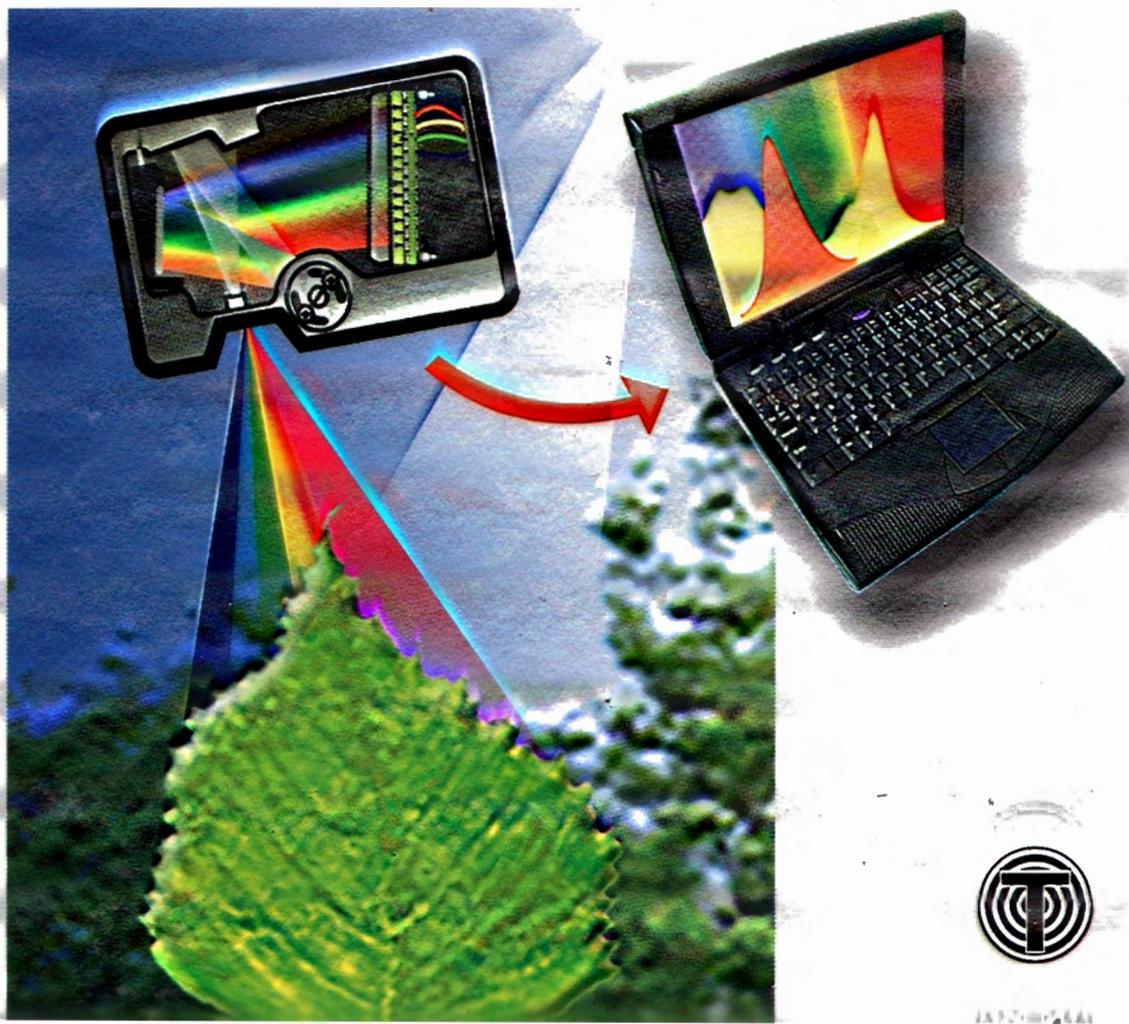


В. ШМИДТ

# ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ДЛЯ ХИМИКОВ И БИОЛОГОВ



1872-00544





# МИР физики и техники

В. ШМИДТ

## Оптическая спектроскопия для химиков и биологов

Перевод с английского  
Н. П. Ивановской  
под редакцией  
С. В. Савилова

ТЕХНОСФЕРА

Москва

2007

**Шмидт В.**

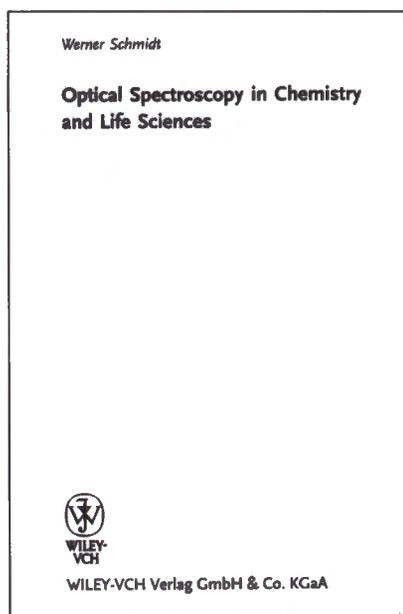
**Оптическая спектроскопия для химиков и биологов**

**Москва:**

**Техносфера, 2007. – 368 с., 6 полос цв. вклейки. ISBN 978-5-94836-140-6**

Книга представляет собой компактное и в то же время полное введение в теорию и практику оптической спектроскопии. Автор умело ведет читателя от методических основ к практическому применению. Подробно рассмотрены атомная и молекулярная спектроскопия, люминесцентная и фотоакустическая, рамановская (КР) и инфракрасная (ИК) спектроскопия. Автор делает акценты на преимуществах и недостатках каждого метода.

Книга предназначена для химиков и биологов, а также студентов и аспирантов естественнонаучных специальностей.



Originally published in the English language by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstrasse 12, D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany, under the title «Optical Spectroscopy in Chemistry and Life Sciences. An Introduction».

© 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

© 2007, ЗАО «РИЦ «Техносфера», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление.

**ISBN 978-5-94836-140-6**

**ISBN 978-3-527-29911-9 (нем.)**

Атомная-эмиссия  
Атомная-абсорбция  
Рентгеновская-флуоресценция  
Молекулярная флуоресценция

## СПЕКТРОМЕТРИЯ

### ISS

**Иновации в флуоресценции для научных и биомедицинских исследований:**

Молекулярная динамика. Коэффициенты кинетических параметров. Взаимодействие антител. Гибридизация нуклеиновых кислот. Химические реакции. Молекулярное агрегатирование и полидисперсность. Взаимодействие лигандов и рецепторов.



### PC1.

Счёт фотонов

Спектры эмиссии, возбуждения, поляризации, синхронной, люминисценции, Исследования кинетики с миллисекундным разрешением. Счёт фотонов по 3-м каналам.

### Alba FCS™

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия

### Alba FLIM™

Конфокальная оптика и флуоресценция времени жизни.

### Chronos™

Пикосекундная спектроскопия времени жизни

### K2™

Мультисчастотный корреляционный фазовый и модулированный флуориметр

## THERMO Fisher Scientific

Атомно-эмиссионная, атомно-абсорбционная спектрофотометрия.



### iCAP 6300 / 6500

Атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой. Одновременная регистрация на детектор CID любых спектральных линий.

### SOLAAR M

Атомно-абсорбционный спектрометр с двумя атомизаторами.

### SOLAAR S

Автоматический атомно-абсорбционный спектрометр.

### КОМПЛЕКТУЮЩИЕ

Горелки, распылители, индукторы, трубки ввода пробы, графитовые кюветы, лампы с полым катодом, стандартные растворы, автосамплеры, лазерная абляция, рециркуляторы, компрессоры, и др.



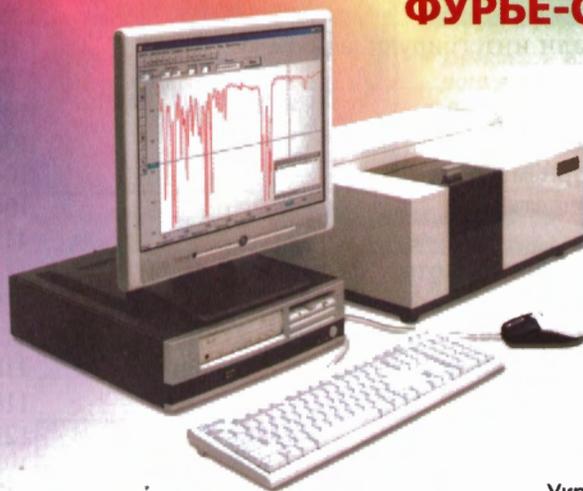
ООО «ЛАБТЕСТ»

Москва, Б.Тишинский пер, 38, оф.617. Тел/Факс: 495-205-3507, 495-518-9452  
www.lab-test.ru, info@lab-test.ru

# СОДЕРЖАНИЕ

<b>Предисловие редактора перевода</b> .....	<b>12</b>
<b>Глава 1. Введение в оптическую спектроскопию</b> .....	<b>13</b>
1.1. Общие сведения.....	13
1.2. История оптической спектроскопии.....	17
1.3. Дополнительная литература.....	22
<b>Глава 2. Основные принципы</b> .....	<b>24</b>
2.1. Природа света.....	24
2.2. Электромагнитное излучение.....	25
2.3. Взаимодействие света и материи.....	28
2.3.1. Фундаментальные принципы оптической спектроскопии. Атом водорода.....	29
2.3.2. Атомы с несколькими электронами.....	35
2.3.2.1. Электронные оболочки и периоды.....	36
2.3.2.2. Векторная модель, правила Паули и Хунда.....	39
2.3.2.3. Атом гелия.....	42
2.3.3. Простые молекулы и их спектральные свойства.....	43
2.3.3.1. Химическая связь.....	43
2.3.3.2. Электронные спектры двухатомных молекул.....	45
2.3.3.3. Молекулярные колебания.....	51
2.3.3.4. Моменты перехода.....	55
2.3.3.5. Вращательный спектр.....	56
2.3.3.6. Вращательно-колебательные полосы.....	58
2.3.3.7. Вращательные, колебательные и электронные переходы.....	59
2.3.3.8. Спектры атомов и молекул, малых и больших: сравнение.....	61
2.4. Дополнительная литература.....	62
<b>Глава 3. Оптика в спектроскопии</b> .....	<b>64</b>
3.1. Введение.....	64
3.2. Физические световые единицы.....	65
3.3. Фотометрические световые единицы.....	68
3.4. Световые источники.....	71
3.4.1. Излучение черного тела.....	72
3.4.2. Лампы накаливания.....	73
3.4.3. Газоразрядные лампы.....	74
3.4.4. Светоизлучающие диоды.....	77
3.4.5. Лазеры.....	78
3.4.6. Синхротронное излучение (Черенкова).....	83
3.5. Геометрическая оптика и волновая оптика.....	83
3.5.1. Преломление и отражение.....	83
3.5.2. Формулы Френеля.....	84

# ИНФРАКРАСНЫЕ ФУРЬЕ-СПЕКТРОМЕТРЫ ФСМ



Лабораторные спектрометры для средней и ближней ИК областей спектра.

Предназначены для качественного и количественного анализа твердых, жидких и газообразных проб, и контроля качества продукции.

Прибор включен в Госреестры средств измерений России, Украины, Белоруссии и Казахстана

Модель	ФСМ1201	ФСМ1202	ФСМ1211
Спектральный диапазон, см <sup>-1</sup>	400–7800	400–7800	2500-12000
Спектральное разрешение, см <sup>-1</sup>	1.0	0.5	2.0
Отношение сигнал/шум (1 мин, 4 см <sup>-1</sup> )		>20000	
Минимальное время получения спектра, с		1	
Размеры кюветного отделения, см		15×19×17	
Размеры спектрометра, см		52×37×25	
Масса спектрометра, кг		28	

- Спектрометры полностью автоматизированы и управляются от персонального компьютера. Базовое программное обеспечение работает в среде Windows XP и обеспечивает измерение спектров, тестирование спектрометра, работу со спектральной базой данных. Имеется широкий набор операций, предназначенных для обработки, анализа и отображения спектров.

- Для спектрометров ФСМ имеется большой набор оптических приставок и приспособлений для ИК спектроскопии: разборные и неразборные жидкостные кюветы, газовые кюветы, в том числе многоходовые, приставки для измерения зеркального и диффузного отражения, приставки МНПВО, прессы и пресс-формы для изготовления таблеток КВг, ИК микроскоп и др.

## ИНФРАСПЕК, ООО

С.-Петербург, 196135, а/я 128

Тел./факс: 812 3828857, 812 3829064

E-mail: [info@infra.spb.ru](mailto:info@infra.spb.ru) Web: [www.infra.spb.ru](http://www.infra.spb.ru)

3.5.3. Линзы и зеркала	87
3.5.4. Траектория светового луча	91
3.5.5. Оптические волокна	92
3.5.6. Сфера Ульбрихта или интегрирующая сфера	95
3.5.7. Модуляторы	98
3.6. Монохроматоры	100
3.6.1. Фильтры	100
3.6.2. Диспергирующие призмы	104
3.6.3. Дифракционные решетки	106
3.7. Фотодетекторы	111
3.7.1. Фотодетекторы с внешним фотоэффектом	113
3.7.2. Фотодетекторы с внутренним фотоэффектом	115
3.7.3. Фотодетекторы с термоэлектрическим эффектом	117
3.7.4. Фотохимические детекторы	118
3.8. Кюветы	118
3.9. Дополнительная литература	121
<b>Глава 4. Атомная спектроскопия</b>	<b>122</b>
4.1. Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС)	123
4.1.1. Пламенный метод	125
4.1.2. Метод графитовой печи	127
4.1.3. Фоновое поглощение	128
4.2. Атомно-эмиссионная спектроскопия	130
4.3. Интерференция	138
4.4. Дополнительная литература	139
<b>Глава 5. Молекулярная абсорбционная спектроскопия</b>	<b>141</b>
5.1. Закон Бугера — Ламберта — Бера	141
5.1.1. Вывод закона	141
5.1.2. Отклонения от закона	145
5.1.3. Терминология	147
5.2. Монохроматоры	148
5.2.1. Устройство монохроматоров	149
5.2.2. Типы дифракционных решеток	154
5.2.3. Линеаризация длины волны	155
5.2.4. Типы сканирующих абсорбционных спектрофотометров	157
5.2.5. Шум	161
5.2.6. Фотометрическая ошибка	164
5.2.7. Рассеянный свет	165
5.2.8. Измерение мутных образцов	167
5.2.9. Спецификация	170
5.3. Поглощающие свойства молекул	172
5.3.1. Основные электронные переходы	172
5.3.2. Комплексы с переносом заряда	174
5.3.3. Комплексы переходных металлов	176
5.4. Модификация спектров поглощения	182
5.4.1. Разностная спектрофотометрия	182



**«P-310A» газоанализатор  
оксида и диоксида азота**

- Диапазон измерений концентраций NO, NO<sub>2</sub>: 0–1000 мкг/м<sup>3</sup>
- Разрешение цифровой шкалы: 1.0 мкг/м<sup>3</sup>
- Принцип действия: гетерогенная хемилюминесценция

**«С-310А» газоанализатор  
диоксида серы**

- Диапазон измерений концентраций SO<sub>2</sub>: 0–2000 мкг/м<sup>3</sup>
- Разрешение цифровой шкалы: 1.0 мкг/м<sup>3</sup>
- Принцип действия: гетерогенная хемилюминесценция



**«3.02 II-A» газоанализатор озона**

- Диапазон измерений концентраций O<sub>3</sub>: 0–500 мкг/м<sup>3</sup>
- Разрешение цифровой шкалы: 1.0 мкг/м<sup>3</sup>
- Принцип действия: гетерогенная хемилюминесценция

**«СВ-320» газоанализатор  
диоксида серы и сероводорода**

- Диапазон измерений концентраций: SO<sub>2</sub>: 0–2.0 мг/м<sup>3</sup>; H<sub>2</sub>S: 0–0.2 мг/м<sup>3</sup>
- Разрешение цифровой шкалы: 1.0 мкг/м<sup>3</sup> (SO<sub>2</sub>) и 0.1 мкг/м<sup>3</sup> (H<sub>2</sub>S)
- Принцип действия: гетерогенная хемилюминесценция



**«H-320» газоанализатор аммиака**

- Диапазон измерений концентраций NH<sub>3</sub>: 0–1000 мкг/м<sup>3</sup>
- Разрешение цифровой шкалы: 1.0 мкг/м<sup>3</sup>
- Принцип действия: гетерогенная хемилюминесценция

**«ОПТОГАЗ-500.4» газоанализатор  
диоксида углерода**

- Диапазон измерений концентраций CO<sub>2</sub>: 0–2000 ppm
- Разрешение цифровой шкалы: 1 ppm
- Принцип действия: NDIR-оптический



5.4.2. Гипер- и гипохромизм	183
5.4.3. Дифференциальная спектрофотометрия	185
5.4.4. Корреляция	189
5.4.4.1. Теория	189
5.4.4.2. Сглаживание	189
5.4.4.3. Производные	190
5.4.4.4. Деконволюция	191
5.4.4.5. Сравнение Фурье-преобразования с корреляцией	192
5.4.5. Спектральный многокомпонентный анализ	194
5.5. Двуволновая спектрофотометрия	195
5.5.1. Введение	195
5.5.2. Методы	196
5.5.3. Измерение вызванных гравитацией изменений в поглощении живых тканей	200
5.6. Спектрофотометры специального назначения	201
5.6.1. Спектрофотометрия остановленной струи	201
5.6.2. Быстрый мониторинг спектра	201
5.7. Дополнительная литература	206
<b>Глава 6. Люминесцентная спектрофотометрия</b>	<b>208</b>
6.1. Введение	208
6.2. Механизмы флуоресценции	210
6.2.1. Происхождение флуоресценции и фосфоресценции	210
6.2.2. Диаграммы энергии	212
6.2.3. От диаграммы энергии к спектрам	212
6.2.4. Влияние растворителя	214
6.2.5. Основы квантовой механики	216
6.2.6. Квантовый выход флуоресценции	219
6.3. Измерение флуоресценции	220
6.3.1. Флуориметр	220
6.3.2. Коррекция спектров флуоресценции	221
6.3.3. Линейность флуоресцентного сигнала	223
6.3.4. Мутные образцы и измерения при низких температурах	226
6.3.5. Дополнительные источники ошибки	227
6.4. Поляризация и анизотропия	228
6.4.1. Определения	228
6.4.2. Перенос энергии	232
6.4.3. Деполяризация	232
6.5. Время жизни флуоресценции	239
6.5.1. Определения	239
6.5.2. Экспериментальное определение времени жизни флуоресценции	240
6.5.3. Определение квантового выхода	243
6.5.4. Тушение флуоресценции	245
6.6. Отдельные приложения	246
6.6.1. Редкоземельные элементы и актиноиды	246
6.6.2. Белки	247



Модульное построение спектрометров  
AvaSpec позволяет создавать различные  
конфигурации для эффективного решения  
самых разнообразных задач



**SOLUTIONS IN  
SPECTROSCOPY**



Автоматизированные оптоволоконные спектрометры AvaSpec производства голландского холдинга Avantes B.V. являются универсальными измерительными системами, применимыми во всех областях, где могут быть использованы данные оптической спектроскопии

ООО «ЛОКАМЕД»

Измерения в широком диапазоне длин волн  
(от 180 нм до 2500 нм)

197376 г. Санкт-Петербург,  
ул. Проф. Попова, дом 15/17

Спектральное разрешение от 0.04 нм

телефон: (8 812) 936 20 39  
факс: (8 812) 234 59 73

Высокоскоростной интерфейс USB2.0 или Bluetooth

Специализированное программное обеспечение

Возможность сохранения результатов измерений  
на карту памяти в спектрометре

e-mail: [vlad@avantes.ru](mailto:vlad@avantes.ru)  
web: [www.avantes.ru](http://www.avantes.ru)

Возможность подключить до 127 оптоволоконных  
измерительных синхронизированных каналов

# НОВЫЕ КНИГИ

ПО ТЕХНИЧЕСКИМ И ЕСТЕСТВЕННЫМ НАУКАМ

**КНИЖНЫЕ СЕРИИ:**

- Мир математики
- Мир физики и техники
- Мир биологии и медицины
- Мир химии
- Мир наук о Земле
- Мир материалов и технологий
- Мир электроники
- Мир программирования
- Мир связи
- Мир строительства
- Мир цифровой обработки
- Мир экономики
- Мир дизайна
- Мир увлечений
- Библиотечка "Квант"



**ТЕХНОСФЕРА**  
РЕКЛАМНО-ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР

125319 Москва, а/я 594  
телефон: (495) 234-0110, факс: (495) 956-3346  
E-mail: [sales@technosphere.ru](mailto:sales@technosphere.ru)  
<http://www.technosphere.ru>

6.6.3. Метки и зонды	247
6.6.4. Хелаты	248
6.6.5. Определение кальция	249
6.6.6. Суммарная флуориметрия	250
6.6.7. Флуоресцентные сенсоры	251
6.6.8. Импульсный амплитудно-модулирующий флуориметр (ИАМ)	253
6.7. Фосфоресценция	255
6.8. Хеми- и фотобиолюминесценция	257
6.8.1. Хемилюминесценция	257
6.8.2. Биолюминесценция	257
6.8.2.1. Биолюминесценция жуков-светляков	258
6.8.2.2. Бактериальная биолюминесценция	258
6.8.2.3. Катализируемые ферментами системы, продуцирующие пероксид водорода	259
6.8.2.4. Приборы и оборудование	259
6.8.2.5. Сверхслабая люминесценция	259
6.9. Замедленная люминесценция	260
6.9.1. Теоретические основы	260
6.9.2. Технические требования	264
6.9.3. Термолюминесценция	265
6.10. Дополнительная литература	266
<b>Глава 7. Фотоакустическая спектроскопия</b>	<b>269</b>
7.1. Введение	269
7.2. Основной принцип фотоакустической спектроскопии (ФАС)	269
7.3. Теория фотоакустической спектроскопии	271
7.3.1. Общие сведения	271
7.3.2. Фотоакустически определяемые спектры поглощения	274
7.3.3. Свойства насыщения	274
7.3.4. Глубинные профили фотоакустических спектров	275
7.3.5. Измерение фотофизических параметров с помощью ФАС	279
7.4. Экспериментальные методы	280
7.5. Фотохимически активные образцы	281
7.5.1. Модификация ФА сигналов	281
7.5.2. Частотный спектр ФА сигнала	283
7.5.3. Хлоропласты	284
7.6. Некоторые методы ФАС	285
7.6.1. Фотоакустическая микроскопия	285
7.6.2. Индуцированная лазером ФАС	286
7.6.3. Фототермическая радиометрия	287
7.6.4. Фотоакустическая спектроскопия на основе ИК преобразования Фурье (ИКПФ-ФАС)	288
7.7. Выводы и перспективы	288
7.8. Дополнительная литература	289
<b>Глава 8. Рассеяние, преломление и отражение</b>	<b>291</b>
8.1. Введение	291

8.2. Упругое рассеяние	293
8.2.1. Вывод уравнения Релея	293
8.2.2. Определение молекулярной массы	297
8.2.3. Рассеяние на больших частицах	300
8.2.4. Рассеяние Фраунгофера	305
8.2.5. Интенсивность рассеяния $I_s$ и размер частицы	307
8.2.6. Динамическое рассеяние	310
8.3. Рамановское рассеяние и инфракрасная спектроскопия	312
8.4. Радуга	316
8.5. Спектроскопия отражения	319
8.5.1. Теоретические основы	319
8.5.2. Некоторые практические результаты	321
8.6. Спектроскопия ослабленного полного отражения (СОПО)	326
8.7. Дополнительная литература	328
<b>Глава 9. Круговой дихроизм и оптическое вращение</b>	<b>330</b>
9.1. Поляризация света	330
9.2. Дисперсия оптического вращения (ДОВ)	333
9.3. Круговой дихроизм (КД)	336
9.4. Теоретические основы эффекта Коттона	342
9.5. Спектрометр КД	344
9.6. Применения	345
9.7. Эллипсометрия	346
9.8. Завершающие комментарии	348
9.9. Дополнительная литература	348
<b>Глава 10. Спектроскопия ближнего инфракрасного диапазона</b>	<b>350</b>
10.1. Введение	350
10.2. Теория спектроскопии ближнего инфракрасного диапазона	351
10.3. Инфракрасный спектрометр	353
10.4. Представление спектров ближней ИК области	354
10.5. Алгоритмы анализа спектров ближней ИК области	355
10.6. Применения	357
10.6.1. Медицина и фармакология	358
10.6.2. Пластмассы	360
10.6.3. Солевой состав морской воды	361
10.7. Выводы	362
10.8. Дополнительная литература	362
<b>Приложение 1. Основные физические константы</b>	<b>364</b>
<b>Приложение 2. Коэффициенты перевода единиц измерения энергии</b>	<b>365</b>
<b>Приложение 3. Периодическая таблица элементов Д.И.Менделеева</b>	<b>366</b>

# ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Высокий уровень аналитического контроля продукции и входящего сырья является одним из важнейших факторов, обеспечивающих успешную деятельность и развитие любого предприятия. Постоянно совершенствующиеся технологии микроэлектроники, оптики, полупроводниковой техники обуславливают ежегодное, а порой, и более частое обновление парка аналитического оборудования. Все это предъявляет серьезные требования к учебным заведениям, осуществляющим подготовку специалистов химических и физических специальностей, которым предстоит освоить данную высокотехнологичную продукцию.

Несмотря на это, в основе работы даже самого технически сложного прибора, по большей части, лежат принципы и законы, сформулированные еще более ста лет назад. Без их знания и понимания попытки в совершенстве овладеть современным оборудованием будут лишены всякого смысла.

Данная книга, несомненно, окажется полезной для широкого круга читателей — от любознательных людей до узких специалистов. Изложению основного материала в ней предшествует краткий исторический очерк, сам по себе представляющий большой интерес. После него автор кратко, но очень емко излагает основные понятия об атомах и молекулах, природе химической связи, световом излучении и его взаимодействии с веществом; затем в книге последовательно описываются составляющие любого спектрального прибора — источники возбуждения спектра, диспергирующие элементы и монохроматоры, детекторы излучения. На основании этих данных автор в дальнейшем обсуждает атомную и молекулярную спектроскопию, люминесцентную и фотоакустическую, рамановскую (КР) и инфракрасную (ИК) спектроскопию. В каждом случае он делает акцент на преимущества и недостатки метода, обсуждает влияние условий проведения эксперимента, приводит описание дополнительных приставок и приспособлений.

Надеюсь, что данная монография будет настольной книгой для студентов и аспирантов естественнонаучных специальностей вузов, позволит возродить, к сожалению, утраченные инженерные кадры и сыграет большую роль в подготовке квалифицированных специалистов для предприятий и научных учреждений России.

*Старший научный сотрудник химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, кандидат химических наук Савилов С.В.*

# ГЛАВА I

## ВВЕДЕНИЕ В ОПТИЧЕСКУЮ СПЕКТРОСКОПИЮ

*Bene docet, qui bene distinguit*

*Правильный выбор означает правильное изучение*

*Гораций*

### 1.1. Общие сведения

Под *оптической спектроскопией* (ОС) в данной книге понимаются все методы количественного и качественного анализа, основанные на взаимодействии света с живой и неживой материей.

Термин *свет* означает электромагнитное излучение от дальней области ультрафиолетового диапазона (УФ) до ближней области инфракрасного диапазона (ближняя ИК). На протяжении более чем двухсот лет оптическая спектроскопия применяется в различных областях науки, производства и медицины, в том числе в химии, биологии, физике и астрономии. Высокая специфичность ОС объясняется тем, что каждое вещество обладает своими спектральными свойствами, отличными от спектральных свойств других веществ. Вещества можно анализировать как в количественном, так и в качественном аспектах. В отличие от других методов спектроскопии, таких как ЯМР (ядерный магнитный резонанс), ЭПР (электронный парамагнитный резонанс), Мессбауэровской или масс-спектрометрии, для анализируемых с помощью ОС образцов практически нет ограничений. Измерения различных оптических параметров в зависимости от длины волны/энергии излучения («спектр») или временных параметров («кинетика») обеспечивают ценную информацию, которую не всегда можно получить другими аналитическими методами.

Оптический спектральный анализ — это хорошо развитый метод. Однако рынок спектрофотометров все время расширяется в связи с появлением новых применений метода. В зависимости от предъявляемых требований спектрофотометры существенно различаются по размерам, форме, применимости и, в конечном счете, по стоимости. Поэтому современная тенденция заключается скорее в использовании специализированных спектрофотометров умеренной стоимости, а не громоздких, доступных для всевозможных применений «многоцелевых установок» с наилучшими характеристиками.

Технические параметры современных спектрометров настолько совершенны, что приближаются к пределу, обусловленному известными на се-

годняшний день законами физики. По сравнению с другими аналитическими методами оптическая спектроскопия обладает рядом преимуществ:

- метод ОС не является разрушающим или агрессивным;
- измерения можно производить с любого расстояния — от нескольких миллиметров до нескольких сот километров (с самолетов и спутников) без физического контакта с образцом. Опасные и недоступные объекты легко поддаются анализу;
- жидкие образцы так же легко исследуются, как твердые или газообразные, независимо от их оптических свойств. Для метода также не важно, является ли объект прозрачным, полупрозрачным или совершенно непрозрачным;
- по ширине охватываемого диапазона фотометрические и кинетические методы перекрывают все другие аналитические методы;
- такой метод, как фемтосекундная лазерная спектроскопия, позволяет измерять чрезвычайно быстрые реакции, протекающие в фемтосекундной временной шкале ( $10^{-15}$  с);
- незначительное количество образца в микрометровой области (микроспектроскопия) или очень редкие явления могут быть исследованы методом счета единичных фотонов (измерение нескольких фотонов в секунду);
- с помощью люминесцентных методов определяются чрезвычайно низкие концентрации (менее 10—18 моль/л) веществ;
- радиоактивные маркеры, применяемые для исследований в биохимических и молекулярно-биологических процессах, все в возрастающей степени заменяются более дешевыми и безопасными люминесцентными маркерами, а оборудование — недорогими люминесцентными спектрометрами.

В настоящей книге будут обсуждены существенные особенности оптической спектроскопии с минимальным описанием сложных теорий, а также различные связанные с ней процессы и аппаратура. Это довольно сложная задача в связи со значительным прогрессом, произошедшим в последнее время в области оптоэлектроники, лазерных технологий и микрокомпьютерной техники. Следует отметить, что книга не является руководством по использованию конкретного спектрофотометра. С этой целью читатель должен обращаться к инструкции производителя.

После краткого описания истории развития оптической спектроскопии в данной главе, следующая позволит ориентироваться в квантово-теоретических концепциях, которые являются основой для понимания спектральной природы материи. Описание начнется с атома водорода, как простейшей квантово-механической системы, затем будут рассмотрены спектральные свойства маленьких, двухатомных молекул, и, наконец, будут изучены сложные молекулы (биологические).

Оптическая спектроскопия неотъемлема от физической оптики. Поэтому в главе 3 даются необходимые основы этой области знаний: определения радиометрических и фотометрических световых единиц, основы оптической геометрии, волновой оптики и оптики элементарных частиц. И, наконец, будут описаны способы генерирования света и его измерения.

Будут рассмотрены свойства таких оптических компонентов, как фильтры, зеркала, линзы, оптоволокно, интегрирующие сферы, а также будут описаны методы диспергирования света с помощью призм, решеток и интерферометров.

В четвертой главе на базе сведений из предыдущих глав будут рассмотрены атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) и атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС) как два варианта атомной спектроскопии.

В пятой главе более детально будут обсуждаться теоретические и практические аспекты молекулярной абсорбционной спектроскопии, которая наиболее широко применяется в качестве аналитического инструмента в различных областях. Будут рассмотрены различные варианты абсорбционных спектрофотометров и методы обработки полученного спектра.

В шестой главе рассматривается люминесцентная спектроскопия. В отличие от абсорбционной спектроскопии, позволяющей получать параметры молекулы, с помощью люминесцентной спектроскопии можно получить параметры молекулярных систем.

Фотоакустическая спектроскопия (ФАС), при которой определяется теплоотдача, будет рассмотрена в седьмой главе. С помощью ФАС определяются термодинамические взаимодействия, в частности сложных молекулярных систем в биологии, химии и медицине. Кроме того данный метод позволяет осуществлять спектральное сканирование невидимых, находящихся под поверхностью (например кожи или кожуры фрукта) слоев материала.

В восьмой главе будут обсуждены методы измерения и выявления рассеяния различных типов, таких как Релеевское, Рамановское, рассеяние Ми и Фраунгофера, включая спектроскопию отражения и ослабленного полного отражения (ОПО)<sup>1</sup>. Учитывая важность хиральных и стереохимических свойств биомолекул, в девятой главе будут даны основы спектроскопии на основе дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД), хотя оба метода — производные абсорбционной спектроскопии и связаны с главами 5 и 8. Будет рассмотрена также эллипсометрия, построенная на измерении сдвига фаз при отражении поляризованного света от поверхности материала. Данный метод применяется для высокочувствительного анализа биологических молекул.

В настоящее время наблюдается расширение сфер применения спектроскопии в ближнем инфракрасном диапазоне (ближняя ИК). Большим спросом пользуются недорогие компьютеризированные спектрометры, работающие в этой области. Они незаменимы при анализах в пищевой и фармацевтической промышленности, медицине, нефтехимии, геологии и экологии. Подчеркнуты дальнейшие технические достижения в этой все расширяющейся области промышленных исследований. Этой области спектроскопии посвящена глава 10.

---

<sup>1</sup> Прим. редактора: в русской транскрипции для обозначения этого вида спектроскопии применяют различные термины — ослабленное внутреннее отражение (ОВО), нарушенное полное внутреннее отражение (НПВО) или многократно нарушенное полное внутреннее отражение (МНПВО)



**Рис. 1.1.** Обзор всех видов оптической спектроскопии, рассматриваемых в данной книге. Оптическая спектроскопия основана на четырех явлениях: поглощении, отражении, рассеянии и люминесценции, которые образуют фундамент целого ряда последующих дисциплин. Для упрощения фотоакустическая спектроскопия — тип эмиссионной спектроскопии (эмиссия тепла) — отнесена здесь к люминесцентной спектроскопии

Наиболее важные физические константы, используемые в данной книге, приведены в приложении 1. В приложении 3 дается Периодическая система элементов Д.И. Менделеева, включающая детальное распределение электронов. Кроме того, в приложении 2 приведена таблица перевода различных единиц энергии. В конце каждой главы приводится список дополнительной литературы.

На рис. 1.1 представлены все типы оптической спектроскопии, рассматриваемые в данной книге.

## 1.2. История оптической спектроскопии

В таблице 1.1 представлена история оптической спектроскопии.

**Табл. 1.1.** История оптической спектроскопии

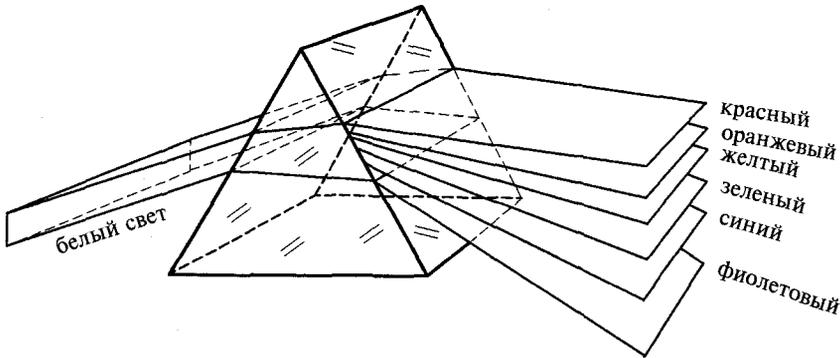
Дата	Этап
1666	Сэр Исаак Ньютон впервые использовал призму для разложения света в спектр
1675	Вышла в свет знаменитая книга Ньютона «Оптика»
1758	Маркграф опубликовал визуальный метод определения вещества на основе изменения цветности пламени (без дисперсии)
1800	Гершель открыл ИК излучение (Англия)
1801	Риттер открыл УФ излучение (Германия)
1802	Волластон с помощью щели и линз впервые осуществил пламенную спектроскопию
1807	Янг, используя двойные щели, доказал волновую природу света, впервые интерпретировав «цвета тонких слоев» и действие оптической решетки
1808	Малюс распознал поляризацию света при отражении
1814	Фраунгофер с помощью дифракционной решетки получил 1500 линий в спектре солнечного света
1817	Янг решил проблему «поляризации отражением», объединив волновые свойства света и свойства элементарных частиц; трансверсальная поляризация
1818	Френель и Гюйгенс соединили волновые свойства света и принцип Гюйгенса
1834	Тальбот спектрально разделил «красный стронций» и «красный литий»; год рождения аналитической оптической спектроскопии
1848	Фуко исследует натрий в электрической дуге (поглощение/эмиссия)
1859	Кирхгофф установил, что длина волны поглощения равна длине волны эмиссии, и открыл натрий в спектре Солнца
1860	Кирхгофф и Бунзен открыли цезий и рубидий
1868	Ангстрем составил список линий спектра Солнца

1868	Кирхгофф и Бунзен открыли на Солнце гелий
1885	Бальмер открыл серию спектральных линий Бальмера в спектре водорода
1887	Эксперименты Майкельсона и Морли положили конец теории эфира
1887	Генри А. Роуланд усовершенствовал экспериментальную спектроскопию применением вогнутой дифракционной решетки; эксперимент Ангстрема 1868 г. получил свое развитие
1888	Роуланд опубликовал первый атлас Солнца («Круг Роуланда»)
1891	Роуланд сравнил спектры всех известных элементов со спектром Солнца и нашел несколько новых линий
1893	Роуланд опубликовал стандартный атлас спектров (сравнение со спектром натрия)
1894	На Земле нашли гелий (на Солнце его нашли в 1868 г.)
1896	Бальмер получил свою первую формулу серий спектральных линий
1887	Томпсон открыл электрон
1897	Рубенсу впервые удалось выделить ИК излучение, используя многократное отражение от металлических слоев
1911	Резерфорд ввел понятие «атомное ядро»
1920	Г. Гальбан впервые определил концентрацию молекул посредством «светоэлектрической аппаратуры»
1925	Г. Шайбе, В. Герлах и Е. Швейцер впервые провели количественный спектральный анализ
1926	Г. Ганзен построил первый записывающий двулучевой спектрофотометр по проекту Коха (1912)
1941	На рынке появился знаменитый призмный фотометр Цейса, модель DU. Впервые этот спектрофотометр давал в УФ диапазоне разрешение в 1 нм. Измеренные параметры считывались со шкалы стрелочным указателем.
1972	В.Л. Бутлер, используя монохроматор Cary 14 в сочетании с микрокомпьютером PDP11 Digital Equipment Corp.AF—01, впервые применил спектроскопию в биологических и биохимических исследованиях

Слово «спектр» в переводе с латинского означает «появление» или «схема». Исаак Ньютон в 1666 г. первым с помощью призмы расщепил солнечный свет на спектральные составляющие (см. рис. 1.2). В 1758 г. Маркграф впервые, используя окраску цвета пламени, открыл способ визуального определения вещества. В 1802 г. английский физик Волластон объяснил эксперимент Ньютона с призмой, усовершенствовал его и впервые наблюдал многочисленные темные линии в солнечном спектре. В то же время Гершель и Тальбот проводили эксперименты со светом пламени, и в 1834 г. Тальбот спектрально разделил красный цвет пламени стронция и красный цвет лития, что считается зарождением аналитической оптической спектроскопии.



**Уоррен Ли Бутлер (1925—1984)** — один из открывших растительный пигмент фитохром и один из пионеров применения оптической спектроскопии в биологических и биохимических исследованиях



**Рис. 1.2.** Исаак Ньютон первым с помощью стеклянной призмы расщепил параллельный солнечный свет на его составляющие в спектр

Этот новый метод исследования, названный оптической спектроскопией, развивается с 1834 г. до настоящего времени. Особое внимание следует уделить работе в этой области физики Фраунгофера, который разработал



Дж. фон Фраунгофер  
(1787—1826)

спектроскопию на дифракционных решетках и получил 1 500 линий в спектре солнечного света.

*Фраунгофер был из очень бедной семьи и с малых лет работал подмастерьем. Три года он изучал, как шлифовать линзы и зеркала, и очень заинтересовался оптикой. Но так как он смог закончить только младшие классы социальной школы, то не обладал достаточными знаниями. Поэтому изучением оптики Фраунгофер занимался самостоятельно и тайно и применял свои вновь приобретенные знания в изготовлении линз и зеркал, сделав заметные успехи в развитии оптики. Несмотря на очевидные достижения, сообщество ученых и академиков Германии не приняло его в свои ряды. И только много лет спустя они признали его работы*

*и даже присвоили звание профессора физики в Мюнхене.*

Фраунгофер построил высокоразрешающий оптический спектроскоп, который до сих пор хранится в музее Мюнхена (см. рис. 1.3 на цветной вклейке). Используя аналогичный спектроскоп, в 1859 г. Кирхгофф определил натрий в спектре Солнца (см. рис. 1.4 на цветной вклейке) и на основе этого открытия получил знаменитый закон *Кирхгоффа*: «На данной длине волне и при определенной температуре величина спектральной эмиссии любого объекта равна величине его поглощения».

До 20-го века не было теорий, которые могли бы удовлетворительно объяснить сложное поведение, проявляемое всеми веществами. Наиболее весомый вклад в сегодняшнее понимание спектральных проявлений внесли следующие ученые.

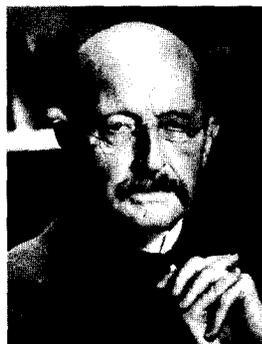
В 1885 г. швейцарский ученый Бальмер открыл серию так называемых спектральных «линий Бальмера» в спектре водорода. В 1897 г. английский ученый Томпсон открыл электрон, а в 1911 г. его соотечественник Эрнест Резерфорд открыл атомное ядро. В 1900 г. Макс Планк сформулировал первые законы квантовой теории. Вернер Гейзенберг (1932 г.) и Эрвин Шредингер (1933 г.) получили Нобелевскую премию за пионерские работы по квантовой механике. В дальнейшем концепцию квантовой механики развивали Поль Дирак и Вольфганг Паули (1945 г.), которые также получили Нобелевскую премию. На сегодняшний день квантовая теория хороша и в известном смысле полностью разработана.

Так как история развития науки переплетена с историей развития методов измерений и анализа, то история оптической спектроскопии в большей степени отражена историей астрономии и, следовательно, историей атомной спектроскопии. Только в конце 19-го века молекулярная спектроскопия становится мощным аналитическим методом. Например, с помощью спектрофотометра, способного обнаруживать характерные «полосы» гемоглобина, можно различить кровь и красители красного цвета, так что сегодня криминалисты могут найти убийцу по маленькой капле крови.

На протяжении многих десятилетий в спектроскопии использовались обычные вольфрамовые лампы накаливания, призмы, дифракционные ре-



**Густав Роберт Кирхгофф** (1824—1887)



**Макс Планк** (1858—1947)

шетки и детекторы света, которые ограничивали результаты узким диапазоном видимой области между 500 и 700 нм.

До 40-х годов 20-го века было доступно всего несколько типов коммерческих спектрофотометров (спектрофотометр «Дженерал Электрик», спектрофотометр Кенко, модель DM Колеман), к тому же на них было трудно работать, и они производились в ограниченном количестве. В то время «измерение» поглощения для определения концентрации производилось визуально последовательным сравнением двух полей, подобно тому как это делается сейчас для проверки цветного видения аномалоскопом Нагеля. Знаменитый фотометр Pulfrich Цейса (было изготовлено несколько тысяч в Германии) нудно и долго работал таким способом с помощью так называемых S-фильтров в видимом диапазоне (интерференционные фильтры с полушириной полосы пропускания 15—20 нм). За 1941 г. было опубликовано более 800 статей по определению концентрации клинически важных компонентов крови и других жидкостей организма с использованием подобных спектрофотометров.

Еще в 30-х годах 20-го века была открыта существенная значимость УФ излучения при количественном определении витамина А, поглощающего при 320—330 нм. Это явилось побудительной причиной создания спектрометра, включающего ультрафиолетовый диапазон. Кэрри и Бэкман создали первый такой спектрометр — знаменитую модель D, коммерческая цена которой в 1941 г. была 723 доллара США. Для этого прибора был разработан источник только ультрафиолетового излучения — водородная лампа. Кварцевую оптику, не поглощающую в УФ области, в те времена было очень трудно достать, ее использовали в основном в радиосвязи для военных кварцевых генераторов. Был разработан специальный фотоумножитель, чувствительный к УФ области вплоть до 220 нм (широкодоступные на основе оксида цезия были хороши лишь для области длин волн > 600 нм). Серия DU/DU1 таких спектрометров Бекмана, вероятно, одна из наиболее успешных серий в мире, продолжала совершенствоваться вплоть до 1976 г., и было продано более 30 000 экземпляров этих приборов.

Параллельно с разработкой УФ-видимых спектрофотометров развивались ИК спектрометры. Однако только после второй мировой войны рынок



**Вернер Карл Гейзенберг** (1901—1976)



**Эрвин Шредингер** (1887—1961)



**Вольфганг Паули** (1900—1958)

спектрального аналитического оборудования стал быстро развиваться и совершенствоваться. Вследствие лучшего разрешения и меньшего количества рассеянного света вместо призм стали использоваться дифракционные решетки и двойные монохроматоры с автоматическим сканированием, дающие исправленные спектры, что способствовало их использованию в рутинной аналитической работе. Существенное снижение рассеянного света привело к совершенствованию детектирующих возможностей спектрофотометров на 4—5 порядков величины.

Вскоре на рынке появились специализированные фотометры, например для радиометрии, колориметрии или двуволнового анализа. В период значительного снижения цен на компьютеры с конца 70-х годов спектрометры стали изготавливать на базе микрокомпьютеров. Это не только облегчило измерения, но и позволило проводить анализ в непрерывном режиме. Сейчас доступны каждому и легко выполняются сложные виды анализа на основе теорий рассеяния Кубелки — Мунка и Фурье или различных методов приближения и корреляций в хемометрии, что используется в ближней ИК области.

### 1.3. Дополнительная литература

Beckmann, A.O., Gallaway, W.S., Kaye, W., Ulrich, W.F. History of Spectrophotometry at Beckman Instruments, Inc. *Anal. Chem.* **1977**, 49, and references cited therein.

Brand, J. C.D. *Lines of Light: The Sources of Dispersive Spectroscopy, 1800—1930*, Gordon & Breach Science, New York, **1995**.

Hearnshaw, J.B. *The Analysis of Starlight: Two Centuries of Astronomical Photometry*, Cambridge University Press, Cambridge, **1996**.

Laitinen, H.A., Ewing, G.W., eds., *A History of Analytical Chemistry*, American Chemical Society, Washington, D.C., **1977**.

Lindon, J.C., Tranter, G.E., Holmes, J.L., eds., *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Academic Press, London, Sydney, Tokyo, **1999**.

Ninnemann, H.A Scientific Homage to W.L. Butler, *Photochem. Photobiol.* **1985**, 42, 619-624.



Sawyer, R.A. *Experimental Spectroscopy*, Dover Publishers, New York, **1963** (the first chapter largely covers the history of optical spectroscopy).

Wilde, E. *Geschichte der Optik*, Sändig Reprint Verlag, H.R. Wohlwend, Vaduz/Lichtenstein **1985**. (History of optics, from ancient times to 1838, an excellent source of the history of optical sciences; in German).

## ГЛАВА 2

# ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ

*Contra principia nagantem non est disputandum*

*Не понимая принципов, нечего обсуждать*

*Гораций*

### 2.1. Природа света

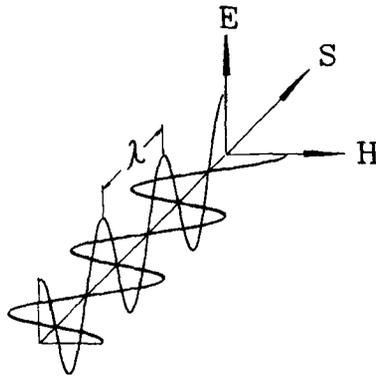
Вообще, оптические явления можно рассматривать с трех различных точек зрения. Геометрическая оптика — наиболее простая точка зрения, которую легко визуально себе представить, — интерпретирует свет в форме лучей и определяет правила, по которым он распространяется, а также описывает получение оптических изображений. Тем не менее, она не описывает взаимодействие света с веществом. В волновой оптике свет интерпретируется как периодические колебания электрического и магнитного полей во времени и пространстве (см. рис. 2.1). Опираясь на эту концепцию, которая впервые была описана Фарадеем (1831 г.), в 1864 г. английский физик Джеймс Клерк Максвелл сформулировал основные уравнения электродинамики, которые «выявили структуру электромагнитного (светового) поля» (Альберт Эйнштейн). Во многих отношениях световые волны сравнимы с механическими волнами в жидкостях, хотя эта аналогия имеет свои пределы. Однако, только при подобном рассмотрении такие явления, как преломление, отражение, интерференция и поляризация, становятся доступными для понимания. С третьей точки зрения — квантовой оптики, свет описывается как поток лишенных массы частиц, известных как «фотоны». Только квантово-оптическая модель способна описать поглощение и испускание света, которые вместе являются основой оптической спектроскопии.



Джеймс Клерк Максвелл (1831—1879)



Альберт Эйнштейн (1879—1955)



**Рис. 2.1.** В соответствии с теорией Максвелла, свет описывается как поперечная электромагнитная волна, в которой магнитная (H) и электрическая (E) компоненты осциллируют в фазе. Их математическое произведение  $S = H \times E$  называется *вектором Пойнтинга*, который направлен в сторону потока энергии

Хотя все эти три точки зрения кажутся несовместимыми, они не исключают друг друга, а фактически просто характеризуют реальную природу света, которая не всегда отвечает нашим интуитивным понятиям. Подобная точка зрения известна под названием квантово-волнового дуализм. В зависимости от условий и задач эксперимента в этой книге будут использоваться все три концепции представления о природе света: свет — это и луч, и волна, и поток частиц.

## 2.2. Электромагнитное излучение

Под понятием спектроскопия обычно подразумевают аналитический метод, основанный на разделении электромагнитного излучения по длине волны, т.е. по энергии. Согласно Эйнштейну, энергия  $E$  электромагнитного излучения пропорциональна частоте  $\nu$ , т.е.  $E \sim \nu$ . Вместе с константой пропорциональности  $h = 6,626 \times 10^{-34}$  Дж с, которая известна как постоянная Планка, мы получаем уравнение:

$$E = h \times \nu \quad (2.1)$$

Так как скорость распространения электромагнитного излучения в вакууме является величиной постоянной  $c = 2997925 \pm 3$  м с<sup>-1</sup> (см. приложение 1), длина волны и частота связаны соотношением:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

и

$$E = h \times \frac{c}{\lambda} \quad (2.2)$$

Следовательно, энергия электромагнитного излучения может быть выражена как величина, обратная длине волны, называемая волновым числом  $k$ :

$$k = \frac{1}{\lambda} \quad (2.3)$$

Энергия единичного кванта света равна:

$$h \times \nu = k \times 1,24 \times 10^{-4} \text{ эВ см} \quad (2.4)$$

Поскольку с помощью дифракционного монохроматора сканирование (развертка изображения) спектра осуществляется по длине волны (см. главу 5), спектры в оптической молекулярной спектроскопии обычно отображаются в шкале длин волн, даже если такое отображение менее содержательно, чем в шкале энергии, т.е. в шкале волновых чисел. При необходимости оба спектральных отображения могут быть легко преобразованы друг в друга с помощью уравнения 2.3.

Электромагнитное излучение включает в себя весь диапазон волн между переменным током в 50 Гц вплоть до высокоэнергетического  $\gamma$ -излучения (рис. 2.2 на цветной вклейке). Для работы в различных спектральных диапазонах требуются различные типы спектрометров. Даже оптический диапазон, который включает в себя область приблизительно от 200 до 2 000 нм, в котором УФ диапазону принадлежит область от 200 до 400 нм, а ближнему ИК — свыше 800 нм, ранее не мог быть измерен непрерывно, так как требовал различного спектрального оборудования. Однако с появлением современных спектрофотометров исследователь часто освобождается от этого затруднения, поскольку спектр сканируется автоматически во всем диапазоне.

Квантование света не означает то же самое, что и квантование вещества, поскольку частоту, т.е. энергию, можно задавать произвольно. По длине волны световое излучение в основном негетогенно: оно «состоит» из квантов различных энергий, и распределение энергии обычно имеет максимумы с определенной полушириной. Как распределение энергии, так и ее максимум зависят от особенностей процесса генерации излучения, например лампой накаливания, газоразрядной лампой, лазером, твердотельным излучателем типа СИД (светоиспускающим диодом) или лазерным диодом. Поток световых квантов с узким распределением энергии или, в идеальном случае, только с одной длиной волны, называется монохроматическим.

В классическом представлении испускание света описывается колебанием эластично связанных электронов, энергия которых экспоненциально затухает в соответствии с законами классической физики. Предположим, что  $N$  атомов находятся в возбужденном состоянии  $j$ . В таком случае их собственное время жизни определяется уравнением:

$$\frac{-dN_j}{dt} = N_j \sum_{i < j} A_{ji}$$

где  $A_{ji}$  — коэффициенты Эйнштейна для спонтанного перехода из возбужденного состояния  $j$  в основное состояние  $i$ . Интегрирование этого уравнения дает соотношение:

$$N_j(t) = N_j(0)e^{\frac{-t}{\tau_j}}$$

где  $\tau_j$  — время жизни излучения, которое равно:

$$\tau_j = \frac{1}{\sum_{i<j} A_{ij}}$$

Время жизни свободных возбужденных атомов или молекул, которые не взаимодействуют между собой, определяется как время снижения интенсивности излучения в  $e$  раз от первоначальной величины. Типичные значения времен жизни лежат в интервале  $10^{-7}$ — $10^{-9}$  с. Существенно отличающиеся значения будут обсуждены в главе 6, посвященной люминесцентной спектроскопии. Зная скорость света  $c$ , можно рассчитать предельное значение волнового пакета (волновой группы), составляющее 3 м и называемое когерентной длиной волны. Чем короче время жизни, тем больше ширина линии, и наоборот. В соответствии с принципом неопределенности Гейзенберга и, зная, что  $\hbar = h/2\pi = 1,0546 \times 10^{-34}$  Дж с, получаем:

$$\Delta E \times \Delta t \geq \frac{\hbar}{2} \quad (2.5)$$

Например, время жизни в  $10^{-8}$  с дает естественную ширину линии  $1,18 \times 10^{-5}$  нм.

*Благодаря чрезвычайной узости ширины линии электронного перехода  $2p^{10} \rightarrow 5d^5 d$  в атоме криптона в 1960 г. эта линия была выбрана в качестве международной единицы длины вместо стержня платино-иридиевого сплава. Длина волны этой оранжевой спектральной линии составляет  $\lambda = 605,780211$  нм в вакууме и  $605,612525$  нм в воздухе.*

Когерентная длина волны, время жизни излучения и ширина линии взаимосвязаны друг с другом. Когерентность — это макроскопическое определение, которое подтверждается фактом интерференции, например кольцами Ньютона. Микроскопически это означает, что индивидуальные волновые пакеты обладают определенной фазовой зависимостью. Для лазеров, которые в настоящее время являются важным инструментом в спектральном анализе, обязательным требованием является когерентность (см. главу 3.4.5).

Интенсивные переходы при атомарном поглощении дают значения  $A_{ji}$  от  $10^8$  до  $10^9$  с $^{-1}$ , т.е. их времена жизни составляют от 1 до 10 нс. Время жизни может быть значительно сокращено за счет столкновений или индуцированной эмиссии. Естественная (собственная) ширина линии возбужденного состояния атома (т.е. когда исключено внешнее воздействие) определяется принципом неопределенности Гейзенберга:

$$\Delta E_j = \frac{h}{2\pi \tau_j}$$

или

$$\Delta E_j = \frac{h \sum_{i < j} A_{ji}}{2\pi}$$

Так как  $E = h\nu$ , то

$$\Delta \nu = \sum_{i < j} A_{ji}$$

где  $\Delta \nu$  — ширина спектральной линии в частотных единицах при переходе из возбужденного состояния в основное. Так как основное состояние имеет неопределенное время жизни, и так называемая  $\delta$ -функция имеет вид бесконечно узкого пика, то ширина спектральной линии будет соответствовать ширине возбужденного состояния.

Однако измеренная ширина спектральной линии всегда больше действительной ширины, получаемой из времени жизни абстрактной возбужденной молекулы, не взаимодействующей со своим окружением. Мы должны взять в расчет уменьшение времени жизни возбужденного состояния путем столкновений, вынужденной эмиссии (как в лазерах, см. главу 3.4.5), а также принять во внимание сдвиг Допплера, вызываемый относительным смещением наблюдаемых молекул и наблюдателя (детектора). Расширение спектральных линий, вызванное столкновением и вынужденной эмиссией, процессами однородными, дают форму кривой Лоренца, а Допплеровское расширение, процесс неоднородный, — форму кривой Гаусса. Сочетание двух форм кривых описывается так называемым профилем Фохта.

### 2.3. Взаимодействие света и материи

В XIX веке спектроскопистами уже было собрано достаточное количество данных о явлениях, наблюдаемых при взаимодействии света с веществом. Одно из таких наблюдений состояло в том, что атомы и молекулы способны поглощать и испускать свет только определенных длин волн или диапазонов (полос) длин волн. Как было отмечено ранее, Кирхгофф открыл, что для данного атома частоты поглощения и испускания идентичны (что не совсем справедливо для молекул; см. главу 6). Считается, что шаг вперед в квантовой теории, а значит и в спектральном анализе, был сделан Альбертом Эйнштейном, когда тот работал экспертом в Патентном Бюро Берна, Швейцария, в 1905 году. Он открыл эмиссию электронов с поверхности твердых тел при облучении их светом подходящей длины волны. В свое свободное время Эйнштейн разработал теорию фотоэлектрического эффекта. Планк предположил, что излучение черного тела квантуется, а Эйнштейн расширил эту концепцию, предположив, что излучение само по себе состоит из квантов.

Таким образом, свет, падающий на детектор, состоит из квантов  $h\nu$ . Когда они бомбардируют поверхность металла, некоторая часть энергии расходуется на преодоление потенциала притяжения  $w$ , который удерживает электроны в металле, а остающаяся энергия превращается в кинетическую энергию испущенных электронов. Таким образом, согласно Эйнштейну:

$$E_{max} = h\nu - w \quad (2.6)$$

Уравнение Эйнштейна для фотоэлектрического эффекта неоднократно подтверждается экспериментально и обеспечивает удобный способ оценки постоянной Планка.

### 2.3.1. Фундаментальные принципы оптической спектроскопии. Атом водорода

Основополагающая структура атомов была установлена только после серии неудач в знаменитых экспериментах Ленарда 1903 г. по рассеянию  $\beta$ -лучей и Резерфорда 1911 г. по рассеянию  $\alpha$ -лучей. Согласно этим ученым, положительно заряженные ядра атомов с диаметром около  $10^{-4}$  Å (в 10 000 раз меньше диаметра атома) несут почти всю массу атома в виде положительно заряженных протонов и электрически нейтральных нейтронов. Остаточная масса (около 1/2 000 от всей массы) собрана в электронной оболочке атома, которая определяет его форму, размер, а главное, химические свойства. Для объяснения, почему отрицательно заряженные электроны не коллапсируют в положительно заряженное ядро, 28-летний Нильс Бор предположил, что электроны движутся по замкнутым орбитам вокруг ядра таким образом, что силы притяжения уравновешиваются центробежной силой:

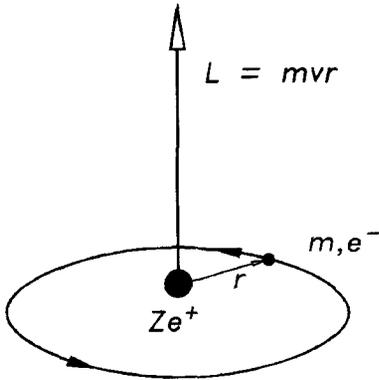
$$(Z \cdot e) \frac{e}{r^2} = \frac{mv^2}{r} \quad (2.7)$$

где  $Z$  — число протонов,  $e$  — электрический заряд,  $r$  — радиус орбиты (см. рис. 2.3).

Согласно законам электродинамики, любой вращающийся (например, в вертикальной проекции) заряд — осциллятор — должен испускать энергию излучения, следовательно, электрон должен бы замедлиться и, в конце концов, упасть на ядро. Для того чтобы вся концепция имела право на существование, Бор разрабатывает знаменитую специальную теорию так называемых квантовых постулатов, согласно которым электрон не излучает и его орбита стабильна только тогда, когда угловой момент ( $mvr$ ) равен произведению  $n\hbar$ , где  $n$  — главное квантовое число, а  $\hbar = h/2\pi$ :



Нильс Хендрик Давид Бор (1885—1962)



**Рис. 2.3.** Схематичное представление вектора углового момента  $L = mvr$  электрона массой  $m$  и зарядом  $e^-$ , который обращается вокруг ядра с зарядом  $Ze^+$  по окружности радиусом  $r$

са атома водорода в виде  $r_n = n^2 \times a_0$  (см. рис. 2.4).

Открытие французского физика Л.-В. де Бройля в 1924 г. подтвердило теорию Бора, (уравнение 2.7). Он описал волновые свойства электронов как элементарных частиц, имеющих скорость  $v$ . Подобным образом монохроматический свет имеет специфическую длину волны (см. уравнение 2.2). Длина волны электронного излучения равна:

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (2.11)$$

где  $p = mv$  — момент частицы.

Теория Бора постулирует, что единственно возможные электронные орбитали — это те, которые состоят из целого числа волн де Бройля, т.е. волна де Бройля по сути стоячая волна (рис. 2.5). Таким образом, разрешенные электронные орбитали вокруг ядра являются дискретными и имеют квантованную энергию.

Общая энергия ( $E_{tot}$ ) электрона вычисляется как сумма кинетической ( $E_k$ ) и потенциальной энергии ( $E_p$ ):

$$E_{tot} = E_k + E_p = \frac{mv^2}{2} - \frac{Ze^2}{r} \quad (2.12)$$

Обозначив:

$$\begin{aligned} R_y &= \frac{2\pi^2 m e^4}{h^2} = 1,31225 \times 10^6 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} = \\ &= 3,288 \times 10^{15} \text{ с}^{-1} = 13,59 \text{ эВ} \end{aligned}$$



**Луи-Виктор,  
Принц де Бройль**  
(1892—1987)

$$mvr = n\hbar \quad (2.8)$$

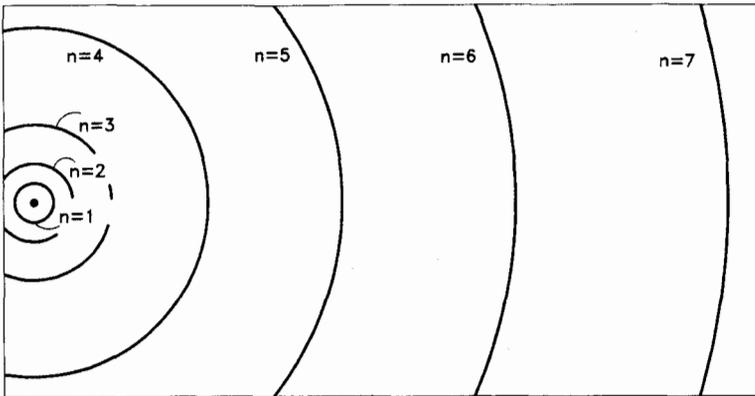
Из уравнений 2.7 и 2.8 мы получаем формулу для радиуса разрешенной орбиты в центральном поле:

$$r = \frac{n^2 \hbar^2}{m Z e^2} \quad (2.9)$$

В особом случае, когда  $Z = 1$  и  $n = 1$ , что представляет атом водорода в своем невозбужденном (основном) состоянии, мы получаем так называемый боровский радиус:

$$r = a_0 = \frac{\hbar^2}{m e^2} = (5,29177 \pm 7) \times 10^{-11} \text{ м} \quad (2.10)$$

Для бóльших квантовых чисел  $n$  мы получаем квадратичную зависимость для радиуса



**Рис. 2.4.** Геометрическое представление круговых орбит Бора для электрона в центральном поле протона с квантовым числом  $n = 1, 2, \dots$  Радиус круговой орбиты возрастает пропорционально квадрату квантового числа  $n$

мы получаем выражение:

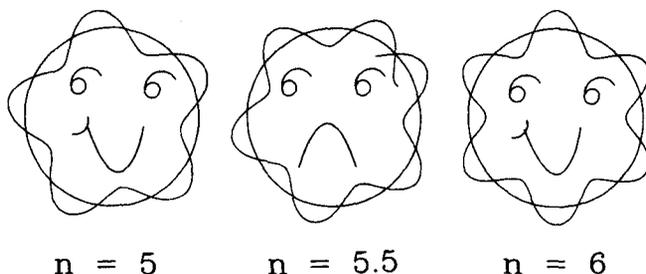
$$E_{\text{tot}} = R_y \times \frac{Z^2}{n^2} \quad (2.13)$$

Однако это выражение не может быть подтверждено экспериментально и представляет только теоретический интерес. Главной задачей оптической спектроскопии, однако, является вычисление разности между двумя энергетическими состояниями  $\Delta E$ , как при поглощении, т.е. при переходе с более низкого энергетического состояния с квантовым числом  $m$  в более высокое энергетическое состояние с квантовым числом  $n$ , так и при испускании, которое происходит вместе с понижением главного квантового числа.

Разность энергий  $\Delta E$  вычисляется согласно уравнению 2.13:

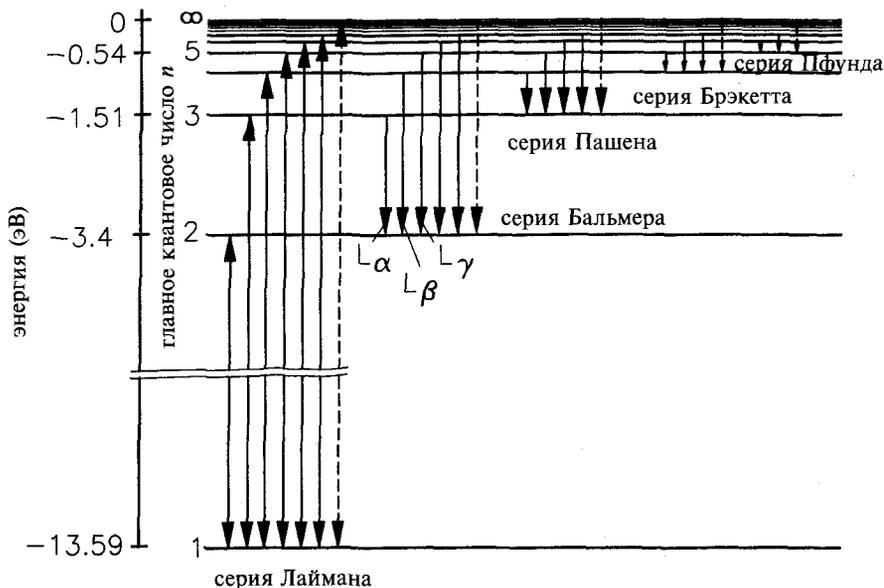
$$\Delta E = R_y \times Z^2 \left( \frac{1}{m^2} - \frac{1}{n^2} \right) \quad (2.14)$$

где  $m$  и  $n$  — главные квантовые числа для более низких и более высоких энергетических состояний электронного перехода, соответственно. Это уравнение было установлено экспериментально в 1890 г. Дж. Р. Ридбергом на основании спектра атома водорода. Оно экспериментально подтверждается вплоть до семикратно ионизированного атома кислорода (8 протонов и 1 электрон в оболочке). Каждой орбите с данным квантовым числом  $m$  соответствует серия спектральных линий, относящаяся к электронному переходу между ней и более высокими орбитами с квантовым числом  $n$ , либо между ними (см. рис. 2.6). Так называемая серия Бальмера получается в результате излучательного перехода с более высоких энергетических уровней на уровень с  $n = 2$  и является единственной серией в видимом диапазоне длин волн, благодаря чему она и была открыта первой.



**Рис. 2.5.** Визуальное представление квантового постулата, открытого Бором. Только целые квантовые числа приводят к стоячим волнам, обеспечивающим безызлучательное, стабильное состояние

Уравнение Ридберга справедливо только для так называемого *центрального поля*, где вокруг пространственно зафиксированного ядра с зарядом  $Z \times e$  вращается единственный электрон. Однако для анализа всех других атомных или молекулярных спектров модели Бора недостаточно вследствие влияния множества электронов в атомах с более высоким атомным номером, чем водород. Более того, модель Бора требует единственного квантового числа  $n$  и принимает во внимание только одно пространственное измерение, тогда как в реальности мы ожидаем, по крайней мере, 3 квантовых числа, соответствующих картезианской системе координат. Другими словами, предположение о том, что орбита для вращения электрона является плоской, не отражает трехмерность пространства. Бор и сам недолго верил в плоские орбиты.



**Рис. 2.6.** Схема термов атома водорода с соответствующими сериями переходов согласно формуле Ридберга. Серия Лаймана обычно наблюдается как в условиях абсорбции, так и эмиссии, все остальные серии обычно видны только как эмиссионные линии

В 1926 г. австриец Шредингер посредством своего знаменитого уравнения сформулировал постулаты квантовой механики для атомных систем, которые (следуя концепции де Бройля) учитывают волновые свойства материи. Здесь мы рассмотрим только основные моменты, которые позволяют понять принципы спектроскопии. Мы столкнемся с некоторыми утверждениями, которые существенно расходятся с нашим макроскопическим взглядом на природу, и эта проблема в принципе неизбежна. Во-первых, что конкретно колеблется в волновой концепции электрона де Бройля? Для электронов в атоме мы описываем вероятность  $\psi^2$  нахождения электрона в данном элементе объема  $dV$ , в то время как  $\psi$  — это собственная функция, или волновая функция, и часто относится к орбитали. С математической точки зрения,  $\psi$  — это комплексная функция, содержащая действительную и мнимую части, которая описывает любую (микроскопическую) систему в пространстве и во времени как некий объект, несущий знак (но только в тех исключительных случаях, когда  $\psi$  известна точно). Если плотность вероятности, в соответствии с законами физики, определяется как квадрат  $\psi^2$  (т.е. в области действительных чисел), то вероятность нахождения электрона в элементе объема  $dV$  получается равной  $\psi^2 dV$ . Вероятность нахождения электрона в любой части пространства равна 100%, т.е. *нормирование* собственной функции задается интегралом  $\int \psi^2 dV = 1$ . Уравнение Шредингера аналогично уравнению движения в классической механике, описывающему, например, колебание одномерной струны с помощью основных и обертоновых частот. Это дифференциальное уравнение с частными производными, которое связывает  $\psi$ ,  $V$ , кинетическую ( $E_k$ ) и потенциальную энергию ( $E_p$ ) системы.

*Для начинающего короткая форма уравнения Шредингера мало о чем говорит:  $\mathbf{H}\psi = E\psi$ , где  $\mathbf{H}$  — оператор Гамильтона,  $E$  — энергия, а  $\psi$  — волновая функция или собственная функция. Оператор Гамильтона, как математический аппарат, «извлекает» значение энергии из соответствующей волновой функции  $\psi$ .*

Подобно механическим колебаниям, вызываемым ударом по струне, существует бесконечное, но дискретное число решений уравнения для  $\psi$ , причем каждому решению, *собственной функции*, соответствует определенное значение общей энергии  $E = E_k + E_p$  — *собственное значение*. В то время как в классической механике колебания одномерной струны характеризуются по сути одним значением энергии, для трехмерной системы мы ожидаем три отдельных параметра: главное квантовое число  $n$ , которое мы уже упоминали при обсуждении модели Бора, а также орбитальное квантовое число  $l$  и магнитное квантовое число  $m_l$ . Каждой собственной функции  $\psi_{n,l,m_l}$  соответствует определенное собственное значение.

В сущности, электрон распределен по всему пространству и образует так называемое «электронное облако». Это, несомненно, является основным свойством материи, которое, тем не менее, проявляется только в микромире. В своем знаменитом *принципе неопределенности*, упомянутом ранее, Вернер Гейзенберг определил это явление в количественной фор-

ме, согласно которой так называемые сопряженные параметры, такие как местоположение и скорость  $v$  для частицы с массой  $m$  (точнее, моментом  $p = m \times v$ ) или время и энергия (см. уравнение 2.5), невозможно определить одновременно:

$$\Delta p \times \Delta d \geq \frac{\hbar}{2} \quad (2.15)$$

Чем более точно мы определяем положение электрона в пространстве, тем с меньшей точностью нам известен его момент, и наоборот. Как показали точные вычисления, максимальная вероятность нахождения  $1s$  электрона в атоме водорода совпадает с классическим боровским радиусом  $a_0$ , что, в свою очередь, и подтверждает простую концепцию, выдвинутую Бором. Однако в сфере, ограниченной только этим радиусом, электрон пребывает 32% времени, а вероятность нахождения его внутри сферы радиусом  $5 \times a_0$  значительно выше и составляет 97,7%. Тем не менее, простая концепция Бора, в которой электрон представляется как точка, имеющая массу и движущаяся по орбите, очевидно противоречит принципу неопределенности Гейзенберга. В свою очередь, в уравнении Шредингера предусмотрено наличие всех трех вышеупомянутых квантовых чисел, связанных с орбиталями и их собственными значениями. Это целые числа и, как показывает квантовомеханический расчет, они взаимно ограничены. Главное квантовое число может принимать значения  $n = 1, 2, 3, \dots$ , орбитальное квантовое число  $l$ , соответствующее угловому моменту электрона, для данного значения  $n$  будет принимать значения от 0, 1, ... до  $n - 1$ . И, наконец, магнитное квантовое число  $m_l$  для данных  $n$  и  $l$  будет принимать значения  $-l, -l + 1, \dots, 0, \dots, l - 1, l$ . Используя орбитальное квантовое число  $l$  углового момента, сам угловой момент  $L$  вычисляется как:

$$L = \hbar \times \sqrt{l(l+1)} \quad (2.16)$$

*Произведение в форме  $l(l+1)$  известно как «квантовомеханический квадрат», поскольку эта величина по своей сущности, после классического дифференцирования, есть  $P$ . Только одна такая находка отражает разницу между классической и квантовой механикой. Для больших квантовых чисел обе точки зрения сходятся.*

По историческим причинам электроны с орбитальными квантовыми числами углового момента  $l = 1, 2, 3$  и  $4$  называются  $s$ -,  $p$ -,  $d$ - и  $f$ -электронами. В дополнение к квантовым числам, которые мы до сих пор обсуждали, для расчетов необходимо четвертое квантовое число, называемое спиновым квантовым числом  $m_s$  (проекция на  $z$ -направление), которое теоретически объясняется в релятивистской квантовой теории П. Дирака. Она принимает в расчет многомерность пространства и времени и описывает собственный квантовый угловой момент спина электрона, который может принимать только два возможных значения:  $m_s = \pm S$ . Даже если нет физического объяснения того, что электрон вращается, эта картина

способна визуализировать спин, включая размер углового момента. Квантовый угловой момент спина вычисляется аналогично уравнению 2.16:  $\hbar [1/2(1/2 + 1)]^{1/2}$ .

