

Методы количественного определения химического состава веществ, основанные на измерении их физических свойств, называются физико-химическими методами анализа. Все эти измерения связаны с использованием соответствующих приборов и поэтому их часто называют инструментальными методами анализа. Фотометрические и спектрофотометрические методы получили широкое распространение в лабораториях. Эти методы позволяют относительно быстро определять весьма малые количества веществ. Имеется определенная закономерность в поглощении части светового спектра окрашенным раствором. Например, раствор, окрашенный в желтый цвет, поглощает синюю часть света, т. е. дополнительный цвет [1]. Величина светопоглощения в фотометрии выражается величиной оптической плотности D (экстинкция или поглощение раствора иногда обозначается E). Величина, обратная плотности, называется прозрачностью, или пропусканием раствора, обозначается T и выражается в процентах. Основным законом колориметрии и абсорбциометрии является объединенный закон Бугера — Ламберта — Бера. Из этого закона следует, что оптическая плотность раствора, или экстинкция, прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества, толщине слоя раствора и молярному коэффициенту погашения. Закон имеет следующее выражение: $D=E=\epsilon\lambda Cl$, (1) где D — плотность или E — экстинкция; $\epsilon\lambda$ — молярный коэффициент погашения; C — концентрация вещества, поглощающего свет; l — толщина поглощающего слоя окрашенного раствора. Молярный коэффициент погашения представляет собой оптическую плотность 1М раствора, помещенного в кювету с толщиной слоя 1 см.

Фотоэлектроколориметрия - это определение концентрации вещества в растворе по изменению тока в фотоэлементе при попадании на него луча, прошедшего через исследуемый раствор. Степень поглощения света (коэффициент экстинкции) прямо пропорциональна концентрации вещества в растворе. Концентрацию растворенного вещества определяют путем сравнения силы тока в фотоэлементе через исследуемый раствор с силой тока на выходном ФЭ при прохождении луча через контрольную жидкость - бесцветный растворитель. Нефелометрия - это тоже, что и фотоэлектроколориметрия, но оценивается не степень поглощения или экстинкции, а степень рассеивания света в эмульсиях и взвесьях.

Спектрофотометрия - это тоже, что фотоэлектроколориметрия и нефелометрия, но предназначенная для измерения светопоглощения или рассеивания строго определенной длины волн. Фотометр предназначен для качественной или количественной оценки результатов иммуноферментного анализа и широко используется в медицине, биологии, фармакологии, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и ветеринарии и в службах санэпиднадзора (СЭС).

Примеры лабораторных исследований, проводимых посредством фотометрических приборов [2]: – концентрацию гемоглобина в специальном

