

- **ФОТОМЕТРИЯ** - совокупность оптических методов и средств измерения *фотометрических величин светового потока*
- *Спектрофотометрия* – определение зависимости фотометрических величин от длины излучения
- *Спектроскопия* – (эмиссионный спектральный анализ) – определение излучательной способности вещества в зависимости от длины волны излучения
- *В КЛД применяются методы количественного анализа, основанные на переведении определяемых компонентов в поглощающие свет соединения с последующим определением их количества путем измерения поглощения света*

Свойства растворенного вещества

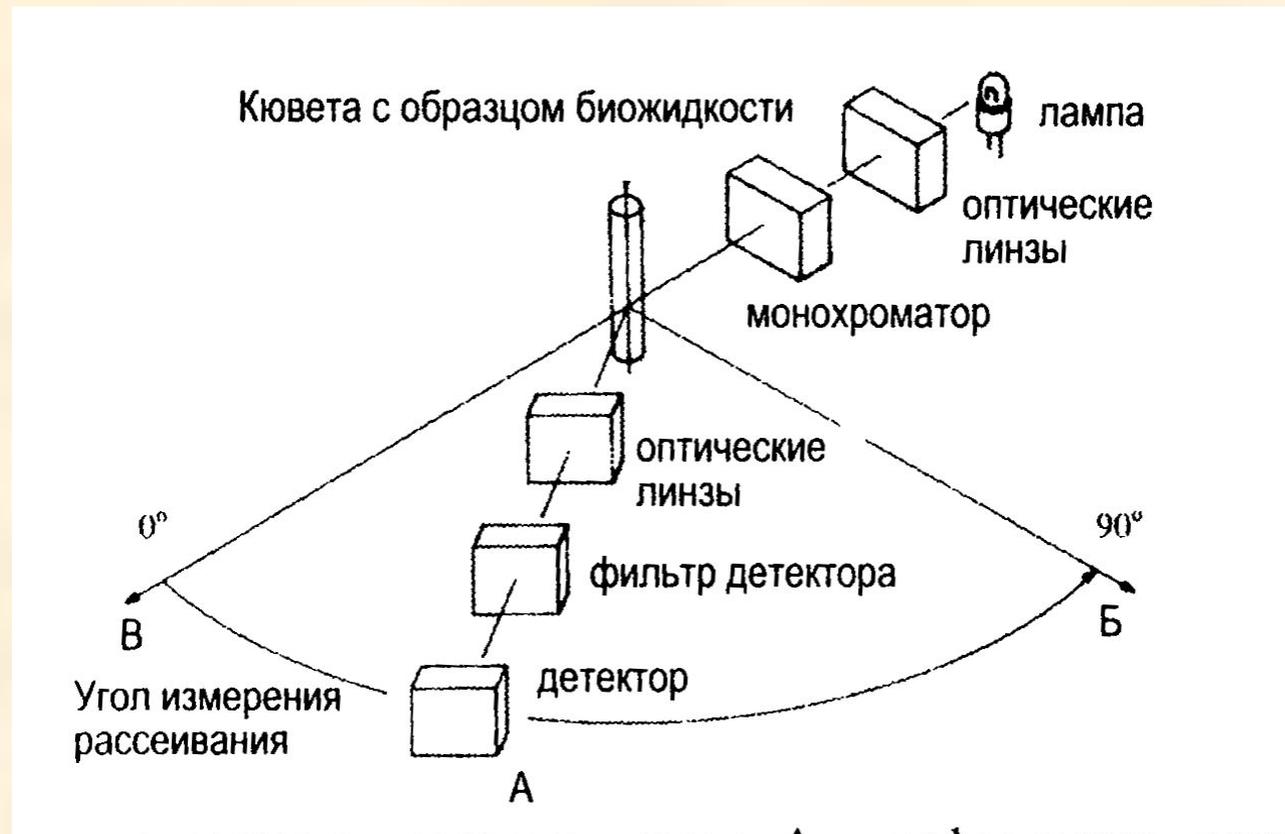
- - коэффициент пропускания (T)
- - коэффициент отражения (R)
- - коэффициент поглощения (A)

*(Для одного и того же вещества –
 $T + R + A = 1$)*

- ***Фотометры*** – приборы, регистрирующие реакции приемника оптического излучения на поток излучения
- ***Отражательные фотометры*** – приборы регистрирующие отражение оптического излучения

Схема измерения рассеянного цвета

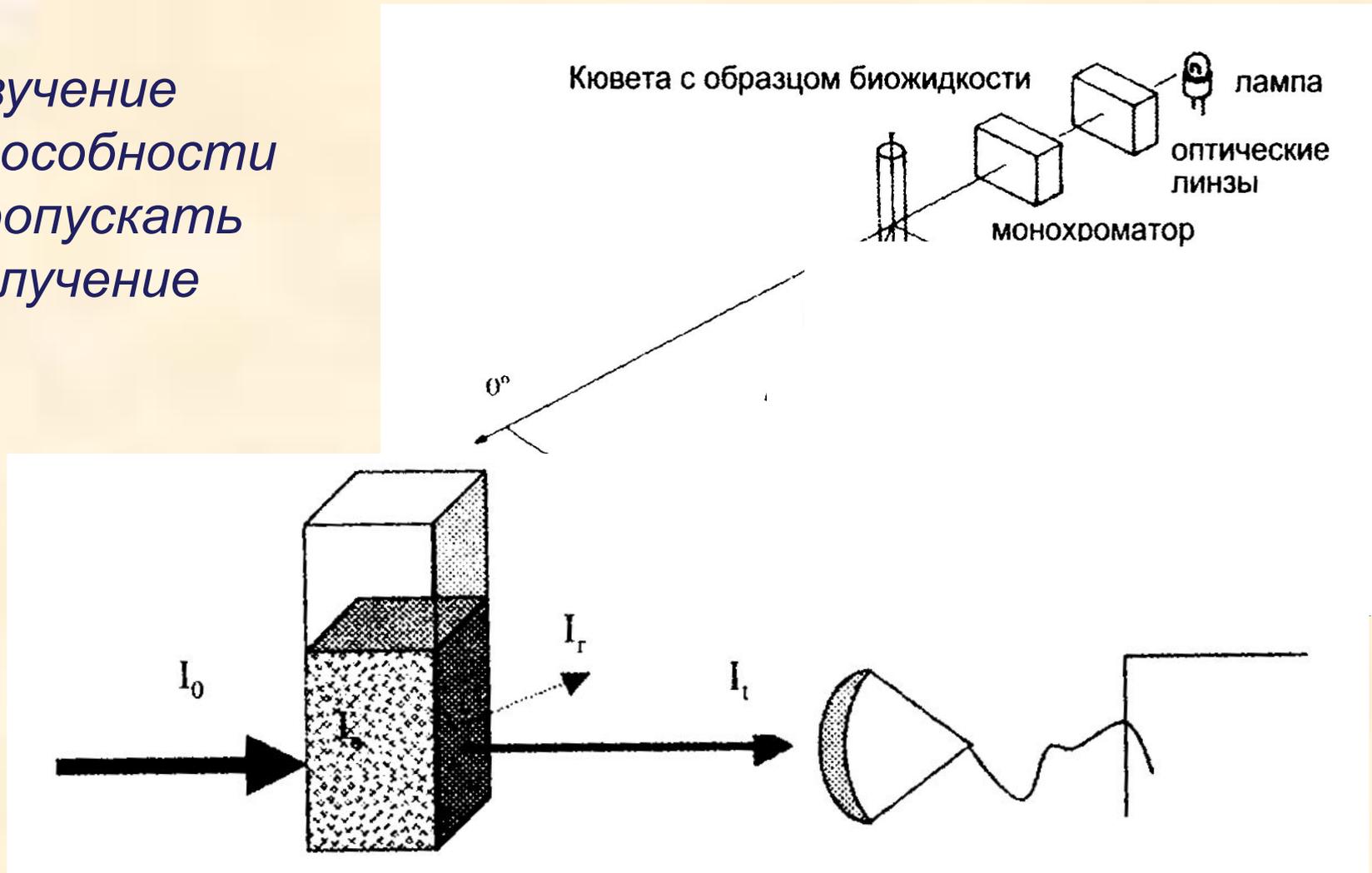
Нефелометрия
– изучение способности рассеивать свет



А – нефелометр, регистрирующий малоугловое рассеяние; Б - нефелометр, регистрирующий рассеяние под углом 90°

Турбидиметрия

Изучение способности пропускать излучение



Оптическое излучение

- - *электромагнитные колебания определенного диапазона частот, распространяющихся в пространстве со скоростью c (для вакуума $\lambda = c/\nu$)*
- *Спектр – частотный состав электромагнитного излучения*

Источники электромагнитных волн

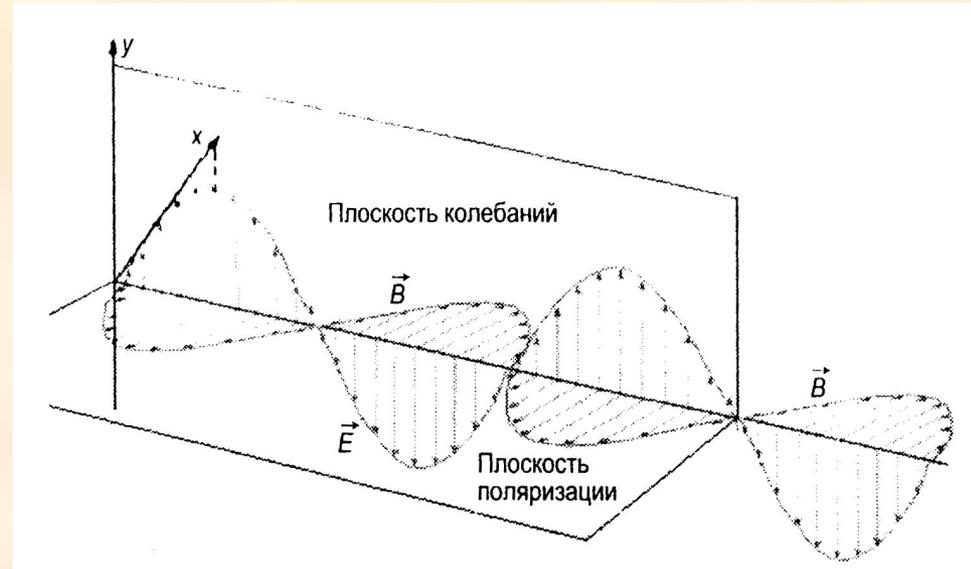
Частота ν , Гц	Длина волны λ , м	Диапазон	Источники. Основные методы возбуждения.
10^3	3×10^4	Радиоволны	Переменные токи в проводниках и электронных потоках (генераторы радиочастот, генераторы сверхвысоких частот СВЧ)
10^{12}	30×10^{-4}		
$3,75 \times 10^{14}$	8×10^{-7}	ИК-излучение	Излучение молекул и атомов при тепловых и электрических воздействиях
$7,5 \times 10^{14}$	4×10^{-7}	Видимый свет	Излучение молекул и атомов при тепловых и электрических воздействиях
3×10^{17}	10^{-9}	УФ излучение, мягкий рентген	Излучение атомов при воздействии ускоренных электронов
3×10^{20}	10^{-12}	Рентген, γ -излучение	Атомные процессы при воздействиях ускоренных заряженных частиц.
10^{23}	3×10^{-15}	γ -излучение	Ядерные процессы, радиоактивный распад, космические процессы

Диапазоны оптического излучения

Обозначение	Волновой диапазон
Коротковолновое ультрафиолетовое излучение — С (УФ-С)	100—280 нм
Средневолновое ультрафиолетовое излучение — В (УФ-В)	280—315 нм
Длинноволновое ультрафиолетовое излучение — А (УФ-А)	315—380 нм
Видимый свет:	380—780 нм
Фиолетовый	380—435
Синий	435—490
Голубой	490—500
Зеленый	500—560
Желтый	560—595
Оранжевый	595—650
Красный	650—780
Ближнее инфракрасное излучение А (ИК-А)	780 нм—1,4 мкм
Среднее инфракрасное излучение В (ИК-В)	1,4—3 мкм
Дальнее инфракрасное излучение С (ИК-С)	3 мкм—1 мм