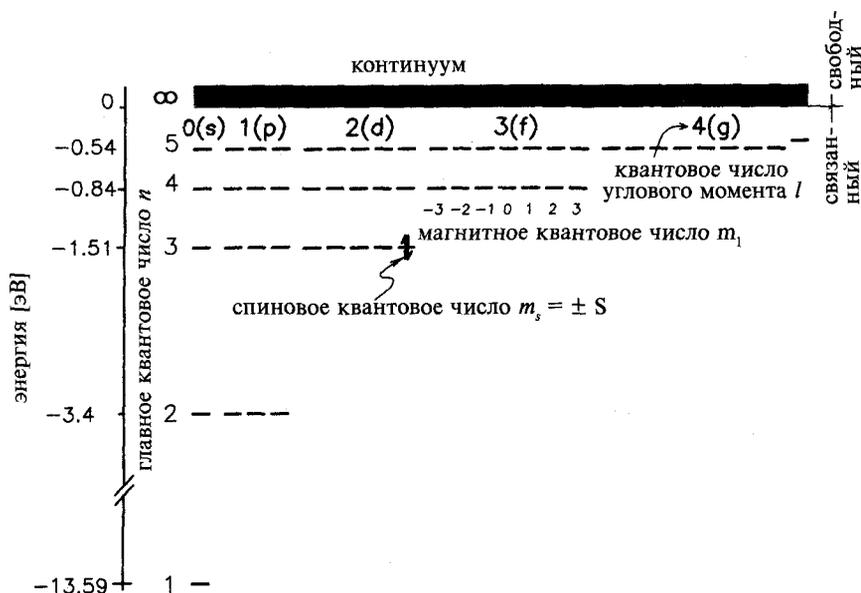
В таблице 2.1 приведены все возможные комбинации четырех квантовых чисел, а на рис. 2.7 изображены соответствующие энергетические уровни (термы) атома водорода вместе с соответствующей номенклатурой. Теперь становится понятным, почему модель атома Бора так хорошо подтверждается экспериментальными данными для атома водорода. В центральном поле, каковым является атом водорода, принимаются во внимание только две частицы — протон и электрон, и все энергетические уровни являются вырожденными по отношению к трем квантовым числам  $l$ ,  $m_l$  и  $m_s$ . Это означает, что различные орбитали с одинаковым квантовым числом обладают идентичными значениями собственной энергии  $E$ . Наиболее важные атомные орбитали (более корректно —  $\psi^2$ , т.е. распределение плотности), представлены на рис. 2.8.

Табл. 2.1. Возможные комбинации четырех квантовых чисел и их распределение по атомным оболочкам

Атомная оболочка	$n$	$l$	$m_l$
К	1	0	0
L	2	0 1	0 -1, 0, 1
M	3	0 1 2	0 -1, 0, 1 -2, -1, 0, 1, 2
N	4	0 1 2 3	0 -1, 0, 1 -2, -1, 0, 1, 2 -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3
Общие соотношения квантовых чисел			$n = 1, 2, \dots, n$ $m_l = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots, \pm l$ $l = 0, 1, 2, \dots, (n - 1)$ $s = \pm S, 2e^-$ на орбиталь

### 2.3.2. Атомы с несколькими электронами

В 1928 г. Дирак сделал провокационное заявление: «В настоящее время химия низведена до уровня математики». Однако физика больших молекул слишком сложна, чтобы быть решаемой строгими математическими вычислениями. Расчеты энергетического состояния даже наипростейших биологических молекул, таких как сахар или аминокислота, при объяснении экспериментальных результатов дают только относительные значения. На подобной основе подтверждаются или опровергаются теоретические



**Рис. 2.7.** Расширенная схема термов при решении уравнения Шредингера для атома водорода. В отличие от схемы на рис. 2.6 здесь указано распределение четырех квантовых чисел (см. табл. 2.1), даже если мы примем во внимание сильное вырождение. При возбуждении светом с энергией выше 13,59 эВ происходит ионизация атома (переход в непрерывный спектр — континуум)

гипотезы. Несмотря на то, что методами квантовой механики с помощью современных суперкомпьютеров теоретически можно с определенной надежностью получить информацию о сложных соединениях типа биомолекул, аналитический спектральный анализ все еще остается незаменимым экспериментальным средством при их изучении.

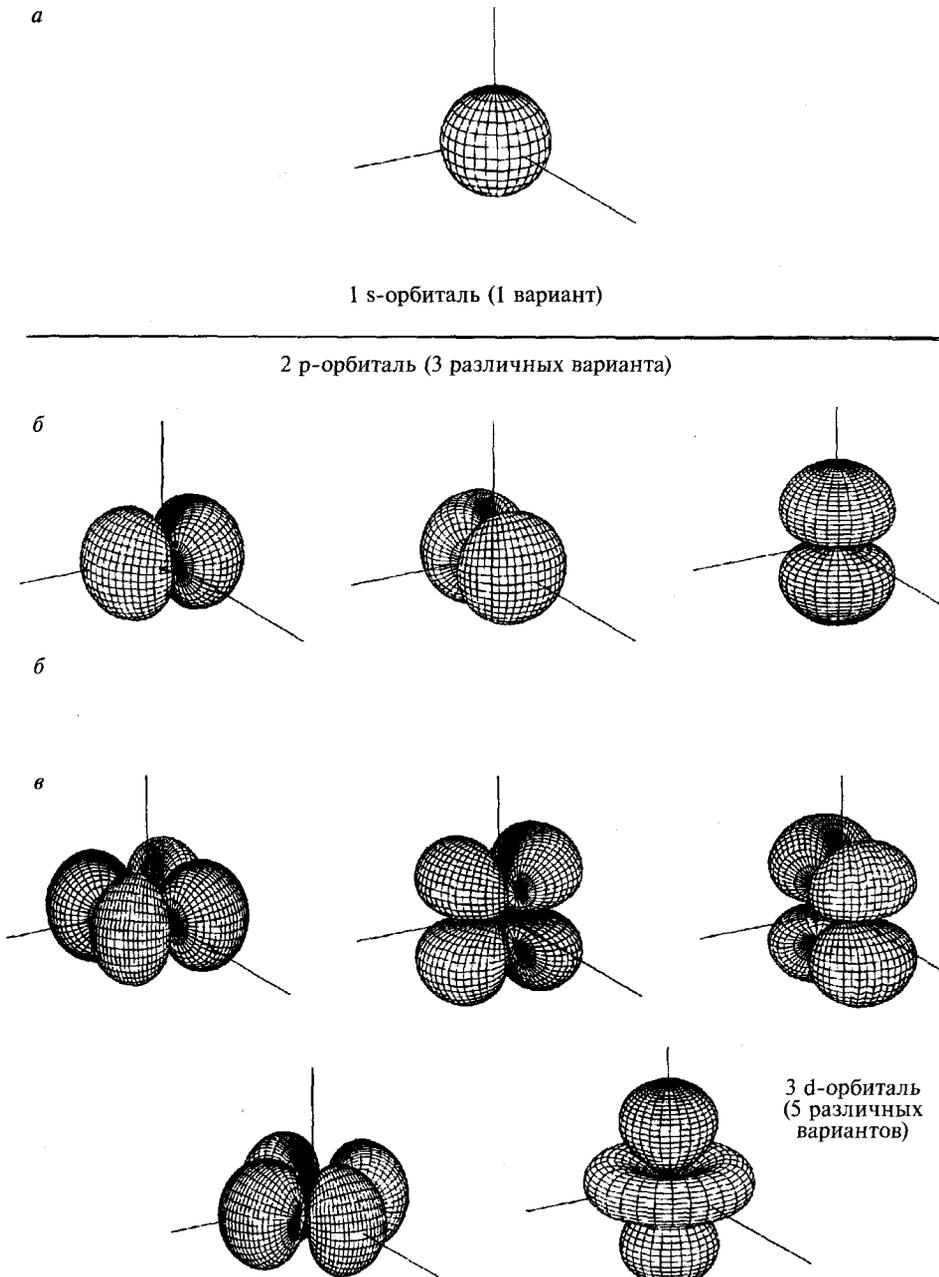
### 2.3.2.1. Электронные оболочки и периоды

В водородоподобных атомах все состояния с одинаковым главным квантовым числом  $n$  вырождены, т.е. имеют одну и ту же энергию.

Однако это справедливо только в первом приближении: с помощью высоко-разрешающих спектрометров удалось выделить индивидуальные линии тонкой структуры, что можно объяснить лишь с помощью более качественной теории.

Если рассматривать атомы с несколькими электронами, то в отношении квантового числа углового момента  $l$  их вырождение возрастает. А вырождение в отношении магнитного квантового числа  $m_l$  и спинового квантового числа  $m_s$  сохраняется. Элементы<sup>1</sup> с одинаковым главным

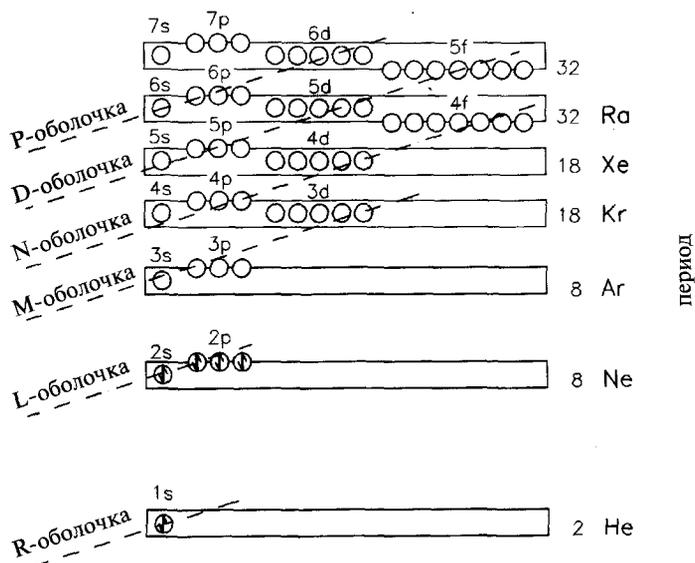
<sup>1</sup> Прим. редактора: Оболочка атома содержит, естественно, электроны, а количество этих оболочек (энергетических уровней) и определяет положение элемента в определенном периоде периодической таблицы. Имея это в виду, можно согласиться с дальнейшими рассуждениями автора.



**Рис. 2.8.** Пространственное изображение  $s$ -,  $p$ - и  $d$ -орбиталей атома с наименее возможным квантовым числом. Так как нереально изобразить функцию, которая зависит от трех пространственных координат  $x$ ,  $y$  и  $z$ , на диаграммах изображена функция, которая соответствует фиксированному значению орбитали, равному  $\pm 0,01$ . Так как можно отобразить только реальные фигуры, показаны линейные комбинации  $\psi_{nlm}$  функций  $\psi_{nl(+m)}$  и  $\psi_{nl(-m)}$ . (Brickman et al. 1978, Chemie in Unserer Zeit, 1, 23–26, с разрешения Verlag Chemie)

квантовым числом  $n$  принадлежат к одной и той же оболочке ( $n = 1, 2, 3, 4, \dots$ , что соответствует  $K$ -,  $L$ -,  $M$ -,  $N$ -, ... оболочкам), причем каждая оболочка может содержать максимум  $2n^2$  элементов, что легко определяется по количеству возможных комбинаций квантовых чисел. Элементы, сгруппированные энергетически, входят в один период. Периоды последовательно содержат 2, 8, 8, 18, 18, 32 и 32 элемента, как показано на рис. 2.9, что и отражено в периодической таблице элементов (см. приложение 3). Это, по сути, энергетический порядок, который был установлен эмпирически. Период не определяется главным квантовым числом, как иногда предполагают: элементы с одинаковым квантовым числом  $n$  локализованы «по диагоналям» схемы терма и могут принадлежать различным периодам.

Казалось бы, очень трудно описать по стандартной спектральной схеме атом с большим количеством электронов и четырьмя квантовыми числами. Как в целом функционирует такая система? Ответ на этот вопрос можно получить очень просто, если рассмотреть атомы с атомным числом меньше 40, которые в основном и являются предметом рассмотрения в химии и биологии. В них проявляется так называемая связь Рассела — Саундерса — в отличие от так называемой  $j-j$  связи у атомов с атомным номером свыше 40). Каждый атом имеет специфический суммарный угловой момент  $\mathbf{J} = \mathbf{S} + \mathbf{L}$ , который состоит из векторной суммы  $\mathbf{S}$  всех угловых моментов всех отдельных спинов и суммарного вектора  $\mathbf{L}$  всех угловых моментов  $l$  всех оболочек, которые не полностью заполнены.



**Рис. 2.9.** Схематическое представление распределения электронов по периодам периодической таблицы элементов. Оболочки соответствуют главному квантовому числу и обычно охватывают отдельные периоды. На схеме видно, как количество электронов в элементах возрастает с увеличением номера периода. Полностью завершённые оболочки соответствуют указанным инертным газам

Лежащие ниже полностью заполненные оболочки не влияют, в общем случае, на спектр (соответствующая спектроскопия внутренних электронов не является предметом рассмотрения данной книги). Сумма всех волновых функций полностью заполненной оболочки имеет сферическую форму.

Конечно, результирующий суммарный угловой момент  $J$  вновь является целым или полуцелым числом, кратным (элементарному) угловому моменту. Только частично заполненные «внешние» оболочки определяют атомный спектр вещества. Это правило распространяется и на молекулы, что будет продемонстрировано ниже.

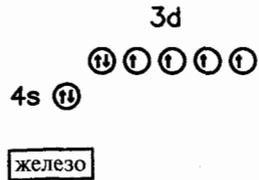
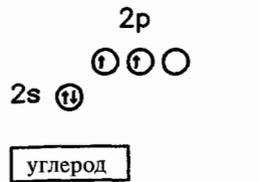
### 2.3.2.2. Векторная модель, правила Паули и Хунда

Как уже упоминалось, каждому квантовому числу орбитального углового момента  $l$  соответствует  $2l + 1$  всегда существующих орбиталей, которые отличаются только по магнитному квантовому числу  $m_l$ , т.е. по ориентации в пространстве. Эти различно ориентированные орбитали могут вырождаться. Вырождение квантового числа  $m_l$  можно предотвратить, если приложить внешнее линейное магнитное поле, условно вытянутое в  $z$ -направлении, так что  $x$ -,  $y$ - и  $z$ -направления станут неэквивалентными. В результате наблюдается расщепление спектральных линий. Векторное изображение очень полезно для получения ясной картины квантования пространства: три  $p$ -орбитали или пять  $d$ -орбиталей изображаются векторами с длиной «1» и «2», соответственно, где их проекция на фиксированное направление в пространстве (вертикальное, обычно) соответствует целым числам  $\hbar$ . На рис. 2.10 в качестве примера векторной модели изображены атомы углерода (C) и железа (Fe). Каждому атому соответствует орбиталь  $\psi$ , которая удерживает максимум два электрона с разными спиновыми квантовыми числами  $m_s = \pm S$  и одинаковыми другими квантовыми числами. Это правило распространяется на все элементарные частицы со спином  $S$  (фермионы) и называется принципом исключения Паули:

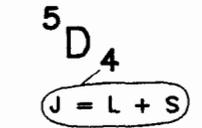
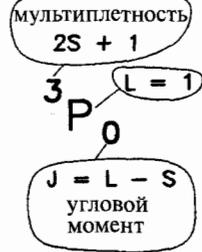
- все электроны атома или молекулы различаются по крайней мере одним квантовым числом.

Процесс заполнения доступных орбиталей отдельными электронами определяется правилами Хунда:

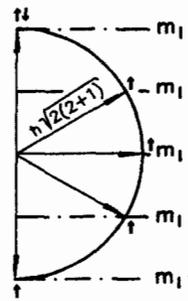
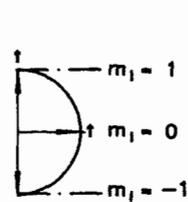
- первое правило Хунда гласит: основное состояние атома (или молекулы) — это состояние с наибольшим суммарным угловым моментом  $L$ ;
- второе правило Хунда гласит: наибольшему суммарному угловому моменту соответствует наибольший суммарный спиновый момент  $S$ ;
- третье правило Хунда связывает векторное взаимодействие между угловым моментом  $L$  и спиновым угловым моментом  $S$  в основном состоянии системы, позволяя таким образом классифицировать атомные спектры. Если электронная оболочка заполнена меньше, чем наполовину, то  $J = L - S$ ; если — больше, чем наполовину, то  $J = L + S$ ; а если — ровно наполовину, то  $J = L + S = S$ , так как  $L = 0$ .



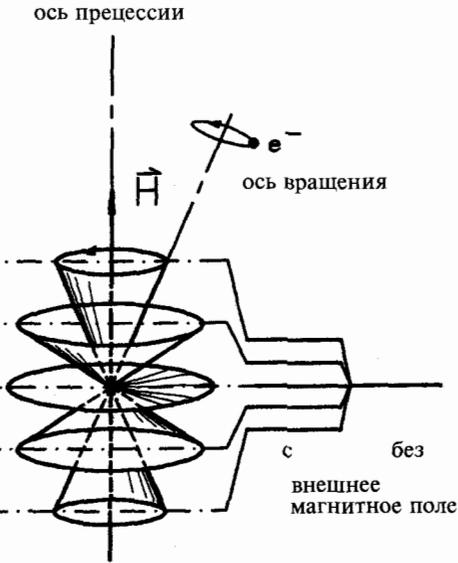
конфигурация  
 электронов в их  
 основном состоянии  
 (валентные электроны)



спектральные  
 термы



векторная модель



демонстрация  
 квантования  
 углового момента

спектральное  
 расщепление

Рис. 2.10. Конфигурация электронов, символы терма и векторные модели атомов углерода и железа. При изотропных условиях направленного квантования не происходит, соответствующие состояния вырождены. Спектральное расщепление наблюдается при приложении линейного магнитного поля  $H$

Соответственно, мы качественно характеризуем так называемый спектральный терм атома, который определяет его спектральные свойства:

$$^{2S+1}L_J \quad (2.17)$$

Верхний индекс  $2S + 1$  означает мультиплетность,  $L$  — угловой момент, нижний —  $J$  — суммарный угловой момент (см. рис. 2.10). В качестве предварения молекулярной спектроскопии, которая будет обсуждена позже, здесь мы упомянем два важных случая мультиплетности. Если все электроны спарены, т.е. все орбитали дважды заняты и суммарный спин  $S = 0$ , то такое состояние называется *синглетным*, вследствие чего внешнее магнитное поле не может привести к расщеплению спектральных линий. Но если  $S = 1$ , то такое состояние называется *триплетным состоянием* атома, которое при наложении внешнего магнитного поля расщепляется на три близко расположенных уровня.

Для атома углерода суммарный вектор углового момента  $L = 1\hbar$  и суммарный спиновый момент  $S = 1\hbar$ , что дает три возможных комбинации квантовых чисел для общего углового момента, при котором основное состояние определяется как  $J = 0$ . Для атома железа с  $L = 2$  и  $S = 2$  существуют пять возможных сочетаний квантовых чисел для общего углового момента  $J$  с  $J = 4$  в основном состоянии. В таблице 2.2 представлены термы основного состояния атомов, наиболее значимых в химическом и биологическом значении.

Табл. 2.2. Символы термов элементов первых трех периодов Периодической Таблицы

По вертикали сгруппированы элементы с одинаковым числом  $s$ - и  $p$ -электронов<sup>1</sup> и, следовательно, с тем же количеством символов терма, т.е. подобных спектров (ср. с рис. 2.13)

$^2S$	$^1S$	$^2P_{1/2}$	$^3P_0$	$^4S$	$^3P_2$	$^2P_{3/2}$	$^1S$
H							He
Li	Be	B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr

Sc $^2D_{3/2}$	Ti $^3F_2$	V $^4F_{3/2}$	Cr $^7S$	Mn $^6S$	Fe $^5D_4$	Co $^4F_{9/2}$	Ni $^3F_4$	Cu $^3F_4$	Zn $^1S$
-------------------	---------------	------------------	-------------	-------------	---------------	-------------------	---------------	---------------	-------------

Для описания спектральных свойств атомов с несколькими электронами недостаточно простой схемы, используемой для атома водорода. Здесь необходимо учитывать переходы между различными термами. Однако не все электронные переходы допущены или наблюдаемы, а только те, которые соответствуют определенным правилам отбора по соображениям симметрии вовлеченных электронных состояний. По законам волновой механики

<sup>1</sup> Прим. редактора: на внешней обложке

электронные переходы чаще запрещены, чем разрешены, — разрешенные переходы являются исключением. Квантово-механический расчет обеспечивает следующие правила (и в добавление к ним информацию о поляризационных свойствах поглощенного и эмиттированного излучения см. в главе 2.3.3.4):

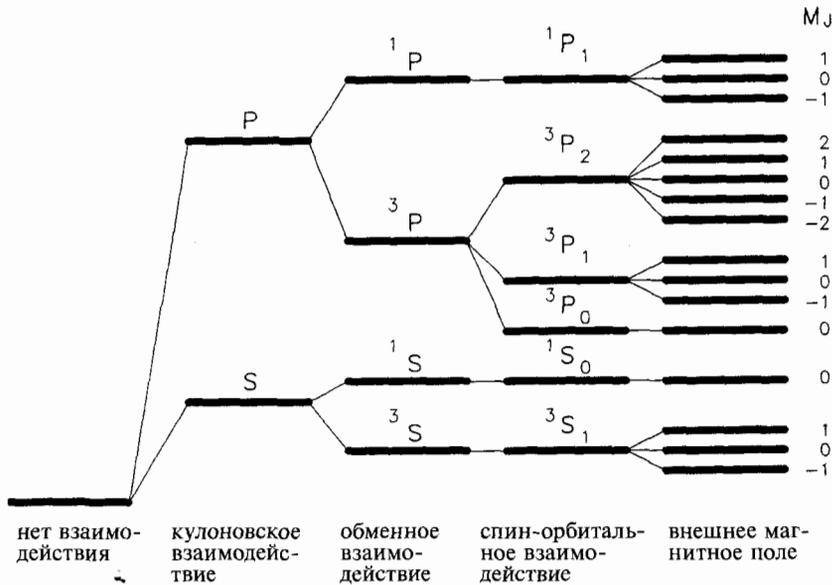
- суммарный угловой момент  $J$  атома не должен изменяться совсем или только на  $\pm 1$  (однако переходы с  $J = 0$  на  $J = 0$  запрещены);
- мультиплетность не может изменяться: смягчение этого правила различными факторами очень важно в молекулярной спектроскопии;
- угловой момент  $l$  изменяется точно на  $\pm 1$ ;
- магнитное квантовое число  $m_l$  не должно изменяться совсем или только на  $\pm 1$ .

### 2.3.2.3. Атом гелия

На основе рассуждений об атоме водорода, как наипростейшей системы, рассмотрим теперь атом гелия с его двумя электронами. В действительности он показывает неожиданно сложный спектр, который исторически был понят только после многочисленных попыток исследования. Понимание спектральных свойств значительно продвинулось после изучения структуры его атома и привело к изучению более крупных многоэлектронных молекул. Гелий может существовать как парагелий и как ортогелий. Так как атом гелия содержит два электрона, то возможны два спиновых состояния, синглетное и триплетное (см. рис. 2.11 на цветной вклейке). Спектральный переход между двумя спиновыми состояниями запрещен и возможен только в пределах одного спинового состояния (см. главу 2.3.2.2, второе правило).

Основное состояние гелия, парагелий, обозначается как  $^1S_0$ , при этом в самом нижнем возбужденном состоянии один из двух электронов находится на уровне с квантовым числом  $n = 2$  с двумя возможными конфигурациями:  $1s^1 2s^1$  и  $1s^1 2p^1$ . В то время как в атоме водорода переход с уровня  $n = 1$  на уровень  $n = 2$  приводит к появлению единственной спектральной линии, длина волны которой может быть точно рассчитана по формуле Ридберга, соответствующая линия гелия расщепляется, после удаления всех вырождений, на 16 линий, как показано на рис. 2.12.

Обычно S-термы расположены ниже P-термов с тем же главным квантовым числом  $n$ , тогда как вероятность нахождения s-электронов в непосредственной близости от ядра больше, чем у p-электронов и подобна электростатическому и кулоновскому взаимодействию. В триплетном состоянии оба электрона имеют одинаковый спин; они находятся на различных орбиталях, и, согласно принципу исключения Паули, не могут сближаться. Однако в синглетном состоянии электроны спарены (суммарный спин равен нулю) и принцип Паули к ним не применим, и они могут сближаться. При сближении возникает отталкивание электронов, что повышает синглетное состояние над триплетным состоянием. Это так называемое *спин-орбитальное взаимодействие*, которое приводит суммарный угловой момент  $J$  в более стабильное состояние, и, следовательно, система будет обладать



**Рис. 2.12.** Схематичное изображение полного расщепления на 16 линий  $\{2 \times [2 + (3 \times 2)]\}$  электронного перехода гелия (первоначально полностью вырожденного) с уровня  $n = 1$  на уровень  $n = 2$  при последовательном рассмотрении предполагаемых «возмущений»

более низкой энергией. Если принимать во внимание все внутренние взаимодействия системы атома гелия, то состояние вырождения атома, характеризующееся квантовым числом  $M_J$ , можно преодолеть внешним магнитным полем. Следует отметить, что  $M_J$  и  $J$  аналогичны  $m_l$  и  $l$  для атома водорода, который был описан ранее.

На рис. 2.13 представлены схемы термов калия и натрия в видимом и инфракрасном диапазоне. Характерными для них являются дублеты, так как суммарный спин равен  $S$ . Такой суммарный спин имеют все щелочные металлы ( $2 \times S + 1$ ). Спектры различных элементов в видимом диапазоне представлены на рис. 2.14 на цветной вклейке.

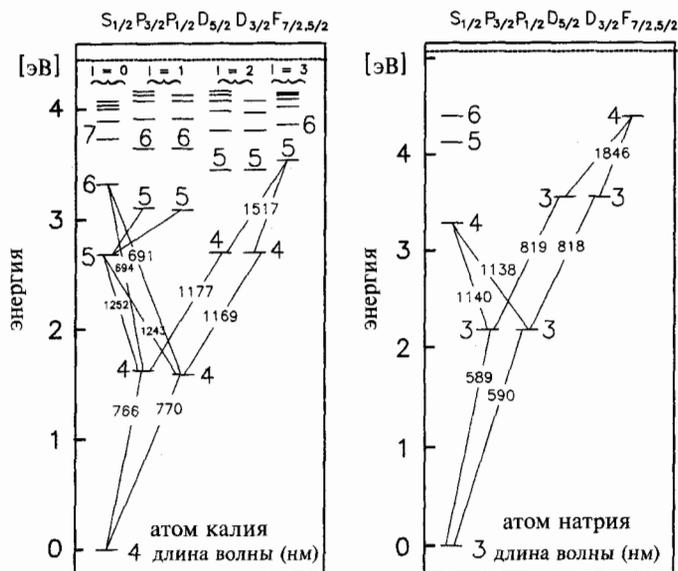
Хорошо известная «желтая D-линия натрия» при длинах волн 589 и 590 нм образуется при переходах  $2S_{1/2} \rightarrow 2P_{3/2}$  и  $2S_{1/2} \rightarrow 2P_{1/2}$ . Она используется для калибровки спектральных приборов по длине волны.

Спектры всех систем с двумя электронами наподобие атомов гелия, щелочноземельных металлов или молекулы водорода демонстрируют синглетные и триплетные серии. В оптической спектроскопии, фотохимии и биологии больших молекул уделяется большое внимание различной роли их синглетных и триплетных состояний.

## 2.3.3. Простые молекулы и их спектральные свойства

### 2.3.3.1. Химическая связь

Основное состояние почти всех молекул — это синглетное состояние. Исключение составляет молекулярный кислород. Спектральные свойства атомов опре-



**Рис. 2.13.** Диаграмма термов калия (детальное представление) и натрия с их водородоподобными спектрами. Значения энергий даны в сравнении с энергией основного состояния атомов. Красная линия спектра калия и желтая линия спектра натрия являются двойными линиями и соответствуют переходам  $S_{1/2} \rightarrow P_{1/2}, P_{3/2}$ . На практике яркость желтой линии натрия (D-линия; D означает дублет) используется для определения разрешающей способности спектрофотометров

деляются их электронной структурой, а спектральные свойства молекул зависят не только от их структуры, но и от химической связи их отдельных частей.

Каждая химическая связь в молекуле основывается на взаимодействии электронов и ядер. Электроны внешних, частично заполненных оболочек называются «валентными электронами», они играют основную роль при формировании химической связи.

*Как правило, «глубинные» оболочки полностью заполнены, они «закрыты» и имеют полностью симметричную волновую функцию. Исключения можно найти в группе лантаноидов и актиноидов (это их свойство используется в флуоресцентной спектроскопии).*

Все химические связи были разделены на классы, хотя это разделение не всегда однозначно:

- ионные связи;
- ковалентные связи;
- водородная связь;
- силы Ван-дер-Ваальса;
- кристаллические связи в твердых веществах, металлическая связь.

Ионная связь основывается на электростатическом притяжении положительно и отрицательно заряженных частиц (например,  $Na^+$  и  $Cl^-$  в молекуле хлористого натрия). Здесь нет непосредственного взаимодействия электронов. При образовании химической связи на основе сил Ван-дер-Ваальса

также нет взаимодействия электронов, притягивающие элементы силы возникают из-за взаимодействия наведенных дипольных моментов, дисперсионных и диполь-дипольных взаимодействий. Водородная химическая связь, напротив, возникает из-за взаимодействия электронов и не всегда напрямую оказывает модифицирующее влияние на оптические спектры. Твердые вещества обладают особыми свойствами, проявляющимися в кооперации атомов и молекул в кристаллической решетке. В оптической спектроскопии наибольший интерес представляют ковалентные и металлические координационные связи. Они будут рассмотрены более детально ниже.

### 2.3.3.2. Электронные спектры двухатомных молекул

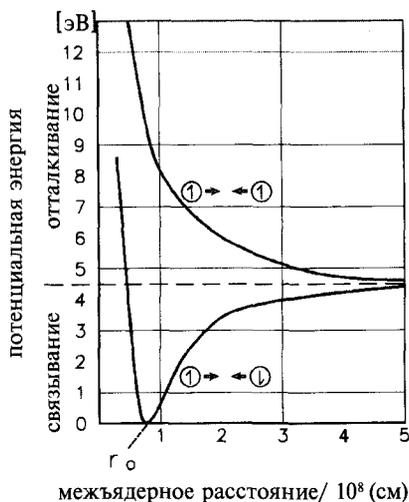
Основные законы спектроскопии лучше приводить на примере наипростейшей системы — молекулы водорода, которая образуется за счет ковалентной связи между двумя атомами водорода. Результаты затем легко трансформировать на более сложные молекулы.

Некоторые основополагающие правила облегчат наше понимание. Ранее мы ознакомились с волновой функцией  $\psi$ . Это математически сложная функция с действительной и мнимой частями, включающая знак «+» или «-» (фазами). Ковалентная химическая связь возникает только между атомными орбиталями с одинаковыми фазами; в результате образуется новая молекулярная орбиталь (МО), которая может содержать максимум два электрона с противоположными спинами. Эта орбиталь пространственно перекрывает атомные орбитали. Например, химическая связь между 1s- и 3d-орбиталями невозможна, однако между 2p- и 1s- или 3p- с 4d-орбиталями легко возникают молекулярные орбитали. Следует отметить, что основной закон квантовой механики гласит: общее количество орбиталей должно оставаться постоянным.

Предположим, два отдаленных друг от друга атома водорода с волновыми функциями 1s-орбиталей  $\psi_A$  и  $\psi_B$  сближаются и образуют МО. Объяснение тому, как образуется МО, дал Р. С. Мюлликен на основе оригинальных математических выкладок. Согласно ему, атомные орбитали объединяются линейно и аддитивно или «в фазе», образуя новую молекулярную орбиталь:

$$\psi_b = \psi_A + \psi_B$$

Индекс  $b$  этой волновой функции означает химическую связь (bonding). Этот процесс образования МО был назван *линейной комбинацией атомных орбиталей* (ЛКАО). Оба электрона удерживаются во времени и пространстве между двумя ядрами соединяющей связью. Образуется так называемая *орбиталь химической связи*. В соответствии с законом количества орбиталей (см. таблицу 2.3), можно предполагать, что образуется вторая МО. Энергетические свойства можно проверить по потенциальным кривым, представленным на рис. 2.15. Они описывают суммарную энергию системы как функцию координат ядер. С одной стороны, сближение ядер приводит к ожидаемой минимизации энергии, т.е. к образованию химической связи (с длиной связи  $r_0$ ; любое дальнейшее сближение запрещено сильным электростатическим отталкиванием вследствие резкого возрастания потенциальных кривых). С другой стороны, справа от начала сближения



**Рис. 2.15.** Потенциальные кривые двух атомов водорода, приближающихся друг к другу с большого расстояния. Мы можем различить состояния связывания и отталкивания. При связывании на расстоянии  $r_0 = 0,74 \text{ \AA}$  сила ковалентного связывания и сила электростатического отталкивания удерживают ядра в равновесии и образуется потенциальная яма. В случае отталкивания ситуация нестабильна и мы переходим к невзаимодействующей паре

возникает непосредственное отталкивание зарядов ядер, которое называется *орбиталью отталкивания*<sup>1</sup>. В первом случае оба электрона заполняют орбиталь химической связи, а во втором случае один электрон находится на орбитали химической связи, а другой на орбитали отталкивания. В результате энергия химической связи будет равна нулю, т.е. химическая связь не образуется.

**Табл. 2.3.** Закон сохранения количества орбиталей: при образовании молекул через ковалентную связь между атомами количество орбиталей сохраняется (т.е., например,  $2 \times 3$  атомных орбиталей образуют 6 молекулярных орбиталей)

Атомные орбитали	Молекулярные орбитали
2 s-орбитали →	1σ, 1σ* (2 орбитали)
6 p-орбитали →	1σ, 1σ* (6 орбиталей) 2π, 2π*
10 d-орбитали →	1σ, 1σ* 2π, 2π* (10 орбиталей) 2δ, 2δ*

Выход из состояния линейного объединения атомных орбиталей приводит к образованию МО отталкивания с волновой функцией:  $\psi_a = \psi_A - \psi_B$ .

<sup>1</sup> Прим. редактора: в русской номенклатуре это связывающая и разрыхляющая орбитали

Индекс  $a$  означает отталкивание (antibonding), на рис. 2.15 это верхняя кривая. Молекулярная орбиталь изменяет свой знак в узловой плоскости между двумя ядрами, где электронная плотность и, таким образом, энергия связывания равны нулю (см. рис. 2.16).

По аналогии с терминологией для атомов молекулярные состояния имеют условные обозначения, но греческими символами (табл. 2.4). Вместо  $s$ -,  $p$ - и  $d$ -орбитальных электронов в молекуле мы имеем  $\sigma$ -,  $\pi$ - и  $\delta$ - электроны, суммарный угловой момент обозначается  $\Lambda$ , а не  $L$ , индивидуальные состояния со значениями  $\Lambda$  0, 1, 2 и 3 —  $\Sigma$ ,  $\Pi$ ,  $\Delta$  и  $\Phi$ . Орбитали отталкивания обозначаются знаком  $*$ . Так же как в атомах водорода, обе молекулярные орбитали молекулы водорода не обладают угловым моментом и обозначаются как  $\sigma$  орбиталь (химической связи) и  $\sigma^*$ -орбиталь (отталкивания).

Табл. 2.4. Условные обозначения орбиталей и угловых моментов атомов и молекулы

Системы	Угловые моменты			
	1	2	3	4
Один электрон (атом)	$s$	$p$	$d$	$f$
Многоэлектронная система (атом)	$S$	$P$	$D$	$F$
Один электрон (молекула)	$\sigma$	$\pi$	$\delta$	$\phi$
Многоэлектронная система (молекула)	$\Sigma$	$\Pi$	$\Delta$	$\Phi$

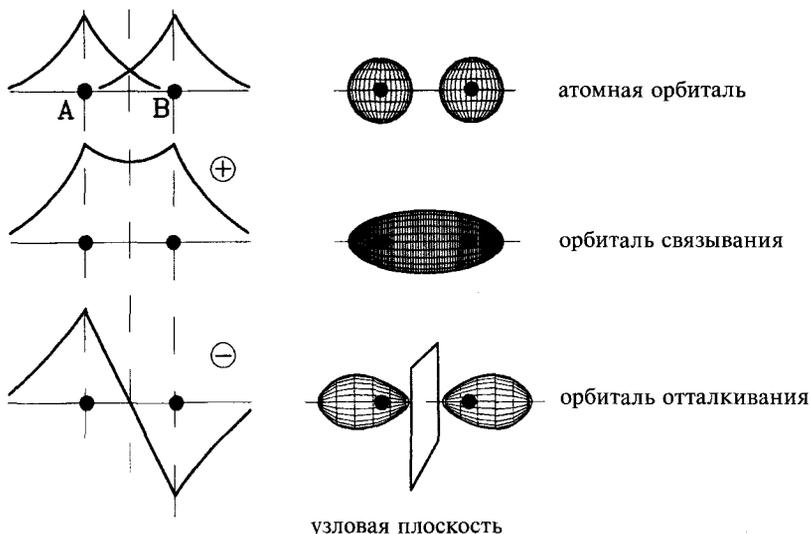


Рис. 2.16. Энергетическая и пространственная визуализация процесса образования молекулярных орбиталей на основе линейного объединения атомных орбиталей (на примере водорода). Вверху: атомные орбитали; в середине: молекулярная орбиталь химической связи с волновой функцией  $\psi_b = \psi_A + \psi_B$  (электронная плотность при этом максимальна на линии между ядрами); внизу: молекулярная орбиталь отталкивания с волновой функцией  $\psi_a = \psi_A - \psi_B$  (между ядрами образуется узловая плоскость)

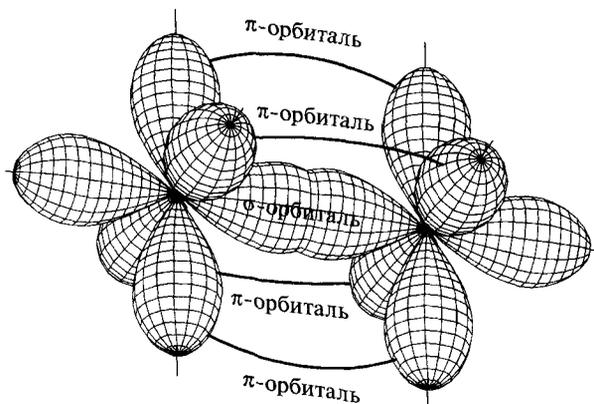


Рис. 2.17. Пространственное распределение тройной химической связи в молекуле азота: две  $\pi$ -связи и одна  $\sigma$ -связь. Для наглядности  $\pi$ -орбитали изображены более растянутыми, чем на самом деле (ср. с рис. 2.8)

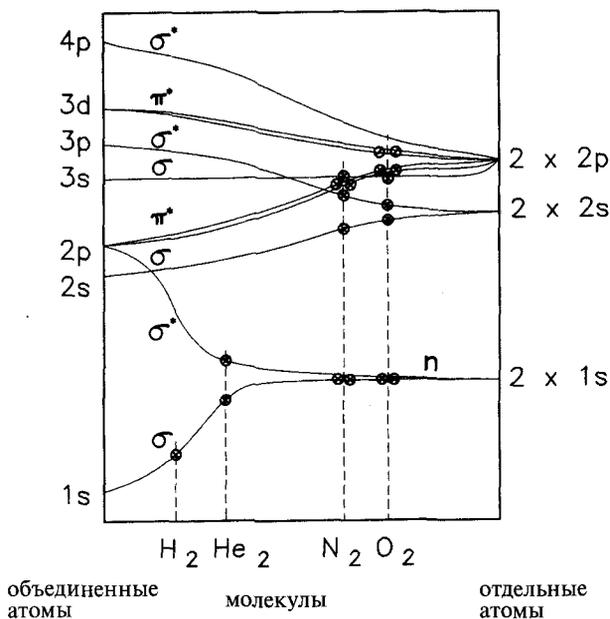


Рис. 2.18. Гомоядерная двухатомная корреляционная диаграмма. Схематично представлены изменения энергии молекулярных орбиталей как функций расстояния между ядрами. Для некоторых молекул приведено распределение электронов, на основании которого можно незамедлительно определить спектральные свойства. Молекулярные  $n$ -орбитали (без химической связи) соответствуют свободным атомным орбиталам и поэтому не дают вклада в молекулярный спектр. Молекулярные орбитали отталкивания обозначены звездочкой

В молекулярной системе атомы часто образуют многократные химические связи, например, в молекуле азота образуется тройная химическая связь. В атоме азота существуют три  $p$ -орбитали с одним электроном в каждой ( $4S$ -термы), которые могут образовывать одну  $\sigma$ - и две  $\pi$ -молекулярные орбитали. Две из трех  $p$ -орбиталей ( $p_x, p_y, p_z$ ) могут располагаться параллельно друг другу, перекрывая при этом сверху и снизу две плоскости, содержащие два атомных ядра. Два электрона химической связи обладают угловым моментом  $l = 1$  и, следовательно, являются  $\pi$ -электронами. С другой стороны, две  $p_x$ -орбитали, вытянутые вдоль оси перекрывания двух ядер, формируют молекулярную орбиталь. Угловым моментом, связанным с этой молекулярной орбиталью,  $l = 0$ , следовательно, это —  $\sigma$ -орбиталь (см. рис. 2.17). По аналогии с атомными орбиталями, молекулярные орбитали с угловым моментом  $l = 2$  являются  $\delta$ -орбиталями.

На рис. 2.18 представлена так называемая корреляционная диаграмма электронной конфигурации двухатомных молекул  $N_2, He_2, N_2$  и  $O_2$ . Две  $s$ -орбитали становятся одной  $\sigma$ - и одной  $\sigma^*$ -молекулярными орбиталями,

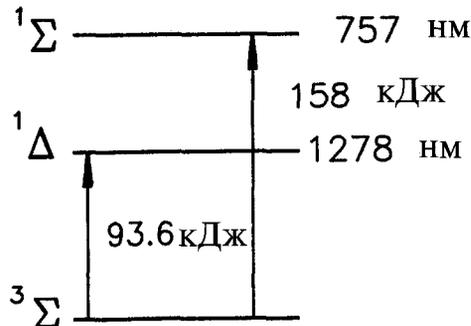
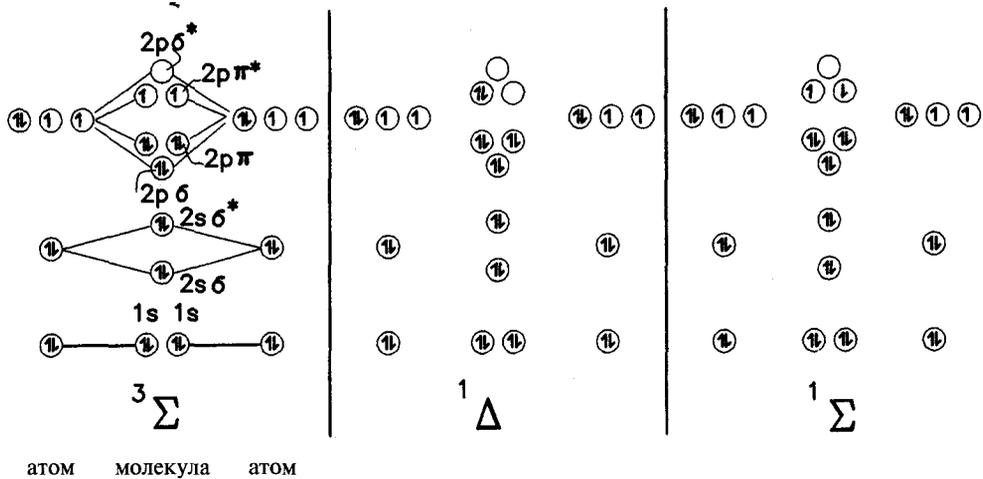
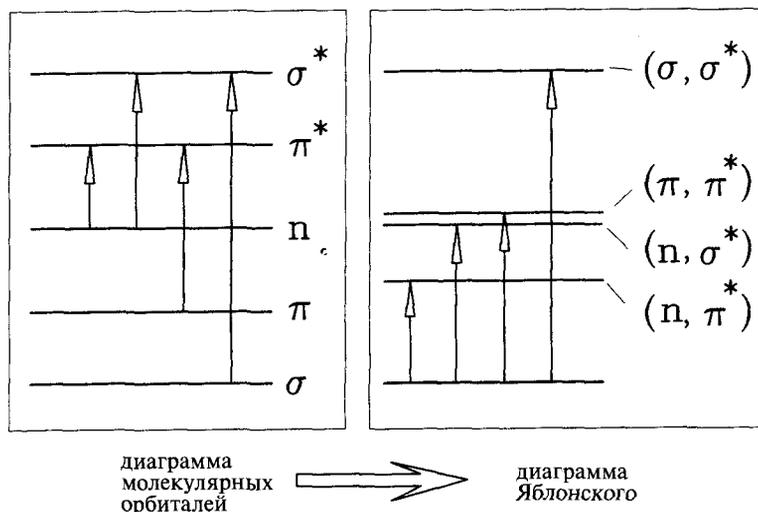


Рис. 2.19. Схема терма и энергий трех наиболее важных состояний молекулы кислорода. Первому синглетному состоянию  $1\Delta$  (синглетный кислород) соответствует спектральная линия 1278 нм, располагающаяся в ближнем инфракрасном диапазоне

две из каждых трех  $p$ -орбиталей ( $p_x, p_y, p_z$ ) становятся одной  $\sigma$ - и одной  $\sigma^*$ -молекулярными орбиталями и двумя  $\pi$ - (химической связи) и  $\pi^*$ - (отталкивания) орбиталями. Расположенные ниже атомные орбитали, энергия которых на образование химической связи совсем не влияет или влияет незначительно, обозначаются несвязывающимися  $n$ -орбиталями, а электроны на них —  $n$ -электронами. При создании корреляционной диаграммы МО заполняются в порядке увеличения энергии с использованием существующего суммарного числа электронов от «низа до верха». Наиболее важны электронные свойства молекулы  $O_2$ , которые детально представлены в виде молекулярных орбиталей на рис. 2.19. Основное состояние кислорода является триплетным.

Для более определенной визуализации энергетических свойств молекулы вместо диаграммы молекулярных орбиталей Яблонским был предложен другой метод представления диаграмм (см. рис. 2.20). На них не указываются энергетические состояния молекул самих по себе, а указываются разности энергий отдельных переходов с соответствующими обозначениями. Например,  $S_1(n, \pi^*)$  описывает энергетически самое низкое возбужденное состояние молекулы синглетного характера после электронного перехода  $n \rightarrow \pi^*$ . Если первое триплетное состояние достигается  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходом, то оно обозначается как  $T_1(\pi, \pi^*)$ . Такая терминология имеет не только теоретическое значение, но непосредственно отражает спектрально-аналитические свойства системы, что мы увидим более детально позже.

Большинство спектров происходит лишь из малой части молекулы. Например, электрон атома водорода в метильной группе ( $-CH_3$ ) занимает всего нескольких ангстрем ( $10^{-10}$  м). Однако есть молекулы, в которых электроны делокализованы по большой площади и в большом количестве



**Рис. 2.20.** Преобразование диаграммы молекулярных орбиталей в практическую, энергетически ориентированную диаграмму Яблонского, в которой все переходы обозначены энергетическими уровнями. Каждый переход на такой диаграмме соответствует определенной разнице энергий; указывается исходное и полученное состояние

орбиталей — порядка  $10 \text{ \AA}$  или даже больше. Так, причиной интенсивной окраски молекул пигментов являются конъюгированные двойные связи, электронные переходы в которых лежат не только в ультрафиолетовом, но, в основном, в видимом диапазоне спектра. Такие пигменты играют очень важную роль в оптической спектроскопии, что будет рассмотрено в последующих главах.

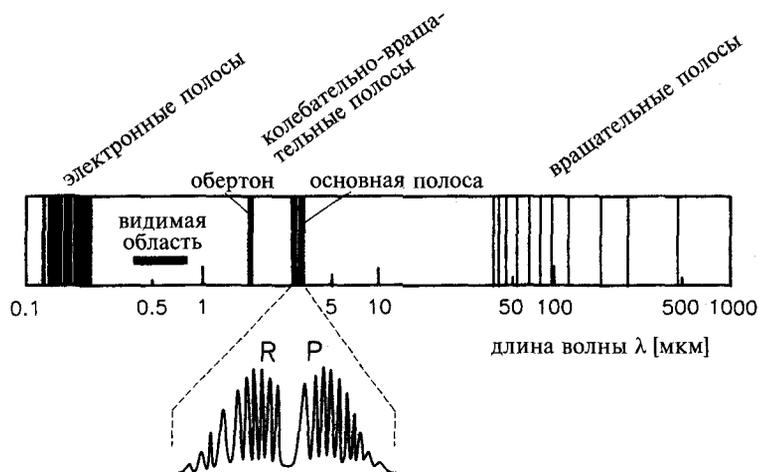
### 2.3.3.3. Молекулярные колебания

В отличие от атомов, имеющих исключительно электронные энергетические уровни, представляемые спектральными линиями, у двухатомных и многоатомных молекул при поглощении инфракрасного и микроволнового излучения могут возбуждаться до более высоких энергий колебательные и вращательные уровни. Так как абсорбционные и эмиссионные свойства отдельных атомов по отношению к «более низко лежащим» электронам (невалентным, характеризваемым рентгеновской областью) при образовании молекулы остаются незатронутыми, молекулы обладают совершенно иными спектральными свойствами. В них проявляются как отдельные спектральные линии и полосы, так и целые системы более или менее перекрывающихся полос большой сложности, которые, очевидно, связаны с внешней оболочкой, т.е. валентными электронами. Для объяснения получаемых спектров потребовалась работа целых поколений ученых, прежде чем спектроскопия превратилась в могущественное аналитическое средство в науке, а затем и в промышленности, и в технологии.

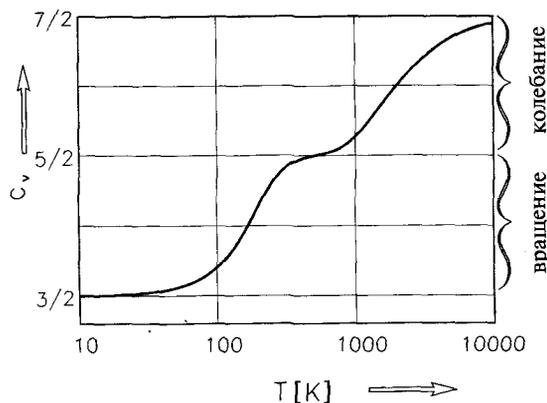
Вновь обозрим этот долгий и тернистый путь с высоты птичьего полета. Так, на рис. 2.21 представлены спектральные характеристики простой молекулы ( $\text{HCl}$ ) в целом спектральном диапазоне: от  $100 \text{ нм}$  (вакуумный УФ) до  $1 \text{ мм}$  (дальняя ИК область). В спектре можно выделить три области линий и полос. В первой спектральной области четко видны три типа переходов, происходящих одновременно: электронный, колебательный и вращательный. Вторая спектральная область включает так называемые колебательно-вращательные полосы, а третья (дальняя ИК) — чисто вращательные переходы.

Квантование вращательной и колебательной энергии молекул (визуализация в этом случае более сложная, чем электронное квантование) впервые было убедительно доказано ступенчатым изменением теплоемкости  $C_v$  в зависимости от абсолютной температуры, что доказывается макроскопически (см. рис. 2.22). С понижением температуры движение в определенной степени затормаживается и, следовательно, больше не способно поглощать энергию.

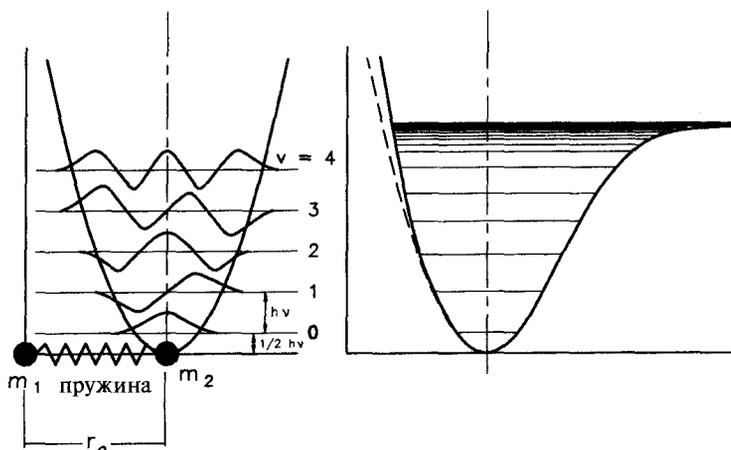
Простейшей моделью исследования молекулярных колебаний являются двухатомные молекулы: колебания атомов, составляющих молекулу, аналогичны колебаниям двух масс, соединенных пружиной. В соответствии с законом Гука (энергия пропорциональна квадрату перемещения), колебания могут быть описаны параболической потенциальной кривой гармонического осциллятора (см. рис. 2.23). Уравнение Шредингера для гармонического осциллятора дает дискретные значения энергии:  $E_v = h\nu(v + 1/2)$ , где  $v$  — колебательное квантовое число и  $\nu$  — частота колебания. На энергетической



**Рис. 2.21.** Полный спектр поглощения, простирающийся на несколько порядков величины, полярной двухатомной молекулы на примере соляной кислоты (HCl). В спектре представлены три типа переходов — электронный, колебательный и вращательный, энергии которых последовательно снижаются в  $\sim 15$  раз (по эмпирическому правилу). Электронные полосы в ультрафиолетовом спектре не разрешаются на отдельные линии, а вращательно-колебательные полосы R и P в ИК области могут быть разрешены, как показано под основным спектром, на отдельные линии



**Рис. 2.22.** Изменение теплоемкости  $C_v$  (при постоянном объеме) в зависимости от абсолютной температуры  $T$  двухатомной молекулы ( $H_2$ ), которое описывается формулой  $k = R/L$ , где постоянная Больцмана  $k$  — газовая константа для одной молекулы, а  $L$  — число Лошмидта. Колебательные степени свободы заморожены уже при комнатной температуре (300 К), а вращательные — нет: молекулы находятся в своем основном колебательном состоянии

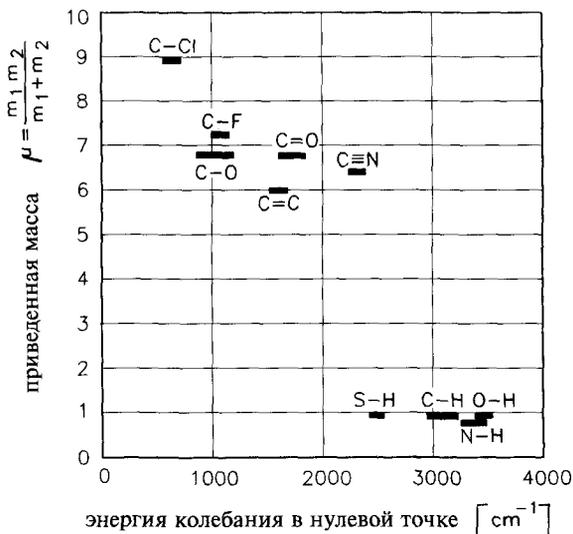


**Рис. 2.23.** Слева: Идеальный гармонический осциллятор с квантово-механически определенными колебательными модами, соответствующий закону Гука (две массы  $m_1$  и  $m_2$ , соединенные пружиной, колеблются друг против друга), описывается параболической потенциальной кривой. Показаны волновые функции с колебательными квантовыми числами  $\nu = 1, 2, \dots, n$ . В основном состоянии гармонический осциллятор обладает конечной, так называемой энергией нулевой точки  $1/2 h\nu$ . Справа: Потенциальные кривые гармонического осциллятора (пунктирная линия) и реальная потенциальная кривая Морзе

схеме видно, что термы колебательных состояний отстоят друг от друга на равном расстоянии  $h\nu$ , и наименьшее возможное значение энергии, в соответствии с принципом неопределенности Гейзенберга, не равно нулю, а равно  $h\nu/2$ . Эта энергия называется *энергией нулевой точки*. Отсюда вытекает очень важное правило отбора:  $\Delta\nu = \pm 1$ , т.е. колебательное квантовое число должно изменяться точно на 1. Таким образом, каждому гармоническому осциллятору соответствует только одна спектральная линия с энергией  $h\nu$  вследствие неизменности расстояния полной длины. Для малых колебательных квантовых чисел гармонический осциллятор является вполне реалистической моделью. С увеличением квантового числа возрастает отклонение от идеального гармонического осциллятора, уровни энергии достигают определенного предела, где молекулы распадаются («пружина рвется»). Реалистическая потенциальная кривая, описывающая достаточно хорошо действительные свойства, называется по имени автора кривой Морзе. Она асимметрична и приводит к ангармоническим колебаниям, схематически показанным на рис. 2.23 справа. Строгое правило отбора для гармонического осциллятора ослабляется настолько, что со снижением вероятности, т.е. интенсивности, возможны переходы  $\Delta\nu = \pm 2, \pm 3$ .

*Теория и практика показывают более точно, что с ростом квантового числа уровни энергии ангармонического осциллятора сближаются.*

Если две массы  $m_1$  и  $m_2$  колеблются относительно центра масс  $S$ , то решающим фактором при определении частоты колебания является так называемая *приведенная масса*  $\mu = (m_1 \times m_2)/(m_1 + m_2)$ . На рис. 2.24 представлены колебательные частоты наиболее важных химических групп в зависи-



**Рис. 2.24.** Колебательные энергии важнейших ковалентных химических групп в зависимости от их приведенных масс

мости от значения приведенной массы  $\mu$ . Очевидно, что число возможных колебаний (нормальных колебаний) возрастает соответственно трем пространственным координатам и с увеличением количества отдельных атомов  $N$ . У нелинейной молекулы возможно  $3N - 6$  нормальных колебаний, а у линейной —  $3N - 5$ . Таким образом, для нелинейной молекулы воды получаем:  $3N - 6 = 3$  нормальных колебания: два *валентных* и одно *деформационное* (см. рис. 2.25). В более сложных молекулах следует различать локализованные и делокализованные колебания. При слишком интенсивном возбуждении локализованных валентных колебаний (в соответствии с кривой Морзе, рис. 2.23) отдельные связи будут разрываться, а молекулы или молекулярные группы диссоциировать. Например, при использовании лазера с «правильной» монохроматической энергией можно индуцировать определенные фотохимические реакции. Первым примером такого воздействия было отщепление атома фтора из молекулы гексафторида серы  $SF_6$  при воздействии высокоэнергетическим ИК лазером на диоксиде углерода, что считается началом индустриального применения лазерной химии.

Теперь рассмотрим сопутствующие изменения электронного и колебательного состояния молекулы. Эти процессы описываются принципом Франка — Кондона. Он констатирует, что межъядерное расстояние при чрезвычайно быстром электронном переходе не изменяется, а принимает новое значение гораздо позже. В соответствии с теорией, переходы происходят преимущественно между состояниями с большим перекрытием соответствующих колебательных волновых функций (см. рис. 2.26). Так называемый *0—0 переход*, т.е. электронный переход без какого-либо изменения колебательного квантового числа, как в атомарных переходах, полностью реализуется только в спектрах поглощения молекул вследствие того, что расстояния между ядрами обычно меняются при переходе. Структура молекулярных спектров определяется принципом Франка — Кондона.

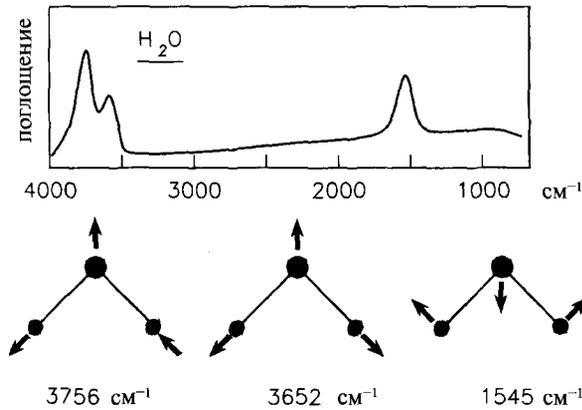


Рис. 2.25. Три колебательных полосы молекулы воды с соответствующими формами колебаний

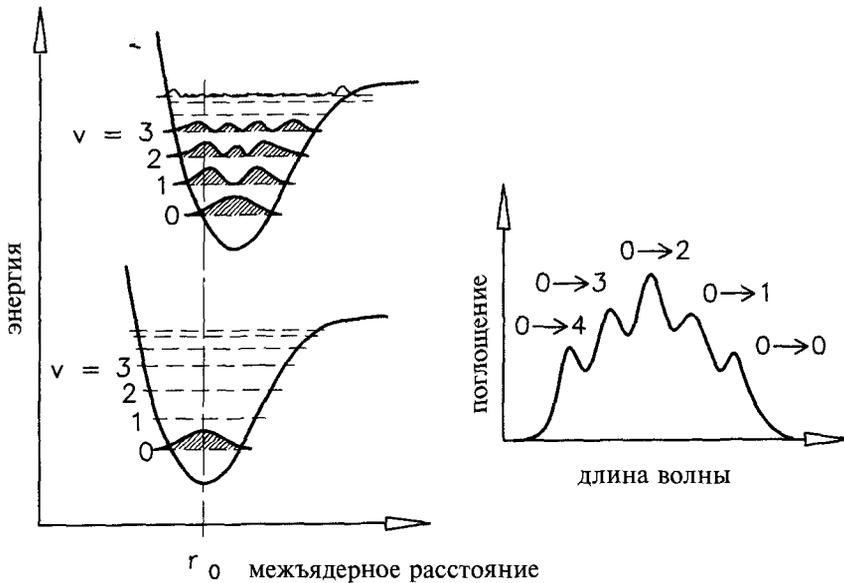


Рис. 2.26. Структура колебательной полосы в существенной степени определяется принципом Франка — Кондона: чем больше перекрытие электронных плотностей основного и возбужденного состояний, тем более интенсивны соответствующие спектры (в данном примере максимальное поглощение происходит при переходе  $\nu = 0 \rightarrow \nu = 2$ )

### 2.3.3.4. Моменты перехода

Вероятность  $P$  того, что молекулярная система перейдет из состояния  $\phi_1$  в состояние  $\phi_2$  за счет поглощения света, зависит от скалярного произведения вектора электрического поля излучения  $E$  и момента перехода  $M$ :

$$P \propto |E \cdot M|^2 \tag{2.18}$$

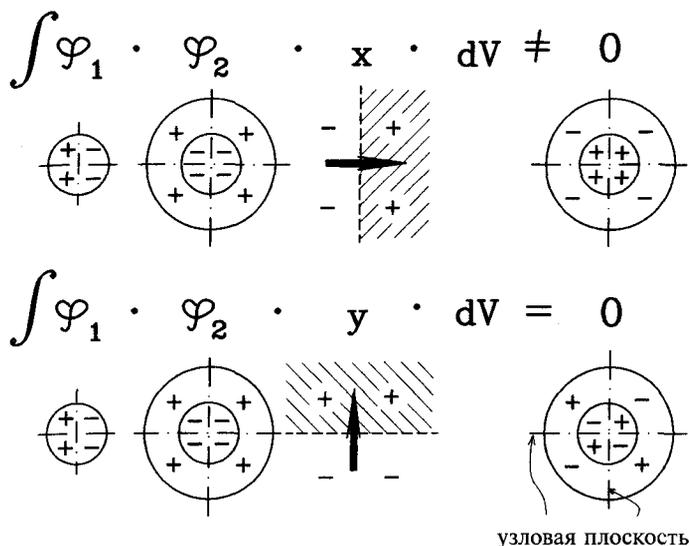
Момент перехода определяется по формуле:

$$M_{12} = e \int \varphi_1 r \varphi_2 dV \quad (2.19)$$

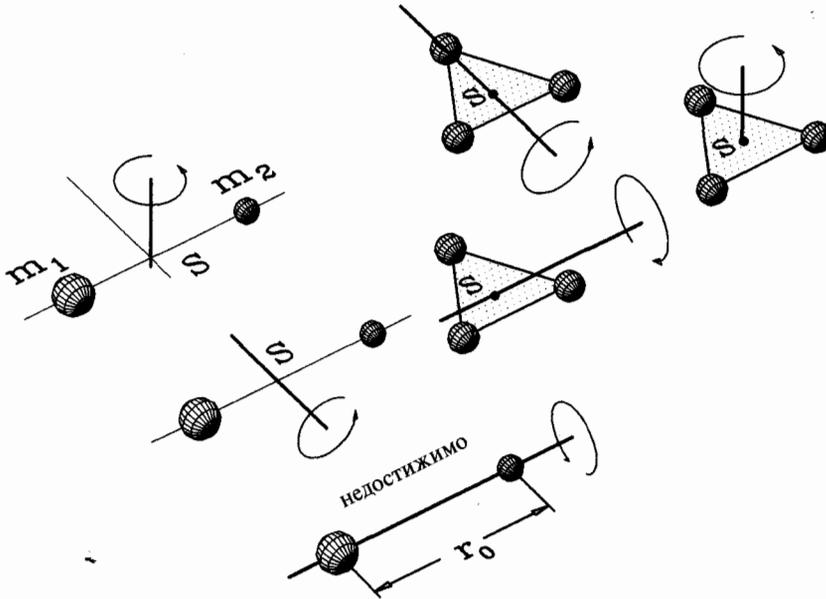
где  $e$  — электрический заряд,  $r$  — вектор положения,  $dV$  — элементарный объем и  $M$  — размеры дипольного момента. Из скалярного произведения  $P$  (ур. 2.18) и индивидуальных свойств симметрии  $\varphi_1$  и  $\varphi_2$  вытекают два следствия, а именно правило отбора и эффекты поляризации, наблюдаемые при абсорбции и эмиссии молекулы. Свет поглощается или излучается, если  $M_{12} \neq 0$ , т.е. дипольный момент перехода должен изменяться при переходе. На рис. 2.27 показан переход в плоскости  $x$ — $y$  между гипотетическими волновыми функциями  $\varphi_1$  и  $\varphi_2$  с определенными свойствами симметрии, на которой вектор положения разложен на соответствующие компоненты  $x$  (вверху) и  $y$  (внизу). Справа на рис. 2.27 подынтегральное выражение выявляет узловую линию в направлении  $y$ -компоненты и  $M_{12}$  исчезает, а в направлении  $x$ -компоненты  $M_{12}$  имеет конечное значение. Таким образом, абсорбционные и эмиссионные эксперименты с поляризованным светом можно использовать для исследования структуры и пространственной перегруппировки молекул.

### 2.3.3.5. Вращательный спектр

Тогда как двухатомные молекулы обладают только двумя вращательными степенями свободы относительно центра масс  $S$  (вращение вокруг линии, соединяющей ядра атомов, невозможно), большие молекулы обладают тремя неза-



**Рис. 2.27.** Визуализация дипольного момента (перехода) двух гипотетических молекулярных орбиталей. Свойства симметрии орбиталей, так же как и направление вектора положения, очень важны. В этом примере переход сопровождается полной поляризацией в  $x$ -направлении, в  $y$ -направлении момент перехода отсутствует



**Рис. 2.28.** Степени свободы вращения двухатомной (2, слева) и трехатомной (3, справа) молекул. Вращение осуществляется вокруг центра масс (общий центр тяжести)

висимыми возможностями вращения и, следовательно, энергии поглощения (см. рис. 2.28). При рассмотрении вращательного движения гармонический осциллятор, используемый при рассмотрении колебаний, заменяют «свободным волчком». Двухатомная молекула с атомными массами  $m_1$  и  $m_2$ , находящимися на расстоянии  $r_0$  относительно друг друга и вращающимися вокруг общего центра масс  $S$ , обладает *приведенной массой*  $\mu$  (см. выше). При вращательном движении не масса, а распределение массы, определяемое моментом инерции  $\theta = \mu \times r^2$ , определяет вращательную энергию. Предположим, двухатомная молекула вращается вокруг оси, перпендикулярной линии, соединяющей ядра атомов (плоский волчок). Тогда угловой момент будет равен  $P_R = \theta \omega$ , где  $\omega$  — угловая скорость. В соответствии с уравнением 2.8, получаем:

$$P_R = J \times \hbar, \text{ где } J = 1, 2, \dots \quad (2.20)$$

Используя соотношение для вращательной энергии, известное из классической механики,

$$E_{rot} = \frac{\theta \omega^2}{2},$$

получаем:

$$E_{rot} = \frac{\hbar^2}{2\theta} \times J^2 \quad (2.21)$$

где  $J$  — вращательное квантовое число. Если учесть, что молекула имеет три степени свободы вращения (свободный волчок), то по законам квантовой механики  $J^2 = J(J + 1)$ . Тогда:

$$E_{\text{rot}} = \frac{\hbar^2}{2\Theta} \times J(J + 1) \quad (2.22)$$

Если заменить, что типично для ИК спектроскопии,  $E_{\text{rot}}$  на волновое число  $k = 1/\lambda$  (см. уравнение 2.3) и ввести постоянную вращения  $B = \hbar/(2c\Theta)$ , то получим простое выражение для энергии:

$$\nu = BJ(J + 1) \quad (2.23)$$

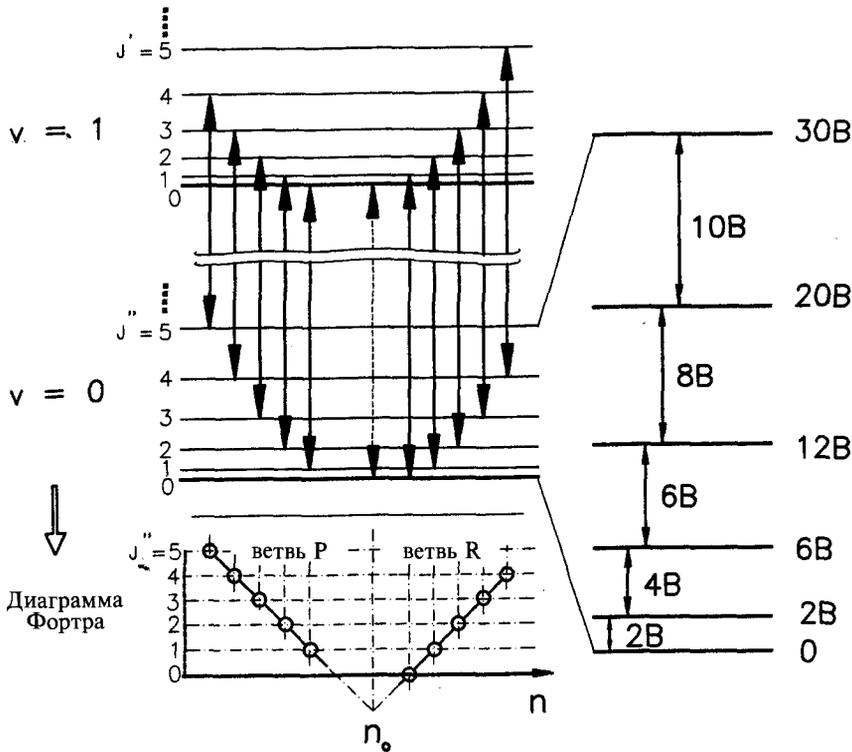
*Здесь символ  $\nu$ , по традиции обычно используется вместо  $k$ . С другой стороны,  $\nu = c/\lambda$  используется также для обозначения частоты излучения (ср. с уравнением 2.1). Такие недоразумения двойного использования типичны для всех наук, и часто вводят в заблуждение.*

Для вращательных переходов также существует правило отбора:  $\Delta J = \pm 1$ , т.е. при поглощении или эмиссии излучения каждое вращательное состояние сопровождается переходом лишь на соседний уровень. Таким образом, энергетический промежуток между последовательными вращательными состояниями равен  $2B$  (см. рис. 2.29). Следовательно, вращательные спектры позволяют непосредственно определять моменты инерции молекул. Однако это утверждение справедливо только для молекул, которые изменяют при переходе свой электрический дипольный момент. Это такие молекулы, в которых центр заряда не совпадает с механическим центром масс (ср. с рис. 2.21, HCl). Следовательно,  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $N_2$  и подобные молекулы не обладают вращательными спектрами. Но Рамановская<sup>1</sup> спектроскопия (гл. 8.3) обеспечивает способ получения соответствующих молекулярных данных.

