За способом отримання результату розрізняють прямі, непрямі і спільні вимірювання.

Прямими називають вимірювання, при яких шукане значення величини знаходять безпосередньо з досвідчених даних (вимір температури, тиску й т. д.).

Непрямими називають вимірювання, при яких шукане значення біологічного параметра знаходять на підставі відомої залежності між цією величиною й величинами, обумовленими прямими вимірами (рентгенівська, ультразвукова томографії, вимірювання площі, об'єму, потужності й т. д.).

Спільними називають вироблені одночасно вимірювання двох або декількох величин для знаходження залежності між ними (тиск у судинах і швидкість кровотоку, швидкість ультразвуку в біосередовищі і її щільність і т. д.) [3].

За способом порівняння з мірою (міра – це засіб вимірювання, що забезпечує відтворення і зберігання одиниці вимірювання) виділяють наступні методи вимірів:

- метод протиставлення, при якому вимірювана величина і величина, відтворена мірою, одночасно впливають на пристрій порівняння (за принципом «більше - менше»);
- диференціальний метод, у якому прилад показує різницю між вимірюваною величиною й відомою величиною, відтвореною мірою;
- нульовий метод – метод порівняння вимірюваної величини з мірою, при якому результуючий ефект впливу величини на індикатор рівноваги доводить до нуля (використовується набір мір);
- метод заміщення, у якому вимірювана величина заміщається відомою величиною, відтвореною мірою;
- метод збігів, при якому різниця між вимірюваною величиною й величиною, відтвореною мірою, вимірюють, використовуючи збіг оцінок шкал або періодичних сигналів.

Залежно від характеру зміни вимірюваної величини в часі

розрізняють статичні й динамічні виміри.

Наведена класифікація допомагає точніше визначити інженерні завдання, що виникають у процесі проведення медико-біологічних досліджень. До таких завдань можна віднести вибір пристрою знімання, вимірювальних апаратів, пристроїв подання кінцевої інформації, а також їх метрологічних характеристик [3].

Фотометричні методи досліджень

Фотометрія – розділ фізичної оптики й вимірювальної техніки, присвячений методам дослідження енергетичних характеристик оптичного випромінювання в процесі його випускнення, поширення в різних середовищах і взаємодії з тілами.

Фотометрію проводять у діапазонах інфрачервоного (довжини хвиль – $10^{-3} \dots 7 \cdot 10^{-7}$ м), видимого ($7 \cdot 10^{-7} \dots 4 \cdot 10^{-7}$ м) и ультрафіолетового ($4 \cdot 10^{-7} \dots 10^{-8}$ м) оптичних випромінювань.

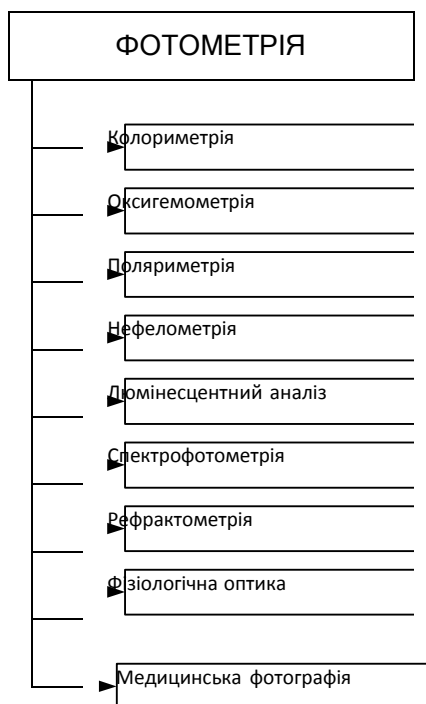


Рис. 2. Структура фотометричних методів медико-біологічних досліджень [3]

При поширенні електромагнітного випромінювання оптичного

діапазону в біологічному середовищі спостерігаються ряд основних ефектів: поглинання й розсіювання випромінювання атомами й молекулами середовища, розсіювання на частках неоднорідностей середовища, деполяризація випромінювання. Реєструючи дані взаємодії оптичного випромінювання із середовищем, можна визначити кількісні параметри, пов'язані з медико-біологічними характеристиками досліджуваного об'єкта.

Специфічним елементом фотометра є приймач оптичного випромінювання. Розрізняють теплові, фотоелектричні й фотохімічні приймачі. У фотоелектронній апаратурі в основному знайшли застосування перші два типи. Теплові приймачі перетворюють енергію випромінювання в теплоту, пропорційно якій виробляють ЕДС (термоелементи, піроп'єзоелементи) або змінюють свої параметри (болметри – електричний опір, оптико-акустичні перетворювачі – розміри чутливої мембрани). Фотоелектричні приймачі засновані на явищах внутрішнього й зовнішнього фотоефектів (фоторезистори, фотодіоди й фототранзистори, фотоелектронні помножувачі, прилади із зарядовим зв'язком). Теплові приймачі володіють значною широкополосністю й невеликою чутливістю.

Перевага фотоелектричних приймачів – у їхній чутливості, однак вона досяжна лише у вузьких частотних інтервалах. Для вимірювання фотометричних величин застосовують прилади – фотометри [3].

Оптичні методи аналізу – це спектроскопія, а також спектрофотометрія в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях, спектрофлуометрія, полум'яна спектрометрія, нефелометрія, турбометрія, рефрактометрія, поляриметрія і спектроскопія комбінованого розсіювання [2].

Спектроскопія – розділ фізики, присвячений вивченню спектрів електромагнітного випромінювання. Методами спектроскопії досліджують рівні енергії атомів, молекул і утворених з них макроскопічних систем, а також квантові переходи між рівнями енергії,

що дає важливу інформацію про будову і властивості речовини. Найважливіші області застосування – спектральний аналіз та інші галузі використання.

Спектроскопія ділиться на області по різних ознаках. По діапазонах довжин (або частот) електромагнітних хвиль в спектроскопії виділяють: радіоспектроскопію, що охоплює область радіохвиль; субміліметрову спектроскопію; мікрохвильову спектроскопію; оптичну спектроскопію, що вивчає спектри оптичні, і інфрачервону спектроскопію, що містить, спектроскопію видимого випромінювання і ультрафіолетову спектроскопію; рентгенівську спектроскопію і гамма-спектроскопію. Специфіка кожної з цих областей спектроскопії заснована на особливостях електромагнітних хвиль відповідного діапазону і методах отримання і дослідження спектрів. У радіоспектроскопії застосовуються радіотехнічні методи; у рентгенівській – рентгенівські методи отримання і дослідження спектрів; у гамма-спектроскопії – експериментальні методи ядерної фізики; у оптичній спектроскопії – оптичні методи у поєднанні з методами сучасної радіоелектроніки. Часто під терміном «спектроскопія» розуміють лише оптичну спектроскопію.

Відповідно до відмінності конкретних експериментальних методів виділяють **спеціальні розділи спектроскопії** – інтерференційну, засновану на застосуванні інтерферометрів, вакуумну спектроскопію, лазерну спектроскопію. Одним з розділів ультрафіолетової і рентгенівської спектроскопії є фотоелектронна спектроскопія.

По типах досліджуваних об'єктів спектроскопію розділяють на атомну (вивчає атомні спектри), молекулярну (досліджує молекулярні спектри), і спектроскопію речовини в конденсованому стані (зокрема, спектроскопію кристалів). Відповідно до **видів руху в молекулі** (електронний, коливальний, обертальний) **молекулярну спектроскопію** ділять на *електронну, коливальну і обертальну*. Аналогічно розрізняють *електронну і коливальну спектроскопію*

кристалів. У спектроскопії атомів, молекул і кристалів застосовують методи оптичної, рентгенівської і радіо-спектроскопії.

Особливу область досліджень представляє **ядерна спектроскопія**, в яку включають **гамма-, альфа- і бета-спектроскопію**; з них тільки **гамма-спектроскопія** відноситься до **спектроскопії електромагнітного випромінювання** [4]. Зведені дані про оптичні та спеціальні електрокопичні методи наведено в табл. 1 [5].

Таблиця 1

Зведена таблиця оптичних та альтернативних їм методів [5]

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 спектру	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 збудженими 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 зміною поляризованості 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-спектрометрія	Реєстрація магнітних моментів ядер атомів з непарним числом протонів	Визначення структури речовин, реакційної здатності атомів і молекул, механізмів хімічних реакцій
ЕПР-спектрометрія	Реєстрація магнітних моментів неспарених орбітальних електронів атомів	Визначення речовин, які містять перехідні метали та їх комплекси, вільних радикалів, сполук у збудженому стані
Мас-спектрометрія	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 газо-рідинною хроматографією
Мессбауерівська спектроскопія	Реєстрація поглинання γ -випромінювання	Структурно-аналітичний аналіз речовин; визначення ступеня окиснення атомів, їх валентних станів; встановлення розподілення електронної густини, характеру хімічних зв'язків

Фотоелектронна спектроскопія (власне фотоелектронна, рентгеноелектронна і ожеелектронна спектрометрія)	Фотоелект (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

Типи та принципи спектроскопічних методів, а також області їх застосування розглянемо більш детально.

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 [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 [5].

Спектрофотометрія – оптичний метод дослідження газоподібних, рідких і твердих речовин, заснований на визначенні інтенсивності поглинання світла речовиною (абсорбційна спектрофотометрія) або інтенсивності випромінювання їм світла (емісійна спектрофотометрія) залежно від довжини хвилі.

Отримані при цьому (за допомогою спеціальних приладів – **спектрофотометрів**) абсорбційні та емісійні спектри є характерними для кожного даної речовини.

Розрізняють **спектрофотометрію в ультрафіолетовій (УФ), видимій та інфрачервоній (ІЧ) областях спектру**.