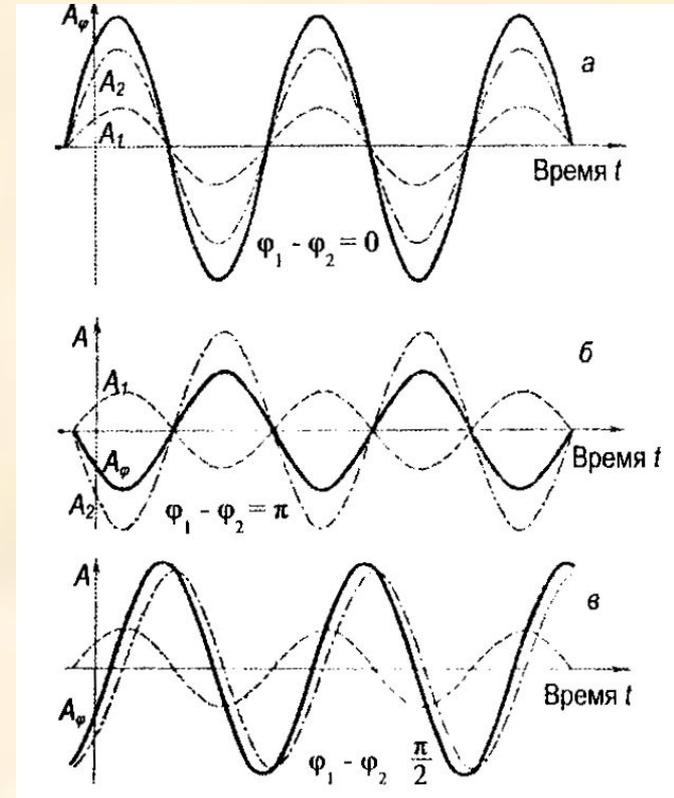
Волновые характеристики света

- Световые волны являются плоскопоперечными, распространяются в однородной среде перпендикулярно направлению электрического и электромагнитного полей.
- **Поляризованный свет** - свет, в котором направления колебаний упорядочены каким-то образом
- Если колебания светового потока происходят только в одной в одной проходящей через луч плоскости – **плоскополяризованный свет**



Когерентность

- **Когерентность** - согласованное протекание во времени и пространстве колебательных или волновых процессов, проявляющееся при их сложении
- Колебания когерентные, если разность их фаз остается постоянной во времени, сложение колебаний определяет амплитуду суммарного колебания



Сложение колебаний двух световых волн (пунктир) с амплитудами A_1 и A_2 при различных фазах. Результирующее колебание – сплошная линия

Квантовые характеристики света

- Фотон – элементарная частица света
- Энергия $E=hc/\lambda$

$$\text{Масса } m = \frac{E}{c^2}$$

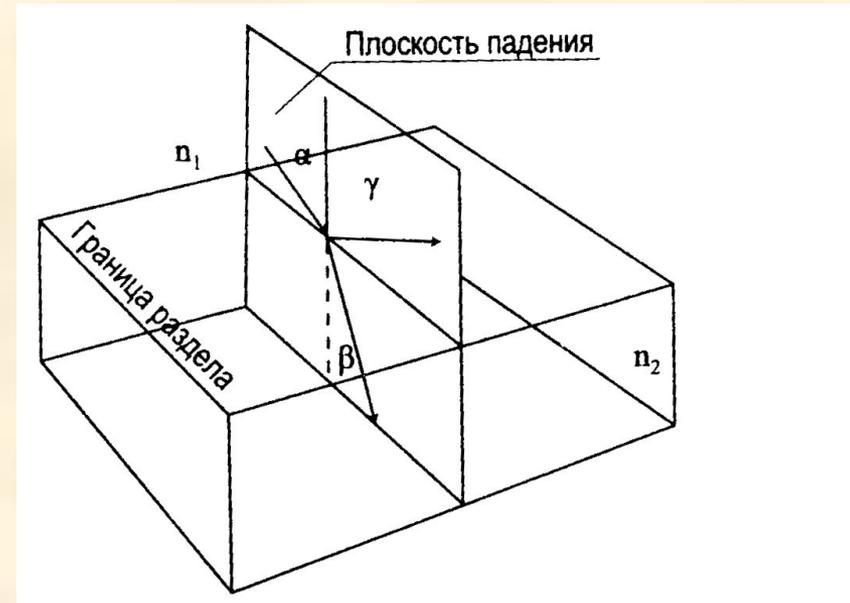
Отсутствует масса покоя, торможение (поглощение) фотона связано с превращением кванта света в другой вид энергии

$$\text{Импульс } p = \frac{h\nu}{c}$$

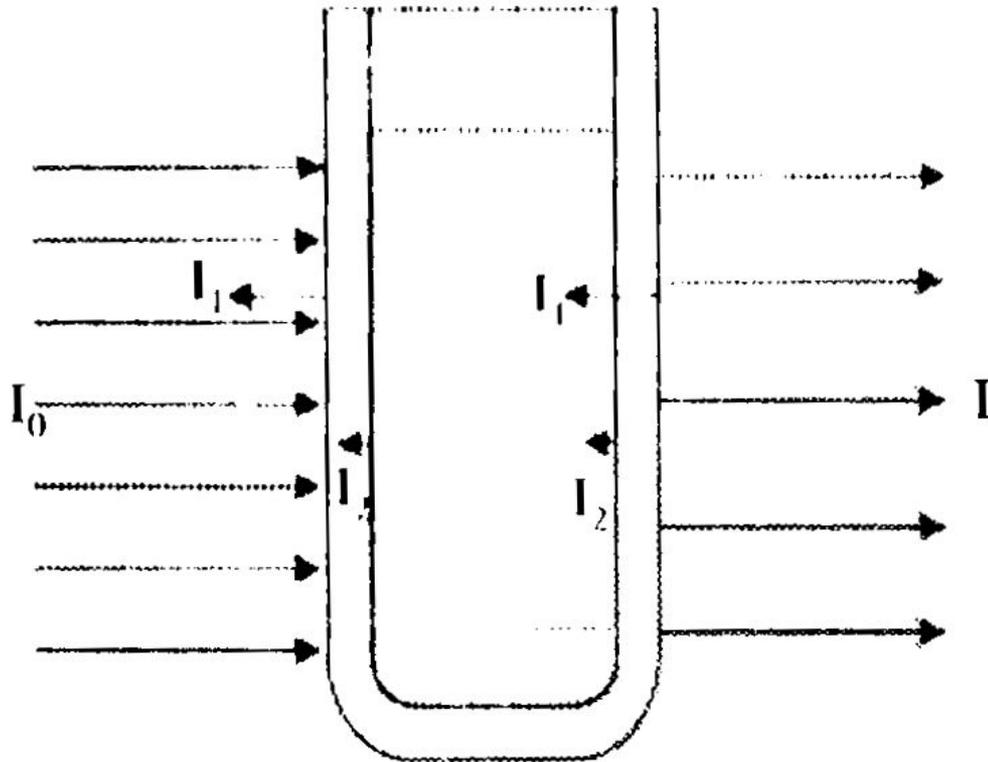
c – скорость света, $\nu = \frac{c}{\lambda}$ – частота электромагнитной волны,
 h – постоянная Планка

Взаимодействие света с веществом

- **Закон отражения света** – падающий и отраженный лучи, а также перпендикуляр к границе раздела сред, восстановленный в точке падения луча, лежат в одной плоскости.
- **Закон преломления света** – падающий и преломленные лучи, а также перпендикуляр к границе раздела сред, восстановленный в точке падения луча, лежат в одной плоскости. Отношение синуса угла падения α к синусу угла преломления β – величина постоянная для данных сред.

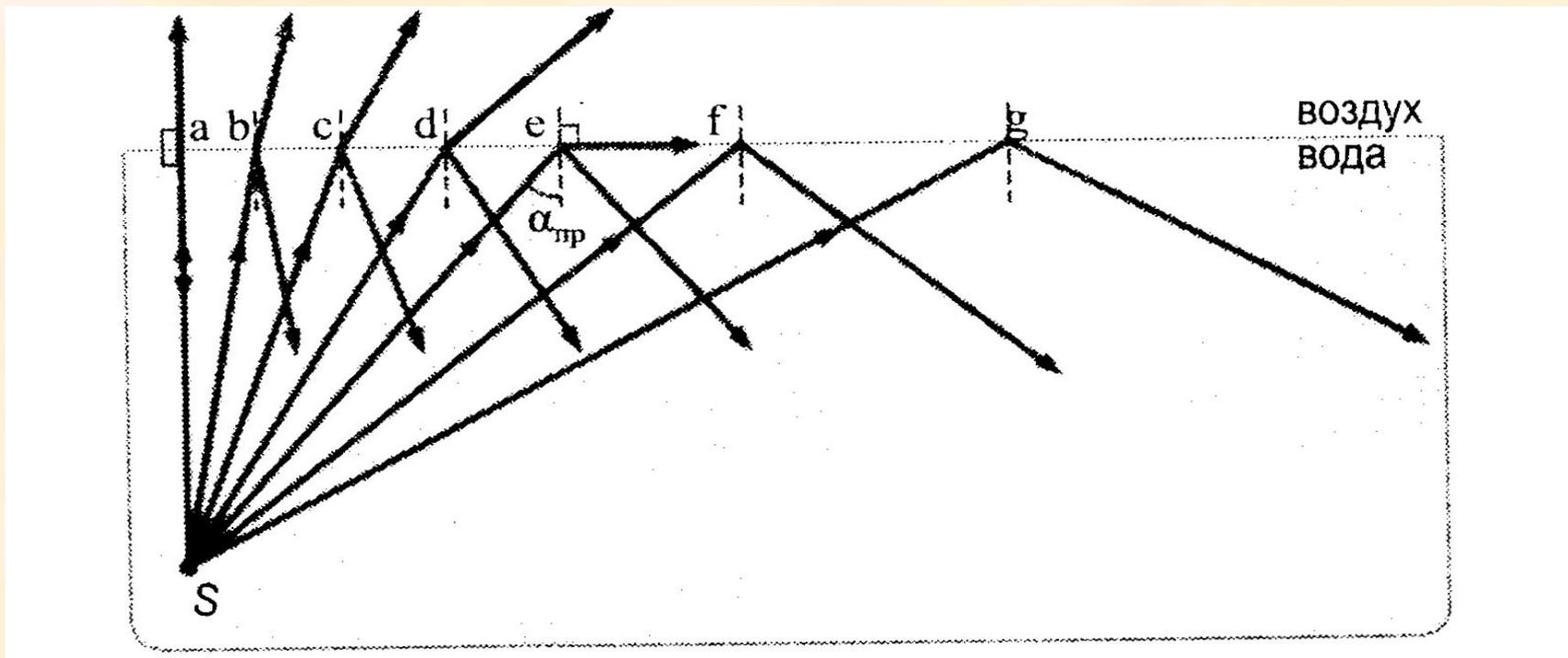


Отражение света от стенок кюветы с неокрашенной прозрачной жидкостью



- Суммарное отражение от стенок кювет составляет около 9,2% светового потока

Полное внутреннее отражение света на границе вода-воздух



S – точечный источник света

При переходе света из оптически более плотной среды в менее плотную возможно полное отражение (исчезновение преломленного луча).

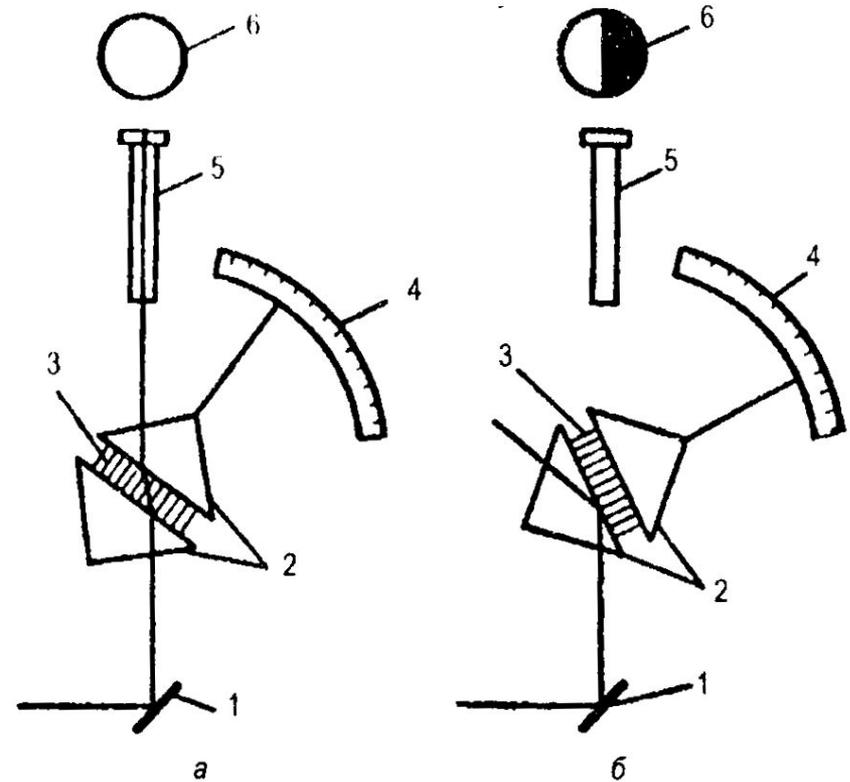
Граница стекло-воздух $\alpha=42^\circ$, вода-воздух $\alpha=48,7^\circ$

Рефракция света

- Мера электронной поляризуемости вещества, характеризующая его физико-химическое состояние
- Рефрактометрически определяют содержание общего белка в сыворотке или высушенных препаратах крови

