

## ЛЕКЦИЯ 2. Методы спектрофотометрического анализа

1. Теоретические аспекты спектрофотометрического анализа. Излучение, энергия и структура атомов
2. Основные законы поглощения света
3. Техника проведения анализа, устройство приборов, работающих в видимой и УФ-области спектра
4. Основные методики проведения фотометрического анализа

**1. Теоретические аспекты спектрофотометрического анализа. Излучение, энергия и структура атомов.** К спектроскопическим методам анализа относят физические методы, основанные на взаимодействии *электромагнитного излучения* с веществом. Это взаимодействие приводит к различным энергетическим переходам, которые регистрируются экспериментально в виде поглощения излучения, отражения и рассеяния электромагнитного излучения. Если исследуют поглощение электромагнитного излучения в видимой части спектра, то это фотометрический вид анализ (рисунок 1). То есть фотометрический анализ является частным случаем спектроскопического анализа.

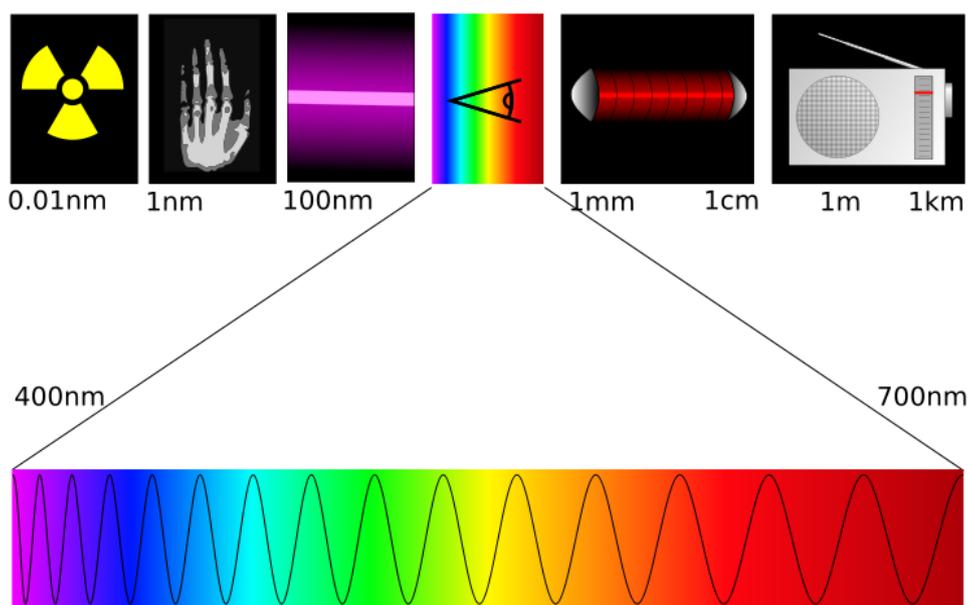


Рисунок 1 – Электромагнитный спектр

Электромагнитное излучение имеет двойственную природу. В одних проявлениях ведет себя как физическое поле с непрерывными свойствами (преломление, интерференция, дифракция, отражение, рассеяние), которые описываются на основе волновой природы излучения. В других случаях электромагнитное излучение проявляет себя как поток дискретных частиц (квантов), и такие явления, как испускание и поглощение атомами и молекулами, описываются на основе корпускулярной природы излучения.

К волновым характеристикам излучения относятся **частота** колебаний, **длина волны** и **волновое число**, к квантовым – **энергия** квантов. Связь между корпускулярной и волновой природой излучения определяется соотношением Планка:

$$\Delta E = h\nu = hc / \lambda = hc\bar{\nu} \quad (0.1)$$

где  $\Delta E$  – изменение энергии элементарной системы при излучении или поглощении кванта с энергией  $h\nu$ ,

$h$  – постоянная Планка, равная  $6,62 \cdot 10^{-34}$  Дж с,

$c$  – скорость излучения в вакууме (см/с).

В системе СИ энергию измеряют в джоулях, в спектроскопии обычно используют внесистемную единицу – электрон-вольт ( $1 \text{ эВ} = 1,60 \cdot 10^{-19}$  Дж).  $\lambda$  – длина волны излучения, в системе СИ измеряется в метрах (м) и его долях. Длина волны электромагнитного излучения связана с его частотой  $\nu$ , которая измеряется в герцах ( $1 \text{ Гц} = 1 \text{ с}^{-1}$ ). В спектроскопии вместо частоты используют волновое число  $\bar{\nu}$ , также называемое частотой (тильда над  $\nu$  обычно опускается). Волновое число принято измерять в обратных сантиметрах,  $\text{см}^{-1}$ .

Электромагнитное излучение при взаимодействии с веществом может вызывать в нем процессы разнообразной физической природы, использующиеся в методах химического анализа. Общий характер этих процессов зависит от энергии фотонов. Следовательно, для классификации методов анализа весь диапазон энергий электромагнитных квантов целесообразно разделить на области, соответствующие тому или иному физическому процессу. В таблице 1.1 указаны основные области электромагнитного излучения, используемые в химическом анализе, диапазоны длин волн, характеризующие область излучения и характер соответствующих процессов.

Для аналитических целей наибольшее значение имеют спектроскопические методы, использующие электромагнитное излучение оптического диапазона. Эти методы делят на оптическую атомную и оптическую молекулярную спектроскопию. В данном разделе речь пойдет о методе анализа, основанном на измерении поглощения света – **молекулярной абсорбционной спектроскопии**.

Метод молекулярной абсорбционной спектроскопии в УФ- и видимой областях спектра обычно называют **спектрофотометрией**. В зависимости от типа абсорбционных спектральных приборов различают фотометрический и спектрофотометрический методы. Их сравнительная характеристика приведена в табл. 1.2.