Спектрофотометрія широко застосовується в клінічних, біохімічних, санітарно-гігієнічних, судово-медичних і фармацевтичних лабораторіях для якісного та кількісного аналізу різного роду об'єктів біологічного походження (сироватка крові, спинномозкова рідина, сеча та ін), лікарських засобів, продуктів харчування і т. д.

Спектрофотометрія в ультрафіолетовій області є одним з основних загальних методів аналізу лікарських речовин та їх препаратів, включених в будь-яку сучасну фармакопею.

Для ідентифікації невідомої речовини в органічній аналітичній хімії спектр досліджуваного речовини зазвичай порівнюють з отриманим при тих же умовах спектром речовини, будова якого відома.

Встановлення автентичності речовини по ультрафіолетовому спектру є цінним доповненням до хімічних і фізико-хімічних методів фармакопейного аналізу.

Метод спектрофотометрії в ультрафіолетовій області успішно використовується як для ідентифікації та кількісного визначення, так і у випробуваннях на чистоту [6].

Реєстрація спектрів

Для проведення якісного і кількісного аналізу речовин реєструється випромінювання джерела світла, що розкладається в

спектр після взаємодії з речовиною. При кількісному аналізі необхідно також визначати 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 викликають на фотографічній пластинці після її проявлення. При фотоелектричному методі реєстрації спектра одночасно визначається склад і інтенсивність спектральних ліній [5].

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, у тому числі 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. 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 [5].

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.

Фотографічна реєстрація спектрів і фотометрія. В основі цього методу лежить хімічна дія світла на галогеніді 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 місця 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*).

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

Сучасний тип вакуумних фотоелектричних приймачів – фотоелектронні помножувачі (ФЕП). На відміну від фотоелементів, які мають два електроди (негативно заряджений fotocутливий шар і позитивно заряджений електрод), ФЕП містять багатоелектродну систему. У цьому пристрої сполучені вакуумний фотоелемент і

підсилювач, дія якого заснована на вторинній електронній емісії [5].

Спектральний аналіз

Спектральний аналіз – це фізичний метод кількісного і якісного складу речовини, оснований на отриманні і дослідженні його спектрів.

Залежно від структури речовини і його хімічного складу, а також від умов збудження, атоми або молекули речовини випромінюють (поглинають) характерні молекулярні, атомні або рентгенівські спектри, за якими можна судити про елементарний склад досліджуваної проби.

В таблиці 2 [6] показані основні області електромагнітного випромінювання, які використовуються у спектральному аналізі, діапазони величин енергії фотонів і назва відповідних фізичних процесів. Спектральний діапазон не має чітких меж і тому поділ спектра на діапазони вважається умовним [6].

Таблиця 2

Області енергій електромагнітного випромінювання, що відповідають певним методам аналізу та процеси, що лежать у їх основі

Область (метод)	Довжина хвилі	Процес
Гамма-випромінювання (ядерно-фізичні)	10^{-4} – 10^{-1} нм	Ядерні реакції
Рентгенівська	10^{-1} – 10^1 нм	Зміна стану внутрішніх електронів
Оптична УФ	200–400 нм	Зміна стану валентних електронів
Видима	400–750 нм	
Інфрачервона (ІЧ)	10^3 – 10^6 нм	Зміна коливальних станів
Мікрохвильова	10^{-3} – 10^{-1} м	Зміна обертальних станів
Радіочастотна (ЯМР, ЕПР)	10^{-1} –101 м	Зміна спінів ядер і електронів

Спектроскопічні методи підрозділяються на атомні та молекулярні.

В методах атомної спектроскопії виникають вузькі лінійчаті спектри, а в методах молекулярної – широкі слабо структуровані спектри. Це визначає можливість їх застосування в хімічному аналізі та вимоги до вимірювальної апаратури.

Емісійний спектральний аналіз проводять за спектрами випускання збуджених атомів, іонів і молекул. Абсорбційний спектральний аналіз здійснюють за спектрами поглинання аналізованих об'єктів.

Атомний спектральний аналіз. В атомному спектральному аналізі (АСА) визначають елементний склад зразка за атомними (іонними) спектрами випускання і поглинання.

Розрізняють два основних варіанти атомного спектрального аналізу – атомно-емісійний і атомно-абсорбційний.

Атомно-емісійний спектральний аналіз (АЕСА)

Атомно-емісійний спектральний аналіз (АЕСА) заснований на залежності інтенсивності спектральної лінії випускання (емісії) певного елемента від його концентрації в аналізованому об'єкті. В основі оптичної спектроскопії лежать відкриття Ньютона (розклав біле світло в райдужну смужку – спектр) і роботи німецького фізика Фраунгофера (виявив у спектрі Сонця вузькі темні лінії та встановив, що вони викликані поглинанням світла у верхніх шарах сонячної атмосфери, а також уперше точно виміряв довжину світлових хвиль). Атомно-емісійна спектроскопія або атомно-емісійний спектральний аналіз – це спектральний метод елементного аналізу, що досліджує спектри випромінювання вільних атомів та іонів у газовій фазі в області довжин хвиль 150-800 нм під впливом джерела збудження. Збудження атомів відбувається при переході одного або кількох електронів на більш віддалений енергетичний рівень. У нормальному стані (не збудженому) атом має найменшу енергію E_0 . У збудженому (нестійкому) стані атом може перебувати дуже короткий час ($\approx 10^{-7}$ – 10^{-8} с) і завжди прагне повернутися в нормальний не збуджений стан. При цьому атом віддає надлишкову енергію у вигляді випромінювання

фотона, де E_2 , E_1 – енергія верхнього і нижнього рівня; ν – частота; c – швидкість світла; λ – довжина хвилі випромінювання; h – постійна Планка. Для переходу атома на більш високий енергетичний рівень йому необхідно передати енергію, яка називається потенціалом збудження. Найменша енергія, необхідна для відриву від не збудженого атома його зовнішнього валентного електрона, називається потенціалом іонізації (енергія збудження).

Застосування якісного аналізу атомно-емісійного методу дозволяє реєструвати велику кількість ліній випромінювання і є багатоелементним методом аналізу якості лікарської сировини за наявністю в ній важких металів (Zn, K, Mg, Mn, Fe і т. д.), що мають певну фармакологічну дію та особливо небезпечних елементів, таких як As, F, Hg. Кількісний аналіз методу використовує будь-які способи градування, стандарти, метод добавок.

Атомно-абсорбційний аналіз (ААА) заснований на залежності аналітичного сигналу від концентрації речовини (закон Бугера-Ламберта-Бера). Метод досліджує спектри поглинання речовини в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях спектра [6].

Спектр поглинання виникає у тому випадку, коли світло від розжареного твердого або рідкого тіла проходить через холодніший газ. При цьому лінії поглинання точно відповідають тим лініям, які випускає сам газ при тій же температурі (закон Кірхгофа).

На рис. 3 показана схема виникнення спектрів поглинання.

У першому випадку (рис. 3а) газ з температурою T_1 випускає світло, яке, пройшовши через щілину і призму, розкладається в спектр у вигляді трьох яскравих ліній на чорному фоні (лінійчатий спектр випускання). У другому випадку (рис. 3б) світло, що випускається твердим тілом з температурою $T_2 > T_1$ утворює на екрані яскравий суцільний спектр, на якому видно чорні лінії поглинання, обумовлені тим, що частина світу поглинулася холоднішим газом.

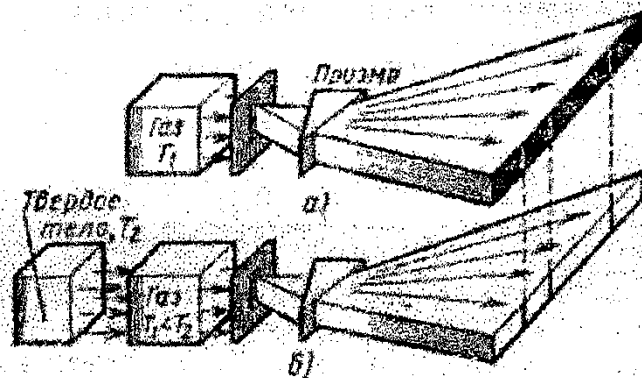


Рис. 3. Схема виникнення спектрів поглинання [4]

Отже, основа спектрального аналізу – спектроскопія атомів і молекул, його класифікують за метою аналізу і типами спектрів. **Атомний спектральний аналіз (АСА)** визначає елементний склад зразка за атомними (іонними) спектрами випускання і поглинання; **молекулярний спектральний аналіз (МСА)** – молекулярний склад речовини за молекулярними спектрами поглинання, люмінесценції і комбінаційного розсіяння світла. **Емісійний спектральний аналіз** проводять за спектрами випускання атомів, іонів і молекул, збудженим різними джерелами електромагнітного випромінювання в діапазоні від γ -випромінювання до мікрохвильового. **Спектральний аналіз абсорбції** здійснюють по спектрах поглинання аналізованих об'єктів (атомів, молекул, іонів речовини).

Атомний спектральний аналіз (АСА) ділиться на якісний і кількісний.

Якісний АСА здійснюють зіставленням отриманого спектру досліджуваної речовини із спектральними лініями елементів, приведеними в спеціальних таблицях і атласах. В основі **кількісного АСА** лежить співвідношення, що зв'язує концентрацію (c) визначуваного елементу з відношенням інтенсивностей ліній визначуваної домішки (I_1) і лінії порівняння (I_2): $I_1 I_2 = aC^b$ (постійні a і b визначаються дослідним шляхом) або $\lg(I_1/I_2) = b\lg C + \lg a$.