Прохождение белого света в рефрактометре Аббе

Наблюдение светового потока, прошедшего через слой раствора вещества, помещенного между двумя призмами. Поворотом зеркала освещают призму белым светом. затем поворотом призмы добиваются появления темного поля в окуляре, при котором луч света полностью отражается от поверхности раздела между призмой и исследуемым веществом



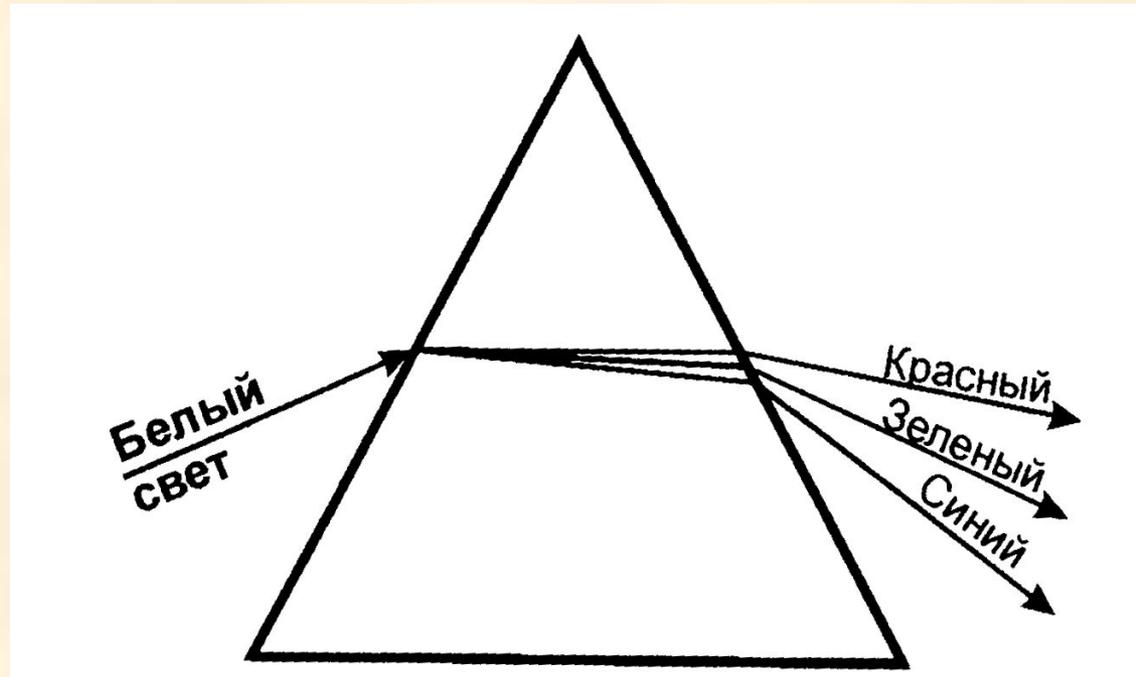
1 – зеркало, 2 – призма, 3 – слой исследуемого вещества, 4 – шкала отсчета, 5 – окуляр, 6 – поле окуляра

Дисперсия света

- Распространение света в среде связано с поляризуемостью молекул. Под действием поля электроны атомов или молекул вещества совершают вынужденные колебания. При совпадении частоты колебания поля приходящей волны и собственной частоты колебания электронов возникает резонанс поглощение света.
- **Дисперсия света** – зависимость фазовой скорости распространения световой волны от длины волны.
- **Дисперсия вещества** – величина определяющая скорость изменения коэффициента преломления с изменением длины волны в веществе

Дисперсия света в прозрачной призме

- Для прозрачных веществ коэффициент преломления монотонно возрастает с увеличением длины волны (синие лучи преломляются сильнее красных).
- Разложение света в диспергирующих призмах используется в монохроматорах фотометров для выделения определенной длины волны

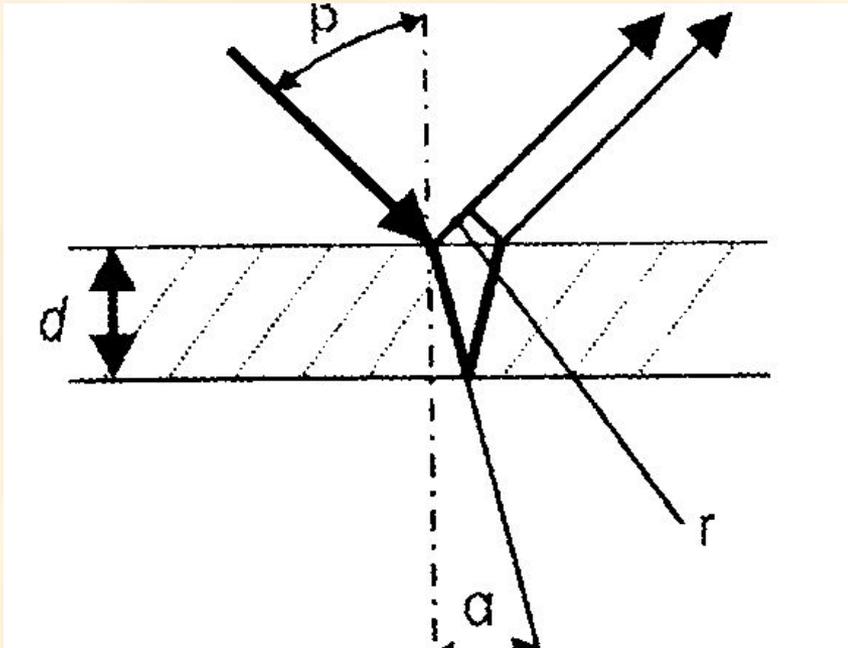


Интерференция света

- Наблюдается при определенных условиях при наложении нескольких световых пучков. Интенсивность света в области перекрытия пучков – чередующие светлые и темные полосы.
- При интерференции белого света интерференционные полосы окрашены в различные цвета спектра.
- Интерференция световых волн заключается в сложении колебаний частот k различными фазами:

$$E = E_1 + E_2 = A \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} r_1\right) + A \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} r_2\right)$$

Интерференция в тонких пленках

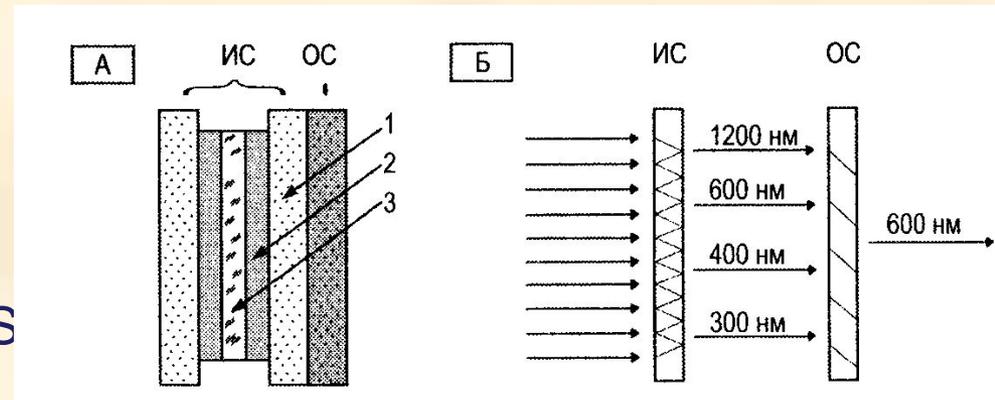


Ход лучей в тонком слое полупрозрачного вещества

- Белый свет, падая на пленку, частично проникает в пленку, отразившись от нижнего слоя, выходит из нее. Лучи отраженного света когерентны, т. к. происходят от одного входного луча, но имеют разность фаз, определяемую толщиной пленки, углом падения и длиной волны света

Интерференционный светофильтр

- Имеет слои из нескольких тончайших непоглощающих слоев из диэлектрических материалов – окислов Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 , фторидов MgF_2 , CaF_2 , LiF , сульфидов ZnS , CdS и др. Наносятся на стекло вакуумным напылением. Внешние слои из металлов – служат полупрозрачными зеркалами.
- Белый свет при прохождении через систему с многочисленными границами многократно переотражается. Часть лучей ослабляется значительно, а часть – в 10^3 - 10^6 раз



А. ИС-интерференционная система, ОС-отрезающая система. 1-стеклянные плоскопараллельные пластинки, 2-полупрозрачные металлические слои, 3-диэлектрические слои

Б. Преобразование белого света интерференционным светофильтром с рабочей длиной волны 600 нм

Полоса пропускания светофильтра

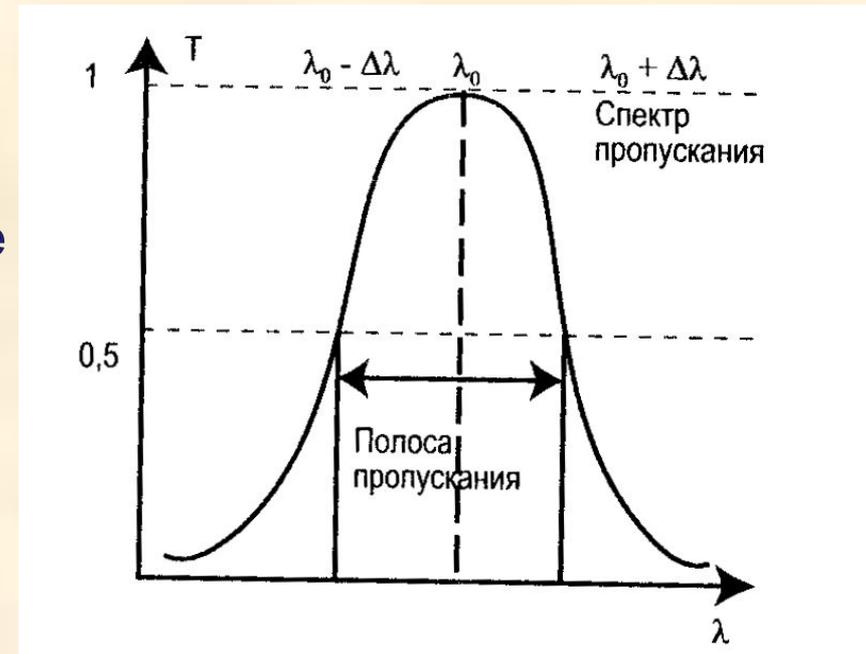
Полоса пропускания тем меньше, чем больше слоев имеет светофильтр.

Отрезающая система подавляет все частоты, кроме рабочей

Технически возможно изготовление светофильтров с полосой пропускания до 1 нм.

В клинической биохимии используются светофильтры с полосой пропускания 10 нм

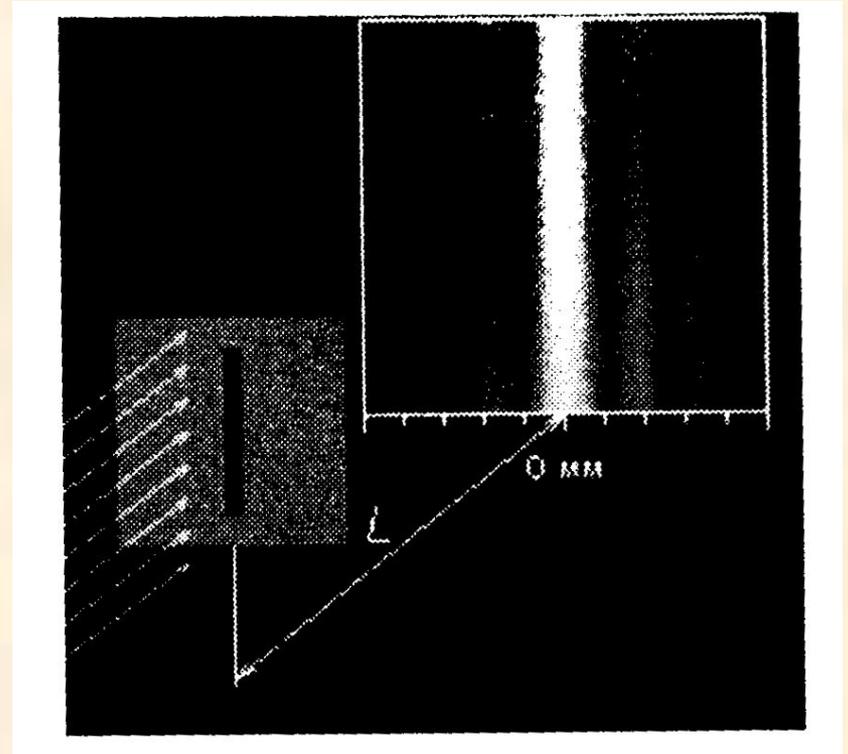
Светофильтры в фотометрах используются в качестве монохроматоров



