

# Оптические методы количественного анализа

И.А. Новикова

# Оптический количественный анализ

Основан на регистрации изменений, происходящих с лучом света при прохождении его через исследуемый раствор.

Методы количественного анализа:

- Фотометрия
- Рефрактометрия
- Поляриметрия

# Фотометрические методы анализа

## 1. Абсорбционная фотометрия:

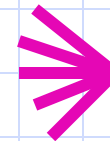
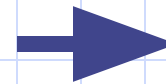
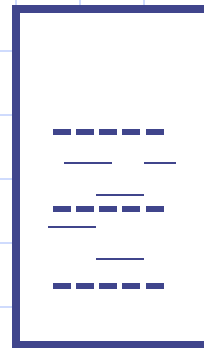
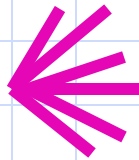
- спектрофотометрия
- нефелометрия (собственно нефелометрия и турбидиметрия)
- атомно-адсорбционная фотометрия

## 2. Эмиссионная фотометрия:

- флуориметрия
- пламенная фотометрия
- атомно-эмиссионный спектральный анализ

# фотометрия

**Источник  
монохрома-  
тического  
света**



**Приемник  
излучения**

**Исследуемый  
образец**

# Закон Бугера-Ламберта-Бееера

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c L}$$

где  $I_t$  – интенсивность света, прошедшего через раствор,  $I_0$  – интенсивность падающего на раствор света,  $L$  – толщина слоя раствора в см,  $c$  – концентрация поглощающего свет раствора вещества;  $\varepsilon$  – коэффициент погашения (абсорбции, экстинции). Если концентрация раствора составляет моль/л и  $L = 1$  см, то  $\varepsilon = A$

# раствора

Оптическая плотность раствора = экстинция = адсорбция раствора (E, D, A) – логарифм отношения интенсивности падающего на раствор света ( $I_0$ ) к интенсивности света, прошедшего через раствор ( $I_t$ ).

$$A = 1g \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon 1c$$

Оптическая плотность растворов при прочих равных условиях прямо пропорциональна концентрации вещества!

# раствора

**Светопроницаемость (прозрачность) раствора (Т) – отношение интенсивности монохроматического потока излучения, прошедшего через исследуемый объект, к интенсивности первоначального светового потока. Выражается в %.**

$$T(\%) = I_t/I_o \times 100$$

# Спектрофотометрия

Измерение интенсивности окраски раствора анализируемого вещества относительно интенсивности окраски эталонного раствора.

**Приборы для выполнения** - фотометры и спектро - фотометры.

В фотометрах нужные спектральные диапазоны выделяются при помощи светофильтров. Число рабочих участков спектра = числу светофильтров.

В спектрофотометрах участки света выделяются с помощью призм или дифракционных решеток, поэтому можно установить любую длину волны в заданном диапазоне и выделить более узкий (монохроматический) участок спектра.

Спектрофотометры – приборы более высокого класса.



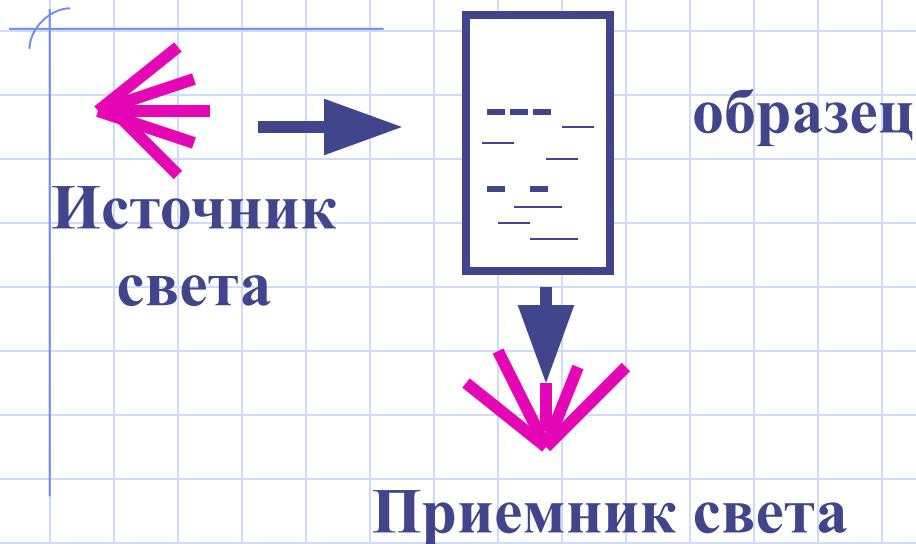
# Нефелометрия

**Нефелометрия** – метод анализа, связанный с оценкой степени мутности исследуемого раствора. Мутность возникает в результате взвешивания в растворителе мельчайших твердых частиц вещества, которые рассеивают лучи света, проходящие через раствор. Интенсивность рассеивания света возрастает с увеличением размера и числа рассеивающих частиц.