Для збудження спектру в АСА використовують різні джерела світла і відповідно різні способи введення в них зразків. Вибір

джерела залежить від конкретних умов аналізу об'єкту. Тип джерела і спосіб введення в нього проби складають головний зміст власних методик АСА. Першим штучним джерелом світла в АСА було полум'я газового пальника. Температура полум'я горючих газів невисока (від 2100 К для суміші водень-повітря до 4500 К для суміші кисень-ціан). За допомогою полум'яної фотометрії визначають близько 70 елементів за їх аналітичними лініями, а також за молекулярними смугами сполук, що утворюються в полум'ї.

У емісійному АСА широко використовуються *електричні джерела* світла. В *електричній дузі постійного струму* між спеціально очищеними вугільними електродами різної форми, в канали яких поміщають досліджувану речовину в подрібненому стані, можна проводити одночасно визначення десятків елементів. Вона забезпечує відносно високу температуру нагріву електродів і сприятливі умови збудження атомів проби в дуговій плазмі, проте точність цього методу невисока із-за нестабільності розряду. Підвищуючи напругу до 300-400 В або переходячи до високовольтової дуги (3-4 кВ), можна збільшити точність аналізу.

Стабільніші умови створює *дуга змінного струму*. У сучасних генераторах дуги змінного струму можна отримувати різні режими збудження (низьковольтну дугу, іскру, ВЧ-іскру, дугу змінного струму, імпульсний розряд тощо). Такі джерела світла з різними режимами використовують при визначенні металів і важкозбудливих елементів (вуглець, галогени, гази, що містяться в металах тощо).

У емісійному АСА перспективне застосування *стабілізованих форм* електричного розряду, що отримуються в плазмотронах різних конструкцій, ВЧ індукційного розряду, СВЧ розряду, що створюється магнетронними генераторами, ВЧ факельного розряду.

За допомогою різних прийомів введення аналізованих речовин в плазму цих розрядів (продування порошків, розпилювання розчинів і т. д.) значно підвищена відносна точність аналізу (до 0,5-3 %), у тому числі і компонентів складних проб, зміст яких складає десятки %.

У деяких важливих випадках аналізу чистих речовин застосування цих типів розряду знижує межі визначення домішок на 1-2 порядки (до 10^{-5} - 10^{-6} %).

Для аналізу чистих речовин, радіоактивних матеріалів, сумішей газів, ізотопного аналізу, спектрально-ізотопного визначення газів в металах і твердих тілах тощо вельми перспективно опинилося використання розряду в порожнистому катоді і безелектродних ВЧ і СВЧ розрядів. Як джерела збудження застосовуються також лазери (лазерна спектроскопія).

Спектральний аналіз (ААА) атомної абсорбції і атомно-флуоресцентний спектральний аналіз (АФА)

У цих методах пробу також випаровують в атомізаторі (у полум'ї, графітовій трубці, плазмі стабілізованого ВЧ і СВЧ розряду), В ААА світловід джерела дискретного випромінювання, проходячи через пари речовини, ослабляється, і за ступенем ослаблення інтенсивностей ліній визначуваного елементу судять про концентрацію його в пробі. ААА проводять на спеціальних спектрофотометрах.

Методика його проведення в порівнянні з іншими методами значно простіша, для нього характерна висока точність визначення не тільки малих, але і великих концентрацій елементів в пробах.

У АФА атомарні пари проби опромінюють резонансним для досліджуваного елементу випромінюванням і реєструють його флуоресценцію. Для деяких елементів (*Zn, Cd, Hg* та ін.) відносні межі виявлення вельми малі (10^{-5} - 10^{-6} %).

АСА дозволяє проводити вимірювання ізотопного складу завдяки ізотопному зрушенню спектральних ліній (для більшості елементів потрібні прилади високої роздільної здатності, наприклад, еталон Фабрі-Перо). Ізотопний спектральний аналіз можна також проводити за електронно-коливальними спектрами молекул, визначаючи ізотопні зрушення смуг, що сягають в деяких випадках значної величини.

Експресні методи АСА широко застосовуються для дослідження

сировини і матеріалів в промисловості, сільському господарстві, геології і багатьох інших областях науки, техніки, народного господарства. Значну роль АСА відіграє в атомній техніці, виробництві чистих матеріалів ПП, надпровідників тощо. Сукупність методів молекулярно-абсорбційного спектрального аналізу, заснованих на вибіркового поглинанні молекулами речовини електромагнітного випромінювання в ультрафіолетовій (УФ), видимій та інфрачервоній (ІЧ) областях спектра ще називають фотометричним аналізом. Методи, які пов'язані з вимірюванням інтенсивності поглинання розчину, підрозділяються на:

- вимірювання світлового потоку, що пройшов через прозорий розчин (фотометричні – фотоколориметрія і спектрофотометрія);
- вимірювання світлового потоку при світлорозсіянні зв'язаними частками мутного середовища (нефелометрія і турбідиметрія та ін.).

До спектрального аналізу відноситься також *аналіз елементного складу речовини за рентгенівськими спектрами (рентгенівський спектральний аналіз), за спектри оже- і фотоелектронів (оже-спектроскопія, фотоелектронна спектроскопія), за спектрами фотопровідності тощо* [4, 7, 8].

Фотометричні методи аналізу засновані на перетворенні аналізованої речовини на забарвлену розчинну сполуку з подальшим вимірюванням світлопоглинання розчину [6]. Фотометричні методи кількісного аналізу засновані на вимірюванні світлопоглинання речовиною при певній довжині хвилі. Якщо вимірюваний компонент не забарвлений, його перетворюють у забарвлену сполуку за допомогою хімічної реакції. Для визначення неорганічних компонентів найчастіше використовують реакції утворення кольорових комплексних сполук, що мають характерні смуги поглинання у видимій, ультрафіолетовій або інфрачервоній областях

спектра. Час, витрачений на проведення фотометричного аналізу, чутливість методу, його точність і вибірковість залежать від вибору хімічної реакції та оптимальних умов утворення забарвленої сполуки.

Фотометричні методи поділяють на **фотоколориметрію** та **спектрофотометрію**.

Фотоколориметрія це поглинання світла в інтервалі довжин хвиль від ~ 315 до ~ 980 нм. Відчуття кольору людини виникає в результаті впливу на око видимого електромагнітного випромінювання з довжинами хвиль від 380 до 760 нм. Колір обумовлюється забарвленням і властивостями поверхні предмета, оптичними властивостями джерел світла і середовища, властивостями аналізатора.

Приладами для фотоколориметрії служать **фотоелектроколориметри (ФЕК)**, що характеризуються простотою оптичної і електричної схем. Більшість ФЕК має набір з 10-15 світлофільтрів. **Світлофільтри** – це забарвлені стекла, що пропускають промінь світла від лампи лише в певному інтервалі довжин хвиль і практично повністю поглинають промені інших довжин хвиль. Чим вужча область максимального пропускання променів світлофільтром, тим вище його вибірковість до променів даного інтервалу довжин хвиль. Пучок світла від джерела випромінювання (лампа розжарювання, рідко ртутна лампа) проходить через світлофільтр і призму для розділення світлового потоку на два пучки, що направляються через кювети з досліджуваним розчином і розчином порівняння. Щоб врахувати втрати світла на відбиття та розсіяння в кюветі, порівнюють інтенсивність світла, що пройшло через досліджуваний розчин і розчин порівняння (розчинник). При однаковій товщині шару розчину в обох кюветах, втрати на відбиття та розсіяння світла будуть приблизно однакові і зменшення інтенсивності світлового потоку, що пройшов через розчин буде залежати тільки від концентрації речовини. Після світлофільтра паралельні світлові пучки попадають на два приймачі випромінювання

(фотоелементи), підключені за диференціальною схемою до нуля-індикатора (гальванометр, індикаторна лампа). Сила електричного струму, що виникає при дії світлової енергії на фотоелемент, прямо пропорційна інтенсивності освітлення. При диференційному фотометричному аналізі оптична щільність аналізованого розчину вимірюється відносно оптичної щільності (яка повинна бути не менше 0,43) розчину порівняння. Останній містить обумовлений компонент у концентрації, близькій до концентрації цього компонента в аналізованому розчині [6].

Спектрофотометрія – метод дослідження та аналізу речовин, заснований на вимірюванні спектрів поглинання в області електромагнітного випромінювання в УФ, видимій та ІЧ-ділянках спектра [6]. За типом досліджуваних систем спектрофотометрію, звичайно, поділяють на *молекулярну і атомну*. Розрізняють *спектрофотометрію в ІЧ, видимій і УФ областях спектра*. Застосування спектрофотометрії в УФ і видимій областях спектра засноване на поглинанні електромагнітного випромінювання сполуками, що містять хромофорні або ауксохромні групи. Поглинання випромінювання в цих областях пов'язане зі збудженням електронів s-, p- і n- орбіталей основного стану та переходами молекул у збуджений стан. В ІЧ області проявляються переходи між коливальними й обертальними рівнями. Серед частот коливань молекул виділяють характеристичні, які практично постійні за величиною і завжди проявляються в спектрах хімічних сполук, що містять певні функціональні групи. Теорія коливань складних молекул дозволяє розрахунковим шляхом передбачити коливальний спектр сполук, тобто визначити частоти та інтенсивність смуг поглинання.

Для вимірювання спектрів використовують спектральний прилад – **спектрофотометр**, основною частиною якого є: джерело випромінювання, диспергуючий елемент, кювета з досліджуваною речовиною та реєструючий пристрій. У якості джерела випромінювання застосовують дейтерієву лампу (в УФ-області) або

вольфрамову лампу розжарювання (у видимій і близькій ІЧ областях). Диспергуючим елементом приладу є призменний монохроматор або монохроматор з дифракційними решітками. Спектр одержують у графічній або цифровій формах [6].