•

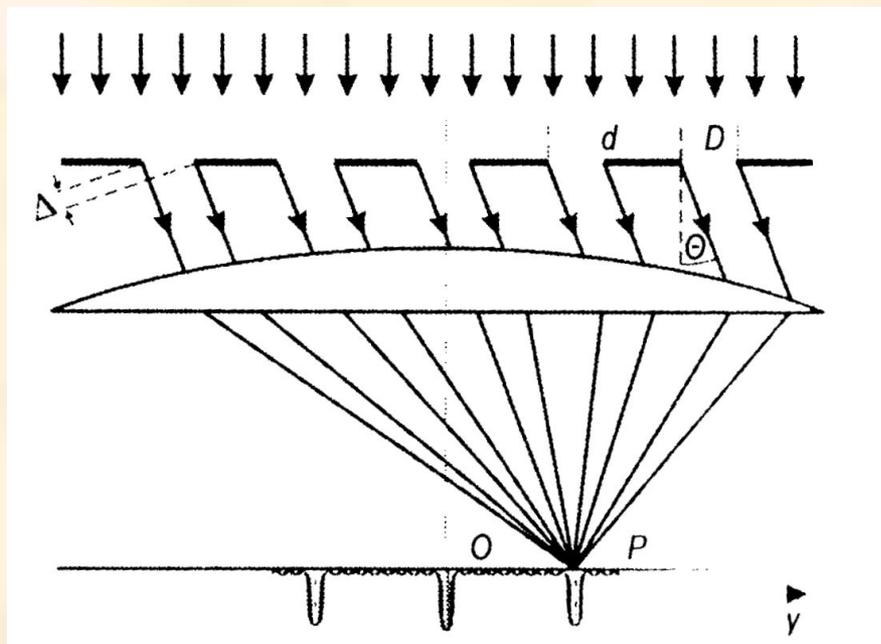
Дифракция света

- Отклонение света от прямолинейного распространения, когда свет огибает контур непрозрачных тел.
- Является следствием проявления волновых свойств света
- На щель падает световая волна, фокусирую линзой свет, прошедший через щель, можно наблюдать чередование максимумов и минимумов освещенности



Дифракция пучка света в узкой щели. В области геометрической тени светлые полосы. Изображение размыто

Дифракция света на решетке

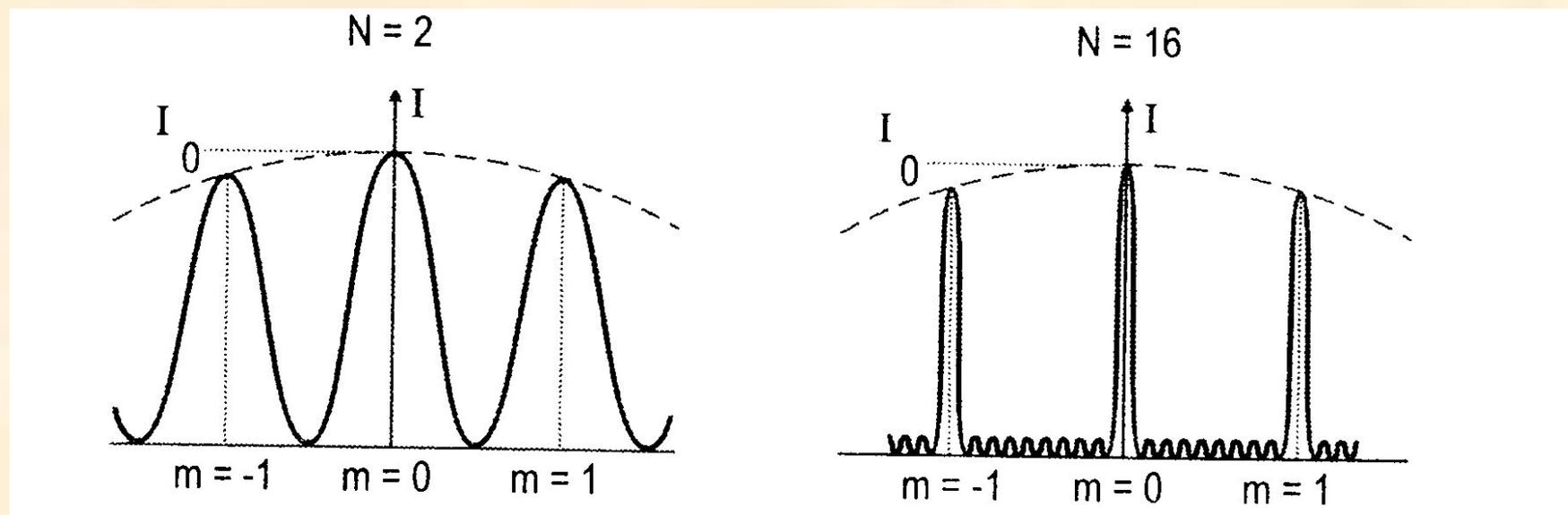


- Дифракционная решетка состоит из прозрачных участков, разделенных непрозрачными промежутками. На решетку направляется параллельный пучок света.
- В каждой точке P на экране соберутся лучи, которые до линзы были параллельны и отклонились на решетке под определенным углом (дифракционный максимум)



Рис. 23. Разложение белого света в спектр с помощью дифракционной решетки.

Распределение интенсивности при дифракции монохроматического света на решетках с различным количеством щелей

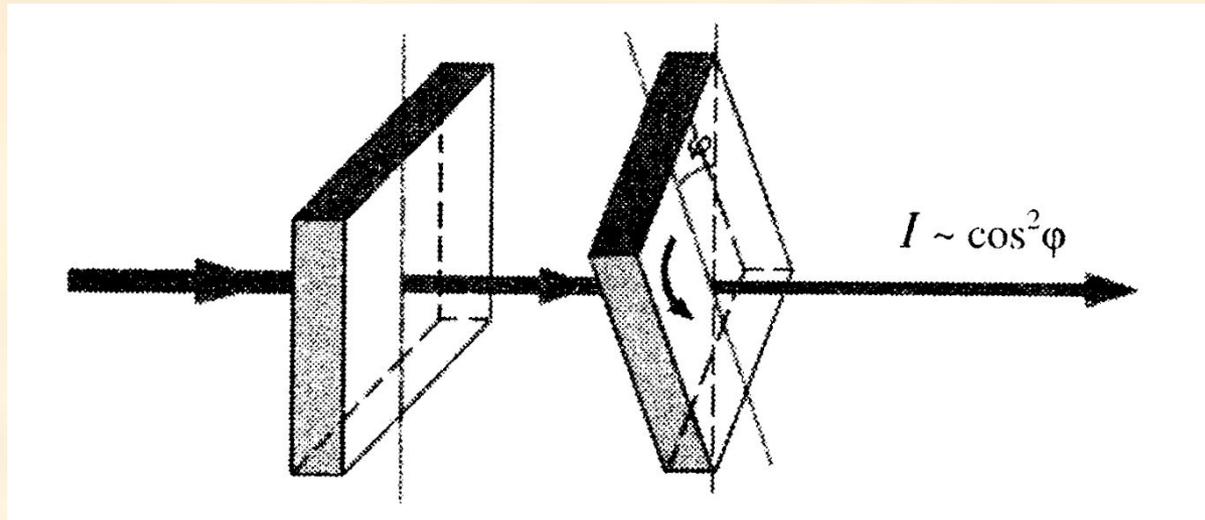


I_0 – интенсивность колебаний при дифракции света на одной щели

Решетка является составной частью **монохроматоров**

Поляризация света

- Выделение из пучка естественного света лучей, поляризованных в определенной плоскости

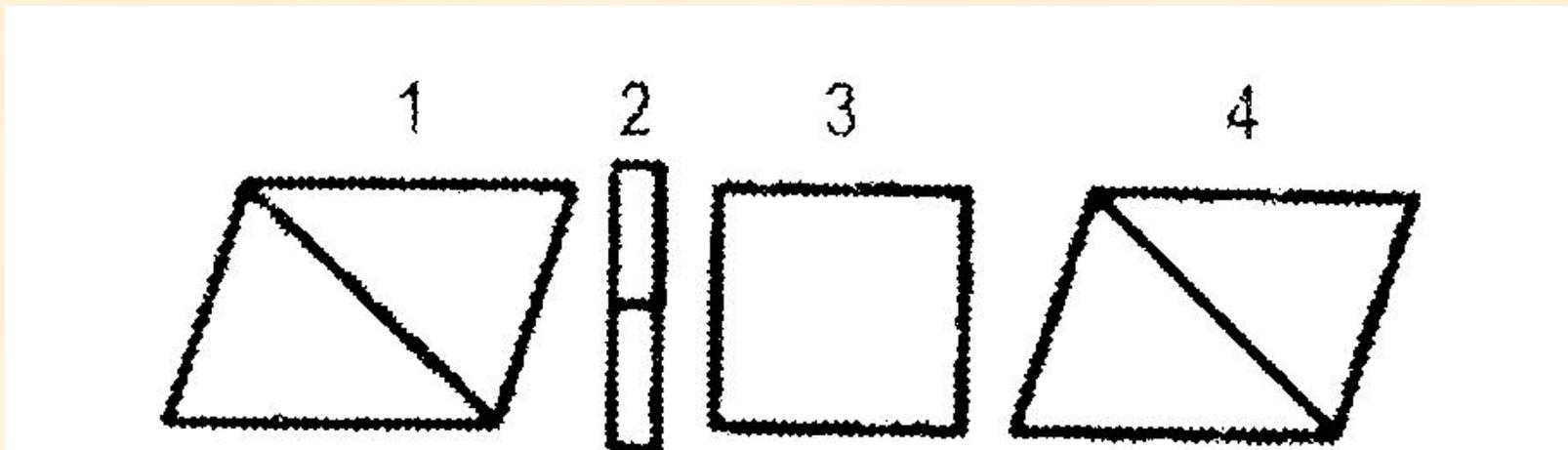


Левая пластинка (турмалин) выделяет электромагнитные колебания с вертикально направленным вектором E . Интенсивность света, прошедшего через правую пластинку (анализатор), зависит от угла поворота анализатора

Поляриметрия

- **Оптически активные вещества** – способны изменять (вращать) плоскость поляризации.
- **Поляриметрический метод** основан на измерении угла вращения плоскости поляризации луча света, прошедшего через оптически активную среду, помещенную между поляризатором и анализатором
- **Оптическая активность вещества обусловлена**
 - Особенностью кристаллической решетки вещества (кристаллы, хлорид натрия и др.)
 - Особенностью строения молекулы вещества (растворы органических веществ – глюкозы, винной кислоты и др.)

Схема простейшего поляриметра



1 – поляризатор, 2 – пластинка бикварца, 3 – кювета с раствором, 4 - анализатор

Колориметрия

- Оптические свойства окрашенных растворов.
- Свет отражается от стенок, поглощается раствором.

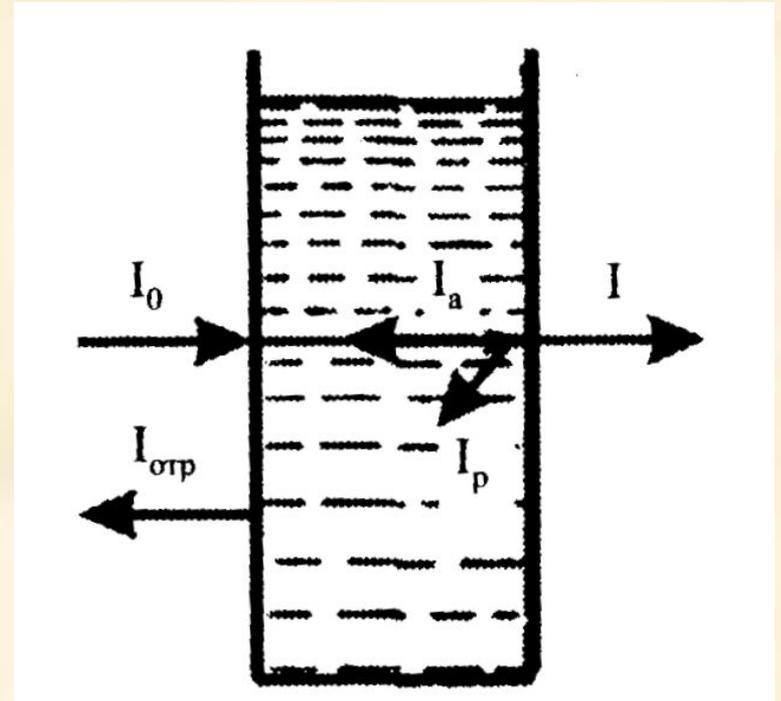
$$I = I_0 - I_{\text{отр}} - I_p - I_a$$