растворе крови определяют в спектрофотометре при зеленом светофильтре с $\lambda = 500... 560$ нм в кювете с рабочей шириной 10 мм; – процесс агрегации тромбоцитов исследуют в ФЭК, перемешивая смесь плазмы крови и специального раствора в течение 16 мин; – исследуя в ФЭК кровь в кислотном физиологическом растворе, строят эритрограммы - зависимости коэффициента экстинкции от времени в течение 10 мин - и делают выводы о кислотной резидентности крови; – белок в моче дает помутнение при добавлении в нее специального раствора, это помутнение регистрируется ФЭК, расчет ведут по калибровочному графику; – для определения сахара в моче исследуют цветную реакцию мочи и щелочи (светофильтр зеленый, ширина кюветы - 5 мм), смесь нагревают в водяной бане, сахар определяют по калибровочной кривой; - диагностику онкологических заболеваний (выявление онкомаркеров), фотодинамические методы используются в терапии метастазов рака молочной железы и меланомы [3]. Актуально применение фотометрических методов анализа в контроле качества лекарственных препаратов [4 - 7]. Расширение арсенала лекарственных средств сопровождается развитием новых методов их анализа. Это связано с тем, что выход и качество конечных продуктов химико-фармацевтического производства зависит не только от строгого проведения процесса согласно технологическому регламенту, от качества исходного сырья, но и от применения надежных методов постадийного контроля. Физико-химические методы все шире внедряются в фундаментальные фармацевтические исследования и в практику фармацевтического анализа. Они используются для идентификации и количественного определения различных групп лекарственных веществ, их стандартных образцов, а также таблеток, мазей, инъекционных растворов, капель и других многокомпонентных лекарственных смесей [8]. Наиболее доступны для использования в фармацевтическом анализе фотометрические методы, в частности спектрофотометрия в ИК- и УФ-областях, фотометрия в видимой области спектра и их различные модификации [9] Интересен фотометрический экспресс-метод определения светозащитных свойств упаковки для лекарственных средств [10]. В [11] представлен обзор основных подходов, применяемых для определения гидразина и его производных спектрофотометрическими и флуориметрическими методами. Приведены примеры определения в объектах. Обсуждены достоинства и недостатки предложенных схем анализа, рассмотрены тенденции развития методов. Как известно, принципиально новые возможности для решения практических задач дают полимер – коллоидные комплексы, поскольку по своим физико-химическим свойствам они существенно отличаются от индивидуальных компонентов [12]. Системы, содержащие неионные ПАВ и водорастворимые полимеры, широко используются в нефтяной, фармацевтической и других отраслях промышленности. Взаимодействие полимолекулярных ансамблей в частности мицелл с макромолекулами, такими

как полимеры, могут мимикрировать действие определенных биоструктур и поэтому они также интересны с теоретической точки зрения. В работе [13] были рассмотрены особенности формирования полимер – коллоидных комплексов в системе неионное ПАВ – полимер. В качестве неионного ПАВ выбраны алкилполиэтоксифенолы (неонолы) с различной длиной оксиэтилированной цепи (АФ9 – 12, АФ9 – 10, АФ9 – 8, АФ9 – 6), а в качестве полимера – полиэтиленимин (ПЭИ) высокомолекулярный (молярной массы 10000) и низкомолекулярный (молярной массы 1200). Спектрофотометрическим методом показано, что реакция в системе АФ9-12 – ПЭИ1200 (0.02 моль/л) – вода идет в двух направлениях, т.е. идут две параллельные реакции, причем с близкими скоростями. Полученные данные по каталитической активности полимер – коллоидных композиций позволяют предположить, что в системе на основе неионных ПАВ и полиэтилениминов формируются нанореакторы [14, 15]. Это можно использовать для разработки эффективных каталитических систем на основе неионных ПАВ с регулируемой активностью, моделирующих принципы функционирования биокатализаторов и действующих в мягких условиях. Это имеет важное значение при решении экологических проблем по уничтожению токсичных соединений. Разработана фотометрическая методика определения дифенгидрамина гидрохлорида в капсулах Антигриппин-АНВИ [7], основанная на реакции лекарственного вещества с кислотным красителем бромтимоловым синим. Изучены оптимальные условия образования окрашенного комплекса и его спектральные характеристики. В настоящее время бурно развивается направление получения аналитической информации в лабораторной диагностике, которое все более успешно конкурирует с традиционной фотометрией: применение видеоцифровых систем на основе ПЗС-камер и сканеров [16]. Микропланшеты для иммуноферментного анализа (ИФА) являются традиционным объектом измерений специализированных вертикальных фотометров (ИФА-ридеров). Целью работы [17] являлось сопоставление аналитических характеристик сканерной видеоцифровой системы Эксперт-Лаб при использовании в качестве фотометра и обычного высококлассного ИФА-ридера. Примеры промышленных фотометров: – колориметры фотоэлектрические концентрационные КФК-2, КФК-1 [3]; – колориметр фотоэлектрический однолучевой КФО; – фотоэлектроколориметр ФЭК-56м, ФЭК-М; – спектрофотометры СФ-4, СФ-16; – минифотометры Metertech (Тайвань): – модель SP-810 (на 330...1000 нм содержит аналоговый индикатор-самописец); – модель SP-870 (на 300...1000 нм, включает клавиатуру, дисплей, 30 ячеек памяти для программы измерений). Фотометры классифицируют: – по количеству каналов (одноканальные и многоканальные фотометры); – по типу источников света (с лампами накаливания, с водородными и ртутными лампами); – по типу фотоприемников (с фоторезисторами, селеновыми фотоэлементами, фотодиодами и с фототранзисторами); – по устройству индикации (стрелочные,

цифровые и микрометрические). Фотоэлектрический колориметр ФЭК-М применяется в медицинских лабораториях всех направлений (рис. 1).