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

Описані вище пристрої спектрофотометрів (джерела світла, конденсори, щілини, кювети, монохроматори, фотометри, реєстратори) містять більшість приладів (рис. 6).

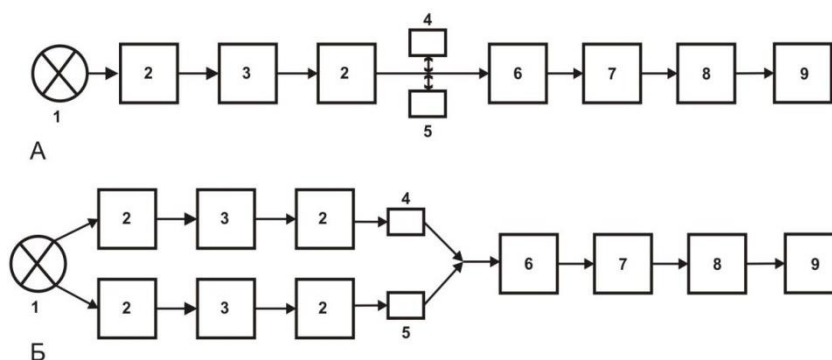


Рис. 6. Блок-схема однопроменевого (А) і двопроменевого (Б) спектрофотометрів [5]

Примітка: 1 – джерело світла; 2 – конденсор; 3 – щілина; 4 – експериментальна кювета; 5 – контрольна кювета; 6 – монохроматор; 7 – приймач світла; 8 – помножувач; 9 – реєструючий пристрій.

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 в останніх [5].

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 (нінгідринова реакція); циклічних амінокислот (тироzinу, триптофану, фенілаланіну) з азотною кислотою – в жовтий колір, а після охолодження – в оранжевий колір (ксантопротеїнова реакція); при додаванні до лужного розчину білка купрум(II) 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 ($K_3[Fe(CN)_6]$) 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 (що 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.

Так, наприклад, пептидний зв'язок) у білках викликає

поглинання світла при 190 нм. **Ароматичні амінокислоти** (триптофан, тирозин і фенілаланін), які є основними структурними компонентами більшості білків, містять хромофори (рис. 7), які поглинають при довжинах хвиль, що більше 220 нм (рис. 8).

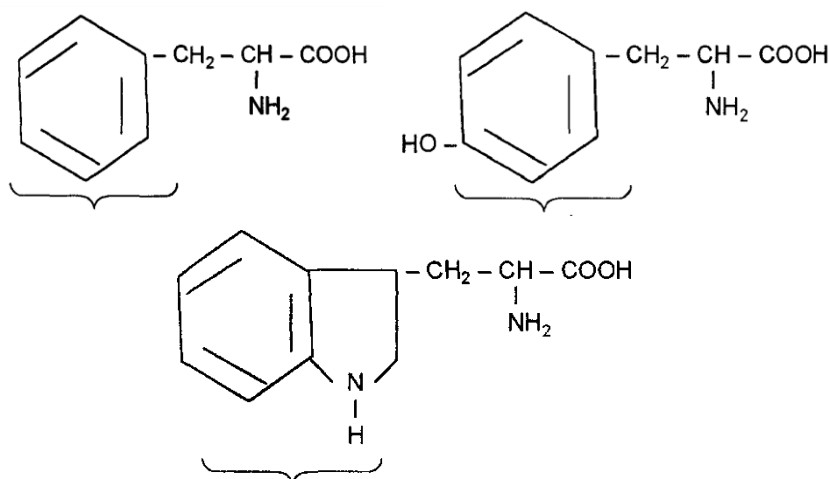


Рис. 7. Хромофорна група фенілаланіну (1), тирозину (2) і триптофану (3) [5]

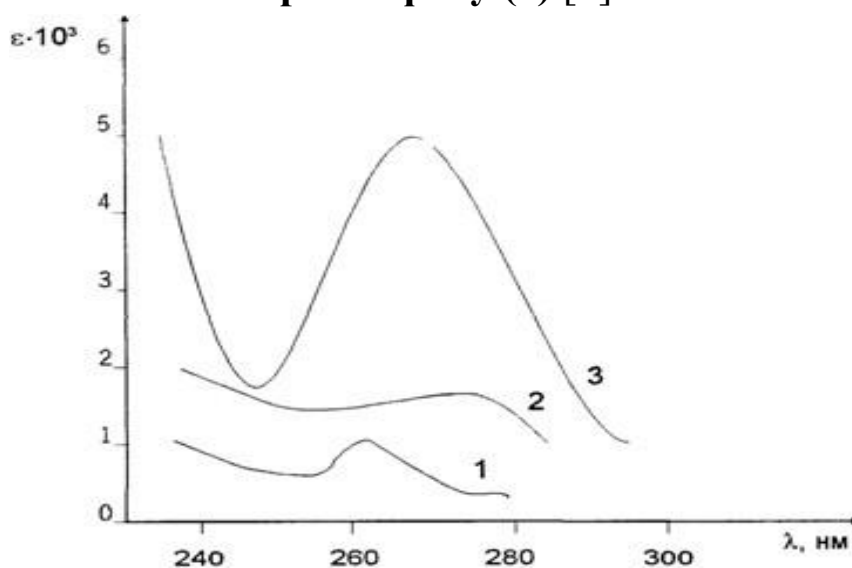


Рис. 8. Спектри поглинання фенілаланіну (1), тирозину (2) і триптофану (3) [5]

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

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

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

не біологічного 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-стандарта від концентрації (c) речовини, що досліджується (рис. 9). У подальшому вимірюють екстинкцію експериментального зразка в тих же самих стандартних умовах і за калібрувальним графіком визначають концентрацію досліджуваної речовини.

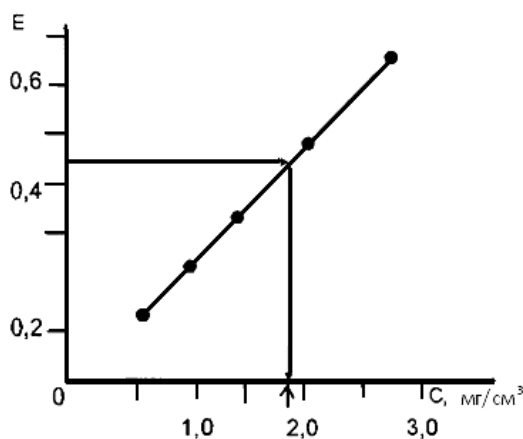


Рис. 9. Калібрувальний графік для визначення концентрації досліджуваної речовини [5]

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 менш 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 нульові осі 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, аби 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. 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).

Суттєвою 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, обробкою, 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 перевершувати 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 званий *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.

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.

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 (раманівської спектроскопії)**.

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.

Спектрофотометри, які використовують для реєстрації ІЧ-спектрів, мають таку ж *будову*, як і спектрофотометри для видимої і УФ-області. **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 молекулах 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* [6].

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 **релеївського розсіювання, нефелометрія, турбіметрія, рефрактометрія і поляриметрія**.

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*** [6].

Спектри комбінаційного розсіювання подібні ІЧ-спектрам, оскільки ті та інші обумовлені коливальними (у деяких випадках і обертальними) переходами в речовині, що досліджується.

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. 10.

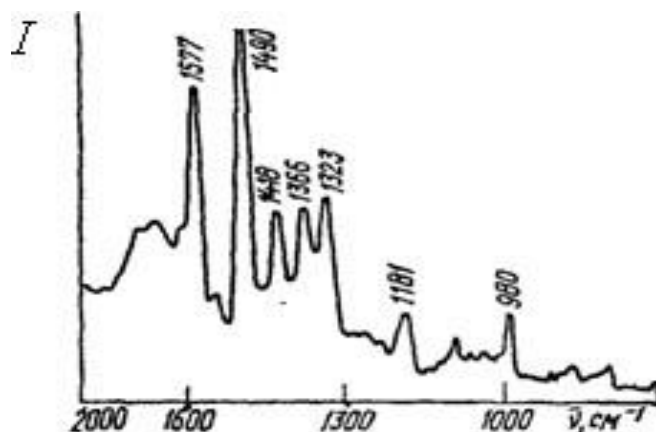


Рис. 10. Спектр комбінаційного розсіювання гуанозину

Примітка: I – інтенсивність; ν – хвильове число [5]

Важливою *перевагою* використання для аналізу **КР-спектрів** є можливість проводити дослідження у видимій і навіть у ближній УФ-області, тоді як при використанні тих ж 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 вибором зручної частоти (довжини хвилі) для збудження, отримуємо КР-спектр в тій же області.

Основний *недолік* **КР-спектрофотометрії** – низька чутливість.

У сучасних КР-спектрометрах як джерело монохроматичного і поляризованого світла використовують *лазери*. 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 [5].

Релеївське розсіювання та його використання

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. Було встановлено, що при опроміненні світлом таких частинок, які знаходяться в розчині, формується електричний диполь, який є джерелом вторинного випромінювання.

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

1) інтенсивність світла, яке пройшло крізь зразок і порівнюють його з інтенсивністю світла, яке падає; різниця між ними дорівнює інтенсивності розсіяного світла (з урахуванням 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 напрямку падаючого світла, джерелом якого є, як правило, монохроматичне випромінювання лазера [5].

Нефелометричний метод аналізу

При проходженні світла крізь суспензію частинок відбувається бічне розсіювання світла, яке падає на кювету, що візуально сприймається як помутніння розчину.

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°) напрямку падаючого світла.

Прилади, які отримали назву **нефелометри**, 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. 11.