Эта закономерность соблюдается в сильно разбавленных растворах, что позволяет определять концентрацию вещества по степени мутности образуемых им растворов.

# нефелометрии

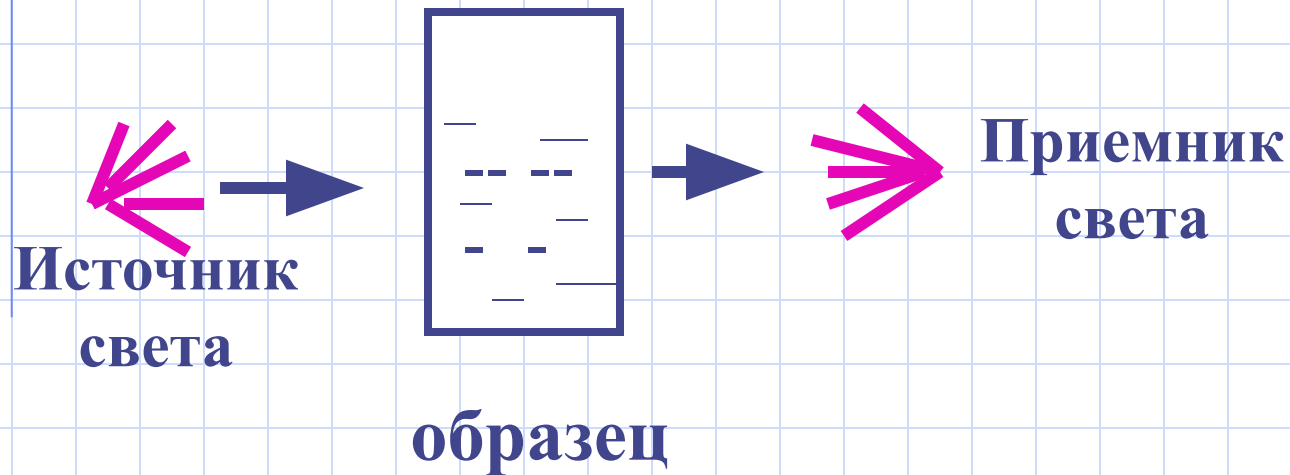
## 1. Собственно нефелометрия



Измеряется интенсивность светового потока, возникшего вследствие рассеяния падающего на взвесь света. Оптимальное условие — использование растворов низкой концентрации.

# Основные методы нефелометрии (продолжение)

## 2. Турбидиметрия



Измеряется ослабление светового потока, прошедшего через мутный раствор. Все нефелометрические методы в клинике относятся к турбидиметрии – тимоловая проба, определение серомукоидов, беталипопротеидов, тесты агрегации тромбоцитов и др

# ВОЛН, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ФОТОМЕТРИИ

**Видимая область спектра – 400-700 нм.**

(самый частый используемый диапазон.)

**Более 700 нм – инфракрасная (используется  
очень редко)**

**Менее 400 – УФ длинноволновая (300-400)**

**УФ коротковолновая (220-300)**

# Эмиссионная фотометрия

Это метод анализа, основанный на измерении энергии, излучаемой веществом в результате энергетически возбужденного состояния. Основные методы эмиссионной фотометрии:

- а) Флуориметрия
- б) Пламенная фотометрия

# Флуориметрия

Флуориметрия – основана на измерении флуоресценции, которая возникает в результате энергетического возбуждения исследуемого вещества под влиянием жесткого коротковолнового облучения (обычно ультрафиолетовые лучи).

Выполняется на аппаратах – флуориметрах.

По чувствительности намного выше колориметрических методов (в 100-1000 раз).

Недостаток – связан именно с высокой чувствительностью, т.к. требуются громоздкие способы предварительной очистки вещества от примесей, которые вносят фоновые искажения.