Таблица 1.1. Области энергий электромагнитного излучения, соответствующие им методы анализа и процессы, лежащие в их основе

Область (метод)	Длина волны	Процесс
Гамма-излучение (ядерно-физические)	$10^{-4}$ – $10^{-1}$ нм	Ядерные реакции
Рентгеновская	$10^{-1}$ – $10^1$ нм	Изменение состояний внутренних электронов
Оптическая УФ	200–400 нм	Изменение состояний валентных электронов
видимая	400–750 нм	
инфракрасная (ИК, КР)	$10^3$ – $10^6$ нм	Изменение колебательных состояний
Микроволновая	$10^{-3}$ – $10^{-1}$ м	Изменение вращательных состояний
Радиочастотная (ЯМР, ЭПР)	$10^{-1}$ – $10^1$ м	Изменение спинов ядер и электронов

Таблица 1.2 Фотометрические методы анализа

Метод,	Тип прибора	Рабочая область спектра, нм	Способ монохромати- зации	Регистрируемы е сигналы
Фотометрия	Фотометр (фото- колориметр)	Видимая 400–750	Светофильтр	Оптическая плотность (А) и пропускание (Т) в диапазоне длин волн, отвечающем полосе пропускания светофильтра
Спектро- фотометрия	Спектро- фотометр	УФ и видимая 100–750	Монохроматор или полихроматор	Оптическая плотность (А) и пропускание (Т) при фиксированной длине волны; электронные спектры поглощения в виде кривых $A =$ $f(\lambda)$ , $A = f(\nu)$ , $T =$ $f(\lambda)$ , $T = f(\nu)$

Оба метода объединяют в одну группу фотометрических методов анализа. Когда определение проводят в видимой части спектра, часто используют термин **фотоколориметрия** (от лат. color – цвет), поскольку имеют дело с окрашенными растворами.

Спектр поглощения, или, более корректно, абсолютный спектр поглощения вещества представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Такие спектры для красителей в видимой области (400—700 нм) имеют иногда несколько максимумов. Спектры поглощения в ультрафиолетовой (200—400 нм) и видимой областях отражают переходы связанных и несвязанных электронов в молекуле. Это обычно делокализованные  $\pi$ -электроны двойных  $C=C$  связей и неподеленные пары азота и кислорода. Поскольку, как правило, электроны в молекуле при комнатной температуре находятся на нижнем энергетическом уровне, спектры в этой области дают информацию об основном и первом возбужденном электронных состояниях молекулы. Ввиду того, что длина волны поглощенного света соответствует определенному переходу, пики на спектрах поглощения вещества обусловлены присутствием в нем известных структур. Группа в молекуле, которая дает вклад в спектр ее поглощения, называется *хромофором*. Такой группой является, например, карбонильная группа  $>C=O$ . При образовании сопряженных связей в молекуле энергия возбужденного состояния электронов уменьшается, и, следовательно, хромофор начинает поглощать свет большей длины волны. Такой сдвиг в спектрах поглощения называется *батохромным*. Наоборот, сдвиг спектра в коротковолновую область именуется *гипсохромным*.

*Гиперхромный* и *гипохромный* эффекты – это соответственно увеличение и уменьшение экстинкции. Обнаружить очень близко расположенные линии колебательных и вращательных переходов на спектрах молекул удастся лишь при высоком разрешении.

*Разрешение* – способность прибора различить две близко расположенные линии.

**2. Основные законы поглощения света.** При прохождении света через равномерно поглощающую среду (рисунок 2) его интенсивность  $I_0$  уменьшается до величины  $I$ . Отношение интенсивностей прошедшего и падающего света  $I/I_0$  называется *пропусканием*  $T$ . Пропускание обычно измеряется в процентах и меняется от 0 до 100%.

Экстинкция — величина безразмерная и изменяется от 0 до  $\infty$ .

*Поглощение*  $A$  или *экстинкция*  $E$  — это величина, равная  $\lg 1/T = \lg I_0/I$ . Для абсолютно прозрачного раствора  $A = 0$ , для абсолютно непрозрачного –  $A \rightarrow \infty$ .

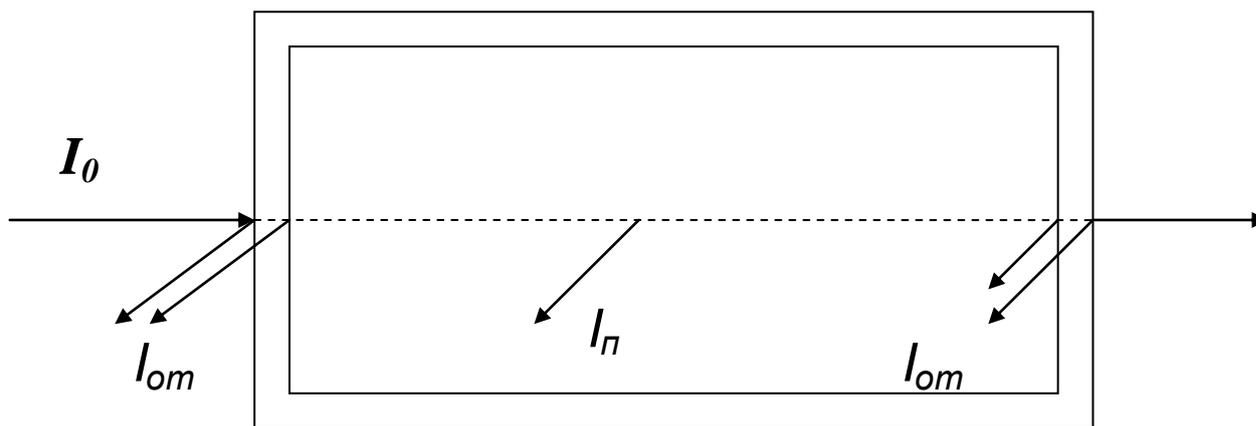


Рисунок 2 – Ход лучей через раствор

Согласно закону *Бугера–Ламберта–Бэра*, экстинкция зависит от природы вещества, пропорциональна концентрации поглощающего вещества и толщине образца, т. е.

$$A = \varepsilon cd,$$

где  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции (поглощение света образцом толщиной в 1 см, содержащим 1 М раствор исследуемого вещества при длине волны  $\lambda$ ),

$c$  – молярная концентрация раствора,

$d$  – оптический путь, или толщина образца в см.

Физический смысл молярного коэффициента поглощения становится ясен, если принять  $l = 1$  см,  $C = 1$  моль/л, тогда  $A = \varepsilon$ .

Следовательно, молярный коэффициент поглощения равен оптической плотности одномолярного раствора с толщиной слоя 1 см. Молярный коэффициент поглощения – индивидуальная характеристика вещества, он зависит от природы вещества и длины волны и не зависит от концентрации и длины кюветы. Поскольку размерность величины  $\varepsilon$  однозначно задана л/моль.см, то ее обычно не указывают, а приводят численное значение. Значение  $\varepsilon$  отражает способность вещества поглощать свет; максимально возможное значение  $\varepsilon$  составляет  $\approx 10^5$ .