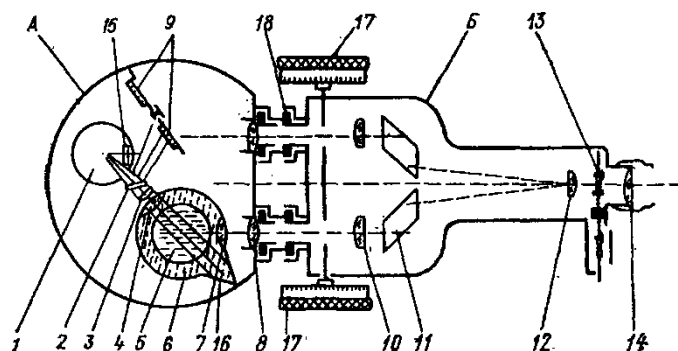


Рис. 11. Оптична схема нефелометра [5]

Примітка: 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

На барабанах діафрагми нанесені дві шкали – світло пропускання

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 осі абсцис відкладають значення концентрації частинок, а по осі ординат – відповідні їм значення оптичної густини). В подальшому вимірюють оптичну густину експериментального зразка, який містить ті ж самі частинки, що і зразки-стандарти, і за калібрувальним графіком згідно зі значеннями цієї величини визначають концентрацію частинок досліджуваної речовини в цьому зразку.

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

Турбідиметрія

Цей метод заснований на вимірюванні ослаблення світлового потоку, який проходить через суспензію, у напрямі, який співпадає з напрямом падаючого світла.

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 суспензії різні білкові 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, що б відтворити однакові за розмірами частинки суспензії, не дати їм можливості коагулювати тощо [5].

Рефрактометрія

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, а також визначення протеїну в сечі, сироватці крові за клінічних досліджень.

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.

Показник заломлення світла середовищ визначається за допомогою приладів, які називаються **рефрактометрами**. Найрозповсюдженішими є рефрактометри типу **Аббе** (рис. 12) і **Пульфриха**. Вимірювання цими приладами показника заломлення світла у видимій області спектра базується на визначенні величини граничного кута заломлення світла.

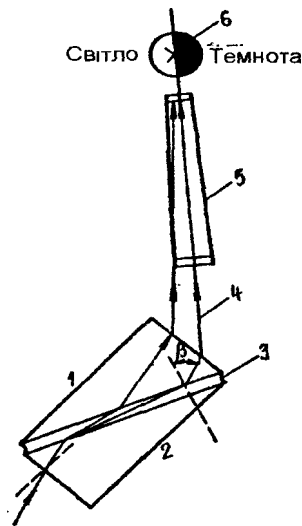


Рис. 12. Схема рефрактометра типу Аббе [5]

Примітка: 1 – вимірювальна призма; 2 – освітлювальна призма; 3 – шар рідини, що містить досліджувану речовину; 5 – зорова трубка; 6 – поле зору

У *рефрактометрі типу Пульфриха* (рис. 13), кут між вхідною (1) і вихідною (2) призмами дорівнює точно 90° . Краї грані вхідної 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 світла.

До рефрактометра типу Пульфриха додаються довідкові таблиці, які дозволяють знаходити показник заломлення світла за величиною кута, який вимірюється.

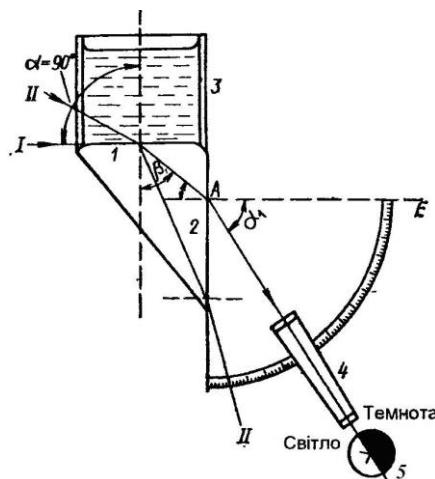


Рис. 13. Схема рефрактометра типу Пульфриха [5]

Примітка: 1 – вхідна вимірювальна призма; 2 – вихідна вимірювальна призма; 3 – кювета; 4 – зорова трубка; 5 – поле зору

Поляриметрія

У поляризованого світла 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 в 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.

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**.

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. 14).

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.

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.

У деяких моделях колового поляриметра на шляху світлового потоку за основним поляризатором встановлюються додаткові, що

дозволяє спростити систему отримання рівномірно затемненого фотометричного поля.

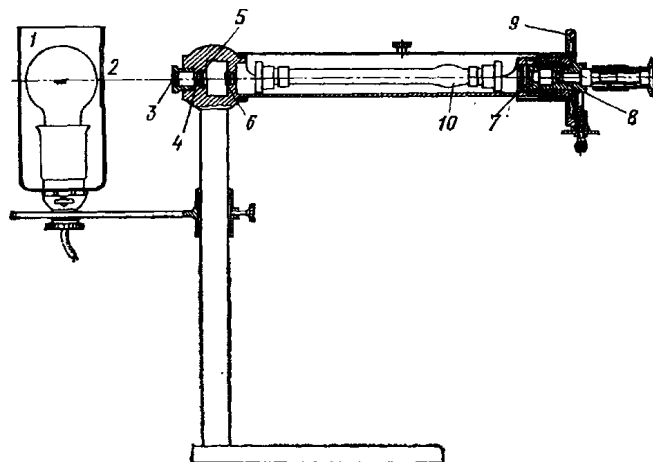


Рис. 14. Схема колового поляризатора [5]

Примітка: 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

У подальшому, 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, щоб повернути цьому полю рівномірне затемнення двох половинок, мікрометричним гвинтом зсувають рухомий клину потрібний бік. Кут обертання площини поляризації світла вираховують за величиною переміщення рухомого клину.

Полум'яна спектрометрія

Полум'яна фотометрія – оптичний метод кількісного елементного аналізу за атомними спектрами випускання. Для одержання спектрів аналізовану речовину переводять в пари, що складаються з атомів досліджуваної речовини, які знаходяться в полум'ї. Термічна полум'яна фотометрія – різновид атомного емісійного спектрального аналізу. У цьому методі аналізований розчин у вигляді аерозолі вводять у полум'я горючої суміші повітря або N_2O з вуглеводнями (пропаном, бутаном, ацетиленом). При цьому розчинник і солі металів випаровуються та дисоціюють на вільні атоми. Атоми металів, що й утворювали молекули оксидів і гідроксидів збуджуються й випромінюють світлову енергію. Із усього спектра випускання виділяють характерну для конкретного елемента лінію за допомогою світлофільтра або монохроматора і вимірюють її інтенсивність, яка служить мірою концентрації даного елемента. Існує ряд причин відхилення від закону Бугера-Ламберта-Бера для забарвлених розчинів:

1. Вплив сторонніх електролітів, що змінюють деформацію електронних оболонок іонів, внаслідок чого змінюється поглинання світла і, відповідно, оптична щільність.

2. В забарвлених розчинах сполуки дисоціюють: $AB \leftrightarrow A^{++}B^{+}$, причому забарвлення іона може відрізнитися від забарвлення молекули. Інтенсивність забарвлення, що залежить від співвідношення концентрацій забарвлених і безбарвних часток, змінюється зі зміною загальної концентрації розчину, тому що при цьому відбувається зміна ступеня дисоціації. У результаті при розведенні або при

концентруванні розчинів спостерігаються відхилення від основного закону колориметрії.

3. Багато забарвлених сполук чутливі до концентрації іонів водню і змінюють своє забарвлення зі зміною рН середовища. При колориметрії точне дотримання рН середовища має виняткове значення.

4. Велике значення у відхиленні від основного закону колориметрії має процес комплексоутворення. Одночасно із цим змінюється й молярний коефіцієнт поглинання.

5. Забарвлення сполуки змінюється в часі.

6. Інтенсивність забарвлення залежить від температури, яка повинна підтримуватися в межах $\pm 1-3^\circ\text{C}$.

7. Утворення забарвленої сполуки часто залежить від кількості, порядку додавання і концентрації реактиву.

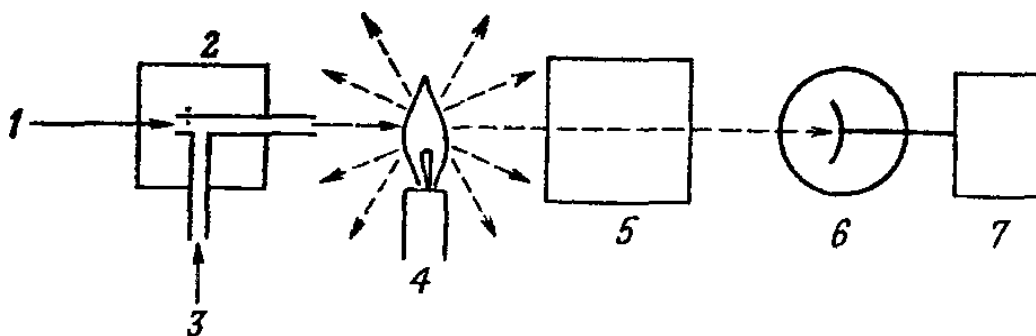


Рис. 15. Схема будови полум'яного емісійного спектрометра (основні пристрої) [5]

Примітка: 1 – повітря від компресора; 2 – розпилювач; 3 – зразок; 4 – пальник; 5 – монохроматор; 6 – детектор; 7 – реєструючий пристрій

Оскільки розчини однієї забарвленої речовини при однаковій концентрації і товщині шару поглинають рівну кількість світлової енергії, то, порівнюючи покази чутливого гальванометра у фотоелектроколориметрі (ФЕК) при вимірюванні поглинання стандартного та досліджуваного розчинів, можна за калібрувальною кривою або за законом Бугера-Ламберта-Бера визначити концентрацію

речовини в аналізованому зразку [6].

Основні пристрої полум'яного емісійного спектрометра наведені на рис. 15.