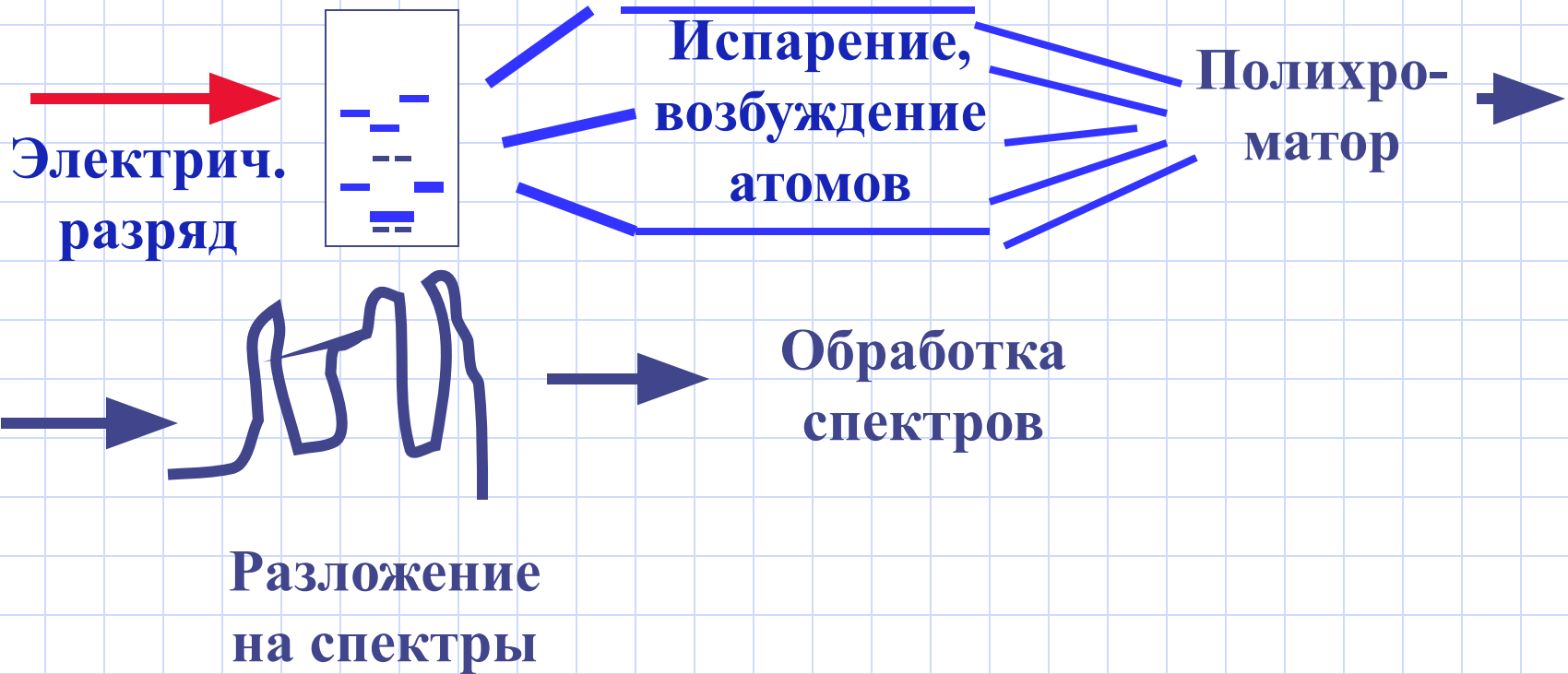
В клинических лабораториях используется нешироко. Определяют катехоламины.

# Пламенная фотометрия

В качестве энергетического агента, вызывающего состояние возбуждения исследуемого вещества используется пламя газовой горелки. Ионы металлов окрашивают пламя в различный цвет, в соответствии с характерными для них спектрами испускания. Для выделения излучения отдельных ионов применяют специальные светофильтры.

В КДЛ применяют в основном для определения концентрации ионов калия и натрия, т.к. эти элементы возбуждаются легче остальных - достаточно энергия низкотемпературного пламени сгорания метана в воздухе. Недостаток метода - необходимость газового оборудования. Эти методы заменяют на ионоселективные, потенциометрические.

# Атомно-эмиссионный спектральный анализ





# Основные условия измерения при работе с фотометрической аппаратурой

**1. Толщина рабочего слоя фотометрической кюветы.** Чем толще рабочий слой кюветы, тем выше будет оптическая плотность измеряемых в ней растворов вещества. Обязательно учитывается и вносится поправка. В ФЭК (измерение в видимой части спектра) применяют оптические кюветы из обычного стекла, с толщиной 5, 10, редко 3 мм. Для измерений в ультрафиолетовой области спектра (СФ, флуориметр) используется материал, не поглощающий УФ лучи - увиолевое, реже кварцевое стекло, толщиной 10 мм.