### 2.3.3.6. Вращательно-колебательные полосы

Вращательно-колебательные полосы спектра возникают, когда на каждый колебательный переход накладывается несколько вращательных полос. На рис. 2.29 схематически представлены серии двух вращательных термов, принадлежащих колебательным уровням  $\nu = 0$  и  $\nu = 1$ . В соответствии с правилом отбора  $\Delta J = \pm 1$ , существуют две ветви вращательно-колебательных полос, соответствующих переходам для  $\Delta J = +1$  и для  $\Delta J = -1$ . Серии спектральных линий, соответствующих  $\Delta J = +1$ , длина волны которых снижается с увеличением  $J$ , называются *R*-ветвью. Аналогично серии спектральных линий, соответствующих  $\Delta J = -1$ , длина волны которых возрастает с увеличением  $J$ , называются *P*-ветвью. Чисто вращательный переход ( $0-0$  переход) на первый взгляд запрещен — он на рис. 2.29 обозначен пунктирной линией и  $n_0$  термом. Однако спектральные данные точно не подтверждают этого, и, следовательно, представ-

<sup>1</sup> Прим. редактора: в России этот вид спектроскопии известен более под названием спектроскопия комбинационного рассеяния



**Рис. 2.29.** Диаграмма Фортра. В соответствии с правилом отбора вращательно-колебательных переходов двухатомных молекул, существуют энергетически разные ветви R ( $\Delta J = +1$ ) и P ( $\Delta J = -1$ ). На диаграмме частоты (энергии) отображены длиной стрелок. Справа приведены увеличивающиеся значения уровней энергии; каждое расстояние возрастает на  $2B$  с увеличением вращательного квантового числа

ленная модель может быть пересмотрена. Во-первых, момент инерции при переходе меняется; во-вторых, взаимодействие вращательной и колебательной энергий не аддитивно. Это свойство принимается во внимание введением дополнительного смешанного термина, что приводит к удовлетворительным результатам. В нижней части рис. 2.29 представлен энергетический путь (длина стрелок соответствует величине энергии) в зависимости от вращательного колебательного числа нижнего состояния ( $J''$ ). Это представление, известное под именем диаграммы Фортра, дает лучшее описание модели.

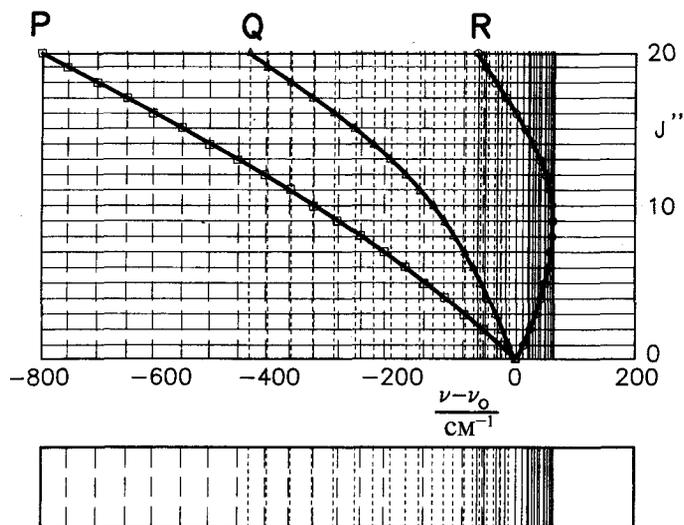
### 2.3.3.7. Вращательные, колебательные и электронные переходы

В большинстве случаев в оптической спектроскопии наблюдаются одновременно и электронные, и колебательные, и вращательные переходы. Электронные переходы, которые энергетически доминируют, наблюдаются в ультрафиолетовом и видимом диапазоне. При возбуждении

электрона его положение изменяется, и, следовательно, электрический дипольный момент молекулы также изменяется. Это приводит к двум последствиям. Во-первых, полосы электронного спектра наблюдаются даже у симметричных двухатомных молекул, таких как  $H_2$ ,  $O_2$  и проч.; во-вторых, переход без изменения вращательного квантового числа также возможен. Таким образом, правило отбора для  $J$  расширяется:  $\Delta J = 0, \pm 1$ . В добавление к R- и P-ветвям наблюдаются Q-ветви, для которых  $\Delta J = 0$ . Наконец, следует упомянуть, что во всех электронных полосах отсутствуют переходы между состояниями с суммарным угловым моментом, равным нулю, так как в этом случае электрический дипольный момент не меняется.

Более прецизионные эксперименты показали, что с увеличением вращательного возбуждения расстояния между линиями в P- и R-ветвях изменяются. Поэтому на рис. 2.30 представлена более реалистичная диаграмма Фортра, характерная для каждой индивидуальной молекулы. В соответствии с уравнением 2.2, единичная ветвь выглядит приблизительно в форме параболы. Если, например, R-ветвь получается на краю спектра, то эта ситуация называется красной тенью. А в аналогичном случае с P-ветвью — фиолетовой тенью. В принципе подобные спектральные края (канты) не окаймляют континуум, наблюдаемый в системе электронных линий атома водорода (см. рис. 2.7).

*Полосатые спектры, особенно «оттененные», свидетельствуют о сложности молекулярного состояния. Количественный анализ абсолютных значений вращательных констант дает значение момента инерции и расстояния химической связи.*



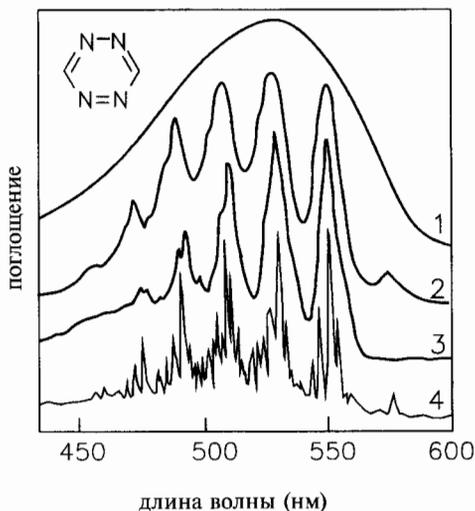
**Рис. 2.30.** Более реалистичная диаграмма Фортра с P-, R- и Q-ветвями для молекулы с ненулевым угловым моментом и вращательной постоянной  $B' = 0,9 B''$ . (G.Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 1985, Verlag Chemie, Weinheim, Germany)

### 2.3.3.8. Спектры атомов и молекул, малых и больших: сравнение

В то время как спектры атомов не зависят существенно от внешних параметров, таких как температура, растворитель или агрегатное состояние, спектры молекул сильно зависят от этих факторов. Например, водородная связь ингибирует вращение и колебание, что немедленно проявляется в колебательной и вращательной структуре спектров. В отличие от спектров, полученных при комнатной температуре, спектры, полученные при низких температурах (например, при  $-196^\circ$ , температуре кипения азота), часто обнаруживают высоко специфичную вращательную структуру, вызываемую селективным замораживанием степеней вращательной свободы. Такие эффекты часто используют при биохимических исследованиях с целью получения полной картины (фингерпринта) исследуемого объекта.

На рис. 2.31 представлен пример зависимости колебательной структуры  $n, \pi^*$ -перехода 1, 2, 4, 5-тетразина 1 (небольшой молекулы) от температуры и вида растворителя. Интересно отметить, что обычно в спектре преобладает ограниченное количество нормальных колебаний, даже если теоретически возможно их большее количество (см. главу 10 по ИК спектроскопии). Даже спектры больших молекул, особенно с хромофорными группами, имеющими спектры в видимом диапазоне (хромопротеиды, например), при низких температурах проявляют лишь несколько заметных колебательных полос, что может служить для их анализа.

Теория спектров относительно небольших неорганических молекул, несмотря на ее сложность, хорошо разработана. Но отнесения спектров макро-



**Рис. 2.31.** Колебательная структура  $n, \pi^*$ -перехода 1, 2, 4, 5-тетразина 1 (Mason S.F., J. Chem. Soc., 1959). 1 — спектр в воде при комнатной температуре. 2 — спектр в циклогексане при комнатной температуре (спектр смещен на 6,3 нм к более длинным волнам). 3 — спектр при  $-196^\circ$  С в изопентан-метилциклогексановой матрице. 4 — спектр паров при комнатной температуре

молекул не могут быть проанализированы детально. Тем не менее спектрофотометрический анализ весьма пригождается во многих научных дисциплинах. Они не занимаются точным молекулярным анализом или определением молекулярной структуры, что является задачей спектроскопии, но качественно и количественно идентифицируют вещества, изучают их механизмы реакций, кинетические и проникающие (например, в плазменную мембрану) свойства и роль, которую они играют в таких сложных системах, как живая клетка. Наблюдаемые явления, как мы увидим в последующих главах, часто более важны, даже если их теоретическое объяснение затруднено.

В заключение приведем спектральные характеристики одной из наиболее важных пигментных молекул в биологии, а именно — хлорофилла, обладающего обширной делокализованной  $\pi$ -электронной системой (рис. 2.32 на цветной вклейке).

*Следует отметить, что спектр на рис. 2.32 в целях большей наглядности представлен не совсем корректно: по оси у указаны длины волн, а не энергия.*

Мы можем видеть, что спектр представляет сложную, частично неструктурированную систему полос и плеч. Электронные переходы недостаточно разрешены, но в спектре можно выделить области электронных, колебательных и вращательных переходов. Четко проявляется разница между синглетными и триплетными состояниями, интеркомбинационная конверсия между которыми запрещена не строго. Электронный переход  $S_1 \rightarrow S_0$  не запрещен, так что время жизни  $S_1$ -состояния короткое и находится в наносекундном диапазоне.

*Следует отметить, что для обозначения электронных переходов используются различные номенклатурные системы. Например, в системе Мюлликена электронный переход обозначается как  $V \leftarrow N$ , в системе Платта — как  $V \leftarrow A$ , в системе Каша — как  $n \leftarrow \pi$ , а в групповой теории классов симметрии — как  ${}^1B_{2u} \leftarrow {}^1A_{1g}$ . В данной книге используется исключительно так называемая цифровая индексация, которая просто учитывает состояния в соответствии с диаграммой Яблонского, и принимает во внимание мультиплетность (например,  $S_0 \rightarrow S_3$ ).*

С другой стороны, переход  $T_1 \rightarrow S_0$  запрещен и, следовательно, маловероятен, поэтому время жизни  $T_1$  в 10 000 раз больше, чем типичное возбужденное синглетное состояние. Это имеет большое значение в фотохимии, фотофизике и фотобиологии. Переходы  $S_1 \rightarrow S_0$  и  $T_1 \rightarrow S_0$ , которые происходят при эмиссии света и соответствуют флуоресценции и фосфоресценции, будут рассмотрены более детально в главе 6, посвященной люминесцентной спектроскопии. В следующей главе мы обратимся к теории и практике различных объектов оптической спектроскопии. Основные понятия квантовой механики в приложении к спектроскопии, обсужденные в настоящей главе, будут полезны при дальнейшем рассмотрении применений оптической спектроскопии.

## 2.4. Дополнительная литература

Atkins, P.W. *Molecular Quantum Mechanics: An Introduction to Quantum Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1970.

Blinder, S., Blinder, S.M. *Introduction to Quantum Mechanics, Material Sciences and Biology*, Academic Press, New York, **2004**.

Brand, J. CD. *Lines of Light: The Sources of Dispersive Spectroscopy, 1800–1930*, Gordon & Breach Sciences, New York, **1995**.

Esposito, G. *From Classical to Quantum Mechanics: An Introduction to the Formalism, Foundations and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, **1994**.

French, A.P., Taylor, E.F. *An Introduction to Quantum Physics*, CRC Press, Boca Raton, **2001**.

Griffiths, D.J. *Introduction to Quantum Mechanics*, Prentice Hall College Division, Englewood Cliffs, **2005**.

Hanna, M.W. *Quantum Mechanics in Chemistry*, 3rd edn., Addison Wesley, London, **1981** (a short introduction into quantum mechanics for non-physicists).

Lindon, J.C., et al., eds. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Academic Press, London, Sydney, Tokyo, **1999**.

Modino, A. *Quantum Theory of Matter: A Novel Introduction*, John Wiley & Sons, Chichester, **1996**.

Phillips, A.C. *Introduction to Quantum Mechanics*, John Wiley & Sons, Chichester, **2003**.

Ratner, M.A., Schatz, G.C. *Introduction to Quantum Mechanics in Chemistry*, Prentice Hall, Englewood Hills, **2000**.

Workman J., A. W. Springsteen, eds. *Applied Spectroscopy: A Compact Reference for Practitioners*, Academic Press, New York, **1998**.

# ГЛАВА 3

## ОПТИКА В СПЕКТРОСКОПИИ

Cum deus calculat, fit mundus.

*По божественному расчету был создан мир.*

*Лейбниц*

### 3.1. Введение

В оптическую спектроскопию входят все аналитические методы, основанные на взаимодействии света и материи. На рис. 3.1 представлены различия между абсорбционной спектроскопией, спектроскопией отражения и рассеяния и эмиссионной спектроскопией. Во всех случаях «монокроматор» выделяет свет определенной длины волны из белого спектра подходящего светового источника (лампы), направляя его на исследуемый образец. Затем экспериментально измеряется часть света, либо отраженная образцом (спектроскопия отражения), либо прошедшая через

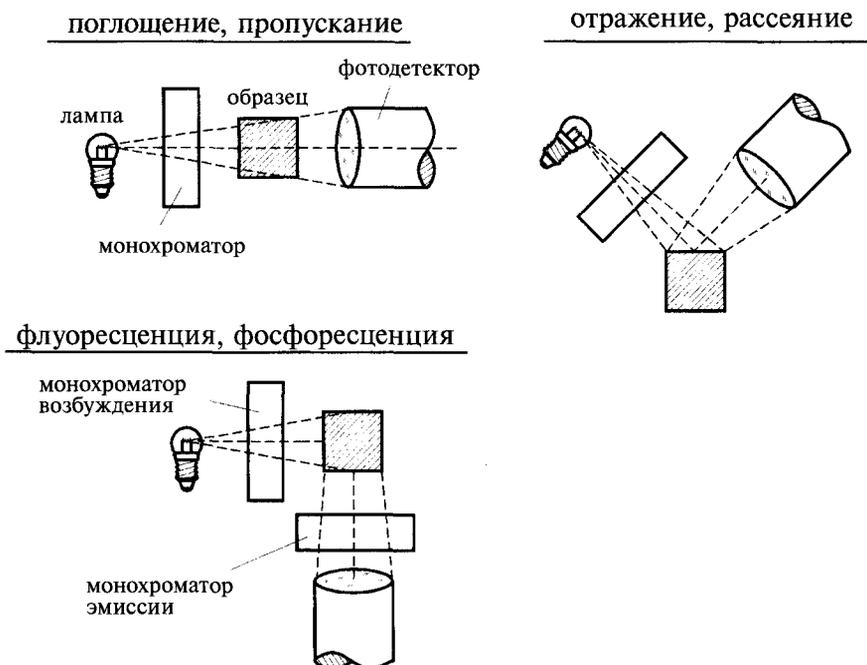


Рис. 3.1. Три принципиальные оптические схемы, используемые при измерении спектров пропускания, отражения и люминесценции

образец (спектроскопия пропускания или поглощения), либо рассеянная определенным образом (спектроскопия рассеяния) (см. рис. 3.1). Как уже упоминалось в главе 2, свет с длиной волны  $\lambda_1$  возбуждает образец, который через определенное время релаксирует и излучает свет другой длины волны  $\lambda_2$  при возвращении в основное состояние (эмиссионная спектроскопия).

*В соответствии с исторически сложившейся терминологией, мы будем называть измерительный прибор спектроскопом, если спектры наблюдаются визуально, спектрометром — в общем случае, когда используется калиброванная шкала для определения длины волны, спектрографом — при регистрации спектра фотопленкой или фотоэлектрическим приспособлением и, наконец, спектрофотометром, если для определения оптических параметров используется монохроматор в сочетании с фотоэлектрическим детектором.*

Основными компонентами всех спектрофотометров являются: источник света, монохроматор, анализируемый образец и фотодетектор, преобразующий полученный световой сигнал в электрический, обрабатываемый затем компьютерной системой. Индивидуальные особенности и настройки определяют спецификацию и рабочий режим спектрофотометра. Прежде чем перейти к деталям, необходимо рассмотреть радиометрические и фотометрические единицы измерения, применяемые во всех оптических измерениях. Символы, применяемые для обозначения фотометрических данных, такие же, как и в радиометрии.

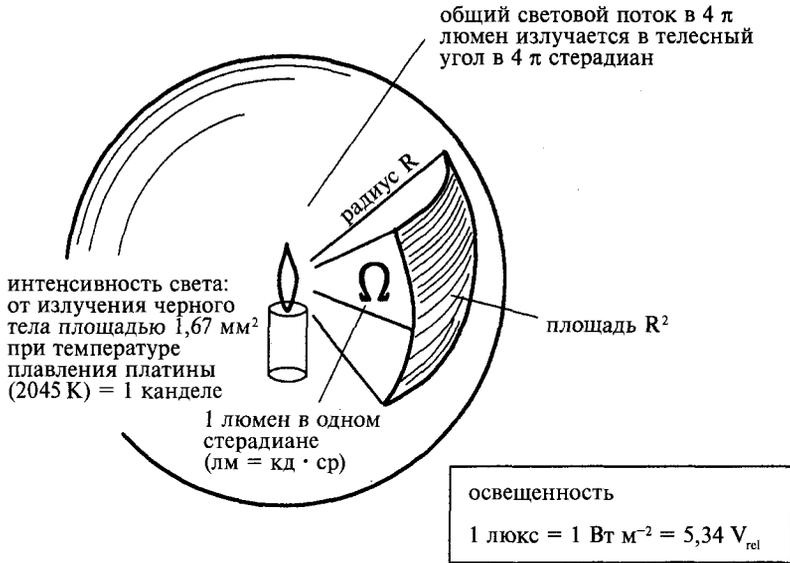
### 3.2. Физические световые единицы

Как уже упоминалось, физические единицы измерения света при использовании их в оптической спектроскопии называются радиометрическими, а единицы измерения света, характеризующие освещенность и связанные с физиологическим распознаванием человеческим глазом, называются фотометрическими (см. главу 4). Световое излучение с точки зрения энергии, можно измерить в эргах, джоулях, ваттах в секунду, калориях, электрон-вольтах и др. единицах. Если рассматривать свет как квантовую сущность, то он измеряется в квантах соответствующей длины волны. Интенсивность излучения (или *поток излучения*  $\Phi_e$ , измеряемый в ваттах (Вт)) определяется как частное от деления энергии на время. Поток излучения, в свою очередь, обычно рассматривается в виде пространственного и спектрального распределения. В этом случае *плотность потока излучения* определяется как

$$E_e = \frac{\Phi_e}{A_2} (\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}) \quad (3.1)$$

где  $A_2$  — площадь, на которую падает излучение.

Один и тот же поток излучения даст большую интенсивность излучения  $I_e$ , если он ограничен меньшим пространственным объемом. Для того, чтобы определить пространственный объем точечного источника излучения,



**Рис. 3.2.** Представление фотометрических световых единиц посредством сферы с радиусом  $R$ . Сила света (*кандела*, *кд*) образует световой поток (*люмен*), который характеризуется плотностью потока света (*люкс*) внутри сферы

используется понятие телесного угла, который измеряется в стерадианах (*ср*). Стерадиан — это угол, который определяется площадью поверхности  $R^2$  сферы с радиусом  $R$  (см. рис. 3.2). Так как площадь сферы равна  $4\pi R^2$ , то полный телесный угол  $\Omega$  равен  $4\pi$  *ср* ( $R = 1$ ), а интенсивность излучения будет равна:

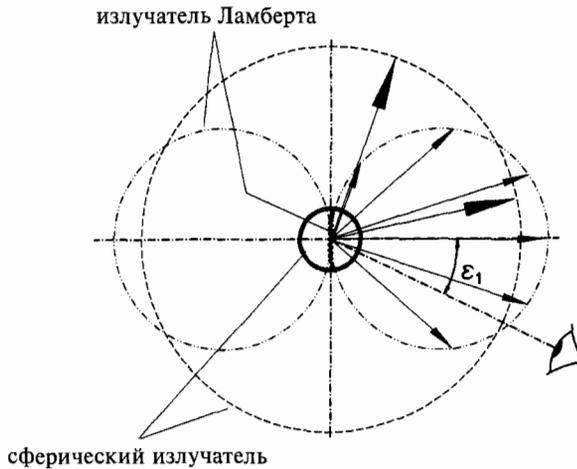
$$I_e = \frac{\Phi_e}{\Omega} (\text{Вт} \cdot \text{ср}^{-1}) \quad (3.2)$$

Плоский источник света площадью  $A_1$ , интенсивность излучения которого равна  $I_e$ , кажется более ярким, если излучает на меньшую площадь. Если плоский источник света наблюдать не под прямым углом к поверхности, а под углом  $\epsilon$  к нормали, то экспериментально находится, что интенсивность излучения будет пропорциональна косинусу  $\epsilon$ . Важна только проекция площади  $A_1$  на  $\cos \epsilon$ , что определяется законом Ламберта:

$$L_e = \frac{I_e}{A_1 \times \cos \epsilon_1} (\text{Вт} \cdot \text{ср}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}) \quad (3.3)$$

где  $L_e$  — яркость излучения.

При замене плоскости светоизлучающей поверхности  $A_1$  светящимся цилиндром, расположенным перпендикулярно плоскости бумаги, яркость излучения не будет зависеть от  $\epsilon$  (сферический излучатель на рис. 3.3). Отсюда ясно, что нить лампы накаливания будет сферическим излучателем



**Рис. 3.3.** Яркость излучения  $L_e$  источника света площадью  $A_1$  падает пропорционально косинусу угла наблюдения  $\epsilon$

в плоскости, перпендикулярной оси нити накаливания, а в плоскости оси нити накаливания будет иметь форму излучателя Ламберта.

Чтобы определить спектральные составляющие света, спектр делится на «элементарные» отрезки  $\Delta\lambda$  (например, на интервалы в 1 нм). Отсюда спектральная плотность светового потока будет равна:

$$\Phi_e(\lambda) = \frac{d\Phi_e}{d\lambda} \text{ (Вт} \cdot \text{нм}^{-1}\text{)} \quad (3.4)$$

Суммарный поток излучения  $\Phi_e$  определяется интегрированием по всему спектральному диапазону от  $\lambda_1$  до  $\lambda_2$  излучаемого света:

$$\Phi_e = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Phi_e(\lambda) d\lambda \quad (3.5)$$

Приведенные ниже формулы демонстрируют простое преобразование различных единиц измерения света. Например, квант света (фотон) с длиной волны 600 нм (оранжевая) будет равен:

$$E = \frac{ch}{\lambda} = \frac{(6,6 \times 10^{-27} \text{ эрг} \cdot \text{с})(3 \times 10^{12} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1})}{6 \times 10^{-7} \text{ см}} = 3,3 \times 10^{-12} \text{ эрг}$$

Если длина волны указана в нм, энергия кванта будет равна:

$$E = \frac{2 \times 10^{-9}}{\lambda} \text{ эрг}$$

$$E = \frac{2 \times 10^{-16}}{\lambda} \text{ Дж} \quad (3.6)$$

$$E = \frac{0,48 \times 10^{-16}}{\lambda} \text{ кал}$$

$$E = \frac{1240}{\lambda} \text{ эВ}$$

Часто требуется знать энергию одного моля ( $6,022 \times 10^{23}$ ) квантов света, известную как 1 *Эйнштейн* ( $\mathcal{E}$ ):

$$\mathcal{E} = \frac{12 \times 10^{14}}{\lambda} \text{ эрг} = \frac{285 \times 10^5}{\lambda} \text{ кал} \quad (3.7)$$

В некоторых случаях требуется знать количество квантов (квантовую плотность), а не энергию кванта. Приведенные ниже формулы демонстрируют такие взаимные преобразования, где длина волны также указана в нм:

$$1 \mathcal{E} \cdot \text{м}^{-2} \text{с}^{-1} = \frac{12 \times 10^{14}}{\lambda} \text{ эрг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1} = \frac{12 \times 10^7}{\lambda} \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2} \quad (3.8)$$

и

$$1 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2} = 10^7 \text{ эрг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1} = 8,3 \times 10^{-9} \times \lambda \mathcal{E} \cdot \text{м}^{-2} \text{с}^{-1} \quad (3.9)$$

В этом контексте можно привести несколько интересных данных о естественном излучении Солнца, которое попадает на поверхность Земли, связанных как с фотофизиологической зависимостью животных, растений и человека от этого источника энергии, так и с созданием солнечных батарей в качестве альтернативных источников энергии. Суммарное солнечное излучение состоит из прямого солнечного излучения и косвенного, образующегося в атмосфере в результате различных процессов рассеяния. Поверхностная плотность потока суммарного солнечного излучения, если Солнце расположено в зените и нет помех в атмосфере, равна  $1\,353 \text{ Вт/м}^2$  (солнечная постоянная). В действительности максимальная измеренная плотность потока суммарного солнечного излучения при чистом небе составляет  $1\,120 \text{ Вт/м}^2$ . А при облачности она составляет  $100 \text{ Вт/м}^2$  (50% — прямой свет, 50% — рассеянный). Удивителен и до сих пор не объяснен тот факт, что полностью облачное небо имеет ожидаемую цветовую температуру между  $4\,000$  и  $6\,000 \text{ К}$  (температура поверхности Солнца), но голубое, ясное небо дает гораздо большие значения порядка  $15\,000$ — $30\,000 \text{ К}$  (см. главу 3.4.1). Вероятной причиной этого является то, что температура короны Солнца выше температуры его поверхности.

### 3.3. Фотометрические световые единицы

Фотометрические единицы измерения субъективны и зависят от спектральной чувствительности глаза человека. Обычно они применяются при обозначении освещенности в окружающей человека среде (освещенность поме-

щения, освещенность при фотографировании и т. п.). Хотя профессионалы в спектроскопии, фотобиологии и химии стараются избегать применения физиологических единиц и используют физические единицы, т.е. объективные световые единицы, даже сегодня в некоторых научных публикациях мы имеем дело с физиологическими единицами (например, люксами). Большое число радиометрических и фотометрических единиц сбивает с толку, поэтому их возможные соотношения приведены в таблице 3.1. Зная спектральную чувствительность глаза человека, можно получить приблизительные формулы преобразования одних единиц измерения в другие.

Табл. 3.1. Основные радиометрические единицы (фотометрические единицы измерения)

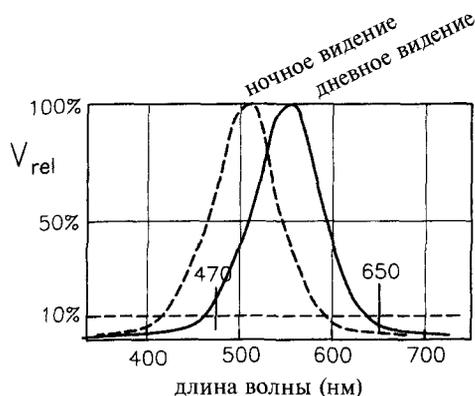
Параметр	Условное обозначение	Определение	Единица измерения	Описание
Поток излучения Скорость потока излучения (Световой поток, лм)	$\Phi_e$ ( $\Phi_v$ )	$dQ_e/dt$	Вт	Мощность $dQ_e$ , излучаемая источником света в пространство в единицу времени $dt$
Интенсивность излучения (Сила света 1 кд = 1 лм/ср)	$I_e$	$d\Phi_e/d\Omega$	Вт ср <sup>-1</sup>	Мощность $d\Phi_e$ , излучаемая источником света в единицу телесного угла $d\Omega$
Плотность потока излучения, падающего на поверхность (Плотность светового потока 1 лк = 1 лм/м <sup>2</sup> )	$E_e$	$d\Phi_e/dA_2$	Вт м <sup>-2</sup>	Мощность $d\Phi_e$ , падающая на единицу площади $dA_2$ детектора
Яркость излучения (Яркость, кд/м <sup>2</sup> )	$L_e$	$\frac{dI_e}{d(A_1 \cos \epsilon_1)}$	Вт ср <sup>-1</sup> м <sup>-2</sup>	Мощность $d\Phi_e$ , излучаемая единицей поверхности $dA_1$ излучателя Ламберта в единицу телесного угла $d\Omega$
Энергия спектрального излучения (Спектральный световой поток, лм нм <sup>-1</sup> )	$\Phi_e(\lambda)$	$\frac{d\Phi_e}{d\lambda}$	Вт нм	Мощность $d\Phi_e$ , излучаемая в определенном интервале длин волн $d\lambda$

Исторически кандела ассоциируется с «мощностью излучения» свечи. В настоящее время кандела — это мощность излучения черного тела пло-

щадью  $1,67 \text{ мм}^2$  при температуре плавления платины ( $2\,045 \text{ К}$ ). Кандела излучает во все окружающее пространство ( $4\pi$  стерадиан)  $4\pi$  люменов. В результате плотность светового потока на поверхности сферы с радиусом  $1 \text{ м}$  вокруг точечного источника света составляет  $1 \text{ лк}$ . Эта единица измерения характеризует «то, что мы действительно видим», т.е. зависит от спектральной чувствительности глаза, от восприятия глазом различных цветов. Например, если глаз адаптирован к дневному свету, то чувствительность глаза имеет одну характеристику, а если глаз адаптирован к темноте, то характеристика его чувствительности смещается на  $50 \text{ нм}$  к более коротким волнам, как показано на рис. 3.4. Таким образом, для корректного преобразования фотометрических единиц измерения в физические необходимо использовать кривые чувствительности глаза. Их максимумы размещены в желто-зеленом спектральном диапазоне. При монохроматическом свете чувствительность глаза  $V_{rel}$  легко определяется, а по ней можно сделать корректный перевод фотометрической единицы в физическую:

$$1 \text{ лк} = 1,61 \times 10^{-7} \times V_{rel} (\text{Вт} / \text{см}^2) \quad (3.10)$$

Однако такое преобразование затруднено, если используется широкополосный свет или «белый свет». Тогда нужно интегрировать чувствительность глаза по всем используемым длинам волн и знать точное спектральное распределение. Различное распределение энергии по длинам волн является причиной различного потока излучения на разных длинах волн. Кроме того, различное распределение энергии по длинам волн является причиной различных фотофизиологических и фотохимических реакций и ответа на них. Строго говоря, в научных исследованиях и измерениях очень важно знать точное спектральное распределение энергии источника света.



**Рис. 3.4.** Спектральная чувствительность  $V_{rel}$  глаза человека при дневном видении (фотопическое, т.е. цветное, видение; колбочки<sup>1</sup>, сплошная линия) и при ночном видении (скотопическое, т.е. черное и белое, видение; палочки<sup>1</sup>, пунктирная линия)

<sup>1</sup> Прим. редактора: элементы сетчатки глаза

### 3.4. Световые источники

Световой источник с определенной эффективностью преобразует подаваемую на него энергию, обычно электрическую, в видимый свет (см. рис. 3.5). Различают два типа основных световых источников. Первый тип представляет из себя так называемый тепловой излучатель, который разогревают до тех пор, пока он, в соответствии с законом Планка, не начинает излучать свет. Лампы накаливания являются типичными тепловыми излучателями. Второй тип источников света — это так называемые люминесцентные излучатели, принцип действия которых основан на возбуждении электронов атомов, которые при релаксации излучают свет. Основными люминесцентными источниками света, применяемыми в спектроскопии, являются газоразрядные лампы, светоизлучающие диоды (СИД) и лазеры. Важнейшей характеристикой световых источников является их спектральная энергия излучения  $\Phi_e$ . Следует различать источники с непрерывным спектром излучения, которые характеризуются распределением энергии в широком спектральном диапазоне, и линейные излучатели, энергия которых сосредоточена только в одной или нескольких разделенных линиях спектра. Квантовая эффективность светового источника определяется отношением мощности потока излучения к приложенной мощности:

$$\eta = \frac{\Phi_s}{P}$$

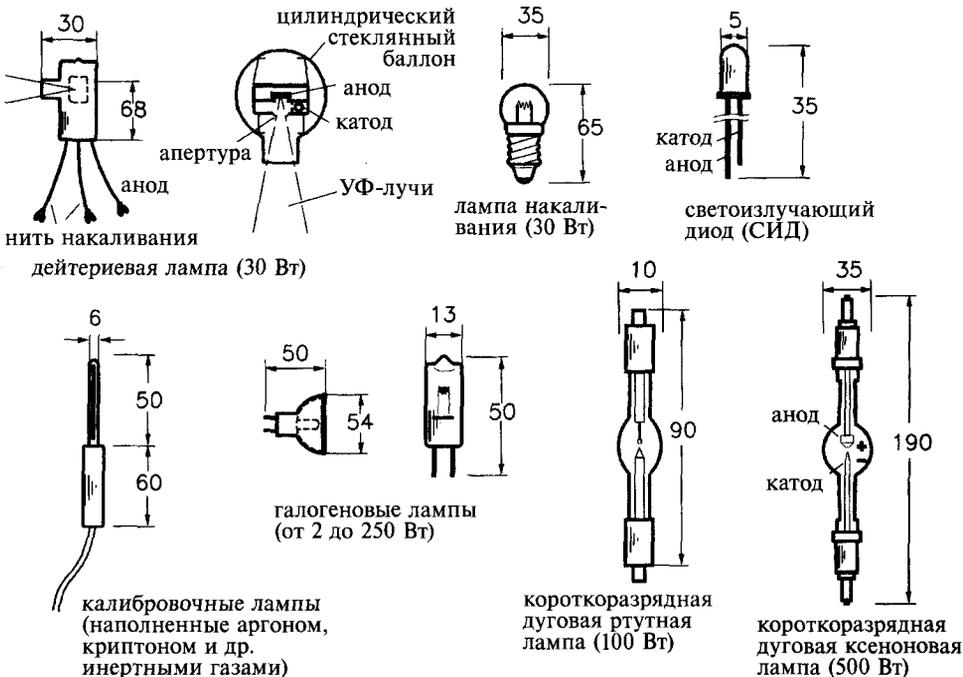


Рис. 3.5. Различные виды ламп, используемых в оптической спектроскопии. Их геометрические размеры даны в миллиметрах

## 3.4.1. Излучение черного тела

В соответствии с законом Планка, каждое идеальное черное тело (т.е. такое тело, которое поглощает все падающие на него кванты) излучает электромагнитное излучение в диапазоне  $d\lambda$ :

$$L_e d\lambda = \left[ \frac{hc^2}{\lambda^5 (e^{\lambda kT} - 1)} \right] \times \Omega_0 d\lambda \quad (3.11)$$

где  $h$  — постоянная Планка,  $L_e(\lambda)$  — спектральное излучение,  $c$  — скорость света,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура в градусах Кельвина (К),  $\Omega_0$  — телесный угол в 1 ср. Все нечерные тепловые излучатели называются «серыми». Они характеризуются аналогичным черному телу спектральным распределением энергии в излучаемом свете при меньшей суммарной энергии излучения. На рис. 3.6 представлены рассчитанные по уравнению 3.11 кривые спектрального распределения энергии в излучаемом черным телом свете при температурах от 3 000 до 7 000 К. С увеличением температуры мощность излучения быстро увеличивается, а максимум излучения смещается к более коротким волнам. Это явление описывает закон смещения Вина (первая производная уравнения 3.11):

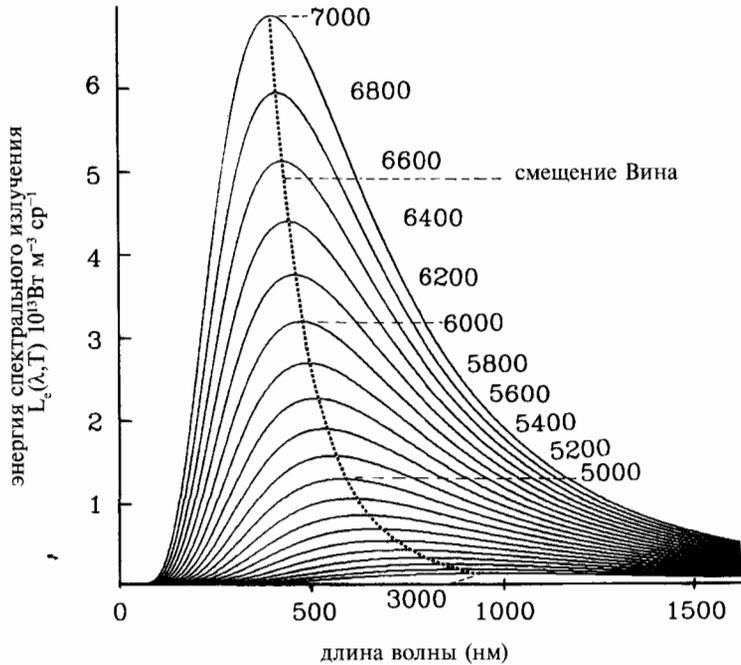
$$\lambda_{\max} = \frac{2,8978 \times 10^6}{T} (\text{нм}) \quad (3.12)$$

Максимальная энергия солнечного излучения приходится на длину волны 500 нм, а максимум чувствительности глаза человека при дневном (фотопическом) видении находится на длине волны 555 нм. Часто выдвигаемый в связи с этим аргумент заключается в том, что эта явная согласованность отражает филогенетическую адаптацию глазных пигментов к солнечному спектру и наиболее эффективному восприятию дневного света. Однако это не так. Оказывается, фоторецепторы глаза реагируют не на энергию, соответствующую определенной длине волны, а на количество квантов. Фоторецепторы глаза являются счетчиками квантов, а не детекторами энергии. Следовательно, глаз реагирует только на поглощенные кванты. Согласно этому предположению, для глаза человека максимум солнечного спектра находится на длине волны 640 нм. Существует еще одно объяснение этого разногласия. В течение эволюции, когда происходила специализация пигментов, солнце было значительно холоднее, и максимум эмиссии квантов приходился на 640 нм. Однако это только гипотеза.



Людвиг Больцман  
(1844—1906)

Суммарная мощность излучения любого теплового излучателя при данной температуре описыва-



**Рис. 3.6.** Плотность потока излучения черного тела в зависимости от абсолютной температуры (К), рассчитанная по уравнению Планка (см. уравнение 3.11). Закон Вина описывает красное смещение максимума, а закон Стефана — Больцмана описывает уменьшение площади под кривыми Планка с уменьшением температуры

ется законом Стефана — Больцмана, который получен интегрированием уравнения Планка 3.11 по всему диапазону длин волн:

$$L_e = \frac{\sigma}{\pi} \times T^4 \times \frac{1}{\Omega_0} (\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1}) \quad (3.13)$$

Интенсивность излучения  $L_e$  и эффективность видимого излучения достигается увеличением, насколько это возможно, температуры лампы накаливания. Каждой отдельной температуре черного тела соответствует только одно специфическое спектральное распределение энергии, в соответствии с законом Планка. Таким образом, для определения спектрального распределения был введен термин «цветовая температура». Он количественно описывает спектральное распределение энергии тепловых и люминесцентных излучателей.

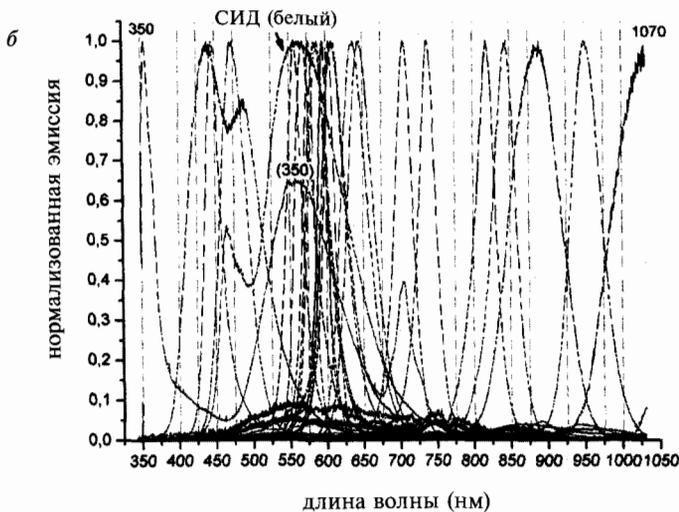
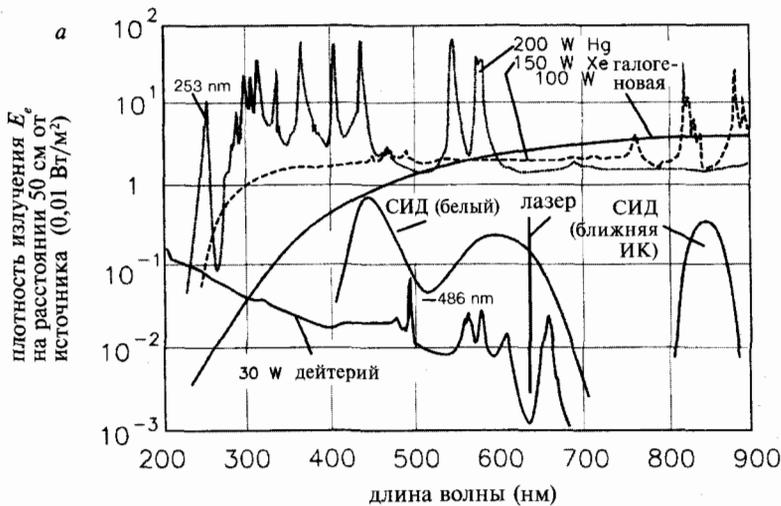
### 3.4.2. Лампы накаливания

Лампы накаливания широко применяются в оптической спектроскопии благодаря их простоте, невысокой стоимости и несложной подаче питания. Двойная скрученная вольфрамовая проволока (точка плавления составляет

3 653 К), помещенная в стеклянный баллон с откачанным воздухом, нагревается электрическим током (см. рис. 3.5). Следовые количества вольфрама всегда испаряются, что в конечном итоге приводит к затемнению стекла лампы. Для снижения затемнения лампу наполняют инертным газом (аргоном, криптоном, ксеноном; температура нити накаливания  $\sim 2\,500$  К). Значительное повышение качества ламп накаливания было достигнуто при добавлении в качестве газа-наполнителя галогеновых газов (обычно бромидов). При циклическом процессе испарения атомы вольфрама реагируют с бромидом, соединение оседает на нить накаливания и распадается, пополняя нить накаливания вольфрамом. По этой технологии можно изготавливать миниатюрные, короткие и компактные нити накаливания с увеличенной температурой нагрева нити до 3 450 К. Размеры лампы должны быть небольшие, чтобы процесс регенерации нити накаливания проходил эффективно, что дает дополнительные преимущества в оптическом применении галогеновых ламп накаливания. Мощность излучения и высокая эффективность в видимом спектре излучения (спектр представлен на рис. 3.7) галогеновых ламп полностью удовлетворяет требованиям оптической спектроскопии к точечному источнику света. Особенно эффективны лампы со встроенным дихроическим отражателем, пропускающим в ближней ИК области, что приводит к меньшему фотолитическому разрушению образца (см. рис. 3.5).

### 3.4.3. Газоразрядные лампы

Электрические разряды применяются во многих типах источников света (см. рис. 3.5). Если к инертному газу, например неону, содержащему следовые количества ртути, подвести высокое напряжение, то свободные электроны будут ускоряться до более высокой кинетической энергии, способной ионизировать газ. Последующая рекомбинация приведет к возбуждению атомов инертного газа. Эта энергия будет передаваться атомам ртути, которые начнут излучать свет. Это принцип действия ртутных газоразрядных ламп. Спектральные характеристики таких источников света в значительной степени зависят от давления, т.е. различных процессов рекомбинации. Например, лампы с низким давлением газа, приблизительно 100 Па, излучают преимущественно свет с длиной волны 253,7 нм; лампы со средним давлением газа, приблизительно  $10^5$  Па, требующие более высоких электрических токов, излучают гораздо большее число линий, а лампы с высоким давлением газа, приблизительно  $3 \cdot 10^6$  Па, и малым расстоянием между электродами излучают свет в диапазоне от ультрафиолета до инфракрасного спектра (см. рис. 3.7). Однако поток излучения таких ламп в красном, зеленом и синем спектральном диапазоне относительно небольшой. Для получения излучения в этих спектральных диапазонах лучше использовать ксеноновые лампы высокого давления с цветовой температурой около 6 000 К (получается свет, аналогичный дневному). Эти лампы не дают энергии спектрального излучения, даваемого ртутными лампами в УФ области, но их спектр в видимой области гораздо более «сглажен», что лучше подходит для спектрального анализа с непрерывной записью спек-



**Рис. 3.7.** *а* — Плотность потока излучения  $E_e$  в логарифмической шкале некоторых источников света в зависимости от длины волны. *б* — Нормализованная интенсивность излучения различных светоизлучающих диодов в зависимости от длины волны. Светодиоды могут излучать в видимой, ближней ИК и УФ областях спектра

тра. Кроме того, спектральное распределение энергии ксеноновых ламп в видимом диапазоне выше, чем в ртутных лампах, даже если присутствуют некоторые сильные (и, значит, интерферирующие) спектральные линии в голубой и ближней ИК области. Особенно широко ксеноновые лампы используются в флуориметрии (гл. 6).

Лучшим источником «непрерывного света» в УФ области являются водородные лампы (см. рис. 3.5), излучение света в которых зависит от рекомбинации  $2H \rightarrow H_2$  на холодной поверхности (см. рис. 3.5 и 3.7). В кварцевом

баллоне размещены вольфрамовые анод и катод. Предварительно они нагреваются до  $100^\circ\text{C}$ , а затем начинают светиться при подаче 220 В. Потери энергии на теплопроводность относительно высоки, следовательно, энергия спектрального излучения будет небольшая. Теплопроводность значительно сократится, если применить дейтерий вместо водорода. Его удвоенная атомная масса позволит увеличить энергию излучения на 30%. Максимум излучения дейтериевых ламп приходится на длину волны 220 нм, а водородных — на 290 нм. Единственный пик для атома водорода ( $\text{H}_\beta$  серии Бальмера, см. рис. 2.6) приходится точно на 486,12 нм, а дейтерия — на 485,99 нм, что можно использовать для калибровки длин волн.

Миниатюрные карандашного типа газоразрядные лампы, заполненные высокоочищенным газом (аргоном, гелием, криптоном, неоном, ксеноном) или парами ртути, с соответствующими источниками питания и эталонными спектрами предлагаются различными производителями в качестве калибровочных ламп для всей УФ-видимой области спектра. Помимо этого, ртутные калибровочные лампы можно использовать в качестве недорогого, но превосходящего светового источника в УФ (254 нм) для возбуждения флуоресценции. На рис. 3.8 представлены нормализованные эмиссионные спектральные линии калибровочной ртутно-аргоновой лампы низкого давления (фирма «ORIEL», № 6035). А на рис. 3.9 представлен спектр излучения калибровочной криптоновой лампы, полученный сканированием при ширине щели 2 нм (логарифмическая шкала по оси ординат).

В лабораторных спектрометрах используются в основном два типа ламп: дейтериевые лампы для УФ области и галогеновые лампы для видимой — ближней ИК области (320—2 500 нм). Автоматическое переключение этих ламп требует значительных опто-механических затрат. Этого не требуется с так называемыми *вседиалозонными* лампами фирмы «Hamamatsu»: свет от галогеновой лампы направляется сквозь экран и апертуру дейтериевой лампы таким образом, что в результате получается сплошной эмиссионный спектр во всем диапазоне длин волн от УФ до ближней ИК.

Импульсные лампы, которые используются в фотовспышках, также являются газоразрядными, но работают в импульсном режиме. Они

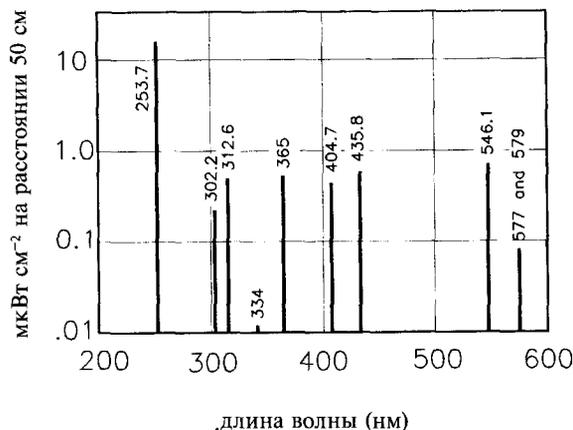
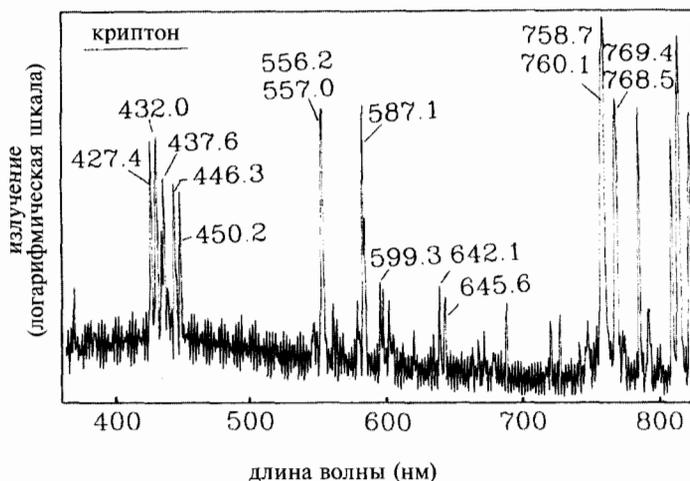


Рис. 3.8. Нормализованный спектр ртутной калибровочной лампы



**Рис. 3.9.** Спектр ксеноновой калибровочной лампы с указанием основных длин волн, полученных сканированием с разрешением 2 нм (логарифмическая шкала ординат)

были изобретены в 30-х годах прошлого века Гарольдом Е. Эдгертоном. Обычно они наполняются ксеноном, так как этот газ наиболее эффективно преобразует электрическую энергию в световую (для ближней ИК предпочтительнее криптон). Два противоположных электрода соединены с низковольтными конденсаторами большой емкости. В неионизованном состоянии электрическое сопротивление лампы кратно 10 МОм. На зажигающем электроде на внешней поверхности лампового баллона генерируют требуемое напряжение пробоя порядка 10 кВ. При этом газ ионизируется, сопротивление падает до уровня мОм, и в зависимости от конкретной электроники возникает вспышка длительностью от 1 мкс до 50 мс. Максимальная мощность вспышки может составлять от кВт до МВт. Колбы таких ламп изготавливаются из стекла или кварца. Спектральный диапазон импульсных ламп, наполненных ксеноном, составляет от 200 до более чем 1 100 нм (сравните с рис. 3.7). Колбы импульсных ламп обычно имеют линейную или полусферическую форму. Последние более предпочтительны (точечной формы, короткоимпульсные, высокая скорость чередования импульсов и длительное время жизни), что особенно важно при обнаружении триплетных состояний и свободных радикалов.

#### 3.4.4. Светоизлучающие диоды

Светоизлучающие диоды (полупроводниковые люминесцентные диоды — СИД) — твердотельные приспособления. Рекомбинация электронов и «дырок» генерирует эмиссию излучения, длина волны которой зависит от материала полупроводника и находится в полупроводниковой полосе, простирающейся от УФ А (350 нм) до ближней ИК области (1 550 нм) (см. рис. 3.7., б). Несмотря на то, что излучательная способность и КПД СИДов ниже, чем ламп накаливания аналогичной мощности, они имеют

ряд преимуществ при использовании их в спектроскопии. Они гораздо долговечней (100 000 ч), дешевле, дают узкую спектральную ширину эмиссии, и их излучение можно модулировать по частоте вплоть до наносекундной области. С увеличением температуры кривая спектрального излучения батохромно<sup>1</sup> сдвигается от 0,1 до 0,3 нм К<sup>-1</sup>.

В СИДах зеленого света изменение интенсивности едва распознается глазом человека, так как пиковая длина волны близка к максимуму кривой  $V - \lambda$  (рис. 3.4). А изменение интенсивности излучения в СИДах красного и синего света при изменении температуры характеризуется изменением цвета излучения, так как их пиковые значения длины волны локализованы на краях кривой  $V - \lambda$ . Так называемые «белые» СИДы с голубоватым оттенком отличаются сравнительно высокой мощностью излучения. На самом деле это СИДы синего диапазона, помещенные в корпус, покрытый флуоресцирующим белым материалом, подобным обычным люминесцентным трубкам. Однако их спектр излучения простирается только до 700 нм (см. рис. 3.7). Следует отметить, что излучение некоторых СИДов содержит паразитное излучение.

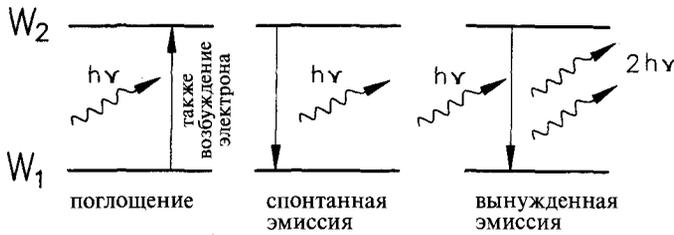
### 3.4.5. Лазеры

Впервые изготовленные в 1960 г., лазеры (light amplification by stimulated emission of radiation — усиление света, стимулированное эмиссией излучения) получили широкое применение в различных областях науки и производства в качестве источников света благодаря своим уникальным свойствам:

- лазеры обладают высокой когерентностью (пространственной и временной), что позволяет их использовать в качестве идеального точечного источника света с узким коллимированным (нерасходящимся) лучом света;
- излучение лазера — монохроматическое, причем длину волны излучения можно перестраивать;
- лазерный луч можно сфокусировать до субмикронных размеров. Это позволяет проводить микроспектрофотометрические эксперименты с высоким разрешением. Кроме того, передачу такого луча можно осуществлять с помощью очень тонкого стеклянного оптоволокна.
- в специальных опто-акустических методах исследования используются сверхкороткие (в фемтосекундной временной шкале) импульсы лазерного света с высокой скоростью повторения импульсов.

Для получения лазерного излучения используются твердые, жидкие и газообразные материалы. Длина волны лазерного излучения может быть любого спектрального диапазона — от ультрафиолетового до инфракрасного. Излучение лазера может быть либо непрерывным («cw» — от continuous wave = непрерывная волна), что характерно для большинства газовых лазеров: гелиевых, аргоновых, неоновых или на диоксиде углерода, либо импульсным. Принцип действия лазера основывается как на фотофизических законах, так и на законах оптики. Основным требованием получения

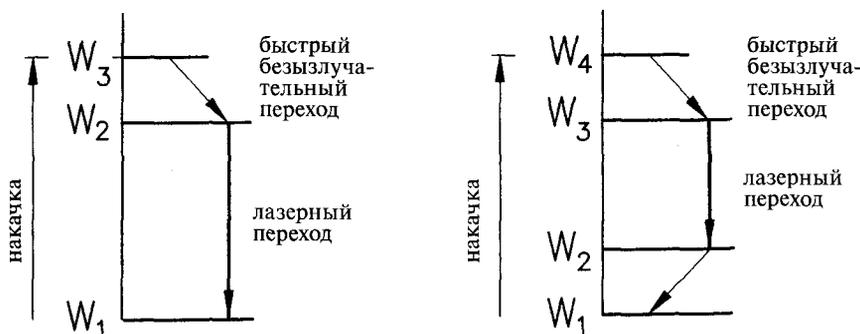
<sup>1</sup> Прим. редактора: т.е. в сторону более длинных волн



**Рис. 3.10.** Сравнение поглощения/возбуждения, спонтанной и вынужденной (стимулированной) эмиссии между двумя электронными состояниями  $W_1$  и  $W_2$

лазерного излучения является обеспечение длительного времени жизни возбужденного электронного состояния атомов или молекул, что достигается инверсной заселенностью уровней, благодаря чему большинство частиц остаются в своем возбужденном ( $W_2$ ), а не основном ( $W_1$ ), состоянии (см. рис. 3.10). Таким образом, в дополнение к «нормальному» абсорбционному переходу может быть инициирован обратный переход из возбужденного состояния в основное светом с энергией  $h\nu$  (в пределах естественного «длительного» времени жизни порядка  $10^{-3}$  с, в отличие от  $10^{-9}$  с спонтанной эмиссии), что приводит к получению двух квантов энергии  $h\nu$ .

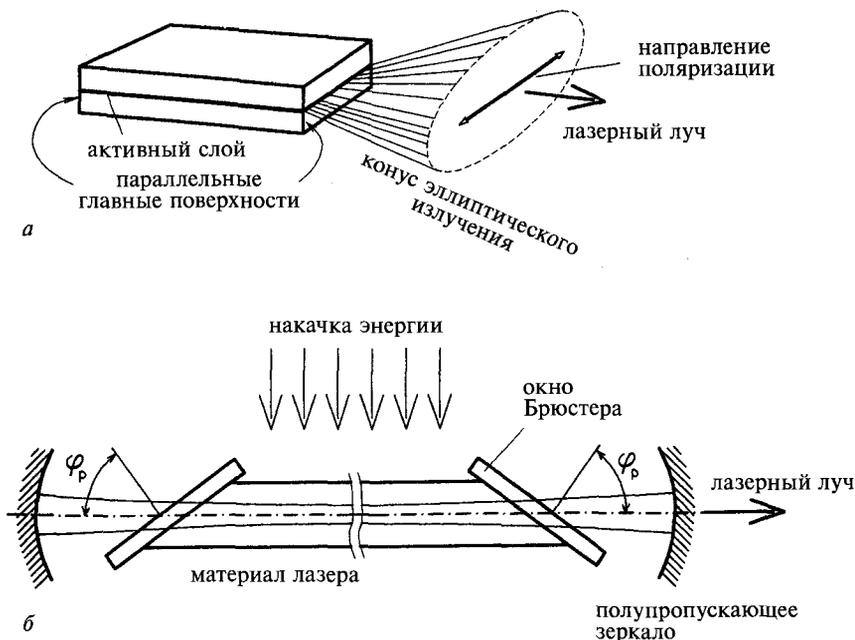
В трехуровневых лазерах переход в активное состояние  $W_2$  достигается посредством внутренней конверсии с более высокого энергетического уровня  $W_3$  (см. рис. 3.11); вынужденный переход с уровня  $W_1$  на уровень  $W_3$  называется «накачкой». Примером лазера такого типа является рубиновый лазер, в котором активным материалом являются ионы хрома Cr, внедренные в  $Al_2O_3$ . Такой лазер излучает красный свет с длиной волны 694,2 нм. Примером четырехуровневых лазеров являются хорошо известные неодимово-YAG лазеры (основная длина волны излучения 1 064 нм), в которых ионы Nd внедрены в  $Y_3Al_5O_{12}$  (алюмо-иттриевый гранат). Они



**Рис. 3.11.** Сравнение принципов работы трех- и четырехуровневых лазеров. Трехуровневый лазер: накачивание энергии с  $W_1$  до  $W_3$  состояния завершается возвращением на уровень  $W_1$  через метастабильное состояние  $W_2$ , что определяет стимулированный лазерный переход  $W_2 \rightarrow W_1$ . Четырехуровневый лазер: получение инверсии заселения получить гораздо легче ввиду того, что до вынужденной эмиссии состояние  $W_2$  совершенно пусто

характеризуются тем, что основное состояние  $W_1$  в них отличается от наиболее низкого лазерного состояния  $W_2$ . Уровень  $W_2$  почти пустой, что позволяет инверсию заселенности с  $W_3$  на  $W_2$  с меньшей мощностью накачки. Неодим-YAG лазеры могут функционировать в непрерывном режиме (cw), при этом в качестве светового источника накачки используются йодид-вольфрамовые лампы. Максимальная мощность света данных лазеров составляет 100 Вт, а их КПД = 2%.

Чтобы два фотона, возникшие в результате стимулированного перехода «сверху — вниз» инициировали «цепную реакцию», материал лазера, лазерный излучатель, помещают в оптический резонатор, образованный зеркалами на обоих концах камеры (см. рис. 3.12, б, «конфокальный резонатор»). Это обеспечивает многократное прохождение излучения через материал лазера. В одном из зеркал делается полупрозрачное окно, через которое луч лазера выходит из системы. Обычно это окно наклонено под «углом Брюстера»  $\phi_p$  (см. рис. 3.16 и главу 3.5.2), что позволяет свету колебаться в плос-



**Рис. 3.12.** а — Схема твердотельного диодного лазера, который функционирует как светоизлучающий диод. Параллельные плоскости действуют как зеркала резонатора. Прямоугольная поверхность тонкого полупроводника излучает расходящийся эллиптически поляризованный пучок света. б — Схема типичного лазера, объем которого заполнен активным материалом и ограничен окнами, расположенными под углом Брюстера  $\phi_p$ . Вектор лазерного света, колеблющегося на входной плоскости, проходит без потерь, тогда как перпендикулярно колеблющаяся компонента блокирована: лазерный свет сильно поляризован. Конфокальный резонатор с выпуклыми зеркалами относительно прост в изготовлении, стабилен и легко юстируется

кости падения и покидать резонатор без потерь, сохраняя таким образом процесс эмиттирования лазерного излучения. Другая, перпендикулярно колеблющаяся компонента несет большие потери. По всей длине  $L$  резонатора в различных аксиальных модах образуются стоячие волны, причем длина волны лазерного излучения  $\lambda$  и длина резонатора должны соответствовать уравнению:

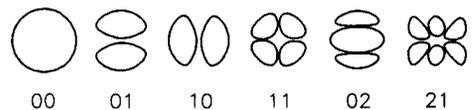
$$L = \frac{m\lambda}{2n}$$

где  $m$  — порядок рассеяния,  $n$  — коэффициент отражения. Это уравнение выполнимо для различных  $\lambda$ . В узловых плоскостях в  $x$ - и  $y$ -направлениях образуются различные поперечные электромагнитные моды (*TEM* — transverse electromagnetic modes, поперечные формы колебаний) (см. рис. 3.13).

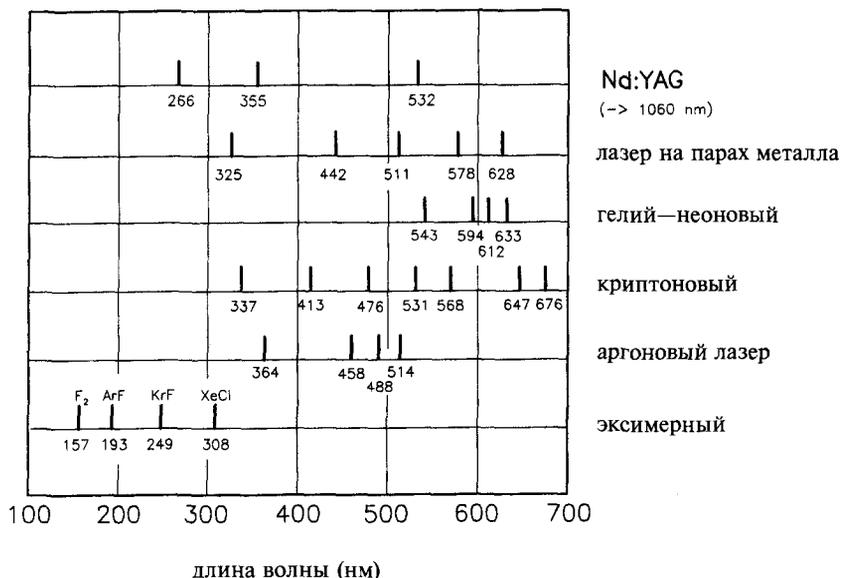
В высокочувствительных методах измерения чрезвычайно малых поглощений (см. главу 5), таких как при измерении специфических обертонов в ИК области (см. главу 10)), используется способ размещения образца (твердого, жидкого или газообразного) в специальной кювете с брестеровыми окнами непосредственно в лазерный резонатор. Даже незначительные потери света вследствие поглощения приводят к гигантским изменениям в выходящем луче. Предпринимают специальные усилия, чтобы предохранить фотодетектор от засветки высокоинтенсивным лазерным лучом.

Длины волн излучения лазеров, применяемых в оптической спектроскопии, приведены на рис. 3.14. К этим лазерам следует добавить азотный лазер с основной длиной волны излучения 337 нм, а также перестраиваемые по длинам волн лазеры на красителях (их диапазон от 350 до 1 100 нм). Большинство твердотельных лазеров функционируют в ближнем инфракрасном диапазоне. В оптической спектроскопии наиболее обычен Nd:YAG лазер с удвоением, утроением и учетверением частоты. Средняя мощность типичных лазеров составляет от 1 мВт до нескольких Вт. Эксимерный и азотный лазеры являются импульсными с длительностью импульсов от 1 до 20 нс и скоростью повторения излучений (частотой) до 500 Гц. Интенсивность излучения импульсных лазеров выше, чем лазеров с непрерывным излучением и может быть регулируема колебанием резонатора («Q-перестраиваемые»). Все остальные, приведенные на рис. 3.14 лазеры работают в непрерывном режиме.

Во многих отношениях в настоящее время классические лазеры в оптической спектроскопии вытесняют полупроводниковые или диодные лазеры. Первый прототип такого лазера был создан в 1970 г. (см. рис. 3.12, а). Размеры диодных лазеров лежат в миллиметровом диапазоне, они недорогие, а их излучение может достигать гигагерцового диапазона. Принцип действия таких лазеров аналогичен действию светоизлучающего диода



**Рис. 3.13.** Схемы различных режимов поперечных электромагнитных колебаний (т.е. распределений поля — *TEM*) в излучении лазеров. Индексами показано количество узловых плоскостей в  $x$ - и  $y$ -направлениях



**Рис. 3.14.** Длины волн лазеров, применяемых в оптической спектроскопии. Основная длина волны хорошо известного Nd:YAG лазера составляет 1060 нм (согласно Schmidt и Schneckenburger, 1990 г.)

(см. главу 3.5.3). Полупроводниковые лазеры являются лазерами с четырьмя состояниями. Длины волн их излучения лежат вблизи 680, 800, 1300 и 1500 нм, что значительно ограничивает их применение. Через удвоение частоты можно получить ультрафиолетовый диапазон (315 нм), но интенсивность излучения при этом уменьшается. Так как толщина излучающего слоя составляет несколько микрометров, пучок излучения получается расходящимся (действие щели). Поэтому в таких лазерах применяется коллимирующая оптика (см. рис. 3.12, а).

Наиболее важными жидкостными лазерами являются лазеры на красителях. Небольшая концентрация специфического органического пигмента (например,  $10^{-4}$  М родамина в этаноле или флуоресцеина в воде) функционирует как лазерный материал, излучающий свет в широком спектральном диапазоне ( $> 50$  нм). Состояния с близко расположенными молекулярными колебательными уровнями энергии служат излучающим лазерный свет материалом. Используя дисперсионное устройство, например призму или решетку, размещенную между зеркалами резонатора, можно получить непрерывно перестраиваемое излучение. Таким образом, применяя всего лишь пять красителей, можно получить излучение во всем видимом диапазоне.

Подобно перестраиваемым лазерам на красителях, можно получить перестраиваемые диодные лазеры. Лазерный диод — часть внешнего резонатора. С помощью решетки (так называемой конфигурации Литгмана или Меткальфа) и, иногда, дополнительного эталона (конфигурации Литрова) достижима перестройка в области длин волн  $\Delta\lambda \geq 20$  нм. Перестраиваемые лазеры на красителях уже используются в лазерной атомно-абсорбционной спектроскопии (см. главу 4).

### 3.4.6. Синхротронное излучение (Черенкова)

Все более важным «экзотическим» источником света в оптической спектроскопии становится синхротронное излучение. Оно включает широкую область электромагнитного излучения от инфракрасной до  $\gamma$ -лучей (см. рис. 2.2) и является мощнейшим источником рентгеновских лучей и ультрафиолетового излучения с непрерывным «сглаженным» спектром эмиссии (в отличие от ртутной лампы, рис. 3.7). Принцип действия синхротрона кажется очень простым: каждый заряд, каким-либо образом ускоренный, излучает электромагнитную энергию, в том числе и в виде света. В синхротроне электроны движутся по круговой траектории, приобретая вследствие этого непрерывное угловое ускорение. Излучение Черенкова является поляризованным, а угол рассеяния составляет всего  $0,006^\circ$ , что позволяет получить ширину импульса менее  $10^{-10}$  с и частотой  $5 \times 10^8$  с $^{-1}$ .

## 3.5. Геометрическая оптика и волновая оптика

### 3.5.1. Преломление и отражение

Лучом света называется воображаемая прямая линия, вдоль которой распространяется энергия излучения. Свойством луча света, которое можно описать, не принимая во внимание его двойственную природу, волновую и корпускулярную, является его обратимость, которая описывается законами преломления и отражения. Принцип обратимости гласит, что при реверсии направления распространения луча света он будет распространяться по той же самой траектории. Однако это свойство касается только пути света, но не его энергии.

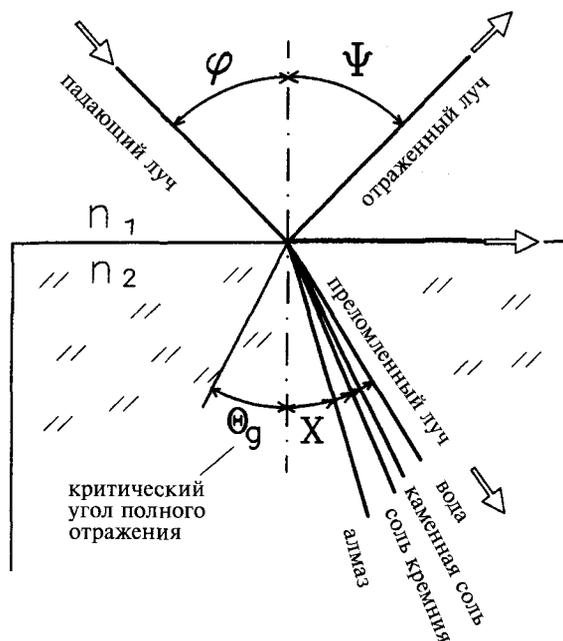
Закон отражения гласит, что при отражении луча света от граничного слоя (например, воздуха и стекла) угол падения  $\phi$  равен точно углу отражения  $\psi$ . Углы всегда измеряются относительно нормали к граничному слою. А закон преломления гласит, что при прохождении луча света через границу различных сред направление распространения изменяется. Причем, в соответствии с законом Снелла, это изменение зависит от соотношения показателей преломления данных сред:

$$\frac{\sin \phi}{\sin X} = \frac{n_2}{n_1} \quad (3.14)$$

где  $\phi$  — угол падения,  $X$  — угол преломления,  $n_1$  и  $n_2$  — показатели преломления данных сред.

Показатель преломления  $n$  является функцией длины волны и описывает свойства среды, через которую проходит луч света. Он определяется как отношение скорости распространения света в вакууме ( $c_0$ ) к скорости распространения света в данной среде ( $c_n$ ):

$$n(\lambda) = \frac{c_0}{c_n} \quad (3.15)$$



**Рис. 3.15.** Визуализация закона преломления при переходе луча света из воздуха ( $n_1$ ) в различные материалы ( $n_2$ ). Углы всегда измеряются от нормали

Например, скорость света с длиной волны 600 нм в кронглассе с  $n = 1,51$  составляет:

$$c_n = \frac{c_0}{n} = 198\,537 \text{ км/с}$$

По определению показатель преломления в вакууме равен единице. На рис. 3.15 представлены углы преломления  $X$  различных прозрачных материалов для заданного угла падения  $\phi$  при прохождении луча из воздуха. При переходе в среду с большим показателем преломления световой луч всегда отражается по отношению к нормали граничного слоя, и наоборот. Вследствие этого существует специфический угол  $\theta_g$  для перехода между средами с меньшим и большим показателями преломления. При превышении этого угла ( $\theta > \theta_g$ ) наступает полное отражение, что является основой оптоволоконной технологии (см. главу 3.5.5), а также спектроскопии ослабленного полного отражения (ОПО)<sup>1</sup> (см. главу 8.6).

### 3.5.2. Формулы Френеля

Основные законы оптики, применяемые в оптической спектроскопии, были открыты французским физиком Френелем (1788—1827). Эти зако-

<sup>1</sup> Прим. редактора: в русской транскрипции для обозначения этого вида спектроскопии обычно применяют термины — ослабленное внутреннее отражение (ОВО) или нарушенное полное внутреннее отражение (НПВО)

ны описывают взаимосвязь интенсивности света при преломлении и при отражении. Так называемое отражение Френеля (зеркальное отражение) — это такое отражение от поверхности образца, которое обусловлено различными коэффициентами преломления двух сред, разделенных граничным слоем.

Энергия света как электромагнитных волн аккумулируется в электрическом ( $E$ ) и магнитном ( $H$ ) полях и равна произведению  $\epsilon \times E^2$ , где  $\epsilon$  — диэлектрическая постоянная среды, в которой распространяется свет. Отражательная способность  $R$  на поверхности определяется по формуле:

$$R = \frac{E_r^2}{E_e^2} \quad (3.16)$$

где  $E_r$  — отраженная энергия,  $E_e$  — падающая энергия.

Следует отметить, что отражательная способность зависит не только от угла падения, но и от поглощательной способности вещества. Не рассматривая математически сложную формулу Френеля, опишем главные особенности на примере, приводимом на рис. 3.16. В зависимости от направления поляризации лучи света отражаются и преломляются в различной степени (см. главу 9.7). В частности, существует такой угол падения, при котором свет, поляризованный параллельно входной плоскости, не отражается. Этот эффект используется для получения высокоэффективного плоско поляризованного света. Угол падения  $\varphi_p$ , при котором это происходит, называется углом Брюстера в честь сэра Дэвида Брюстера (1781—1868), который это установил. В этом случае преломленный и отраженный лучи света перпендикулярны друг другу в соответствии с уравнением:

$$\frac{\sin \varphi_p}{\sin X} = \frac{n}{l} = n$$

$$\sin X = n \sin \varphi = n \sin(90 - \varphi_p) = n \cos \varphi_p \quad (3.17)$$

$$n = \tan \varphi_p$$

Таким образом, коэффициент преломления  $n$  можно определить по углу Брюстера  $\varphi_p$ . При  $\varphi = 0$ , т.е. при перпендикулярном падении света, для отражения в воздух формула Френеля дает очень полезное соотношение, содержащее только коэффициент преломления  $n$  отражающей среды:

$$R = \left( \frac{n-1}{n+1} \right)^2 \quad (3.18)$$



Август Жан Френель  
(1788—1827)

Например, оконное стекло с коэффициентом преломления  $n = 1,5$  обладает отражательной способностью  $R = 4\%$ ; алмаз с  $n = 2,4$  обладает отражательной способностью  $R = 17\%$ ; а германий с  $n = 4$  обладает отражательной способностью  $R = 36\%$ .

Согласно вышеприведенным формулам, получение свободных от отражения поверхностей, что крайне необходимо при изготовления линз спектрометров, кажется невероятным, однако с помощью интерференционных эффектов (см. главы 3.6.3 и 3.5.5) поверхности без отражения можно получить по крайней мере для заданного диапазона длин волн. Это достигается покрытием этих поверхностей кристаллическими слоями  $KBr$ ,  $CaF_2$  и других современных материалов определенной толщины.

