# ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ

# ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИЯ. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

**ТЕМА ЭКЗАМЕНА!**

# Значение темы ПЕРЕПИСАТЬ

Физико-химические методы анализа основаны на измерении физических характеристик определяемых компонентов в ходе химических превращений веществ.

Физико-химические методы анализа широко применяются в клинических и биохимических анализах. Эти методы отличаются низкими пределами обнаружения, экспрессностью, возможностью автоматизации технологических процессов.

В любой клинико-диагностической лаборатории обязательно имеется перечень приборов и оборудования для проведения анализа физико-химическим путем. При создании современных приборов и оборудования использованы последние достижения электроники и вычислительной техники, которые значительно упрощают проведение различных видов анализа, делают их более точными и чувствительными. Фотометрически определяют содержание гемоглобина в крови, холестерин, общий белок.

**Мини лекция ПЕРЕПИСАТЬ**

Очень многие физико-химические свойства растворов, такие, как светопоглощение, величина угла вращения плоскости поляризации, электропроводность и др., находятся в зависимости от концентрации вещества. Таким образом, измеряя эти величины, можно определить количество вещества в анализируемом растворе. Все эти методы имеют название физико-химических методов анализа.

**Основными методами физико-химического анализа являются:**

1. фотометрия,
2. электрометрия,
3. хроматография.

В фотометрических методах используют зависимость между составом и количеством вещества и его светопоглощением, светорассеянием, преломлением света (рефракцией), вращением плоскости поляризации, люминесценцией. Электрометрические методы анализа основаны на измерении различных электрических характеристик вещества (изменение электропроводности, электрического потенциала, величины тока).

Методы хроматографического анализа основаны на различиях в адсорбируемости вещества, в константах ионного обмена, в растворимости осадков и т. д.

 Физико-химические методы анализа широко применяются в клинических и санитарно-гигиенических анализах. Фотометрически определяют содержание гемоглобина в крови, холестерин, общий белок, остаточный азот; фотометрически определяют также количество аммиака, железа и нитритов в воде для оценки качества питьевой воды.

Нефелометрия применяется для оценки загрязнения вредными примесями на производстве, определения содержания свинца и ртути.

Поляриметрия применяется для определения количества сахара в моче. При анализе безалкогольных напитков количество сахара также определяют с помощью поляриметрии.

**Фотометрические методы.**

Фотометрические методы анализа основаны на измерении поглощения, пропускания или рассеяния света определяемым веществом.

Наблюдения можно проводить визуально или с помощью различных физических приборов. Визуальные методы менее точные, чем определения с помощью физических приборов. Так, точность визуального опреде­ления во многом зависит от способности глаза улавливать разницу в интенсивности окраски или степени мутности раствора.

**Имеются различные фотометрические методы:**

спектрофотометрия,

фотоэлектроколориметрия,

колориметрия,

нефелометрия,

флюорометрия.

Колориметрия — визуальное определение количества вещества по интенсивности окрашивание раствора, появляющегося при взаимодействии данного вещества с каким-либо реактивом.

Фотоэлектроколориметрия — определение количества вещества по поглощению окрашенным раствором света, пропущенного через светофильтр и измеряемого фотоэлементом.

Нефелометрия — визуальное определение количества вещества по степени мутности раствора. Можно проводить нефелометрическое определение с применением приборов. При этом определяют концентрацию по интенсивности света, рассеянного взвешенными частицами суспензии и измеряемого фотоэлементом.

Все указанные методы применяются в том случае, если у нас имеются очень малые количества вещества, когда определение обычными методами гравиметрии и титриметрии практически невозможно.

**Законы поглощения света окрашенными растворами**

Если поток монохроматического света с интенсивностью I0 падает на однородный слой какого-либо раствора, то часть его отражается (интенсивность Ir), часть (Ia) поглощается раствором, а часть (It) проходит сквозь его слой. Т.о.

I0 = Ir + Ia + It

Т.к. в фотоколориметрии сравнивают растворы в одинаковых сосудах, величиной Ir можно пренебречь, Тогда:

I0 = Ia + It

Т.о. проходя через раствор, световой поток теряет часть своей интенсивности. Чем больше окрашенных молекул в растворе, тем больше величина Ia, следовательно, тем меньше величина It. Число окрашенных молекул зависит от концентрации вещества и от толщины слоя раствора, через который проходит свет.

Зависимость величины It от различных факторов выражена

формулой Ламберта-Бера:

где e – молярный коэффициент поглощения света, зависящий от природы вещества и его физического состояния;

С – концентрация вещества; h – толщина слоя раствора, через который проходит свет.