# Основные условия измерения при работе с фотометрической аппаратурой (продолжение)

2. **Длина световой волны.** Определяется физико-химическими свойствами исследуемых растворов. Визуально они могут быть: а) прозрачные неокрашенные; б) мутные неокрашенные; в) прозрачные окрашенные, г) мутные окрашенные (исследованию не подлежат).
- a.** используются в иммунологии при определении ЦИК, в биохимии для определения НАД. Замер в УФ области при соответственно 280 и 340 нм.
  - b.** относится к нефелометрии, длина волны 540 нм (зеленый светофильтр) или 640 нм (красный светофильтр).
  - c.** длина световой волны обусловлена принципом дополнительности цветов исследуемого раствора и светофильтра. Например, для растворов, окрашенных в желтый цвет используется синий светофильтр (440 нм), для растворов синего цвета желтый (590) иногда красный - 640 нм.

# Способы расчета результатов фотометрии

1. условные единицы
2. по стандартным (эталонным) растворам
3. по калибровочному графику
4. с помощью коэффициента пересчета

# Способ расчета результатов фотометрии по условным единицам

Это фактически непосредственное выражение единиц оптической плотности исследуемого раствора. Для удобства единицы оптической плотности умножают на коэффициент 100 или 1000 для выражения у.е. в больших целых числах. Например, сиаловые кислоты 130-200 у.е. соответствуют коэффициенту экстинкции 0,13-0,20, умноженному на 1000 .

# **Способ расчета результатов фотометрии по стандартным растворам**

Эталонные растворы обрабатываются параллельно с серией исследуемого биоматериала и находятся в тех же условиях, что исследуемый материал.

**Недостаток** - повышенный расход реактивов и рабочего времени.

**Подготовка эталонного раствора:** из реактива хч, взвешивание на аналитических весах с высокой точностью (для флуориметрии, а для ФЭК можно на торсионных), растворение в мерной колбе, концентрация вещества в стандарте должна быть близка к норме. Расчет исследований по стандартным растворам производится по способу простой арифметической пропорции: стандарт умножить на пробу разделить на стандарт.

# Способ расчета результатов фотометрии по калибровочному графику

Недостаток - ограниченное количество методик со стабильными условиями проведения и с хорошим подчинением результатов основному закону фотометрии. Калибровочные графики строятся для каждого фотометра отдельно, перенос на другой аппарат недопустим даже в случае использования однотипных фотометров, т.к. у каждого аппарата свои технические особенности. Калибровочные графики проверяются не реже 1 раза в год.

# Правила построения калибровочного графика

Проводят исследование серии стандартных растворов, различающихся между собой концентрацией. Диапазон концентраций должен охватывать как значения физиологической нормы, так и наиболее вероятные пределы патологии для данного исследуемого компонента. Для приготовления стандартных растворов навеска берется только на аналитических весах, обязательно в параллелях (для снижения вероятности ошибок, связанных с погрешностями взвешивания), растворение в мерной колбе.

Калибровочный график должен содержать:

- название метода исследования,
- заводской номер фотометра, к которому построен график,
- указать длину световой волны, толщину слоя кюветы,
- исходные данные для построения,
- дата построения

# Способ расчета результатов фотометрии по коэффициентам пересчета

Является наиболее простым и быстрым. Формула:  $C = F \times E$ , где  $C$  - концентрация исследуемого компонента,  $F$  - коэффициент пересчета,  $E$  - экстинция.

Коэффициент пересчета является величиной специфической для каждого отдельного теста. Обычно указывается в описании метода исследования. Можно рассчитывать самому на основании исследования стандартных растворов. За основу можно взять ранее построенный калибровочный график. Коэффициенты требуют проверки не реже 1 раза в год.

Коэффициенты используются в анализаторах. Они вводятся в память компьютера и выдаются автоматически.