Следует отметить, что у поверхностей с интенсивным поглощением и диффузионным отражением, что присуще в основном биологическим образцам, образцам *in vivo* или суспензиям, разница в поляризации между параллельной и перпендикулярной компонентой векторов электрического поля менее выражена. В этом случае термин «угол Брюстера» ( $\phi_p$ ) заменяется менее жестким термином «средний угол падения» ( $\Phi$ ).

Итак, все процессы отражения и преломления света сопровождаются изменением поляризации света, что нельзя игнорировать в экспериментах по поляризации света (см. главу 6.4). В частности, при измерении спектрально разрешаемой поляризации нужно четко разделять действительные и мнимые поляризационные эффекты (см. главу 6.4).

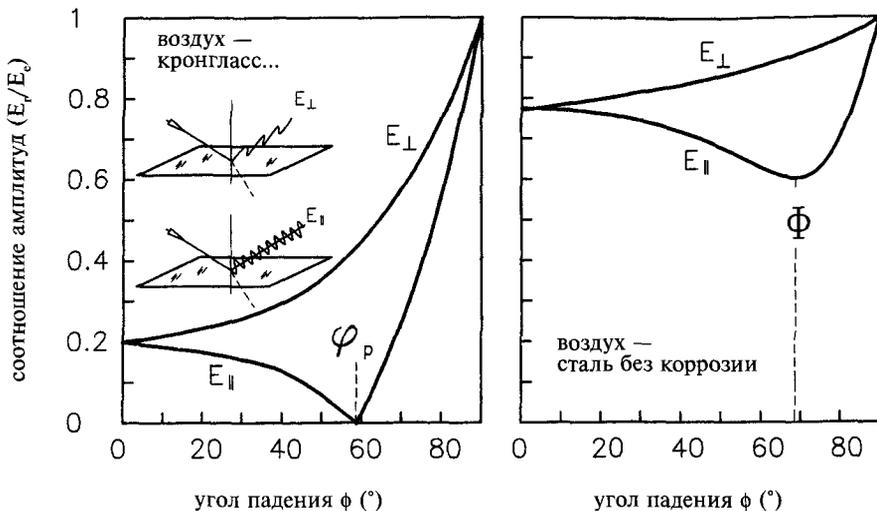


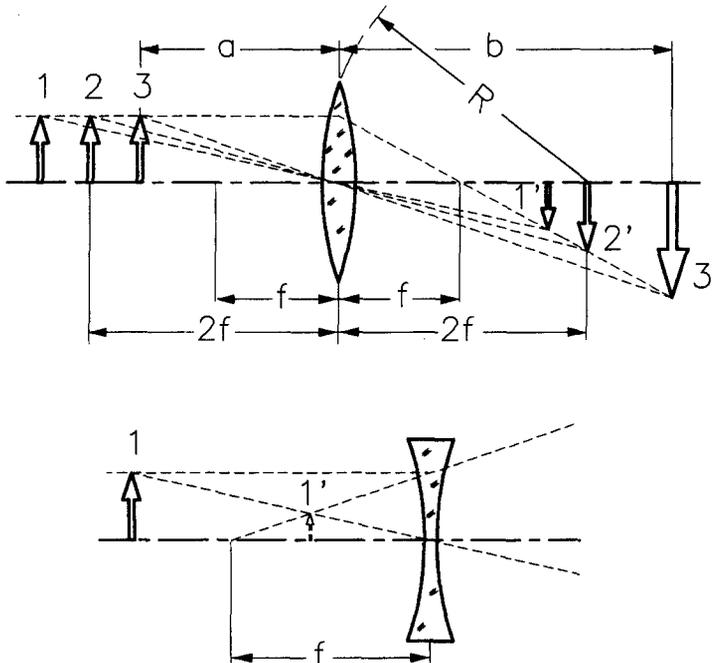
Рис. 3.16. Визуализация формулы Френеля для отражения и преломления луча света при попадании на границу воздух — стекло (нет поглощения) и на границу воздух — сталь (значительное поглощение). (Детали — см. текст)

## 3.5.3. Линзы и зеркала

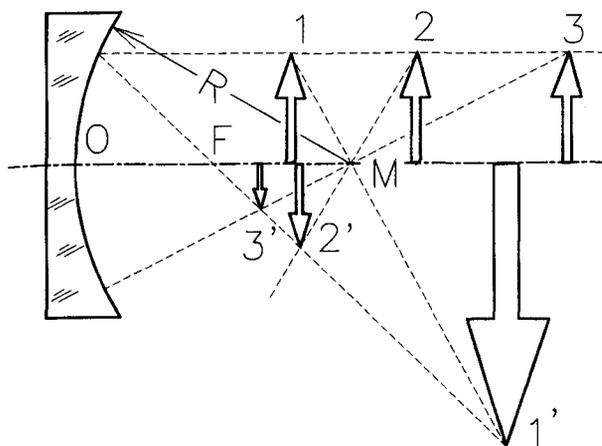
Для получения изображения в геометрической оптике наиболее важны плоские зеркала, собирающие (выпуклые «+») и рассеивающие (вогнутые «-») линзы и аналогичные зеркала. Мы остановимся на наиболее важных соотношениях между так называемыми «тонкими линзами». Толстые линзы, т.е. реальные линзовые системы, требуют более сложной обработки и не будут рассматриваться здесь. Линзы и неплоские зеркала характеризуются такими параметрами, как фокусное расстояние и апертура. При классификации линз и неплоских зеркал используются три показателя: средняя точка линзы  $O$ , фокусное расстояние  $f$  и двойное фокусное расстояние  $2f$ , которое для тонкой линзы совпадает со сферическим радиусом  $R$  (см. рис. 3.17). Для идеальной линзы и сферического зеркала справедливо следующее выражение:

$$\frac{1}{a} + \frac{1}{b} = \frac{1}{f} \quad (3.19)$$

где  $a$  — расстояние от объекта до линзы,  $b$  — расстояние от линзы до изображения объекта.

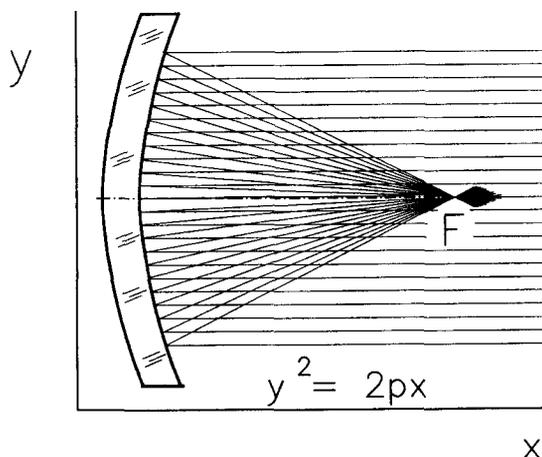


**Рис. 3.17.** Получение изображения с помощью тонких собирающих (вверху) и рассеивающих (внизу) линз. Параллельные лучи света становятся сфокусированными, при этом лучи, проходящие через середину линзы, не изменяют свое направление. С помощью рассеивающих линз получают мнимое изображение, с помощью собирающих — действительное



**Рис. 3.18.** Схема получения изображения в идеальных сферических собирающих зеркалах

Если объект расположен на бесконечном расстоянии ( $a = \infty$ ), то его изображение будет размещаться в фокусе. Если объект расположен на двойном фокусном расстоянии, то его изображение будет находиться на втором фокусном расстоянии, но в перевернутом виде, и иметь такие же размеры, что и объект. Формула 3.19 применима и к сферическим зеркалам, но только для лучей, близких к оси (см. рис. 3.18). Для остальных лучей фокусное расстояние менее  $R/2$ , что приводит к «сферической аберрации». Поэтому в спектроскопии применяются не сферические, а параболические зеркала. В параболических зеркалах с параметрами параболы  $y^2 = 2px$  и фокусным расстоянием  $f = p/2$  аберрация не возникает (см. рис. 3.19).



**Рис. 3.19.** Если сферическое собирающее зеркало дает существенное искажение изображения, то параболические зеркала обладают лучшими свойствами получения изображения, в особенности при фокусировке лучей, лежащих вне центральной оси



Эрнст Аббе  
(1840—1905)



Герман фон Гельмгольц  
(1821—1894)

В таких сложных оптических системах, как спектрофотометры, применяются только специальные зеркала. Их поверхность изготавливается напылением тонкого алюминиевого слоя на стеклянную матрицу с защитным слоем из кварца ( $\text{SiO}_2$ ). Обратная сторона таких зеркал покрывается краской и защитным лаком. Для оптических приборов недопустимо дополнительное отражение от переднего стеклянного слоя.

Оптическая система формирует хорошее изображение, если она спроектирована таким образом, чтобы:

$$\gamma \times \sin u = \gamma' \times \sin u' = \text{const} \quad (3.20)$$

Это так называемое *условие синусов*, сформулированное Э. Аббе (1873 г.) и Г. Гельмгольцем (1874 г.). Произведение размеров объекта и его изображения ( $\gamma$  и  $\gamma'$ ) на соответствующие числовые апертуры ( $\sin u$  и  $\sin u'$ ) должно оставаться постоянным. Это правило продемонстрировано на рис. 3.20.

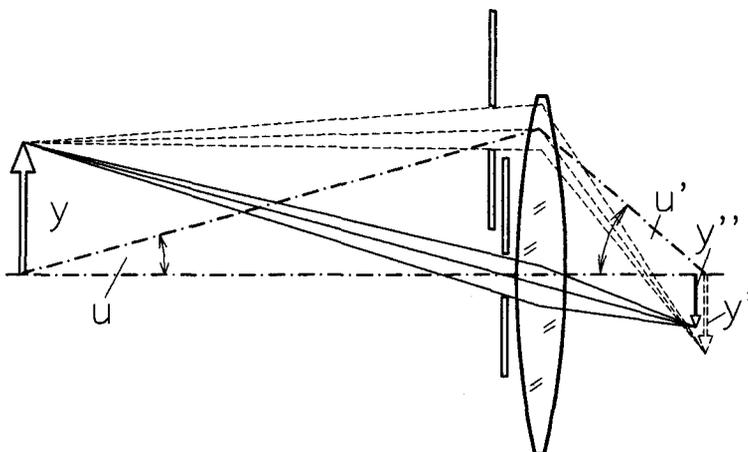


Рис. 3.20. Визуализация условия синусов. Условие выполняется, если каждая точка объекта соответствует определенной точке изображения, в отличие от двух изображений  $y'$  и  $y''$  на этом рисунке

Термин «апертура» используется для описания различных понятий. В одних случаях это активный диаметр линзы, зеркала и проч., который полностью заполняется светом. Термин «числовая апертура» относится к синусу половины угла между внешним лучом и оптической осью (на рис. 3.20 это угол  $u$ ). И, наконец, термин «апертура» может просто означать физические границы траектории луча.

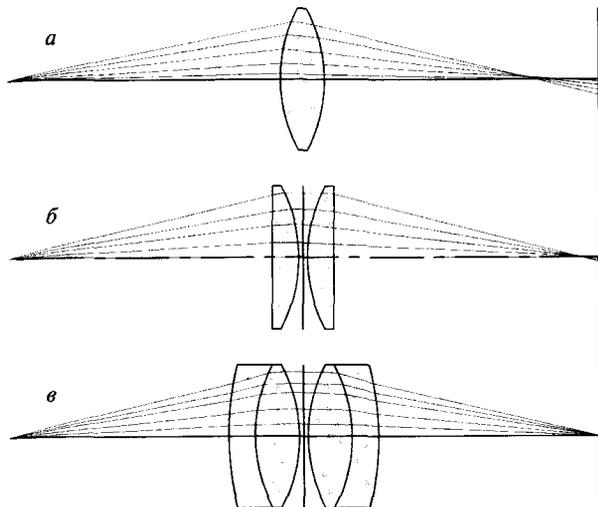
Если в оптической системе с линзами или зеркалами размеры изображения зависят от расстояния от центрального луча, то условие синусов не выполняется и изображение искажается и размывается.

Следует отметить, что для различных спектральных областей в качестве оптических компонентов используются различные материалы, что отражено в таблице 3.2.

Табл. 3.2. Материалы для ряда спектральных областей, применяемые в различных оптических компонентах

Спектральная область	Зеркало	Линза	Окна
Рентгеновские лучи	Нет	Нет	Бериллий
Ультрафиолет	Алюминий	Синтетический (плавленый) кварц	Синтетический (плавленый) кварц
Видимая	Алюминий	Стекло	Стекло
Ближняя инфракрасная	Золото	Стекло	Стекло
Инфракрасная	Медь, золото	ZnSe	ZnSe, NaCl, BaF <sub>2</sub>

В большинстве применений, таких как получение высококачественного изображения входной щели на выходной щели монохроматора, требуется две или более линз. Если сравнивать различные конфигурации представленных на рис. 3.21 линз, то это поможет нашему пониманию передающих линз. (а) В качестве пропускающей линзы применяется одна линза с большой апертурой, которая дает значительную сферическую aberrацию (различные лучи не фокусируются в одну и ту же точку). (б) Улучшенная система, в которой одна линза заменена двумя отдельными линзами с двойным фокусным расстоянием линзы (а) каждая. Изображение получается лучшего качества, и снижается сферическая aberrация при малых значениях  $f$  (см. ниже). Поверхности линз почти соприкасаются, как в типичном конденсере. (в) Следующим шагом по улучшению изображения является применение ахроматов. Ахроматические линзы превосходят простые линзы по качеству изображения и обладают большой апертурой. Сферическая aberrация в таких линзах устраняется за счет большой апертуры.



**Рис. 3.21.** Визуализация улучшения изображения использованием «толстых линз», получаемых сочетанием: *a* — одна линза; *б* — улучшение комбинацией из двух линз, с двойным фокусным расстоянием линзы (*a*) каждая; *в* — дальнейшее улучшение ахроматическими линзами

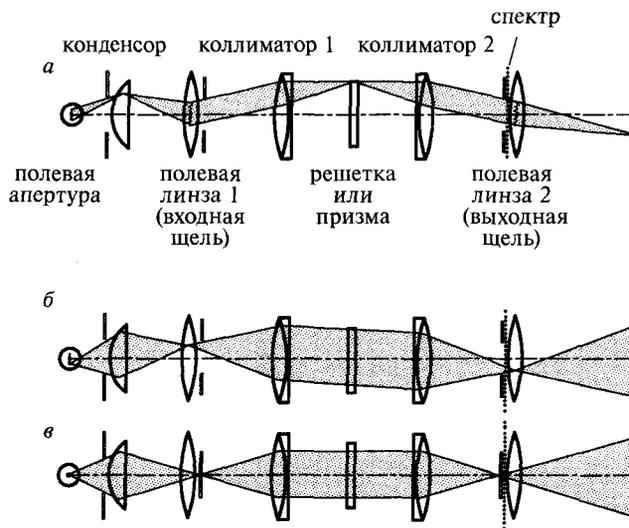
#### 3.5.4. Траектория светового луча

На рис. 3.22 представлена типичная оптическая схема монохроматора с в основном независимыми, но частично совпадающими световыми путями (по Келеру). На схеме (*a*) представлен ход лучей объекта и источника освещения, на схеме (*б*) — вид, параллельный высоте щели, (*в*) — вид под прямым углом к высоте щели.

1. *Ход лучей от источника света:* Свет от нити накаливания лампы (или дуги) через конденсер попадает на входную щель (фиксированная апертура); после нее коллиматор 1 формирует широкий параллельный пучок света (телецентрический световой путь), который равномерно освещает диспергирующий элемент (призму или решетку, см. главу 3.6). После угловой дисперсии коллиматор 2 подает изображение нити накаливания лампы на выходную щель в диспергированном виде. Пунктирной линией на выходной щели обозначен полученный спектр.

2. *Ход лучей от объекта.* В данной системе апертура ярко освещена и посредством полевой линзы 1 и коллиматора 1 полностью проецируются на апертуру диспергирующего элемента. Полевая линза на выходной щели нужна для равномерного освещения кюветы или образца или для направления монохроматического света в оптоволокно (см. главу 3.5.5). В данной схеме заложена идея Келера: для получения максимального разрешения по длине волны нужно применить максимальное пересечение траекторий лучей света. Оптимальное спектральное разрешение достигается получением безупречного изображения входной щели на выходной щели, т.е. выполнением условия синусов (см. главу 3.5.3).

Численное измерение световой пропускающей способности любой оптической системы, такой как монохроматор, выражается так называемым



**Рис. 3.22.** Две взаимосвязанные траектории луча света, применяемые в монохроматоре для лучшего прохождения света и получения оптимального спектрального разрешения: (а) оптические компоненты и ход лучей от источника освещения и объекта; (б) вид щелей в вертикальной плоскости сечения; (в) вид щелей в горизонтальной плоскости сечения. Названия приведены в соответствии с принятыми в «оптике изображений»

$f$ -числом. Оно определяется как отношение фокусного расстояния к апертуре  $A$  (здесь это диаметр круга освещенности входной апертуры):

$$f\text{-число} = f/A \quad (3.21)$$

Световая пропускающая способность обратно пропорциональна квадрату  $f$ -числа. Типичными  $f$ -числами монохроматоров обычно являются 3 или 4,2 (записывается это как  $F/3$  и  $F/4,2$ ), что соответствует световой пропускающей способности 0,111 и 0,057, которые отличаются друг от друга в два раза.

### 3.5.5. Оптические волокна

Как было показано в главе 3.5.1, если среда, в которой распространяется входной луч света, обладает более высоким коэффициентом преломления, и если угол падения больше определенного угла  $\theta_g$ , луч света будет полностью отражаться обратно от границы среды без (теоретически) потери энергии (см. главу 8.5). Этот эффект используется в так называемых *световодах*. Самым простым световодом является стеклянный стержень с плоскими торцами, в котором наблюдается полное отражение света от граничной поверхности между поверхностью стержня и воздухом. В реальных световодах сердцевина волокна покрывается оболочкой, сделанной из материала с меньшим показателем преломления, чтобы вы-

полнить условие оптической изоляции каждого отдельного волокна от соседнего. Оптоволокну должно иметь хорошую механическую защиту, чтобы не разрушиться. Поэтому применяются специальные буферные слои, которые защищают оптоволокну от механического, термального и химического воздействия. Тип этих буферных слоев зависит от специфики применения оптоволокну. Большим преимуществом оптоволокну является возможность изгибать его с различными радиусами, позволяя тем самым свету проникать в различные труднодоступные места. Таким образом, световоды могут состоять из отдельных тонких гибких волоконных элементов.

Конструкция единичного оптоволокну представлена на рис. 3.23. Сердцевина оптоволокну изготавливается из кварца, стекла или полимера с коэффициентом преломления  $n_1$ , а оболочка — из плавленного кварца, легированного фтором, с коэффициентом преломления  $n_2$ . Максимальный угол входа луча света  $u$  с переднего торца оптоволокну равен половине угла входного конуса и определяется из условия  $\theta > \theta_g$ . Для числовой апертуры получаем (см. 3.6.3):

$$\sin u = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (3.22)$$

Для прямого оптоволокну излученный угол с характерным профилем энергии является точно таким же, как входной конический угол  $2u$  (рис. 3.24). Для типичной числовой апертуры  $NA = 0,22$  рассчитанное значение  $u = 12,7^\circ$ . Так как входная апертура спектрофотометра обычно меньше этого значения (часто оно равно 0,1), то для согласования входа или выхода спектрофотометра с оптоволокну используются специальные адаптирующие устройства.

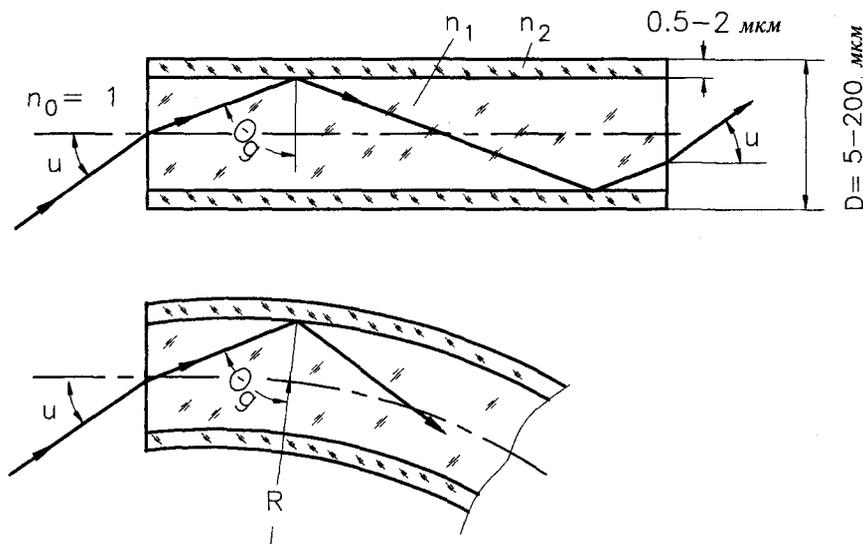
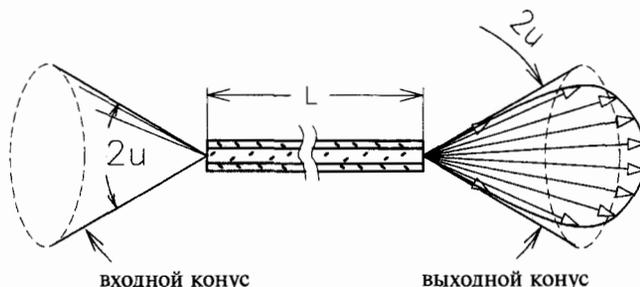


Рис. 3.23. Единичное оптоволокну, входящее в состав световода: сверху прямое, а внизу изогнутое (по радиусу  $R$ )

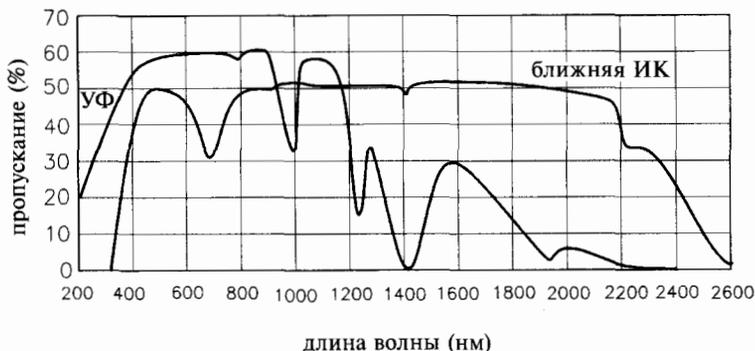


**Рис. 3.24.** По оптоволокну передаются только лучи света, попадающие во входной конус с апертурой  $2u$  (апертурный угол равен  $u$ ). Входной угол прямого оптоволокну равен выходному углу, интенсивность излученного света изменяется в соответствии с длиной стрелок в выходном конусе

Для изогнутого оптоволокну угловая апертура определяется по формуле:

$$\sin u = \sqrt{n_1^2 - n_2^2 \times \left(1 + \frac{D}{2R}\right)^2} \quad (3.23)$$

где  $D$  — диаметр сердцевины волокна (при  $R \rightarrow \infty$  получаем уравнение 3.22). В зависимости от диаметра радиус изгиба оптоволокну может изменяться от нескольких сантиметров до нескольких миллиметров. Область пропускания кварцевого световода — от ближнего инфракрасного до дальнего ультрафиолетового спектрального диапазона (UV-C, 200 нм) (см. рис. 3.25). Материалы, из которых изготавливается сердцевина оптоволокну, различаются по содержанию ОН групп. Кварцевое оптоволокну с высоким содержанием гидроксидов (600—1 000 частей на миллион) применяется в УФ-видимом диапазоне (от 230 до 800 нм). Для длин волн ниже 230 нм применяется специальное «устойчивое к поляризации» оптоволокну, которое, однако, имеет ограниченное время жизни. Термин «поляризация» характеризует непрозрачность материала для дальнего



**Рис. 3.25.** Спектральные характеристики световодов, производимых для УФ-видимого и ближнего ИК диапазона. На определенных длинах волн наблюдаются значительные провалы на кривых пропускания

ультрафиолетового излучения, которое поглощается «центрами окраски» на длине волны 214 нм.

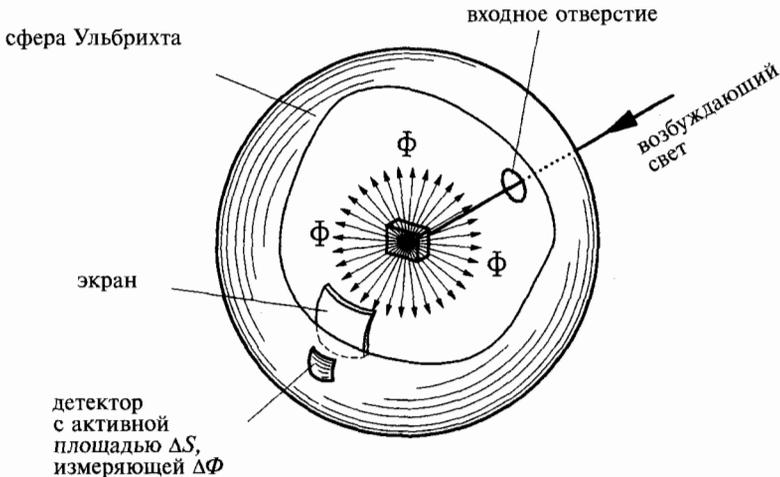
Современные оптические волокна демонстрирует превосходное пропускание  $T$ , т.е. очень низкие потери:  $T = 10^{-LK/10}$ , где  $L$  — длина оптоволокну, а  $K$  — потеря в дБ/м. Так, для  $K = 0,5$  дБ/м (хорошее значение на сегодняшний день) пропускание составит  $T = 0,89$  м<sup>-1</sup>. Единица Бел (Б), подобно единицам Эйнштейн или Дальтон, имеет не реальное, а относительное значение. 1 децибел (дБ) = 0,1 Б. В первую очередь, это позволяет сравнивать в логарифмической шкале значения энергии  $I_0$  и  $I$ . Например, если мы направляем в оптоволокну свет с энергией  $I_0$ , то через 1 м получим  $I = 0,89 I_0$ , тогда потери составят  $K = \log[I_0 / (0,89 I_0)] = 0,056$  Б м<sup>-1</sup> = 0,506 дБ м<sup>-1</sup>. Волокно подобного качества длиной 10 м имеет пропускание  $T = 10^{-LK} = 10^{-(10 \times 0,0506)} = 0,32$  или 32%.

Оптоволокну с разветвлением луча на несколько «рукавов» применяются, например, в спектроскопии отражения (см. главу 8.5), в низкотемпературной флуоресцентной спектроскопии (см. главу 6.3.4) или в двухволновой спектроскопии (см. главу 5.5). В этих случаях проводимый по одному рукаву оптоволокну возбуждающий свет попадает на образец, а отраженный или излучаемый от образца свет подается на детектор (см. главу 5.5.2). Оптоволокну со специальными разъемами (SMA 905, ST, FC-PC) легко подгоняются вручную, что способствует их все возрастающему применению в оптической спектроскопии.

### 3.5.6. Сфера Ульбрихта или интегрирующая сфера

Большинство источников света не являются излучателями Ламберта, т.е. излучение света в пространство происходит диффузно. Раньше они функционировали с более (лазеры) или менее четко выраженными траекторными характеристиками, что делает невозможным измерение общего потока излучения  $\Phi_e$  пространственно близко расположенным фотодетектором. Ульбрихт (1900 г.) решил эту проблему, спроектировав сферу, которую он назвал интегрирующим фотометром (впервые он был описан Сампнером в 1892 г., а усовершенствован Тейлором в 1920 г.). Сфера Ульбрихта — это полая сфера, забеленная изнутри, в центре которой расположен измеряемый источник света. Этот источник света активно излучает сам по себе или возбуждением (в результате отражения, флуоресценции или фосфоресценции) через небольшое отверстие в оболочке сферы (см. рис. 3.26). После многочисленных отражений внутри сферы устанавливается равновесие излучения, и внутренний объем сферы становится равномерно и однородно освещенным. Где-нибудь внутри сферы устанавливают маленький фотодетектор с активной площадью  $\Delta S$ , который измеряет сигнал  $\Delta\Phi$ , прямо пропорциональный потоку излучения  $\Phi_e$ . Необходимым требованием при этом является, чтобы фотодетектор был надежно защищен от прямого излучения источника света в центре сферы.

Исходно белый слой на внутренней поверхности сферы Ульбрихта делают нанесением пасты из оксида цинка, камфорного спирта и бесцветного



**Рис. 3.26.** Интегрирующая сфера (сфера Ульбрихта) используется для получения почти идеально однородного потока излучения  $\Phi$  от источника света. Детектор с маленькой активной площадью  $\Delta S$  защищен экраном от прямого излучения источника света в центре сферы. Такие образцы как флуоресцирующие водоросли можно заставить излучать свет, возбуждая их внешним светом. Радиус сферы составляет обычно от 10 до 50 см. В некоторых экспериментах, однако, он может достигать нескольких метров

целлулоида. Это занимало много времени, а полученный слой был недолговечен. В настоящее время существует множество материалов, пригодных для создания белого слоя внутри сферы Ульбрихта. Они изготавливаются на основе сульфата бария и ряда запатентованных соединений, таких как спектралон, спектрафлект, дурафлект или инфраголд, которые обладают хорошими отражающими свойствами от 80 до 99% в зависимости от длины волны (фирма «Labsphere»).

Если отражательная способность внутренней поверхности сферы равна  $\zeta$ , и если на маленькую площадь этой поверхности  $\Delta S$  падает поток излучения  $\Delta\Phi$ , то она сама становится излучателем. Каждый элемент сферы за счет первого отражения вносит свой вклад в плотность  $E_1$  суммарного потока излучения:

$$E_1 = \frac{\zeta}{4\pi R^2} \sum \Delta\Phi \quad (3.24)$$

Аналогично после второго отражения плотность излучения составит:

$$E_2 = \frac{\zeta^2}{4\pi R^2} \sum \Delta\Phi, \text{ и т. д.}$$

Суммарный поток излучения  $E_e$  составит:

$$E_e = E_1 + E_2 + E_3 + \dots$$

$$E_e = \frac{\zeta^2 \Phi}{4\pi R^2 (1 - \zeta)} \quad (3.25)$$

Отношение:

$$k = \frac{E_e}{\Phi} \quad (3.26)$$

является постоянной для определенной сферы.

Другим важным параметром сферы, когда она используется как источник Ламберта, является пропускная способность  $\tau$ . Она определяется как отношение суммарного выходного потока излучения  $\Phi_e$  к суммарному входному потоку  $\Phi_i$ . Пропускная способность зависит от отражательной способности сферы, количества отверстий и их диаметров:

$$\tau = \frac{\Phi_e}{\Phi_i} = \frac{\zeta \frac{A_e}{A_s}}{1 - \zeta \left(1 - \frac{A_p}{A_s}\right)}$$

где  $\Phi_e$  — суммарный поток излучения на выходном отверстии,  $\Phi_i$  — суммарный падающий поток,  $A_e$  — площадь выходного отверстия,  $A_s$  — площадь поверхности сферы,  $A_p$  — суммарная площадь всех отверстий,  $\zeta$  — отражательная способность поверхности сферы.

Отклонения от идеальной сферы Ульбрихта обусловлены несколькими причинами. Отражательная способность  $\zeta$  от внутренней стенки сферы зависит от длины волны, свет отражается неидеально, часть его поглощается. Защитный экран детектора, а также отверстия в сфере искажают геометрию сферы и однородность потока излучения, поэтому детектор фиксирует сигнал не в соответствии с законом Ламберта (см. рис. 3.3). Однородность излучения можно улучшить, увеличив размеры сферы. Поэтому чем больше сфера, тем выше качество излучения.

Сфера Ульбрихта применяется не только для получения однородного света. Она может содержать различные отверстия в своей оболочке для установки образцов, измерительных приспособлений и специальных оптических компонент в специализированных устройствах. С использованием калибровочного стандарта можно измерять пропускающие или отражающие свойства по-разному рассеивающих образцов, активно излучающие или отражающие цветовые источники могут быть измерены для определения их места в нормализованном цветовом треугольнике CIE<sup>1</sup>. И, наконец, сфера Ульбрихта может быть совершенным изотропным и диффузным источником света, если в центр сферы поместить обычную лампу накаливания, тогда небольшое отверстие в оболочке сферы станет идеальным излучателем Ламберта (см. главу 3.2).

<sup>1</sup> Прим. редактора: Commission Internationale de l'Eclairage - Международной комиссии по освещенности

## 3.5.7. Модуляторы

Во многих случаях возникает необходимость управления интенсивностью или амплитудой пучка света. В оптических спектрофотометрах, таких как двухлучевые спектрометры, флуорометры, спектрометры КД (кругового дихроизма) или фосфороскопы, применяются механические вращающиеся или колеблющиеся заслонки — прерыватели или модуляторы (зеркальные многоугольники), лучшие из которых работают в области килогерцовых частот. Наиболее доступны механические прерыватели, применяемые в фотокамерах, даже если они далеки от абсолютной светонепроницаемости, что подтверждается методом счета единичных фотонов.

Действие электрооптического модулятора основано на индуцированном изменении двойного лучепреломления под воздействием электрического поля. Пространственное и временное модулирование интенсивности излучения  $I_e$  различными типами модуляторов возможно в наносекундном диапазоне, а частота модуляции может достигать гигагерцового диапазона. В основе модуляции лежит эффект двойного лучепреломления Керри (см. рис. 3.27).

Двойное лучепреломление в оптической спектроскопии очень важно как в теоретическом, так и практическом применении. Оно тесно связано с понятиями оптической активности, дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма. Большинство химических групп в атомных системах или кристаллах, например асимметричный атом углерода с четырьмя различными заместителями, являются асимметричными в отношении поляризуемости светом, т.е. подвижности электронов вдоль ковалентной связи как оптической оси. В этом направлении поляризуемость  $a$  является наибольшей, скорость света —

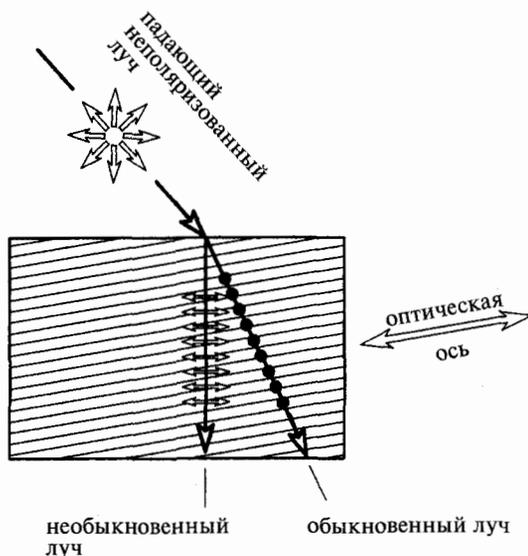
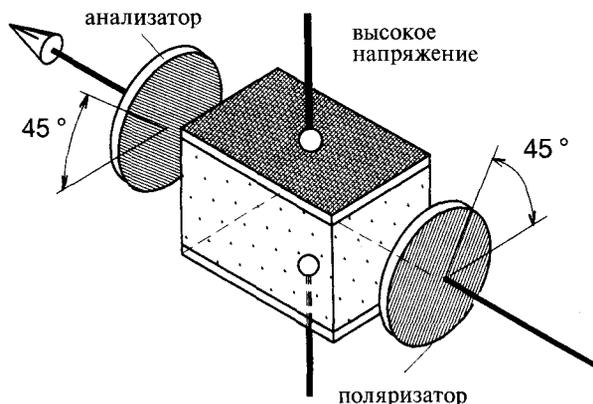


Рис. 3.27. Кристалл двойного лучепреломления, в котором падающий неполяризованный луч света расщепляется на обычный и необычный лучи (сравните рис. 3.16 и 3.27). Оба луча становятся плоско поляризованными, а их  $E$ -векторы перпендикулярны друг другу

наименьшей и, следовательно, показатель преломления — максимальным (см. уравнение 3.15) и направленным перпендикулярно к направлению, при котором он минимален. Таким образом, при изменении направления необычного луча коэффициент преломления изменяется. Если вектор света ортогонален оптической оси кристалла, направление распространения не влияет на коэффициент преломления, и получается нормальный, обычный луч (см. рис. 3.16 и 3.27). Необычный луч замедляется относительно обычного луча (замедление обозначается через  $\Phi$  в виде количества длин волн; *полуволновым напряжением* называется напряжение, при котором  $\Phi/2$ ; электрооптическая константа модулятора определяется в пикометрах на вольт для данной длины волны). Если входной луч света плоско поляризован, то после модулятора выходят два луча эллиптически поляризованного света (см. главу 9.7).

Помимо кристаллов двойное лучепреломление проявляют и некоторые вещества, например нитробензол. Их называют *электрооптическими материалами*. Дипольные моменты, возникающие под воздействием электрического поля  $E$  порядка 10 000 В/см пропорциональны напряженности поля  $E$ . Кроме того, уже поляризованные молекулы с возрастанием поля становятся все более синхронизированными, в отличие от подвижности, вызываемой теплом. По этой причине двойное преломление растет пропорционально  $E^2$ . Оптический модулятор функционирует следующим образом (см. рис. 3.28): между двумя поляризационными фильтрами (поляризатором и анализатором) размещается кювета с Керри-активной жидкостью, в которой эффект Керри вызывается двумя электродами. Без приложенного напряжения луч света блокируется анализатором. После подачи напряжения и получения эффекта Керри луч света расщепляется на обычный и необычный лучи, но через анализатор может пройти только один луч.



**Рис. 3.28.** Двойное преломление луча света в ячейке Керри возникает при подаче на нее высокого напряжения. В двух скрещенных поляризационных фильтрах (поляризаторе и анализаторе) векторы пропускания каждого наклонены относительно вектора электрического поля  $E$  на  $45^\circ$ , а по отношению друг к другу скрещены на  $90^\circ$ . Таким образом реализуется «быстрый» оптоэлектронный затвор. Без приложенного высокого напряжения затвор «закрыт», а открывается при подаче напряжения

Так как ячейка Керри функционирует при высоком переключающем напряжении, и для нее требуется нитробензол высокой степени чистоты, в оптических модуляторах вместо нее часто применяется ячейка Поக்கельса. Двойное лучепреломление в ней возрастает линейно с приложенным напряжением в кристалле однозамещенного фосфата аммония ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) или дейтерированной формы однозамещенного фосфата калия калии ( $\text{KD}_2\text{PO}_4$  — дейтерированная форма требует половины переключающего напряжения).

Преломляющая способность дидейтерированного фосфата калия в зависимости от длины волны представлена в таблице 3.3.

**Табл. 3.3.** Коэффициент преломления дидейтерированного фосфата калия в зависимости от длины волны

Длина волны (нм)	дидейтерированный фосфат калия	
	Обычный луч	Необычный луч
200	1,621	1,563
400	1,524	1,480
600	1,509	1,468
800	1,520	1,463
1000	1,496	1,461
1200	1,490	1,458
1400	1,483	1,456
1600	1,467	1,454
1800	1,468	1,452
2000	1,460	1,450

## 3.6. Монохроматоры

### 3.6.1. Фильтры

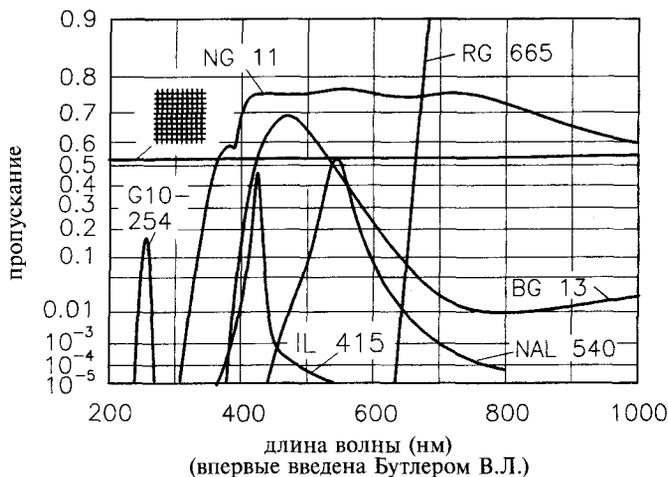
Световые фильтры — это оптические элементы, которые уменьшают интенсивность падающего светового потока или изменяют его каким-либо другим образом (например, запаздывание, поляризация) в зависимости от длины волны, угла падения или поляризации. Фильтры нейтральной плотности («серые фильтры») уменьшают энергию падающего света на требуемую величину (например, на 75%) и в основном не зависят от длины волны.

Однако по теоретическим причинам кривые пропускания фильтров нейтральной плотности в широком спектральном диапазоне всегда имеют некоторые отклонения в пропускании, т.е. они не являются «нейтральными» как требуется. Черные металлические или тканые сетки с доста-

точно тонкой текстурой могут быть хорошими нейтральными фильтрами, особенно в УФ диапазоне (см. рис. 3.29). Таким образом, чтобы минимизировать интерференционные эффекты вследствие их тонкой структуры, в спектрофотометрах такие фильтры помещают по возможности между полевой апертурой и полевой линзой (см. рис. 3.22).

Цветные фильтры пропускают только определенную длину волны или диапазон длин волн. Это их свойство основано либо на эффектах интерференции или отражения либо на специфическом поглощении материала фильтра (абсорбционные фильтры).

По физическим причинам длина волны пропускания интерференционных фильтров зависит от угла падения светового луча. Интерференционный фильтр — это модифицированный интерферометр Фабри — Перо. Основой его конструкции служат расположенные на небольшом расстоянии друг от друга две прозрачные плоскопараллельные частично отражающие пластины, которые благодаря интерференции пропускают лишь узкую часть спектрального диапазона. Интерференционные фильтры, будучи компактными приспособлениями, состоят из нескольких слоев. Длина волны максимального пропускания определяется при перпендикулярном падении света (см. главу 3.7.2). Даже небольшое отклонение на несколько градусов приводит к значительному спектральному смещению максимума пропускания к более коротким длинам волн с одновременным расширением и некоторым уменьшением полосы пропускания. Этот эффект может быть использован для получения с помощью небольшого поворотного устройства



**Рис. 3.29.** Типичные кривые пропускания некоторых широко применяемых в оптической спектроскопии фильтров (относительно масштаба оси ординат — см. текст). G10-254 — узкий «фильтр ртутной линии» («Corion»); BG 13 — голубой стеклянный фильтр («Schott», «Mainz», Германия); NAL 540 — широкополосный интерференционный фильтр («Schott»); IL 415 — узкополосный интерференционный фильтр («Schott»); RG 665 — отрезной фильтр («Oriell»); NG 11 — серый фильтр («Schott»). В качестве серых фильтров лучше всего применять тонко сплетенную сеть из стекла, так как ослабление ею света происходит практически независимо от длины волны

нескольких полос пропускания (различие до 20 нм) от одного интерференционного фильтра (см. рис. 3.30). Следует отметить, что сильно отражающая поверхность интерференционного фильтра вынуждает помещать фильтр подальше от источника света, чтобы уменьшить абсорбционный нагрев.

Оптические свойства фильтра определяются степенью пропускания  $T(\lambda)$ . На рис. 3.29 представлены кривые пропускания разных фильтров. Как правило, зависимость пропускания  $T$  от длин волн дается в координатах  $[I - \log(\log I/T)] - \lambda$ . В соответствии с этой зависимостью, фильтры бывают пропускающими (резкое возрастание пропускания с увеличением  $\lambda$ ) и отрезными (резкое снижение пропускания с увеличением  $\lambda$ ). На практике часто применяются комбинации этих двух фильтров, что позволяет иметь непрерывное изменение полосы пропускания длин волн. Широкополосные фильтры пропускают широкий спектральный диапазон, а узкополосные фильтры — узкий, в форме колоколообразной кривой. Полуширина (HW — half-width) узкополосного фильтра определяется как ширина спектральной полосы в нм, где интенсивность пика составляет 50% от максимума ( $\Delta\lambda_{0,5}$ ). Другое определение полуширины фильтра связывает изменение пропускания с максимальной длиной волны  $\lambda_m$  в процентном отношении:

$$HW = \frac{\Delta\lambda_{0,5}}{\lambda_m} \times 100 (\%)$$

Например, HW = 1% при  $\lambda_m = 500$  нм означает, что полуширина равна 5 нм. Крутизна спектра пропускания в отрезающей точке  $\gamma$  отрезного фильтра определяется по формуле:

$$\gamma = 100 \times \frac{\lambda_{0,8} - \lambda_{0,05}}{\lambda_{0,5}} \% \tag{3.27}$$

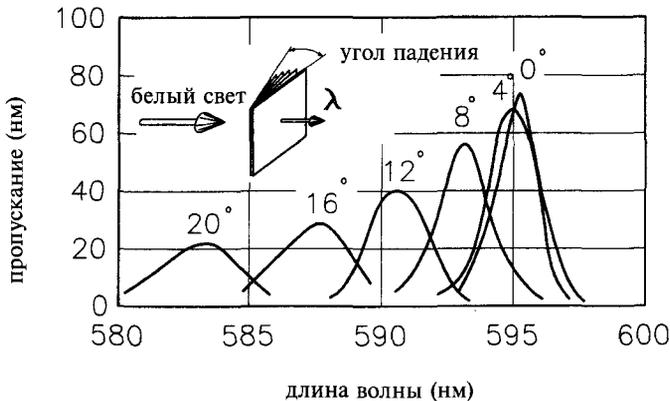


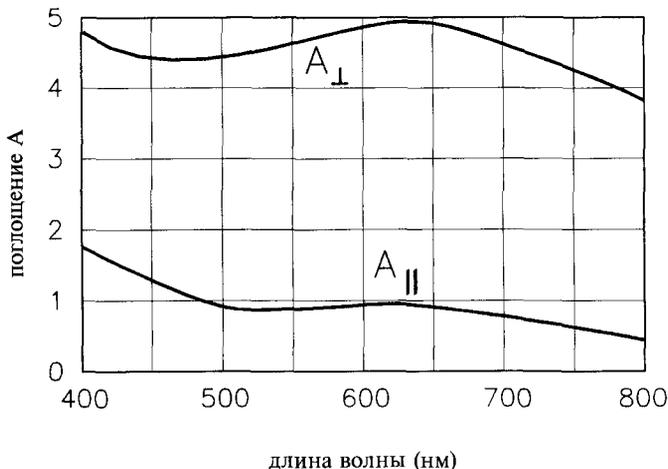
Рис. 3.30. В соответствии с законами физики, пропускающая способность интерференционных фильтров зависит от угла падения луча света. Например, у фильтра, изображенного на рисунке, максимум пропускания приходится на длину волны 596 нм, а простое поворотное устройство позволяет смещать максимальную длину волны на 10–20 нм при одновременном снижении пропускания

Например, для высокопропускающего фильтра на  $\lambda_{0,5} = 520$  нм с  $\lambda_{0,8} = 530$  нм и  $\lambda_{0,05} = 505$  нм получаем  $\gamma = +4,8$  (для низкопропускающего фильтра  $\gamma$  будет отрицательным числом).

Интерференционные фильтры с непрерывно меняющейся полосой пропускания поставляются в форме круглых или прямоугольных пластин. Непрерывно изменяющаяся длина волны пропускания от 400 до 750 нм, например, получается за счет изменения угла вращения в направлении вдоль длинной оси пластины.

Поляризационные фильтры основаны на эффекте двойного лучепреломления в анизотропных кристаллах, таких как турмалин или герпатит (полийодид сульфат хинина). Коэффициент преломления в таких материалах является анизотропным и зависит от направления распространения света. Распространение двух по-разному преломленных лучей в такой среде приводит к их взаимно перпендикулярной поляризации (см. рис. 3.27). При этом один из лучей сильно поглощается. Поляризационные фильтры с большой площадью производятся из вытянутых пленок поливинилового спирта, содержащих в качестве наполнителя пигменты. Хорошие образцы таких фильтров функционируют практически независимо от длины волны (см. рис. 3.31).

Существуют еще подавляющие фильтры — они подавляют узкий спектральный диапазон (обычно от 15 до 40 нм при  $T = 10\%$ ) с эффективностью между  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$  ( $A = 3 - 4$ ). Вне диапазона подавления пропускание таких фильтров обычно составляет 75% (за исключением области более высоких и низких гармоник подавляемой длины волны). Так называемые режекторные фильтры используются в основном в спектро스코пах Рамана. Они обладают очень узким блокирующим спектральным диапазоном в несколько нанометров, поглощение в этом диапазоне составляет 7—8 единиц, а вне этого диапазона пропускание более 90%.



**Рис. 3.31.** Поляризационные пленки с низким пропусканием ( $\Delta_{\parallel} = 1 A$ ) и максимальным подавлением ( $\Delta_{\perp} = 5 A$ )

### 3.6.2. Диспергирующие призмы

Преимуществом оптических фильтров является высокая степень пропускания падающего излучения при относительно невысокой стоимости, небольших размерах и весе. Однако это пропускание фиксировано или изменяется лишь в небольшом спектральном диапазоне (см. рис. 3.30). В диспергирующих призмах для пространственного разделения луча света по длинам волн используется зависимость коэффициента преломления  $n$  всех прозрачных материалов, таких как стекло и кварц, от длины волны (см. рис. 3.32). Пересечение двух активных плоскостей призмы известно как ребро преломления при соответствующем вершинном угле<sup>1</sup>. Отклонение луча в плоскости рисунка составит:  $\delta = a + \epsilon - \beta$  (будет отрицательным в направлении по часовой стрелке). Угол выхода составит:

$$\epsilon = \arcsin[\cos a \cos \beta - \sin a(n^2 \sin^2 \beta)] \quad (3.28)$$

Если луч входит в призму под углом  $\beta$ :

$$\beta = \arcsin n \times \sin \frac{a}{2} \quad (3.29)$$

то покидает ее симметрично ( $\beta = \epsilon$ ), что приводит к минимальному отклонению луча (см. рис. 3.33):

$$\eta_{\min} = a - 2\beta \quad (3.30)$$

Из уравнений 3.29 и 3.30 получаем:

$$\sin \frac{a - \eta_{\min}}{2} = n \sin \frac{a}{2} \quad (3.31)$$

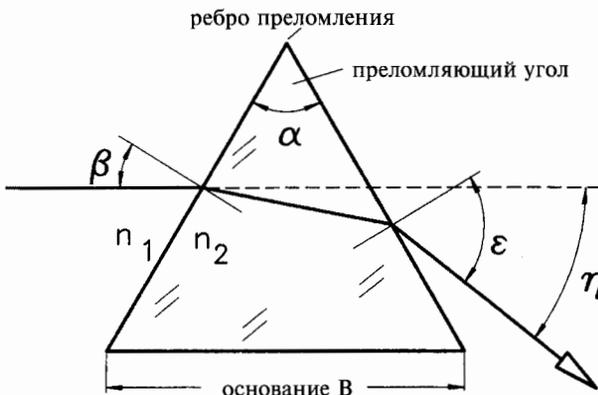


Рис. 3.32. Отклонение  $\eta$  луча света призмой при угле падения  $\beta$

<sup>1</sup> Прим. редактора: в русифицированном варианте принято говорить о преломляющем угле призмы

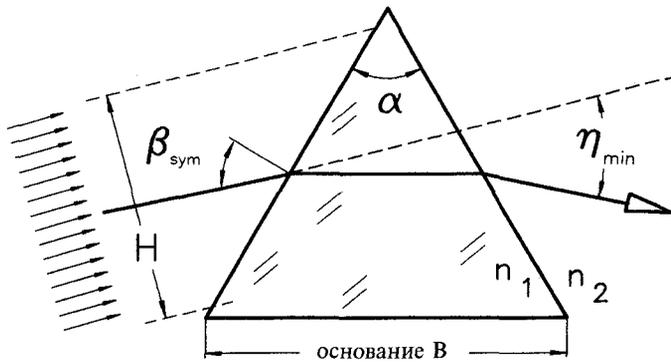


Рис. 3.33. Симметричное прохождение света внутри призмы дает простую формулу (параметры — см. текст)

По формуле 3.31 можно с высокой точностью рассчитать показатель преломления  $n$ , так как углы  $\alpha$  и  $\eta_{min}$  определяются очень точно.

Так как угол отклонения  $\eta$  зависит от  $n$  и, следовательно, от  $\lambda$ , то луч белого света будет расщеплен на монохроматические компоненты. Используя уравнения 3.29 и 3.30 и аббревиатуры  $B$  и  $H$ , как показано на рис. 3.33, получаем:

$$\frac{d\delta}{d\lambda} = \frac{d\delta}{dn} \times \frac{dn}{d\lambda} = - \frac{2 \sin \frac{\alpha}{2}}{\sqrt{1 - n^2 \sin^2 \frac{\alpha}{2}}} \frac{dn}{d\lambda} \quad (3.32)$$

$$\frac{d\delta}{d\lambda} = - \frac{B}{H} \frac{dn}{d\lambda}$$

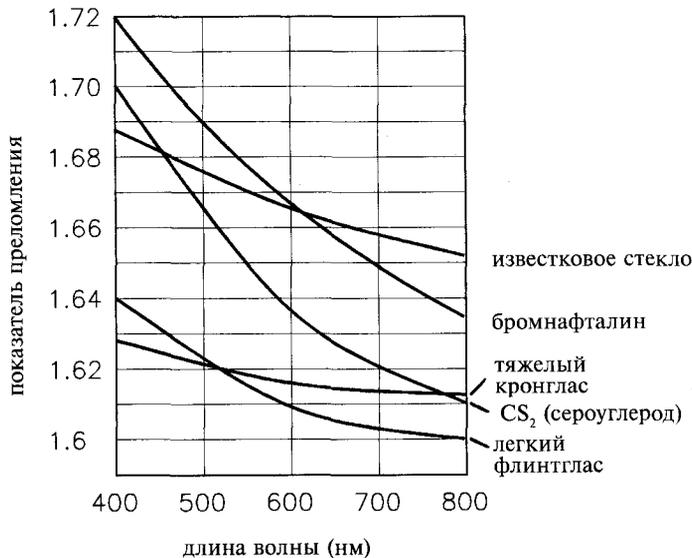
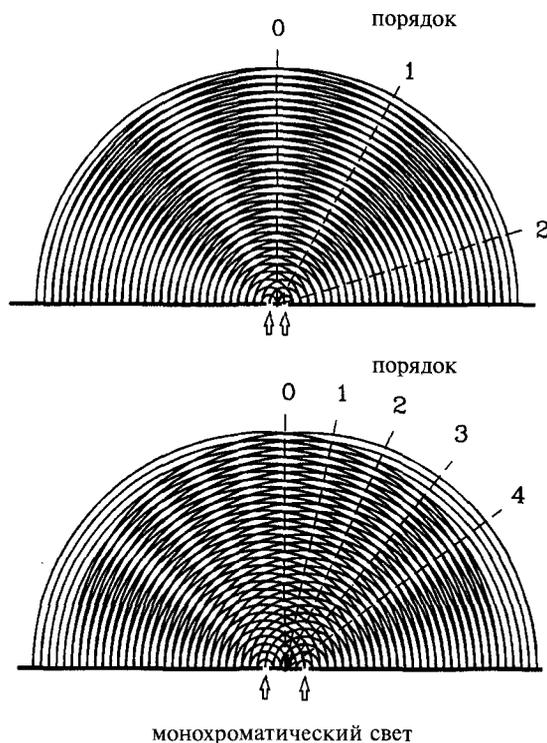


Рис. 3.34. Показатели преломления  $n$  различных оптических материалов в зависимости от длины волны

Дифференциал  $dn/d\lambda$  зависит от типа стекла (см. рис. 3.34). Таким образом, угол дисперсии пропорционален размеру основания  $B$  и обратно пропорционален ширине падающего луча света  $H$ , но не высоте призмы или углу при вершине.

### 3.6.3. Дифракционные решетки

Если параллельный пучок света падает на две щели с размерами и расстояниями между ними, сопоставимыми с длиной волны света, возникает эффект интерференции. В соответствии с законом Гюйгенса, обе щели являются источниками простых или сферических волн, которые взаимодействуют друг с другом в пространстве, т.е. возникает интерференция: совпадающие максимальные амплитуды складываются, противоположные амплитуды подавляют друг друга (см. также главу 2.2). Если начертить максимумы волн в виде окружностей с центрами в щелях, расстояние



**Рис. 3.35.** Наложение только двух сферических волн монохроматического света образует в зависимости от относительного расстояния между ними (постоянной решетки  $a$ ) типичную интерференционную картину с обозначенными максимумами (пересечение линий) и минимумами в различных направлениях (пересечение пропусков между линиями). Относительно нормали наблюдаются максимумы 0-го, 1-го, 2-го, и т. д. порядков интерференции. Чем больше расстояние от щелей, тем больше порядков перекрывается (см. также рис. 4.8)

между которыми равно  $a$  (постоянная решетки), то получится картина как на рис. 3.35. В одних направлениях волны усиливают друг друга, в других направлениях они подавляют друг друга. На этом принципе основано действие оптических решеток с несколькими сотнями штрихов (щелей) на миллиметр. Направление максимумов определяется тем фактом, что, согласно рис. 3.36, гомологичные лучи отличаются только на одну длину волны или кратно ей (уравнение решетки):

$$\sin \beta - \sin \epsilon = \pm m \frac{\lambda}{a} \quad (3.33)$$

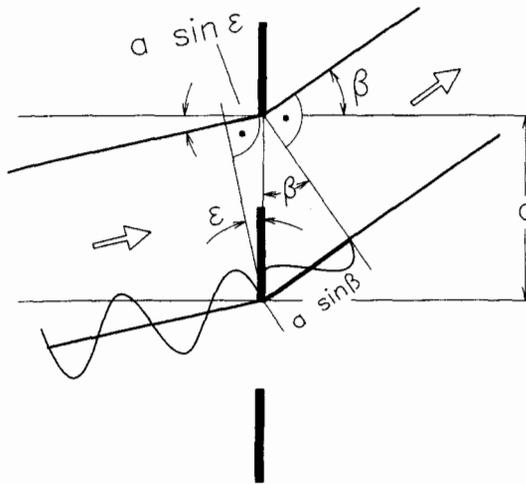
$$\beta = \arcsin \left( \pm \frac{m\lambda}{a} + \sin \epsilon \right)$$

Знак «+» относится к прозрачным, а знак «-» — к отражающим решеткам.

Разрешающая способность решетки  $R = \lambda/d\lambda$  — это ее способность разделять две соседние спектральные линии. В соответствии с законом Релея, это — тот случай, когда максимум одной волны падает на минимум второй. Если  $N$  — общее количество штрихов решетки, тогда

$$R = \frac{\lambda}{d\lambda} = m \times N \quad (3.34)$$

Чем выше порядок  $m$  и больше количество штрихов, тем выше разрешающая способность решетки.



**Рис. 3.36.** Математическое описание результатов, продемонстрированных на рис. 3.35: интерференционная картина, получаемая при рассеянии света от двух щелей, расстояние между которыми равно  $a$ . Гребни сферических волн, исходящих от двух щелей, складываются, если фазовый сдвиг  $a \times (\sin \beta - \sin \epsilon)$   $m$ -кратен длине волны  $\lambda$



**Кристьян Гюйгенс**  
(1629—1695)

Например, решетка с 600 линиями на мм и шириной 50 мм дает для первого порядка интерференции числовое разрешение  $R = 600 \times 50 = 30\,000$ . Если подставить уравнение 3.33 в уравнение 3.34 и обозначить общую ширину решетки как  $W = N \times a$ , то получим:

$$R = W \times \frac{\sin \varepsilon - \sin \beta}{10^{-6} \lambda} \quad (3.35)$$

Таким образом, разрешающая способность решетки зависит от ее ширины  $W$ , средней длины волны и использованной геометрии.

Разрешение не следует путать с шириной полосы. Например, для 500 нм получаем  $d\lambda = 500/30\,000 = 0,0166$  нм. Однако, так как эффективная ширина полосы спектрометра также зависит от ширины щели и таких оптических эффектов, как абберация, астигматизм или кома, на практике действительная ширина полосы всегда хуже.

Угловая дисперсия определяется как разница углов  $d\beta$ , полученных для двух длин волн, отличающихся друг от друга на  $d\lambda$ . Продифференцировав уравнение 3.33, получаем:

$$\frac{d\beta}{d\lambda} = \frac{\sin \varepsilon + \sin \beta}{\lambda \cos \beta} \quad (3.36)$$

Линейная дисперсия  $d\lambda/dx$  систем с решеткой (диспергирующий элемент плюс оптика, отображающая входную щель на выходной) равна обратному значению произведения угловой дисперсии и фокусного расстояния  $f$  выходного коллиматора (см. уравнение 3.22):

$$\frac{d\lambda}{dx} = \frac{a \cos \beta}{mf} \quad (3.37)$$

Если  $a$  — расстояние между линиями (постоянная решетки) и  $n = 1/a$  — число линий на мм, то получаем:

$$\frac{d\lambda}{dx} = \frac{10^6 \cos \beta}{mnf} \left( \frac{\text{нм}}{\text{мм}} \right) \quad (3.38)$$

Таким образом, если решетка обеспечивает 2 нм/мм (на выходной щели), то ее линейная дисперсия будет больше, чем у решетки с 4 нм/мм.

Практическое значение имеет распределение энергии  $I$  решетки в пределах всего рабочего спектрального диапазона. Для заданного значения постоянной решетки  $a$ , распределение энергии будет определяться в соответствии с уравнением:

$$I(\varepsilon, \beta) = \frac{I_0 \sin^2 [W \pi \lambda^{-1} (\sin \varepsilon + \sin \beta)]}{\sin^2 [a \pi \lambda^{-1} (\sin \varepsilon - \sin \beta)]} \quad (3.39)$$

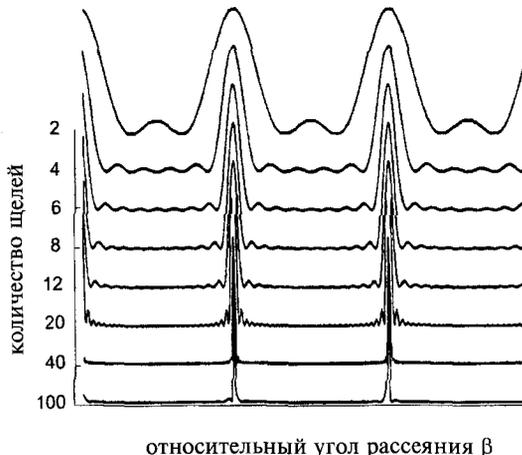
Для  $a = 6\,000$  нм и  $N =$  от 2 до 100 линий получаем распределение энергии, как показано на рис. 3.37. Очевидно, что с увеличением количества штрихов максимумы рассеяния обостряются (сужаются) и разрешающая способность решетки возрастает.

На рис. 3.38 представлены основные ограничения для решеток, которых не существует для дисперсионных призм и непрерывных фильтров. В качестве примера приведено отклонение (дисперсия) монохроматического света дискретных длин волн (от 200 до 1 000 нм) определенной решетки с разными порядками рассеяния (от первого до четвертого). Линейная дисперсия  $d\lambda/dx$  увеличивается пропорционально порядку рассеяния (см. уравнение 3.37). Так, дисперсия для первого порядка ( $m = 1$ ) вполне определенная. То же самое можно отметить для 300—600 или 400—800 нм, т.е. в пределах одной октавы (удвоение длины волны). Если падающий свет является белым светом, то происходит перекрытие порядков рассеяния. «Нежелательный» свет второго порядка 200 нм попадает на диапазон от 400 до 800 нм первого порядка. Эти проблемы на практике решаются подавлением нежелательных порядков отрезными фильтрами (в данном примере необходим фильтр на 200 нм). Следовательно, для решеток необходимо ввести еще один важный параметр — «эффективный диапазон длин волн»:

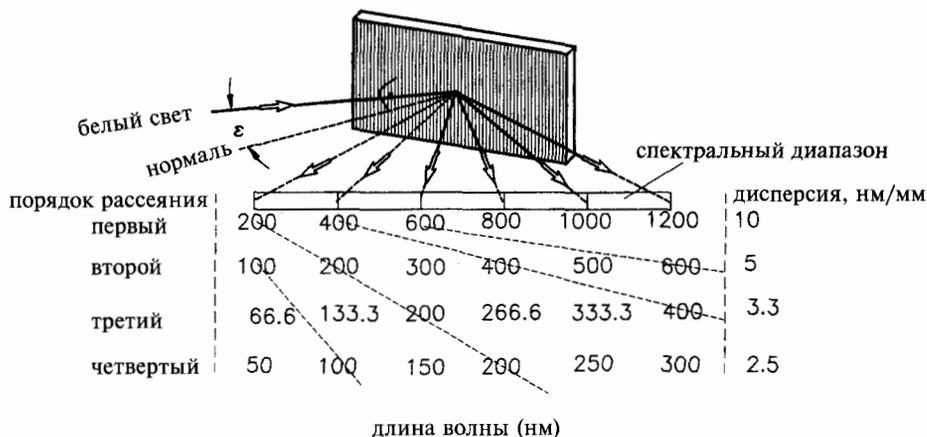
$$\Delta\lambda = \frac{\lambda}{m} \quad (3.40)$$

В наиболее благоприятных случаях для  $m = 1$  и 200 нм эффективный диапазон  $\Delta\lambda = \lambda$ , т.е. для 200 нм он простирается от 200 до 400 нм. А для  $m = 4$  и 600 нм эффективный диапазон находится только в интервале от 600 до 750 нм (зато с четырехкратным разрешением!).

Еще одним недостатком дифракционных решеток является неблагоприятное распределение энергии, поэтому в основном применяются



**Рис. 3.37.** Относительная интенсивность рассеяния решетки с 2—100 щелями с фиксированным расстоянием  $a$  и с заданным значением угла падения  $\varepsilon = \theta$  в зависимости от угла рассеяния  $\beta$



**Рис. 3.38.** Отклонение (дисперсия) монохроматического света дискретных длин волн (от 200 до 1 000 нм) конкретной решетки от первого до четвертого порядка. Линейная дисперсия  $d\lambda/dx$  возрастает с увеличением порядка решетки (см. уравнение 3.37). Таким образом, внутри одной октавы (удвоение частоты) дисперсия всегда однозначна. Для более высоких порядков решетки линейная дисперсия возрастает, и получается значительное перекрытие

решетки первого порядка рассеяния (за исключением решеток Эшеле в спектроскопии индуктивно связанной плазмы, гл. 4). А небольшие уширения позволяют сконцентрировать распределение энергии только в первом порядке рассеяния. Для этого штрихи решетки делают треугольного сечения с шагом наклона  $\epsilon$ , в котором угол рассеяния  $\beta$  идентичен обычному зеркальному углу отражения  $\epsilon$  (см. рис. 3.39). Этот угол называется «углом блеска»; а соответствующая длина волны максимального рассеяния — длиной волны блеска. В приведенном примере решетка «блестит» в первом порядке. Пунктирной линией обозначено результирующее распределение энергии. В последующих главах будет подробно описано практическое применение дифракционных решеток.

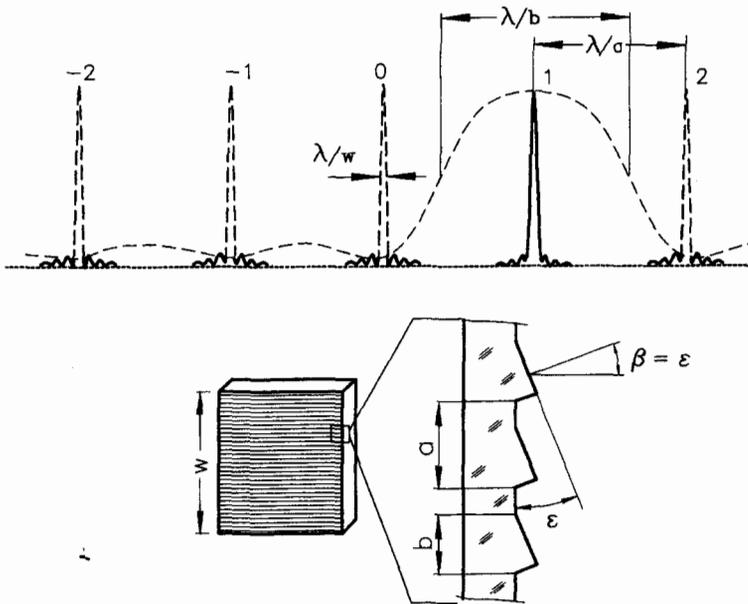
Энергетические профили эшелей определяются так называемой конфигурацией Литроу, при которой входящие рассеиваемые лучи света отображаются в том же направлении, они автоколлимируются при вращении решетки ( $\beta = \epsilon$ ). В этом случае получается длина волны  $\lambda_B$  при угле блеска:

$$\sin \beta - \sin \epsilon = -m \times \frac{\lambda}{a}$$

$$\omega = \epsilon = -\beta, \text{ где } \omega \text{ — угол блеска} \quad (3.41)$$

$$2 \sin \omega = m \frac{\lambda_B}{a} \times 10^6 \quad (\lambda - \text{в нм})$$

Например, для решетки с 600 линиями на мм при 500 нм получаем угол блеска  $\omega = 8,627^\circ$ .



**Рис. 3.39.** В отражающих решетках Эшеле со штрихами специфической формы диспергируемая энергия может быть сконцентрирована главным образом в первом порядке, т.е. в +1-м порядке, соответствующем огибающей кривой в этом примере (прерывистая колоколообразная кривая, согласно данным, представленным фирмой Jobin — Yvon)

В физическом смысле дифракционная решетка является набором случайно распределенных параллельных оптических возмущений. В обсуждаемых нами решетках штрихи наносились механически или светотехникой в (стеклянной) матрице и обладали отражательными или пропускающими свойствами независимо от самой матрицы. В акустооптических спектрометрах (известных как акустооптические модуляторы — АМ) механически сжатые волны получают вследствие пьезоэлектрического эффекта в кристаллах (диоксида теллурия, молибдата свинца, кварцевого стекла или германия), что образует соответствующую картину преломления (ультразвуковые решетки). При так называемом режиме Брегга генерируется только единственный порядок рассеяния (рис. 3.39). Изменяя мощность высокочастотного генератора, модулируют интенсивность света, его частота при этом определяется постоянной решетки  $a$ . В основном АМ применяются как модуляторы интенсивности и направления (см. главу 3.5.7), но могут применяться и как сканеры длины волны, особенно в спектрометрах ближней ИК области (гл. 10).

### 3.7. Фотодетекторы

Фотодетекторы обычно классифицируют на основании внешнего или внутреннего фотоэффекта. Кроме того, существуют классы фотодетекторов, которые основаны на термоэффекте или на фотохимической реакции. Чувствительность различных фотодетекторов зависит от области электро-

магнитного спектра, поэтому их используют в наиболее подходящих спектральных диапазонах (см. рис. 3.40 и 3.41). В таблице 3.4 приведены некоторые полупроводниковые материалы с их спектральной чувствительностью.