$$\frac{I}{I_0} = \frac{(1-A)I_0^{\text{ex}}}{I_0^{\text{ex}}} = (1-A) = T$$

Коэффициент пропускания

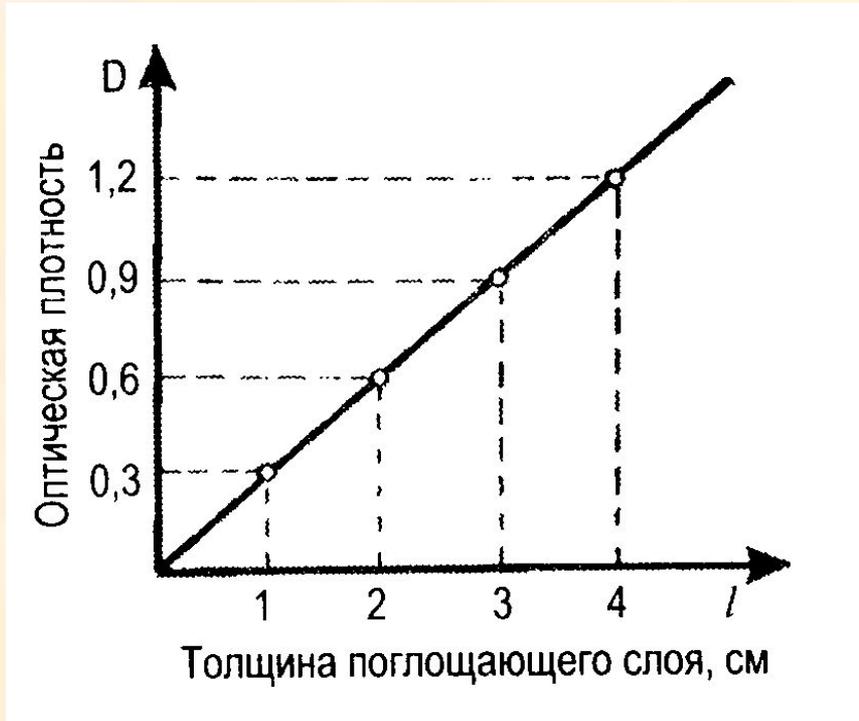
$$D = \lg \frac{1}{T}$$

Оптическая плотность



Закон Бугера-Ламберта

- Интенсивность окраски выражают величиной оптической плотности
- Однородные слои одного и того же вещества поглощают ту же долю падающей на них световой энергии
- Оптическая плотность вещества прямо пропорциональна толщине поглощающего слоя
- Степень поглощения вещества зависит от числа частиц в единице объема (концентрации)
- $D = k * l * C$
- k – показатель поглощения
- L – толщина слоя
- C – концентрация вещества



Зависимость оптической плотности от толщины поглощающего вещества

Колориметрические методы измерений

• **Визуальные методы**

Метод цветowych шкал (определение H_b по цвету капиллярной крови)

Метод разбавления (определение H_b по Сали)

Метод уравнивания интенсивности окраски (определение H_b на компараторе цвета –сравнение с цветными стандартами)

Метод диафрагм или оптического клина (сравнение с окраской стандарта)

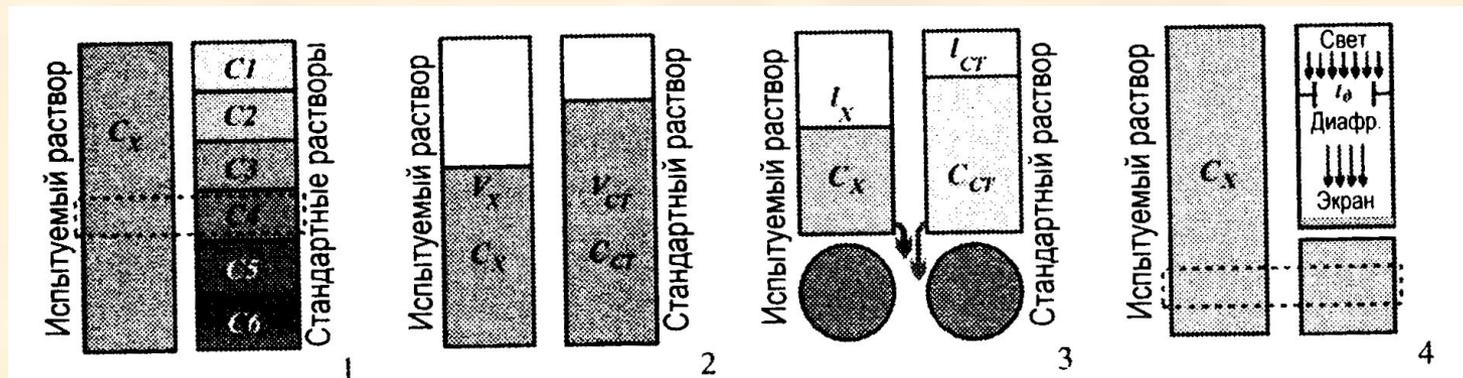
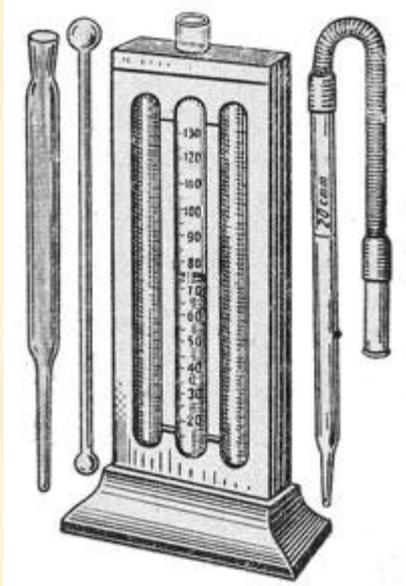


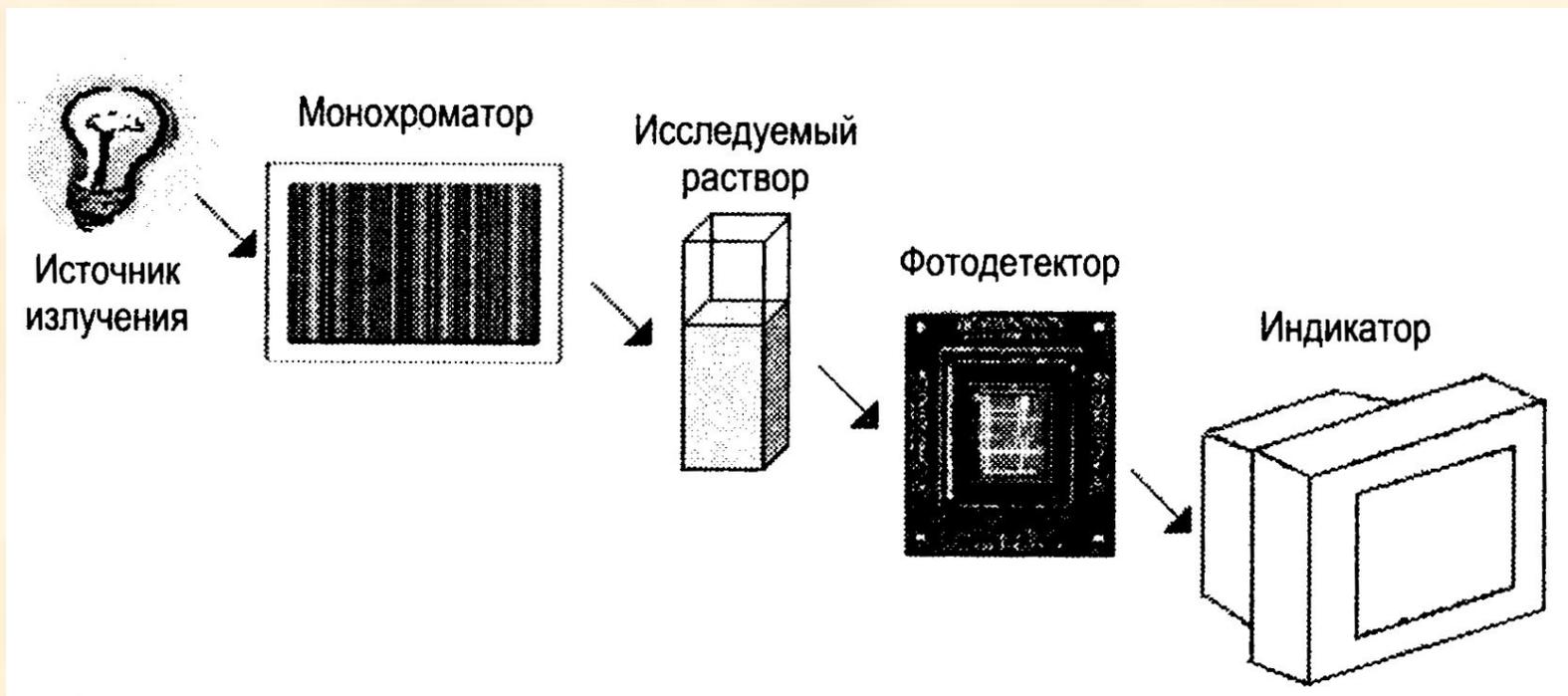
Рис. 48. Визуальные методы колориметрии. 1 — метод цветowych шкал (стандартных серий); 2 — метод разбавления; 3 — метод уравнивания интенсивности окраски; 4 — метод диафрагм или оптического клина.



www.mirid.com.ua

Фотоэлектрические методы

- Определение мощности светового потока, прошедшего через исследуемый раствор с помощью фотодетекторов



Молярный показатель поглощения

- В кювете с фиксированной длиной оптического пути (1 см) оптическая плотность и концентрация связаны через молекулярный показатель поглощения ϵ_{λ} . Он специфичен для каждого вещества, определяется структурой вещества, характеризует способность молекул вещества поглощать свет с длиной волны λ и не зависит от концентрации вещества

$$\epsilon_{334} = 6,18 \cdot 10^3 \text{ л/(моль} \cdot \text{см)}^{-1} \text{ — для НАД} \cdot \text{Н и НАДФ} \cdot \text{Н}$$

$$\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ л/(моль} \cdot \text{см)}^{-1} \text{ — для НАД} \cdot \text{Н и НАДФ} \cdot \text{Н}$$

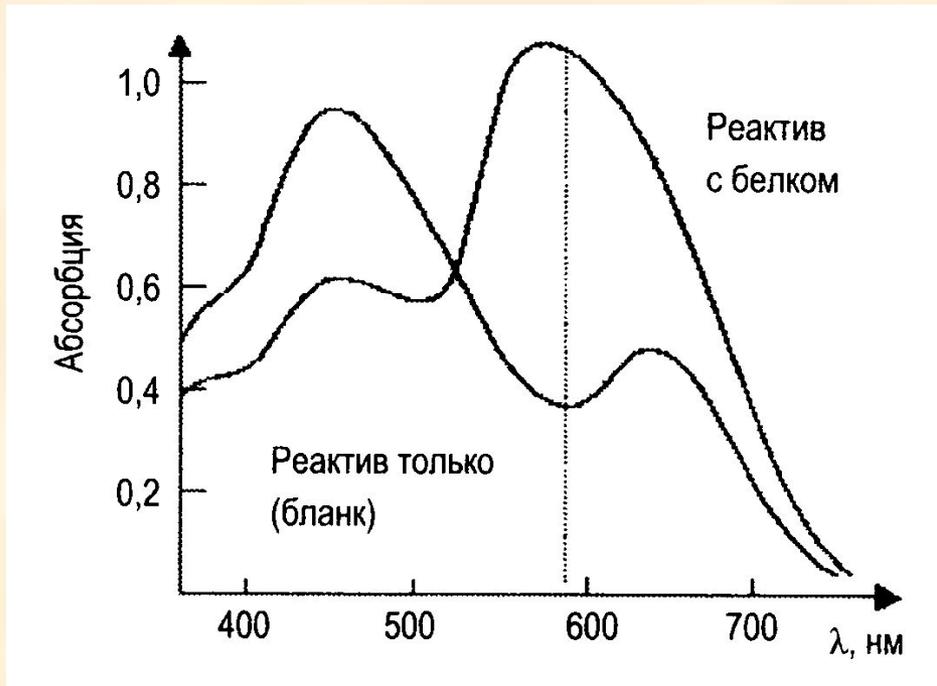
$$\epsilon_{365} = 3,4 \cdot 10^3 \text{ л/(моль} \cdot \text{см)}^{-1} \text{ — Для НАД} \cdot \text{Н}$$

$$\epsilon_{365} = 3,5 \cdot 10^3 \text{ л/(моль} \cdot \text{см)}^{-1} \text{ — Для НАДФ} \cdot \text{Н}$$

- Единица измерения ϵ_{λ} л/(моль*см)⁻¹ (если С в моль/л, длина оптического пути – 1 см)

Измерение в многокомпонентных растворах

- Принцип аддитивности – поглощение отдельного вещества не зависит от других веществ, обладающих собственным поглощением



Спектр поглощения Кумасси бриллиантового синего без белка и в соединении с белком