Преобразуем это выражение:

прологарифмируем его:



или

Величину  называют оптической плотностью раствора и обозначают D:



т.е. оптическая плотность раствора зависит от концентрации вещества, от природы этого вещества и от толщины слоя раствора, через который проходит свет.

**Фотоэлектроколориметрия**

Для определения применяются фотоэлектроколориметры (ФЭК) различных марок.

Принцип работы ФЭК. Световой поток, проходя через окрашенную жидкость, частично поглощается. Остальная часть светового потока попадает на фотоэлемент, в котором возникает электрический ток, регистрирующийся при помощи амперметра. Чем больше концентрация раствора, тем больше его оптическая •плотность и тем больше степень поглощения света, и, следовательно, тем меньше сила возникающего фототока.

**«Устройство ФЭКа»**

В клинической и биохимической практике наиболее широко представлены фотоэлектроколориметры типов: КФК-2МП, КФК-3.

В устройстве прибора выделяют: осветительную, оптическую системы, кюветное отделение и электрическую часть.

*Осветительная часть* прибора. Источник света (лампа накаливания) находится на боковой стенке прибора. Для того, чтобы световые потоки попадали на фотоэлемент только во время определения, имеется непрозрачная шторка, закрывающая световые потоки. Шторка открывается во время опускания крышки кюветного отделения.

В *оптическую часть* прибора входят светофильтры. Они вмонтированы в диск и для включения светофильтра поворачивают рукоятку, которая находится на передней панели ФЭКа. Светофильтры обозначены номерами в соответствии с длинами волн, максимально пропускаемых данным фильтром. Светофильтр подбирают опытным путем к каждому определению.

Обычно берут такой светофильтр, цвет которого является дополнительным к цвету окрашенного раствора (см. табл.)

**Зависимость цвета вещества от поглощаемой части спектра**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Видимый цвет раствора** | **Поглощаемая часть спектра, (нм)** | **Цвет поглощенной части светового потока** |
| Желто-зеленый | 400-450 | Фиолетовый |
| Желтый | 450-480 | Синий |
| Оранжевый | 480-490 | Зелено-синий |
| Красный | 490-500 | Сине-зеленый |
| Пурпурный | 500-560 | Зеленый |
| Фиолетовый | 560-575 | Желто-зеленый |
| Синий | 575-590 | Желтый |
| Зелено-синий | 590-625 | Оранжевый |
| Сине-зеленый | 625-750 | Красный |

В *кюветном отделении* имеются 2 кюветодержателя, вставленные в каретку. В дальнее отделение кюветодержателя всегда устанавливают кювету с контрольным раствором, а в ближнее – с исследуемым.

**Кюветы** – представляют собой прямоугольные или цилиндрические сосуды из стекла или кварца с определенным расстоянием между стенками. Толщина кюветы указывается в мм на одной из поверхностей. В зависимости от интенсивности окраски раствора для измерения выбирают кювету с большей или меньшей толщиной слоя.

Поскольку кювета, помещенная в спектрофотометр, становится составной частью его оптической системы, с ней нужно обращаться очень аккуратно. Царапины и грязь на стенках кюветы сильно рассеивают и поглощают свет, искажая результаты измерений.

Кюветы можно протирать мягкими тканями, например, из хлопка. Не рекомендуется использовать для этих целей фильтровальную бумагу. Поскольку органические молекулы поглощают в ультрафиолетовой области, ни в коем случае нельзя касаться оптических (прозрачных) стенок кюветы. Кюветы довольно хрупки, особенно кварцевые, поэтому работать с ними надо осторожно, не допуская механических повреждений.

Содержимое кюветы должно быть гомогенным – это необходимое условие получения воспроизводимых данных. Нужно следить за тем, чтобы раствор не был мутным. Особенно мешают измерениям пузырьки воздуха, сильно увеличивающие рассеяние. Нельзя наливать в кювету очень холодный раствор, поскольку при этом на наружных стенках кюветы конденсируются пары воды воздуха, и стенки становятся непрозрачными.

Кюветы, в которых проводят измерение поглощения, должны быть тщательно очищены: их моют концентрированной соляной кислотой, водопроводной водой. Несколько раз ополаскивают дистиллированной водой и насухо вытирают снаружи. Во всех случаях кювету предварительно споласкивают небольшим количеством раствора, оптическую плотность которого собираются измерять. Кювету заполняют до такого уровня, чтобы поток излучения проходил только через слой раствора.

Закончив измерение данного раствора, необходимо его тотчас вылить из кюветы, которую необходимо тщательно промыть дистиллированной водой и поставить в перевернутом виде на чистую фильтровальную бумагу.