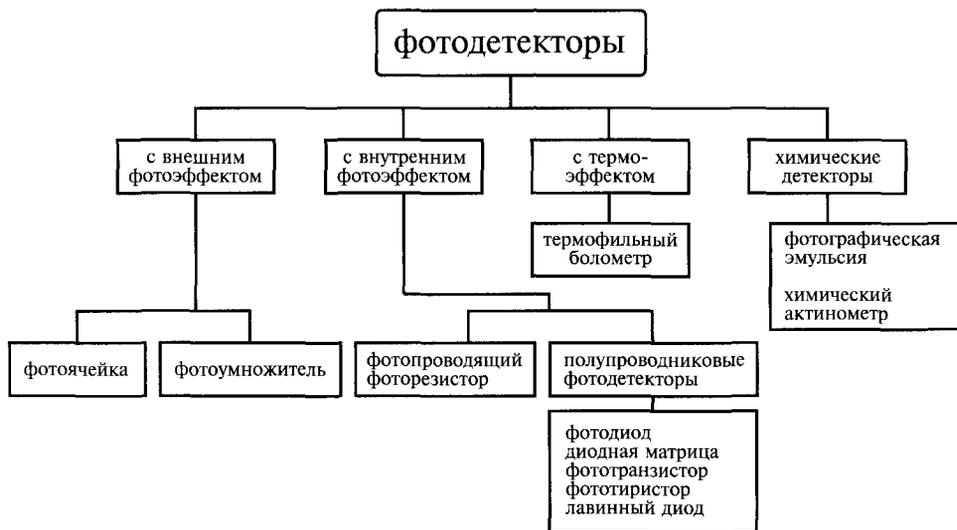


Рис. 3.40. Классификация фотодетекторов

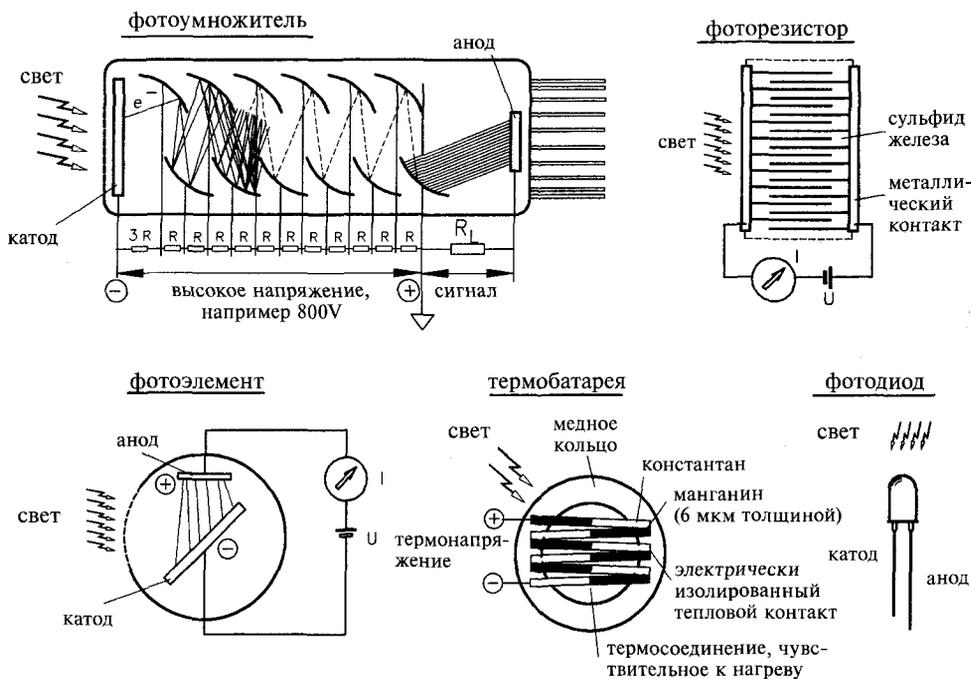


Рис. 3.41. Конструкции наиболее важных фотодетекторов, применяемых в оптической спектроскопии

Табл. 3.4. Материалы полупроводниковых фотодетекторов и спектральные диапазоны их применения

Материал детектора	Спектральный диапазон (мкм)
Si	0,2—1,1
Ge	0,8—1,8
In(Ga)As	1,0—3,8
InSb	1,0—7,0
InSb (77 K)	1,0—5,6
HgCdTe (77 K)	1,0—25

### 3.7.1. Фотодетекторы с внешним фотоэффектом

Фотодетекторы этого класса основаны на так называемом эффекте Эйнштейна, или на внешнем фотоэффекте. Фотоны способны выбивать электроны из фотокатода, изготавливаемого из сплавов щелочных металлов с полупроводниковыми элементами: Sb—Cs, Na<sub>2</sub>—K—Sb, Cs—Te и других. При этом катод становится положительно заряженным. Выбитые с катода электроны при соответствующем напряжении достигают анода, и мы наблюдаем индуцированный светом электрический ток — «фототок». Во избежание взаимодействия с молекулами воздуха фотоячейку необходимо вакуумировать. Фототок можно значительно усилить — в этом случае получится фотоумножитель<sup>1</sup>. В ФЭУ ряд динодов с увеличивающимся потенциалом образует каскадное увеличение потока электронов. Увеличение тока электронов может достигать 10<sup>6</sup>—10<sup>7</sup> крат. ФЭУ являются одними из самых

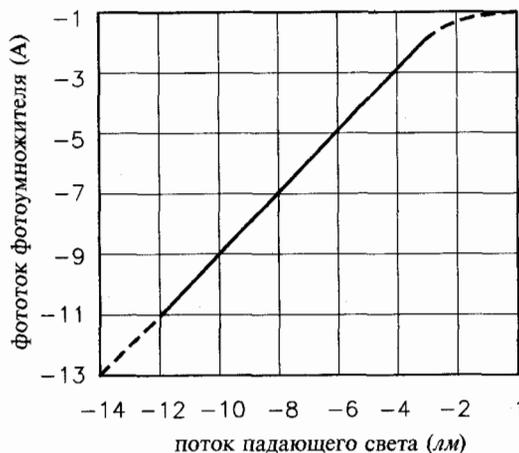


Рис. 3.42. Зависимость между фототоком в высококачественном фотоумножителе и интенсивностью падающего светового потока

<sup>1</sup> Прим. редактора: в России принятое название для такого рода фотодетекторов — фотоэлектронный умножитель (ФЭУ)

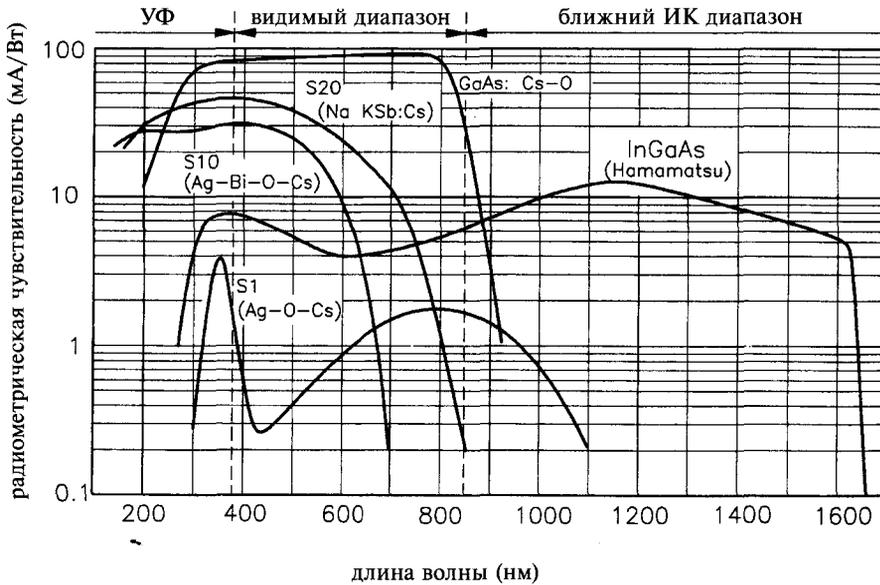
чувствительных фотодетекторов, но они отличаются относительно высокой стоимостью, большими размерами, сложностями в эксплуатации, механической хрупкостью и высокими требованиями к стабилизации напряжения питания. На рис. 3.42 представлена линейная зависимость между фототоком в фотоумножителе и интенсивностью падающего светового потока.

В зависимости от материала катода и входного окна ФЭУ они применяются в основном в УФ — видимом диапазоне. Однако после изобретения «Hamamatsu» нового катода (из InGaAs) область применения фотоумножителей расширилась на ближний ИК диапазон вплоть до 1700 нм, но при этом требуется охлаждение. Следует отметить, что фотоумножители можно еще разделить на два класса по типу конструкции: с боковым и торцевым фотоокном. (см. таблицу 3.5).

Табл. 3.5. Сравнительные параметры ФЭУ с боковым и торцевым фотоокном

С боковым фотоокном	С торцевым фотоокном
Отражающий фотокатод (чувствительность строго зависит от пространственного распределения света)	Пропускающий фотокатод (более однородный прием сигнала)
Умеренно высокое напряжение	Более высокое напряжение
Низкая стоимость	В ~5 раз дороже, чем с боковым окном
Маленький телесный угол охвата	Большой телесный угол охвата (почти до $2\pi$ )
Высокая степень усиления и чувствительность (Круговые диоды)	

Следует отметить, что фотоумножители и другие фотодетекторы характеризуются так называемым темновым током, который обусловлен тепловыми эффектами. Он снижает чувствительность устройства, и, чтобы снизить этот шум, применяется охлаждение устройства. Чувствительность определяется как значение потока излучения  $\Phi_e$ , в 100 раз превышающее темновой ток. На рис. 3.41 показан типичный каскад напряжений на диодах фотоумножителя при получении сплошного спектра. Номиналы резисторов  $R$  этого каскада могут быть от 20 кОм до 5 МОм (каскадный ток должен иметь многократно увеличенное по сравнению с анодным значение, чтобы гарантировать значительное напряжение на диодах). Высокая чувствительность ФЭУ достигается за счет высокого напряжения (например, на большом резисторе  $3R$ ) между фотокатодом и первым диодом. Отрицательный потенциал на катоде — «высокий», а положительный потенциал анода заземлен. Сопротивление нагрузки  $R_L$  составляет обычно 51 Ом, а коаксиальный кабель обеспечивает оптимальное согласование импедансов. В специальных применениях (например, в космических технологиях) фотоумножители изготавливаются небольших размеров (со спичечный коробок), причем со встроенным генератором высокого напряже-



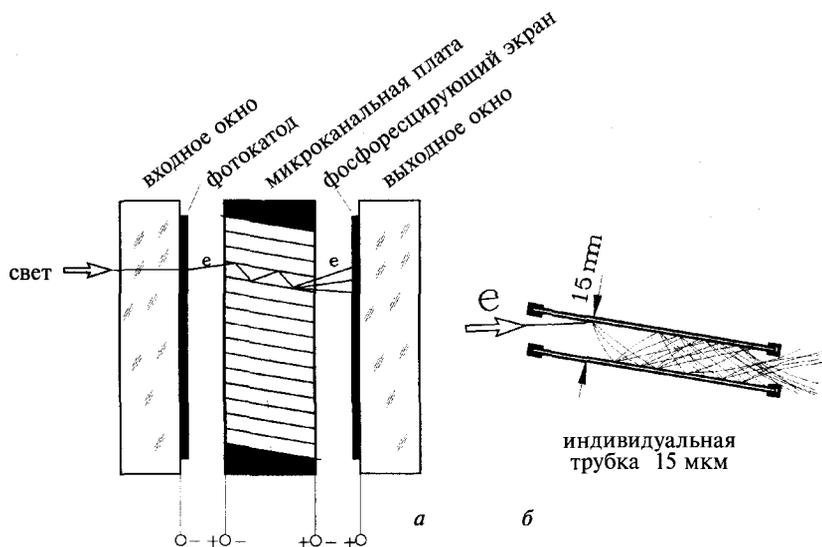
**Рис. 3.43.** Спектральная чувствительность фотоумножителей как функция материала катода. Каждому сплаву щелочных металлов присвоено условное обозначение: S1, S10, и т. д. В ультрафиолетовом диапазоне особую роль играет материал окна фотоумножителя. Применение ФЭУ в основном ограничено УФ — видимым диапазоном

ния. В этом фотоумножителе «Hamamatsu» подается обычное напряжение питания постоянного тока.

Современная версия фотоумножителя представляет из себя многоканальную плату (см. рис. 3.44). В конструкции этого фотоумножителя применяется оригинальная конструкция усиления фотоэлектронов. Микроканальная плата делается из сплавленных оптоволокон, сердцевина которых изготовлена из стекла, а оболочка — из легированного свинцом силикатного стекла. Сердцевина оптоволокна вытравливается, и получаются трубки с внутренним диаметром менее 15 мкм. Длина каждой трубки составляет 500 мкм. Внутренние поверхности трубок покрываются слоем из полупроводника, а плата с двух сторон посредством напыления покрывается металлическими электродами. Таким образом, каждая отдельная трубка работает как фотоумножитель. При подаче напряжения (обычно 1 000 В) коэффициент усиления устройства составляет приблизительно 10 000. Для получения дальнейшего усиления микроканальные платы можно соединять последовательно, но с потерей разрешения. Подобные усилители изображения успешно применяются в диодных устройствах или спектрометрах с CCD (ПЗС) регистрацией.

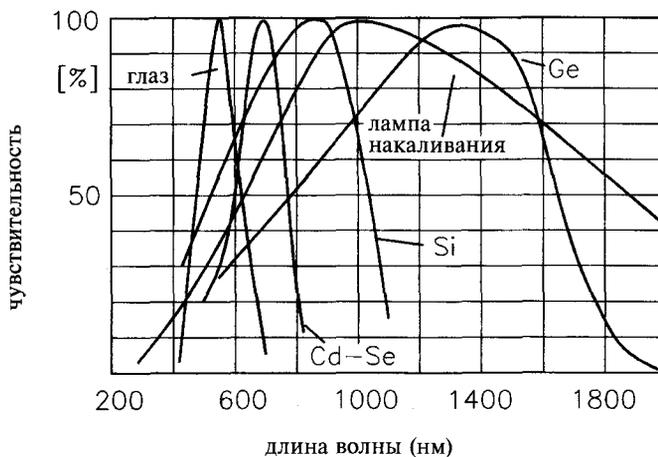
### 3.7.2. Фотодетекторы с внутренним фотоэффектом

В полупроводниковых детекторах кванты попадающего на них света увеличивают количество носителей свободного заряда в твердом теле (это так



**Рис. 3.44.** Принцип работы микроканальной платы (МКП). Свет через входное окно попадает на фотокатод. Вследствие внешнего фотоэффекта электроны с катода под воздействием приложенного напряжения ускоряются по индивидуальным трубкам МКП и попадают на фосфоресцирующий экран. Здесь ускоренные электроны вновь превращаются в свет и распознаются диодной матрицей или прибором зарядовой связи (ПЗС) = CCD детектором

называемый *внутренний фотоэффект*). На рис. 3.45 представлены типичные кривые чувствительности фоторезистора (Cd—Se) и двух фотодиодов (Si, Ge) по сравнению с чувствительностью глаза человека в спектральном диапазоне света лампы накаливания. Фотопроводники и фоторезисторы изготавливаются из сульфида железа или соединений кальция; изменение их сопротивления не зависит от направления тока. Фотодетекторы этого типа отличаются низкой скоростью переключения ( $< 10$  Гц). Полупроводниковые детекторы с *pn*-поверхностным переходом разделяются, в зависимости от электрической схемы, на фотоэлементы (работающие без приложенного напряжения) и фотодиоды (работающие при напряжении в реверсивном направлении). Напряжение на фотоэлементах увеличивается логарифмически с увеличением плотности потока света (этот эффект используется в абсорбционной спектроскопии, см. главу 5), в фотодиодах реверсивный ток пропорционален плотности потока света. В качестве материалов полупроводниковых фотодетекторов используются германий (высокая фоточувствительность) и кремний (низкая температурная зависимость темнового тока). Частотные пределы данных устройств лежат в мегагерцовом диапазоне. Специальные фотодиодные матрицы с 512 или 1 024 плотно упакованными отдельными диодами используются в качестве фотодетекторов в диодных спектрометрах (см. главу 5). В фототранзисторах имеются два *pn*-перехода, что является дополнительным усиливающим фактором, однако «темновой шум» в этих приборах также усиливается, что не способствует повышению предела обнаружения. Функционирование



**Рис. 3.45.** Чувствительность полупроводниковых детекторов в сравнении с чувствительностью глаза человека и эмиссионным спектром лампы накаливания. Германиевый фотодетектор наиболее эффективен в ближнем инфракрасном диапазоне

лавинных диодов основано (аналогично фотоумножителям) на механизме внутреннего усиления малых сигналов. Под воздействием света в данных приборах образуются пары носителей зарядов, которые ускоряются реверсивным напряжением таким образом, что при ионизации столкновением их кинетической энергии достаточно для образования последующей пары носителей заряда. Коэффициент усиления лавинных диодов обычно составляет 100 (т.е. на несколько порядков ниже, чем в фотоумножителях). Основным недостатком лавинных диодов является их сильная температурная зависимость.

### 3.7.3. Фотодетекторы с термоэлектрическим эффектом

Приемники излучения, которые зависят от нагрева детектора, являются чисто тепловыми детекторами, их чувствительность практически не зависит от длины волны излучения. Таким образом поглощается столько фотонов, сколько попадает на поверхность. Это достигается применением черенных рецепторов или полостью в зачерненном полем теле с маленьким окном (черным телом). Теплоемкость детектора должна быть небольшой, чтобы получить существенное изменение температуры при малой передаваемой энергии. На принципе температурной зависимости сопротивления некоторых материалов основана работа болометра. При постоянном напряжении питания ток болометра увеличивается пропорционально поглощенной энергии. Термоэлемент болометра состоит из пары спаянных биметаллических (или полупроводниковых) соединений. В то время как одно соединение нагревается световым излучением, температура другого (опорного) соединения поддерживается на постоянном уровне за счет большой массы (медное кольцо на рис. 3.41). Типичная чувствительность болометров составляет несколько десятков

микровольт на градус Цельсия. Из последовательно соединенных термоэлементов получается термобатарея, обладающая линейно возросшей чувствительностью.

### 3.7.4. Фотохимические детекторы

Фотоэлектрические и термоэлектрические измерения света производятся просто, относительно быстро и точно. Однако абсолютное измерение света, требуемое, например, при определении квантовой эффективности фотосинтеза, достаточно сложно, так как геометрия детекторов не всегда стандартизована и их линейная область меняется с течением времени. В терминах абсолютных значений можно ожидать ошибку радиометрических измерений более  $\pm 50\%$ , возможная абсолютная точность, как правило, переоценивается. Поэтому иногда бывает необходимо применение более сложных методов фотохимических измерений света (актинометрия). Такие измерения, как правило, интегрируются в пространстве и во времени, и измеряемая кювета должна быть адаптирована к измеряемому потоку излучения. Фотохимические актинометры применяются в основном для измерений фотохимических реакций, протекающих с высокой и точно известной квантовой эффективностью (подобно измерению квантовой эффективности флуоресценции; см. главу 6.2.6). В начале измерения известна концентрация реагентов. После определенного времени освещения измеряется концентрация определяемого продукта реакции для падающего потока светового источника по отношению к измеренному, и мы получаем:

$$\text{фотон/с} = \frac{\text{количество полученных молекул продукта}}{\text{квантовая эффективность} \times \text{время облучения}}$$

Классический актинометр, разработанный Хетчардом и Паркером, измеряет фотопревращение ионов ферриоксалата в феррооксалат:



После окончания облучения добавляется фенантролин, и образуется окрашенный комплекс с восстановленным ионом железа, концентрация которого определяется по поглощению на длине волны 510 нм.

### 3.8. Кюветы

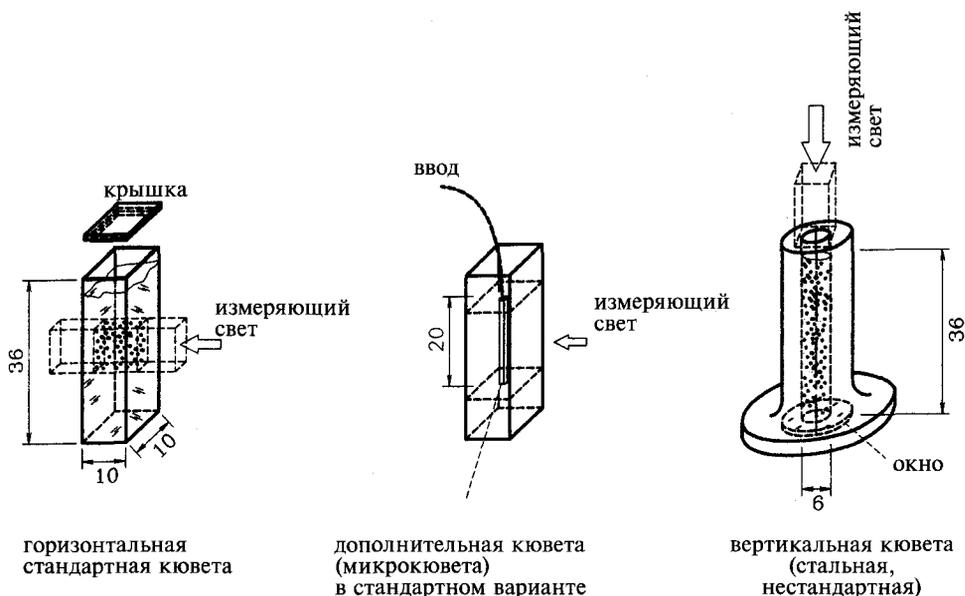
При спектральных измерениях жидких образцов они помещаются в специальные стеклянные контейнеры, так называемые кюветы. В зависимости от конкретного применения и типа измерений разработано большое количество конструкций кювет, которые значительно отличаются по цене. Выбор той или иной кюветы зависит от концентрации образца, его объема, спектрального диапазона и температуры измерений. Измерения в УФ диапазоне ниже 320 нм, например, требуют применения кварцевого стекла;

измерения при температурах, отличных от комнатной, возможны при использовании специальных кюветодержателей, обеспечивающих заданный уровень температуры. Низкотемпературные измерения, например при температуре жидкого азота или жидкого гелия, осуществляются с применением так называемых сосудов Дьюара. При биохимических измерениях часто требуются анаэробные условия, т.е. отсутствие кислорода в окружающей среде. Это достигается пропусканием над образцом газов типа аргона, ксенона или азота. Обычно кюветы изготавливаются из пластмассы, стекла или кварцевого стекла (см. рис. 3.46 слева). Стандартные кюветы имеют внешние размеры:  $12,5 \times 12,5 \times 45$  мм, а внутренние —  $10 \times 10$  мм. Кюветы с меньшим внутренним объемом, выпускаемые одним производителем, имеют тот же внешний размер, что и стандартные, но внутренний, например  $10 \times 1,25$  мм. Проточные микрокюветы имеют внутренний объем всего несколько микролитров и позволяют, например в колоночной хроматографии, проводить спектральные измерения в процессе элюирования. При флуоресцентных измерениях треугольные кюветы позволяют проводить измерение флуоресценции с той же поверхности, на какую падает возбуждающий свет, а общедоступные (прямоугольные) — с поверхности, перпендикулярной падающему лучу после его прохождения через измеряемый объем (см. главу 6.3.2).

В большинстве спектрометров (и спектрофотометров) применяются стандартные кюветы, которые предназначены для такого размещения, которое предусматривает горизонтальную траекторию луча света. Основным недостатком подобных кювет является то, что только небольшая часть образца (около 10%) освещается измеряющим светом. В случае большой ценности образца или доступности его в небольшом объеме, можно использовать микрокюветы или ультрамикрокюветы с объемом 50 или даже 2,5 мкл. Кюветы очень маленьких объемов проявляют капиллярные свойства, и возникают проблемы с образованием пузырьков воздуха, что требует дегазации. Наконец, из таких кювет сложно извлечь обратно образец.

С другой стороны, вертикальная траектория света (как предложил Бутлер, см. рис. 3.46 справа) обеспечивает 100% использование доступного объема образца. Другими словами, в этом случае для исследования потребуется объем образца в 20 раз меньше, чем при использовании стандартной кюветы. Однако в этом случае ограничивающим фактором является неверно определяемая концентрация образца, если требуется количественное, а не качественное определение. При измерении концентрированных образцов малого объема точной концентрацией часто пренебрегают в пользу получения необходимого спектрального разрешения. Помимо этого для подобных измерений применяется метод отражательной спектроскопии (см. главу 8) или способ подводки света через оптоволокно наподобие того, как это делается в оптродах (см. рис. 6.34).

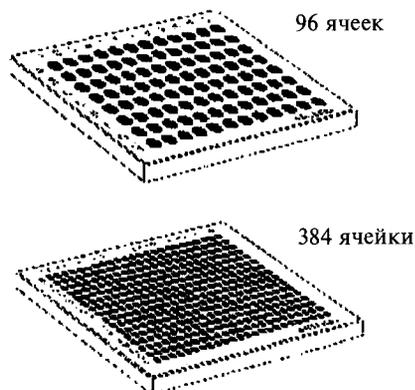
В соответствии с законом Ламберта — Бэра, поглощение пропорционально длине траектории луча света, проходящего через образец. Поэтому для слабопоглощающих образцов используется многократное прохождение луча света через измеряемый объем, сопровождающееся многократным от-



**Рис. 3.46.** Сравнение прохождения света в общедоступной кювете определенной толщины, ультрамикрокювете и кювете из нержавеющей стали с вертикальным ходом луча

ражением внутри кюветы. Эта процедура используется, в частности, в абсорбционной спектроскопии слабопоглощающих газов — ИК спектроскопии ослабленного внутреннего отражения (см. главу 8.6 и рис. 8.27. б). Для УФ — видимого диапазона она менее важна.

При исследовании белков и ДНК высокоэффективный анализ проводится при одновременном измерении большого количества отдельных маленьких кювет — ячеек, скомпонованных в микропланшеты по 96 или 384 штуки (см. рис. 3.47), которые автоматически измеряются специальными спектрофотометрами, называемыми микропланшетными ридерами. При этом доступны как абсорбционные, так и флуоресцентные измерения.



**Рис. 3.47.** Два обычных типа микропланшет на 96 и 384 ячейки

### 3.9. Дополнительная литература

Albani, J.R. *Structure and Dynamics of Macro-molecules: Absorption and Fluorescence Studies*, Elsevier Science, Amsterdam, **2005**.

Bass, M., Styland, E.W. *Handbook of Optics: Fundamentals, Techniques, and Design*, McGraw Hill, New York, **1994**.

Bass, M., Styland, E.W. *Handbook of Optics: Devices, Measurements, and Properties*, McGraw Hill, New York, **1994**.

Dereniak, E.L., Crowe, D.G. *Optical Radiation Detectors*, John Wiley & Sons, New York, **1984**.

Denney, R.C. *Visible and Ultraviolet Spectroscopy (Analytical Chemistry by Open Learning)*, John Wiley & Sons, Chichester, **1987**.

Engstrom, R.W. *Photomultiplier Handbook*, RCA/Electrooptics and Devices, Lancaster, PA, **1980**.

Hutley, M.C. *Diffraction Gratings*, March, N.H., Daglish H.N., eds., Academic Press, New York, **1982**.

O'Shea, D.C. *Elements of Modern Optical Design. Wiley Series in Pure and Applied Optics*, Goodman, J.W, advisory ed., John Wiley & Sons, New York, **1985**.

Petruzzellis, T. *Optoelectronics, Fiber Optics and Laser Cookbook*, McGraw Hill, New York, **1997**.

Robinson, J.W. ed., *Handbook of Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, **1981**.

Slayter, M.E. *Optical Methods in Biology*, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York, **1970**.

Smith, W.J. *Modern Optical Engineering. The Design of Optical Systems*, McGraw Hill, New York, **1966**.

Wilcox, C.H. *Scattering Theory for Diffraction Gratings (Applied Mathematical Sciences Series Vol. 46)*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1984**.

Yen, W.M., Levenson, M.D. eds., *Lasers, Spectroscopy and New Ideas: A Tribute to Arthur L. Schawlow (Springer Series in Optical Sciences, Vol. 54)*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1987**.

## ГЛАВА 4

# АТОМНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

*Natura in minimis maxima*

*В природе самое маленькое — это самое великое*

*Пифагор*

*Felix qui potuit rerum cognoscere causas*

*Блажен тот, кто достиг понимания законов мироздания*

*Вергилий*

В соответствии с правилом Кирхгофа, спектры атомов могут быть получены как в условиях поглощения, так и при их излучении. Все химические элементы обладают специфическими и интенсивными спектральными линиями, которые используют для анализа этих элементов. Например, алюминий определяется по линиям 308,215 и 396,152 нм, кальций — по 315,887 и 317,933 нм, кадмий — по 214,438 нм, магний — по 279,079 и 279,553 нм, свинец — по 220,353 нм, калий — по 404,721 и 766,491 нм, натрий — по 330,237, 588,995 и 589,592 нм, а цинк — по 206,095 и 213,856 нм. По различным причинам, которые станут ясны из последующих рассмотрений, атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС) и оптическая эмиссионная спектроскопия индуктивносвязанной плазмы (ИСП—ОЭС) более чувствительна, чем атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС).

Несмотря на это, ААС является одним из наиболее широко применяемых методов анализа микроэлементов. По теоретическим соображениям, абсолютная чувствительность эмиссионных методов должна обеспечивать более интенсивный сигнал, но, с аналитической точки зрения, такой как предел обнаружения, как пламенная, так и ИСП абсорбционная спектроскопия для многих элементов показывают схожие пределы обнаружения. В действительности во всех случаях ААС на основе графитовой печи достигается лучший предел обнаружения, чем в ИСП варианте. Эта разница объясняется скоростью поглощения образца. Пламенные распылители поставляют гораздо большее количество образца в пламя, чем ИСП распылители, в случае которых ~98% образца улетает в выхлопную трубу! С другой стороны, метод ИСП имеет большие преимущества при изучении многоэлементных образцов и более широкий динамический диапазон, во многих случаях производительность анализа намного перевешивает чрезвычайное потребление аргона в ИСП ААС.

## 4.1. Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС)

В химических и биологических системах, особенно в ферментативных реакциях, ионы металлов играют ключевую роль. Следовательно, их количественное и качественное определение является основным условием эффективного анализа, например мониторинга окружающей среды. ААС представляет быстрый, доступный, дешевый и эффективный метод достаточной специфичности и чувствительности. Она является полезным дополнением к масс-спектрометрическому анализу. Как указывалось в главе 1.2, так называемые фраунгоферовы линии (см. таблицу 1.1) — это результат атомного поглощения различных элементов в атмосфере Земли и Солнца.

Обычно атомно-абсорбционный спектрометр настраивают для определения концентрации только одного элемента (см. рис. 4.1, б), в том числе и в сложных смесях. Это объясняется тем, что каждому элементу соответствуют определенные спектральные линии поглощения, хорошо разделяемые по длинам волн и интенсивности (см. главу 2). В качестве источников света АА спектрометров используются так называемые лампы с полым катодом. Катод в форме цилиндра содержит только один металл, который требуется определить в образце, или его сплав. Лампа наполнена под низким дав-

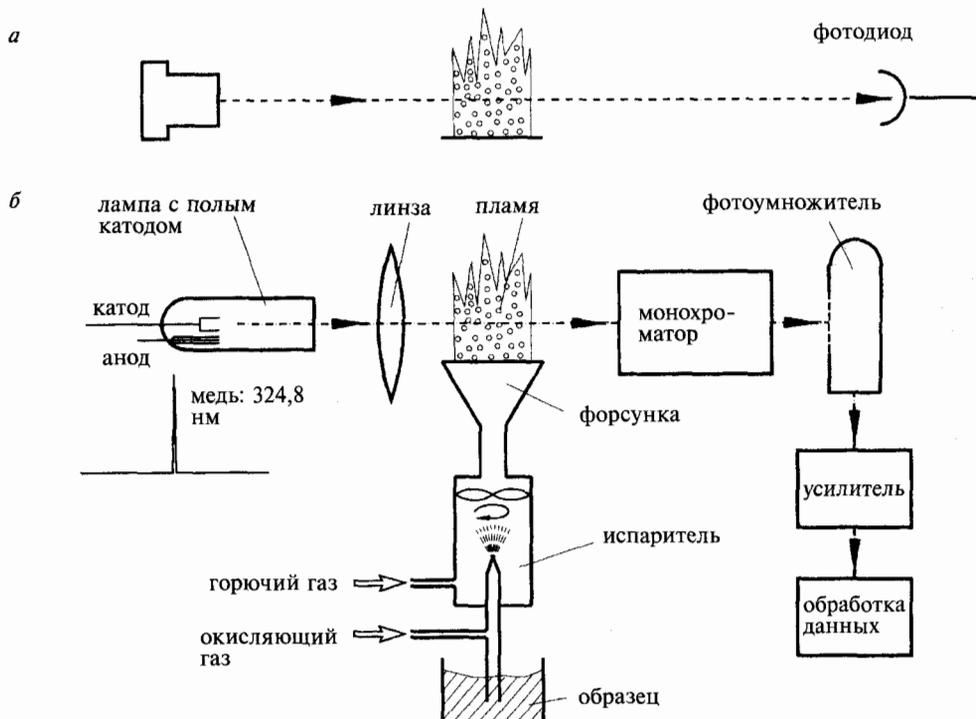


Рис. 4.1. а — Принципиальная схема атомно-абсорбционного спектрометра с перестраиваемым лазерным диодом в качестве источника света и фотодиодом в качестве детектора или б — с лампой с полым катодом в качестве источника света

лением инертным газом, обычно аргоном или неоном. При прохождении тока газ ионизируется на аноде, его анионы с ускорением движутся к катоду. «Бомбардировка» материала катода приводит к испарению атомов, переходящих в первое возбужденное состояние. Возврат в основное состояние приводит к излучению единичной атомной линии, которая является строго специфической характеристикой светового источника определяемого элемента (обычно металла).

В спектрометрах такого типа применяются также и многоэлементные лампы. В этом случае полый катод изготавливается из сплава нескольких металлов. Помимо этого бывают «безэлектродные» лампы, содержащие небольшое количество определяемого металла, заполненные инертным газом под низким давлением. Подобно спектроскопии ИСП (см. ниже) эта смесь возбуждается до состояния плазмы микроволнами, что приводит в конечном итоге к эмиссии света в сотни раз более интенсивной, чем в случае с лампой с полым катодом.

Альтернативой газоразрядной лампе с полым катодом в атомно-абсорбционных спектрометрах служит лазерный диод (см. рис. 4.1 *a*). Вследствие чрезвычайной узости спектральной полосы излучения лазерный диод позволяет проводить с высокой селективностью обнаружение различных элементов и их изотопов сканированием лазерной длины волны ( $\Delta\lambda \leq 20$  нм, см. главу 3.4.5). Кроме того, абсорбционный профиль линии служит для исключения неспецифического поглощения матрицы образца. На сегодняшний день доступны простые модули для перевода общедоступных атомно-абсорбционных спектрометров в лазеродиодные атомно-абсорбционные спектрометры. К сожалению, серьезным ограничением использования этих приборов является то, что достаточно интенсивные лазерные диоды доступны лишь для областей свыше 630 нм.

В отличие от молекулярной оптической спектроскопии, где имеется возможность исследования твердых, жидких и газообразных образцов, в ААС требуется перевод атомов исследуемого образца в газообразную фазу. Это осуществляется либо простым испарением образца в пламени, либо беспламенным испарением в графитовой печи (беспламенная ячейка). Посредством пламенной ААС исследуются только жидкие образцы. А с помощью графитовой печи (электротермического атомизатора) могут быть исследованы жидкости, суспензии и даже твердые образцы. В пламенной ААС аэрозоль образца, содержащего определяемый элемент, смешивается с топливным газом типа ацетилена и воздуха и подается в пламя. Метод графитовой печи в 100—1 000 раз более чувствителен, чем пламенный метод. Причина здесь в том, что в атомизаторе осаждается весь образец и отсутствуют потери на эффективность распылителя и разбавление топливными газами, что присутствует в пламенной ААС. Однако анализ ААС с графитовой печью длится от 2 до 3 мин, а пламенной — менее 10 с.

Атомная ширина линии — важный параметр для понимания ААС. Лампа с полым катодом эмитирует много отдельных атомных линий, характерных для используемого материала катода, например меди или железа. Ширина линии определяется двумя факторами: (1) временем жизни возбужденного атома и (2) доплеровским уширением. Ширина

линии и время жизни связаны между собой принципом неопределенности Гейзенберга:

$$\Delta\nu_{LT}\Delta\tau_{LT} \geq 1$$

Для атомов это соответствует среднему интервалу времени между столкновениями. При температуре 2 500 К и давлении 1 000 гПа получаем  $\Delta\nu_{LT} = 10^{11}$  Гц. Выбрав длину волны 300 нм (ей соответствует частота  $10^{15}$  Гц), получаем:

$$\frac{\Delta\nu}{\nu} \approx \frac{\Delta\lambda}{\lambda} = 10^{-4}$$

Следовательно,  $\Delta\lambda = 0,03$  нм = 0,3 Å.

Доплеровское уширение определяется уравнением:

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = \frac{v}{c}$$

где  $v$  — относительная скорость излучателя и приемника, а  $c$  — скорость света. Для температуры 2 500 К и средней скорости 1 500 м/с получаем:

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = 5 \times 10^{-6}$$

что значительно меньше величины уширения из-за столкновений.

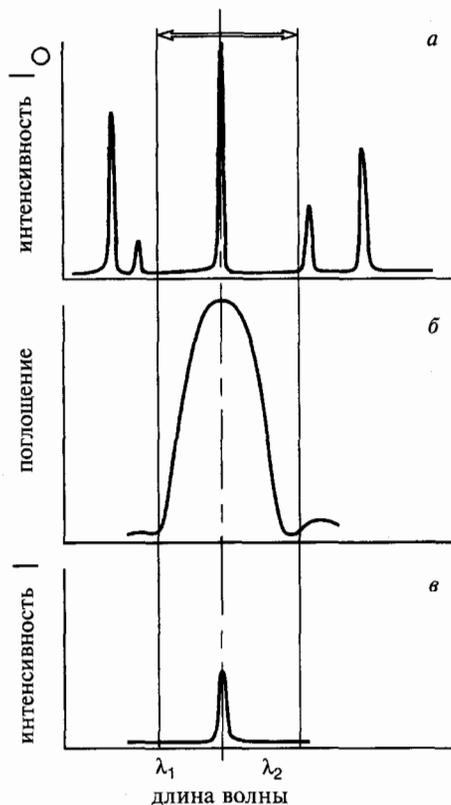
Параметры атомно-абсорбционной спектроскопии представлены на рис. 4.2. Доминантная линия, излучаемая специальной (низкого давления) газоразрядной лампой с полым катодом, имеющая ширину приблизительно  $10^{-4}$  Å и интенсивность  $I_0$ , проходя через пламя или нагретую графитовую печь, поглощается, и возникает такая же спектральная линия, но в 1 000 раз большей ширины. После соответствующего ослабления интенсивность излучения  $I$  детектируется фотомножителем.

#### 4.1.1. Пламенный метод

Действительная температура пламени в данном методе спектроскопии не играет важной роли. Более важным параметром является длина пламени, проходимою измеряющим лучом света, так как количество поглощений зависит от объема зондируемых паров атомов образца и от концентрации этих атомов в пламени в их основном состоянии. Следовательно, свет должен проходить через длинное узкое пламя (например, длиной 10 см), создаваемое щелевой форсункой.

В соответствии с законом распределения Больцмана:

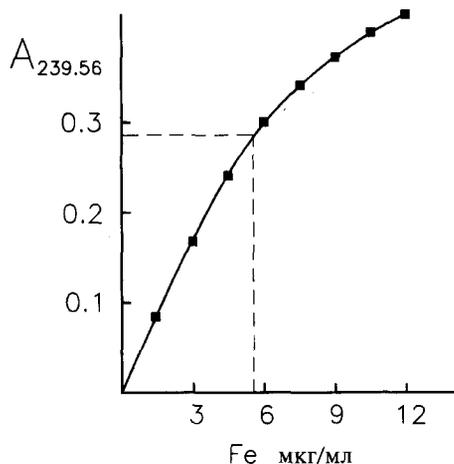
$$\frac{N_1}{N_0} = e^{-\frac{E_0 - E_1}{kT}} \quad (4.1)$$



**Рис. 4.2.** *a* — Лампа с полым катодом и низким давлением наполняющего газа (1 гПа) дает спектральные атомные линии шириной порядка  $10^{-4}$  Å и интенсивностью  $I_0$ . *б* — В зависимости от метода ААС (пламенный или графитовый) свет, проходя через пары образца при нормальном давлении 1 000 гПа, дает спектральную линию с шириной в 1 000 раз большей, порядка  $10^{-1}$  Å. *в* — Монохроматор с шириной щели ( $\lambda_2 - \lambda_1$ ) от 1 до 10 Å выделяет одну атомную спектральную линию, после соответствующего ослабления свет интенсивности  $I$  детектируется соответствующим ФЭУ и преобразуется в поглощение образца  $A = \log I_0/I$ . Детали фоновой коррекции представлены в главе 4.1.3

где  $N_0$  и  $N_1$  — количество атомов в основном и возбужденном состоянии, соответственно,  $E_0$  и  $E_1$  — соответствующие энергии,  $k$  — постоянная Больцмана, а  $T$  — абсолютная температура. При температуре пламени 2 000 К только 2% анализируемых атомов переходят в возбужденное состояние, а основная масса остается все еще в основном состоянии. Это позволяет определить поглощение, а затем, после коррекции нулевой линии и калибровки, — и концентрацию элемента. Однако необходимо иметь в виду, что с пламенным распылителем вследствие потерь в действительности более 90% образца не анализируется (см. главу 3.8).

В соответствии с законом Ламберта — Бера, концентрация  $c$  газообразного вещества определяется по уравнению  $A = \epsilon \times c \times l$  (ср. с уравнением 5.5).



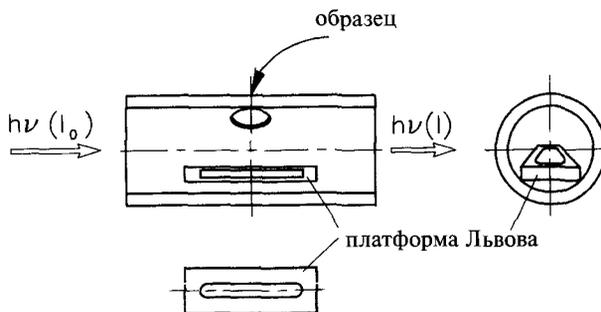
**Рис. 4.3.** Калибровочная кривая при измерениях концентрации железа методом ААС. Определенной концентрации в мкг/мл, откладываемой по оси  $x$ , соответствует величина поглощения, откладываемая по оси  $y$ . Различные причины отклонения от прямолинейной зависимости приведены в главе 5

Однако большое количество неопределенных параметров, таких как температура пламени, световой путь, рассеяние света и молекулярное поглощение, приводят к существенным отклонениям от закона Ламберта — Бера. Поэтому для каждого отдельного измерения в ААС требуется построение калибровочных кривых, типа представленной на рис. 4.3.

#### 4.1.2. Метод графитовой печи

Графитовая печь имеет много преимуществ по сравнению с открытым пламенем. Она является более эффективным атомизатором, что позволяет проводить измерения значительно меньших объемов при более низких концентрациях образца, так как более высокая концентрация атомов создается в меньшем ограниченном объеме. Помимо того, она обеспечивает «восстанавливающее» окружение для легко окисляющихся образцов путем продувки инертным газом, аргоном или азотом. Температуру печи можно выставлять постепенно и с большой точностью. Таким образом, образец мягко высушивается, органический материал сжигается дотла, а затем атомизируется.

Графитовая трубка длиной  $\sim 30$  мм с внутренним диаметром  $\sim 6$  мм помещается на пути света в атомно-адсорбционном спектрометре (см. рис. 4.4). Внутри трубки размещена так называемая платформа Львова из пирографита. Следует отметить, что и трубка, и платформа изготавливаются из очень качественного графита, содержащего чрезвычайно низкие концентрации примесей. Приложение переменного напряжения на концы графитовой трубки вызывает в ней ток до 400 А, а высокое электрическое сопротивление трубки вызывает ее разогрев до  $3\ 000^\circ\text{C}$ . Требуемое для исследования количество образца — от 0,1 до 5,0 мг.



**Рис. 4.4.** Основой АА спектрометра с атомизацией в графитовой печи является графитовая трубка длиной 30 мм и внутренним диаметром 6 мм. Так называемая платформа Львова изготавливается из высококачественного пироуглерода с очень низким процентом примесей, что позволяет проводить обнаружение ультрамалых количеств образца

#### 4.1.3. Фоновое поглощение

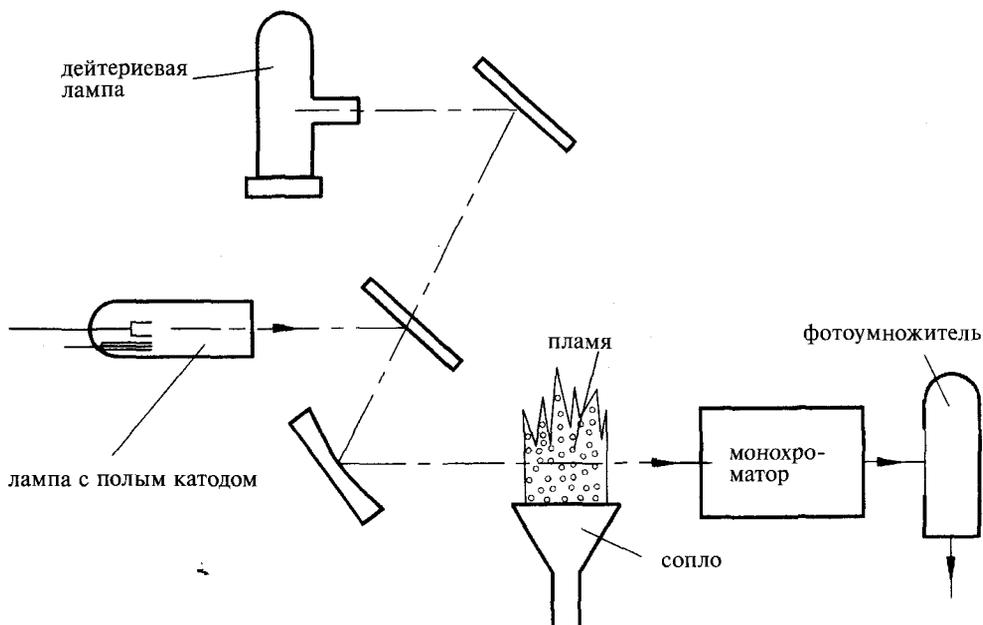
Свет, излучаемый лампой с полым катодом, поглощается не только отдельными исследуемыми атомами в газообразном состоянии, но и ослабляется также неспецифическим поглощением или рассеянием матрикса. Например, при измерении концентрации свинца в морской воде в диапазоне частот/миллион каждый атом свинца окружен 10 миллионами частиц соли. Поэтому, даже если исследуемый элемент атомизирован в большой степени, всегда имеется определенное количество других молекул и твердых частиц, которые значительно ослабляют применяемый при исследовании свет. В ААС, особенно в методе графитовой печи, необходима коррекция на это неспецифическое ослабление.

В 1965 г. был разработан метод коррекции на основе источника света с непрерывным спектром, который используется до сих пор. Сначала луч света от дейтериевой лампы проходит через пламя без атомов образца и заполняет целиком входную щель монохроматора. Этот неспецифический референтный (сравнительный) сигнал обозначается как  $I_0$ . Затем в пламя вводится образец и наблюдается специфическое ослабление измеряемым образцом света выбранной линии лампы с полым катодом ( $I$ ). В соответствии с законом Ламберта — Бера, концентрация  $c$  образца будет равна:

$$c = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{l\epsilon}$$

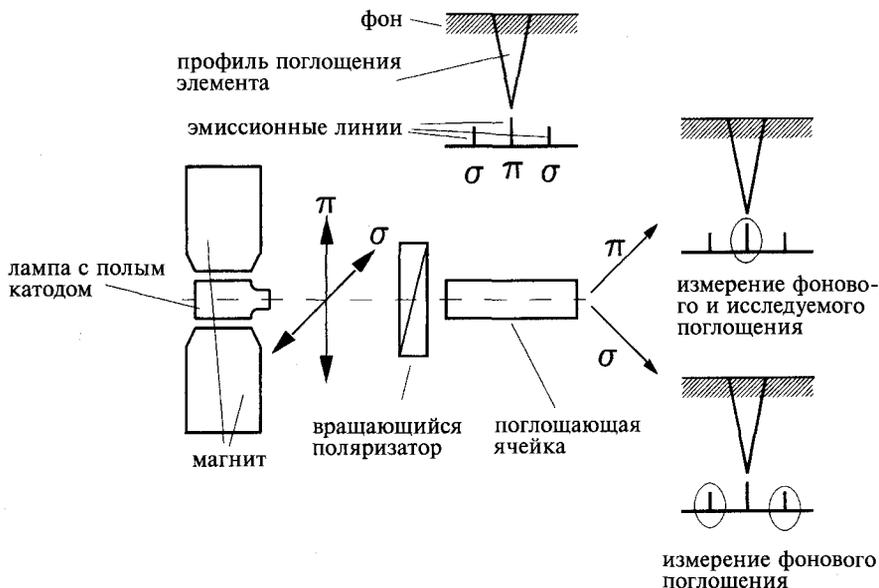
где  $l$  — длина пути луча,  $\epsilon$  — коэффициент экстинкции. Как и в молекулярной спектроскопии, измерения проводят либо в однолучевом (см. рис. 4.5), либо в дуолучевом (не показано) режиме. В современных АА спектрометрах переключение дейтериевой лампы на лампу с полым катодом производится с частотой 50—100 Гц (на рис. 4.5 это не показано).

Другая, более действенная процедура коррекции фона основана на так называемом эффекте Зеемана. Он был открыт в 1896 г. датским физиком



**Рис. 4.5.** Корректировка на фоновое поглощение в ААС (при пламенном или графитовом методе) с помощью излучателя с непрерывным спектром (дейтериевой лампы). Образец облучается либо источником света с непрерывным спектром, либо линией лампы с полым катодом, что позволяет провести коррекцию неспецифического поглощения

Питером Зееманом, и эта его совместная с Лоренцем работа была отмечена Нобелевской премией в 1902 г. В 1969 г. немецкая компания «Zeiss» получила патент на этот метод коррекции, но только в 1975 г. компания «Hitachi» выпустила первый атомно-абсорбционный спектрометр с использованием эффекта Зеемана (ZAAS), заключающегося в расщеплении электронных уровней атома под действием магнитного поля. Без внешнего магнитного поля атомные уровни с различными магнитными квантовыми числами  $m$ , вырождены, т.е. обладают одной и той же энергией (см. рис. 2.7 и 2.9). А если приложить магнитное поле, то состояния с различными магнитными квантовыми числами  $m$ , расщепляются (см. рис. 2.10). Переход электронов между состояниями возможен, если  $\Delta m_l = 0, \pm 1$  (см. главу 3.2.2.2). Следовательно, если переход без приложения внешнего магнитного поля выражается в виде единственной линии, то в его присутствии он расщепляется на три линии, известные как триплет (см. рис. 4.6). Средняя  $\pi$ -линия не изменяется энергетически и проявляет поляризацию, параллельную приложенному магнитному полю, а две боковые  $\sigma$ -линии поляризованы перпендикулярно приложенному магнитному полю. Энергия, или разница в длинах волн между тремя линиями, пропорциональна силе магнитного поля и составляет порядка  $10^{-3}$  нм. Этот так называемый нормальный эффект Зеемана; он характерен для элементов второй основной группы Периодической Таблицы и переходных элементов, таких как Ве,



**Рис. 4.6.** Принцип фоновой коррекции ААС спектров на основе эффекта Зеемана. Магнитное поле расщепляет одну спектральную линию на триплет. Средняя линия не изменяется энергетически; она называется  $\pi$ -линией. Две другие линии называются  $\sigma$ -линиями. Линии плоско поляризованы перпендикулярно друг другу, как показано на схеме. Используя вращающийся поляризатор и двуволновую процедуру, фоновый сигнал  $\sigma$  просто вычитается из полного сигнала  $\pi$ , и получается скорректированный сигнал

Mg, Cd, Pb и Zn. Аномальный эффект Зеемана наблюдается в гораздо большем количестве элементов, но ввиду сложности здесь он не будет рассмотрен.

Эмитируемые триплетные линии последовательно выделяются с помощью вращающегося поляризатора: поглощенная образцом и фоном  $\pi$ -линия или только фоном —  $\sigma$ -линии, которые затем обрабатываются с помощью двуволнового метода синхронизированным усилителем. Различные ААС приборы с использованием эффекта Зеемана представлены на рынке, но здесь они не будут рассмотрены.

## 4.2. Атомно-эмиссионная спектроскопия

Теоретически атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС) является дополнением ААС и особенно полезна для количественного многоэлементного анализа, так как не требует селективного возбуждения, как в ААС. Однако конструкция спектрометров, подготовка образца, методы измерения и пределы обнаружения этих двух типов исследований существенно отличаются. В качестве примера АЭС будет рассмотрен широко применяемый в настоящее время прибор оптической эмиссионной спектроскопии на основе индуктивно связанной плазмы (ИСП—ОЭС).

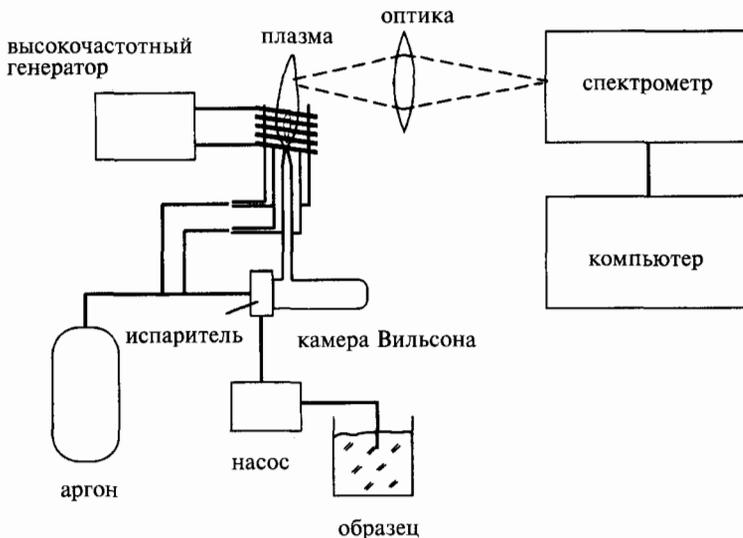


Рис. 4.7. Схема ИСП-ОЭС прибора

Аналогично ААС, в ИСП-ОЭС осуществляются три последовательных действия (см. рис. 4.7):

1. Вначале посредством вспомогательного газа образец распыляется, и получается мелкодисперсный аэрозоль с размерами капель примерно 10 мкм в диаметре. Этот процесс является одним из самых важных шагов в ИСП-ОЭС. Аналогично распыляющим камерам, в большинстве случаев применяется пневматический метод, иногда применяется ультразвуковое распыление посредством колеблющихся пьезоэлектрических преобразователей. Два потока вспомогательного инертного газа быстрый поток аэрозоля подается в высокочастотное поле большой интенсивности тороидальной силовой катушки.

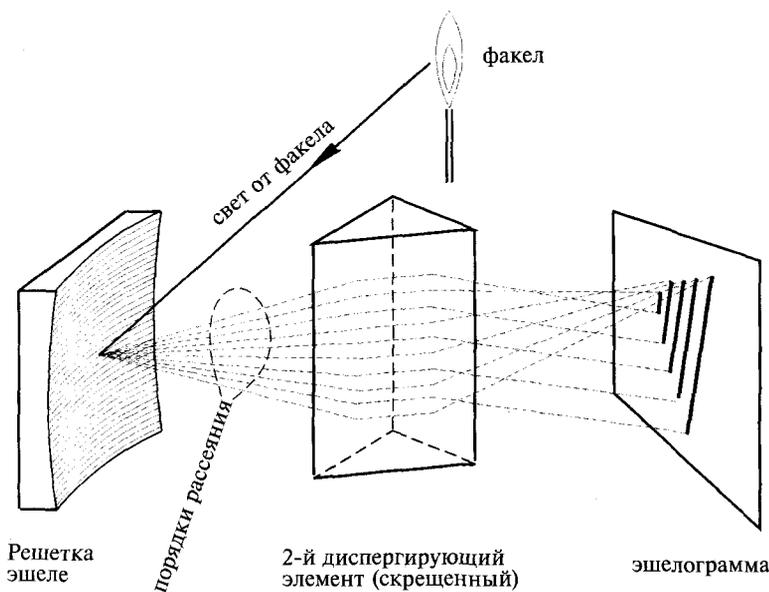
2. Внутри тороидальной силовой катушки образуется «горячая» плазма («факел») с температурой примерно 10 000 К. Энергия, затраченная на получение плазменного факела, сравнима с энергией настоящего пламени в пламенной ААС (см. выше). Она не является процессом окисления, а возникает в сильном электромагнитном поле высокой частоты. Расход аргона в таком устройстве составляет примерно от 15 до 20 л/мин и также является критической точкой в ИСП-ОЭС.

3. Наконец, оптическая система направляет свет факела в монохроматор, который выделяет и детектирует отдельные спектральные линии атомной эмиссии для дальнейшего анализа встроенным компьютером. Вследствие текущих потоков распыляемого вещества и вспомогательных газов плазменный факел неомогенен и содержит пространственно структурированные и распределенные по температуре кластеры атомов, молекул и ионов. ИСП исследуется либо сбоку, либо с торца. Для получения температуры плазмы порядка 10 000 К, при которой значительная часть (~1/3) атомов образца переходит в возбужденное состояние (см. уравнение 4.1), в ИСП-ОЭС обычно требуется мощность высокочастотного излучения

от 750 до 1 500 Вт. Частота, на которой работают ИСП—ОЭС, в основном равна 40,68 МГц.

Как ААС, так и АЭС используют небольшой спектральный диапазон ( $\Delta\lambda = \lambda/m$ ), но с высоким разрешением по длине волны ( $R = m \times N$ , см. уравнение 3.34), для чего детектирующие монохроматоры работают в порядке высокого рассеяния (например, 100-м, в отличие от типичных монохроматоров для УФ — видимой области, применяемых в молекулярной спектроскопии, работающих в первом порядке) (см. главу 3.6.3). Однако рабочий диапазон спектрометров должен составлять от 160 до 782 нм. Это неизбежно приводит к проблемам интерференции и перекрывания спектральных линий различных элементов во многих различающихся порядках рассеяния (рис. 3.38). Разработчики, прошедшие долгий путь в разрешении этих проблем, — фирмы «Becker-Rov» и «Florek» (см. дополнительную литературу). Критическим в разработке приборов ИСП—ОЭС была разработка спектрографа Эшеле. Мы объясним принцип его действия на примере современного ИСП спектрометра Optima 5300 (фирма «PerkinElmer»).

Основной принцип действия этого ИСП спектрометра заключается в использовании двух пересекающихся диспергирующих элементов, называемых решетками Эшеле (эшелями) (первоначально все решетки с пересекающимися щелями треугольной формы так назывались; сегодня этот термин остался за решетками с малой плотностью щелей, что позволяет наблюдать дисперсию высоких порядков рассеяния) (см. рис. 3.35 и рис. 4.8), и призмы. Таким образом получается двухмерная дисперсионная картинка, где одна ось отображает порядок рассеяния, а вторая — длину волны.



**Рис. 4.8.** Схема получения эшелогаммы, в которой первым диспергирующим элементом является решетка эшеле, а вторым — скрещенная призма

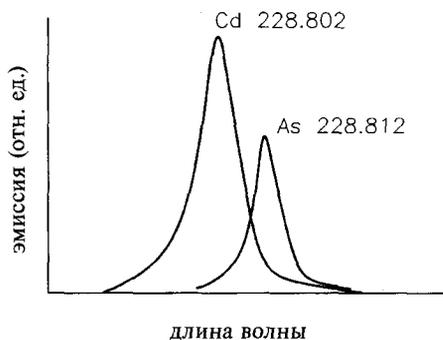
Такие эшелогаммы (см. рис. 4.9 на цветной вклейке) содержат, например для железа, сотни отдельных отражений (линий или «пятен»). Так как расположение всех этих линий с точки зрения порядка рассеяния и длины волны можно точно идентифицировать на основе калибровочных стандартов, то для выполнения совместного анализа потребуется только подходящий детектор. Они сейчас доступны в виде детектора на основе сегментированной матрицы прибора зарядовой связи (СПЗС = SCD). В отличие от общедоступного CCD детектора, применяемого в теле- и видеокамерах, он содержит несколько сотен субматриц, четко отделенных друг от друга, от 20 до 80 пикселей ( $\sim 12 \times 100$  мкм) каждая, всего их на матрице 236 по числу наиболее важных спектральных линий в ИСП спектроскопии. Каждая ячейка матрицы состоит из собственных электронных компонентов, таких как накопитель, интерфейс, память и электроника выходного сигнала, необходимая для дальнейшей обработки сигнала.



Сэр Исаак Ньютон  
(1642—1727)

*С помощью первой эшелогаммы Ньютону удалось сделать свое революционное открытие, которое позже так страстно отвергал Гете и которое так очевидно сегодня для нас: белый свет диспергируется уже первым элементом на цветовые составляющие, которые в дальнейшем не могут быть диспергированы вторым скрещенным элементом. Цвета радуги монохроматичны.*

Сегодня призмы используются только в видимом диапазоне, так как в УФ-В и УФ-С диапазонах они проявляют значительное поглощение. Поэтому схема спектрометра, изображенная на рис. 4.8, применяется только для видимой области. Для УФ диапазона между решеткой Эшеле и призмой в качестве «перекрестнодиспергирующего» элемента вводится дополнительная дифракционная решетка с малой апертурой, позволяющая видимому свету проходить, а УФ части светового потока отражаться и направляться



**Рис. 4.10.** Спектроскопией ИСП легко разрешаются даже очень близко расположенные атомарные линии различных элементов и интенсивностей, количественные измерения проводятся на основании оценки структуры целого пика

на собственный детектор (не показан на рис. 4.8). Кроме того это устройство позволяет получать неискаженные изображения, что приводит к лучшему разрешению в обеих спектральных областях. В дальнем УФ диапазоне разрешающая способность таких спектрометров составляет 6 пм, что приближается к порядку естественной ширины линии (1,5–5 пм). Рис. 4.10 демонстрирует разрешение, несмотря на их сильно различающиеся профили поглощения, двух спектральных линий мышьяка и кадмия, отличающихся между собой лишь на 0,01 нм.

До недавних пор ИСП–ОЭС применялась для определения и измерения концентрации металлов. Однако новейшие спектрометры позволяют с высокой точностью определять также и неметаллы. В таблице 4.1 приведены пределы обнаружения неметаллических примесей в воде, а также предельно допустимые концентрации (ПДК) этих веществ в питьевой воде (Данные «Analytical Instruments GmbH», Kleve, Германия).

Табл. 4.1. Пределы обнаружения (ПО) некоторых неметаллов в воде

Элемент (линия, нм)	ПО (3σ, мкг/л)	ПДК в питьевой воде, (мкг/л)
Br (163,340)	450	
Cl (134,724)	200	25 000
I (161,761)	55	
P (178,290)	3,9	400
S (182,037)	6,5	8 300 (общая)
S (180,734)	3,5	8 300

Одним из новейших применений ИСП–ОЭС является определение неметаллических примесей, в частности галогенов и серы, в таких органических образцах, как отработанное масло. Другим примером является анализ образцов, применяемых при утилизации отходов отработанной древесины. В этих применениях необходимо определять такие элементы, как As, B, Cu, Pb, Sr и особенно Cl. Сфера применения данного метода несомненно будет расширяться с его развитием и снижением цены на спектрометры.

В 1962 г. была впервые получена плазма с температурой 10 000 К с помощью рубинового лазера. Луч импульсного лазера высокой мощности был сфокусирован в точку на образце, и была получена свободно парящая сферическая плазма, которая затем распадалась. После лазерного импульса длительностью от 5 до 20 нс плазма остывала, ионы и атомы высвобождали свою энергию подобно тому, как это происходит в плазменном факеле ИСП, частично в виде характерных эмиссионных линий. В принципе этот новый метод, названный индуцированной лазером разрушающей спектроскопией (ЛИРС = LIBS), может быть миниатюризирован и удешевлен. Будучи размером с карманный калькулятор, в будущем портативные ЛИРС-АЭС могут оказаться полезными во многих областях, в частности в науках о жизни, которые до сих пор все еще используют общедоступные ИСП-АЭС. Следует отметить также еще один более

совершенный и чувствительный метод спектрометрии на основе индуктивно связанной плазмы — ИСП-МС (масс-спектрометрия). Данный метод является мощным инструментом следового (ppb—ppm: частей на миллион—частей на миллиард) и ультраследового (ppq—ppb: частей на триллион—частей на миллиард) анализа элементов, приобретающего все большую популярность при проведении точнейших измерений. Принцип действия спектрометров этого типа основан на получении в атмосфере аргона плазмы из ионов, электронов и нейтральных частиц, которые, пройдя затем через ряд апертур, подаются в высоковакуумный масс-спектрометр. Изотопы элементов идентифицируются по отношению массы к заряду ( $m/z$ ), а интенсивность определенного пика в масс-спектре пропорциональна количеству данного изотопа элемента в образце. В таблице 4.2 сравнены чувствительности обнаружения элементов различными методами атомной спектроскопии.

Табл. 4.2. Пределы обнаружения (ПО) некоторых элементов различными методами атомной спектроскопии (воспроизведено с любезного разрешения «Perkin Elmer Inc.»)

Элемент	ПО пламенной ААС, мкг/л	ПО графитовой ААС, мкг/л	ПО ИСП—ОЭС, мкг/л	ПО ИСП-МС, мкг/л
Ag	1,5	0,005	0,6	0,002
Al	45	0,1	1	0,005 <sup>a</sup>
As	150	0,05	2	0,0006 <sup>b</sup>
Au	9	0,15	1	0,0009
B	1000	20	1	0,03 <sup>c</sup>
Ba	15	0,35	0,03	0,00002 <sup>d</sup>
Be	1,5	0,008	0,09	0,003
Bi	30	0,05	1	0,0006
Br				0,2
C				0,8 <sup>c</sup>
Ca	1,5	0,1	0,5	0,0002 <sup>d</sup>
Cd	0,8	0,002	0,1	0,00009 <sup>d</sup>
Ce			1,5	0,0002
Cl				12
Co	9	0,15	0,2	0,0009
Cr	3	0,004	0,2	0,0002 <sup>d</sup>
Cs	15			0,0003
Cu	1,5	0,014	0,4	0,0002 <sup>c</sup>
Dy	50		0,5	0,0001 <sup>f</sup>
Ga	75		1,5	0,0002

Элемент	ПО пламенной ААС, мкг/л	ПО графитовой ААС, мкг/л	ПО ИСП—ОЭС, мкг/л	ПО ИСП-МС, мкг/л
Gd	1800		0,9	0,0008 <sup>g</sup>
Ge	300	0,6	1	0,016 <sup>i</sup>
Hf	300		0,5	0,0008
Hg	300	0,6	1	0,016 <sup>i</sup>
Ho	60		0,4	0,00006
I				0,002
In	30		1	0,0007
Ir	900	3,0	1	0,001
K	3	0,005	1	0,0002 <sup>d</sup>
La	3000		0,4	0,0009
Li	0,8	0,06	0,3	0,001 <sup>c</sup>
Lu	1000		0,1	0,00005
Mg	0,15	0,004	0,04	0,0003 <sup>c</sup>
Mn	1,5	0,005	0,1	0,00007 <sup>d</sup>
Mo	45	0,03	0,5	0,001
Na	0,3	0,005	0,5	0,0003 <sup>c</sup>
Nb	1500		1	0,0006
Nd	1500		2	0,0004
Ni	6	0,07	0,5	0,0004 <sup>c</sup>
Os			6	
P	75000	130	4	0,1 <sup>a</sup>
Pb	15	0,05	1	0,00004 <sup>d</sup>
Pd	30	0,09	2	0,0005
Pr	7500		2	0,00009
Pt	60	2,0	1	0,002
Rb	3	0,03	5	0,0004
Re	750		0,5	0,0003
Rh	6		5	0,0002
Ru	100	1,0	1	0,0002
S			10	28 <sup>j</sup>
Sb	45	0,05	2	0,0009
Sc	30		0,1	0,004
Se	100	0,05	4	0,0007 <sup>b</sup>
Si	90	1,0	10	0,03 <sup>a</sup>

Элемент	ПО пламенной ААС, мкг/л	ПО графитовой ААС, мкг/л	ПО ИСП—ОЭС, мкг/л	ПО ИСП-МС, мкг/л
Sm	3000		2	0,0002
Sn	150	0,1	2	0,0005 <sup>a</sup>
Sr	3	0,025	0,05	0,00002 <sup>d</sup>
Ta	1500		1	0,0005
Tb	900		2	0,00004
Te	30	0,1	2	0,0008 <sup>k</sup>
Th			2	0,0004
Ti	75	0,35	0,4	0,003 <sup>i</sup>
Tl	15	0,01	2	0,0002
Tm	15		0,6	0,00006
U	15000		10	0,0001
V	60	0,1	0,5	0,0005
W	1500		1	0,005
Y	75		0,2	0,0002
Yb	8		0,1	0,0002 <sup>m</sup>
Zn	1,5	0,02	0,2	0,0003 <sup>d</sup>
Zr	450		0,5	0,0003

Все пределы обнаружения даны в микрограммах на литр и определены по стандартам элементов в разбавленном водном растворе при условии 98% доверительного интервала (3 стандартных отклонения).

Все пределы обнаружения атомной абсорбцией были определены на основе оптимизированных для каждого элемента инструментальных параметрах, включая использование безэлектродных разрядных ламп системы 2. Данные получены на приборе AAnalyst™ 800.

Все пределы обнаружения ИСП—ОЭС (Optima 4300/5300) были получены в условиях многоэлементного анализа при осевом наблюдении двойной плазмы с использованием распылительной камеры циклонного типа и концентрического распылителя.

Пределы обнаружения ртути в виде холодного пара определены на проточно-инжекционной системе FIAS-100 или FIAS-400 с приставкой для амальгамирования.

Предел обнаружения без амальгамирования 0,2 мкг/л лампой с полым катодом, 0,05 г/л — безэлектродной разрядной лампой системы 2. (Предел обнаружения Hg на ртутном анализаторе FIMS-100 или FIMS-400 <0,005 и <0,0002 мкг/л без и с приставкой для амальгамирования, соответственно).

Пределы обнаружения ААС с графитовой печью определены на приборе AAnalyst 800 с использованием 50 мкл образцов, интегрированной платформы и в соответствии с условиями STPF. В дальнейшем пределы обнаружения посредством графитовой печи были улучшены повторными впрысками.

Если не указано иначе, пределы обнаружения ИСП-МС получены на ELAN 6100/9000, снабженном распылительной камерой Rytan, распылителем поперечного потока II типа и никелевыми конусами.

Все пределы обнаружения были получены при 3-х секундном времени интегрирования и минимум в 8 повторных измерениях.

Ссылки в пределах обнаружения ИСП-МС относятся к применению особых условий и означают: *a* — анализ в стандартном режиме на ELAN DRC с использованием Pt конусов и кварцевой системы введения образца; *b* — анализ в режиме DRC на ELAN DRC с использованием Pt конусов и кварцевой системы введения образца; *c* — анализ в стандартном режиме на ELAN DRC в чистой комнате класса 100 с использованием Pt конусов и кварцевой системы введения образца; *d* — анализ в режиме DRC на ELAN DRC в чистой комнате класса 100 с использованием Pt конусов и кварцевой системы введения образца; *e* — с использованием C-13; *f* — Dy-163; *g* — Cd-157; *h* — Ge-74; *i* — Hg-202; *j* — S-34; *k* — Te-125; *l* — Ti-49; *m* — Yb-173.

### 4.3. Интерференция

Как уже отмечалось в главе 4.1.3 по коррекции фона, ААС является относительным методом. Количественные измерения требуют построения калибровочных кривых типа приведенных на рис. 4.3. Различные нарушения, называемые термином «интерференция», приводят к отклонениям от эталонного материала при измерении реального образца. Следует различать физическую интерференцию и химическую интерференцию.

Любой процесс, нарушающий количественную атомизацию определяемого элемента, называется *химической интерференцией*. Например, если необходимо определить кальций в растворе, в котором присутствуют  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{SO}_4^{2-}$ , то прежде всего образуется  $\text{CaSO}_4$ , который в пламени немедленно превращается в  $\text{CaO}$ . С другой стороны, если использовать в качестве эталонного раствора раствор  $\text{CaCl}_2$ , то  $\text{CaO}$  не образуется.  $\text{CaO}$  лишь слегка атомизируется в обычном воздушно-ацетиленовом пламени. Это означает, что в присутствии ионов сульфата определится меньше  $\text{Ca}$ , чем без них. Это и называется химической интерференцией. Основным методом предотвращения химической интерференции является добавление других катионов в избытке, которые образуют более стабильные соединения с интерферирующим анионом. В рассматриваемом примере необходимо в раствор добавить барий в виде  $\text{BaCl}_2$ , и сульфат превратится в более нерастворимый  $\text{BaSO}_4$ , оставив  $\text{Ca}$  в виде  $\text{CaCl}_2$ .

Все процессы, влияющие на общее количество газообразных атомов, называются *физической интерференцией*. В основном все они обусловлены пневматическим распылителем. Важными параметрами при этом являются различия в плотности, вязкости и поверхностном натяжении образца и эталона. Основным методом предотвращения физической интерференции является как можно большее разведение образца.

В зависимости от ее температуры поглощающая кювета содержит не только атомы в основном состоянии, но и частично термически возбуж-

денные или даже ионизованные, причем как определяемые, так и прочие атомы, способные излучать свет. Поэтому на фотодетектор попадает не только ослабленное излучение от лампы с полым катодом, как от первичного источника света, но и излучение от возбужденных атомов или ионов, не обязательно идентичных определяемым атомам. Это вносит значительные погрешности измерения, которые называются *спектральной интерференцией*. Если эту дополнительную эмиссию нельзя исключить спектрально монохроматором, то детектируется ослабленное излучение, что приводит к заниженному определению концентрации определяемого образца. Основным методом предотвращения спектральной интерференции является модулирование света лампы с полым катодом, например частотой 50 Гц. Это позволяет обработкой сигнала ФЭУ с помощью синхронизированного по частоте и фазе усилителя, настроенного на сигнал 50 Гц, отличать сигналы излучения с частотой переменного тока от сигналов постоянного тока, получаемых от термически возбужденных атомов.

#### 4.4. Дополнительная литература

Becker-Roß, H., Florek, S. *Echelle Spectrometers and Charge Coupled Devices*, Spec-trochim. Acta, Part B, **1991**, 52.

Boumanns, P. W. J. M., ed. *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy — Parts 1 and 2*, in Elving, P.J., Winefordner, J.D., eds., *Chemical Analysis Vol. 90*, John Wiley & Sons, New York, **1987**.

Dean, J.R., Ando, D.J. *Atomic Absorption and Plasma Spectroscopy*, 2nd edn., Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.

Ebdon, L., Evans, E.H., Fischer, A.S. eds. *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*, John Wiley & Sons, New York, **1998**.

Haswell, S.J. *Atomic Absorption Spectrometry: Theory, Design and Applications*, Elsevier, Amsterdam, **1991**.

Heckmann, P.H., Trabert, E. *Introduction to the Spectroscopy of Atoms*, North Holland, Amsterdam, **1989**.

Hill, S.J., ed. *ICP Spectrometry and its Applications*, Sheffield Academic Press, Sheffield, **1998**.

Hollas, J.M. *High Resolution Spectroscopy*, John Wiley and Sons Ltd., **1998**.

Jenniss, S.W. *Application of Atomic Spectrometry to Regulatory Compliance Monitoring*, John Wiley & Sons, Chichester, **1997**.

Jackson, K.W. *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **1999**.

Kurfürst, U. *Solid Sample Analysis. Direct and Slurry Sampling Using GF-AAS and ETV-ICP*, Springer, Heidelberg, **1998**.

Laitinen, H.A., Ewing, G.W., eds. *A History of Analytical Chemistry*, American Chemical Society, Washington, D. C., **1977**.

Montaser, A., Golightly, D.W., eds. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, 2nd edn., Verlag Chemie (VCH), Weinheim, **1992**.

Moore, G.L. *Introduction to Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, **1988**.

Schlemmer, C, Radziuk, B. *Analytical Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Birkhäuser Verlag AG, Basel, 1998.

Snedden, J., Lee, Y.I., eds. *Lasers in Analytical Atomic Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York, 1997.

Svanberg, S. *Atomic and Molecular Spectroscopy. Basic Aspects and Practical Applications. Springer Series on Atomic, Optical, and Plasma Physics, Vol. 6*, Springer, Heidelberg, 1996.

Varma, A. *Handbook of Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, 1990.

Welz, B., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U. *High-Resolution Continuum Source AAS*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

# ГЛАВА 5

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

*Vebra docent, exempla trahunt*

*Слова учат, примеры убеждают*

*Неизвестный античный автор*

В главе 3 были рассмотрены принцип действия и конструкции монохроматоров на основе призмы и дифракционной решетки (см. рис. 3.22), а также необходимые для них оптические компоненты. На их основе в главе 4 были рассмотрены основы атомно-абсорбционной и эмиссионной спектроскопии. В этой главе будут рассмотрены основы молекулярной абсорбционной спектроскопии, а в главе 6 — основы молекулярной эмиссионной спектроскопии.