Измерение в максимуме спектральной полосы поглощения

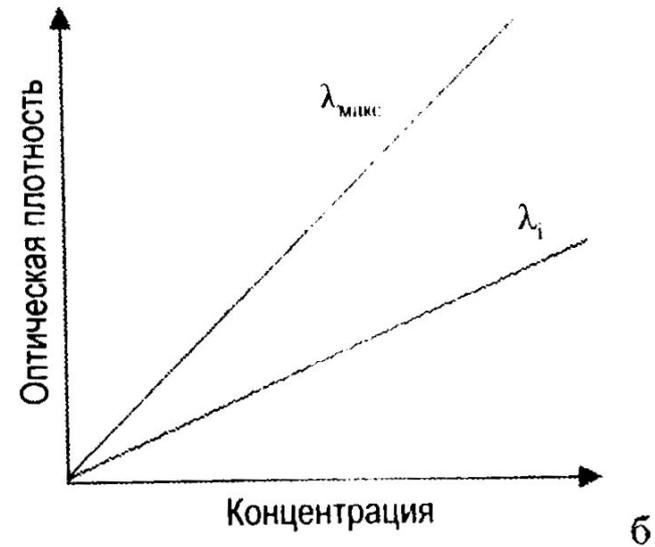
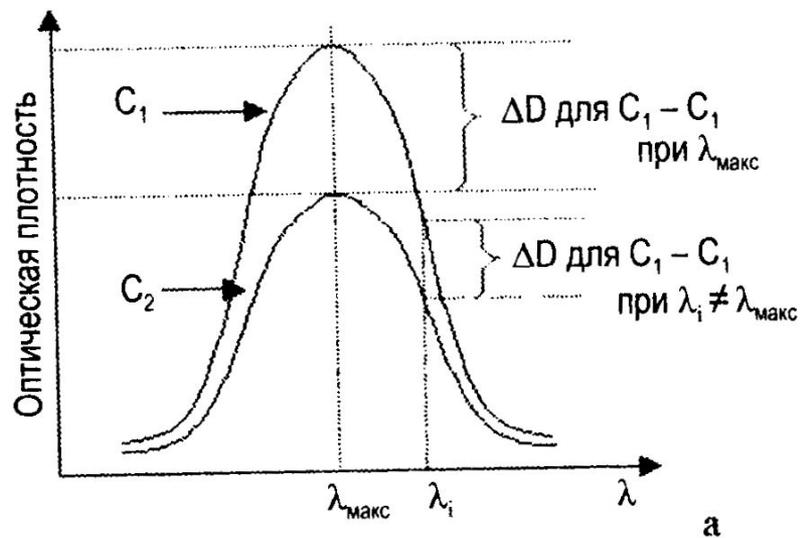
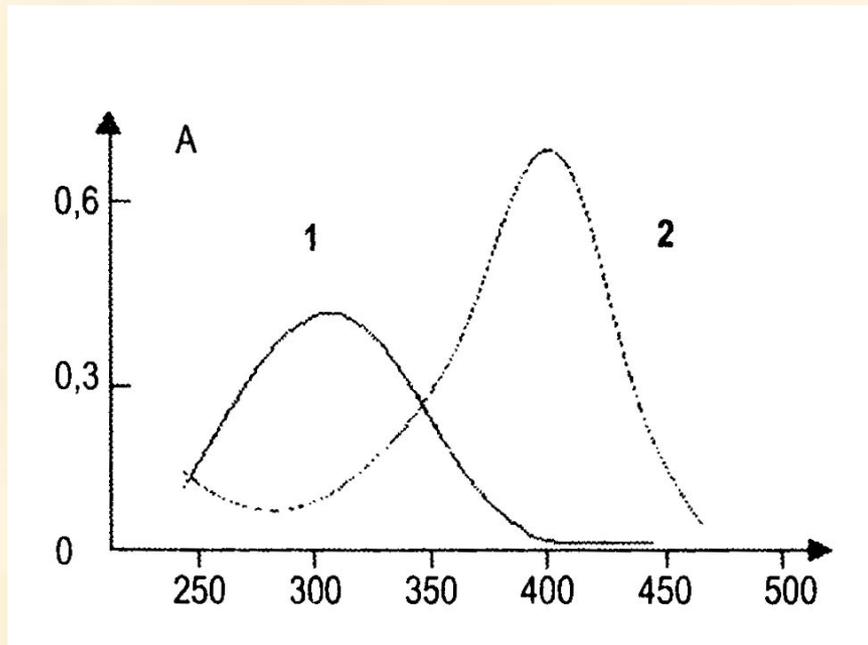


Рис. 59. Фотометрическая чувствительность: а — определение разницы двух концентраций аналита ($C_1 - C_2$) существенно выше при измерении на $\lambda_{\text{макс}}$, соответствующей максимальному коэффициенту молярной экстинкции аналита; б — зависимость изменения оптической плотности от изменения концентрации имеет больший tg при измерении на $\lambda_{\text{макс}}$, т. е. большую чувствительность.

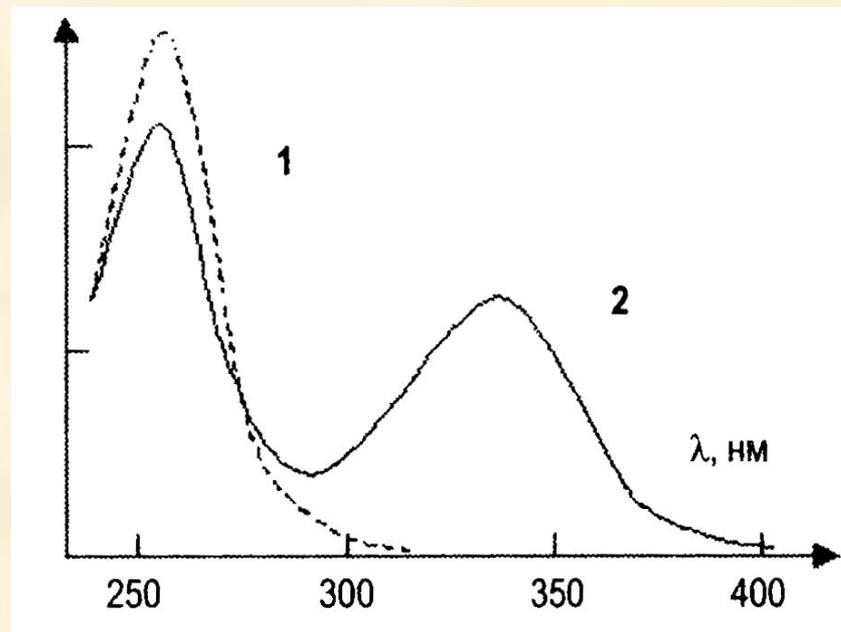
Спектральные характеристики хромогенов

Максимум поглощения в воде, $\lambda_{\text{макс}}$, нм	Молярный показатель поглощения, ϵ , (л/моль · см)	Субстрат	Хромоген	Применение в клинической химии
340	6220	НАД ⁺ , НАДФ ⁺	НАД·Н, НАДФ·Н	Оптический тест Варбурга
400	18300	p-нитро-фенил-фосфат	p-нитрофенол	Определение активности фосфомоноэстераз. При 400 нм поглощает субстрат, поэтому измерение проводят при 405 нм
420	21300	o-нитро-фенил- β -D-галактопиранозид	o-нитрофенол	Определение активности β -галактозидазы (лактазы), определение концентрации натрия энзиматическим методом
550	26600	фенолфталеин- β -D-глюкуро-нид	фенолфталеин	Определение активности β -глюкуронидазы
550			Комплекс Cu^{+2} с белком	Биуретовый метод определения белка
595			Комплекс белка с красителем Кумасси G250	Метод Брэдфорда определения белка в моче
600		тимолфталеинфосфат	тимолфталеин	Определение активности щелочной фосфатазы

Спектры поглощения



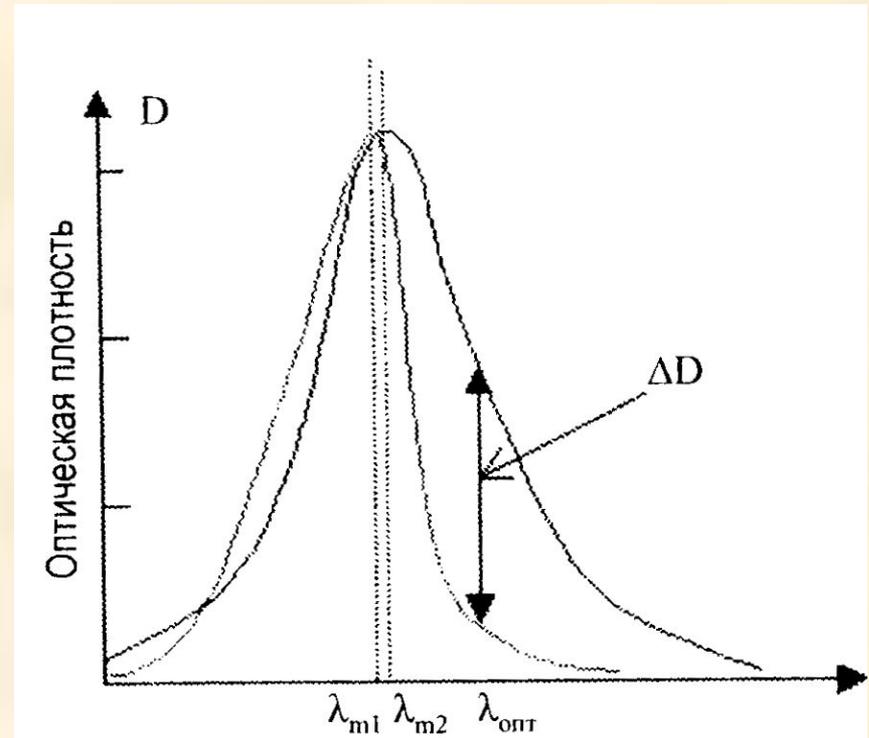
- 4-нитрофенолфосфата (1) и 2-нитрофенольного аниона (2), образующегося при расщеплении субстрата



- Спектры поглощения НАД⁺ (1) и НАДН (2)

Измерение на оптимальной длины волны

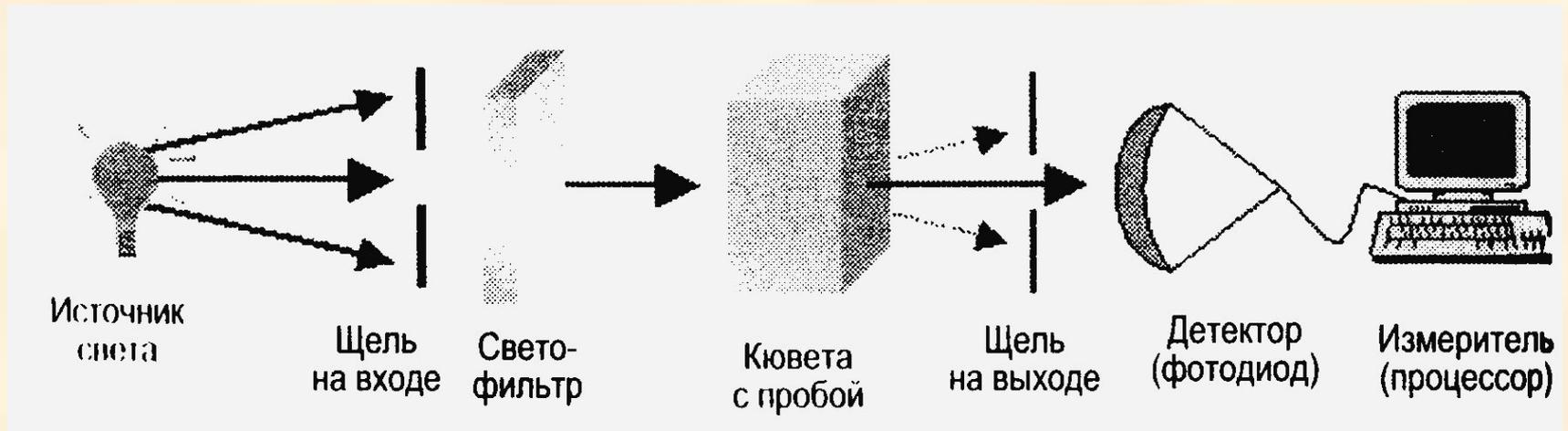
- Если в многокомпонентной системе несколько компонентов имеют максимум поглощения в одной области, то измерение проводят на длине волны, на которой существенно различаются оптическая плотность рабочего раствора и исследуемого вещества