Технические характеристики прибора: – количество каналов 2; – диапазон исследуемых коэффициентов экстинкции 2...100%; – погрешность прибора 1%; – длины волн фильтров (зеленый, синий, красный) 300...700 нм. Рис. 1 - Схема ФЭК-М: 31, 32 – зеркала, С1, С2 – светофильтры, А1, А2 – кюветы с исследуемым и контрольным растворами, Ф1, Ф2 – фотоэлементы селеновые, К – клин (заслонка), применяемый для изменения светового потока по оптическому каналу, D – диафрагма с микрометрическим винтом, отградуированным в единицах коэффициентов экстинкции, Г – гальванометр. Фотоэлементы Ф1, Ф2 включены дифференциально, поэтому при идентичных каналах световые токи фотоэлементов вычитаются и гальванометр показывает нуль. Идентичность каналов обеспечивается идентичностью фотоэлементов и световых потоков. Переключатель в первом положении обеспечивает меньшую чувствительность гальванометра, во втором – полную. Этапы работы с прибором следующие. В кюветы А1 и А2 помещают контрольный раствор. Диафрагму устанавливают на 100%. Регулируя клин (левый световой поток), обеспечивают идентичность каналов по нулю гальванометра, в кювету А1 ставят исследуемый раствор. Гальванометр показывает не нуль. Изменяя переключателем чувствительность гальванометра и вращая лимб диафрагмы D, устанавливают стрелку гальванометра на нуль. На лимбе читают коэффициент экстинкции. Колориметр фотоэлектрический одноканальный (КФО) используется в аналитических лабораториях для измерения коэффициента пропускания через раствор света определённых длин волн. Технические характеристики: – коэффициент пропускания 5... 100%; – погрешность измерения коэффициента пропускания 1...5%; – разделение на цвета длин волн: 415 нм – синий, 500 нм – сине-зеленый, 530 нм – зеленый, 600 нм – оранжевый, 630 нм – красный, 320...720 нм – нейтральный. В приборе используются лампа накаливания и селеновый фотоприемник. Оптический принцип работы устройства – одноканальный (эталонный и исследуемый раствор анализируется последовательно во времени). Принципиальная схема устройства приведена на рис. 2. Работа с прибором заключается в следующем. Затемнив фотоприемник, потенциометром R2 стрелку прибора устанавливают на нуль, затем вводят кювету с контрольным раствором с коэффициентом пропускания $\lambda = 5...100\%$ и потенциометром R5 добиваются максимума шкалы, соответствующей Φ_0 . После этого устанавливают исследуемый раствор, измеряют $\Phi_{изм}$ и по формуле $\lambda = \Phi_{изм}/\Phi_0$ рассчитывают λ . Рис. 2 - Схема ФКО: Д1 – селеновый фотоприемник, А1 – операционный усилитель, R1, R2, R5 – сопротивление установки на нуль, ИП – измерительный прибор, R4, R5 – цепь отрицательной обратной связи (ООС) для регулировки чувствительности ИП. Спектрофотометры КФК-3 [18], КФК-2МП предназначены для измерения коэффициента пропускания, оптической плотности растворов и