### 5.1. Закон Бугера — Ламберта — Бера

#### 5.1.1. Вывод закона

Из схемы, приведенной на рис. 3.1, ясно, что задачей абсорбционной спектрометрии является определение того, в какой степени образец пропускает свет определенной длины волны  $\lambda$ . В этом контексте «свет» определяется как энергия спектрального излучения  $\Phi_e(\lambda)$  ( $\text{Вт нм}^{-1}$ ) или как плотность потока излучения на единицу поверхности ( $\text{Е м}^{-2} \text{с}^{-1}$ ) (см. главу 3.2). Для упрощения и без применения специфических единиц измерения света обозначим интенсивность падающего света в точке  $x = 0$  как  $I_0$ , а интенсивность в точке  $x$  — как  $I$  (см. рис. 5.1). Бугер в 1729 г. и Ламберт в 1760 г. установили, что ослабление света, проходящего через прозрачную среду, пропорционально интенсивности света  $I$  и толщине исследуемого образца  $dx$  (закон Бугера — Ламберта):

$$dI \propto I \times dx$$

Введя коэффициент поглощения (экстинкции)  $a(\lambda)$ , получим:

$$dI = a(\lambda) \cdot I \cdot dx \quad (5.1)$$



**Иоганн Генрих  
Ламберт**  
(1728—1777)

Закон Бугера — Ламберта применим только при особых условиях, которые не всегда выполняются, в особенности при исследовании биологических образцов, таких как белки или различные суспензии. Условия, при которых выполняется закон Бугера — Ламберта:

- падающий свет должен быть монохроматическим и коллимированным (параллельным);
- исследуемые молекулы должны быть диспергированы до молекулярного, т.е. гомогенного, уровня, они не должны рассеивать свет и взаимодействовать друг с другом;
- рассеяние и отражение от поверхности образца подобно поглощению также уменьшают интенсивность света, поэтому они также должны быть исключены.

В дополнение к этому в 1852 г. Бер обнаружил, что для большинства растворов поглощающих молекул коэффициент пропорциональности  $a(\lambda)$  в уравнении 5.1 сам пропорционален концентрации  $c$  определяемой молекулы. Объединив открытие Бера с законом Бугера — Ламберта, получим закон Бугера — Ламберта — Бера (обычно сокращаемого до закона Ламберта — Бера):

$$dI = -a(\lambda) \cdot c \cdot I \cdot dx \quad (5.2)$$

Интегрирование уравнения 5.2 по всей толщине  $x$  образца дает:

$$I = I_0 e^{-a(\lambda) \cdot x \cdot c} \quad (5.3)$$

где постоянная интегрирования  $I_0$  — интенсивность падающего на образец света, а  $I$  — интенсивность света в любом положении  $x$  внутри образца, т.е. с увеличением толщины образца интенсивность света уменьшается экспоненциально. В логарифмической форме уравнение 5.3 будет иметь вид:

$$\log \frac{I}{I_0} = -a(\lambda) \cdot x \cdot c \cdot \log(e) \quad (5.4)$$

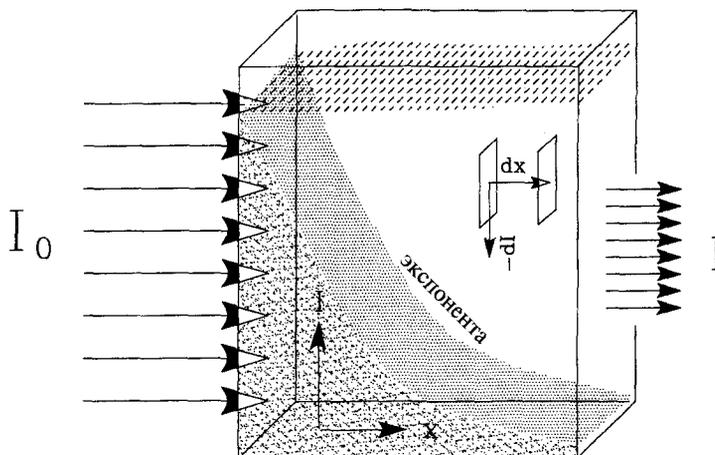
С учетом так называемого коэффициента молярной экстинкции:

$$\varepsilon(\lambda) = a(\lambda) \times 0,4343 (M^{-1} \text{cm}^{-1})$$

где  $M^{-1} = \text{л/моль}$ , получаем:

$$\log \frac{I_0}{I} = A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot x \cdot c \quad (5.5)$$

где  $\log I_0/I$ , определяемое произведением  $\varepsilon(\lambda)x$ , называется оптической плотностью или поглощательной способностью (поглощением) образца  $A(\lambda)$ .



**Рис. 5.1.** В соответствии с законом Бугера — Ламберта — Бера, интенсивность параллельного пучка света, падающего на образец, экспоненциально уменьшается с увеличением толщины образца

Молекулу можно представить в виде непрозрачного диска с поперечным сечением  $\sigma$ . Допустим, ее пронизывает фотон с частотой  $\nu$ . Если частота света значительно отличается от резонансной частоты, то эффективный диаметр диска равен нулю, а на резонансной частоте эффективный диаметр диска будет максимальным. При  $\epsilon = \sigma (6,023 \times 10^{23} / 2,33) = 2,61 \times 10^{23}$  получаем типичные поперечные сечения и коэффициенты экстинкции, приведенные в таблице 5.1.

**Табл. 5.1.** Примеры поперечных сечений и коэффициентов экстинкции

Тип спектра	$\sigma$ (см <sup>2</sup> )	$\epsilon$ (М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> )
Атомное поглощение	$10^{-12}$	$3 \times 10^8$
Молекулярное поглощение	$10^{-16}$	$3 \times 10^4$
Инфракрасное поглощение	$10^{-19}$	$3 \times 10$
Рамановское рассеяние	$10^{-29}$	$3 \times 10^{-9}$

Так как логарифм — безразмерная величина,  $A(\epsilon)$  не имеет физической размерности, а выражается только числом<sup>1</sup> (подобно тому, как «молекулярный вес» выражают в дальтонах). В таблице 5.2 приведены коэффициенты экстинкции и максимумы поглощения некоторых важных молекул, а также соответствующие им типы переходов (сравните с рис. 2.20). У аминокислот и нуклеиновых кислот полосы поглощения часто образуются различными одновременно происходящими переходами.

<sup>1</sup> Прим. редактора: оптическую плотность оценивают в Беллах или ЕОП (единицах оптической плотности)

Табл. 5.2. Коэффициенты экстинкции некоторых биологически важных молекул на длине волны максимального поглощения, включая отнесение типов перехода

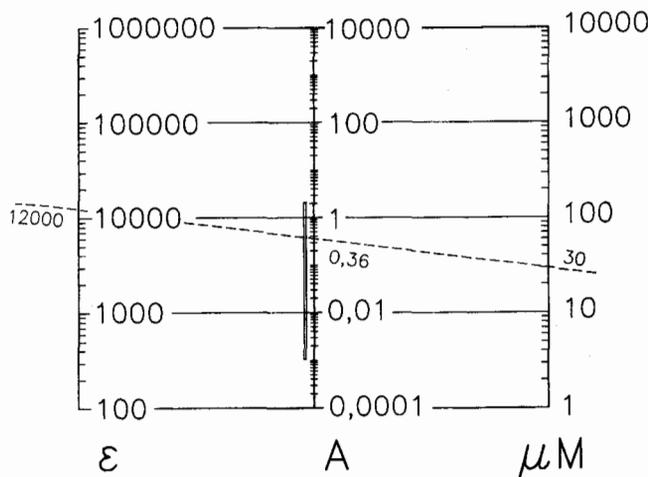
Тип молекулы	$\lambda_{\max}$ (нм)	$\epsilon$ ( $M^{-1} \text{ см}^{-1}$ )	Переход
Радикал флавина	600	5000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Флавин (окисленная форма)	450	12000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Каротин	450	120000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Цитохром с	420	126000	Рис. 5.31
Хлорофилл <i>a</i>	420	85000	
Триптофан	280	5600	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
Триптофан	219	7000	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
Аденин	260	13400	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
Гуанин	275	8100	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
Цитозин	267	6100	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
Тимин	264	7900	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
ДНК	258	6600	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
РНК	258	7400	$n \rightarrow \pi^*$ , $\pi \rightarrow \pi^*$
Бензол	~256	215	$\pi \rightarrow \pi^*$
Бензол	~180	60000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Фенол	~210	2200	$\pi \rightarrow \pi^*$
Метанол	177	200	$n \rightarrow \sigma^*$
Вода	167	7000	$n \rightarrow \sigma^*$
Этилен	163	15000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Гексан	150	?	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
Этан	135	?	$\sigma \rightarrow \sigma^*$

Пропускание  $T$  — это отношение интенсивности потока световой энергии, прошедшего через слой исследуемого вещества  $I$ , к интенсивности падающего потока световой энергии  $I_0$ :

$$T(\lambda) = \frac{I}{I_0} \quad (5.6)$$

$$A(\lambda) = -\log T(\lambda)$$

Таким образом, поглощение  $A$ , в отличие от пропускания  $T$ , пропорционально концентрации исследуемого образца. Этот вывод позволяет производить быстрое оптическое измерение концентрации. Для этой цели полезна номограмма, приведенная на рис. 5.2.



**Рис. 5.2.** Номограмма для определения поглощения  $A$  образца с известным коэффициентом экстинкции  $\epsilon$  ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) и заданной концентрацией ( $\mu M$ ). Например,  $30 \mu M$  окисленный флавин с  $\epsilon = 12\,000$  при толщине  $1$  см дает величину  $A = 0,36$

### 5.1.2. Отклонения от закона

Часто наблюдаются явные и реальные отклонения от закона Ламберта — Бера. Поэтому в сомнительных случаях необходимо экспериментальное подтверждение закона. Экстинкция  $E$ , оптическая плотность  $OD(\lambda)$ , а также  $-\log T(\lambda)$  только тогда идентичны  $A(\lambda)$ , когда выполняются условия закона Бугера — Ламберта — Бера. А именно, свет в образце должен ослабевать только из-за поглощения, но не отражения или рассеяния.

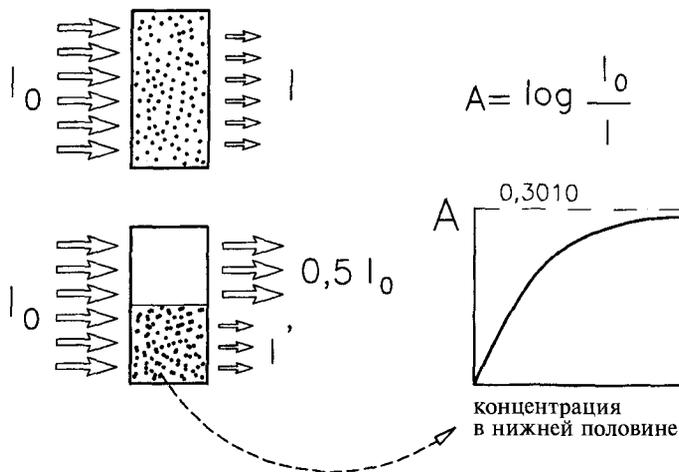
*Экстинкция определяется как суммарное ослабление света образцом за счет поглощения, отражения и рассеяния (см. ниже). Однако термин «коэффициент экстинкции» относится только к поглощению света молекулой.*

Дальнейшие очевидные отклонения вызваны концентрационно зависимой агрегацией и образованием комплексов, в основе чего лежит взаимодействие дипольных моментов перехода (гипо- и гиперхромизм, см. главу 5.4.2) или изменение констант диссоциации, как, например, в кислотах ( $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$ ).

Важно отметить, что часто наблюдаемое отклонение закона Ламберта — Бера связано с так называемым эффектом сита, который представлен на рис. 5.3. Он обусловлен неоднородным распределением поглощающего вещества. При однородном распределении поглощение определяется как:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

$A = 1$  при  $I = 0,1 I_0$ . Если предположить, что при гипотетическом эксперименте все частицы заключены в нижней половине кюветы (например, хлорофилл, находящийся в хлоропластах фотосинтетических клеток), то получим максимальное поглощение  $A = 0,3010$ , если нижняя часть кю-



**Рис. 5.3.** Иллюстрация эффекта сита, приводящего к ошибке в измерении концентрации неомогенно распределенных компонентов. Если теоретически разместить все обладающие поглощательной способностью молекулы в нижней половине кюветы, то оптическое поглощение достигнет только максимального значения, равного  $\log(2/1) = 0,3010$ , даже если нижняя половина кюветы будет заполнена полностью ( $\epsilon = \infty$ )

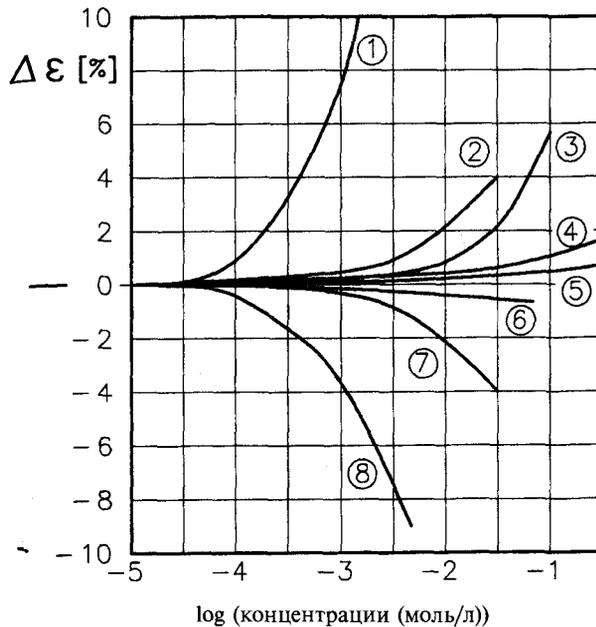
веты совсем не пропускает свет — независимо от исследуемых молекул. В результате неомогенного распределения измеряемых молекул в образце образуются «дырки», через которые кванты света будут проходить без взаимодействия с поглощающим веществом (как сквозь сито). Следовательно, закон Ламберта — Бера не будет выполняться.

Более или менее удовлетворительно дисперсионными теориями можно теоретически описать коэффициент экстинкции ( $\epsilon$  или  $a$ ), показатель преломления  $n$ , уравнения Френеля, а также спектроскопии рассеяния (глава 8) и КД/ДОВ (глава 9). Они позволяют научно элегантно сформулировать законы природы в математически сложной форме. Мы уже знакомы с этой процедурой при введении комплексной волновой функции в уравнении Шредингера. Например, комплексный показатель преломления  $n' = n(1 - ik)$  содержит хорошо известный показатель преломления  $n$  в виде действительной части и в виде мнимой части — коэффициент абсорбции  $k$ .

Следует иметь в виду, что закон Ламберта — Бера применим только к разбавленным растворам. Следовательно, даже в идеальных условиях его применение ограничено и вне определенных границ приводит к существенным отклонениям. В соответствии с теорией дисперсии, вместо коэффициента  $\epsilon$  предпочтительней использовать так называемое молярное преломление  $R$ :

$$R_{mol} = \epsilon \frac{n}{(n^2 + 2)^2} \quad (5.7)$$

которое не зависит от концентрации, где  $n(\lambda)$  — показатель преломления среды (буфера) (см. главу 3.6.1). Так как показатель преломления  $n$



**Рис. 5.4.** Отклонения от закона Ламберта — Бера для различных ионов в водных растворах по сравнению с раствором очень низкой концентрации ( $10^{-5}$  моль/л). (1) Анион эозина на 366 нм, (2) анион эозина в растворе KI на 546 нм, (3) ион 2,4 динитрофенолята в водном растворе фенола на 436 нм, (4) ион 2,4 динитрофенолята в растворе KCl на 436 нм, (5)  $\text{NO}_2^-$ , (6)  $\text{CrO}_4^{2-}$  на 436 нм, (7) ион 2,4 динитрофенолята в растворе  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  на 436 нм, (8) анион эозина в растворе тетраалкиламмоний бромида на 436 нм (воспроизведено из Kortum G.Z. *Elektrochem., Angew. Physik. Chem.* 1936, 42, 287)

и  $n/(n^2 + 2)^2$ , в общем, изменяются в зависимости от концентрации, следует ожидать противоположного изменения в значении  $\epsilon$ . На рис. 5.4 продемонстрированы отклонения значений  $\epsilon$  в процентах для различных веществ при низкой их концентрации ( $10^{-5}$  М). В некоторых случаях они весьма значительны и строго индивидуальны в зависимости от типа молекулы.

Коэффициент экстинкции  $\epsilon(\lambda)$ , который описывает абсорбционные свойства как функцию распределения электронов в поглощающей молекуле, зависит от многих факторов, таких как температура (замораживание некоторых степеней свободы — см. рис. 2.22), концентрация (взаимодействие) и растворитель (микроокружение). Ниже будет обсуждаться использование этих основных возмущающих эффектов в аналитических целях.

### 5.1.3. Терминология

В данном параграфе собраны термины, которые часто используются при рассмотрении электронных спектров.

- **Хромофор:** молекула или ковалентно связанная ненасыщенная химическая группа, определяющая электронный спектр поглощения и, следовательно, цвет.

- *Ауксохром*: насыщенная химическая группа ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{Cl}^-$ ), которая сама по себе не проявляет поглощение в исследуемой спектральной области, однако в соединениях с хромофорами изменяет длину волны максимума поглощения хромофора, так же как и коэффициент экстинкции.
- *Фотохромная молекула*: молекула, которая существует в двух различных формах с различными длинами волн максимума поглощения. При облучении этой молекулы светом соответствующего максимума она переходит из одной формы в другую. Например, молекулы фитохрома, которые есть во всех высших зеленых растениях, контролируют многочисленные фотофизиологические реакции. Они существуют в физиологически неактивной красной ( $P_r$  660 нм) и активной дальней красной форме ( $P_{fr}$  730 нм) поглощения.
- *Батохромный сдвиг*: смещение длины волны поглощения к большим длинам волн в результате замещения или влияния растворения.
- *Гипсохромный сдвиг*: смещение длины волны поглощения к более коротким длинам волн в результате замещения или влияния растворения.
- *Гиперхромный эффект*: увеличение коэффициента экстинкции.
- *Гипохромный эффект*: уменьшение коэффициента экстинкции.
- *Изобестическая точка*: Длина волны  $\lambda_r$ , на которой две или более разных видов молекул в смеси характеризуются одинаковыми коэффициентами экстинкции  $\epsilon$ .

*Примечание: При определении поглощения ( $A = \log(I_0/I)$ ) всегда измеряется проходящий свет ( $I$ ), который не взаимодействует с образцом. В то же время, в соответствии с законом Ламберта — Бера, разница потоков света ( $I_0 - I$ ) считается полностью поглощенной образцом. Таким образом, поглощение измеряется непрямым методом, в отличие от измерений флуоресцентного, фосфоресцентного (см. главу 6) или фотоакустического спектра (см. главу 7). Кроме того, поглощение и эмиссия света — это квантованный процесс, т.е. сингулярное явление, которое само по себе не ведет к спектру. Спектр — это статистическое распределение длин волн большого количества молекулярных явлений. В действительности сегодня имеются (главным образом во флуоресцентных измерениях) методы, позволяющие измерять единичные атомы и молекулы. Однако по техническим причинам, связанным с высокой чувствительностью, это ограничивается флуоресцентной спектроскопией.*

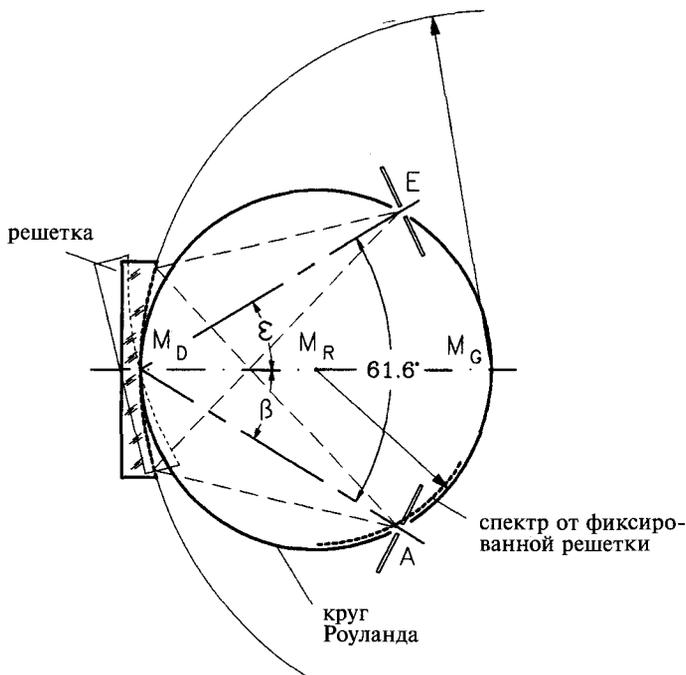
## 5.2. Монохроматоры

Как уже упоминалось в главе 3.8, в монохроматорах видимого спектрального диапазона обычно применяются дифракционные решетки, так как призмы проявляют разрешение, зависящее от длины волны. Спектрофотометр с диодной матрицей (ОМА — оптический многоканальный анализатор) обладает большими преимуществами по сравнению с другими типами, но в химии и биологии их применение ограничено. В настоящее время широкое применение получает спектроскопия Фурье (см. рис. 5.8).

### 5.2.1. Устройство монохроматоров

В монохроматорах реализуются различные пути хода луча, но все они укладываются в схему, приведенную на рис. 3.22. В процессе конструирования действует принцип оптимизации — учитываются различные факторы, такие как стоимость оптомеханических компонентов, тип диспергирующего элемента, его цена, геометрические размеры, эксплуатационные характеристики, требования к рассеянному свету, методы компенсации ошибок линз и решеток, скорость сканирования, спектральный диапазон, точность фотометрических измерений и т. д. В данной главе будут рассмотрены основные компоненты монохроматоров.

Так называемый круг Роуланда определяет характеристики изображения посредством вогнутой дифракционной решетки. Если изображение входной щели монохроматора локализуется на круге Роуланда, то и диспергированный спектр также будет размещаться на этом круге (рис. 5.5). Если, согласно Сейя — Намиока, решетка вращается, как показано на рисунке, то входная и выходная щели остаются зафиксированными. Эта особенность позволяет конструировать простые и недорогие монохроматоры с высокой светопроходимостью. При этом



**Рис. 5.5.** Круг Роуланда определяет свойства изображения, создаваемого сферической вогнутой дифракционной решеткой. Его диаметр соответствует радиусу кривизны этой решетки. Если изображение входной щели  $E$  монохроматора локализуется в каком-либо месте круга Роуланда, то и спектр также будет размещаться только на этом круге. Кроме того, показана голографическая решетка Сейя - Намиока во вращающемся приспособлении, требующая фиксированного угла между входной и выходной щелями (в данном случае это  $61,6^\circ$ )

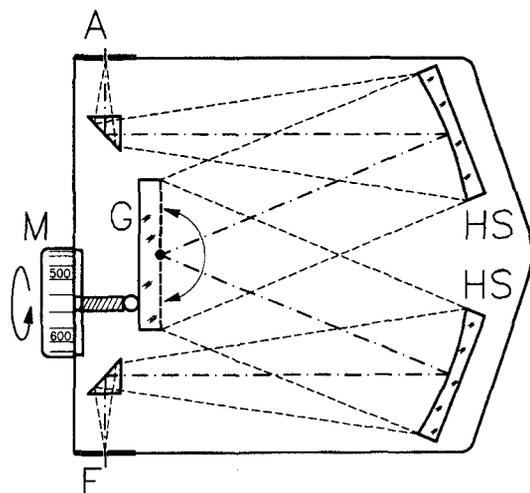
можно использовать всего несколько оптических компонентов и получить невысокий уровень рассеянного света. Угол между входной и выходной щелью указывается производителем (а определяется он голографическими методами), например, для решетки на рис. 5.5 он составляет  $61,6^\circ$ . Его нужно очень тщательно выдерживать для предотвращения расфокусировки.

Очень часто применяется монохроматор Черни — Тернера (см. рис. 5.6), в котором плоская дифракционная решетка вращается, а изображение входной щели с помощью двух параболических зеркал (см. главу 3.5.3) без искажений формируется на выходной щели. Преимуществом данного монохроматора является отсутствие ошибок комы.

*Если условие синусов (см. главу 3.5.3) не выполняется, получается искаженное изображение, лежащее в большей части вне оптической оси, что называется комой.*

Вместо зеркальных поверхностей в спектрофотометрах в качестве отклоняющих луч элементов часто используются отражающие призмы. Их действие основано на полном отражении, что более эффективно в большем диапазоне длин волн по сравнению с зеркалами. Замена двух фокусирующих зеркал одним большего размера называется «устройством Эберта», которое предпочтительно при конструировании небольших монохроматоров.

Матричный спектрофотометр, называемый также синхронным, так как обеспечивает мониторинг всего спектра длин волн одновременно, не имеет выходной щели. Диспергированный спектр проецируется на диодную матрицу с 512 или 1 024 микродиодами общей шириной, как правило, 25 мм и измеряется одновременно (см. рис. 5.7 на цветной вклейке). В матричных спектрометрах нет движущихся частей, поэтому их конструкция гораздо проще, что дает много преимуществ.



**Рис. 5.6.** Часто применяемая конструкция монохроматора Черни-Тернера с плоской решеткой и механической синус-коррекцией. Используя подходящую настройку призмы, юстируют входящий и выходящий лучи вдоль прямой линии. Вогнутые зеркала (HS) обеспечивают симметричное изображение входной щели (E) на выходной щели (A)

Мониторинг спектра матричный спектрометр осуществляет с очень высокой скоростью, зависящей от типа схемы считывания диодной матрицы, и только это является лимитирующим время шагом. Однако это преимущество порождает и недостатки таких спектрометров:

- обычно образец облучается интенсивным белым светом, т.е. дополнительными длинами волн, лежащими вне контролируемой области. Это приводит к усиленному выцветанию фоточувствительных образцов (к фотолизу);
- образец является частью светового пути изображения. Это требует, чтобы образец был прозрачным и нерассеивающим, иначе спектральное разрешение и светопроходимость значительно уменьшатся, рассеяние увеличится, а динамика и чувствительность системы снизятся;
- спектральное разрешение здесь определяется не щелью, а дифракционной решеткой и диодной матрицей, а следовательно, является фиксированным. Это требует применения различных взаимозаменяемых решеток, что очень дорого (см. главу 5.2.2);
- активная площадь фотодиодной матрицы на длину волны чрезвычайно мала (25 мкм  $\times$  2,5 мм). Таким образом, чувствительность матричных спектрометров невелика по сравнению с общедоступными спектрофотометрами;
- чувствительность матричных спектрометров в области короче 250 нм обычно низка;
- уровень рассеянного света в просмотрном режиме (спектр с низким спектральным разрешением) достигает 3%, что очень много. Понизить этот уровень до 0,05% можно, снижая скорость мониторингования с 5 мс до 1 с на спектр (усреднение, высокоточный режим). При этом теряется основное преимущество матричных спектрометров;
- скорость мониторинга целого спектра в режиме предварительного просмотра составляет обычно 0,1 с, в режиме точного измерения — 2—14 с (например, в Lambda Gray 3840 фирмы «PerkinElmer»). Мониторинг со скоростью ниже 10 мс на спектр является некорректным по ряду причин (см. главу 5.6.2);
- типичный рабочий динамический диапазон фотодиодного спектрометра составляет от 0,05 до 1 ЕОП, что намного меньше, чем у сканирующего спектрофотометра с фотоумножителем (от 0,001 до 3 ЕОП);
- после измерения сигнал в цифровом виде хранится в памяти, а затем вычисляется его логарифм. Результат измерения, таким образом, получается в логарифмической шкале, и разрешающая способность также получается в логарифмической шкале. Например, если суммарный фотометрический диапазон  $A = 2$ , а линейный сигнал хранится с типичной разрешающей способностью 16 бит, то наименьшее разрешение от  $A = 0$  до  $A = 0,5$  представлено только 16 точками (4 битами), а наибольшее разрешение — 61 440 точками (16 бит—12 бит).

Первые фотодиодные детекторы были линейными. В настоящее время они заменяются двумерными ССД (т.е. ПЗС (прибора зарядовой связи) матрицами), которые разрабатывались для телевизионной и видеотехники. Наиболее обычным чиповым форматом в оптической спектроскопии для таких матриц

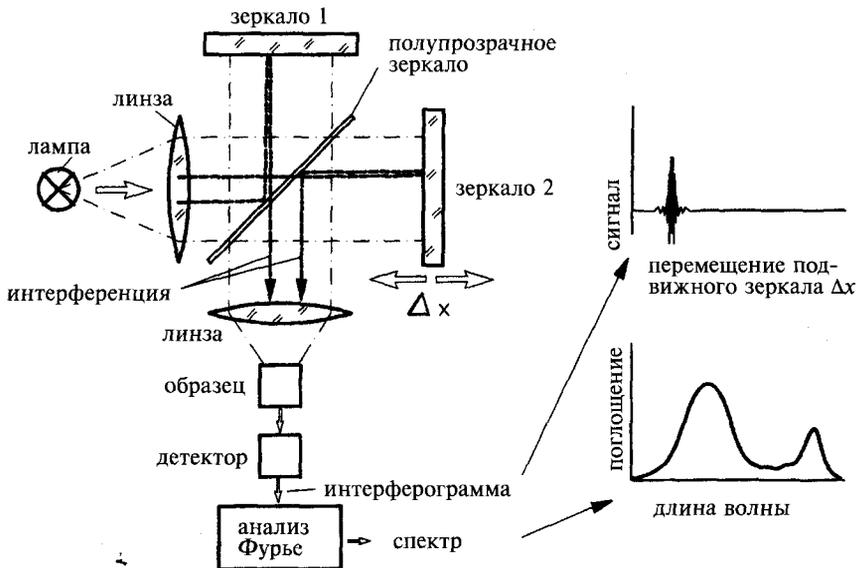
является  $1\,024 \times 256$  пикселей. Колонки из 256 пикселей каждая, соответствующие изображению линейной входной щели, соединяются в регистр и считываются как один сигнал. В CCD матрице скорость процесса считывания намного выше, и требуемый объем памяти для хранения сигнала намного меньше, что положительно сказывается на динамических характеристиках спектрометра: CCD детекторы приблизительно на два порядка величины более чувствительны и обладают более высоким динамическим диапазоном по сравнению с диодными матрицами. Но последние, в отличие от CCD, имеют более высокий уровень линейности и хороший динамический диапазон. Пиксели обычно значительно большего размера, чем для CCD чипов:  $500\text{--}2\,500$  мкм вместо  $20\text{--}50$  мкм. Кроме того, отношение сигнал/шум (SNR) в спектрометрах с диодной матрицей лучше, что позволяет использовать более высокие интенсивности света. Выбор типа детектора зависит от вида его применения (см. таблицу 5.3).

**Табл. 5.3.** Сравнительные характеристики фотодиодной матрицы и CCD детектора

Параметр	Фотодиодная матрица	CCD
Динамический диапазон	15 бит	16 бит
Отношение сигнал/шум (SNR)	10000:1	900:1
Пределы определения	$< 3,3$ пДж/см <sup>2</sup>	$< 3,8$ фДж/см <sup>2</sup>
Насыщение	$> 107$ нДж/см <sup>2</sup>	$> 250$ пДж/см <sup>2</sup>

Таким образом, срочный обзорный спектр легче получить матричным спектрометром, если допустимы пониженная точность измерения и динамика. Однако прецизионные измерения лучше делать на общедоступном спектрометре с детектированием фотоумножителем. Таким образом, прежде чем покупать новый спектрофотометр, следует взвесить все преимущества и недостатки приборов мгновенного и общепринятого способов сканирования. Рекомендуется делать тестовые измерения для правильного выбора инструмента исследования.

По техническим причинам до недавних пор анализ Фурье был ограничен только ИК спектроскопией. Однако постоянно возрастает число таких спектрофотометров, способных работать и в УФ-видимой области спектра. В отличие от так называемых мгновенных спектрометров (диодных матричных и CCD), считывание в которых производится последовательно, Фурье спектрометры — истинно мгновенные. Дисперсия по длинам волн основана на явлении интерференции, которое впервые описал А. Майкельсон — первый американец, получивший Нобелевскую премию в 1907 г. В своих опытах он не использовал ни призмы, ни решетки (см. рис. 5.8). Луч белого света расщеплялся полупрозрачным зеркалом на два луча, которые распространялись по двум различным путям. После отражения от зеркал 1 и 2 два луча соединялись и фокусировались на образце. Как два луча от одного источника света, они способны интерферировать друг с другом. Вследствие незначительного перемещения  $\Delta x$  двух лучей относительно друг друга формируется интер-



**Рис. 5.8.** Схема интерферометра Майкельсона. Коллимированный (параллельный) луч света расщепляется на два полупрозрачным зеркалом, и после отражения на неподвижном зеркале 1 и подвижном зеркале 2, соответственно, лучи соединяются и фокусируются на образце. Объединенные лучи способны интерферировать и образовывать при сдвиге зеркала 2 на  $\Delta x$  характерную интерферограмму. Используя обратное преобразование Фурье, получают требуемый спектр образца. Применяя логарифмические преобразования и соответствующую конкретному прибору коррекцию на дисперсию, из этого спектра получают кривую поглощения

ферограмма. По сути — это преобразование Фурье абсорбционного спектра образца (см. главу 5.4.4.5). Используя обратное преобразование Фурье (с помощью встроенного компьютера), можно получить исходный спектр поглощения образца. Если интерферометр сравнить с диспергирующим спектрометром, где падающий свет проходит сквозь очень маленькую щель, то прохождение света в нем обеспечить гораздо проще, и мониторинг спектра можно проводить в субсекундном диапазоне вплоть до наносекундного. Важно отметить, что в интерферометре можно параллельно производить измерение слабого лазерного луча определенной длины волны (например HeNe лазера), что позволит очень точно определить отдельные точки в спектре образца. Полная калибровка интерферометров по длинам волн производится с помощью специальных калибровочных образцов с известными спектральными характеристиками или, например, в ближнем ИК диапазоне — просто по чрезвычайно узким вращательным линиям «примеси» водяных паров, практически всегда присутствующих в образце (Брукер) (см. главу 10).



**Альберт Абрахам Майкельсон**  
(1852—1931)

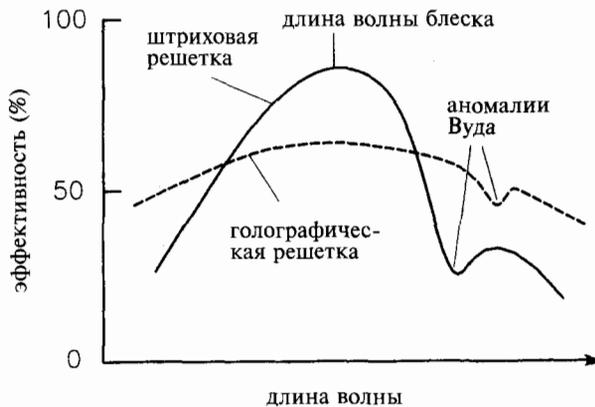
### 5.2.2. Типы дифракционных решеток

Дифракционные решетки были известны уже 180 лет назад (см. таблицу 1.1). Так как они являются очень важным инструментом в спектроскопии, то, естественно, они постоянно совершенствовались. Сначала они были только трансмиссионными (пропускающими). Как правило, дифракционные решетки — это квадраты размером  $50 \times 50$  мм с 1 200 бороздками на мм; суммарная длина бороздок составляет при этом 3 км. Бороздки делаются механическим процарапыванием алмазными инструментами по стеклу. В настоящее время чаще применяются отражающие дифракционные решетки и голографические решетки (интерференционные решетки). Их получают посредством двух расширяющихся и пересекающихся лазерных лучей, например аргонового, с длиной волны 488 нм, которые образуют интерференционную картину в форме требуемой решетки. Затем соответствующим фотохимическим процессом бороздки (штрихи) протравливаются и покрываются защитным слоем  $\text{SiO}_2$  (напылением). Голографические решетки изготавливают до 6 600 штрихов на мм с помощью удвоения частоты лазерной аргоновой линии 257 нм и на любой искривленной поверхности (вогнутые решетки).

Следует отметить, что в практике изготовления дифракционных решеток применяется такой порядок изготовления: производится сначала оригинал определенного типа решетки методом, описанным выше, а затем по нему делают много точных копий. Разработано большое количество технологий изготовления копий оригинала решетки, которые играют важную роль в развитии спектроскопии. Точная копия оригинала решетки обычно делается нанесением тонкого эпоксидного слоя (0,1—1 мкм) на чистую заготовку, и она совмещается с оригиналом, как сэндвич. Когда эпоксидный слой застынет, оригинал и заготовка разъединяются. При этом эпоксидный слой с рисунком прорезей оригинала (в зеркальном воспроизведении) остается на заготовке. На этот рисунок наносится отражающий слой  $\text{MgF}_2$ , Au или Pt (в зависимости от спектрального назначения решетки), а затем сверху наносится защитный слой  $\text{SiO}_2$ .

Интерференционные решетки не имеют действительного «угла блеска», существующего у линейчатых решеток (см. рис. 3.39), поэтому они не достигают их эффективности, составляющей ~95%. Однако они демонстрируют пониженную, но более эффективную степень проходимости света (светосилу) во всем спектральном диапазоне (см. рис. 5.9). Даже при очень высокой плотности штрихов у этих решеток не наблюдается ошибок. Поэтому они не дают ложных спектральных линий («духов»), и уровень рассеянного света у них по крайней мере в 100 раз ниже, чем у высококачественных линейчатых решеток. Это существенно увеличивает их динамический, т.е. фотометрический, диапазон.

В 1902 г. В. Вуд установил своеобразную нерегулярность спектральной эффективности решеток (см. рис. 5.9), которая не понята полностью и до сих пор. Эффективность решеток особенно значительна, если падающий на решетку свет поляризован перпендикулярно штрихам. Особенно это надо иметь в виду при интерпретации спектров, получаемых на некомпенсируемых однолучевых спектрометрах и флуориметрах: например, часто имеется интенсивная аномалия Вуда в области ~550 нм, совпадающая с  $\alpha$ -полосой цитохрома *c* (см. рис. 5.30).



**Рис. 5.9.** Эффективность голографических и линейчатых дифракционных решеток в зависимости от длины волны

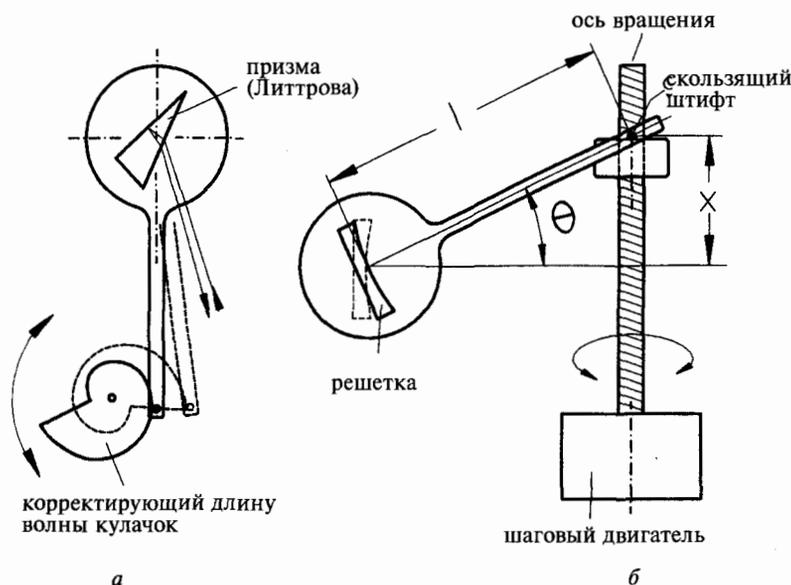
В 1883 г. Роуланд изобрел вогнутую отражающую решетку с двойной функцией диспергирования и фокусирования луча света аналогично вогнутому зеркалу (см. главу 5.2.1). До сих пор такие дифракционные решетки и их вариации используются в недорогих спектрофотометрах, использующих голографические вогнутые зеркала. Таким образом сокращается количество оптических компонентов, а спектральный диапазон этой системы по сравнению с линейчатыми решетками оказывается гораздо более расширен, особенно в сторону коротких длин волн до 185 нм. Важно отметить, что эффективность вогнутых решеток проявляет сильную зависимость от направления поляризации падающего света. Причем небольшие отклонения могут привести к сдвигу максимума пика (см. главы 6 и 8.7).

Если в спектрометрах используются в качестве фотодетекторов фотодиодные матрицы или CCD матрицы, то для них разработаны специальные дифракционные решетки, которые изображение входной щели после диспергирования проецируют на всю площадь этих матриц (так называемые плоские решетки вместо круга Роуланда).

### 5.2.3. Линеаризация длины волны

Теоретически представление спектра в единицах энергии имеет много преимуществ. В этом случае возможно построение зависимости поглощения от волнового числа. Однако на практике удобнее представлять поглощение как функцию длины волны ( $A$  от  $\lambda$ ). Это объясняется тем, что угол вращения  $q$  дифракционной решетки приблизительно пропорционален длине волны (но только приблизительно). Если сканировать спектр вращением решетки в соответствии с формулой 3.33, входной угол  $\epsilon$  и угол дисперсии  $\beta$  изменяются. Из схем на рис. 3.34 и 5.5  $\epsilon - \beta = \text{const}$  (т.е.  $= 61,6^\circ$ , этот угол зависит от параметров конкретной решетки). Используя теоремы тригонометрии для решетки на рис. 5.5, получаем:

$$\lambda = 2 \cos(30,8^\circ) \times a \times m \times \sin(30,8^\circ - \epsilon) \quad (5.8)$$



**Рис. 5.10.** Линеаризация длины волны в монохроматорах (а) с призмой и (б) с решеткой. Изогнутый диск на схеме (а) применяется только в монохроматорах с призмой, а для решеток применяется синусовая коррекция (б) (возможна смена решеток)

При постоянстве  $c = 2 \times \cos(30,8^\circ) \times a \times m$  и угла вращения решетки  $q = (30,8^\circ - \epsilon)$  получаем оптическую функцию:

$$\lambda(\Theta) = c \sin(\Theta) \quad (5.9)$$

Таким образом получается, что изменение длины волны пропорционально синусу угла вращения  $q$ . На рис. 5.10, б показано, что синусоидальную зависимость можно компенсировать механически. Для угла вращения  $q$  имеет место механическая функция:

$$\sin \Theta = \frac{x}{l} \quad (5.10)$$

где перемещение  $x$  по оси вращения обеспечивается, как правило, шаговым двигателем. Если подставить уравнение 5.10 в уравнение 5.9, то получим линейную зависимость между  $\lambda$  и  $x$ . В современных спектрофотометрах вместо оси применяется управляемый компьютером шаговый двигатель. Думается, в ближайшем будущем все механические коррекции будут заменены компьютерной коррекцией в режиме реального времени.

При компоновке Литтрова (см. рис. 5.11) получаем:  $\epsilon = \beta = q$ . Отсюда, уравнение решетки будет иметь вид:

$$\lambda = \frac{2a}{m} \sin \Theta$$

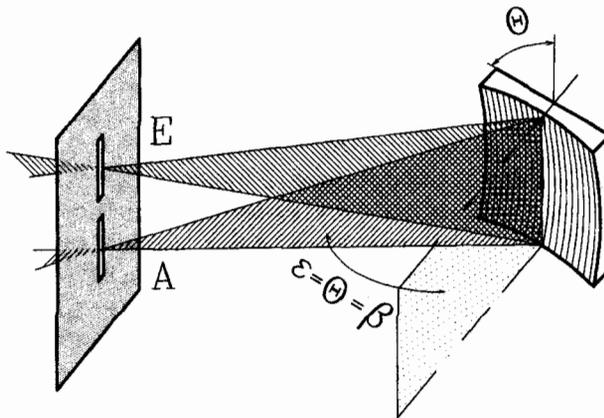


Рис. 5.11. Компоновка дифракционной решетки Литтрова

$$2a \cos \Theta \delta\Theta = m\delta\lambda \quad (5.11)$$

$$\frac{\delta\Theta}{\delta\lambda} = \frac{m}{2a \cos \Theta} = \tan \frac{\Theta}{\lambda}$$

где  $\delta\Theta/\delta\lambda = \delta\beta/\delta\lambda$  — определяет угол дисперсии (см. уравнение 3.3.5). Угол дисперсии возрастает пропорционально порядку рассеяния. Следует отметить, что конструкция Литтрова редко используется в решеточных монохроматорах для молекулярной спектроскопии. Она скорее служит в качестве теоретического сравнения различных спецификаций и более часто употребляется в призмных спектрометрах, как, например, в классическом монохроматоре MIV-Q3 «Zeiss». В соответствии с уравнением 3.28, призма проявляет строгую нелинейную зависимость от входного угла, а также от показателя преломления материала призмы (см. рис. 3.34). Поэтому для осуществления линейаризации призмного монохроматора применяются специально профилированные диски<sup>1</sup> (см. рис. 5.10, а). Однако разрешающая способность монохроматора при постоянной ширине щели существенно зависит от длины волны.

Следует отметить, что наличие рассеянного света в одиночном монохроматоре ограничивает его динамический диапазон 4 или 5 порядками (см. главу 5.2.7). Если соединить последовательно два монохроматора (двойной монохроматор), уровень рассеянного света значительно понизится до  $< 10^{-9}$ , что позволит увеличить фотометрический динамический диапазон. При этом необходимо очень тщательно механически синхронизировать привод обеих дифракционных решеток.

#### 5.2.4. Типы сканирующих абсорбционных спектрофотометров

При измерении поглощения вещества определяется его поглощающая способность на определенной длине волны  $\lambda_1$ . Настроив монохроматор на эту

<sup>1</sup> Прим. редактора — кулачки в русскоязычной транскрипции

длину волны (см. рис. 5.6), мы определяем разницу между значениями, полученными в присутствии и отсутствие исследуемого образца:

$$A(\lambda_1) = \log I_0(\lambda_1) - \log I(\lambda_1)$$

Аналогично можно отсканировать весь спектральный диапазон  $\Delta\lambda$  между  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  в присутствии и отсутствие образца (двухлучевые спектрометры имеют два параллельных луча, один из которых проходит через сравнительную кювету, а второй — через кювету с образцом) и получить с помощью встроенного компьютера скорректированный спектр поглощения (с помощью вычислений на компьютере в режиме реального времени) (см. рис. 5.12, а):

$$A(\lambda) = \log I_0(\lambda) - \log I(\lambda) \quad (5.12)$$

До недавних пор логарифмирование данных измерений спектрометров осуществляли с помощью логарифмирующего усилителя, т.е. аппаратно. Теперь, с целью снижения стоимости оборудования, процесс логарифмирования выполняется с помощью программного обеспечения спектрофотометра, исходный сигнал в котором сохраняется в линеаризованном виде. Однако это порождает некоторые трудности. (1) Прежде чем рассчитать логарифм, необходимо с высокой точностью определить нулевую линию (т.е. «истинный нулевой сигнал»), что особенно важно при измерении небольших значений поглощения,

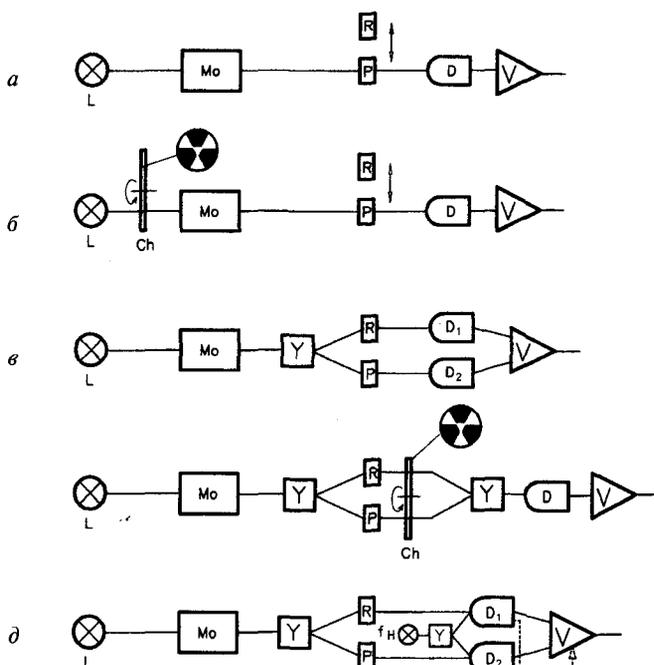


Рис. 5.12. Типы сканирующих абсорбционных спектрофотометров. Детали в тексте (согласно Науману и Шредеру, 1987)

*незначительные отклонения могут вызвать существенные изменения величины поглощения и формы спектра. (2) Последующее логарифмирование линеаризованных данных, хранящихся в памяти, приводит к логарифмическому фотометрическому разрешению (см. главу 5.2.1). (3) Измерение спектров поглощения быстросканирующими спектрофотометрами с одновременным логарифмированием линейного сигнала (глава 5.6.2) требует высоких скоростей преобразования, которые достижимы только с использованием быстросканирующих микропроцессоров.*

С точки зрения схемной реализации — усиление сигнала переменного тока производить проще, чем усиление сигнала постоянного тока (см. главу 5.2.5). Поэтому сигнал постоянного тока, получаемый на фотодетекторе спектрометра, перед усилением преобразуют в сигнал переменного тока механическим прерывателем (см. рис. 5.12, б).

В отличие от последовательных измерений, измерение образца и сравнения можно проводить одновременно, предварительно расщепив луч света (расщепителем луча  $Y$ ) и используя два отдельных фотодетектора  $D_1$  и  $D_2$ , после чего два независимых сигнала преобразуются в спектр поглощения (см. уравнение 5.5. и рис. 5.12, в). Такой метод позволяет исключить ошибки измерения, вызванные флуктуациями источника света, но не компенсирует различия в чувствительности детекторов.

В сканирующем абсорбционном спектрометре, приведенном на рис. 5.12, г, применяется только один детектор. Измеряющий свет расщепляется на два луча (расщепителем луча  $Y$ ), затем после прохождения образца, сравнения и прерывателя они соединяются обратным расщепителем луча  $Y$ . Затем с помощью фазочувствительного усилителя, который воспринимает сигнал сравнения с прерывателя, получают исправленный спектр поглощения (уравнение 5.5). Такая конструкция сканирующего абсорбционного спектрометра применяется наиболее часто. Однако у него есть несколько недостатков. Вследствие ограниченной частоты прерывателя (60 Гц) и в соответствии с теоремой отбора, скорость сканирования длины волны не может быть выше 30 с на спектр в диапазоне от 400 до 800 нм. Иначе фотометрические ошибки и ошибки определения длины волны достигнут неприемлемо высоких значений. Обычно механическое расстояние между образцом/сравнением и фотодетектором  $D$  более 20 см. Таким образом, допустимый телесный угол света, излучаемого образцом, составляет 0,001. Это исключает, однако, возможность измерения мутных рассеивающих образцов наподобие присутствующих *in vivo* биологических и застеклованных при низких температурах.

Для того, чтобы собрать как можно больше квантов света, конструкция спектрометра должна предусмотреть как можно больший телесный угол сбора света от образца (до  $2\pi$ ) (см. рис. 5.19). Площадь катода отдельного фотоумножителя, как правило, бывает неоднородной с точки зрения эффективности. Поэтому, если два луча двулучевого спектрофотометра падают на слегка различающиеся площадки одного и того же фотокатода, то, даже в случае оптимальной юстировки, коррекция нулевой линии оказывается недостаточной, и это выражается в существенном отклонении от идеальной горизонтальной линии. В практически всех практически спек-

тросметрах такого типа применяется оптическая последовательная коррективировка, которая занимает много времени. В соответствии с правилом Гаусса, касающимся ошибки распространения луча, ошибки лучей образца и сравнения аддитивно влияют на конечный результат. На рис. 5.13 представлена конструкция типичного двулучевого спектрофотометра («Kontron Instruments GmbH»).

Если вновь ввести второй детектор согласно рис. 5.12, *д* и компенсировать различие усиления обоими детекторами вторым световым источником переменного тока частотой  $f_H$ , мы снимем ограничения в скорости сканирования. Образец, сравнение и детекторы размещаются очень близко друг к другу, что позволяет проводить измерения рассеивающих мутных образцов (см. рис. 5.19).

Если требования к оптическим свойствам и разрешению по длине волны (порядка  $\Delta\lambda = \pm 0,5$  нм) не очень высоки, что обычно бывает в химической и биологической молекулярной спектроскопии, то идеальным представляется использование конструкции Сейя — Намиока на основе голографической вогнутой решетки (см. рис. 5.14).

*Доступно быстрое спектральное сканирование мутных и сильно рассеивающих (in vivo) образцов, компактный дизайн, низкий уровень рассеянного света, большой динамический диапазон измерения и, что наиболее важно, встроенный компьютер, производящий все типы спектральных измерений. Такие спектрометры отличаются небольшими размерами, низкой стоимостью и высокой надежностью. Для каждого исследуемого образца не требуется*

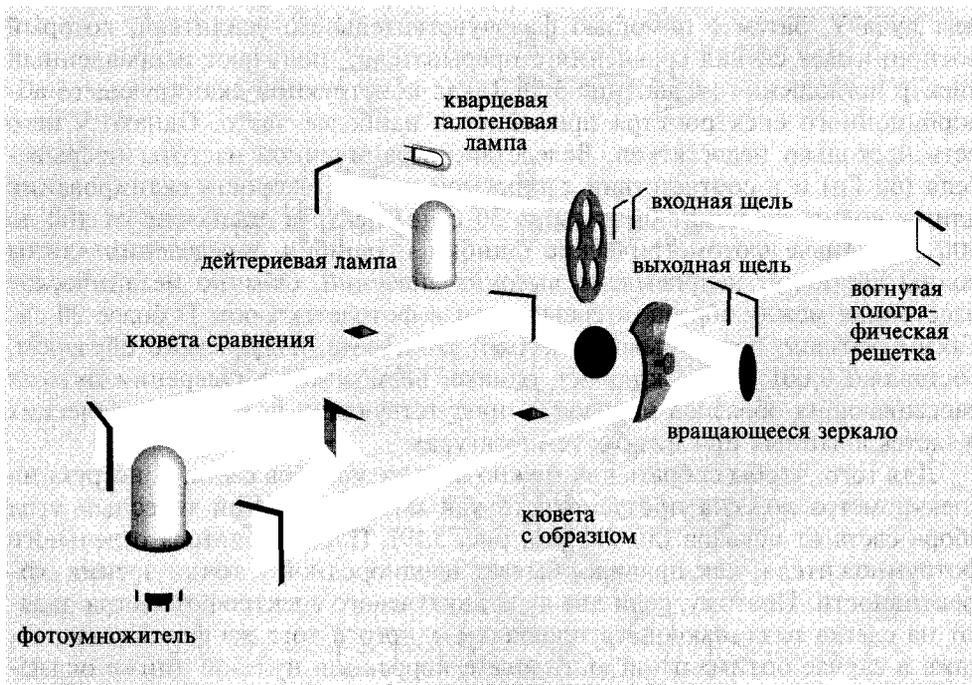


Рис. 5.13. Компоненты типичного двулучевого спектрофотометра («Kontron Instruments GmbH»)

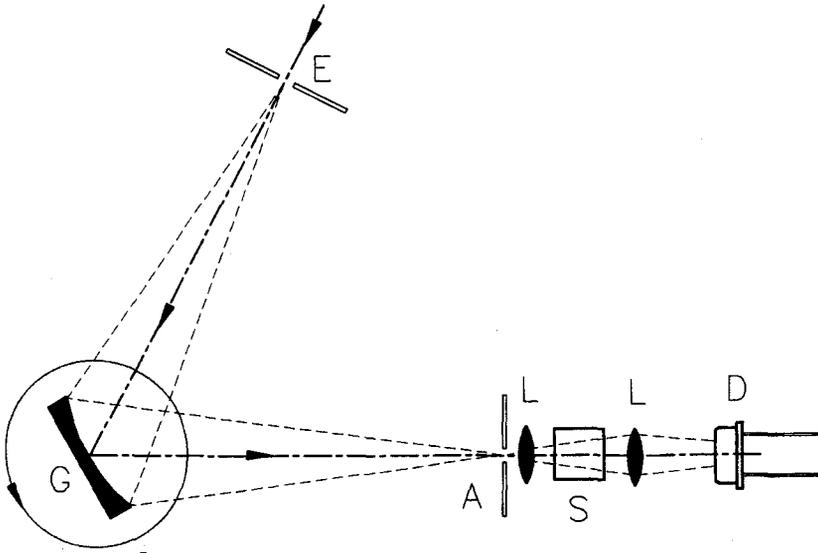


Рис. 5.14. Схема небольшого, но мощного монохроматора Сейя — Намиока на основе голографической вогнутой решетки

последующее сканирование сравнительного образца. Сравнительный спектр, снятый раз и навсегда, сохраняется в виде коррекционной кривой в памяти компьютера, и спектр исследуемого образца автоматически корректируется в процессе сканирования без вмешательства человека.

### 5.2.5. Шум

Отношение сигнал/шум (ОСШ = SNR в англоязычной транскрипции) является наиболее важной характеристикой спектрофотометра, определяющей его фотометрические характеристики. А разрешение по длине волны определяют ширина входной и выходной щелей спектрометра, а также качество оптического изображения входной щели на выходной щели (см. рис.3.22). Происхождение шума в сигналах измерения обусловлено многими причинами. Уровень шума зависит как от интенсивности падающего света  $I_0$ , так и от различного физического влияния компонентов цепи передачи сигнала (см. рис.5.15).

- **Фотонный шум:** Каждый источник света (включая нежелательное фоновое излучение) излучает фотоны с определенной статистической вероятностью. Излучатель черного тела (см. главу 3.4.1), например, при температуре 300 К выделяет средний квантовый поток  $n = 4 \times 10^{18} \text{ c}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , который, однако, претерпевает значительное изменение во времени. Отношение квантов  $n$ , попадающих на детектор, к числу измеренных квантов  $m$ , называется квантовой эффективностью  $\eta = m/n$ . Согласно определению, отношение сигнал/шум  $SNR = \sqrt{\eta n}$  относится к идеальному фотодетектору (бесшумовому), что практически не бывает. Кроме того, очень часто образец бывает источником теплового шума, который особенно сильно проявляется в оптически рассеивающих образцах. Это влияние можно существен-

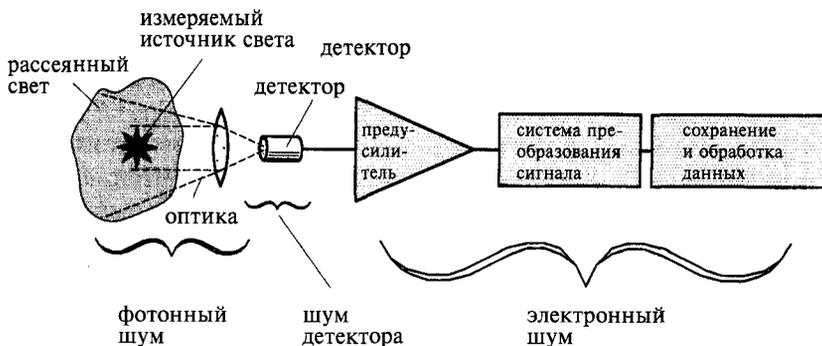


Рис. 5.15. Источники шума различного происхождения в однолучевом спектрофотометре

но снизить охлаждением образца, например до температуры жидкого азота или жидкого гелия.

**Шум детектора.** Шум детектора можно разделить на несколько видов. Шум Джонсона (его еще часто называют шумом Никвиста) определяется тепловым движением заряженных частиц в электрических резисторах. Энергия этого шума, равная  $1/2\chi \times T$  (где  $T$  — абсолютная температура,  $\chi$  — постоянная Больцмана), не зависит от тока. Охлаждая фотодетектор, можно снизить шум Джонсона. Шум Скотта (его еще называют шумом Шотки) возникает при движении заряженных частиц через поверхность раздела и граничные слои. Примером такого шума является поток фотоэлектронов между катодом и анодом фотоумножителя. Ток  $i$  шума Скотта пропорционален корню квадратному среднего тока фотона  $i_M$ , т.е.  $I \sim \sqrt{i_M}$ . Рекомбинационный шум возникает в фотопроводниках (см. главу 3.7.2) в результате рекомбинационных процессов после предшествующего разделения зарядов. Он обратно пропорционален корню квадратному общего числа свободных носителей заряда.  $1/f$ -шум определяется энергией, которая снижается с уменьшением частоты сигнала. Его происхождение теоретически мало обосновано. Однако при очень малых измеряемых сигналах постоянного тока этот компонент суммарного шума значительно уменьшается, если сигнал модулировать определенным образом (см. рис. 5.12, б и г). От шума Джонсона следует отличать температурный шум, который возникает в результате термоэффекта (см. главу 3.7.3); он зависит от статистических изменений температуры. Микрофонный шум возникает в результате механических колебаний, которые преобразуются в электрические сигналы. Теоретически его описать невозможно. Этот тип шума предотвращается механической стабилизацией конструкции аналитического прибора. Интерференционный шум возникает в результате интерференции частоты напряжения питания с частотами его гармоник (в Европе 50, 100, 150 Гц, в Америке 60, 120, 180, ... Гц). Практически все спектрометры, будучи электрическими приборами, подключаются к централизованным линиям электропитания, так

как в их состав входят двигатели, трансформаторы, газоразрядные трубки и источники излучения. Поэтому все шумы линий электропитания нейтрализуются специальными электронными схемами, особенно в двулучевых (см. главу 5.2.4) и двуволновых (см. главу 5.5) спектрофотометрах.

- *Электронный шум.* Источниками электронного шума являются все компоненты усилителя, усиливающего сигнал от фотодетектора. Прежде всего, это фотонный шум и шум детектора, приходящие на усилитель. Кроме того, эти компоненты генерируют шумы, обусловленные выше. Если спектрометр функционирует вместе с компьютером, то используется еще схема преобразования аналогового сигнала в цифровой, которая тоже является источником электронного шума. Особенно это важно учитывать в дифференциальной и абсорбционной спектроскопии, где приходится измерять разницу между двумя большими сигналами, вследствие чего не может быть достигнуто фотометрическое разрешение малой разности. Например, для (меньшего) разрешения 10 бит (1 024) сигнал поглощения  $A = 1$  подразделяется приблизительно на 1 000 шагов; таким образом приемлемый разностный сигнал 0,01 ЕОП соответствует 10 единицам: слишком маленькое число для приемлемого разрешения структуры спектра. И, наконец, бывает белый шум, определяемый как независимый от частоты шум, — в отличие от  $1/f$  шума. Он содержит шумовые сигналы, равномерно распределенные по всем частотам. Он представляет только теоретический интерес и не проявляется в реальных экспериментах.

В оптических спектрометрах все источники шума вносят свой вклад в суммарный сигнал шума, и мы определяем суммарное ОСШ в специфических условиях, например «ОСШ = 0,0005 при времени срабатывания 50 мс, разрешающей способности 2 нм на длине волны 500 нм».

Сигнал шума определяется стандартным отклонением  $N_\sigma$  большого числа дискретно измеренных значений данных  $y_i$ , случайно разбросанных вокруг среднего значения  $\bar{y}$ :

$$N_\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}, \text{ где } \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

Стандартное отклонение описывает разброс данных и требуется при оценке любой аналитической процедуры. Однако проводить оценку стандартного отклонения непрерывно сканируемых спектров слишком обременительно. Гораздо легче измерить шум  $N_{p-p}$  от пика к пику, являющийся просто разницей между наибольшим и наименьшим значениями измерений внутри определенной спектральной области. Согласно расчетам Г. Лиека (университет Мюнстера, Германия), наименьший измеряемый сигнал равен  $3/5 N_{p-p}$ . В соответствии с этой теорией, невозможно определить шум сам по себе, а также предел обнаружения, равный удвоенному сигналу шума.

### 5.2.6. Фотометрическая ошибка

Так как каждый отдельный сигнал измерения содержит ошибку, то при определении поглощения согласно формуле:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log I_0 - \log I$$

суммарная ошибка вычисляется в соответствии с законом распределения Гаусса. При высокой оптической плотности образца величина прошедшего света  $I$  становится очень маленькой, т.е.  $\delta I$  относительно большая. Однако при небольшой оптической плотности образца приходится вычитать друг из друга два сравнительно больших сигнала. Таким образом, величина ошибки  $\delta I$  будет определять результирующий разностный сигнал. Следовательно, чтобы измерение было максимально достоверным, необходимо, чтобы ошибка была наименьшей. Эта минимальная ошибка определяется из зависимости дифференциала  $\delta I$  от  $I$ . Например, с фотодетектором PbS (он используется в ближней ИК области, см. главу 10) ошибка  $I$ , т.е.  $\delta I$ , не зависит от  $I$  совсем и остается постоянной (доминирующим становится шум Джонсона). Следовательно:

$$dA = -0,43 \frac{dI}{I}$$

и

$$\frac{dA}{A} = -\frac{0,43}{A} \frac{dI}{I}$$

откуда минимальная относительная ошибка (см. рис. 5.16, а):

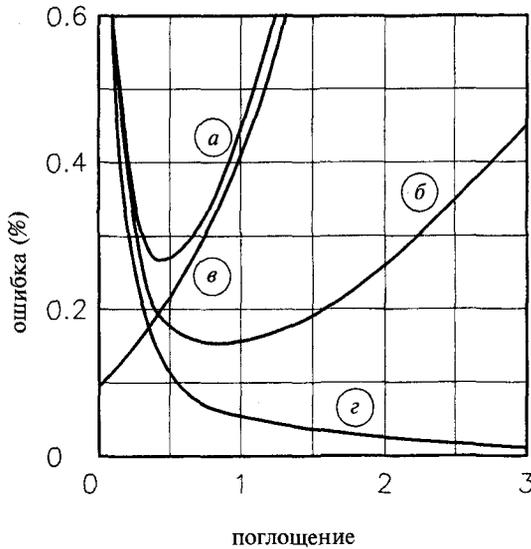
$$\log \frac{I_0}{I} = A = 0,43 \quad (5.13)$$

При использовании фотоумножителя в качестве фотодетектора отношение сигнал/шум определяет шум Скотта (см. главу 5.2.5). Он увеличивается пропорционально корню квадратному от  $I$ , т.е.  $dI = p \times \sqrt{I}$ . Таким образом, получаем:

$$\frac{dA}{A} = -\frac{0,43}{A} \frac{p}{\sqrt{I}} \quad (5.14)$$

с минимумом при (см. рис. 5.16, б):

$$\log \frac{I_0}{I} = A = 2 \times 0,43 = 0,86$$



**Рис. 5.16.** Фотометрическая ошибка абсорбционного фотометра (а) с полупроводниковым фотодетектором, (б) с фотоумножителем. Темновой ток и рассеянный свет становятся более значимыми при увеличении толщины образца (кривая в). Флуктуация и шум источника света становятся более важными с уменьшением плотности образца (кривая г) (Согласно Pardue et al., Clin. Chem. 1975, v.20, p.1028)

Следовательно, при оптимальных измерениях фотоумножители позволяют получать более высокие значения поглощения, чем полупроводниковые фотодетекторы.

Такие ошибки, как темновой ток (см. главу 5.2.5) и рассеянный свет (см. главу 5.2.7) становятся доминирующими с увеличением оптической плотности и экстинкции (включая рассеяние) (см. рис. 5.16, в). Если ошибка возрастает пропорционально  $I$ , что является следствием дрейфа и шума источника излучения самого по себе, то получаем кривую (г) на рис. 5.16.

### 5.2.7. Рассеянный свет

Важным параметром монохроматора является так называемый рассеянный свет. Это такой свет, который рассеивается в корпусе монохроматора и может попасть на образец. С учетом рассеянного света формула определения поглощения будет иметь вид:

$$A = \log \frac{I_0 + I_S}{I + I_S} \quad (5.15)$$

В предположении того, что и кювета сравнения, и кювета с образцом одинаково вовлечены в этот процесс, это приводит к дополнительному фототоку  $I_S$  в обоих путях луча. Согласно уравнению 5.15 для  $I \ll I_S$ , вели-

чина  $A$  является постоянной. Если же уровень рассеянного света достигает 10% ( $I_s = 0,1 \times I_0$ ), то измеряемое поглощение будет максимально:

$$A = \log \frac{I_0 + 0,1I_0}{0,1I_0} = 1,04 \quad (5.16)$$

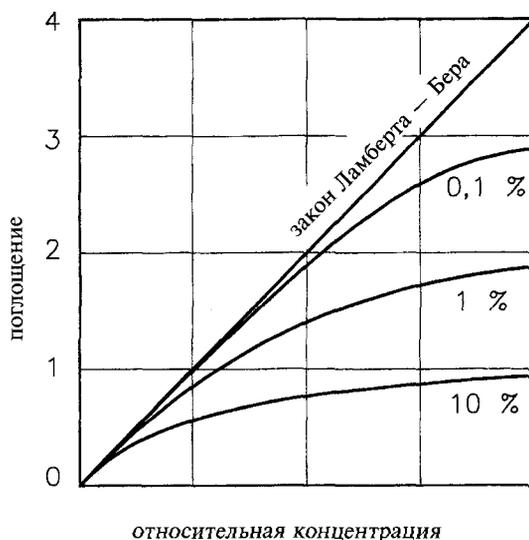
Для уровня рассеянного света 0,01% (типичное значение для одиночного монохроматора) максимальный диапазон поглощения будет равен  $\Delta A = 4,00$ . С увеличением экстинкции и при постоянном значении уровня рассеянного света  $I_s$  относительная ошибка измерения резко возрастает (см. рис. 5.17). Для уровня рассеянного света 1% и при поглощении  $A = 0,5$  ошибка будет составлять 2%.

Существенным результатом рассеянного света является сжатие спектральных пиков, приводящее к искажению спектра и неправильному определению величины поглощения, т.е. к заниженной концентрации образца.

Согласно уравнению 5.15, уровень рассеянного света может быть количественно учтен исключением путем поглощения соответствующих сигналов  $I$  из  $I_0$ .

Для этих целей применяются отрезные светофильтры (см. главу 3.6.1), которые полностью не пропускают свет определенных длин волн. К сожалению, отрезные стеклянные фильтры часто обладают довольно значительной флуоресценцией в той области длин волн, где они не пропускают. Поэтому на практике вместо таких фильтров употребляют жидкостные, представляющие из себя растворы веществ, которые при определенной концентрации проявляют свойства отрезных фильтров в определенном диапазоне длин волн и не флуоресцируют:

- хлорид калия (12 г/л):  $\leq 200$  нм,
- йодид натрия (10 г/л): 220 нм,



**Рис. 5.17.** Отклонения значений поглощения от закона Ламберта — Бера при увеличении уровня рассеянного света (%)

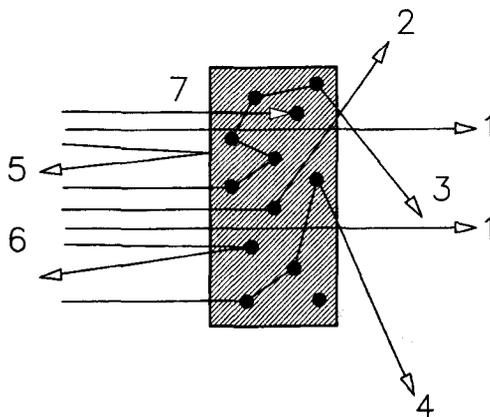
- нитрат натрия (50 г/л): 340 нм,
- метиленовый синий (0,01%): 600—700 нм.

### 5.2.8. Измерение мутных образцов

Как уже упоминалось ранее, растворы образца, растворенного до молекулярного уровня, являются оптически прозрачными и не влияют на распространение света в спектрофотометре. Они просто снижают интенсивность падающего света за счет чистого поглощения. Однако некоторые образцы часто бывают мутными и высоко рассеивающими (см. главу 8), что сильно искажает траекторию света (см. рис. 5.18), и влияют на закон Ламберта — Бера (см. главу 5.1.2). С теоретической точки зрения, такая ситуация весьма сложна и трудно разрешима. Однако на практике она часто решается.

Поток падающего света  $I_0$  проходит через анализируемый объем строго прямолинейно (луч 1), рассеивается: либо одно- (лучи 2 и 6), либо многократно (лучи 3 и 4), либо отражается: зеркально (угол падения равен углу отражения — луч 5), или диффузионно (излучатель Ламберта — луч 6). Выходящий поток света  $I$  оказывается более или менее разупорядоченным, что зависит от рассеивающих свойств образца, т.е. от размера и формы частиц, от взаимодействия между ними и от образования агрегатов. Кроме того, в полосах сильного поглощения наблюдается явление аномальной дисперсии: коэффициент преломления  $n$  резко изменяется вблизи максимума спектра поглощения, и в то же время уменьшается отражательная способность (см. главу 8.5.1). Это существенно осложняет анализ.

В теории пропускания света сквозь образец два параметра играют существенную роль: рассеяние и диффузионное отражение, которые, в свою очередь, зависят от коэффициента преломления  $n$  и от поглощения  $A$ . Как известно, коэффициент преломления  $n$  и поглощение  $A$  зависят от длины волны, коллимированности пучка и плоскости поляризации падающего



**Рис. 5.18.** Схематическое представление пути света в высоко рассеивающем образце. (1) Абсолютное прохождение без взаимодействия; (2) однократное рассеяние; (3 и 4) многократное рассеяние; (5) поверхностное отражение (зеркальное отражение); (6) диффузионное отражение; (7) поглощение

света, которые в теории объединяются понятием «комплексный показатель преломления».

Если размеры частиц сравнимы или меньше длины волны падающего света ( $\lambda$ ), то явления отражения, преломления и рассеяния нельзя учитывать отдельно, и весь этот комплекс явлений объединяется в понятие «рассеяние» (см. главу 8). Однако если размер частиц значительно больше падающей длины волны, то доминирующим явлением становится интерференция, приводящая к отклонениям, связанным с диффузионной эмиссией. Различные теории, такие как теория Кубелки — Мунка (1931 г.) или теория Ми (1908 г.), практически достоверно описывают рассеивающие свойства различных типов образцов. Существенный вклад в это направление был внесен Кортюмом (1962 г.). В главе 8 будут подробно описаны проблемы, связанные с измерением рассеивающих и отражающих сред.