Приборы для фотометрического анализа

Фотометр

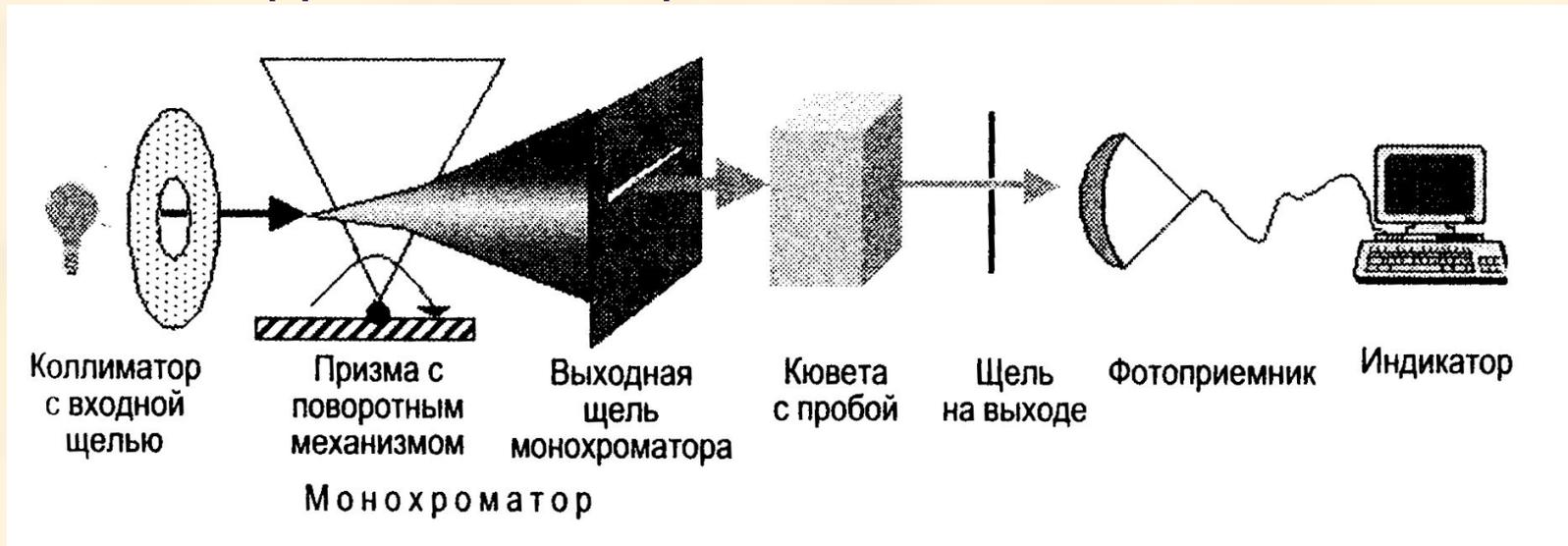
- Оптический прибор, позволяющий измерять световой поток на фиксированных длинах волн



Основные компоненты одноканального фотометра

Спектрофотометр

- Оптический прибор, который разлагает световой поток на непрерывный спектр и позволяет измерять его на любой длине волны в пределах оптического диапазона. Используется диспергирующая призма или дифракционная решетка



Основные компоненты спектрофотометра

Источники света

- Тепловые источники – **лампы накаливания** (вольфрамовая спираль, 2500-2700°, диапазон 340-1000 нм). При испарении материала нити колба темнеет, а нить становится тоньше
- Время работы – 100 часов

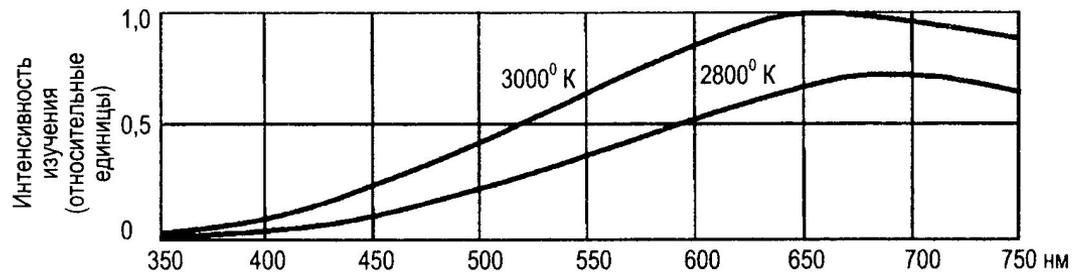
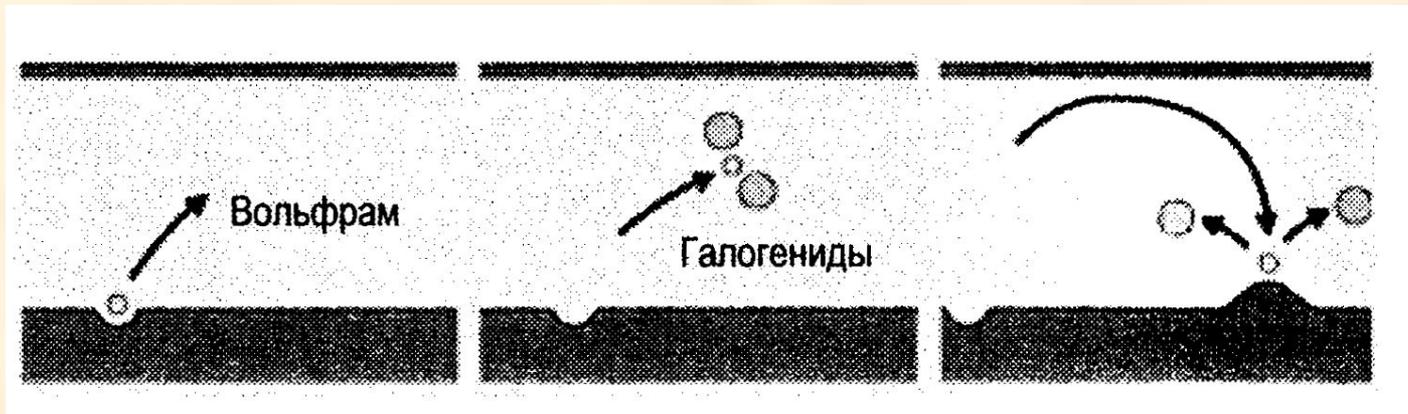


Рис. 83. Спектры вольфрамовой лампы накаливания при температурах 3000°K и 2800°K.

Спектры вольфрамовой лампы накаливания

Источники света

- **Галогеновые лампы** – содержат газ-наполнитель с добавкой галогенов (устраняется потемнение колбы)
- Уменьшен размер колбы
- Время работы до 4000 часов



Источники света

- Газоразрядные лампы

Водородные и дейтериевые лампы (кварцевая трубка, содержащая анод катод, заполненная водородом или дейтерием). Дают непрерывный спектр в УФ-области (185-360 нм)

Дуговые ртутные лампы (люминесцентно-тепловые). Имеют самонагревающиеся фольфрамовые электроды, покрытые оксидной пастой. В лампе – строго определенное количество ртути и спектрально чистый аргон. Основная часть излучения – дуговой разряд паров ртути, имеющее линейчатый спектр

Дуговые ртутные лампы

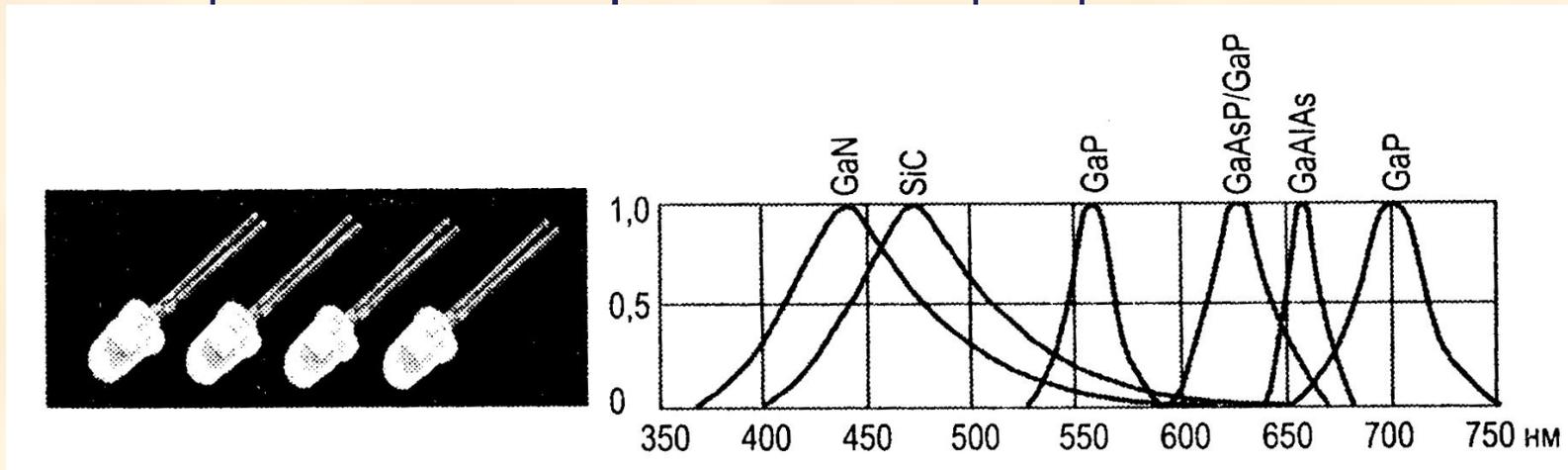
Таблица 13. Относительное распределение потока излучения ламп типов ДРТ-230, ДРТ-400 и ДРТ-1000

Длина волны спектральной линии, нм	Поток излучения линии, %	Длина волны спектральной линии, нм	Поток излучения линии, %
248,2	10,5	302,2	31,2
253,7	26,1	312,6	68,0
265,2	23,4	334,1	6,6
270,0	4,1	365,0	100,0
275,3	3,2	404,7	35,9
280,0	10,3	435,8	62,4
2894	5,0	546,1	71,8
296,7	14,3	577,0	70,4

Срок службы – 1500 – 3000 часов

Источники света

- Светоизлучающие диоды – полупроводниковые приборы, преобразующие электрическую энергию в энергию оптического излучения на основе инжекционной электролюминисценции.



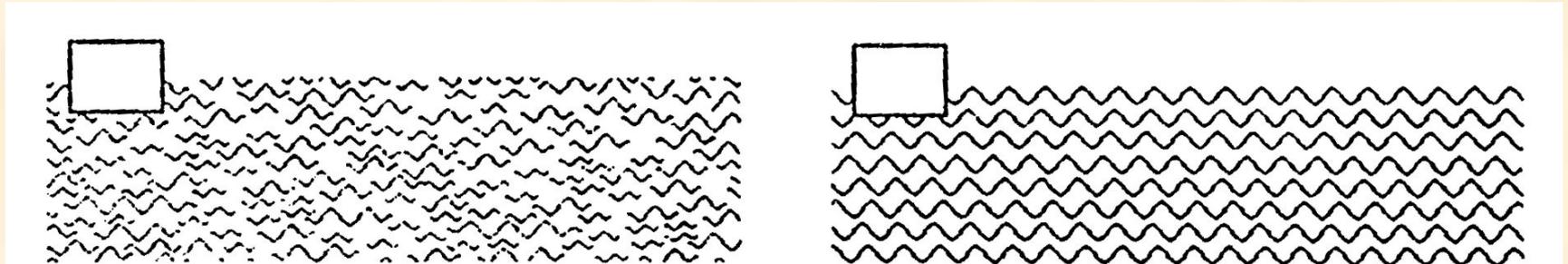
Инжекционные фотодиоды и их нормализованные спектры

Источники света

- Лазеры – оптические квантовые генераторы

Узко направленный пучок

Когерентность (луч характеризуется высокой монохроматичностью и минимальным рассеиванием в однородной среде)

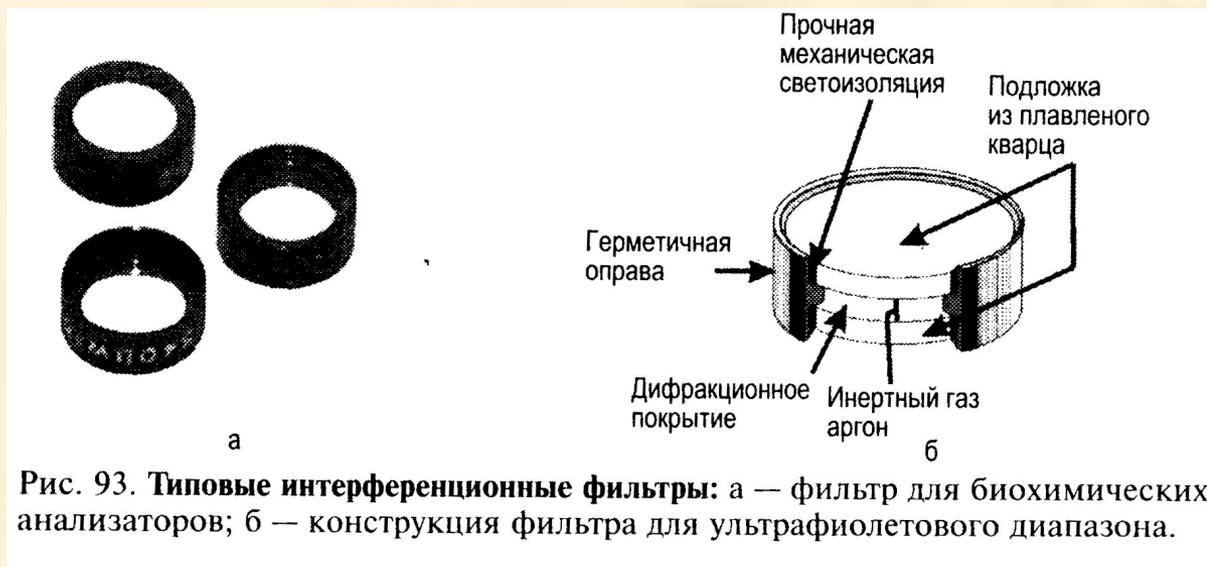


Некогерентный световой пучок

Когерентный световой пучок

Спектральная фильтрация

- - **стеклянный абсорбционный фильтр** (пропускает свет относительно широкого диапазона – более 50 нм)
- - **комбинация широкополосных и отрезающих стеклянных фильтров** (несколько широкополосных и отрезающих фильтров можно получить фильтр с более узкой полосой)
- - **узкополосные интерференционные фильтры** – точность установки длины волны – 2 нм, спектральная полоса 10 нм