Заключенный в корпусе прибора фотоэлемент связан с микроамперметром, выводящим результат на цифровом табло.

Прибор включают в сеть через стабилизатор, обеспечивающий постоянство напряжения тока, питающего источник света. На задней стенке корпуса находится выключатель сетевого напряжения – тумблер.

**Самостоятельная работа ВСЕ ОФОРМИТЬ В ТЕТРАДЬ**

**1. Оформите в тетрадь порядок работы на КФК-2МП**

**Порядок работы на КФК-2МП**

1. Подсоединить колориметр к сети 220 В, открыть крышку кюветного отделения и включить тумблер «Сеть», при этом должна загореться сигнальная лампочка.
2. Нажмите клавишу «Пуск» на цифровом табло появляется мигающая запятая.
3. Выдержать колориметр во включенном состоянии в течении 15 минут, при открытой крышке кюветного отделения.
4. Налить в одну кювету фотоколориметра толщиной 1 см (брать кюветы только за узкие боковые части!) дистиллированную воду(чуть выше риски на широкой боковой поверхности кюветы), в другую кювету фотоколориметра налить исследуемый раствор.
5. По истечению 15 минут нажать клавишу «Ш (0)», измерить нулевой отсчет.
6. Установить в кюветное отделение кюветы: с дистиллированной водой в дальнее гнездо кюветодержателя, с исследуемым раствором − в ближнее гнездо.
7. Установите необходимый светофильтр и соответствующий фотоприемник.
8. Ручку кюветодержателя установить в левое положение (в световой пучок вводится кювета с контрольным раствором).
9. Закрыть крышку кюветного отделения, нажать клавишу «К (1)».
10. Ручку кюветодержателя установить в правое положение (в световой пучок вводится кювета с исследуемым раствором).
11. Нажать клавишу «Д (5)». Отсчет на цифровом табло справа от мигающей запятой соответствует оптической плотности исследуемого раствора.
12. Вынуть кюветы, закрыть крышку кюветного отделения. Нажать клавишу «Пуск». Затем выключить с правого торца прибора тумблер «Сеть» и отсоединить фотометр от сети 220 В.

**3.** **Рассмотрите прибор и зарисуйте его в тетрадь. Найдите все части прибора и подпишите.**

1 – источник света (лампа накаливания)

2 – электронное табло

3- рукоятка фотоэлемента

4 –ручка кюветодержателя

5 – крышка кюветного отделения

6- рукоятка светофильтров

**СПЕКТРОМЕТРИЯ. ПЕРЕПИСАТЬ**

Ультрафиолетовая спектроскопия (УФ) (400-200K нм) находит применение для анализа продуктов нефтехимии. В других областях она используется редко из-за перекрывания полос поглощения и малой специфичности. Неограниченные возможности не только для качественного анализа, но и для определения строения молекул вновь синтезированных веществ, имеет спектроскопия в ИК области. В основе метода – неповторимость ИК спектра соединения. Спектры каждого соединения имеют так называемые характеристические полосы поглощения при определенных длинах или частотах, которые отвечают конкретным атомным связям или функциональным группировкам. Так, характеристическая полоса поглощения OH –группы проявляется при различных частотах в соединениях: 23 – карбоновые кислоты (мономеры) – 1380 1280K см–1; – карбоновые кислоты (димеры) – 3100 2500K см–1; – первичные спирты 3400 3200K см–1 . То есть по частоте характеристической полосы можно судить не только о наличии определенной функциональной группы, но и принадлежности вещества к тому или иному классу соединений. Как правило, отсутствие в ИК спектре данной полосы, указывает на то, что соответствующей группы в исследуемом веществе нет. Но нет правил без исключения. Например, колебания ― C ≡C ― связи в молекулах с высокой симметрией (например, если связь находится в центре молекулы) не проявляются. Иногда искомая полоса перекрывается за счет примесных соединений, или происходит совпадение частот характеристических полос различных функциональных групп. В этом случае следует прибегнуть к другим методам анализа. В настоящее время опубликованы атласы и таблица ИК спектров свыше 20 тыс. соединений, что облегчает проведение анализа. Из аппаратуры отечественного производства наиболее распространены неавтоматические однолучевые спектрофотометры типа СФ-16 и СФ-26, а также автоматические регистрирующие спектрофотометры СФ-10 и СФ-40. Для анализа органических соединений методом ИК-спектроскопии достаточно широко используются зарубежные спектрофотометры (например «Specord» производства Карл Цейс). Для расшифровки структуры молекул органических соединений разработаны автоматизированные системы, основанные на использовании микросхем, в память которых заложены спектры поглощения большого числа соединений.