Если толщина образца и количество рассеивающих частиц достаточно велики, то распределение света внутри образца и излучаемый свет достаточно диффузны и изотропны, т.е. не зависят от направления излучения. Это подтверждается аппроксимацией закона косинуса Ламберта — яркость образца во всех направлениях должна быть одинаковой. В этом случае спектры отражения и поглощения становятся почти идентичными по форме (см. главу 8.5.2).

В двулучевых спектрофотометрах (см. рис. 5.12, з) телесный угол, оцениваемый фотодетектором, составляет всего 0,001 ср, так что диффузно излучаемый свет будет едва определимым. Решение этой проблемы в основном для биологических и биохимических образцов предложили Норрис и Батлер: торцевой фотоумножитель с большим фотокатодом (1 дюйм в диаметре) располагается как можно ближе к образцу, что позволяет собирать свет в пределах телесного угла до  $2\pi$  ср (см. рис. 5.19). Таким образом, сильно рассеивающие образцы с поглощающей способностью до  $A = 8$  поддаются измерению, но при условии, что уровень рассеянного света очень низкий, например, благодаря использованию двойного монохроматора (см. главу 5.2.7). В качестве примера на рис. 5.20 представлен спектр поглощения зрелого листа букового дерева с экстинкцией порядка

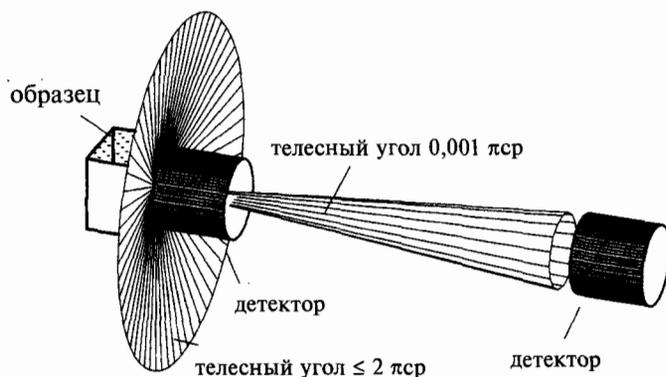
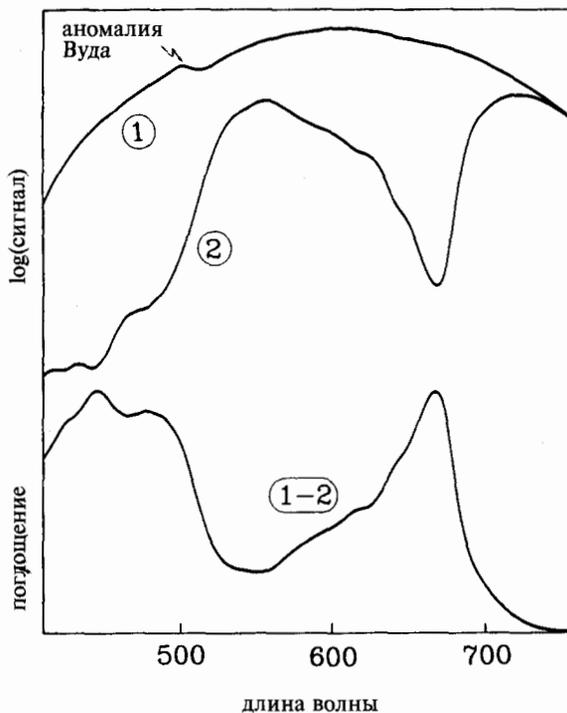


Рис. 5.19. Зависимость телесного угла, в пределах которого фотодетектор фиксирует излучение, от расстояния между детектором и образцом



**Рис. 5.20.** Спектр поглощения листа бука, полученный на однолучевом спектрометре. Кривая 1, коррекционная кривая, полученная от кусочка белой, не флуоресцирующей фильтровальной бумаги. Кривая 2 — неисправленный спектр поглощения букового листа. Кривая 1—2 — «истинный» (исправленный) спектр поглощения букового листа ( $E = 4,5$ ;  $A = 1,8$ )

$E = 4,5$  и истинным поглощением  $A = 1,8$ . Рассеивающее действие листа можно легко скорректировать с помощью кусочка белой, не флуоресцирующей и не поглощающей фильтровальной бумаги с идентичной экстинкцией при 760 нм. Следует отметить, что на этой длине волны лист бука не поглощает, но имеет сравнимое с листом бумаги рассеяние. Истинный спектр поглощения букового листа получается вычитанием из его неисправленной экстинкции экстинкции бумаги (сравнительный спектр). Для спектроскопии сильно рассеивающих образцов незаменимым методом становится производная спектроскопия. Отдельные биохимические компоненты в живых тканях распознаются полуколичественным методом (см. главу 5.4.3).

Как видно из рис. 5.18, усредненная траектория луча света  $x$  через сильно рассеивающий образец больше траектории луча через нерассеивающий образец, что увеличивает его поглощение ( $A = \epsilon \times c \times x$ ). Измеренная величина поглощения сильно рассеивающего образца может возрасти вплоть до 100 раз («фактор интенсивности»  $\beta$ ) ( $A = \beta \times \epsilon \times c \times x$ ) при одной и той же концентрации поглощающего вещества в растворе. Фоторецептор растений фитохром, упомянутый в главе 5.1.3, *in vivo* обычно присутствует

в чрезвычайно низких концентрациях. Ее можно измерить в живой ткани без какого-либо концентрирования, так как фактор интенсивности  $\beta$  естественных тканей растения, таких как колеоптиль или гипокотиль, существенно усиливают сигнал. Для того, чтобы измерить экстрагированный очищенный фитохром, его помещают в сильно рассеивающую среду, например,  $\text{CaCO}_3$  (суспензия 1 г  $\text{CaCO}_3$  в 1 мл среды, см. главу 8.4.2). Однако абсолютное измерение малых концентраций наподобие этой осуществить в действительности очень трудно, но это обычно и не требуется. Например, при измерении физиологических материалов рассматривают кинетические изменения или относительные концентрации и соответствующие концентрационные изменения.

*Для выполнения закона Ламберта — Бера необходимы две основные предпосылки: (1) распределение вещества в образце до молекулярно диспергированного уровня; (2) прямолинейность (коллимированность) падающего на образец луча света. Однако при полностью диффузном падающем свете теория предсказывает удвоение эффективной длины пути света в образце и, таким образом, удвоение измеряемого сигнала. Причина того, что этот эффект не полностью проявляется в абсорбционной спектроскопии, заключается в том, что образец может диффузно излучать дополнительный свет.*

В общедоступных двулучевых спектрофотометрах спектральные измерения при низких температурах (например, при  $-196^\circ\text{C}$ ) требуют больших временных затрат, и поэтому применяются нечасто. Измеряемые и сравнительные образцы помещаются в специальные кюветы и сосуды Дьюара в застеклованном виде, так как в таком состоянии они не рассеивают свет и не изменяют траекторию луча света. А при вертикальной траектории луча света, однолучевой компоновке, при которой фотоумножитель располагается в непосредственной близости к образцу, можно легко и быстро измерять даже очень мутные и/или сильно рассеивающие, незастеклованные образцы.

### 5.2.9. Спецификация

Если возникает необходимость приобрести новый спектрометр, то пользователь начинает изучать технические описания (спецификации) различных типов приборов, в которых указана цена, размеры и технические параметры прибора. Идея купить «универсальный» спектрометр со множеством опций, которые предоставят различные виды применения с наилучшими характеристиками для каждого, как практиковалось ранее, не очень хороша. Лучше исходить из частных применений, для которых создаются специализированные высокочувствительные и недорогие приборы, например для быстрого сканирования в большом спектральном диапазоне, измерения ионов кальция или белков при низких температурах, измерения в двуволновом режиме или в дальней УФ области спектра. Однако во многих случаях подобные спектрофотометрические системы коммерчески недоступны, так как производители не могут предвидеть всех возможных аспектов применения. Поэтому на сегодняшний день во многих исследовательских лабораториях можно найти спектрофотометрические установки собствен-



ного изготовления, предназначенные для выполнения определенной цели. Нижеприведенная последовательность параметров спектрометров может помочь в выборе наиболее подходящего спектрофотометра:

- для исследований требуется сканирующий спектрометр или с фиксированной длиной волны (для кинетических исследований)?
- двулучевой, двухволновой или однолучевой спектрометр? Нужен ли быстро сканирующий спектрофотометр (оптический многоканальный или диодный анализатор)?
- двойной или простой монохроматор? Длина оптического пути ( $F$  — число)? Какой допустимый уровень рассеянного света?
- требуемый спектральный диапазон, скорость сканирования. Если необходим УФ диапазон, то каких длин волн (для  $< 200$  нм требуется продувка азотом)? Если необходим ближний ИК диапазон, то насколько дороги чувствительные к ИК области ФЭУ? Ближняя ИК между 1 000 и 2 500 нм используется для специфических случаев (см. главу 10);
- каковы разрешение по длине волны и динамическому фотометрическому диапазону? Длина волны блеска (используется ли абсолютно вся область длин волн)? Порядок подавления фильтров? Фотометрический диапазон? С какой точностью устанавливается и воспроизводится длина волны? Каково отношение сигнал/шум? Какова линейность нулевой линии?
- какова долго- и коротковременная стабильность измеряемого сигнала? Время прогрева?
- система получения и преобразования данных? Режим счета единичных фотонов или аналоговый преобразователь сигнала (чувствительность)? Встроенный или внешний компьютер, стандартное программное обеспечение? Поставляется ли дополнительное программное обеспечение? Самодостаточна ли программа пользователя? Какова система хранения и представления данных? Файлы стандартны? Поддерживается ли связь с внешним высококачественным лазерным принтером? Качество вывода данных на печатающее устройство (для публикаций!)?
- возможно ли измерение рассеивающих (биологических/биохимических) образцов или только прозрачных? А застеклованных и, особенно, мутных образцов при низкой температуре (жидкого азота)? Скорость сканирования? Многопозиционный держатель кювет с регулированием температуры?
- ценовая категория? Размеры, вес, требуется ли удаление озона? Термостатирование требуется? Возможно ли питание от батареи при использовании спектрометра в полевых условиях?
- сервис? Предлагается ли обучение (часто весьма ценно)? Гарантия? Предлагаются ли тестовые измерения?

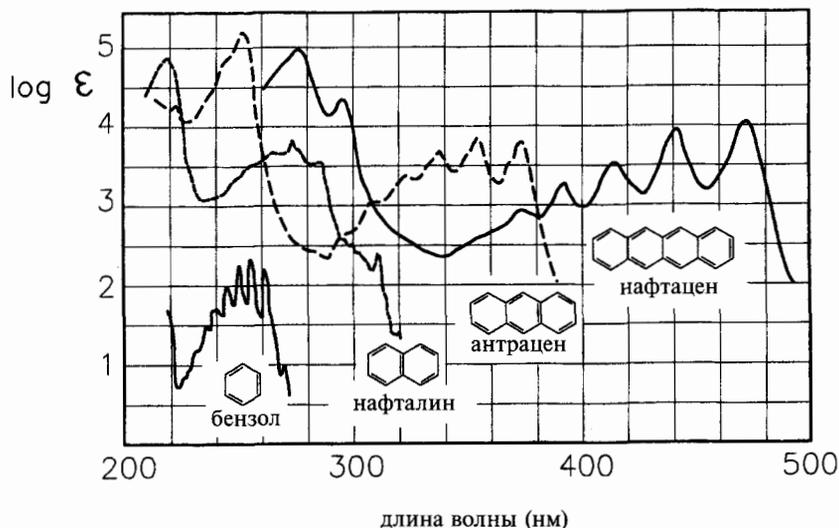
Следует отметить, что вследствие быстро растущих достижений в оптике и электронике становится нереалистичным планировать что-либо более чем на 5 лет вперед: «самые последние достижения» на сегодняшний день завтра могут оказаться совершенно ненужными и неприменимыми.

### 5.3. Поглощающие свойства молекул

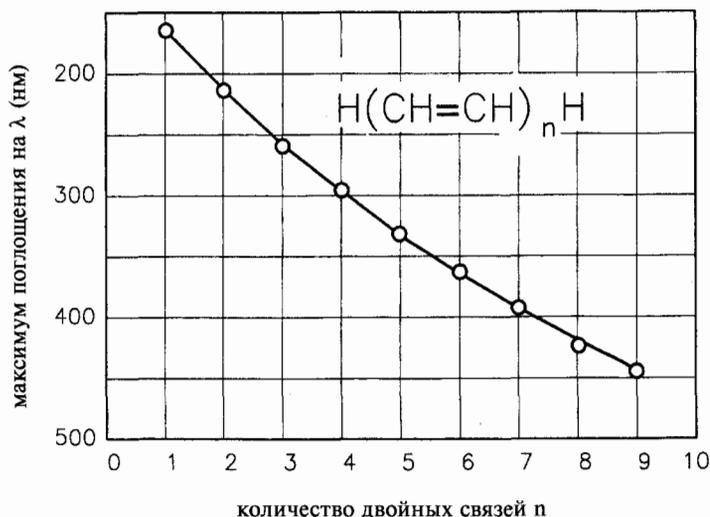
#### 5.3.1. Основные электронные переходы

Исходя из электронной структуры, можно утверждать, что все молекулы без исключения обладают поглощением. Маленькие неполимерные молекулы в большинстве случаев поглощают в ближнем (300—400 нм), дальнем (200—300 нм) и так называемом вакуумном (<200 нм) ультрафиолетовом диапазоне. Термин «вакуумный» применяют потому, что на длинах волн короче 200 нм начинают поглощать компоненты окружающего нас воздуха, что приводит к искажению измерений, и поэтому полный оптический путь спектрофотометра должен быть вакуумирован или, по крайней мере, находиться в атмосфере азота, не поглощающего в дальнем УФ. Практике, теории и интерпретации спектров в дальнем УФ посвящено много работ.

В таблице 5.2 приведены примеры поглощения некоторых молекул как в видимом, так и УФ диапазоне спектра и соответствующие им электронные переходы. Энергетические характеристики этих переходов рассматривались ранее (см. рис. 2.18 и 2.20). Переходы  $n \rightarrow \pi^*$  отдельных групп симметрично запрещены, что обуславливает значения их коэффициентов экстинкции  $\epsilon < 100 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . С увеличением полярности растворителя в спектре происходит гипсохромный сдвиг. Переходы  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , например, как в этане, расположены в вакуумном УФ, поэтому они мало интересны для исследователя. Наиболее интересны  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходы, в частности в сопряженных молекулярных структурах, особенно ароматических молекул. Согласно Хюккелю, ароматические молекулы имеют  $(4n + 2)$  сопряженных  $\pi$ -электронов

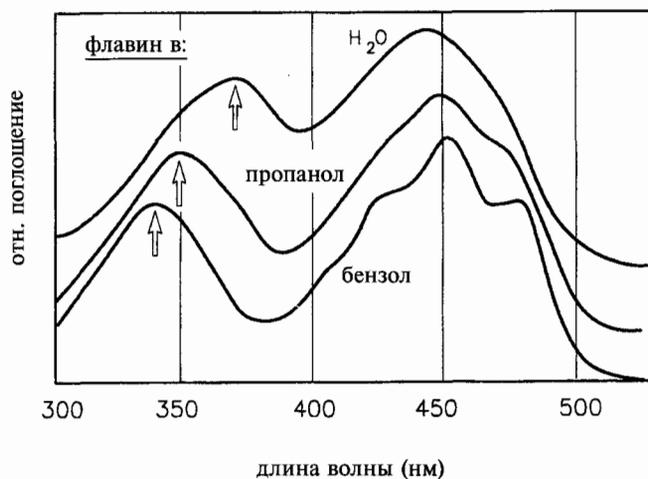


**Рис. 5.21.** Спектры поглощения ароматических молекул проявляют возрастающий красный сдвиг с увеличением количества сопряженных двойных связей (воспроизведено из Silverstein R.M et al., 1974, Spectrometric identification of organic compounds, Jhon Willey & Sons, Inc.)

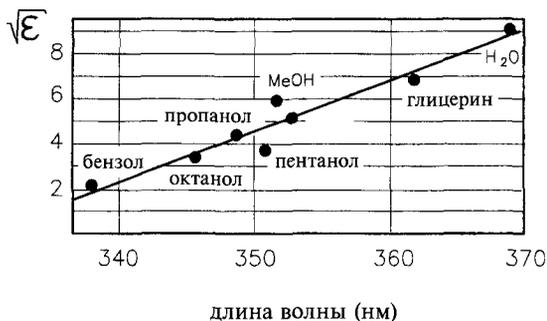


**Рис. 5.22.** Батохромный сдвиг  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходов сопряженных полиенов с увеличением количества двойных связей

( $n = 1, 2, \dots$ ). Они чрезвычайно стабильны и были обнаружены оптической спектроскопией даже в галактических объектах. Они имеют энергетически низкий уровень и обладают четко выраженными полосами поглощения. Примерами ароматических молекул служат бензол ( $n = 1$ ), нафталин ( $n = 2$ ), антрацен ( $n = 3$ ), нафтацен ( $n = 4$ ) (см. рис. 5,21) или молекула окисленного флавина ( $n = 4$ ) (см. рис. 5.23). Переходы  $\pi \rightarrow \pi^*$  сопряженных полиенов с увеличением количества двойных связей дают батохромный сдвиг (см. рис. 5.22). Спектры таких молекул сложны, но в принципе их можно интерпретировать. Например, полоса флавина в ближнем УФ с увеличением полярности растворителя батохромно смещается, в то время как «голубая» полоса при 450 нм смещается слегка гипсохромно с одновременной



**Рис. 5.23.** Спектр поглощения флавина в растворителях различной полярности

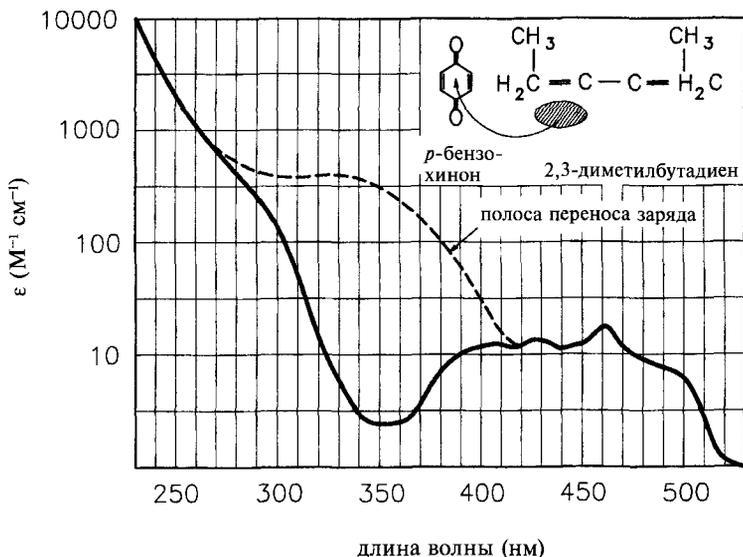


**Рис. 5.24.** Линейный сдвиг полосы поглощения флавина в ближнем УФ в зависимости от корня квадратного от диэлектрической константы  $\epsilon$  растворителя

размывкой колебательных полос (см. рис. 5.23). Опыты показали, что смещение полос в ближнем УФ пропорционально корню квадратному от диэлектрической константы  $\epsilon$  растворителя. Это поведение открывает простой путь изучения полярности микроокружения неизвестных систем флавина (см. рис. 5.23).

### 5.3.2. Комплексы с переносом заряда

Смесь доноров (Д) и акцепторов электронов (А) в растворе часто дает широкие неструктурированные полосы поглощения, лишённые колебательной структуры. Таких полос нет в спектрах исходных молекул: в отличие



**Рис. 5.25.** Пунктирной линией показан спектр поглощения комплекса с переносом заряда (КПЗ) *p*-бензохинона (кислоты Льюиса) с 2,3-диметилбутадиемом (основанием Льюиса). Сплошная линия (контроль) — спектр *p*-бензохинона, растворенного в циклогексане

от раствора, содержащего только Д или А, смешанный раствор этих соединений, даже если не образуется новых химических соединений, интенсивно окрашен. Эти полосы относятся к определенной донорно-акцепторной сущности — донорно-акцепторному комплексу (ДАК), называемому комплексом с переносом заряда (КПЗ) (см. рис. 5.25). Акцепторами чаще всего служат кислоты Льюиса, такие как поли- и нитро-ароматические молекулы, хинин и иодиды, донорами чаще всего являются основания Льюиса, такие как ароматические углеводороды, диены и амины. Спектральные полосы комплексов с переносом заряда «сильных» доноров и акцепторов смещены в более длинноволновую сторону. Принцип связывания и спектральные характеристики комплексов с переносом заряда были впервые описаны и объяснены Мюлликеном.

Волновая функция  $\psi_{AD}$  двух молекул А и D, которые образуют сэндвич-конформацию с расстоянием около 0,34 нм, описывает взаимодействие диполь-диполь или водородных связей. С другой стороны,  $\psi_{A^-D^+}$  описывает обобщенную волновую функцию  $D^+$  и  $A^-$  после обмена электронами. Обычная линейная комбинация двух волновых функций  $\psi_{AD}$  и  $\psi_{A^-D^+}$  приводит к двум так называемым орбиталам переноса заряда, одна из которых — основное состояние и является стабильной, а другая орбиталь соответствует первому возбужденному состоянию и является нестабильной:

$$\psi_{S0} = a\psi_{AD} + b\psi_{A^-D^+}$$

и

$$\psi_{S1} = a\psi_{A^-D^+} - b\psi_D$$

В большинстве случаев  $b \ll a$ , поэтому:

$$\psi_{S0} \approx a \times \psi_{AD}$$

и

$$\psi_{S1} \approx a \times \psi_{A^-D^+}$$

(см. рис. 5.26). Таким образом, спектральный переход в сущности энергетически идентичен индуцированному светом переходу электрона от донора к акцептору. Поэтому они называются переходами с переносом заряда. Следовательно, для основного состояния нельзя применять термин «комплекс с переносом заряда» (без возбуждения светом), так как в этом случае нет переноса заряда.

Следует упомянуть о так называемых контактных переносах заряда, например, между  $O_2$  и ароматическими углеводородами. В отличие от комплексов с переносом заряда такие комплексы носят промежуточный характер, так как энергия связи в них намного меньше кинетической энергии  $\chi T$  (произведения постоянной Больцмана и абсолютной температуры).

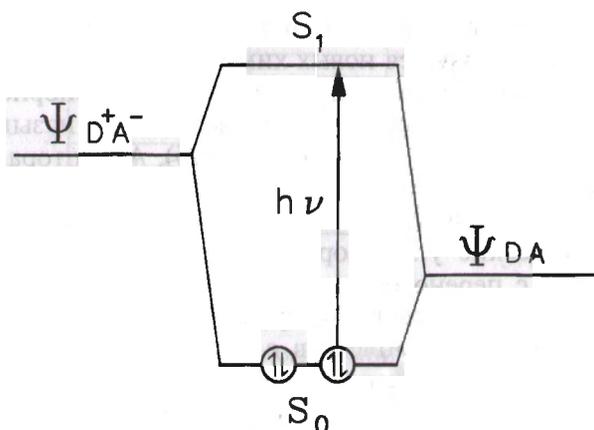
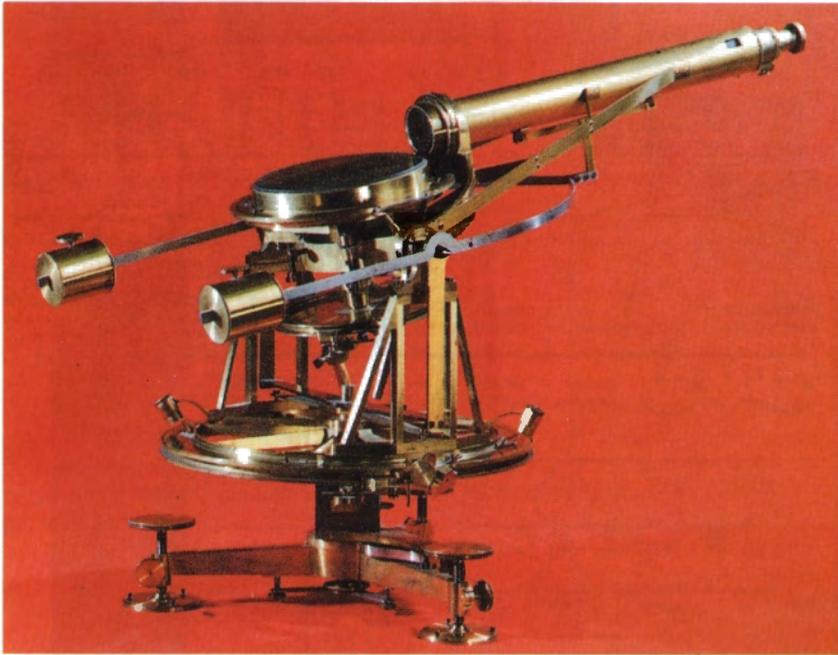


Рис. 5.26. Линейная комбинация двух волновых функций  $\Psi_{DA}$  и  $\Psi_{D^+A^-}$  приводит к двум орбиталям переноса заряда. Одна орбиталь стабильна, а вторая соответствует возбужденному состоянию

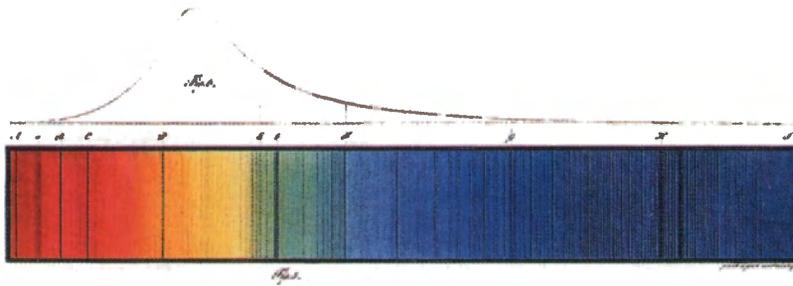
### 5.3.3. Комплексы переходных металлов

У переходных металлов, относящихся к четвертому периоду периодической системы, в химические связи включаются их  $d$ -орбитали. Существует много так называемых комплексов переходных металлов, представляющих большой интерес в медико-биологических исследованиях. Это такие молекулы или ионы, в которых «лиганды» (атомы, ионы или химические группы) объединяют свою пару неподеленных электронов с центральным переходным металлом. Классическим примером является ион гексахлорида кобальта  $\text{CoCl}_6^{3-}$ , в котором ион кобальта  $\text{Co}^{3+}$  окружен шестью ионами  $\text{Cl}^-$ , занимающими углы октаэдра (см. рис. 5.27).

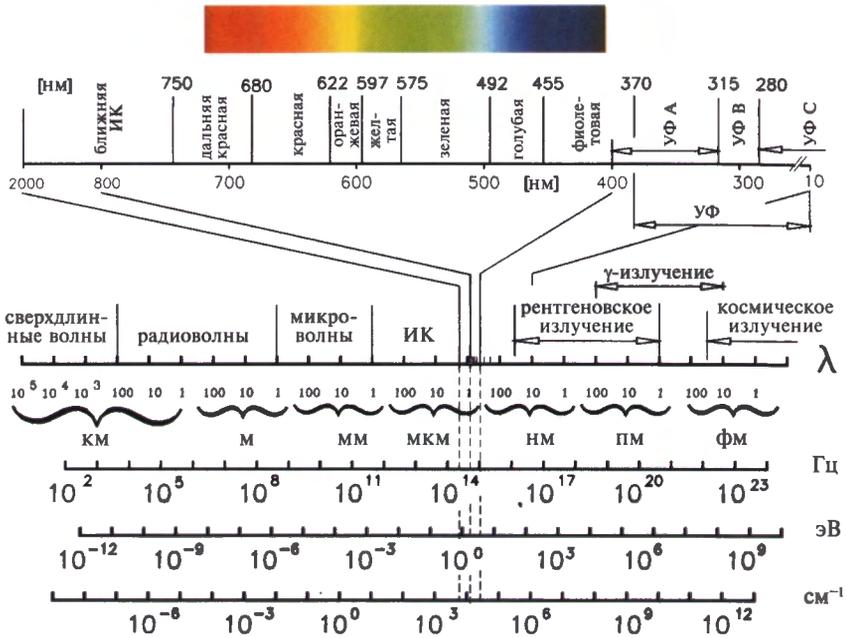
Шесть лигандов различным образом влияют на пять энергетически эквивалентных, но геометрически различных  $d$ -орбиталей центрального атома (см. рис. 2.8). Две из пяти  $d$ -орбиталей обладают своими составляющими по  $x$ -,  $y$ - и  $z$ -осям ( $d_{x^2-y^2}$ ,  $d_{z^2}$ ), в то время как остальные три орбитали, ортогональные друг другу, занимают срединные оси ( $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ). Предположим, что все орбитали заняты электронами. И если возникнут шесть отрицательно заряженных лигандов, занимающих пространство относительно центрального атома в трех направлениях пространства:  $\pm x$ ,  $\pm y$  и  $\pm z$  (любые другие направления могут быть разложены на эти три пространственные направления), то электроны на первых двух орбиталях будут испытывать значительно большие силы отталкивания, чем электроны на остальных трех орбиталях, занимающих срединные оси. Таким образом, получается типичная 3:2 энергия расщепления объема, так называемая энергия кристаллического расщепления  $\Delta$  (см. рис. 5.28). Верхние два состояния обозначены как « $e$ » (возбужденные орбитали), нижние три состояния обозначены как « $t$ » (три орбитали). Эти пять орбиталей заполняются в зависимости от количества свободных  $d$ -электронов, от  $\Delta$  и от электростатического взаимного отталкивания спаренных электронов (см. главу 2.3.2.2, энергия спаривания, правило Хунда). Например, ион  $\text{Cr}^{3+}$



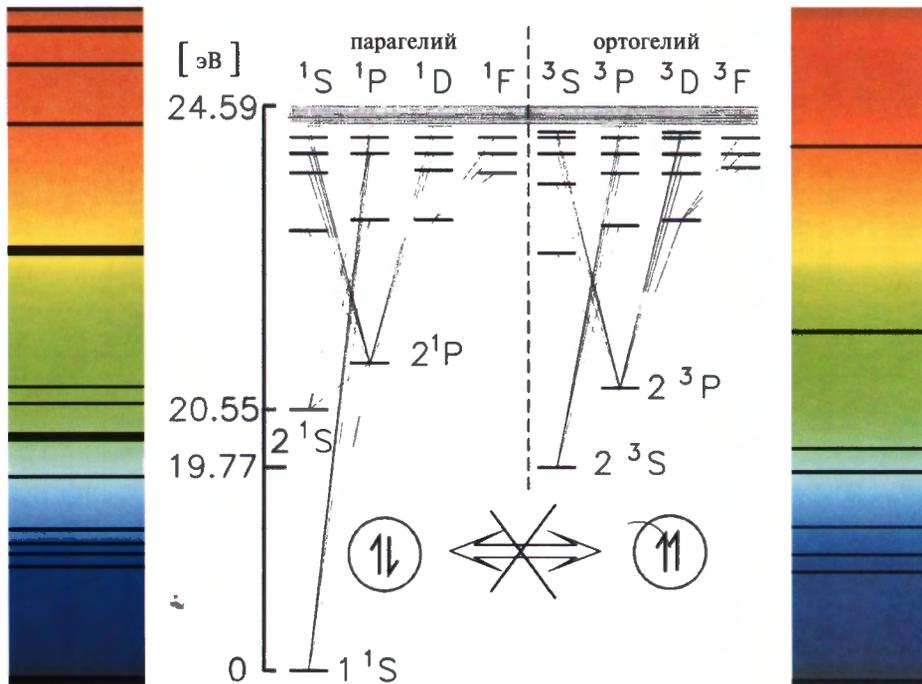
**Рис. 1.3.** Первый дисперсионный спектрометр Фраунгофера, 1821 г. (Музей в Мюнхене, Германия)



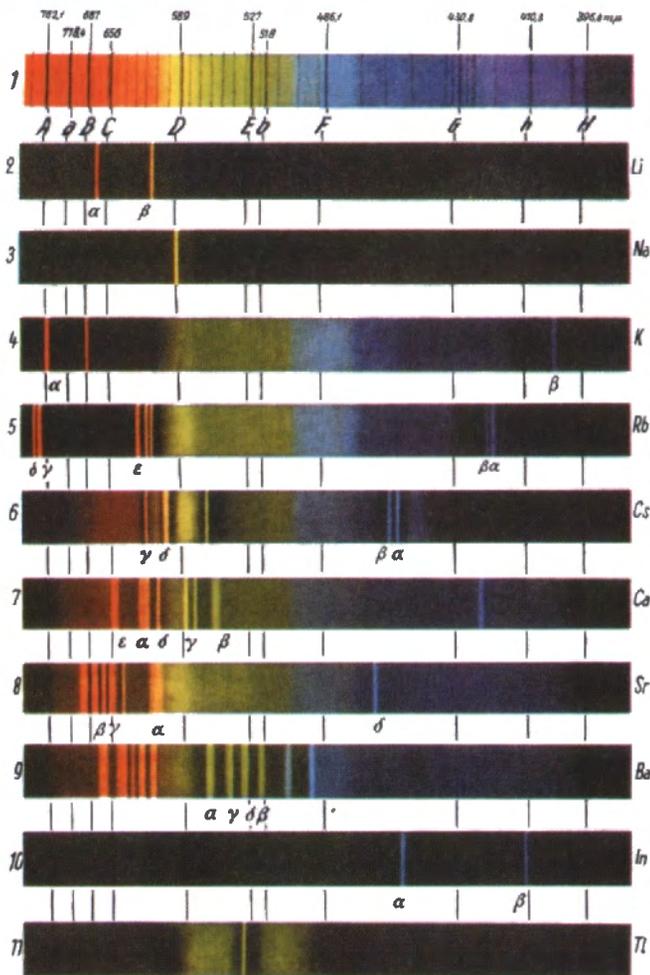
**Рис. 1.4.** Линии Фраунгофера солнечного спектра. Медная решетка, 1814 г., воспроизведено с *Denkschriften der kgl. Akademie der Wissenschaften zu München*, 1814—1815, Vol. 5, Table II, Munich. 1817. Сплошная линия (см. рис. 3.4) показывает кривую чувствительности глаза человека (Deutsches Museum, Munich, Германия)



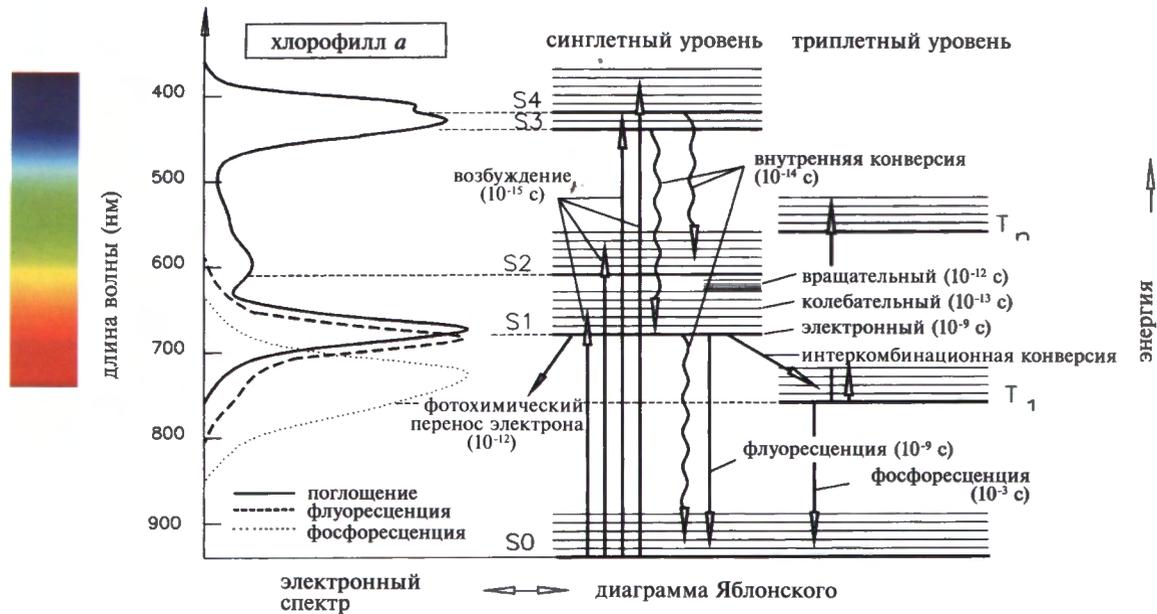
**Рис. 2.2.** Электромагнитный спектр покрывает более 24 порядка величины длины волны  $\lambda$ . Важная для оптической спектроскопии спектральная область, включающая ИК и УФ излучение, расширена; видимая область представлена в виде соответствующих цветов, воспринимаемых человеческим глазом. В нижней части рисунка добавлены некоторые типичные единицы измерения энергии



**Рис. 2.11.** Схемы терма пара- и ортогелия. Обе разновидности в действительности представляют один атом гелия, где синглетное состояние соответствует пара-, а триплетное состояние — ортогелию. Сопутствующий запрещенный переход между обеими системами (интеркомбинационная конверсия) объясняет существование двух независимых разновидностей

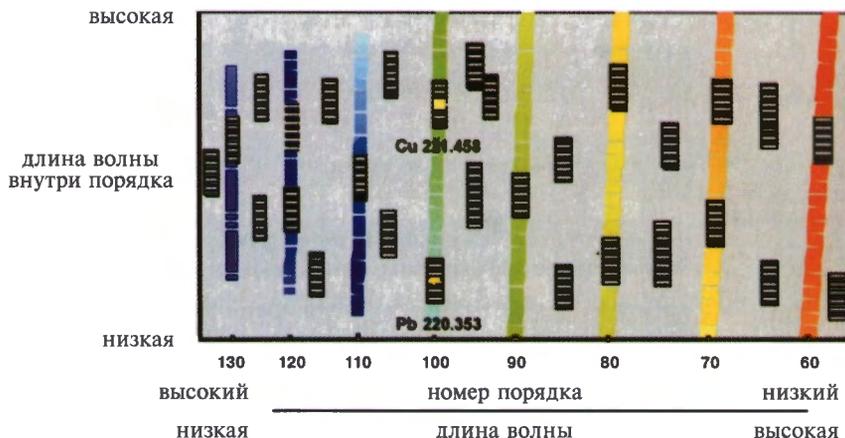


**Рис. 2.14.** Линейчатые спектры различных элементов видимого спектрального диапазона, полученные на дифракционном спектрофотометре. В сплошном спектре Солнца много черных линий, которые объясняются поглощением солнечного излучения в хромосфере Солнца. Например, линии С и F Фраунгофера — это первые две линии бальмеровской серии водорода (ср. с рис. 2.6), линия D — это дублет натрия (ср. с рис. 2.13), линии E и G — две из многих линий железа (ср. с рис. 2.10), линии A и B — линии кислорода  $O_2$  (ср. с рис. 2.19)

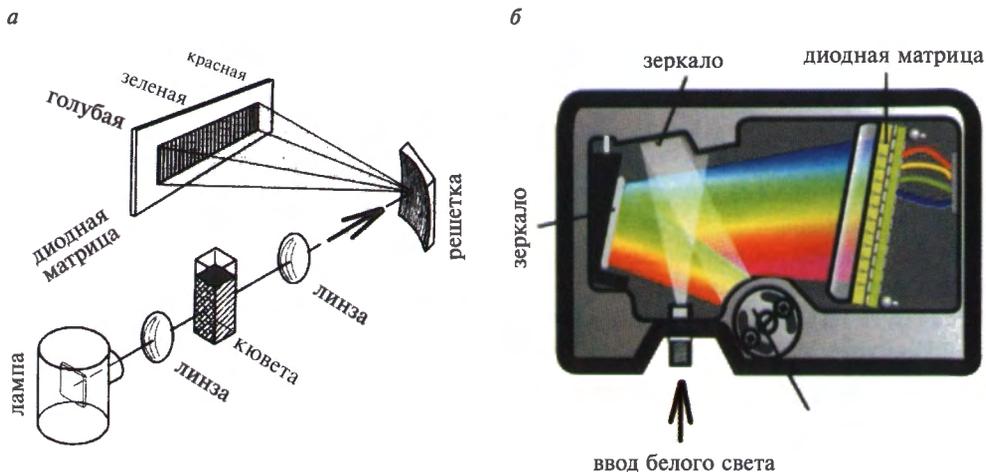


**Рис. 2.32.** Сравнение спектров поглощения, флуоресценции и фосфоресценции с соответствующей диаграммой Яблонского сложной молекулы — хлорофилла. Этот зеленый пигмент, содержащийся в листьях растений, отвечает за преобразование света в химическую энергию во всех фотосинтетических организмах. Наложение электронных, колебательных и вращательных состояний приводит к образованию специфической структуры спектров (фингерпринта). В сложных системах, как эта, имеет значение только разница между триплетными ( $T_1, \dots, T_n$ ) и синглетными состояниями ( $S_1, \dots, S_n$ ). Приведены также важные особенности и характеристические временные постоянные

## Детектор на основе сегментированной матрицы прибора зарядовой связи (СПЗС = SCD)



**Рис. 4.9.** Эшелограмма — это двухмерное представление нескольких порядков рассеяния. Все линии спектра атомной эмиссии локализованы в хорошо определяемых областях, где они обнаруживаются посредством субматриц от 20 до 80 пикселей каждая и далее преобразуются отдельными электрическими цепями и подаются на компьютер. Все матрицы и отдельные твердотельные компоненты объединены в обычный чип (воспроизведено с любезного разрешения PerkinElmer Inc.)



**Рис. 5.7.** а — Схема диодно-матричного спектрофотометра (оптического многоканального анализатора — ОМА). Его основное преимущество — отсутствие движущихся частей. Спектральное разрешение обеспечивает диодная матрица («Hewlett Packard»). б — Миниатюрная версия ОМА (USB 2000, Ocean Optics); размеры:  $\sim 80 \times 63 \times 34$  мм, вес 190 г.

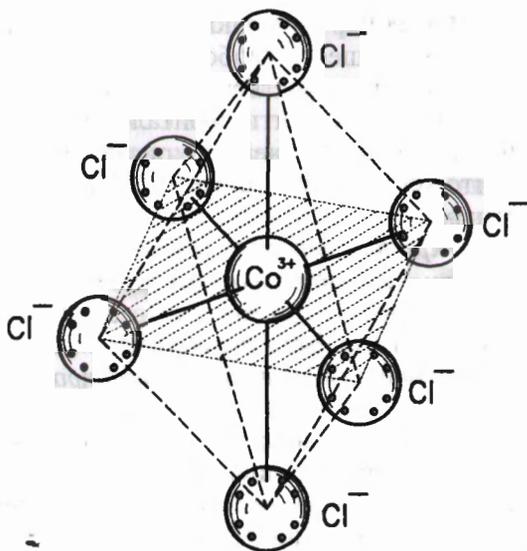


Рис. 5.27. В гексахлориде кобальта ( $\text{CoCl}_6^{3-}$ ) центральный ион кобальта ( $\text{Co}^{3+}$ ) окружен шестью ионами  $\text{Cl}^-$ , которые занимают углы октаэдра

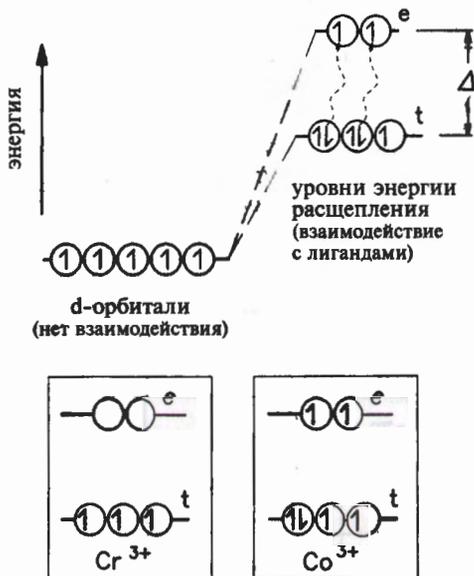


Рис. 5.28. Расщепление пяти  $d$ -орбиталей центрального атома в октаэдрическом поле лиганда. В зависимости от соотношения энергии кристаллического расщепления ( $\Delta$ ) и энергии спаривания электронов свободные электроны распределяются либо на нижележащем уровне  $t$ -орбиталей, либо на вышележащем уровне всех пяти орбиталей ( $2e + 3t$ )

имеет три внешних электрона, занимающих три нижерасположенных  $t$ -орбитали. А ион  $\text{Co}^{3+}$  имеет шесть свободных электронов. При меньшей  $\Delta$  энергии, например в гексафториде кобальта, электроны будут распределены случайным образом на всех пяти орбиталях (см. рис. 5.28). С другой стороны, в гексаанидиде кобальта энергия кристаллического расщепления  $\Delta$  настолько велика, что комплекс поглощает в УФ области, поэтому вещество кажется бесцветным.

При низкой энергии кристаллического расщепления  $\Delta$  суммарный спин  $S$  системы, в соответствии с законом сложения векторов, будет большим (высокий спин), в противоположном случае — маленьким (низкий спин). Таким образом, данные свойства могут быть независимо от оптико-спектрального анализа обнаружены с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Эмпирически показано, что энергия кристаллического расщепления  $\Delta$  увеличивается с увеличением концентрации зарядов лигандов в пространстве. В большей степени не зависящие от типа центрального атома, спектрохимические последовательности лигандов в порядке увеличения расщепления и, следовательно, гипсохромного смещения их спектров, имеют вид:



На примере  $\text{Co}^{3+}$  в таблице 5.4 продемонстрировано изменение окраски комплексов переходных металлов.

**Табл. 5.4.** Более «сильные» лиганды увеличивают энергию кристаллического расщепления  $\Delta$ , что проявляется в гипсохромном смещении максимума поглощения, благодаря чему раствор таких молекул приобретает окраску дополнительного цвета

Комплексы $\text{Co}^{3+}$	Поглощение (нм)	Дополнительный цвет (наблюдаемый)
$[\text{CoF}_6]^{3-}$	700	Зеленый
$[\text{Co}(\text{CO}_3)_3]^{3-}$	640	Зелено-голубой
$[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	600	Голубой
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$	535	Пурпурный
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OH}]^{2+}$	500	Красный
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$	475	Желто-оранжевый
$[\text{Co}(\text{CN})_5\text{Br}]^{3-}$	415	Лимонно-желтый
$[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$	310	Бледно-желтый

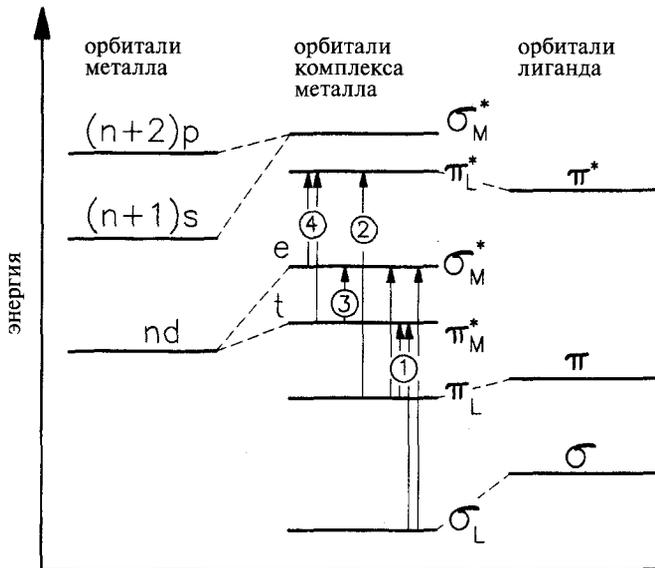
Комплексам переходных металлов присуще чрезвычайное разнообразие цвета. Часто они поглощают в длинноволновой области видимого спектра. В фотофизике, фотобиологии и фотохимии они используются как аналоги

фоторецепторов. Также их используют в фотодинамической терапии раковых больных.

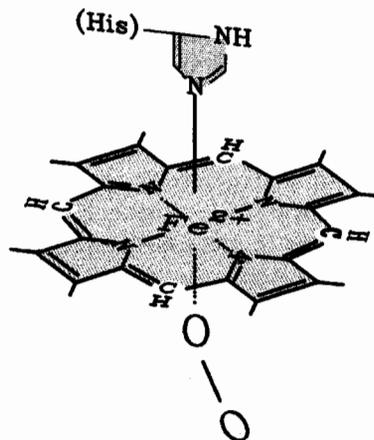
В комплексах переходных металлов можно выделить три типа электронных переходов (см. рис. 5.29):

- переходы между молекулярными орбиталями (МО) внутри центрального атома металла, который, несмотря на связывание с лигандами, сохраняет свой металлический характер. Такие переходы очень слабые ( $\epsilon = 10 - 100 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), так как они симметрично запрещены;
- переходы между МО, которые локализованы в основном в лигандах и на которые образование комплекса почти не влияет;
- переходы между МО, которые локализованы и в центральном атоме, и в лигандах: переходы с переносом заряда (см. главу 5.3.2). Эти переходы очень интенсивны ( $\epsilon = 1\,000 - 10\,000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и, следовательно, часто обнаруживаются в УФ или видимом спектральном диапазоне. Они обуславливают оптико-спектральные свойства большинства биологических и биохимических молекул.

Очень важную для биологии группу комплексов металлов составляют порфириновые пигменты, такие как гемоглобин (пигмент крови, центральным атом которого является  $\text{Fe}^{2+}$ ), различные редокс-активные цитохромы дыхательной цепи или хлорофилл (зеленые молекулы растений, центральным атомом которых является Mg) всех фотосинтетически активных орга-



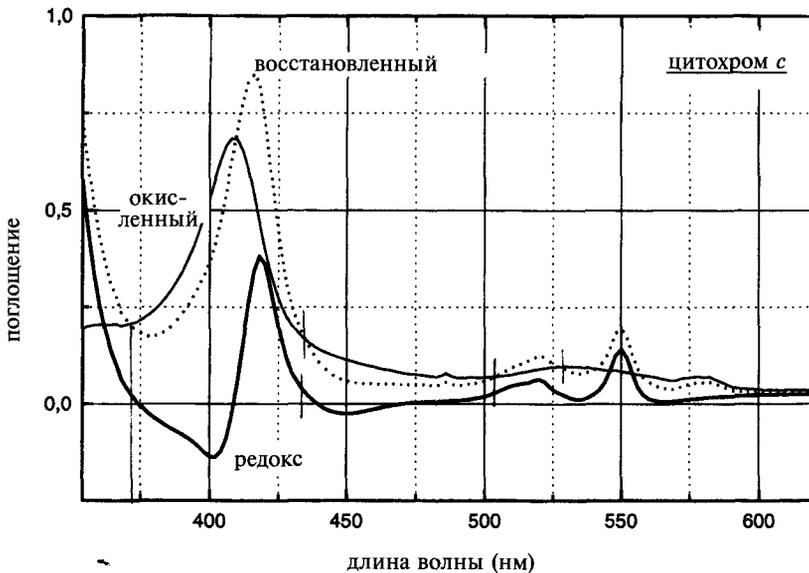
**Рис. 5.29.** Три типа электронных переходов в комплексах переходных металлов. (1, 4) Переходы между лигандами и центральным атомом. Этот тип переходов отвечает за характерную окраску и существенные свойства многих комплексов переходных металлов и порфиринов. (2) Переходы внутри лигандной сферы. (3) Переходы, локализованные в центральном атоме (воспроизведено из статьи Neubacher и Lohmann в: W. Hoppe, W. Lohmann, H. Marckl, H. Ziegler, Biophysik. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, N.Y., 1982)



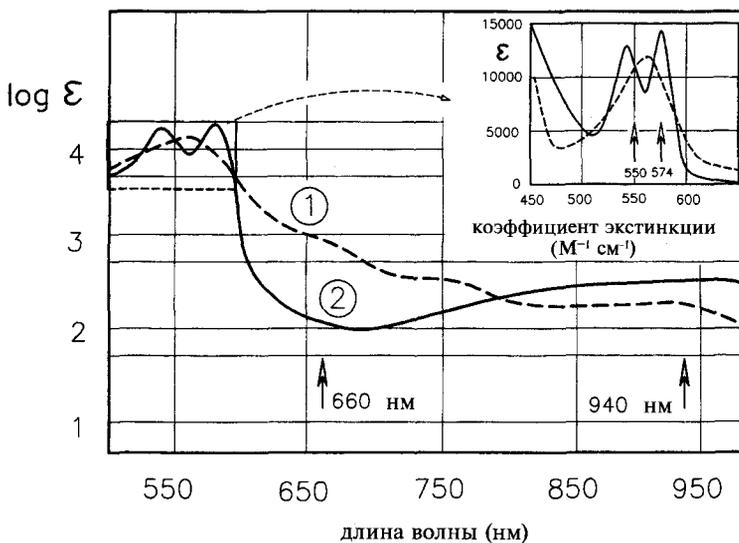
**Рис. 5.30.** Схематическое представление молекулы гема, связанного с молекулой O<sub>2</sub>, которая занимает нижний угол октаэдрической пирамиды; верхний угол занят гистидином апопротеина

низмов. Октаэдрическая структура с центральным атомом металла, характерная для таких молекул, встречается в некоторых белках. Четыре позиции лиганда в основании пирамиды заняты неподеленными парами электронов атомов азота плоскостной порфириновой кольцевой системы. Если центральным атомом является атом железа, то этот комплекс порфирина называется гемом или гемовой группой. В гемоглобине (см. рис. 5.30) два вершинных угла пирамиды заняты специфическими аминокислотами (гистидином) и/или молекулой кислорода. А в цитохроме *c* вершинные пирамидальные углы гема заняты атомом азота гистидинового остатка и атомом серы метионинового остатка окружающего белка. Редокс (окислительно-восстановительное) изменение цитохромов происходит за счет центрального атома железа  $[(Fe^{2+}) \leftrightarrow (Fe^{3+})]$ . Соответствующие спектры поглощения цитохрома *c* представлены на рис. 5.31. Изменения максимума поглощения цитохромов (так называемых  $\alpha$ -пиков: цитохрома *c* на 550 нм, цитохрома *b* на 560 нм, цитохрома *a* на 610 нм) очень специфичны и используются для их идентификации, тогда как соответствующие  $\beta$ - и  $\gamma$ -полосы менее информативны ( $\gamma$  = полоса *Soret*).

В гемоглобине пятым лигандом является также атом азота гистидина, шестая позиция остается свободной для связывания молекулы кислорода. В геме атом железа всегда находится в двухвалентной форме. Артериальная, несущая кислород кровь, всегда красного цвета, в то время как венозная кровь темно-красного цвета, что отражается на их спектрах (см. рис. 5.32). Это изменение поглощения вызвано связыванием кислорода в красном спектральном диапазоне (660 нм) и ближнем ИК диапазоне (940 нм). Эта особенность крови используется в медицине (в импульсных оксиметрах) для измерения и мониторинга насыщения кислородом крови (на мочке уха или на кончике пальца). Эта область более предпочтительна, несмотря на то, что изменение поглощения гемоглобина в диапазоне от 560 до 575 нм на порядок величины больше, но рассеяние биологических тканей тут также значительно выше, что затрудняет анализ (см. главу 8).



**Рис. 5.31.** Спектры поглощения цитохрома *c* в его окисленном и восстановленном состоянии и рассчитанный разностный спектр. Характеристикой цитохрома *c* является  $\alpha$ -пик на длине волны 550 нм, который используется при ферментативном анализе митохондрий (в дыхательной цепи)



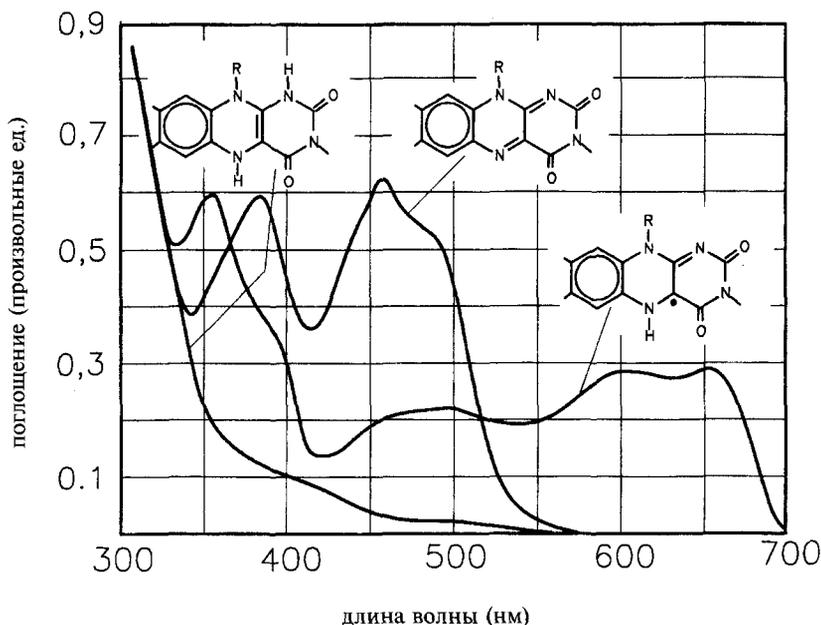
**Рис. 5.32.** Спектр поглощения гемоглобина в состоянии: (1) — свободном от кислорода, (2) — связанном с кислородом. Для большей наглядности весь спектр приведен в логарифмическом (шкала  $\epsilon$ ) масштабе, а спектр во вставке — в линейном масштабе. Как известно, переносящая кислород артериальная кровь красного цвета, что объясняется более чем в 10 раз низким поглощением ее в красной области (более высокая отражательная способность)

## 5.4. Модификация спектров поглощения

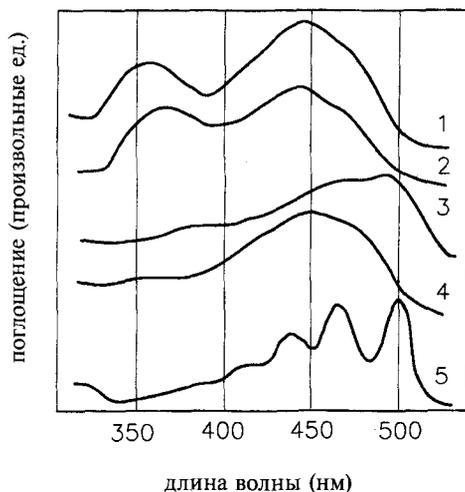
В данной книге термин модификация описывает (1) изменение спектров поглощения, вызванное условиями эксперимента, и (2) математическую обработку уже существующих спектров для получения дополнительной информации.

### 5.4.1. Разностная спектрофотометрия

Как уже упоминалось, всем молекулам присущи свои специфические спектры поглощения. Различные параметры, такие как температура, полярность растворителя (микроокружение), подвижность (т.е. вязкость микроокружения при погружении в него), значение pH (рК), наличие водородных связей и многое другое, влияют на спектр молекулы, часто изменяя его весьма незначительно. Следовательно, очень важно при измерении спектров поглощения отслеживать все соответствующие условия проведения эксперимента, такие как растворитель, температуру, ионную силу, ширину щели и прочие. Однако окислительно-восстановительные изменения и другие, кажущиеся незначительными, внутримолекулярные изменения приводят к существенным спектральным изменениям. Например, это видно из сравнения спектров «бесцветного» лейкофлавина и радикала флавина со спектром желтого, полностью окисленного флавина (см. рис. 5.33) или ред-окс



**Рис. 5.33.** Спектры поглощения трех возможных состояний флавинового хромофора (слева направо): восстановленная, окисленная и радикальная форма (голубой радикал). Окисленный хромофор является ароматическим соединением с соответствующим сильным поглощением ( $n = 4$ )



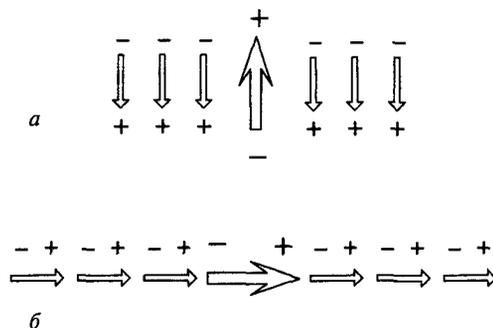
**Рис. 5.34.** Спектры поглощения окисленной формы флавина в воде: (1) при комнатной температуре, (2) при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  (жидкий азот). (4) Спектр поглощения  $\beta$ -каротина в этаноле при комнатной температуре, (5) при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Если флавин измерять в его твердом состоянии в виде порошка (с коррекцией на рассеяние, см. рис. 5.20), то получится спектр (3) (пик в ближней УФ области отсутствует!)

спектра цитохрома с (см. рис. 5.31) с несколькими изосбестическими точками. По определению, разностные спектры пересекают нулевую линию при длине волны, где коэффициенты экстинкции двух редокс форм идентичны. Разностные спектры могут служить основой для выбора длин волн в двухволновой спектроскопии (см. главу 5.5).

Ярким примером высокой температурной чувствительности спектра поглощения является спектр  $\beta$ -каротина. При комнатной температуре его спектр поглощения, за исключением отсутствия полосы в УФ области, очень похож на спектр поглощения флавинов. Однако при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  спектр поглощения  $\beta$ -каротина полностью изменяется, что объясняется ингибированием свободы вращения при этой температуре. С другой стороны, спектр флавина почти не изменяется даже при охлаждении до  $-196^{\circ}\text{C}$  (см. рис. 5.34).

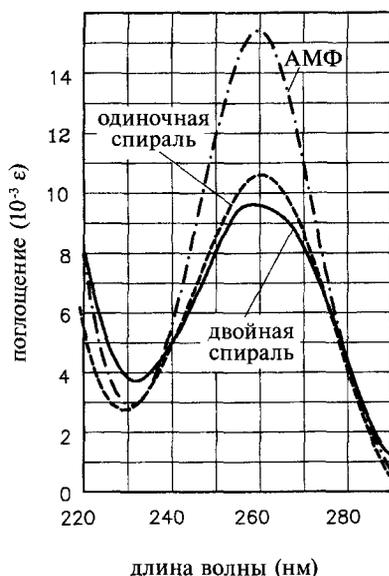
#### 5.4.2. Гипер- и гипохромизм

Абсорбционные свойства белков и нуклеиновых кислот при расщеплении до уровня отдельных аминокислот и нуклеиновых оснований существенно меняются: максимумы поглощения смещаются с одновременным изменением коэффициентов экстинкции  $\epsilon$ . Если  $\epsilon$  становится больше, то это гипер-, а если  $\epsilon$  становится меньше, то это гипохромизм (см. главу 5.1.3). Причиной такого изменения спектров является изменение взаимосвязей отдельных компонентов. При неразрушенной вторичной и третичной структуре молекулы взаимодействие ее отдельных составляющих совершенно отличается

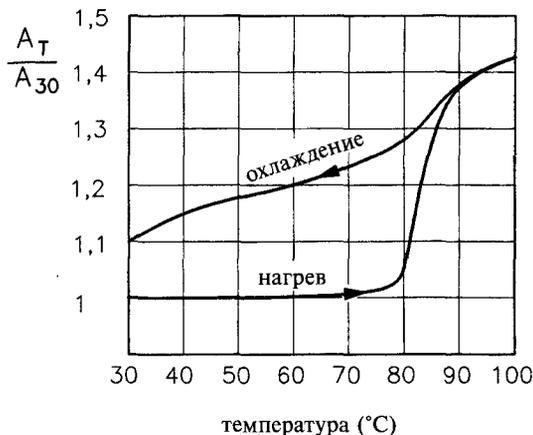


**Рис. 5.35.** Упрощенная схема гипер- и гипохромизма, вызываемых индуцированными дипольными моментами при их взаимодействии с исходным дипольным моментом. *а* — Параллельное расположение дипольных моментов вызывает гипохромизм. *б* — Последовательное расположение дипольных моментов вызывает гиперхромизм

от ситуации, когда отдельные аминокислоты или азотистые основания непосредственно контактируют с растворителем. Приближительное объяснение этому явлению заключается в том, что дипольный момент перехода  $m$  поляризует электроны сопряженных (или даже различных) соседних хромофоров и индуцирует таким образом дипольный момент перехода  $m'$ . Параллельное существование дипольных моментов  $m'$  (см. рис. 5.35, *а*) уменьшает  $m$ , следовательно, вероятность поглощения снижается, и наблюдается гипохромизм. Однако, если индуцированные диполи  $m'$  собираются «последовательно» (см. рис. 5.35, *б*), то  $m$  возрастает, и наблюдается гиперхромизм.



**Рис. 5.36.** Гипохромизм полирибоадениловой кислоты (поли А). Мономер (АМФ) демонстрирует значительное поглощение, а одно- или даже дуспиральная поли А обладает более низким поглощением



**Рис. 5.37.** Увеличение поглощения при 260 нм при плавлении ДНК. Значительное увеличение поглощения при температуре 80°С соответствует типичному кооперативному процессу, который не полностью обратим при охлаждении

Эффекты гипохромизма редко используются для анализа структур макромолекул, но они применяются для простой и быстрой оценки, как качественной, так и кинетической, последовательности макромолекул в неочищенном состоянии. На рис. 5.36 представлен гипохромизм (с сопутствующим незначительным гипсохромным смещением) одно- и дуспиральной полирибоадениловой кислоты (поли А) в сравнении с мономером (при равных концентрациях мономеров). На рис. 5.37 показано увеличение поглощения на длине волны 260 нм при плавлении деоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК, см. таблицу 5.2). Заметное возрастание поглощения при температуре 80°С характерно для кооперативных процессов, которые, следовательно, можно спектрофотометрически контролировать. Однако при охлаждении процесс не полностью обратим.

### 5.4.3. Дифференциальная спектрофотометрия

Дифференциальную спектрофотометрию ввели в практику в 1953 г. Хэмонд с Прайсом и Моррисон. С тех пор она находит все более широкое применение во всех областях оптической спектроскопии. Несмотря на аналитическую эффективность ее применения, как будет видно далее, следует с осторожностью истолковывать ее результаты.

Первая, вторая и более высокие производные (дифференцирование) от спектра поглощения  $A(\lambda)$  определяются как частное дифференциалов:

$$\frac{dA}{d\lambda}, \frac{d^2A}{d\lambda^2}, \dots, \frac{d^n A}{d\lambda^n}$$

(см. рис. 5.38). Например, первая производная — это наклон спектральной кривой в каждой отдельной точке в зависимости от длины волны; максимум спектра поглощения соответствует пересечению первой производной

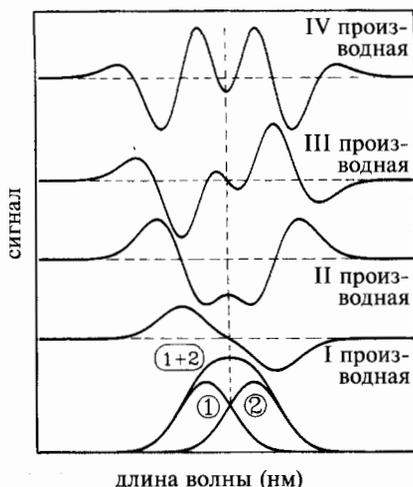


Рис. 5.38. Первая — четвертая производные от аддитивного спектра (1 + 2), состоящего из двух подобных кривых Гаусса, слегка смещенных относительно друг друга (1, 2)

с нулевой линией. Оптимумы первой производной соответствуют изменению наклона в исходном спектре. Если вторая производная больше нуля, то кривая спектра на этой длине волны изгибается вверх (по оси + y), и наоборот. Без обсуждения радиусов кривизны, точек обращения и прочих деталей на приводимом искусственном примере видно, что обе составляющие общий спектр поглощения компоненты становятся более выраженными с увеличением порядка производной, тогда как в исходном спектре они неразличимы. Особенно в четвертой производной обе исходные компоненты лучше разрешимы, чем во второй, с положением точек максимума в том же (положительном) направлении, как и у исходных компонент, что облегчает интерпретацию. В соответствии с законом Ламберта — Бера:

$$A = c \times x \times \varepsilon \quad (5.5)$$

первая производная спектра будет иметь вид:

$$\frac{dA}{d\lambda} = c \times x \times \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$

вторая производная:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = c \times x \times \frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}$$

а наиболее ценная четвертая производная будет иметь вид:

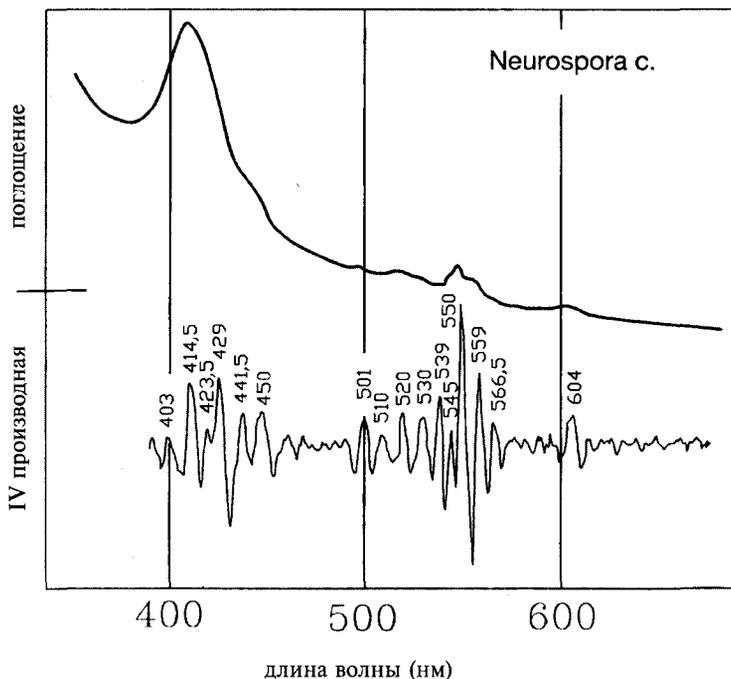
$$\frac{d^4A}{d\lambda^4} = c \times x \times \frac{d^4\varepsilon}{d\lambda^4}, \text{ и т. д.} \quad (5.17)$$

Следовательно, высота дифференциальных спектров прямо пропорциональна концентрации, что увеличивает ее аналитическое значение. Конечно, на практике дифференцирование заменяют разностью длин волн:  $d\lambda \rightarrow \Delta\lambda = 1 \text{ нм}$ .

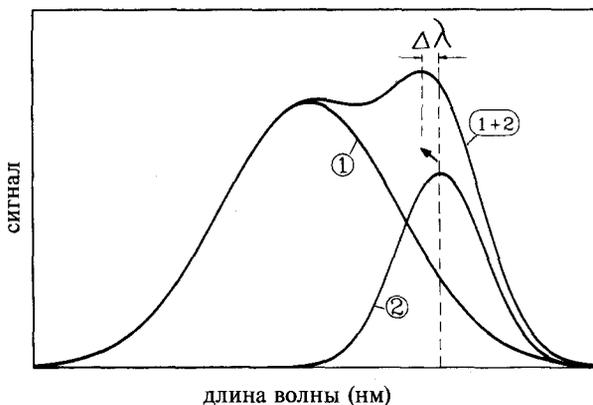
С увеличением порядка производной выявляются отдельные компоненты спектра, не разрешимые в исходном спектре. Однако таким же образом возрастает вероятность получения артефактных (ложных) значений. Например, в четвертой производной примера на рис. 5.38 появляются «субмаксимумы» (спутники) слева и справа от пиков, которые не соответствуют ни одной из реальных компонент исходного спектра.

На рисунке 5.39 приведен спектр поглощения при  $-196^\circ\text{C}$  мицелия белого мутанта гриба *Neurospora crassa* и его четвертая производная. Присутствует удивительно большое число отдельных компонент (не шум!), что связано с наличием различных составляющих дыхательной цепи.

Дифференциальная спектроскопия позволяет проводить точное определение максимумов поглощения отдельных компонентов, что требуется при проведении многокомпонентного анализа (см. главу 5.4.5). На рис. 5.40 снова представлен аддитивный искусственный спектр, со-



**Рис. 5.39.** Спектр поглощения мицелия белого мутанта гриба *Neurospora c.*, полученный при температуре  $-196^\circ\text{C}$ . Спектр содержит в среднем 32 отдельных спектра, сканированных однолучевым спектрофотометром. В спектре четвертой производной присутствуют пики, соответствующие различным отдельным компонентам образца



**Рис. 5.40.** Суммарный спектр (1 + 2) двух отдельных кривых Гаусса (1, 2) различной ширины и интенсивности. В суммарном спектре пик более узкой компоненты смещен на  $\Delta\lambda$  в направлении максимума более широкой и интенсивной компоненты

стоящий из двух значительно различающихся Гауссовых кривых. Первый удивительный результат мы наблюдаем в сдвиге пика суммарного спектра, обусловленного главным образом компонентой 2, в направлении максимума компоненты 1. Это очень частое явление, наблюдаемое в сложных спектрах. Максимум относительно более узкого и менее интенсивного пика 2 находится выше более широкого и интенсивного пика компонента 1 и смещен в сторону более широкого пика. Следует отметить, что максимумы пиков снова проявляются в четвертой производной.

Просуммируем преимущества дифференциальной спектрофотометрии:

- ширины пиков будут сужаться, что увеличивает разрешение по длине волны;
- «плоские» сигналы подавляются (в зависимости от выбора  $\Delta\lambda$ );
- количество пиков возрастает с увеличением порядка производной. Первая производная однопикового спектра дает два, двухпикового спектра — три пика,  $n$ -пикового спектра —  $(n + 1)$  пиков. Сателлитно-артефактные пики, упомянутые выше, могут быть использованы для идентификации вещества (фингерпринтирование);
- дифференциальная спектроскопия отличается простотой и высокой чувствительностью, например, можно определить 200 нг  $Zn^{2+}$  или  $Cd^{2+}$  в виде дитизоната при анализе микропримесей в окружающей среде, или  $< 1$  ppm (одна миллионная часть) анилина или фенола в питьевой воде. Этот метод широко применяется в фармакологии (анализ кортизола, витаминов, барбитуратов) и контроле пищевых продуктов (молока, соков, кофе, чая, какао, сыра, мяса);
- дифференциальная спектроскопия применяется не только в абсорбционной спектроскопии, но используется во всех видах спектрального анализа, в том числе и в флуоресцентной спектроскопии.