Детектори та реєстрація спектрів у методі полум'яної спектрометрії

Сучасні атомно-абсорбційні полум'яні спектрометри є, як правило, двопроменеві, 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.

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.

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} .

Метод атомно-абсорбційної спектрометрії застосовується у визначенні вмісту важких металів у харчових продуктах.

Молекулярний спектральний аналіз

В молекулярному спектральному аналізі (МСА) – молекулярний склад речовини визначається за молекулярними спектрами поглинання, випускання, відбиття, люмінесценції комбінаційного розсіювання світла.

Спектрофлуориметрія. Люмінесцентний аналіз, сукупність методів аналізу, оснований на явищі люмінесценції.

Люмінесценція (лат. *lumen* – світло та суфікс *escentia*, що означає слабку дію) – нетеплове світіння речовини, що відбувається після поглинання нею енергії збудження. Важливою особливістю люмінесценції є здатність проявлятися при більш низьких температурах, тому що не використовує теплову енергію випромінюючої системи. За це люмінесценцію часто називають «холодним світінням». Багато форм природної **люмінісценції** були відомі людям здавна. Наприклад, світіння комах (світлячки), світіння морських риб і планктону, полярне сяйво, світіння дерева, що гниє, та інших органічних речовин при розкладанні. Існує багато штучних способів збудження люмінісценції. Тверді та рідкі речовини, здатні люмінісціювати, називають **люмінофорами** (від лат. *lumen* – світло й грец. *phoros* – несучий).

Разрізняють **флуоресцентний, фосфоресцентний і хемілюмінесцентний аналізи** [6].

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 молекулу 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).

Отже, **флуоресценція (фотолюмінесценцією)** – це короткотривала люмінесценція, утворення люмінесціюючих комплексних сполук елементів з органічними реагентами. Тривалість існування такого збудженого стану складає 10^{-11} – 10^{-6} сек. Виникає внаслідок опромінення речовини світлом, іонізуючим промінням, при хімічних реакціях. Флуоресценцією звичайно називають випромінювальний перехід збудженого стану із самого нижнього

синглетного коливального рівня S_1 в основний стан S_0 [6].

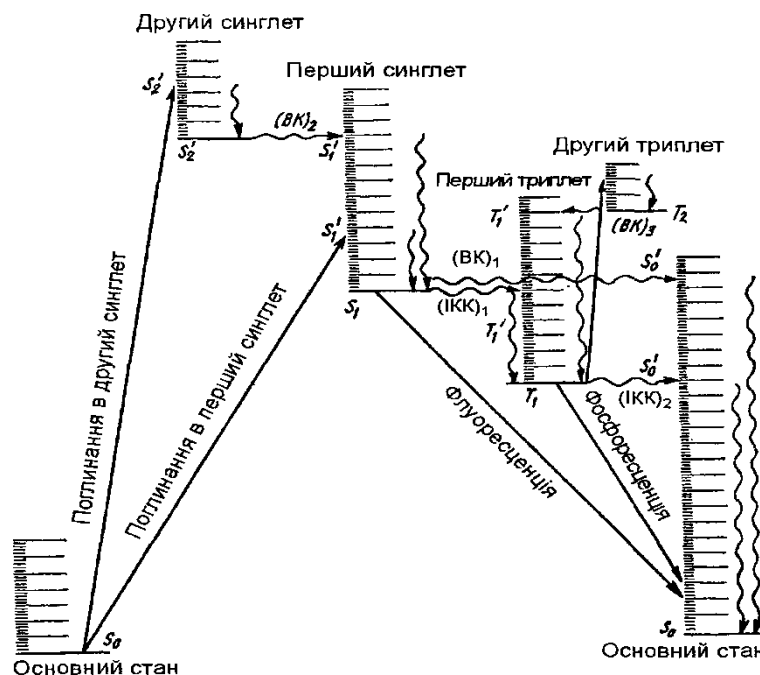


Рис. 16. Схема виникнення флуоресценції [5].

Примітка: S_0 , S_1 , S_2 – синглетні стани; T_1 , T_2 – триплетні стани; S_1' , . – коливальні рівні синглетних станів; T_1 , T_2' – коливальні рівні триплетних станів; ВК – внутрішня конверсія; ІКК – інтеркомбінаційна конверсія; хвилястими стрілками показані переходи без випромінювання.

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).

Енергія кванта світла, що випромінюється в процесі флуоресценції збудженої молекули, менша, ніж енергія поглинутого кванта світла. Наслідком цього явища 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, сульфати Барію, Кальцію і Стронцію.

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, 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.

Основні пристрої спектрофлуориметрів

Схема спектрофлуориметра (основні пристрої) наведена на рис. 17.

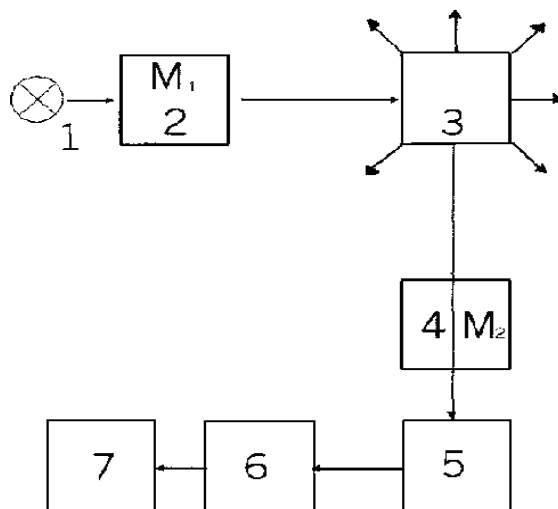


Рис. 17. Схема будови спектрофлуориметра (основні пристрої)

Примітка: 1 – джерело випромінювання; 2 – монохроматор збудження; 3 – кювета зі зразком; 4 – монохроматор випромінювання; 5 – приймач випромінювання (детектор); 6 – підсилювач; 7 – реєструючий пристрій [5]

Приймачем випромінювання (детектором) у спектрофлуориметрі є фотоелемент або, як правило, **фотоелектронний помножувач**

(ФЕП).

На рис. 17 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 – $2 \cdot 10^{-10}$ [5].

Будова та специфіка застосування пристроїв «лабораторія-на-чіпі». 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 квадратних сантиметрів. Вона має справу з обробкою надзвичайно малих об'ємів рідини і може бути інтегрована з напівпровідниковими приладами, обробляти лабораторні дані (рис. 18, 19).

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

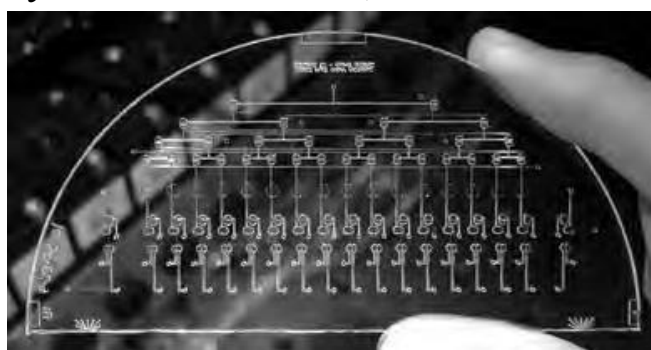


Рис. 18. «Лабораторія-на-чипі» [5]

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.

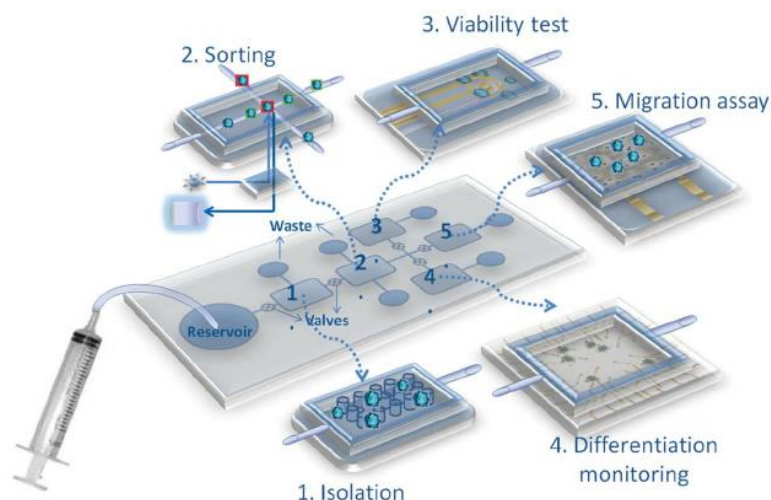


Рис. 19. Фахівці-онкологи з Каліфорнійського університету створили протиракову «лабораторію-на-чіпі» [9]

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 розрізняти класи схожих зображень. Щоб розрізняти 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. 4), 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.

Модуль класифікації складається з модулів:

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

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

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 [5]. Такою інтеграцією можна пришвидшити розроблення багатofункціональних лаб-чипів, що є надзвичайно важливим та актуальним завданням для фармакології, прикладної біології, медицини тощо.

Частина 2. Лабораторна робота

Тема: «Визначення концентрації фенолу у воді фотоколориметричним методом» [7]

Мета. Оволодіти принципами роботи фотометричного устаткування.

Реактиви і обладнання:

1. Дистильована вода.
2. Досліджуваний розчин.
3. Контрольний розчин.
4. Мірна колба місткістю 100 мл – 10 шт.
5. Мірна колба місткістю 200 мл – 6 шт.

6. Мірна колба місткістю 1 л – 3 шт.
7. Хімічна склянка місткістю 200-300 мл – 2 шт.
8. Піпетка місткістю 5 мл – 2 шт.
9. Піпетка місткістю 10 мл – 2 шт.
10. Скляна паличка.
11. Техно-хімічні терези.
12. Аналітичні терези (типу ВЛР-200).
13. Фотоелектроколориметр КФК-2.
14. Спектрофотометр СФ-46.