твердых образцов, скорости изменения оптической плотности и концентрации вещества в растворах. Физико-химические методы и биотестирование применяются для системного анализа качества водных объектов [19], эти методы также могут использоваться при анализе археологических объектов, в частности находок из металла [20], загрязняющих веществ в объектах окружающей природной среды [21]. Технические показатели прибора КФК-3: – коэффициент пропускания 0,1...100%; – погрешность измерения коэффициента пропускания 5%; – длины волн 315...990 нм; – разрешение по длине волны 7 нм; – оптическая плотность 0...3. Оптическая схема двухканальная (раствор и растворитель исследуются одновременно). Лампа галогенная, фотоприемник фотодиодный. В этом приборе в качестве дифрагирующего элемента используется дифракционная решетка (рис.3). Технические характеристики прибор КФК-2МП: – коэффициент пропускания 1... 100%; – погрешность измерения коэффициента пропускания 1%; – длины волн 315...980 нм; – оптическая плотность 0...2. В приборе используются оптическая схема одноканальная, лампа галогенная, фотоприемники фотодиодные (Ф26 - для 315...500 нм, ФД-24К - для 500...980 нм), дифрагирующие элементы - светофильтры. Рис. 3 - Схема КФК-3: ФП – фотоприемник, МУПДР - механизм угла поворота дифракционной решётки, МЭВМ – микроЭВМ, ПУП преобразователь угла поворота, РСН - регулируемый стабилизатор напряжения Свет от лампы попадает на фотодиод Д через раствор. Фотоприемник формирует напряжение $U(\Phi)$, которое вводится через АЦП в микроЭВМ. Механизм управления углом поворота дифракционной решетки изменяет длину волны света, проходящего через раствор. Это изменение (механическое) устройством ПУП преобразуется в напряжения U_1 и U_2 , пропорциональные длине волны. U_1 поступает в МЭВМ через второй АЦП, а U_2 преобразуется в напряжение питания лампы так, чтобы на нижней длине волны 315 нм это напряжение было равно 12 В, а на верхней - 10 В. При этом осуществляется коррекция силы света от длины волны. В МЭВМ вводятся $U(\Phi)$ и $U_1(\lambda)$ в автоматическом режиме, а градуировочный коэффициент K_g - с клавиатуры. Кроме этого, в МЭВМ имеется таймер, который дает информацию об интервале времени t между замерами последовательных коэффициентов пропускания. Благодаря этому в МЭВМ рассчитываются такие параметры: $\lambda = (\Phi_{изм}/\Phi_0) \cdot 100\%$ - коэффициент пропускания; $D = \lg(1/\lambda)$ - оптическая плотность; $A = (D_{кон} - D_{нач})/t$ - скорость изменения оптической плотности; $C = D \cdot K_g$ - концентрация, где K_g - градуировочный коэффициент. Кроме этого, МЭВМ управляет механизмом угла поворота дифракционной решетки и переключает оптический путь луча через эталонный и исследуемый растворы. Процесс измерения параметров осуществляется по программе, заложенной в МЭВМ. Фотометр КФК-2МП работает аналогично КФК-3, но в нем отсутствует блок МУПДР, а содержится кассета с одиннадцатью фильтрами. Смена фильтров осуществляется дискретно по команде МЭВМ. Специалист

всегда стремиться получить максимум полезной информации с помощью наиболее безопасных для пациента методик диагностики, к которым относятся лабораторные анализы крови, мочи, кала, мокроты и слизи, содержимого мазков и соскобов, к таким методам и относят фотометрические и спектрофотометрические методы анализа. Данные методы позволяют относительно быстро определять весьма малые количества веществ. Отличаясь простотой, хорошей чувствительностью и высокой скоростью анализа, они находят применение, как в повседневной практике, так и в исследовательской работе. Фотометрический анализ является одним из наиболее удобных методов определения малых количеств вещества, так как существует практически неограниченная возможность превращения вещества в раствор, сильно поглощающий свет. Достоинство фотометров заключается в том, что обеспечивается автоматизированный режим измерения параметров (благодаря наличию МЭВМ), а недостаток - в сложности устройств. Однако, обширная область применения фотометров - лаборатории научно-исследовательских институтов, лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений, лаборатории контроля пищевых продуктов и мониторинга окружающей среды перекрывают все их недостатки.