Концентрацию растворов веществ с неизвестными молярными массами обычно выражают в массовых долях (%). В этом случае коэффициент поглощения называют удельным коэффициентом поглощения и обозначают символом  $E_{1\text{см}}^{1\%}$ . Последний численно равен оптической плотности 1%-ного раствора при  $l = 1$  см. При другом способе выражения концентрации раствора (например, г/мл или др.) коэффициент поглощения обозначают символами  $a$  или  $k$  и указывают размерность.

С отклонениями от линейной зависимости между оптической плотностью и концентрацией приходится сталкиваться довольно часто. Основные причины этого явления состоят в следующем.

1. Закон Бера справедлив для разбавленных растворов. При высоких концентрациях ( $> 0,01 \text{ M}$ ) среднее расстояние между частицами поглощающего вещества уменьшается до такой степени, что каждая частица влияет на распределение заряда соседних частиц, что, в свою очередь, может изменить способность частиц поглощать излучение данной длины волны.

Коэффициент  $\varepsilon$  в уравнении (1.3) зависит от показателя преломления среды. Увеличение концентрации раствора приводит к значительному изменению показателя преломления  $n$  и отклонению от закона Бера (показатели преломления разбавленных растворов и растворителя отличаются несущественно).

2. Закон справедлив для монохроматического излучения. Строго говоря, уравнение (1.3) следует записывать в виде:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \ell C \quad (0.2)$$

Индекс  $\lambda$  указывает, что величины  $A$  и  $\varepsilon$  относятся к монохроматическому свету с длиной волны  $\lambda$ . Немонохроматичность светового потока связана с несовершенством оптических приборов. Отклонение от закона Бера менее заметно, если длина волны не приходится на часть спектра с резким изменением оптической плотности. На практике измерение  $A$  стремятся проводить в максимуме светопоглощения.

3. Температура при измерениях должна оставаться постоянной хотя бы в пределах нескольких градусов.

4. Пучок света должен быть параллельным.

5. Уравнение (1.3) соблюдается для систем, в которых поглощает только один тип частиц вещества, т.е. отсутствует химическое взаимодействие. Если при изменении концентрации будет меняться природа этих частиц, вследствие, например, кислотно-основного взаимодействия, полимеризации, диссоциации и т. д., то зависимость  $A = f(C)$  не будет линейной, так как молярный коэффициент поглощения вновь образующихся и исходных частиц не будет одинаковым.

Ограничения 1 и 2 являются истинными, остальные называют кажущимися; ограничения (3–5) зависят от условий проведения эксперимента, их связывают с инструментальными причинами. Последнее из ограничений вызвано химическими причинами.

При выполнении закона Бера график зависимости оптической плотности от концентрации представляет собой прямую, проходящую через начало координат (рисунок 3 а), а функция  $A_{\lambda} = f(\lambda)$  имеет один и тот же вид независимо от толщины слоя и концентрации раствора, и положение максимума поглощения сохраняется (рисунок 3 б).

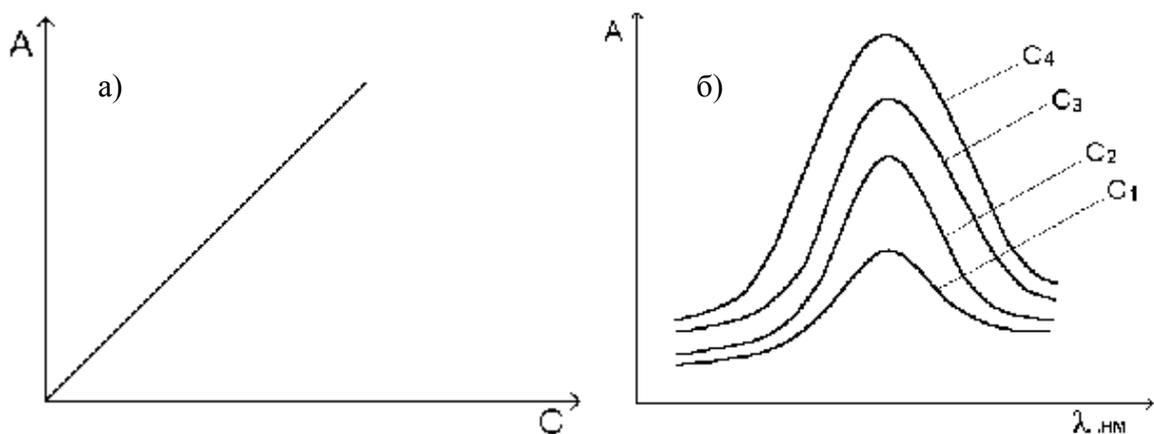


Рисунок 3 – а) зависимость оптической плотности вещества от концентрации при соблюдении основного закона светопоглощения).

б) кривая светопоглощения одного и того же вещества при соблюдении закона Бугера – Ламберта – Бера:  $C_1 < C_2 < C_3 < C_4$ .

**Закон аддитивности.** Оптическая плотность – экстенсивное свойство вещества. Поглощение света каким-либо веществом не зависит от присутствия в растворе других веществ, и оптическая плотность смеси веществ равна сумме оптических плотностей каждого из них. Это справедливо при условии подчинения каждого вещества закону Бугера – Ламберта – Бера и в отсутствие химического взаимодействия между ними. Итак, для смеси  $m$  веществ при одной и той же длине волны имеем:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_m \quad (0.3)$$

или:

$$A_\lambda = \ell(\varepsilon_{\lambda,1}C_1 + \varepsilon_{\lambda,2}C_2 + \dots + \varepsilon_{\lambda,m}C_m) \quad (0.4)$$

Принцип аддитивности (суммирования) оптических плотностей широко используют в аналитической химии.

**3. Техника проведения анализа, устройство приборов, работающих в видимой и УФ-области спектра.** Для получения спектра поглощения необходимо измерить экстинкцию при различных длинах волн, что выполняют с помощью приборов – *спектрофотометров (фотоэлектроколориметров)*.

В спектрофотометре индикатором служит фотоэлемент, ток в котором пропорционален интенсивности падающего на него света. На рисунок 3, а приведена оптическая схема простого спектрофотометра, работающего в видимой области. В качестве *источников света* в видимой области применяются лампы накаливания, а в ультрафиолетовой – водородные или дейтериевые лампы (рисунок 4, 5).