Принцип роботи фотометричного устаткування [7] полягає у виділенні частини світлового потоку від джерела поліхроматичного випромінювання (лінії з $\Delta\lambda=0,5$ нм – за допомогою монохроматора, чи смуги ($\Delta\lambda_{1/2}=10-20$ нм) – за допомогою світлофільтра), його проходження через кювети із фоновим дослідом (холостим) та досліджуванним зразком (розчином) та вимірювання інтенсивності випромінювання, що пройшло через зразки шляхом порівняння.

Для однопроменевого обладнання необхідно встановлювати « $A = 0$ » при проходженні випромінювання через розчин порівняння («холостий»), та « $A=\infty$ » при закритому фотоелементі (в сучасному обладнанні ці операції автоматизовані) – зразки порівняння та досліджувані послідовно вводяться в світловий потік.

У двопроменевому обладнанні, зазвичай, два однакові світлові потоки (одержують поділом одного) одночасно попадають на досліджуваний зразок і на зразок порівняння, після чого виконується автоматична реєстрація поглинання зразка. Практично в усіх видах фотометричного обладнання існує можливість вимірювання оптичної густини (A) або пропускання (T , %). В хімічному аналізі, зазвичай, використовують вимірювання оптичної густини (A).

Важливе значення для успішного проведення фотометричних визначень відіграє процедура вибору оптимальної довжини хвилі чи світлофільтра, особливо у випадках, коли сполука аналіту має декілька смуг поглинання і тоді, коли має місце поглинання фотометричного

реагенту [7].

Умови фотоколориметричних визначень

Прилади – фотоелектроколориметри – дають можливість виділяти з видимого спектра невелику ділянку в інтервалі довжин хвиль 20-100 нм за допомогою світлофільтрів.

На практиці вибирається той світлофільтр, при якому спостерігається максимальне світлопоглинання, тобто максимум поглинання розчину повинен відповідати максимуму пропускання (мінімуму поглинання) світлофільтра.

Характеристика фотоелектроколориметра КФК-2

Колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2 вимірює у діапазоні хвиль 315-980 нм коефіцієнти пропускання і оптичну густину розчинів та прозорих твердих тіл. Колориметр дозволяє проводити вимірювання коефіцієнтів пропускання розсіювальних суспензій, емульсій, колоїдних розчинів, прозорих твердих тіл, а також активності розчинів.

Принцип дії колориметра ґрунтується на почерговому вимірюванні світлового потоку I_0 , який проник через розчинник чи контрольний розчин, та потоку I , який проник через дослідний розчин. Коефіцієнт пропускання визначається як відношення цих потоків:

$$\tau = \frac{I}{I_0} \times 100\%$$

На колориметрі це **відношення** визначається таким чином:

1. Спочатку до світлового потоку поміщають кювету з розчинником або контрольним розчином.

2. Змінюванням чутливості колориметра домагаються, щоб відлік за шкалою коефіцієнтів пропускання колориметра дорівнював 100 поділкам. Отже, умовно приймається, що коефіцієнт пропускання розчинника дорівнює 100 %.

3. Потім до світлового пучка поміщають кювету з дослідним розчином. Показ приладу за шкалою τ дорівнює коефіцієнту пропускання у %, а за шкалою D – оптичній густині цього розчину.

Колориметр складається з **двох блоків: оптичного (колориметричного) і блока живлення**. Блок живлення по направляючим встановлюється до оптичного і електрично з'єднується з ним через роз'єм.

До складу **оптичної схеми** колориметра входять: лампа, оптичний вузол для фокусування випромінювання лампи, кольорові світлофільтри для виділення вузьких ділянок спектра із суцільного спектра випромінювання лампи (весь спектральний діапазон роботи колориметра від 315 до 980 нм за їх допомогою розбили на 11 інтервалів), кювети з розчином, пластинка, котра розділяє потік випромінювання на два: 10 % його спрямовується на фотодіод і 90 % – на фотоелемент.

Електрична схема колориметра складається з перетворювачів світлового випромінювання в електричні сигнали (фотоприймачів – фотодіода ФД-24К і фотоелемента Ф-2б), посилювача постійного струму, стабілізаторів напруги. Фотоприймачі і посилювач з перемикачем фотоприймачів розміщені в оптичному блоці, а стабілізатори і джерело напруги – в блоці живлення. Потік випромінювання, який проходить через дослідний розчин, діє одночасно на фотодіод і фотоелемент. Вхід посилювача постійного струму підключається до одного з фотоприймачів в залежності від спектрального діапазону. Струм фотоприймача, який підключено, посилюється і подається на вимірювальний прилад, показ якого пропорційний потоку випромінювання, що пройшов крізь дослідний розчин [7, 8].

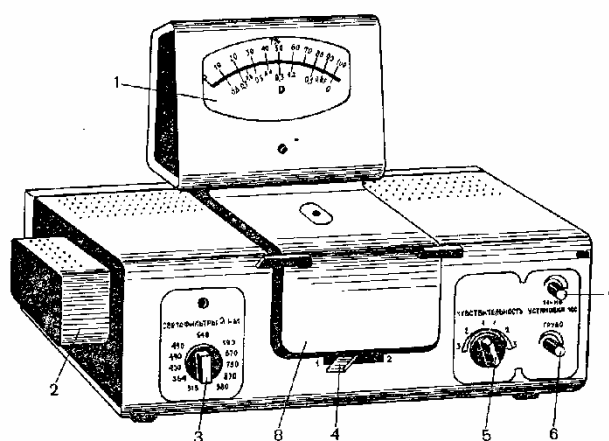


Рис. 20. Загальний вигляд фотоелектроколориметра КФК-2

1 – мікроамперметр, 2 – лампа накаливання, 3 – рукоятка для введення світлофільтрів, 4 – перемикач кювет, 5 – перемикач фотоприймача, 6 – ручка «установка 100 грубо», 7 – ручка «установка 100 точно», 8 – кришка кюветного відділення [7]



Рис. 21. Колориметр фотоэлектрический КФК-2 [10]

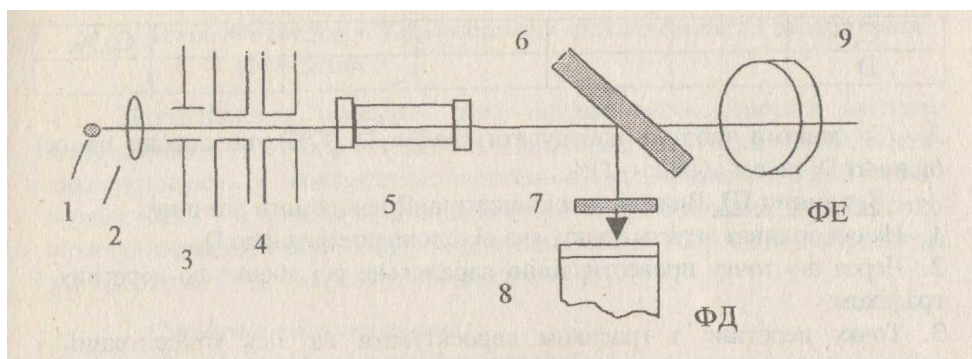


Рис. 22. Оптична схема КФК-2 [7]

Промінь світла від освітлювача (1) через конденсор (2), діафрагму (3) і

світлофільтр (4) падає на кювету (5) з досліджуваним розчином, після чого розділяється на два промені напівдзеркальною пластинкою (6). Один промінь з інтенсивністю $I_1 = 0,9I_0$ падає на фотоелемент (9), а інший з інтенсивністю $I_2 = 0,1I_0$ падає на більш чутливий фотодіод (8). Фотоелемент або фотодіод працюють неодноразово. В положеннях 3, 2, 1, позначених чорним кольором, працює фотоелемент, а в положеннях 1, 2, 3, позначених червоним кольором, працює фотодіод. Напруга, яка виникає в фотоелементі або фотодіоді, підсилюється і подається на мікроамперметр, шкала якого градуйована в одиницях оптичної густини D і коефіцієнта пропускання τ зі своїм світлофільтром.

Підготовка до роботи на фотоелектроколориметрі КФК-2

1. Включити прилад в електромережу з напругою 220 В за 25-30 хв до початку вимірювань. Кюветне відділення при цьому повинно бути відкритим (при цьому шторка перед фотоприймачами перекриває світловий потік).

2. Перемикачем (3) поставити відповідний світлофільтр.

3. Встановити мінімальну чутливість колориметра. Для цього ручку «Установка 100 точно» необхідно встановити в положення 1, ручку «Установка 100 грубо» – в крайнє ліве положення.

4. Перед вимірами і при переключенні фотоприймачів перевірити установку стрілки колориметра на 0 за шкалою коефіцієнтів пропускання при відкритому кюветному відділенні.

5. В одну з кювет налити до мітки досліджуваний, в іншу кювету – контрольний розчин для порівняння. Протерти бокові стінки кювет чистою ганчіркою. Помістити кювети у кюветне відділення.

6. Закрити кюветне відділення. Посунути кювету з контрольним розчином під промінь.

7. Ручками (6) і (7) встановити стрілку мікроамперметра за шкалою на поділку «100».

8. Ручкою (4) посунути під промінь кювету з розчином.

9. Зробити відлік за шкалою D . Точність – соті долі [7, 8].

Дивитись навчальний фільм за посиланням [11].