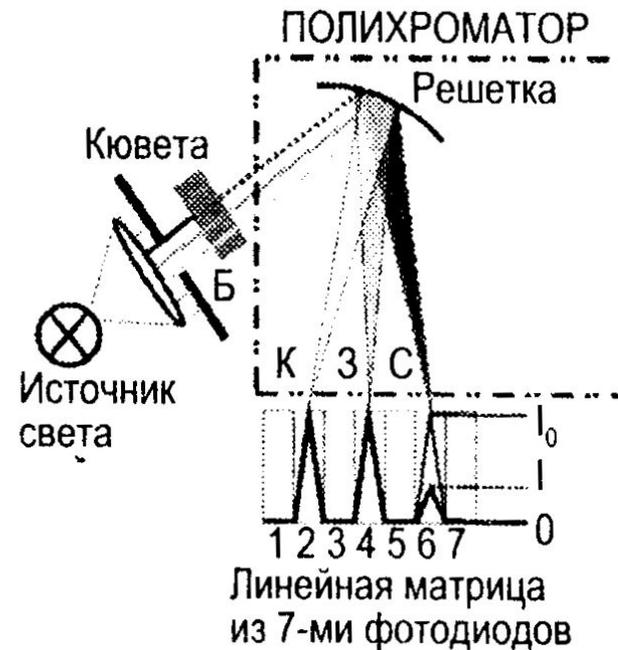
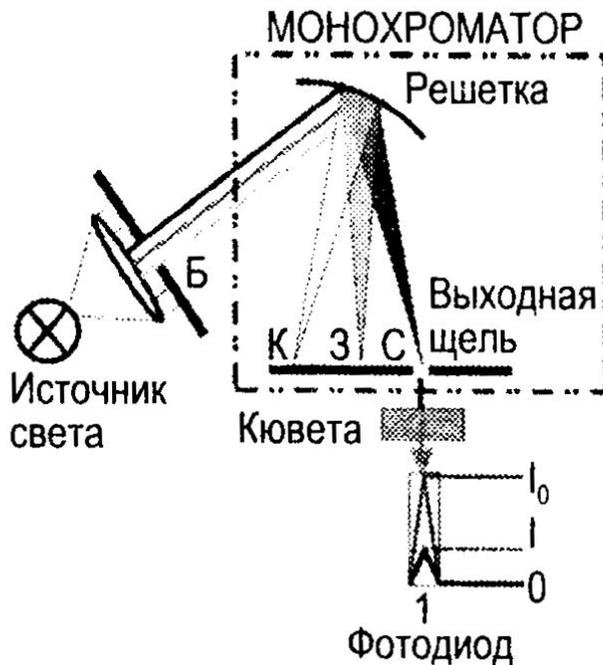
Монохроматор

- система выделения излучательной энергии необходимой длины волны и подавления других волн
 - *входная щель*
 - *коллиматор*
 - *диспергирующее устройство*
 - *фокусирующий объектив*
 - *выходная щель*

Монохроматор

- ***Входная и выходная щель*** – получение достаточно резкого и четкого изображения спектральной линии оптического излучения
- ***Коллиматор*** – получение параллельных пучков белого света, направленных на диспергирующую систему (объектив или вогнутое зеркало, в фокусе которого)
- ***Диспергирующее устройство*** (призма, дифракционная или голографическая решетка)

Полихроматор



Спектр воспринимается матрицей фотоприемников. Рабочая спектральная полоса определяется размером фотоприемника. Оптическая плотность может измеряться одновременно каждым фотоприемником матрицы в соответствующей этому приемнику спектральной полосе

Кюветы

- Стеклянные кюветы – не пропускают УФ
- Для $\lambda < 300$ нм – кюветы из кварца
- Пластиковые кюветы из полистирола макротипа 10x10x45 ($V = 1,0$ мл), полумикрокюветы 10x4x45 ($V = 0,5$ мл) и полумикрокюветы 10x2x45. Спектральные характеристики близки к кварцевому стеклу
- Групповые кюветы (для фотометров с вертикальным фотометрированием)

Приемники оптического излучения

- Электровакуумные фотоэлементы
- Фотоэлектронные умножители (кроме фотокатода и анода содержит фокусирующую электронно-оптическую систему, диафрагму и дополнительные электроды)
- Фотодиоды – полупроводниковые приборы основанные на внутреннем фотоэффекте

Устройства считывания

- Стрелочные гальванические элементы (измерение тока напрямую или индикатор нуля при выравнивании сигнала по бланку)
- Цифровые индикаторы со светодиодными элементами (обеспечивают изображение чисел, соответствующее оптической плотности или концентрации)
- Жидкокристаллические индикаторы

Регистрирующие устройства

- Используют малогабаритные принтеры со струйной печатью или термопечатью.
- Некоторые спектрофотометры оборудованы графопостроителями для отражения фотометрических данных



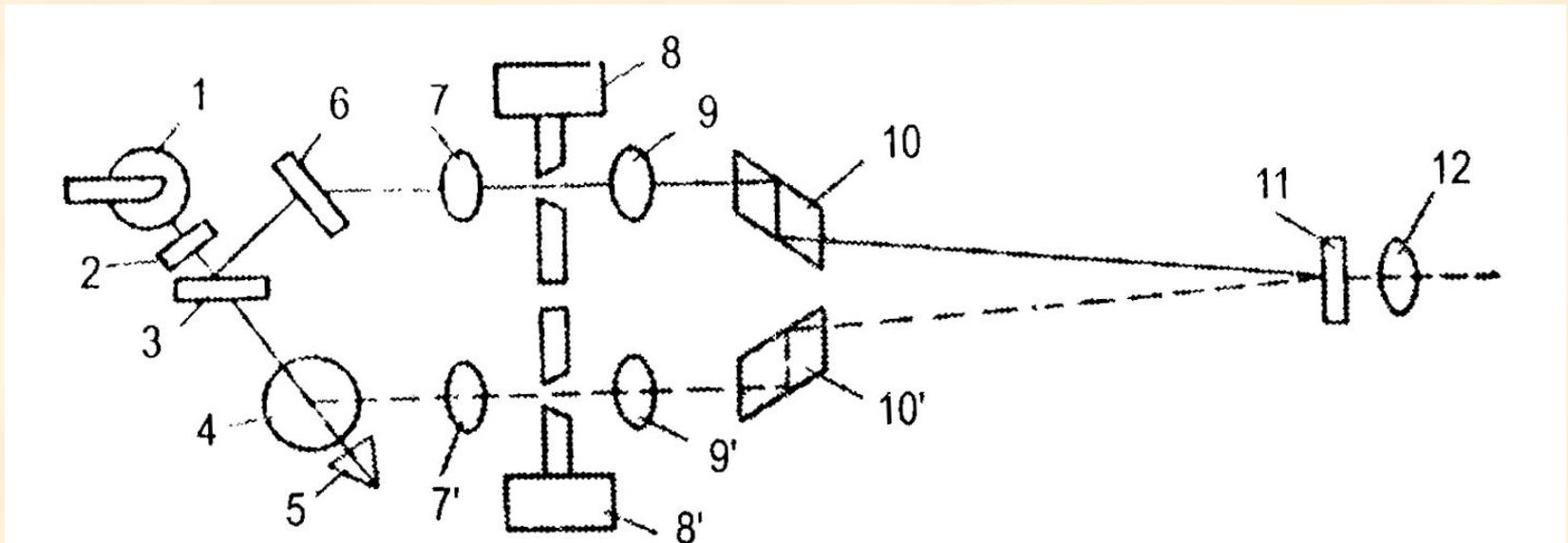


<http://osd.prom.ua...>



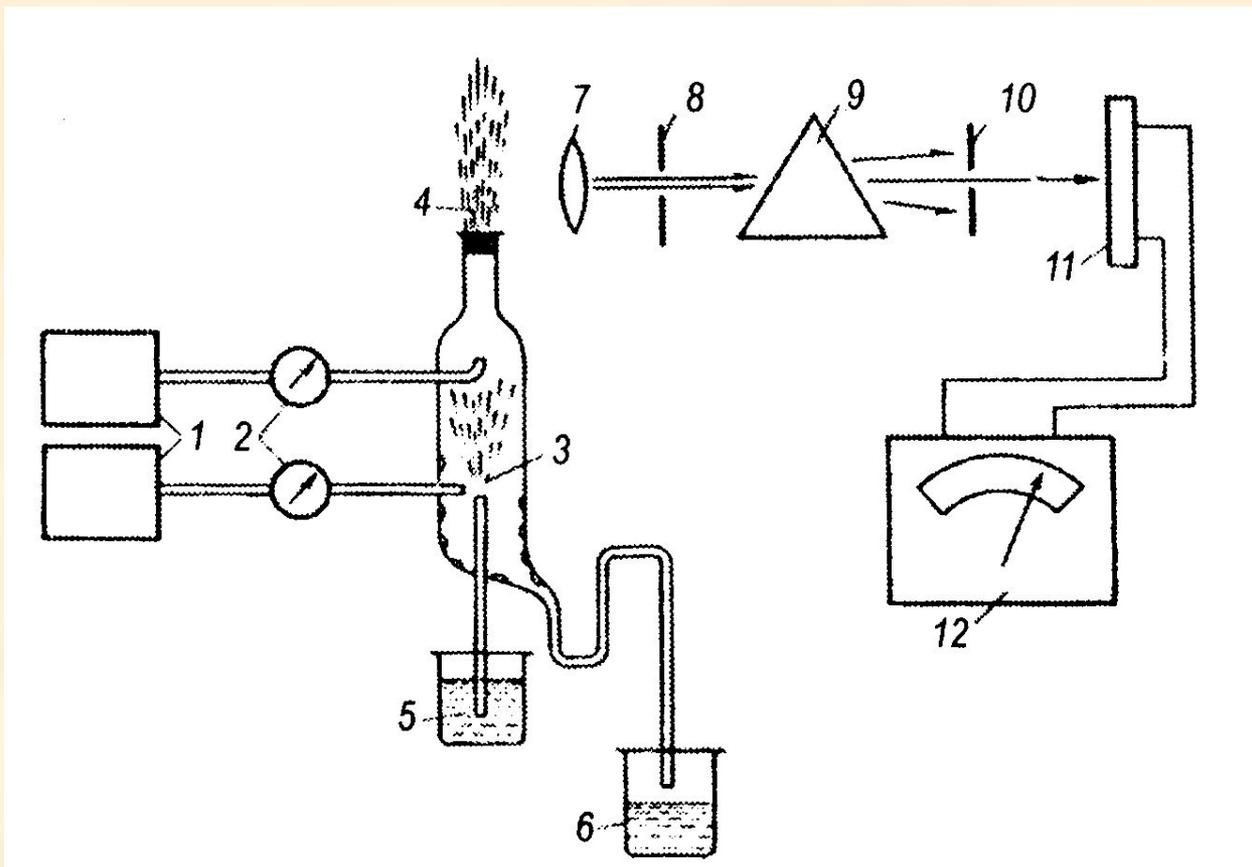
СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

Оптическая схема нефелометра



1 – лампа, 2, 11 – светофильтры; 3 – стеклянная пластинка, разделяющая свет на 2 пучка; 4 – кювета с исследуемым раствором; 5 – ловушка света; 7, 8, 9 – линзы; 8 – уравнивательные диафрагмы; 10 – ромбические призмы; 12 – окуляр

Схема пламенного фотометра



1 – цилиндры с топливом и воздухом; 2 – клапаны регуляции давления и устройства для измерения расхода газов; 3 – распылительная камера; 4 – устройство для осушения распылительной камеры; 5 – фокусирующая линза; 6 – входная щель монохроматора; 7 – призма, разделяющая свет по длине волны; 8 – выходная щель монохроматора; 9 – фотодетектор; 10 – фотоэлектрод; 11 – фотоэлектрод; 12 – фотоэлектрод