# Методы оценки результатов фотометрии

1. по конечной точке (измерение в конечной точке) - учет образования продукта за некоторое время инкубации. Расчет результатов по стандарту.
2. по фиксированному времени - требуется применение фотометров с термостатируемыми кюветами. Устанавливается количество нарабатываемого (расходуемого) продукта за определенный промежуток времени, расчет концентрации по стандарту.
3. кинетически (кинетическое измерение) - производят измерение оптической плотности через определенные интервалы времени. Используется для ферментативных методов

# Особенности эксплуатации фотометрической аппаратуры

Показания фотометров можно снимать в единицах оптической плотности или в процентах поглощенного или прошедшего света относительно фоновых величин (шкалы разных цветов). **Во всех, предназначенных для измерений оптической плотности приборах, наибольшая точность достигается при значениях экстинкции около 0,3, т.е. когда проходит примерно половина падающего света. По мере удаления в ту или другую сторону точность измерения уменьшается!**

Экстинкция раствора есть произведение его концентрации на толщину слоя раствора. **Оптимальны в смысле чувствительности, точности и удобства кюветы с длине оптического пути 1 см.**

**Точность фотометрии значительно возрастает при использовании проточных кювет.**

# Основные источники ошибок при фотометрии

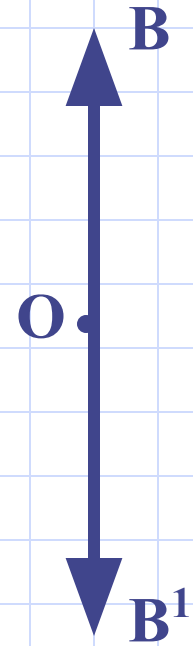
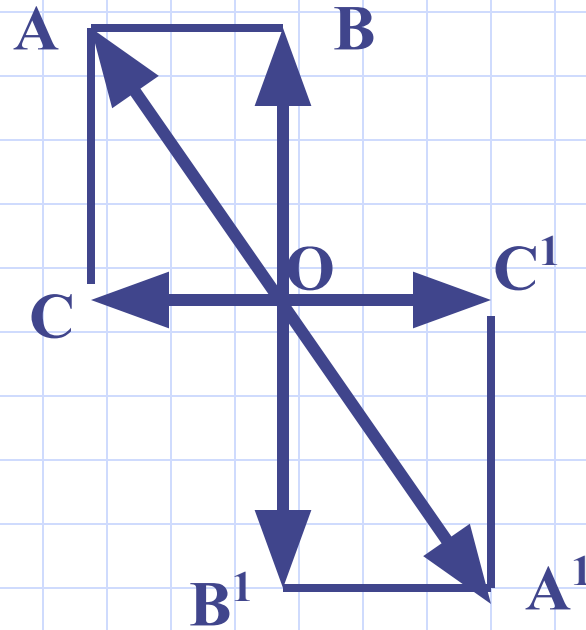
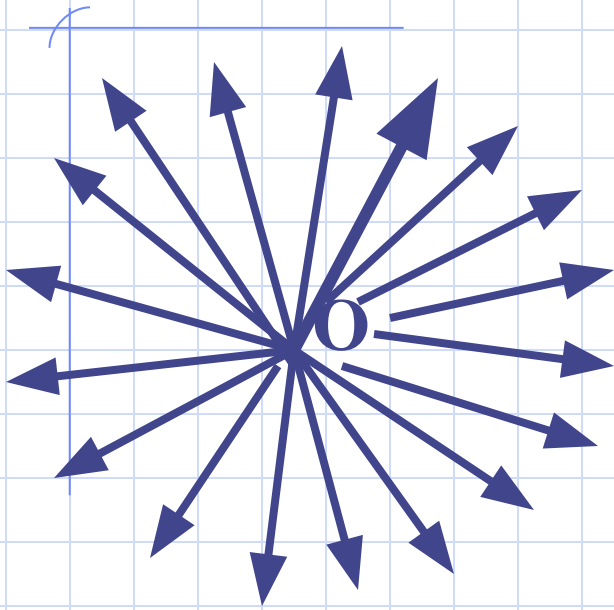
- 1). Работа с растворами, имеющими слишком высокую (более 1) или слишком низкую (менее 0,3) оптическую плотность резко увеличивает погрешность измерения.
- 2). Для фотометрии пригодны лишь прозрачные растворы. Мутные растворы рассеивают свет и снижают достоверность измерений. Мутные окрашенные растворы использоваться не должны.

# Рефрактометрия

**Метод основан на измерении показателя преломления света при прохождении его через оптически неоднородные среды.**

**Пример – определение общего белка в сыворотке. В лаборатории используется мало.**


# Обыкновенное и плоскополяризованное электромагнитное поле излучения



# Поляриметрия

Основан на способности веществ в растворе изменять плоскость поляризованного луча света.

**Пример – лазерный поляриметр для определения глюкозы в моче. В КЛД применяется мало.**



**БЛАГОДАРЮ  
ЗА ВНИМАНИЕ !!!**