Порядок роботи на спектрофотометрі СФ-46

Ультрафіолетова спектроскопія (УФ-спектроскопія) – розділ оптичної спектроскопії, що включає одержання, дослідження та застосування спектрів випускання, поглинання та відбиття в УФ-області спектра (400-10 нм) (рис. 23). Дослідженням спектрів в області 200-10 нм займається вакуумна спектроскопія



Рис. 23. Види оптичних спектрів [6]

Поглинання в близькій УФ- і видимій областях спектра пов'язане з наявністю в молекулі ненасичених зв'язків і атомів з неподіленими парами електронів. Групи атомів, які призводять до поглинання в близькій УФ-області (200-400 нм) і видимій (400-750 нм) області спектра, називаються хромофорами. У якості джерел освітлення для УФ-області у спектрофотометрах використовують лампи з дуговим розрядом, наповнені дейтерієм або воднем. Водневі або дейтерієві лампи випромінюють енергію у вигляді безперервного спектра в області 185-375 нм. Для роботи у видимій області використовують лампи розжарювання.

Спектрофотометр призначений для вимірювання пропускання або оптичної щільності різних рідких і твердих прозорих речовин в області спектра від 220 до 1100 нм. Лампа випромінювання за допомогою системи дзеркал фокусується на вхідну щілину монохроматора. Далі пучок світла потрапляє на диспергуючу поворотну призму, виготовлену з високоякісного оптичного кварцу, яка розкладає випромінювання в спектр. Випромінювання з потрібною

довжиною хвилі «вирізається» із суцільного спектра вихідною щілиною. Обертаючи призму монохроматора, можна одержувати на виході з нього світло різних довжин хвиль, яке, пройшовши через зразок або еталон, потрапляє на світлочутливий шар фотоелемента температури, який забезпечує перенесення тепла у внутрішні області. Температура на поверхні буде максимальною [6].

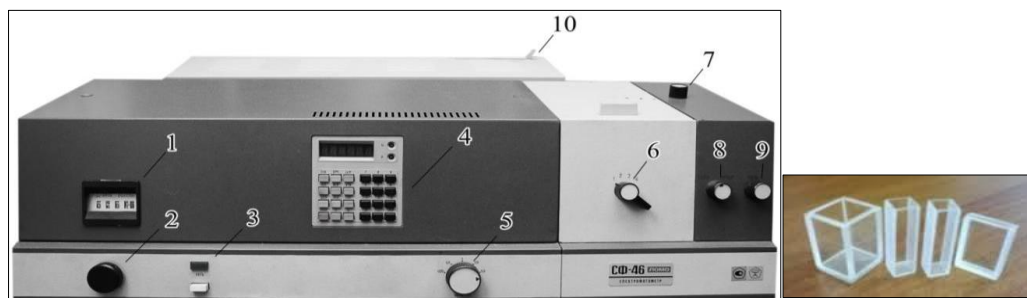


Рис. 24. Загальний вигляд спектрофотометра СФ-46 та фотометричних кювет [12]

Підготовка приладу.

1. Закрити фотоеlement переміщенням ручки (8) в положення «закр.».
2. Перемикачем (5) встановити ширину щілини – 0,15 нм.
3. Вибрати необхідне джерело випромінювання поворотом перемикача (10) в положення «Д» – для вимірювання в області 190-350 нм (дейтерієва лампа, яка запалюється автоматично через 1 хв. після увімкнення приладу) чи «Н» (вольфрамова лампа розжарення) для вимірювання в межах 340-1110 нм.
4. Підключити прилад до мережі електричного струму (220 в) і натиснути кнопку «сеть» (3) та клавішу «Пуск» на панелі мікропроцесора (4), що супроводжується загорянням «коми» на табло.
5. «Прогріти» прилад 10-30 хв. (Стабільна робота дейтерієвої лампи досягається через 20 хв. з моменту її ввімкнення).

Проведення вимірювань

1. Встановити в тримач кювет від одного до 3-х досліджуваних

зразків, а в четверту – контрольний зразок («холостий», розчин порівняння). Закрити кришку кюветного відділення.

2. Встановити необхідну довжину хвилі поворотом лімба установки довжин хвиль (2) підводячи його із сторони менших довжин (1).

3. Встановити необхідний фотоелемент поворотом ручки (7) в положення «Ф» при вимірюванні в області 190-700 нм, чи в положення «К» для області 600-1100 нм.

4. При закритій шторці (перемикач 8) натиснути кнопку «ШО» на панелі мікропроцесора, при цьому на табло висвітлиться значення темного фотоструму.

5. Регулятором «Нуль» (9) встановити будь-яке значення, яке лежить в межах від 0,05 до 0,1 (ручка має грубий та тонкий режим регулювання). Покази значень перевіряють повторним натисканням кнопки «ШО» до одержання стабільних і відтворюваних значень ($\pm 0,001$).

6. Переміщуючи каретку ручкою (6) встановити на шляху світлового потоку контрольний зразок («холостий»).

7. Відкрити шторку переміщенням перемикача (8) в положення «Откр.».

8. Натиснути клавішу «К1», при цьому на табло висвітлюється певне значення. Це значення повинно лежати в межах 0,5-5,0. При висвітленні менших значень, поворотом ручки почергово встановити більшу ширину щілини, покази знімати шляхом повторного натискання на кнопку «К1», до одержання необхідного і стабільного результату. Поява на табло знаку «П» свідчить про засвічування елемента, для усунення якого слід зменшити щілину і через певний час повторним натисканням клавіші одержати вказаний результат.

Вимірювання оптичної густини

1. Натиснути на клавішу «Д5» при цьому на табло повинно висвітлитись значення $0,000 \pm 0,001$. Якщо цього не спостерігається то повторити операції пункту № 8.

2. Натиснути клавішу «Ц/Р» і знову «Д5» при цьому прилад починає автоматично фіксувати оптичну густину через рівні проміжки часу (5 секунд) (циклічний режим).

3. Встановити по черзі на шляху світлового потоку досліджувані зразки і записати отримані значення оптичних густин кожного зразка.

Прилад дозволяє вимірювати пропускання зразків та концентрацію аналіту після відповідного введення параметрів градууювального графіка.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Характеристика загальних методів наукового дослідження.
2. Загальна характеристика фотоколориметричного методу аналізу.
3. Який оптичний закон лежить в основі фотометричних методів аналізу?
4. Основні принципи спектроскопічних методів аналізу.
5. Класифікація методів спектроскопії: за природою взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною, за довжиною хвилі випромінювання, за природою поглинаючої системи.
6. Основний закон світлопоглинання.
7. Принцип методів спектрофотометрії та фотоколориметрії.
8. Принципова схема фотоелектроколориметра та спектрофотометра.
9. Правила вибору світлофільтра.
10. Диференційна спектрофотометрія. Розчини порівняння у фотометрії.
11. Вплив різних факторів на утворення забарвлених сполук.
12. Фотометричні, екстракційно-фотометричні, сорбційно-фотометричні методи аналізу.
13. Використання УФ-спектроскопії для ідентифікації органічних речовин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Методичні вказівки до виконання розділу «Охорона праці» в дипломних роботах (для студентів усіх спеціальностей) // Гвоздій С. П. – Одеса: ОНУ, 2011. – 16 с.
2. Грабченко А. І., Федорович В. О., Гаращенко Я. М. Методи наукових досліджень: Навч. посібник. – Х.: НТУ «ХПІ», 2009. – 142 с.
3. Дмитрук В. В. Оптико-електронні методи діагностування в біомедицині / В. В. Дмитрук, Н. В. Белік, С. О. Штельмах // Оптико-електронні інформаційно-енергетичні технології. – 2009. – С. 5-13.
4. Кожем'яко В. П. Оптико-електронна геоінформаційно-енергетична система біомедичного призначення / Кожем'яко В. П., Павлов С. В., Шевченко О. В., Дмитрук В. В. // Оптико-електронні інформаційно-енергетичні технології. – 2006. – № 2 (12). – С. 192-196.
5. Мельничук Д. О. 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.
6. Оптичні методи аналізу, Харків:
https://dl.khadi.kharkov.ua/pluginfile.php/86279/mod_resource/content/1/%D0%9E%D0%BF%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D1%96%20%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%20%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B7%D1%83.pdf
7. Федорченко С. В. Методичні вказівки і інструкція до виконання лабораторної роботи з курсу «Моніторинг і методи вимірювання хімічних параметрів», – ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», кафедра теоретичної та прикладної хімії, 2017. – 14 с.
8. Ларичева Л. П. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Автоматичне регулювання та управління технологічними процесами» для студентів спеціальності 161 –

«Хімічні технології та інженерія». Укладачі: Л. П. Ларичева, Л. О. Спіцина. Кам'янське: ДДТУ, 2013. – 35 с.

9. <https://fainaidea.com/nauka/medicina/sozdana-protivorakovaya-laboratoriya-na-chipe-153906.html>
10. <https://prom.ua/p738287511-kolorimetr-fotoelektricheskiy-kfk.html?&primelead=MC44>
11. <https://www.youtube.com/watch?v=8yXwYNh5Ryg>
12. Практикум з аналітичної хімії. Інструментальні методи аналізу. [для студ. вищ. навч. закл.] / Студеняк Я. І., Воронич О. Г., Сухарева О. Ю., Фершал М. В., Базель Я. Р. – Ужгород, 2014. – 129 с. : <https://www.uzhnu.edu.ua/en/infocentre/get/8877>.

Навчальне видання

**Устянська Ольга Володимирівна
Шкодовська Анна Марія Ігорівна**

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ТА КЛАСИФІКАЦІЯ
СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ
БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ**

**Фізико-хімічні методи, які застосовуються
для дослідження біосистем людини
Спектроскопічні методи аналізу**

Частина II

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних занять з дисципліни**

Електронне практичне видання

В авторській редакції

Затвердж. авт. 23.12.2022. Шрифт Times New Roman.
Обсяг 1,7 МБ. Зам. № 2536.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua