**Время для изучения темы до 05.04.2020**

**Вопросы по выполнения задания – наставнику** Андрею Валерьевичу по ссылке <https://vk.com/id182241914>

**Тема для изучения: Спектрофотометрические методы анализа**

Спектрофотометрия – метод исследования и анализа, основанный на измерении спектров поглощения в оптической области электромагнитного излучения.

Спектрофотометрия широко применяется для исследования органических и неорганических веществ, для качественного и количественного определения различных веществ, для контроля технологических процессов и окружающей среды.

По типам изучаемых систем спектрофотометрию обычно делят на атомную и молекулярную. Спектры возникают при переходе системы из одного стационарного состояния в другое. При этом система поглощает или испускает энергию в виде кванта, величина которого равна разности энергии двух состояний:

hν = E2 – E1

где h – постоянная Планка; ν – частота кванта света.

Вместо частоты ν используют волновое число ω = ν/с = 1/λ, где с – скорость света; λ – длина волны. Волновое число ω также называют частотой. Тогда частота спектральных линий определяется по формуле:

ω = (Е2 – Е1)/сh

В свою очередь, энергетическое состояние определяется свойствами электронных оболочек атомов и молекул, колебаниями атомных ядер в молекулах и вращением молекул. Различают спектроскопию в инфракрасной (ИК), видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях спектра.

Съёмка молекулярных спектров основывается на следующем законе: молекула поглощает электромагнитное излучение только таких длин волн, какие она может излучать. При пропускании пучка лучей, имеющего сплошной спектр, сквозь слой определяемого вещества последнее поглощает лучи определённых длин волн. По спектральному составу света, поглощаемого молекулами данного вещества, можно судить о природе этих молекул. На этом основаны качественная и структурная спектроскопия. Применение спектроскопии в УФ и видимой областях спектра основано на поглощении электромагнитного излучения соединениями, содержащими хромофорные и ауксохромные группы.

Количественный спектральный анализ основана на том, что количество поглощаемой энергии зависит от числа молекул, принимающих участие в этих процессах. Основным законом, на котором основан количественный спектрофотометрических анализ, является закон Бугера-Ламберта-Бера.

**Закон Бугера-Ламберта-Бера:** каждая молекула (ион) растворённого вещества поглощает одинаковую часть монохроматического излучения; интенсивность излучения после прохождения слоя раствора уменьшается экспоненциально с увеличением концентрации растворённого вещества, а оптическая плотность линейно увеличивается с ростом концентрации. Этот закон объединяет два более простых закона: закон Бугера-Ламберта и закон Бера.

Закон Бугера-Ламберта: говорит о том, что каждый слой однородного вещества поглощает равную долю падающего на него монохроматического излучения.

Закон Бера: устанавливает связь между поглощением и концентрацией: поглощение монохроматического излучения прямо пропорционально концентрации поглощающего вещества.

**Вывод закона Бугера-Ламберта-Бера:** В толще раствора мысленно выделим элементарный слой сечением 1 см2 и толщиной dx см. Объём этого слоя равен dx см3. Если концентрацию раствора выразить через число молекул (ионов) растворённого вещества в 1 см3, то их количество в элементарном слое равно Ndx. Направим на элементарный слой, перпендикулярно к нему поток излучения с длиной волны лямбда и интенсивностью I (интенсивность равна энергии излучения, падающего на единицу поверхности в единицу времени). Предположим, что монохроматическое излучение с длиной волны лямбда поглощается только молекулами растворённого вещества и притом в равных количествах. Тогда уменьшение интенсивности излучения при прохождении через элементарный слой будет пропорционально числу поглощающих молекул и интенсивности падающего излучения:

-dI = εNIdx

Закон Ламберта справедлив при любой толщине слоя, если свет является монохроматичным, т.е. характеризуется только одной определённом частотой колебаний. Несоблюдение условия монохроматичиности света приводит к нарушению этого закона, так как коэффициент поглощения зависит от длины волны.

Область применения закона Бера является значительно более узкой, так как он предполагает независимость коэффициента поглощения от концентрации. Однако в растворах небольших концентрации коэффициент поглощения изменяется с ростом концентрации, так как при этом изменяется состояние вещества в растворе (вследствие ассоциации, диссоциации, полимеризации и т.д.).

Спектры излучения и поглощения. Как правило, анализируемая проба излучает и поглощает полихроматический свет, включающий кванты разной энергии и разной длины волны. Однако для аналитика предпочтительнее измерять испускание или поглощение света, в котором все кванты примерно одинаковы по энергии, соответствуют одной длине волны. Чтобы выделить ее из полихроматического излучения, нужно особое устройство – *монохроматор.*

Спектральные приборы, снабженные монохроматорами, называют спектрометрами, спектрографами или стилоскопами, в зависимости от используемого в них приемника излучения, то есть от того, какой способ регистрации спектра (фотоэлектрический, фотографический или визуальный) применяется в этих приборах. С помощью таких приборов можно зарегистрировать спектр излучения или спектр поглощения исследуемой пробы*.*

**Устройство и принцип работы спектрофотометра - видео**

<https://www.youtube.com/watch?v=D78mrgZbetA>

<https://www.youtube.com/watch?v=1EWFtbA0tmk>

**Основные приемы фотометрического определения.**

1 Метод градуировочного графика.

Закон Бугера - Ламберта - Бера аналитически выражается уравнением прямой зависимости Аλ от концентрации. Однако в силу химических и инструментальных причин эта линейная зависимость часто не выполняется. В таких случаях необходимо значительно увеличить число точек градуировочного графика зависимости Aλ стандартных растворов от их концентрации. Однако, даже в отсутствие нарушений линейности, нужно иметь не менее 3-4 точек, чтобы быть уверенным в надежности анализов. Недостатки метода: трудности приготовления эталонных растворов и влияние «третьих» компонентов (сами не определяются, но влияют на результаты измерения). Этот метод обладает высокой точностью, потому получил широкое применение.

2 Метод определения молярного коэффициента поглощения.

Применим к растворам, обязательно подчиняющимся основному закону фотометрии. Готовят несколько стандартных растворов (Cст) и измеряют их Аст. Рассчитывают ελ по формуле ελ=Аст/Cст. Находят среднее арифметическое этих величин. Очень трудно определить истинное значение ε, поэтому εср лучше определить, используя табличные данные. Затем измеряют оптическую плотность исследуемого раствора и рассчитывают концентрацию вещества по формуле:

c = A / ε l

3 Метод добавок.

Сначала определяют оптическую плотность анализируемого раствора Ах с концентрацией Cх. После этого в исследуемый раствор добавляют известное количество определяемого компонента Cст и снова фотометрируют, измеряя Ах+ст. Оптические плотности растворов равны:

Ax = ελ·l·cx и Ax+ст = ελ·l·(cx + cст)

Поделим эти выражения и получим:

Cx = Cст · Ax/( Ax+ст - Ax)

Спектры поглощения одного и того же вещества в координатах А – λ имеют одинаковый вид независимо от толщины слоя раствора или концентрации вещества в растворе и характеризуются максимумом при одной и той же длине волны, при которой и проводят все определения.

Задачи для самостоятельного решения.

1. Рассчитайте удельный показатель поглощения полученного раствора с нано частицами в максимуме длины волны 444 нм, если оптическая плотность раствора 1\*10 –5 г препарата в 1 мл, равна 0,328 при толщине слоя 10 мм.

2. Найдите молярный показатель поглощения для нано частиц серебра при длине волны 396 нм., если оптическая плотность 0,0005% раствора при толщине слоя 10 мм равна 0,40, М.м. 264,20.

3. Дайте заключение о качестве лекарственной формы состава:

Раствора рибофлавина 0,02% - 10 мл.

Кислоты аскорбиновой 0,02

Тиамина бромида 0,02

Калия йодида 0,3

по количественному содержанию рибофлавина, если оптическая плотность раствора , полученного разведением 0,5 мл лекарственной формы до 10 мл. водой, измеренная при длине волны 445 нм в кювете с толщиной поглощающегося слоя 10 мм, равна 0,340, удельный показатель рибофлавина в максимуме при 445 нм равен 328

4. Исследовать раствор с содержанием веществ 0,02% - 200 мл если оптическая платность испытуемого раствора 0,230: оптическая плотность стандартного раствора 0,265, а концентрация стандартного раствора 0,0002 г/мл.

5. Оптическая плотность стандартного раствора, полученного из 1 мл 0,02 % раствора РСО фурацилина по той же методике равна 0,290.Содержание фурацилина в 1 мл препарата должно быть 0,000194 –0,000206 г, определить оптическую плотность в данном интервале.

Дополнительные вопросы для самостоятельного и углубленного изучения данной темы

1. Классификация и отнесение электронных переходов. π-π\*, σ-σ\*,n- π переходы.
2. Интенсивности полос различных переходов. Переходы с переносом заряда.
3. Применение электронных спектров поглощения в качественном и количественном анализе. Закон Бугера-Ламберта-Бера.
4. Оценка максимумов поглощения диеновых систем и ненасыщенных кетонов. Правила Вудворта-Физера.
5. Особенности поглощения ароматических систем. Правила Стокса
6. Вероятности переходов между электронно-колебательно-вращательными состояниями. Принцип Франка - Кондона. и расчет характерных полос в электронных спектрах поглощения
7. УФ-спектроскопия нуклеиновых кислот
8. УФ-спектроскопия белков
9. УФ-спектроскопия витаминов и лекарств
10. Определение типа перехода. Батохромные и гипсохромные сдвиги под действием растворителя
11. Гиперхромные и гипохромные эффекты в биополимерах. Изучение «плавления» биополимеров.
12. Передача энергии возбуждения, FRET-методы.
13. Использование поляризованного света, эффект деполяризации.
14. Флуоресценция в УФ-области. Исследования белков и других природных соединений.
15. Эмиссионная УФ спектроскопия как метод исследования двухатомных молекул
16. Атомно-абсорбционная спектрометрия. Основы метода ААС. Источники первичного излучения.