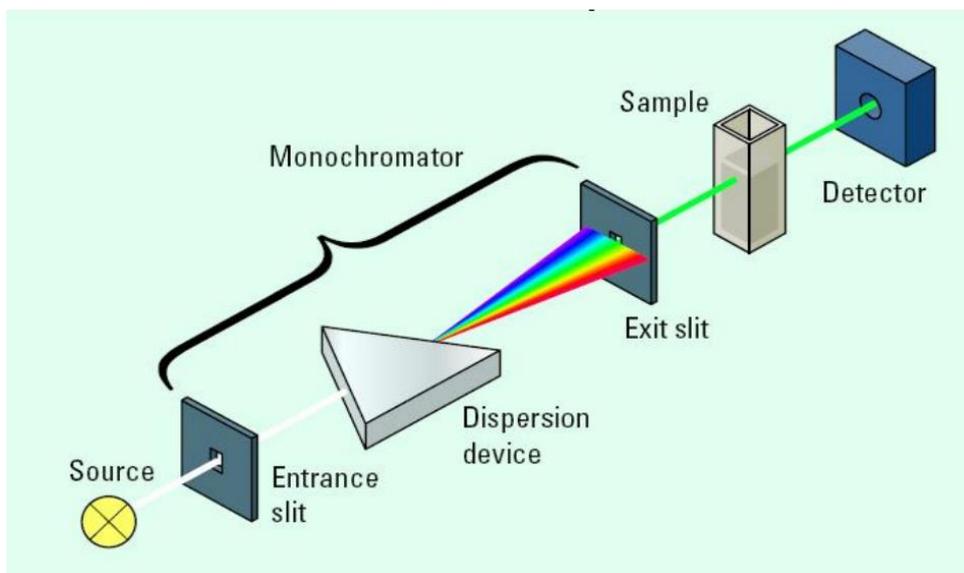


Рисунок 4 – Схема спектрофотометра, работающего в видимой области

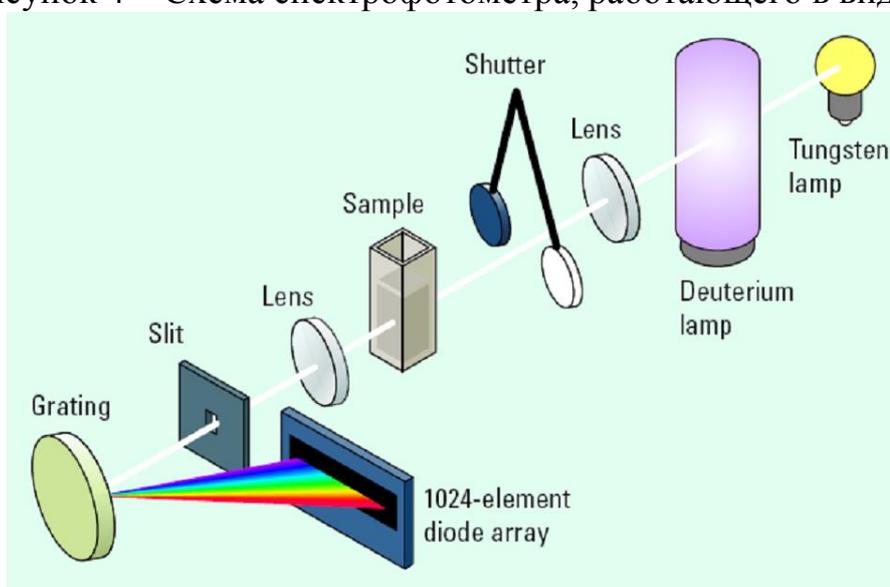


Рисунок 5 – схема спектрофотометра, работающего в УФ-области

**Монохроматоры.** *Монохроматор* – это оптическая система, выделяющая из всего спектра источника света излучение определенной длины волны. Это обычно призмы, по-разному преломляющие свет разных длин волн, или дифракционные решетки. В видимой области используются обычные стеклянные призмы, но в ультрафиолетовой области они не годятся, поскольку стекло начинает поглощать уже при  $\lambda < 400$  нм, поэтому призмы делают из кварца. На самом деле к образцу от монохроматора поступает не монохроматическое излучение, а свет в некотором диапазоне длин волн, называемом *спектральной шириной щели*. Ширина щели – важный параметр, поскольку она определяет тот диапазон длин волн, при которых на самом деле проводятся измерения.

В качестве монохроматоров применяются также дифракционные решетки, которые представляют собой плоскопараллельную пластину с

нанесенными на ней параллельными линиями – бороздками. Белый свет из-за дифракции на параллельных бороздках разлагается в непрерывный спектр.

**Кюветы.** Исследуемое вещество растворяют в соответствующем растворе и помещают в оптически прозрачный сосуд для измерений – *кювету*. Для определения поглощения только исследуемого вещества используется кювета сравнения, идентичная кювете с образцом; в нее наливают только растворитель. Для работы с летучими или химически активными веществами кюветы закрывают пробками.

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. Об этом особенно надо помнить при работе в ультрафиолетовой области. Поскольку органические молекулы поглощают в ультрафиолетовой области, ни в коем случае нельзя касаться руками оптических стенок кюветы и вообще стараться по возможности меньше брать кюветы в руки. 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.

**Фотоэлементы.** *Фотоэлементы* преобразовывают световую энергию в электрическую. Электрический сигнал затем усиливается и регистрируется. Фотоны, бомбардируя поверхность фотоэлемента, выбивают из нее электроны, количество которых пропорционально интенсивности света. Эти электроны летят к положительному электроду; в результате в замкнутой цепи возникает электрический ток, который регистрируется по падению напряжения на сопротивлении, находящемся в этой цепи.

**Регистрирующие спектрофотометры** могут регистрировать как *изменение поглощения вещества* в зависимости от длины волны, так и *изменение поглощения во времени* при постоянной длине волны. Конечно, регистрирующие приборы очень удобны в работе, но надо помнить, что часто такие спектрофотометры имеют меньшую чувствительность, чем более дешевые однолучевые приборы, поскольку в них из-за автоматической регулировки щели возникают дополнительные шумы. *Основная разница между одно- и двухлучевыми* приборами состоит в том, что в последних исходный луч при помощи системы плоских зеркал направляется то в кювету сравнения, то в кювету с образцом. Разница в этих прошедших световых потоках, улавливаемых фотоумножителем, соответствует значению поглощения вещества. В хороших спектрофотометрах бумага самописца может двигаться с разной скоростью, поэтому спектры можно растягивать по длинам волн. Изменение чувствительности самописца позволяет усиливать или ослаблять сигнал, поступающий от спектрофотометра, так что на всю его шкалу можно уместить значения экстинкции 0—0,1, 0—1, 1—2 или 2—2,1.

Иногда бывает необходимо исследовать соединения, поглощающие при длинах волн  $\lambda < 200$  нм. В этой области начинает поглощать кислород

воздуха, поэтому для измерений в *вакуумном ультрафиолете* из системы нужно откачать воздух. Кварц начинает поглощать ниже 190 нм, но эту трудность можно обойти, изготовив оптические детали из фтористого лития, который прозрачен до 110 нм.

Спектрофотометры, учитывающие отражение – это приборы, улавливающие свет, рассеянный образцом во все стороны. Такие измерения проводят тогда, когда образец сильно рассеивает в области поглощения (например, суспензия бактерий). В этом случае поглощение находят после измерения всего рассеянного и прошедшего света, и истинное значение оптического пути неизвестно. Этот факт сильно усложняет обработку экспериментальных данных. В качестве сравнения применяется рассеивающая поверхность из окиси магния.

Многолучевой регистрирующий спектрофотометр регистрирует изменение экстинкции одновременно при двух выбранных длинах волн.

**Качественный анализ.** Спектры в ультрафиолетовой и видимой областях характерны для более или менее больших структурных элементов в молекуле. Спектры больших, сходных по структуре молекул различаются очень незначительно. Обычно они представлены отдельными широкими полосами поглощения, которые часто накладываются одна на другую и перекрываются.

Характерными полосами поглощения обладают соединения, содержащие хромофорные группы. Спектральные исследования в этой области часто дают полезную качественную информацию о наличии или отсутствии некоторых функциональных групп, таких как карбонил, ароматическое кольцо, нитрогруппа или сопряженная двойная связь. Следует иметь в виду, что идентификация надежна, если хромофоры в молекуле изолированы. В присутствии ауксохромов и цепей сопряжения идентификация затрудняется.

Однако для более точного анализа необходимы исследования поглощения в инфракрасной области.

**Количественный спектрофотометрический анализ.** В фотометрическом анализе количество вещества определяется по интенсивности окраски или светопоглощению окрашенных соединений. Раствор или предмет кажутся окрашенными, если он по-разному пропускает или поглощает видимый свет различных длин волн. В видимой области цвет раствора обусловлен длиной волны излучения, не поглощенного этим раствором. Например, раствор, поглощающий излучение в синей части спектра ( $\approx 475$  нм), окрашен в желтый цвет, т. е. синий цвет является дополнительным к окраске раствора. В таблице 1.3 приводятся такие данные для всей области видимого излучения.

При определении неорганических компонентов для получения окрашенных соединений чаще всего используют реакции образования (иногда – разрушения) комплексных соединений; значительно реже применяются реакции окисления-восстановления. Для фотометрического

определения органических компонентов чаще всего используют реакции синтеза окрашенных соединений. Такие реакции называют **фотометрическими**.

Таблица 1.3. Цвета видимого излучения

Наблюдаемый цвет, (цвет раствора)	Область максимального поглощения, нм	Дополнительный цвет, (поглощаемое излучение)
Зелено-желтый	380–420	Фиолетовый
Желтый	420–440	Синий
Оранжевый	440–470	Голубой
Красный	470–500	Голубовато-зеленый
Пурпурный	500–520	Зеленый
Фиолетовый	520–550	Желто-зеленый
Синий	550–580	Желтый
Голубой	580–620	Оранжевый
Голубовато-зеленый	620–680	Красный
Зеленый	680–780	Пурпурный

Основные требования к реакциям сводятся к следующему:

- избирательное действие реагента;
- высокая скорость реакции;
- большое значение константы равновесия;
- постоянство состава и устойчивость окрашенных соединений во время проведения анализа.

Важное значение, в связи с этим, имеют *pH среды, время реакции, концентрации реагентов, температура*.

Ряд важных биологических соединений можно полуколичественно изучать с помощью спектрофотометрии в видимой и ультрафиолетовой областях. Например, измеряя поглощение белков при 280 нм, а нуклеиновых кислот при 260 нм – длинах волн, соответствующих максимуму поглощения этих соединений. Экстинкция белка при 280 нм зависит от содержания в нем ароматических аминокислот – тирозина и триптофана, поэтому значения молярной экстинкции при 280 нм для всех белков различны, и для определения содержания каждого из них требуется индивидуальная калибровочная кривая. Как правило, биохимики работают со смесью белков, и тогда можно пользоваться градуировочной кривой, полученной для белка или смеси белков со средним содержанием тирозина и триптофана. Это может быть, например, сывороточный альбумин или смесь сывороточных белков. Таким образом, для контрольных измерений надо выбирать соответствующий белок. Проводя измерения при длинах волн, где примесь

поглощает больше исследуемого вещества, можно с помощью соответствующих формул оценить количество примеси в образце.

Количество двух компонентов, имеющих перекрывающиеся спектры, например хлорофиллы *a* и *b* в эфире, можно оценить, зная их экстинкцию при двух длинах волн. Для *n* компонентов надо иметь данные по поглощению при *n* длинах волн.

**Разностные спектры.** Основное преимущество разностной спектрофотометрии состоит в том, что с ее помощью можно изучать небольшие изменения поглощения системы с большим значением экстинкции, например изменение окислительного состояния компонентов дыхательной цепи в целых фосфорилирующих митохондриях и хлоропластах.

*Разностный спектр* получается вычитанием одного абсолютного спектра поглощения из другого, например вычитанием абсолютного спектра поглощения убихинола из спектра убихинона (рисунок б). На практике такой разностный спектр получается, если в кювету сравнения поместить одно вещество, в данном случае убихинол, а в кювету для образца – другое, в данном случае убихинон.

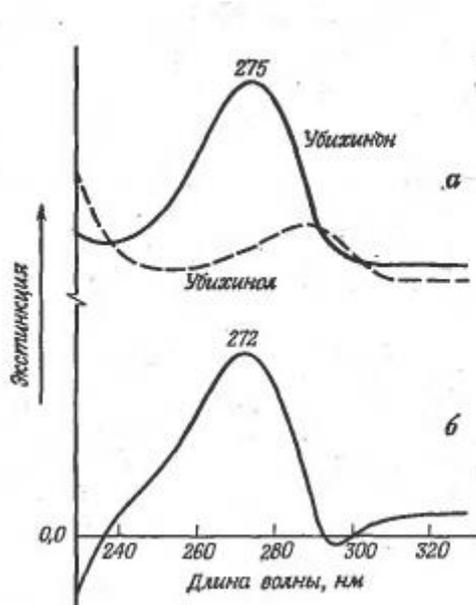


Рисунок б – Абсолютные (а) и разностный (б) спектры поглощения убихинона и убихинола

### Основные свойства разностных спектров:

- значения экстинкции могут быть отрицательными;
- максимумы и минимумы поглощений смещены, а значения экстинкции отличаются от их значений на абсолютных спектрах;
- точки нулевого поглощения – *изобестические точки* – отвечают длинам волн, где восстановленные и окисленные формы вещества поглощают одинаково;

➤ изобестические точки используются для обнаружения посторонних веществ.

**Турбидиметрия и нефелометрия** (измерение мутности). Очень разбавленные суспензии можно количественно исследовать при помощи *турбидиметрии*, т. е. измерения экстинкции не в полосе поглощения вещества. Рассеяние света меняется с концентрацией нелинейно, поэтому стандартизовать измерение концентрации разбавленных суспензий по уменьшению интенсивности попадающего на фотоэлемент света довольно трудно. Концентрацию бактерий обычно оценивают при длине волны 600 нм.

*Нефелометрия* – это метод измерения интенсивности рассеянного суспензией света; он применяется в основном для определения концентрации микроорганизмов.

#### 4. Основные методики проведения фотометрического анализа.

**Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого соединений.** Для анализа вещества этим способом готовят раствор исследуемого вещества и два-три стандартных раствора, затем измеряют оптические плотности этих растворов в одинаковых условиях (длина волны, толщина поглощающего слоя). Погрешность определения будет меньше, если оптические плотности исследуемого и стандартного растворов будут иметь близкие значения. Для этого вначале фотометрируют исследуемый раствор, а затем подбирают нужную концентрацию стандартного раствора. Согласно закону Бера, оптические плотности исследуемого и стандартного растворов равны:

$$A_x = \varepsilon_\lambda \ell C_x \quad (0.5)$$

$$A_{ст} = \varepsilon_\lambda \ell C_{ст} \quad (0.6)$$

Разделив уравнение (1.9) на (1.10) и учитывая, что оптические плотности измеряют в одних и тех же условиях ( $\lambda = \text{const}$ ,  $l = \text{const}$ ) и в растворе одни и те же светопоглощающие частицы ( $\varepsilon_\lambda = \text{const}$ ), получим:

$$\frac{A_x}{A_{ст}} = \frac{C_x}{C_{ст}} \quad (0.7)$$

откуда

$$C_x = C_{ст} \frac{A_x}{A_{ст}} \quad (0.8)$$

Метод сравнения используется для единичных анализов и требует обязательного соблюдения закона Бера.

**Метод молярного коэффициента поглощения.** При работе по этому методу определяют оптическую плотность нескольких стандартных растворов  $A_{ст}$ , для каждого стандартного раствора рассчитывают молярный коэффициент поглощения:

$$\varepsilon = \frac{A_{\text{ст}}}{\ell C_{\text{ст}}} \quad (0.9)$$

и полученное значение  $\varepsilon$  усредняют. Поскольку молярный коэффициент светопоглощения не зависит от толщины поглощающего слоя, измерения можно проводить в кюветах разной длины. Затем измеряют оптическую плотность исследуемого раствора  $A_x$  и рассчитывают концентрацию  $C_x$ :

$$C_x = \frac{A_x}{\varepsilon \ell} \quad (0.10)$$

Метод требует обязательного соблюдения закона Бера хотя бы в области исследуемых концентраций; используется довольно редко.

**Метод градуировочного графика.** В соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера график зависимости оптической плотности от концентрации должен быть линейным и проходить через начало координат.

Готовят серию стандартных растворов различной концентрации и измеряют оптическую плотность в одинаковых условиях. Для повышения точности определения число точек на графике должно быть не меньше трех-четырех. Затем определяют оптическую плотность исследуемого раствора  $A_x$  и по графику находят соответствующее ей значение концентрации  $C_x$  (рисунок 7).

Интервал концентраций стандартных растворов подбирают таким образом, чтобы концентрация исследуемого раствора соответствовала примерно середине этого интервала.

Метод является наиболее распространенным в фотометрии. Основные ограничения метода связаны с трудоемким процессом приготовления эталонных растворов и необходимостью учитывать влияние посторонних компонентов в исследуемом растворе. Чаще всего метод применяется для проведения серийных анализов.

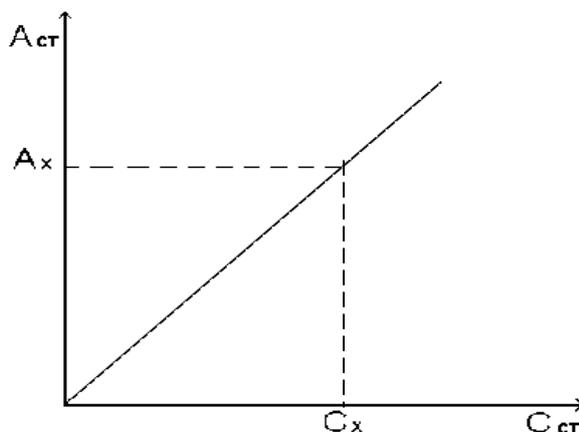


Рисунок 7 – Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации

**Метод добавок.** Этот метод применяют для анализа сложных растворов, так как он позволяет автоматически учитывать влияние посторонних компонентов анализируемого образца. Сначала измеряют оптическую плотность исследуемого раствора с неизвестной концентрацией

$$A_x = \varepsilon l C_x \quad (0.11)$$

затем в анализируемый раствор добавляют известное количество стандартного раствора определяемого компонента ( $C_{ст}$ ) и измеряют оптическую плотность  $A_{x+ст}$ :

$$A_{x+ст} = \varepsilon l (C_x + C_{ст}) \quad (0.12)$$

откуда

$$C_x = C_{ст} \frac{A_x}{A_{x+ст} - A_x} \quad (0.13)$$

Для повышения точности добавку стандартного раствора определяемого компонента делают дважды и полученный результат усредняют.

Концентрацию анализируемого вещества в методе добавок можно найти графическим путем (рисунок 8).

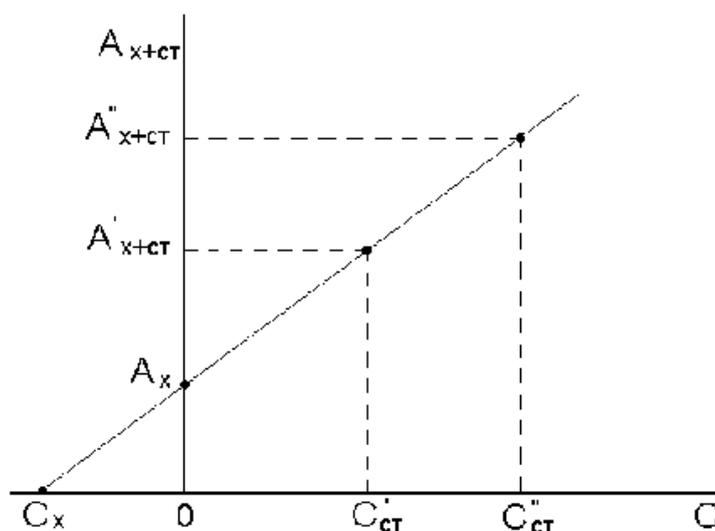


Рисунок 8 – Градуировочный график для определения концентрации вещества по методу добавок

Уравнение (1.16) показывает, что если строить график  $A_{x+ст}$  как функции  $C_{ст}$ , то получится прямая, экстраполяция которой до пересечения с осью абсцисс дает отрезок, равный  $-C_x$ . Действительно, при  $A_{x+ст} = 0$  из уравнения (1.16) следует, что  $-C_{ст} = C_x$ .

**Метод дифференциальной фотометрии.** В этом методе оптические плотности исследуемого и стандартных растворов измеряют не по отношению к растворителю или раствору сравнения с нулевым поглощением, а, в отличие от прямых спектрофотометрических методов, по

отношению к раствору с известной концентрацией определяемого вещества  $C_o$ .

В зависимости от способов измерения относительной оптической плотности различают несколько вариантов метода.

1. Метод высокого поглощения – концентрация раствора сравнения меньше концентрации исследуемого раствора ( $C_o < C_x$ ). Готовят серию стандартных растворов с концентрациями  $C_1, C_2 \dots C_n$  и фотометрируют стандартные и исследуемый растворы по отношению к раствору сравнения с концентрацией  $C_o$ . Значения относительной оптической плотности  $A'$  представляют собой разность оптических плотностей исследуемого (стандартных) раствора и раствора сравнения:

$$A'_x = A_x - A_o = \varepsilon \ell (C_x - C_o) \quad (0.14)$$

$$A' = A_{ст} - A_o = \varepsilon \ell (C_{ст} - C_o) \quad (0.15)$$

Концентрацию исследуемого раствора определяют расчетным способом или по градуировочному графику. Отличие градуировочного графика от обычного (рисунок 1.7) в том, что за начало отсчета принимают концентрацию раствора сравнения  $C_o$ .

При расчетном способе учитывают, что отношение оптических плотностей исследуемого и стандартных растворов соответствует отношению разности между концентрациями этих растворов и раствора сравнения:

$$\frac{A'_x}{A'_{ст}} = \frac{C_x - C_o}{C_{ст} - C_o} \quad (0.16)$$

Отсюда:

$$C_x = C_o + A'_x \frac{C_{ст} - C_o}{A'_{ст}} \quad (0.17)$$

или

$$C_x = C_o + F A'_x \quad (0.18)$$

где

$$F = \frac{C_{ст} - C_o}{A'_{ст}} \quad (0.19)$$

$F$  называют фактором пересчета.

В одной серии измерений  $F$  является постоянной величиной.

Метод рекомендуется использовать в тех случаях, когда оптическая плотность растворов больше единицы.

2. Метод низкого поглощения. Концентрация раствора сравнения больше концентрации исследуемого раствора ( $C_o > C_x$ ). В этом случае применяют обратный порядок измерения: анализируемый и стандартные растворы условно принимают за растворы сравнения и по отношению к ним

измеряют оптическую плотность изначального раствора сравнения. При обратном порядке измерения относительная оптическая плотность  $A'$  равна разности оптических плотностей исследуемого раствора (стандартного) и раствора сравнения:

$$A'_x = A_o - A_x \quad (0.20)$$

$$A'_{ст} = A_o - A_{ст} \quad (0.21)$$

Концентрацию  $C_x$  рассчитывают по формуле:

$$C_x = C_o - FA'_x \quad (0.22)$$

где

$$F = \frac{C_o - C_{ст}}{A'_{ст}} \quad (0.23)$$

Метод низкого поглощения применяют чаще всего к растворам с оптической плотностью  $< 0,1$ .

3. Метод двухстороннего дифференцирования (метод предельной точности) сочетает в себе оба метода с прямым и обратным порядком измерения оптической плотности растворов.

При работе этим методом готовят несколько стандартных растворов с концентрациями, меньшими, чем в растворе сравнения, и столько же стандартных растворов с концентрациями, большими, чем в растворе сравнения (рисунок 9).

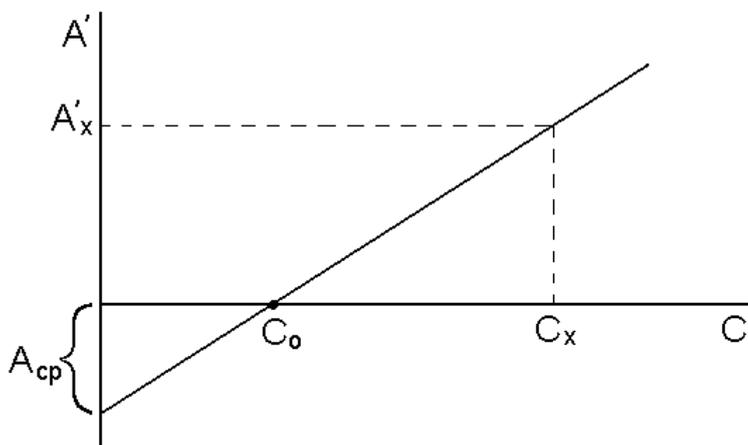


Рисунок 9 – Градуировочный график в методе двухсторонней дифференциальной фотометрии

Если  $C > C_o$ , используют прямой порядок измерения, если  $C < C_o$ , применяют обратный порядок измерения, и значения относительных оптических плотностей берут со знаком минус (для фотометрических приборов стрелочного типа со шкалой). Современные фотоэлектроколориметры позволяют фиксировать отрицательные значения оптической плотности,

поэтому используют прямой порядок измерений. Градуировочный график при этом не проходит через начало координат, а пересекает ось абсцисс в точке, соответствующей концентрации раствора сравнения  $C_o$  (рисунок 1.9). Концентрацию исследуемого раствора можно определить и расчетным путем:

$$C_x = C_o + FA'_x \quad (0.24)$$

Как видно, при концентрации раствора сравнения  $C_o = 0$  дифференциальный метод превращается в метод прямой фотометрии.

Дифференциальные методы анализа применяют для определения больших количеств веществ, для устранения мешающего влияния посторонних примесей и исключения поглощения реактивов. Этот метод применяют еще и в тех случаях, когда из-за большой концентрации нарушается закон Бугера – Ламберта – Бера, или когда значение оптической плотности выходит за границы шкалы прибора, а дальнейшее разбавление раствора нежелательно. Точность определения при использовании дифференциального метода повышается.

### **Определение смеси светопоглощающих веществ**

Спектрофотометрический метод, в принципе, позволяет определить несколько светопоглощающих веществ в одном растворе без предварительного разделения. В простейшем случае вещества поглощают при разных длинах волн, и анализ смеси сводится к определению каждого компонента в отдельности – метод изолированной абсорбции. В случае, когда спектры поглощения компонентов смеси частично накладываются друг на друга, выбирают длину волны, при которой наблюдается максимальное поглощение одного компонента, а поглощение другого компонента пренебрежимо мало.

Если же спектры веществ перекрываются, то для анализа используют один из методов, основанных на законе аддитивности. Например, для смеси веществ А и В можно записать систему уравнений Фирордта:

$$A_{\lambda_1} = l(\varepsilon_{A,\lambda_1} C_A + \varepsilon_{B,\lambda_1} C_B) \quad (0.25)$$

$$A_{\lambda_2} = l(\varepsilon_{A,\lambda_2} C_A + \varepsilon_{B,\lambda_2} C_B) \quad (0.26)$$

Решение этой системы уравнений при  $l = 1$  см дает:

$$C_A = \frac{A_{\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_1} - A_{\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1}}{\varepsilon_{A,\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - \varepsilon_{A,\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1}} \quad (0.27)$$

$$C_B = \frac{A_{\lambda_2} \varepsilon_{A,\lambda_1} - A_{\lambda_1} \varepsilon_{A,\lambda_2}}{\varepsilon_{A,\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - \varepsilon_{A,\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1}} \quad (0.28)$$

Длины волн, при которых следует проводить измерения оптической плотности, выбирают по спектрам поглощения веществ А и В. Хорошие результаты дает, например, метод максимальных разностей. Для этого сначала снимают спектры поглощения веществ А и В (рисунок 10 а), а затем

строят график зависимости  $\varepsilon_A - \varepsilon_B$  или  $\varepsilon_B - \varepsilon_A$  от длины волны и находят области максимума и минимума (рисунок 10 б).

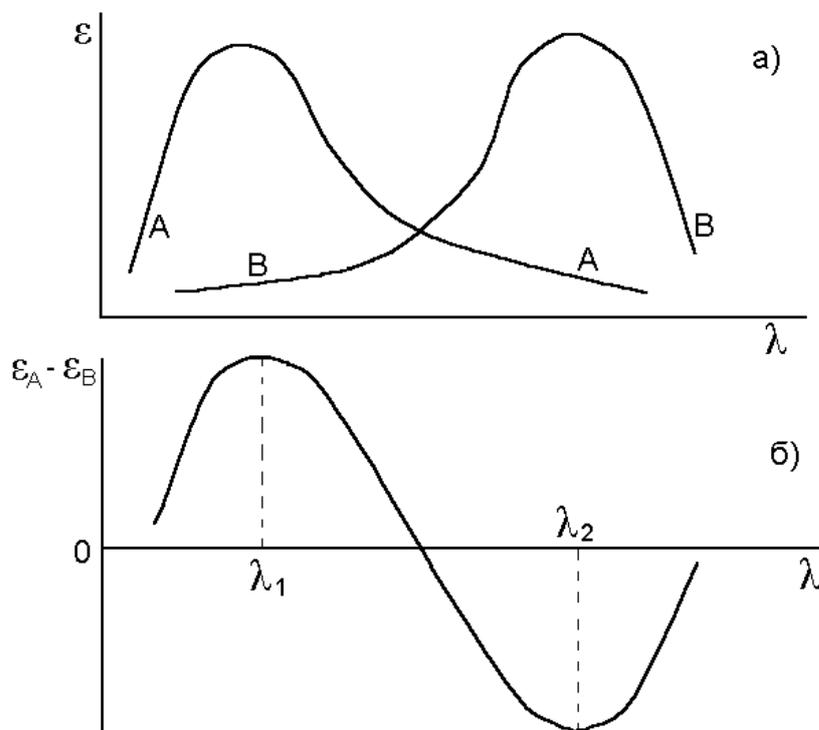


Рисунок 10 – Спектры поглощения веществ А и В (а) и зависимость  $\varepsilon_A - \varepsilon_B$  от длины волны (б)

Молярные коэффициенты светопоглощения определяют заранее, поэтому анализ сводится к измерению оптической плотности при двух длинах волн. Этот анализ при помощи фотоколориметров осуществить практически невозможно, поэтому количественное определение компонентов производят при помощи спектрофотометров.

Точность определения тем выше, чем больше различие в значениях  $\varepsilon_A$  и  $\varepsilon_B$  при одной и той же длине волны. Точность результатов анализа зависит от соотношения концентраций компонентов. Погрешность определения резко увеличивается при уменьшении относительного содержания компонента и при большом числе определяемых компонентов. Если число компонентов в смеси больше, чем два, число слагаемых в уравнениях типа (1.29–1.30) увеличивается пропорционально числу компонентов и соответственно возрастает число уравнений. Необходимое требование – подчинение компонентов системы законам Бера и аддитивности.

Так, для  $n$  компонентов будет записана система из  $n$  уравнений, значения оптических плотностей должны быть измерены при  $n$  длинах волн. Такие системы уравнений решают с использованием вычислительной техники.