## 5.4.4. Корреляция

### 5.4.4.1. Теория

Любой сигнал в спектрометрии несет большой объем информации, и существует множество методов ее извлечения. Это так называемые «корреляционные методы». Корреляция в общем представлении — это понятие, объединяющее различные аналитические процедуры и процессы в науке и технике, даже если они не всегда очевидны. В общем случае корреляция определяется как взаимодействие двух функций.

Математически корреляция описывается как процедура умножения-интегрирования. При этом обычно используется понятие свертки.

*Математически идентифицировать корреляцию со сверткой не совсем корректно. Рассмотрим функцию  $g(x)$  (уравнение 5.18): если  $g(x)$  обратима в отношении  $x$  и  $x'$  в положениях, приводимых в уравнении 5.18, то это свертка, а если только смещена, т.е.  $g(x' - x)$ , то это корреляция.*

Функция  $f(x)$  умножается на другую функцию  $g(x)$ , которая по отношению к оси  $x$  (время или пространство) немного смещена на определенную величину. Это произведение усредняется по всему  $x$ -диапазону (интегрируется). Такая процедура называется интегральной сверткой. Результатом является свертка  $h(x)$  двух функций  $f(x)$  и  $g(x)$ :

$$h(x) = \int_{x=-\infty}^{+\infty} f(x')g(x - x')d'x \quad (5.18)$$

Для каждого значения  $x$  (в спектроскопии это длина волны  $\lambda$ ) можно отдельно рассчитать значение  $h$ . Каждой отдельной точке (длине волны) интеграла свертки необходимо интегрирование по всему доступному (в этом примере — лишь одномерному) пространству, что требует для расчетов значительного времени.

Уравнение 5.18 обычно представляется в сокращенной форме:

$$h(x) = f(x) * g(x) \quad (5.19)$$

где знак «\*» означает операцию свертки.

На практике уравнение 5.18 заменяется конечным суммированием, которое легко реализуется с помощью компьютерных программ:

$$h(n) = \sum_{m=0}^n f(n)g(n - m) \quad (5.20)$$

### 5.4.4.2. Сглаживание

Усредняющие свойства корреляционной функции часто используются для сглаживания шумовых сигналов. Кривая (1) на рис. 5.41 — это шумовой спектр поглощения листа бука, полученный с использованием экстремально узкой ширины щели порядка 0,1 нм и светового источника с пониженным напряжением. Свертка этого спектра с помощью простой

прямоугольной функции дает превосходное сглаживание (кривая (2) на рис. 5.41).

*В некоторых случаях, аналогичных приведенному примеру, вычисления можно существенно сократить. В данном случае функция  $f(x)$  описывает спектр в диапазоне от 360 до 760 нм, а  $g(x)$  является прямоугольной функцией (часто называемой kern-функцией) с шириной сглаживания 22 нм. С помощью микрокомпьютера необходимые вычисления занимают долю секунды, так как каждая отдельная длина волны интегрировалась по небольшой ширине kern-функции, а не по всему диапазону длин волн.*

Конечно, этот процесс происходит только в течение действительного измерения на спектрофотометре и если ширину щели до измерения для снижения шума установили на значении 22 нм. Однако эффективная щелевая функция спектрофотометра с типично идентичными прямоугольными входной и выходной щелями отображается скорее в треугольном, а не прямоугольном виде (см. рис. 5.43).

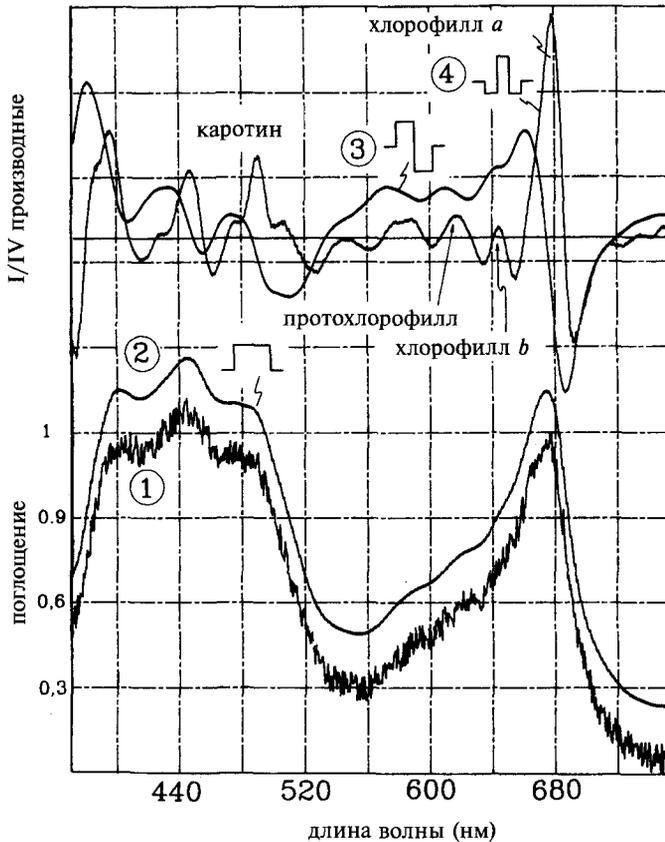
Процедуру корреляции спектра с использованием kern-функции можно представить как структурное упрощение, позволяющее проанализировать спектр. «Шум» (быстрые, малые и нерегулярные изменения сигнала) не содержится в сглаженной, прямоугольной функции, применяемой для сглаживания: он просто не исследуется и, следовательно, подавляется.

#### 5.4.4.3. Производные

В качестве корреляционной функции можно использовать другую простую kern-функцию, состоящую из положительной и отрицательной прямоугольных функций, как показано на рис. 5.41 (3). Ее форма напоминает первую производную от одиночной полосы молекулярного спектра. Действительно, корреляция спектра поглощения листа бука такой kern-функцией дает точно первую производную, что можно проверить, сделав сравнение определения производной с формулой:  $g(x) \sim f(x) - f(x-dx)$ . Ширина kern-функции соответствует « $dx$ » обычной дифференциальной спектроскопии. Если заменить kern-функцию ее зеркальным отображением, то первая производная станет обращенной, что эквивалентно умножению на « $-1$ ».

Если выбрать  $W$ -образную kern-функцию (4) (см. рис. 5.41), то получим четвертую производную от спектра поглощения. Полученная кривая позволила определить два пигмента образца, что демонстрирует аналитические возможности дифференциальной спектрометрии.

Суммируя: интеграл свертки с kern-функцией, перекрывающей лишь небольшой спектральный диапазон, равный ширине щели, позволяет элегантно оценивать как производные, так и функции сглаживания. Ширина kern-функции легко регулируется в зависимости от определенных требований модификации спектра. Изменяя форму kern-функции, можно из сложных спектров выделить специфические компоненты, например, цитохром  $b$ , не определяемый в основном спектре.



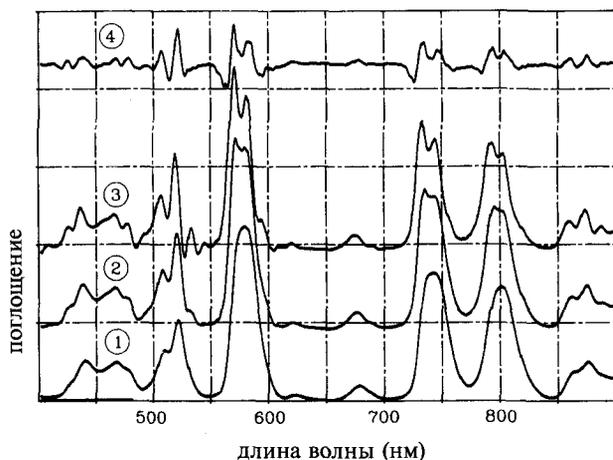
**Рис. 5.41.** Корреляция шумового спектра поглощения листа бука (1) с прямоугольной kern-функцией приводит к сглаживанию (2) с kern-функцией, приведенной в спектре (3) для первой производной, и с «W»-образной kern-функцией (4) в спектре четвертой производной

#### 5.4.4.4. Деконволюция

Как уже упоминалось, процесс свертки производится во время измерения на спектрофотометре, когда в качестве эффективной kern-функции (получаемой с идентичными входной и выходной щелями) используется треугольная функция (см. главу 5.4.4.5). Если внимательнее рассмотреть формулу интеграла свертки в уравнении 5.20, то представляется возможным простое ее преобразование. Таким образом мы сможем восстановить спектральное разрешение, потерянное практически неизбежной сверткой спектра в течение измерения щелевой функцией:

$$f(n) = h(x) - \sum_{m=1}^n g(n) f(n-m) \quad (5.21)$$

Через этот алгоритм из измеряемого спектра  $f(n-m)$  с использованием собственной известной kern-функции  $g(n)$  спектрометра полу-



**Рис. 5.42.** Спектры поглощения дидимия (фильтр BG 32), полученные при щелях шириной 10 (1) и 1 (2) нм. «Разворачивание» свернутого спектра 1 с помощью прямоугольной kern-функции с шириной 10 нм дает спектр 3. Кривая 4 — четвертая производная спектра 1 ( $dx = 10$  нм), тонкая структура которой сравнима со структурой восстановленного спектра 3, т.е. методы эквивалентны

чается «развернутый» спектр  $f(n)$ . Исходное значение  $f(0)$  просто является коэффициентом нормализации. Для упрощения и демонстрации вместо правильной, но более сложной треугольной функции выберем в качестве  $g(n)$  прямоугольную функцию определенной ширины. Например, «свертка» спектра поглощения дидимия (фильтр BG 32, Schott, Германия), специально полученного с большими входной и выходной щелями шириной 10 нм, дает спектр, представленный на рис. 5.42, кривая 1. Для сравнения на рис. 5.42 представлен спектр дидимия, полученный сканированием при ширинах щелей 1 нм (кривая 2). Более низкое спектральное разрешение спектра (1) устраняется использованием kern-функции с шириной 10 нм, т.е. производится обратное вычисление с теоретической шириной щели, равной 0, — получается спектр (3), который превосходит, как и следовало ожидать, по разрешению спектр (2), полученный с разрешением 1 нм. На рис. 5.42 представлена также четвертая производная (4) спектра 1, которая, однако, не содержит больше структурной информации, чем обратно рассчитанный с нулевой шириной щели спектр 3.

#### 5.4.4.5. Сравнение Фурье-преобразования с корреляцией

Математически анализ Фурье является одним из видов корреляционных методов. Согласно Фурье, кривые любой формы  $f(x)$  (которые, конечно, удовлетворяют некоторым постулатам типа непрерывности) можно разложить на неограниченное количество синусоидальных и косинусоидальных функций. Этот закон описывается теоремой Фурье, которая в общем виде имеет комплексную форму:

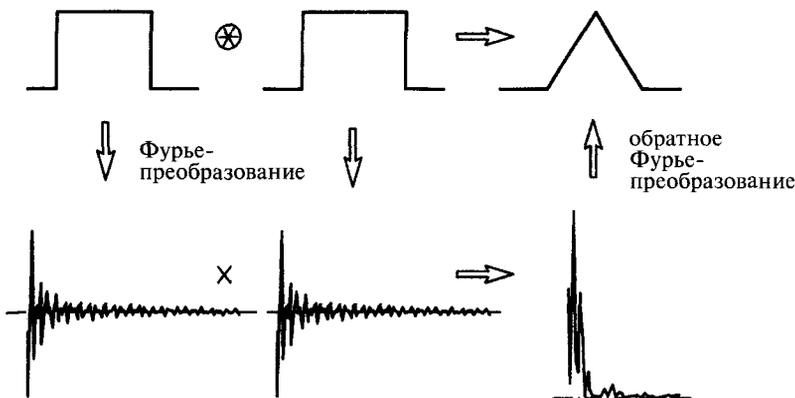
$$h(x) = \int_{x'=-\infty}^{+\infty} f(x')e^{-2\pi ixx'} dx' \quad (5.22)$$

где используется преобразование Эйлера:  $ze^{ix} = \cos x + i \sin x$  с  $i = \sqrt{-1}$ . В уравнении 5.22 явно просматривается аналогия с уравнением 5.18, но здесь ядро функции  $g(x)$  просто заменена экспоненциальной функцией. Если пренебречь мнимой частью уравнения 5.22, которая содержит только информацию о фазе, то оно значительно упростится до основного уравнения спектроскопии Фурье-преобразования, легко применимого на практике:

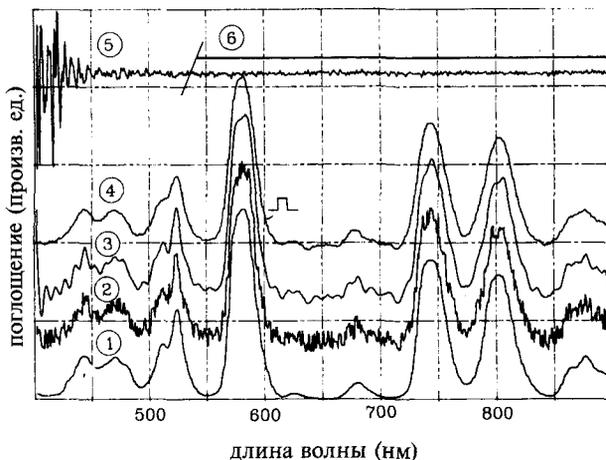
$$h(x) = \int_{x'=-\infty}^{+\infty} f(x') \cos(-2\pi xx') dx' \quad (5.23)$$

Иллюстрация очень важной теоремы спектроскопии, которая гласит, что Фурье-преобразование и свертка взаимосвязаны, представлена на рис. 5.43. Как уже упоминалось, корреляция прямоугольной функции на саму себя (автокорреляция) дает треугольную функцию, а Фурье-преобразование прямоугольной функции, в соответствии с уравнением 5.23, дает функцию  $(\sin x)/x$ . Таким образом, основным утверждением теоремы Фурье является то, что свертка двух функций эквивалентна произведению их Фурье-преобразований. В случае прямоугольной функции произведение ее Фурье-преобразования на саму себя дает  $[(\sin x)/x]^2$ . Обратное Фурье-преобразование последней снова приводит к треугольной функции, которая доказывает эту теорему. Теоретически не имеет значения, как преобразовывать спектр. Однако на практике это имеет большое значение.

На рис. 5.44 сравниваются два метода сглаживания спектра поглощения дидимиевого фильтра, полученного с помощью свертки и с помощью Фу-



**Рис. 5.43.** Иллюстрация очень важной теоремы спектроскопии, которая гласит, что Фурье-преобразование и свертка взаимосвязаны. Корреляция прямоугольной функции на саму себя (автокорреляция) дает треугольную функцию, Фурье-преобразование прямоугольной функции дает функцию  $(\sin x)/x$ . Свертка двух функций (\*) соответствует произведению ( $\times$ ) их Фурье-преобразований. Обратное Фурье-преобразование последних приводит к треугольной функции



**Рис. 5.44.** Сравнение сглаживания спектра поглощения дидимиевого фильтра с помощью свертки и Фурье-преобразования. Кривая 1 — спектр поглощения дидимия; кривая 2 — тот же спектр, но с шумом; кривая 5 — Фурье-преобразование спектра 2 (с высокочастотными компонентами). Если отрезать высокочастотные компоненты, как показано на кривой 6, то обратное Фурье-преобразование дает кривую 3 (единственный вклад слева отсеченной точки на кривой 5). Свертка спектра 2 прямоугольной kern-функцией дает спектр 4

рье-преобразования. Кривая 1 показывает наличие большого шума в исходном спектре, а кривая 2 — тот же спектр с добавленным белым шумом. Кривая 5 — это Фурье-спектр кривой 2, в котором остались высокочастотные составляющие. Удалив высокочастотные составляющие из спектра 5, получаем спектр 6. Применив к нему обратное Фурье-преобразование, получаем спектр 3. Свертка спектра 2 с заданной прямоугольной функцией дает спектр 4. Таким образом, в практической работе по сглаживанию спектра предпочтительней пользоваться сверткой, а не Фурье-преобразованием, тем более, что на него тратится больше времени.

#### 5.4.5. Спектральный многокомпонентный анализ

Очень часто требуется определить наличие и/или концентрацию отдельных компонентов в неизвестной смеси. Если эти компоненты не проявляют взаимодействия, то данная задача является просто математической проблемой. Допустим, образец определенной толщины проявляет поглощательную способность  $A$ . Тогда, в соответствии с законом Ламберта — Бера (см. уравнение 5.5), спектр смеси из  $n$  компонентов будет иметь вид:

$$A(\lambda_i) = \sum_{j=1}^n \epsilon_j(\lambda_j) \times c_j$$

где  $j$  — порядковый номер компонента смеси. В более короткой форме закон Ламберта — Бера смеси будет иметь вид:



$$A(\lambda_i) = \sum_{j=1}^n \epsilon_{ij} \times c_j \quad (5.24)$$

или в матрично-векторной форме:

$$A_i = \epsilon_{ij} c_j \quad (5.25)$$

Для решения системы уравнений 5.25 применяется правило Крамера матричной алгебры, например, полагая наличие трех «*j*» компонентов на трех длинах волн «*i*» (контрольные точки) для концентрации первого компонента получим:

$$c_1 = \frac{\begin{vmatrix} A_1 & \epsilon_{12} & \epsilon_{13} \\ A_2 & \epsilon_{22} & \epsilon_{23} \\ A_3 & \epsilon_{32} & \epsilon_{33} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} \epsilon_{11} & \epsilon_{12} & \epsilon_{13} \\ \epsilon_{21} & \epsilon_{22} & \epsilon_{23} \\ \epsilon_{31} & \epsilon_{32} & \epsilon_{33} \end{vmatrix}} \epsilon_{ij} c_j \quad (5.26)$$

Данный детерминант-числитель, содержащий в первой колонке три значения поглощений, делится на детерминант матрицы исходных коэффициентов экстинкции. Аналогично можно определить концентрации остальных компонентов  $c_2$  и  $c_3$ . Из-за громозкости выкладок не будем здесь останавливаться на подробностях и обсуждать многочисленные альтернативные методы расчета многокомпонентного анализа. Множественные эксперименты и сложные расчеты дают хорошие результаты, однако в большинстве случаев на основе так называемых моделирующих анализов с «подходящими» компонентами и точно определенными соотношениями концентраций.

На практике чаще всего требуется проанализировать смеси только из двух компонентов, что можно сделать гораздо проще и с высокой точностью. При анализе трехкомпонентных смесей не следует ожидать ошибки ниже 5%. Только в очень специальных случаях возможно определение более пяти компонентов. Для всех практических случаев крайне важным является использование «метода детерминант», описанного выше, с благоприятным спектральным распределением отдельных компонентов и оптимальным подбором длин волн и контрольных точек по всему спектру поглощения.

## 5.5. Двуволновая спектрофотометрия

### 5.5.1. Введение

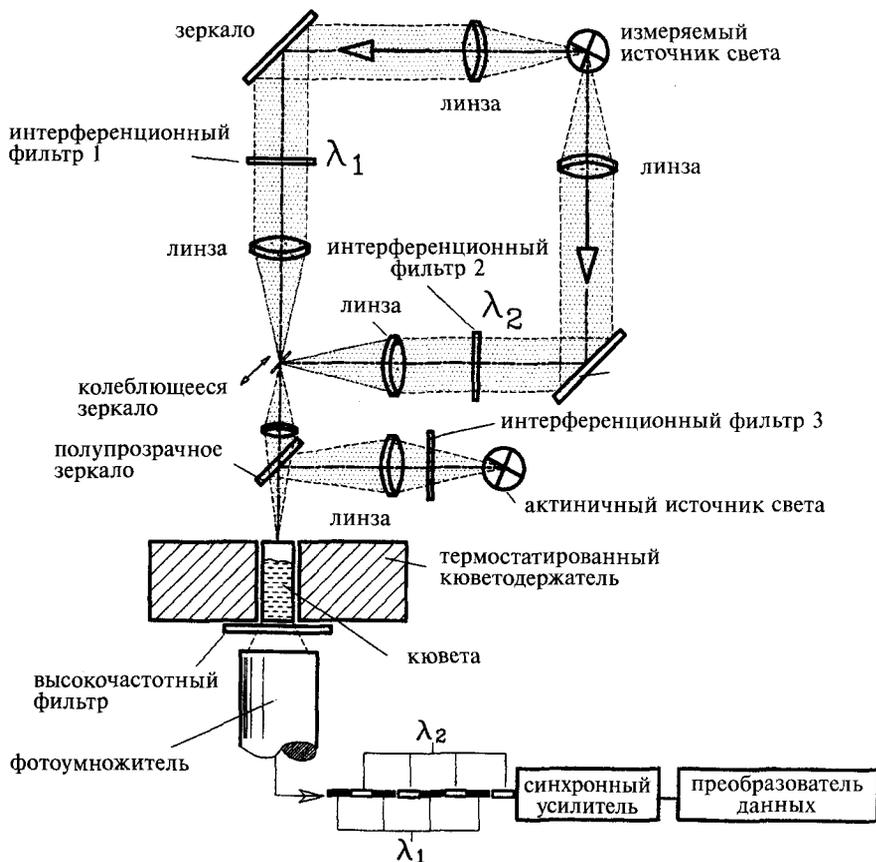
В начале 50-х годов прошлого века Брайтон Чанс предложил новый метод измерения очень маленьких изменений поглощения сильно рассеивающих и мутных образцов, которые являются частой аналитической процедурой

в биохимии и физиологии. Очень важные результаты были получены на основе метода двуволновой спектроскопии. Основная идея очень проста. В то время как в двулучевой спектроскопии, где две кюветы, с образцом и сравнением, облучаются светом одной, но переменной длины волны  $\{A = \log[I_0(\lambda)/I(\lambda)]$ , см. рис. 5.12}, в двуволновой абсорбционной спектрофотометрии используется только одна кювета — с образцом, которая облучается двумя различными длинами волн, и измеряется разница поглощений между  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , т.е.  $\Delta A = A(\lambda_1) - A(\lambda_2)$ . Метод обычно ограничивается двумя заранее определяемыми длинами волн, одна из которых соответствует изобесцветической точке пигментной системы, а другая — максимуму поглощения компонента системы. Образно говоря, измеряемый сигнал оказывается привязанным к сравнительному сигналу того же образца, что дает величину изменения поглощения. При этом в большой степени компенсируются все другие неопределенности типа долго- или краткосрочных сдвигов или шумовых компонентов, обычных для положений обеих длин волн. Процесс компенсации тем лучше, чем ближе расположены друг к другу измеряемая и сравнительная длины волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ . В отличие от двулучевой в двуволновой спектрометрии не так интересно абсолютное значение поглощения, как его относительное изменение со временем, т.е. кинетика. В зависимости от образца, метод двуволновой спектрофотометрии в 100—1 000 раз более чувствителен, чем обычная двулучевая спектрометрия.

### 5.5.2. Методы

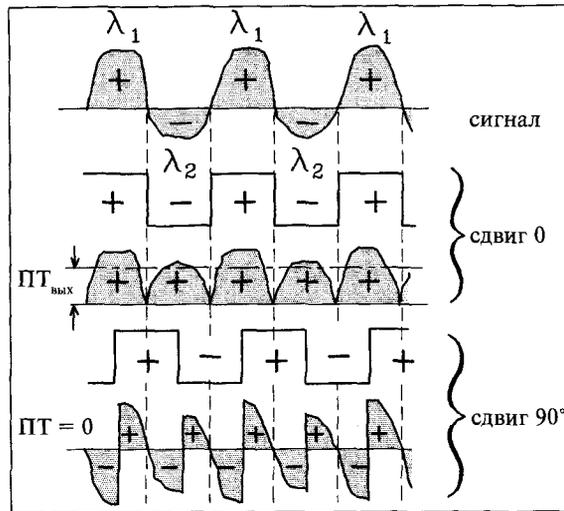
Схема стандартного двуволнового спектрофотометра приведена на рис. 5.45. Разрешение по длине волны здесь, в отличие от светосилы, имеет второстепенное значение. Поэтому в качестве «монохроматора» двуволнового спектрофотометра вполне подойдут узкополосные интерференционные фильтры. Они обладают большей светосилой, чем решеточные монохроматоры. Два луча света с длинами волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  посредством колеблющегося с частотой от 30 до 100 Гц зеркала попеременно облучают образец. Соответствующие сигналы  $I(\lambda_1)$  и  $I(\lambda_2)$  поступают на вход фазочувствительного усилителя (*синхронный усилитель*, см. главу 5.2.4), выходной сигнал которого после определенного преобразования подается для обработки на компьютер.

*Синхронный усилитель позволяет оценивать сигнал в 20 000 раз меньший по сравнению с отфильтровываемым шумовым сигналом от общего измеряемого сигнала, когда последний последовательно повторяется и синхронизируется с эталонной частотой как в двуволновом спектрофотометре. В принципе, синхронный усилитель действует как очиститель, отфильтровывающий «реальный сигнал» из общего сигнала селективным обнаружением фазы. Пульсирующий сигнал постоянного тока преобразуется затем в стабильный сигнал постоянного тока и усиливается (см. рис. 5.46). Синхронный усилитель функционирует на частотах от 0,2 до 200 кГц и в зависимости от применения используется в виде либо большого высококачественного и многопланового исследовательского приспособления, либо миниатюрного недорогого модуля с фиксированной фазой и может быть размером с сигаретную коробку.*



**Рис. 5.45.** Схема типичного двуволнового спектрофотометра. Два ортогональных луча, излучаемые одной лампой, разделяются, коллимируются и диспергируются интерференционными фильтрами с длинами волн пропускания  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ . Далее лучи света фокусируются на маленькое колеблющееся зеркало (типичная частота колебания составляет 120 Гц). Генерированная последовательность световых импульсов длин волн  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_1, \lambda_2, \dots$  в большей степени поглощается оптически плотным образцом, а малая интенсивность прошедшего света детектируется фотоумножителем. Выходной сигнал фотоумножителя преобразуется синхронным усилителем и подается на компьютер для обработки. Использование полупрозрачного зеркала и соответствующего блокирующего фильтра между образцом и детектором, чрезвычайно малого светового излучателя (актиничной лампы с интерфильтром 3) позволяет распознавать чрезвычайно низкие изменения поглощения ( $\Delta A < 0,0001$ ) при большом оптическом фоне ( $E \gg 4$ ). Кювета с образцом находится в специальном термостатированном держателе, гарантирующем постоянную температуру измерений

Обнаруживаемые изменения поглощения обычно бывают очень незначительными. В таком случае изменения в поглощении и пропускании практически идентичны и можно просто пренебречь обязательным



**Рис. 5.46.** Схематичное представление функционирования фазо- и частотно-селективных (синхронного) усилителей, применяемых в двулучевых и двуволновых спектрофотометрах. Сигналы при длинах волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  ослабляются образцом в различной степени, в результате генерируется сигнал, представленный на верхней диаграмме. После фазовой селекции усилителем (здесь  $0^\circ$ ) формируется требуемый разностный сигнал постоянного тока (ПТ)  $[I(\lambda_1) - I(\lambda_2) = \text{ПТ}_{\text{вых}}]$ . Если направление фазы усилителя смещено относительно измеряемого сигнала на  $90^\circ$ , выходной сигнал усилителя исчезает (значения постоянного тока ПТ = 0). Синхронный усилитель наиболее часто функционирует в режимах селекции по фазе и частоте

для обычного двулучевого спектрофотометра логарифмическим усилителем.

Если продифференцировать уравнение 5.6, то получим:

$$dA = -d \log T = -0,43 \frac{dT}{T}$$

Заменив дифференциалы на изменение значений, получаем:

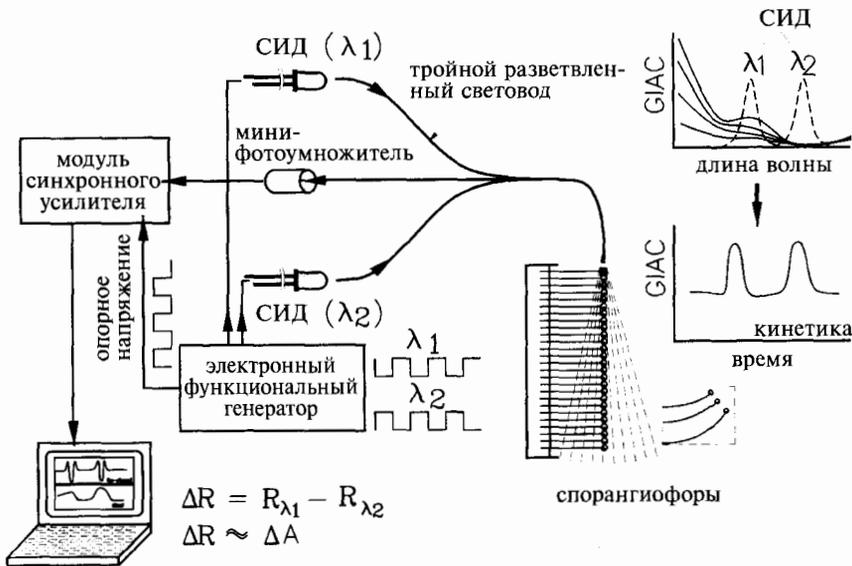
$$-\Delta A \propto 0,43 \frac{dT}{T}$$

При  $\Delta T \ll T$  имеем  $\Delta A \ll I$ . Следовательно, изменение пропускания  $\Delta T$  пропорционально изменению поглощения образца  $\Delta A$ .

Как уже упоминалось, двуволновая спектроскопия имеет большое значение для фотохимических и фотобиологических исследований. Так как измерение светового сигнала производится с одной определенной частотой, синхронный усилитель должен быть отрегулирован и настроен на эту частоту, тогда как все другие частоты и, особенно, сигналы постоянного тока должны совсем не усиливаться. Если детектор предохранен от действия

достаточно интенсивного актиничного света подходящими блокирующими фильтрами, то в (*in vivo*) образце он способен индуцировать фотохимические процессы. Таким путем, например, непрерывно и кинетически регистрируя весьма незначительные индуцируемые светом изменения в поглощении живых клеток, можно изучать первичные процессы сенсорной трансдукции в фотобиологии.

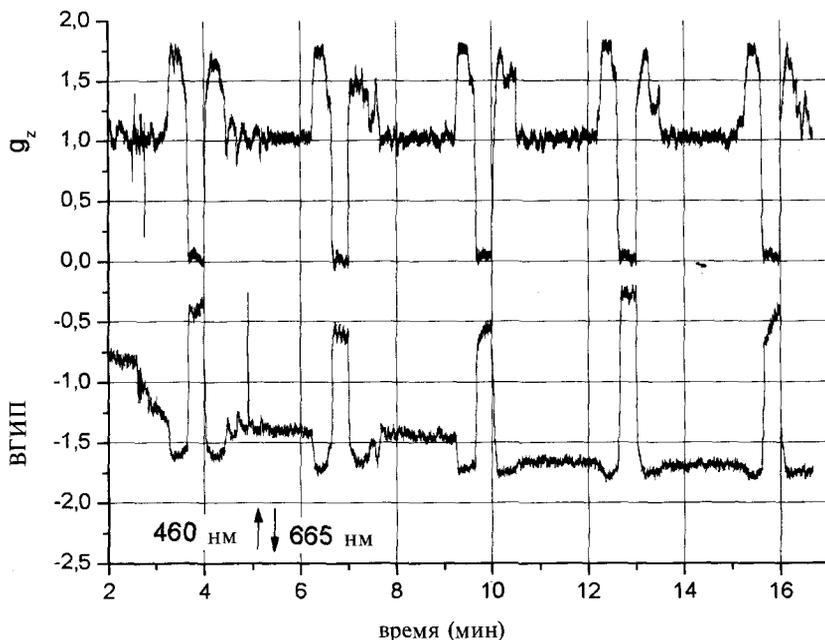
Двуволновой микроспектофотометр (см. рис. 5.47) является миниатюризированной, но весьма успешной модификацией описанной выше установки. Интерференционные фильтры, формирующие два луча света с различными длинами волн, и колеблющееся зеркало заменены здесь на электронно-прерываемые светоизлучающие диоды (СИДы) соответствующих длин волн. Использование частоты прерывания в кГц диапазоне и функционирующего генераторного чипа позволяет значительно снизить время ответа (<мс) и повысить чувствительность спектрофотометра за счет снижения  $1/f$  шума (см. главу 5.2.5). Установка характеризуется малыми габаритами, транспортабельностью и не содержит механически подвижных деталей, что позволяет использовать ее в «полевых» условиях, даже в параболетических полетах.



**Рис. 5.47.** Схема двуволнового микроспектофотометра (ДВМС = MDWS), применяемого для кинетического измерения незначительных изменений в отражении. Чередующийся свет от двух СИДов, излучающих длин волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , проходит по разным кабелям тройного оптоволоконного световода и облучает спороангиофоры гриба *Phycomyces*. Отраженный свет по третьему кабелю поступает на фотокатод миниатюрного фотоумножителя. После предварительного усиления измеренный сигнал подается на синхронный усилитель, на который подается также опорное напряжение от функционального генератора, подающего переменное напряжение на СИДы. После превращения сигнала в сигнал постоянного тока он подается на компьютер

### 5.5.3. Измерение вызванных гравитацией изменений в поглощении живых тканей

Впервые незначительные вызванные гравитацией изменения в поглощении (ВГИП = GIAC) живых тканей были получены на спорангиофорах гриба *Phycomyces*. Измерения были сделаны в полете на аэробусе 300-ZERO G с использованием спектрометра отражения, который работал в миллисекундном временном диапазоне. В этом спектрометре использовались СИДы голубого (460 нм) и красного (665 нм) света. При совершении аэробусом параболического полета в воздушном пространстве между Средиземным морем и Атлантическим океаном гравитация изменялась от 0 до 1,8 g ( $1 \text{ g} = 9,81 \text{ м/с}^2$ ). Как показано на рис. 5.48, в течение параболического полета ВГИП синхронно коррелировали с измеренными изменениями гравитации, что дало новое понимание первичных реакций, происходящих в грибах при изменении силы тяжести. Преобразования спектра отражения в спектр поглощения будут рассмотрены в главе 8.5.1.



**Рис. 5.48.** Измерение вызванных гравитацией изменений в поглощении (ВГИП) спорангиофоров гриба *Phycomyces* на спектрометре отражения (см. рис. 5.47) в течение 15 мин на 5 параболических полетах аэробуса. На верхней диаграмме представлены измеренные значения гравитации в  $g$  (ускорение свободного падения) ( $1 \text{ g} = 9,81 \text{ м/с}^2$ ). На нижней диаграмме представлены соответствующие ВГИП, показывающие либо возрастание либо снижение в голубой, либо снижение в красной области спектра (согласно Schmidt W., Galland P., J. Plant Physiol., 2004, v.135, p.183 - 192)



## 5.6. Спектрофотометры специального назначения

Начиная с конца последней мировой войны было разработано множество оптических спектральных аналитических устройств специального назначения. Несметно количество технической и патентной литературы в этой области. Множество замечательных идей, таких как анализ Фурье и корреляционный анализ, разработанных ранее, позволили расширить области применения спектроскопии.

Последние достижения в оптоэлектронике и микрокомпьютерной технике приводят ко все расширяющейся палитре спектрофотометрических приложений, которые не в последнюю очередь стимулируют потребителей конструировать самодельные установки, не всегда коммерчески доступные. Ниже будет проведено краткое обсуждение некоторых специфических приспособлений абсорбционной спектроскопии для быстрых спектральных и кинетических измерений.

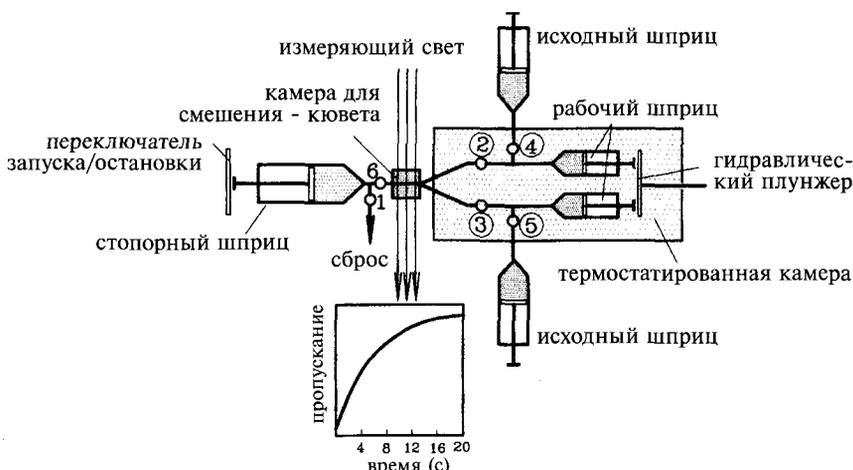
### 5.6.1. Спектрофотометрия остановленной струи

Наиболее часто используемый в химии и биологии способ контроля быстро протекающих процессов — метод остановленной струи. (см. рис. 5.49). Два компонента, которые вступают в реакцию между собой, помещаются в различные исходные шприцы (обычно емкостью 25 мл). С помощью гидравлической системы жидкости сначала вводятся в меньшие по размеру «рабочие шприцы». Затем гидравлическим поршнем жидкости впрыскиваются в измеряемую камеру, которая, в свою очередь, соединена со стопорным шприцем. В то время как «старая» жидкость поступает в стопорный шприц, камера-кювета наполняется «свежими» компонентами (смесью), так как плунжер стопорного шприца внезапно «останавливается» стопором, и таким образом начинается процесс получения данных, фиксируемых осциллографом или компьютером.

Большую проблему в этом методе создают пузырьки воздуха, поэтому предпринимаются меры по их предотвращению. Для управления температурой все устройство помещается в термостатируемую водяную баню. Хорошо сконструированный спектрофотометр остановленной струи обеспечивает время между началом смешения жидкостей и остановкой (началом измерений) менее 1 мс. В примере на рис. 5.49 представлена кинетика химической реакции (относительно медленной) дейтероферригема с перекисью водорода, выражающаяся в изменении пропускания.

### 5.6.2. Быстрый мониторинг спектра

Для исследования быстрых, например, катализируемых ферментами, химических реакций мониторинга на определенной длине волны бывает недостаточно, так как состав реакционной смеси изменяется неизвестным способом. Поэтому требуется быстрый спектральный мониторинг кинети-

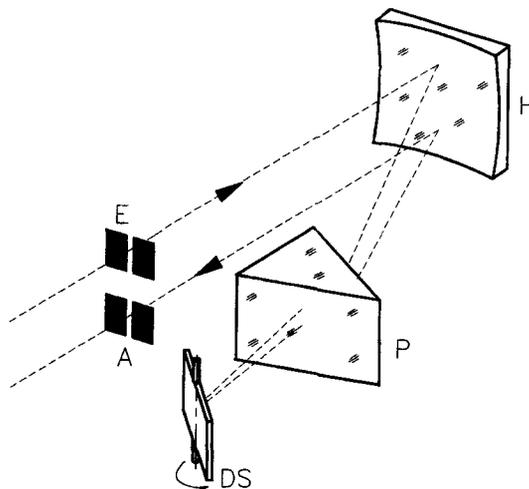


**Рис. 5.49.** Схема спектрофотометра остановленной струи для мониторинга быстрых химических реакций. Детали см. текст. (согласно Jones et al., Biochem. J., 1975, v.135, p.361)

ки реакции. Для этих целей разработано большое количество установок, работающих в миллисекундном диапазоне. Их можно разделить, три типа «скоростных» спектрофотометров:

- матричные, так называемые «одновременные» спектрофотометры, такие как оптический многоканальный анализатор (ОМА), описанный ранее. Они способны одновременно проводить анализ во всем спектральном диапазоне. В их конструкциях нет подвижных деталей, они компактны, что позволяет использовать их как портативную, мобильную аппаратуру (см. рис. 5.7);
- интерферометр Майкельсона (см. главу 5.4, рис. 5.8), который осуществляет одновременный мониторинг спектра, но для него требуются оптомеханические компоненты сканирования высокой точности;
- быстросканирующие спектрометры, в которых осуществляется последовательное и механическое сканирование диспергированного обычным образом спектра. В его конструкции предусмотрено быстрое вращение либо дисперсионной решетки или призмы, либо вторичных отклоняющих луч света элементов (например, полигона или сканирующего зеркала), либо щели. В отличие от одновременных спектрофотометров, данный тип устройства для мониторинга спектра отличается наиболее высокой чувствительностью, так как в нем могут быть использованы высококачественные детекторы с большой площадью чувствительного слоя и решетки или призмы с высокой светосилой (см. главу 5.2.1). В соответствии с назначением можно выбрать оптимальный состав аппаратуры.

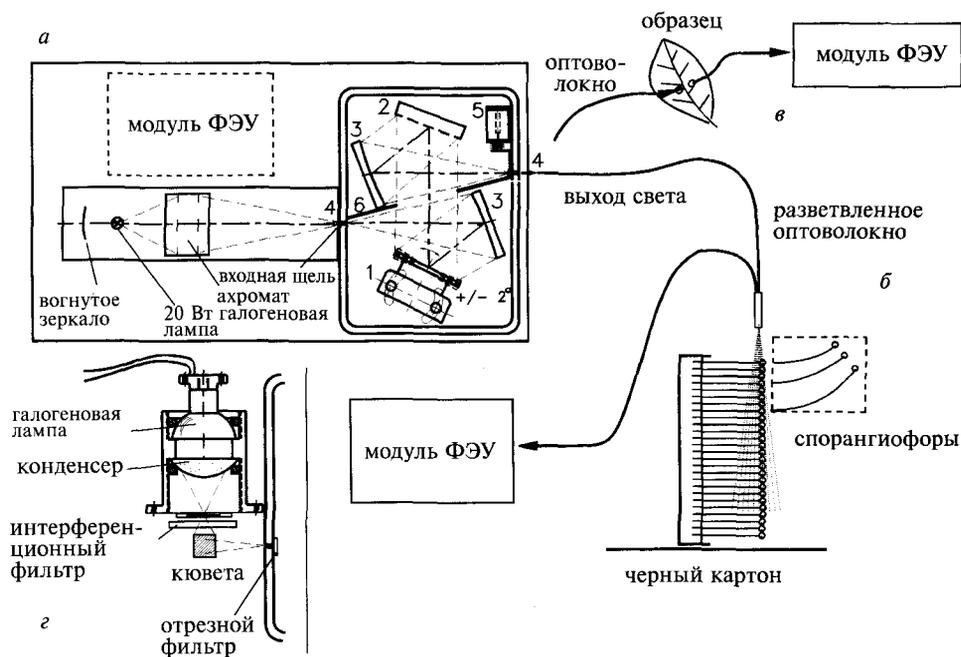
На рис. 5.50 представлена схема быстросканирующего спектрофотометра на основе призмного монохроматора и компоновки Литтрова. Вращающееся зеркало (DS) сканирует спектр, полученный на призме (P). Недостатком данного спектрофотометра является то, что полный



**Рис. 5.50.** Схема быстрого сканирующего спектрофотометра на основе призмного монохроматора и компоновки Литтрова. Вращающееся или гальванометрическое зеркало (DS) сканирует спектр, полученный на призме (P) (двойное пропускание дает удвоенную дисперсию). Вогнутое зеркало (H) обеспечивает корректное изображение входной щели (E) на выходной щели (A)

оборот зеркала дает только незначительный угловой диапазон ( $5^\circ$ ) спектрального сбора. Мертвое время спектрометра, т.е. временной перерыв между спектрами, составляет 95%. Такие же показатели производительности имеют и сканирующие спектрофотометры на основе вращающихся решеток.

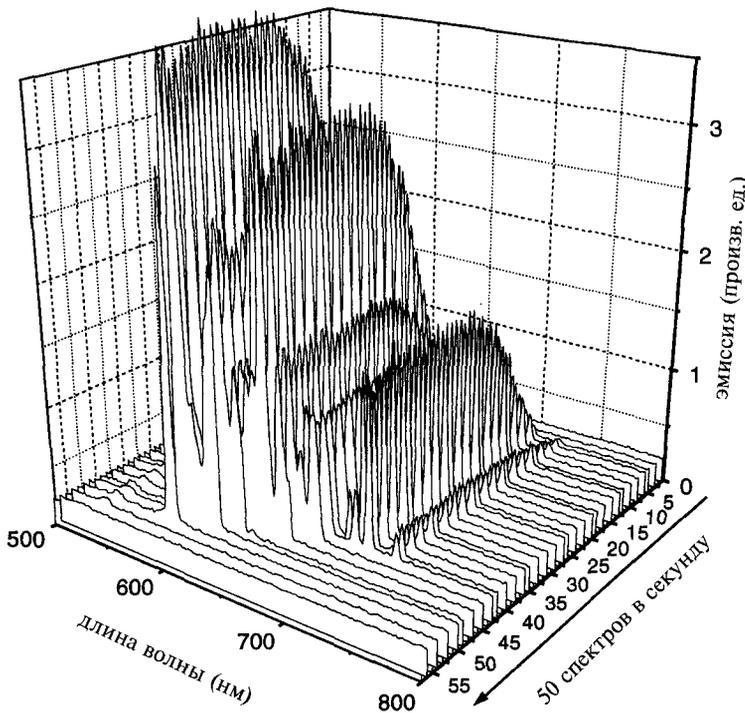
Указанный недостаток преодолевается в решеточных монохроматорах с колеблющимся зеркалом (в так называемых лазерных сканерах), как показано на рис. 5.51, особенно если мониторинг спектра осуществляется в обоих направлениях движения сканирующего зеркала. Установка на рис. 5.51 является модификацией установки Черни — Тернера (рис. 5.6), где сканирующее зеркало (1) расположено в коллимированном (параллельном) пучке света, и быстрое колебание входного угла  $\epsilon$  (см. уравнение 3.33) на решетке (2) вызывает последовательную дисперсию на выходной щели (4). Амплитуда колебаний определяет спектральный диапазон, а положение решетки — середину спектра. Снятие полного спектра образца происходит за субмиллисекундный диапазон. Монохроматор (а) может функционировать в различных режимах. Поглощение типичной стеклянной кюветы с размерами  $1 \times 1$  см измеряется простым оптоволоконным устройством (на схеме оно не указано). Измерение отраженного света производится с помощью раздвоенной оптоволоконной системы (б). Оптоволоконный зажим (в) непосредственно измеряет спектр поглощения твердых образцов, таких как листья или мочка уха. Для измерения спектров флуоресценции (эмиссии) образец помещается перед входной щелью, а длина волны возбуждения определяется соответствующим интерференционным фильтром. Блокировка возбуждаю-



**Рис. 5.51.** Схема модифицированного быстросканирующего спектрофотометра Черни — Тернера с колеблющимся зеркалом. Свет фокусируется на входной щели (4). Далее свет коллимируется вогнутым зеркалом (3) и сканирующим зеркалом (1), после чего отклоняется на плоскую решетку (2). Наконец, диспергированный свет фокусируется вторым вогнутым зеркалом на выходной щели (4). Положение решетки при нерабочем положении сканирующего зеркала определяет середину спектра, а амплитуда сканирующего зеркала — спектральный диапазон. Монохроматор (а) может функционировать в различных спектральных режимах. Поглощение типичной стеклянной кюветы с размерами  $1 \times 1$  см измеряется простым оптоволоконным устройством (на схеме оно не указано). Измерение отраженного света производится с помощью раздвоенной оптоволоконной системы (б). Специальный модуль (в), вмонтированный в оптоволоконно, непосредственно измеряет спектр поглощения твердых образцов, таких как листья, цветы или мочка уха. Для измерения спектров флуоресценции (эмиссии) образец помещается перед входной щелью, а длина волны возбуждения определяется соответствующим интерференционным фильтром. Блокировка монохроматора от попадания в него возбуждающего света производится соответствующим фильтром (г).

щего света от попадания в монохроматор производится соответствующим фильтром (г).

На рис. 5.52 представлен временной ход эмиссионных спектров неоновой газоразрядной лампы, работающей от сетевого напряжения с частотой 50 Гц. Частота сканирования свободно колеблющегося сканирующего зеркала (1, рис. 5.51) составляет приблизительно 50,5 Гц, что является причи-



**Рис. 5.52.** Последовательность из 50 эмиссионных спектров неоновой газоразрядной лампы, работающей от сетевого напряжения с частотой 50 Гц. Частота сканирования  $\sim 50,5$  Гц вызывает интерференционную картину, которая позволяет спектрально разрешать единичные импульсы длительностью  $\sim 10$  мс

ной «биения» частоты порядка 0,5 Гц, вызывающего появление импульсов длительностью 10 мс.

Другой метод быстрого сканирования спектров с большим успехом применен производителями OLIS в США. Два обычных монохроматора Черни — Тернера сгруппированы наподобие двойного монохроматора таким образом, что обе диспергирующие решетки являются зеркальным отражением друг друга. Выходная щель первого монохроматора одновременно является входной щелью второго монохроматора, причем она выполнена в виде вращающегося диска с 16 щелями (частота вращения составляет 62,5 Гц). Таким образом, в соответствии с линейной дисперсией появляется спектр в виде окрашенной полосы, располагающейся в промежуточной плоскости изображения. Он спектрально сканируется в течение 1 мс и изображается на фиксированной выходной щели второго монохроматора независимо от длины волны.

В отличие от медленносканирующих двулучевых монохроматоров, быстросканирующие однолучевые монохроматоры позволяют получать отдельные спектры с повторяемостью от 50 до 1 000 спектров в секунду. В их конструкции используются синхронные усилители, которые эффективно подавляют шумовые сигналы, что обеспечивает высокое значение отношения сигнал/шум. Кроме того, вследствие высокой частоты сигнала взаимо-

связь с конденсером существенно снижает  $1/f$  шум и большой температурный дрейф PbS детекторов, используемых в спектроскопии ближней ИК области (см. главу 10).

### 5.7. Дополнительная литература

Blass, W.E., Halsey, G.W. *Deconvolution of Absorption Spectra*, Academic Press, London, 1981.

Bonsquet, P. *Spectroscopy and its Instrumentation*, Adam Hilger, Bristol, 1971.

Britton, G., ed., *Carotenoids: Spectroscopy*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1995.

Egan, W.E. *Phase-Lock Basics*, John Wiley & Sons, New York, 1998.

Görög, S. *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis*, CRC Press Boca Raton Fl 33487, 1995.

Gottwald, W., Heinrich, K. H. *Spektroskopie für Anwender*, Wiley-VCH, 1998.

I Howell, J. A. Ultraviolet and Absorption Light Spectrometry, *Anal. Chem.* 1998, 70, 107R-118R (review article).

Jansson, P.A., ed., *Deconvolution of Images and Spectra*, 2nd edn., Academic Press, London, 1996.

Karlberg, B., Pacey, G.E. *Flow Injection Analysis, A Practical Guide*, Elsevier, Amsterdam, 1989 (general introduction to flow techniques).

Kortüm, G. *Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie*, Springer-Verlag, Berlin, 1962 (an excellent textbook on the theory of optical spectral analysis, in German).

Lang, L., ed. *Absorption Spectra in the Ultraviolet and Visible Region*, Akademiai Kiadó, Budapest, 1966.

Malmstadt, H.V., Enke, C.G., Crouch, S.R., Horlick, G. *Optimization of Electronic Measurements*, The Benjamin Publishing Company, Menlo Park, CA, 1974.

Norris, K.H., Butler, W.L. Technique for Obtaining Absorption Spectra in Intact Biological Samples, *Inst. Radio Eng. Trans. Bio-Med. Electron.* 1961, 8, 153-157 (one of the mostly cited publications on the in vivo optical spectroscopy of biological specimens).

Orchin, M., Jaffé, H.H. *Symmetry, Orbitals, and Spectra (S.O.S.)*, John Wiley & Sons, New York, 1971.

Pavia, D. L. *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*, Saunders College Publishing, 1997.

Peiponen, K.-E., Vartiainen, E.M., Asakura, T. *Dispersion, Complex Analysis and Optical Spectroscopy: Classical Theory*, Springer Tracts in Modern Physics, 147, Springer-Verlag, Berlin, 1998.

Perkampus, H.-H. *UV-VIS-Spektroskopie and its Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 1992.

Pretsch, C., Seible, S. *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds (NMR, IR, MS, UV/VIS)*, 2nd edn., Springer-Verlag, Berlin, 1989.

Smith, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Lewis Publishers, 1995.

Smith, K. C., ed., *Photochemical and Photobiological Reviews*, Vol. 1-7, Plenum Press, New York, 1983 (offers a range of optospectroscopic methods).



Steward, E.G. *Fourier Optics, An Introduction*, Ellis Horwood, Chichester, **1987**.

Struve, W. S. *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York, **1989**.

Sommer, L. *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet, The Principles*, Elsevier, Amsterdam, 1989.

Svanberg, S. *Atomic and Molecular Spectroscopy*, Springer-Verlag, Berlin, **1991**.

Sweedler, J.V, Ratzlaff, K. L. *Charge-Transfer Devices in Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York, **1994**.

van Holde, K. E. *Physical Biochemistry, foundation of modern biochemistry series*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Wilson, R. G. *Fourier Series and Optical Transform Techniques on Contemporary Optics: An Introduction*, John Wiley & Sons, New York, **1995**.

## ГЛАВА 6

# ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

*Nihil tam difficile est, quin quaerando investigari posset*

*Нет ничего такого, чего невозможно исследовать*

*Теренс*

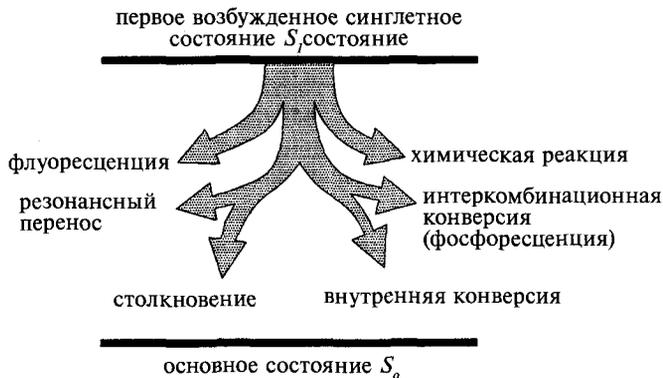
### 6.1. Введение

Термин «люминесценция» описывает эмиссию света, причиной которой являются возбужденные атомы и молекулы. Электроны в атомах и молекулах возбуждаются, если поступает энергия извне. Форма этой энергии может быть самой различной. Если излучение света происходит в результате биохимических процессов, то она называется биолюминесценцией. Если химическая реакция сопровождается излучением света, то это хемилюминесценция. Кроме того, существуют определенные пигменты, излучающие свет под воздействием ионизирующей радиации, наиболее часто индуцируемой тритием ( $^3\text{H}$ ), это — радиолюминесценция. Целый ряд дополнительных явлений типа механо-, термо- или электролюминесценции здесь будут просто упомянуты (см. рис. 1.1). Существует много молекул и молекулярных систем, которые излучают свет в результате поглощения света; это называется фотолюминесценцией. В данной главе внимание будет сосредоточено на отдельных разновидностях фотолюминесценции — флуоресценции и фосфоресценции. Сам термин флуоресценция произошел от названия минерала плавиковый шпат (fluorspar), свечение которого впервые наблюдалось в 1565 г. Измерение фосфоресценции было впервые произведено в 1858 г. Э. Беккерелем (1820—1891). После первого наблюдения фосфоресценции П. Генрихом (1758—1825) он продемонстрировал, что после облучения светом все щелочные и щелочноземельные металлы фосфоресцируют. Следует отметить, что существует много других форм эмиссии света, таких как излучение ламп накаливания (излучение черного тела) или синхротронное излучение Черенкова, не являющихся результатом возбуждения электронов.



**Генри Беккерель**  
(1852—1908)

Измерять люминесценцию можно различными способами. На их основе можно распознавать молекулы и различные вещества, а в некоторых случаях получать и количественные характеристики. Люми-



**Рис. 6.1.** Возможные релаксационные каналы первого возбужденного синглетного состояния

несценцию можно использовать для зондирования окружения излучающего люминофора. Люминесцентный зонд чрезвычайно чувствителен даже к незначительным изменениям такой сложной системы, как живая клетка. Задачей спектроскописта является анализ подобных сигналов. Для практических аспектов флуоресценции и фосфоресценции можно рекомендовать прекрасную, но слегка устаревшую книгу Ренделла 1987 г. с компьютеризированным дополнением 1991 г. Для более углубленного теоретического введения в основы флуоресценции весьма рекомендуются учебники Паркера (1968 г.), Лаковича (1983 г.), Демаса (1983 г.) и под редакцией Джильболта (1990 г.). В книгах Гёке (1988 г.) и Пиллера (1977 г.) детально обсуждены возможности флуоресцентной микроскопии, позволяющей отображать пространственное распределение флуоресцирующих компонентов в клетках растений и животных.

Основная разница между абсорбционной и люминесцентной спектроскопией заключается в способе измерения. Поглощение образца определяется по формуле (см. уравнение 5.5):

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon(\lambda) \times c \times l$$

где  $I_0$  — интенсивность света, падающего на образец,  $I$  — интенсивность света, прошедшего сквозь образец,  $c$  — концентрация поглощающих частиц,  $\epsilon(\lambda)$  — молярный коэффициент экстинкции. В действительности измеряется часть излучения  $I$  падающего света  $I_0$ , которое не поглощено образцом. Таким образом, определение поглощения  $A$  является непрямым аналитическим методом. С одной стороны, это позволяет исключить внутреннюю дисперсию абсорбционного спектрометра, так как измерения основаны на сравнении с референтным образцом, и получить абсолютное значение поглощения ( $A$  или  $ОП$  по устаревшей номенклатуре оптической плотности). Однако при измерении поглощения применяется логарифмирование, поэтому чувствительность определения абсорбционными методами на 2–3 порядка ниже, чем при люминесцентных измерениях. Кроме того, в аб-

сорбционной спектроскопии существует проблема определения небольшой разницы между двумя значительными сигналами: у сильно поглощающего образца интенсивность прошедшего света очень мала и должна вычитаться из очень большого референтного сигнала (см. главу 5.2.6).

В отличие от поглощения люминесцентные измерения являются хоть и относительными, но прямыми измерениями: детектируется только интенсивность излучения образца, немедленно дающая спектральные характеристики. Однако в данном методе не используется опорный образец, а значит необходимо вводить корректировку на дисперсионные потери в аппаратуре, что сделать очень сложно. Вследствие этого флуоресцентным данным присущи большие ошибки как в отношении длины волны ( $\pm 5$  нм), так и интенсивности люминесценции ( $\pm 10\%$ ). Несмотря на это, по сравнению с абсорбционной спектроскопией флуориметрия более информативна в отношении фотофизики молекул. В то время как в абсорбционной спектроскопии единственным измеряемым параметром является поглощение  $A(\lambda)$ , флуоресцентная спектроскопия позволяет получить ряд независимых параметров, таких как квантовый выход (также называемый иногда квантовой эффективностью)  $\Phi$ , расстояние безызлучательного переноса энергии  $R_0$ , время жизни  $\tau$ , поляризация  $p$  или анизотропия  $r$ , Стоксов сдвиг  $\Delta\lambda$  и много других, каждый из которых дает определенную информацию о системе.

## 6.2. Механизмы флуоресценции

### 6.2.1. Происхождение флуоресценции и фосфоресценции

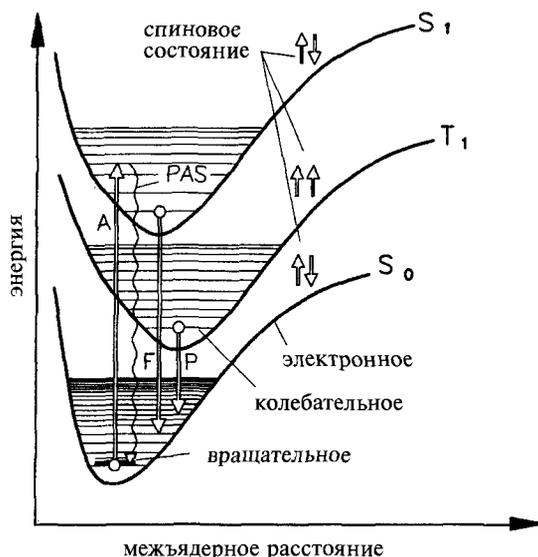
Происхождение флуоресценции и фосфоресценции уже освещалось в главе 2. Эти явления отличаются между собой только электронной природой возбужденного состояния, с которого происходит эмиссия света: с первого возбужденного синглетного состояния ( $S_1$ ) и триплетного состояния ( $T_1$ ), соответственно (см. рис. 6.2). Обычно флуоресценция определяется как излучательный переход между двумя состояниями идентичной мультиплетности, а фосфоресценция — как излучательный переход между двумя состояниями различной мультиплетности. Таким образом, можно наблюдать триплет-триплетную флуоресценцию, дублет-дублетную флуоресценцию и другие экзотические эмиссии. Если молекула возбуждается до более высокого электронного и колебательного уровня, она обычно претерпевает безызлучательную релаксацию в состояние  $S_1$  за приблизительно  $10^{-14}$  с. В основное электронное состояние  $S_0$  она может возвратиться затем по разным каналам, из которых флуоресцентный канал в данном контексте представляет для нас наибольший интерес (см. рис. 6.1), и выражается разностью энергий ( $S_1 - S_0$ ), излучаемой в виде кванта или фотона света.

Азулен — это наиболее известное исключение, в нем эмиссия флуоресценции происходит не с  $S_1$ , а с  $S_2$  уровня.

Если молекула не флуоресцирует при переходе в основное электронное состояние, то энергия возбуждения должна рассеиваться другим образом. Вероятны: (1) безызлучательный перенос энергии на другие молекулы

(тушение флуоресценции); (2) фотохимические реакции и, наиболее важно, — (3) внутренний перенос энергии. Последняя возможность означает внутреннее перераспределение энергии в самой молекуле. Его нужно отличать от внутренней конверсии (ВК), при которой молекула сохраняет свой спин, но скатывается до самого низкого колебательного уровня того же электронного возбужденного состояния, рассеивая колебательную энергию в виде тепла. Также следует отличать интеркомбинационную конверсию (ИКК) — переход из первого возбужденного синглетного состояния в первое возбужденное триплетное состояние, сопровождающееся изменением ориентации спина ( $S_1 \rightarrow T_1$ ). Далее из этого состояния молекула релаксирует в основное состояние  $S_0$  либо с испусканием света, т.е. фосфоресценции ( $T_1 \rightarrow S_0$ ), либо безызлучательно в результате столкновения, вызванного, возможно, химической реакцией (см. рис. 6.2).

Эти процессы в упрощенном виде можно описать следующим образом. В жесткой молекуле энергия, принесенная фотоном, перераспределяется мгновенно по всей системе, а затем в большей степени излучается снова в виде света. Однако в гибкой молекуле энергия в основном рассеивается через безызлучательные переходы, что можно проиллюстрировать следующей грубой макроскопической аналогией. Если стальной шар падает на стальной лист, его кинетическая энергия мгновенно распределяется по



**Рис. 6.2.** Типичная диаграмма потенциальной энергии гипотетической двухатомной молекулы. Возбужденные состояния, определяемые их электронными конфигурациями (синглет  $S_1$ ; триплет  $T_1$ ), существуют на большем расстоянии от ядер, чем основное состояние (синглет  $S_0$ ). Общая энергия является суммой электронной, колебательной и вращательной составляющих, что приводит к типичным широкополосным спектрам молекул. Указаны переходы, соответствующие поглощению (A), флуоресценции (F), фосфоресценции (P) и фотоакустике (PAS)

всему листу и излучается в виде звуковой энергии. Однако если стальной шар упадет на свинцовый лист, то звука не будет, так как он поглотится без распределения энергии вдоль пластины.

Следовательно, флуоресценция противоположна поглощению. Это установил еще г. Кирхгофф в 1859 г. В соответствии с законом Кирхгоффа, каждый атом, который поглощает на определенной длине волны, излучает на той же самой длине волны (см. рис. 1.4). Этот закон позже теоретически доказал А. Эйнштейн. В принципе, атомная абсорбционная и эмиссионная спектроскопия несут одну и ту же информацию. Однако в молекулярной спектроскопии практические различия огромны. Для лучшего их понимания и использования преимуществ флуоресцентной спектроскопии следует более детально обсудить теоретические основы.

### 6.2.2. Диаграммы энергии

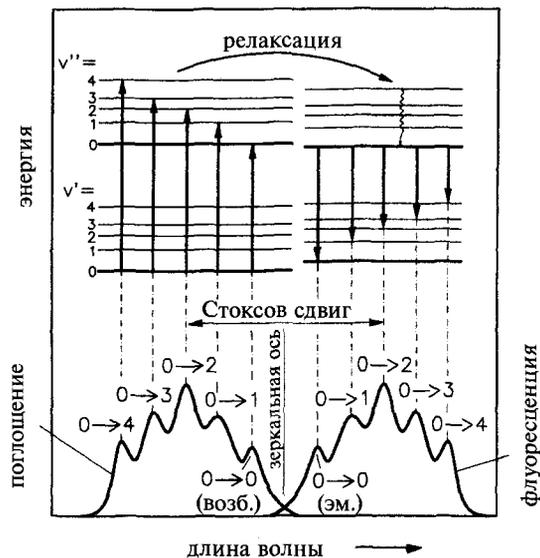
Для иллюстрации фотохимических и фотофизических свойств отдельных молекул и более сложных систем, касающихся эмиссии света, можно использовать диаграммы потенциальной энергии (см. рис. 2.26). Так, на рис. 6.2 представлены потенциальная энергия основного состояния, первых синглетного и триплетного состояний в зависимости от межъядерного расстояния в гипотетической двухатомной молекуле. Внутри потенциальной ямы возможные энергетические состояния существуют в форме дискретных колебательных уровней. Каждый индивидуальный колебательный уровень подразделен на ряд еще меньших энергетических подуровней — вращательных уровней. Электронные переходы осуществляются настолько быстро, что межъядерное расстояние не успеваает измениться, и на диаграмме потенциальных энергий переходы происходят «вертикально». Это — так называемый принцип Франка — Кондона. Электронные переходы соответствуют поглощению (A), флуоресценции (F) и фосфоресценции (P). Форма, размер и положение спектров молекулярной люминесценции могут значительно изменяться вследствие того, если электронные переходы будут происходить с более высоких уровней колебательных состояний.

С точки зрения более общих рассуждений, фотоакустическую спектроскопию (PAS (ФАС)) можно рассматривать как тип эмиссионной спектроскопии, в которой энергия при электронном переходе излучается не в виде света, а в виде тепла (на рис. 6.2 это изображено волнистой линией). Вследствие все возрастающей важности, особенно в биологических науках, этот тип спектроскопии будет описан в отдельной главе 7.

### 6.2.3. От диаграммы энергии к спектрам

Используя диаграмму потенциальной энергии на рис. 6.2, можно сконструировать соответствующую диаграмму Яблонского, с помощью которой можно понять принцип получения спектров поглощения и флуоресценции (также и фосфоресценции) (см. рис. 6.3). Распределение энергии колебательных уровней на всех электронных уровнях ( $S_0$ ,  $S_1$  и  $T_1$ ) очень схоже. В гипотетическом примере, приведенном на рис. 6.3, по принципу Фран-

ка — Кондона самым сильным является переход  $0 \rightarrow 2$ , т.е. ему соответствует максимальное поглощение. Вслед за возбуждением молекулы через внутреннюю конверсию и тепловое рассеяние претерпевают быструю безызлучательную релаксацию в основное колебательное состояние  $S_1$  уровня, с которого затем осуществляется переход в основное электронное состояние  $S_0$ . Однако флуоресценция наблюдается только тогда, когда первое электронное состояние  $S_1$  не изменяется в течение временного интервала, соответствующего собственному времени жизни излучения  $\tau$  (см. ниже). Это может быть результатом определенных внешних воздействий или внутримолекулярных процессов (см. рис. 6.1). На рис. 6.3 продемонстрировано, почему спектр поглощения (здесь  $S_0 \rightarrow S_1$ ) и спектр эмиссии ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) часто являются зеркальным отражением друг друга: при электронных переходах соответствующие колебательные уровни заполняются в «обратном» порядке. По сравнению со спектром поглощения спектры флуоресценции и фосфоресценции всегда батохромно смещены (т.е. в длинноволновую сторону). Это явление известно как сдвиг Стокса. Стоксов сдвиг определяется как разница длин волн максимумов поглощения и эмиссии (см. рис. 6.3), и у разных молекул он может быть разным. Это явление было открыто Стоксом в 1858 г. и сформулировано в виде закона: максимум эмиссии всегда смещен в более длинноволновую сторону по сравнению с максимумом поглощения.



**Рис. 6.3.** Энергетическая диаграмма Яблонского и выведенные на ее основе спектры поглощения и флуоресценции молекулы. Колебательные уровни различных электронных состояний сравнимы и объясняют зеркально-симметричный характер обоих спектров. Электронные состояния  $S_0$  и  $S_1$ , в зависимости от направления перехода ( $S_0 \times S_1$ ), отличаются по величине. Таким образом, зеркальное отображение является приблизительным. Стоксов сдвиг определяется как разница длин волн максимумов поглощения и флуоресценции (в данном примере  $\nu = 0 \rightarrow \nu = 2$ )

## 6.2.4. Влияние растворителя

Длина волны и интенсивность эмиссии флуоресценции существенно зависят от таких внешних факторов, как температура, химические связи, вязкость и полярность растворителя. С увеличением полярности растворителя эмиссия становится слабее, а спектры эмиссии сдвигаются в красную область, как, например, у флавина (см. рис. 6.6). Тому есть две причины (см. рис. 6.4). С одной стороны, электронное облако при возбуждении расширяется, что обычно увеличивает поляризуемость (изменение полярности во внешнем поле) и снижает энергию возбуждения. С другой стороны, процесс электронного возбуждения происходит за  $\sim 10^{-15}$  с, в то время как переориентация ядер и молекул растворителя происходит гораздо медленнее (примерно за  $\sim 10^{-10}$  с, в соответствии с принципом Франка — Кондона). В воде, которая обладает очень высоким дипольным моментом, это явление особенно заметно. Затем из этого реорганизованного состояния в пикосекундной — наносекундной временной шкале происходит эмиссия флуоресценции. Это объясняет, почему так называемые  $0 \rightarrow 0$  переходы поглощения и эмиссии энергетически не идентичны (ср. различные электронные уровни на рис. 6.3 и 6.5). Для флавина в воде эта разница энергий равна длинноволновому сдвигу приблизительно на 25 нм (см. рис. 6.6), а для антрацена в пропаноле — всего  $\sim 5$  нм (см. рис. 6.5). Увеличение полярности растворителя и поляризуемости флуорофора сопровождается в основном красным смещением спектра, как продемонстрировано на ближней УФ полосе спектров поглощения и эмиссии флавина в различных растворителях (рис. 6.6). Таким образом, зеркальный характер эмиссионных и абсорбционных ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) спектров только приближителен, но не идеален.

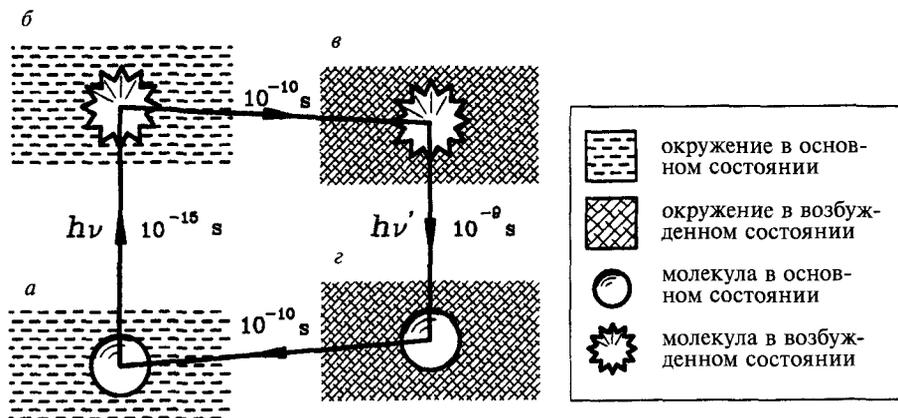
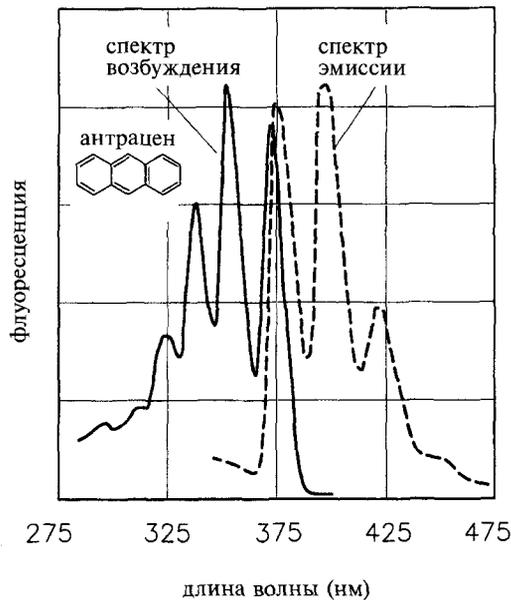
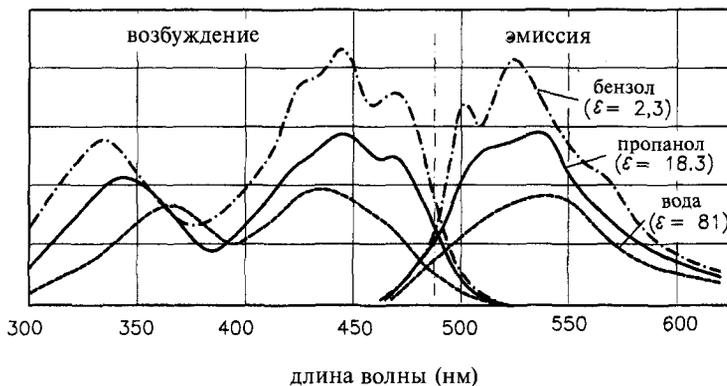


Рис. 6.4. Схематическая диаграмма взаимодействия флуорофора с растворителем (окружением) в основном и первом возбужденном состоянии с указанием типичных времен реакции. В течение «быстрого» перехода электрический дипольный момент изменяется, вызывая, в свою очередь, «медленную» переориентацию молекул растворителя. Соответственно, меняются энергетические уровни и, следовательно, спектры

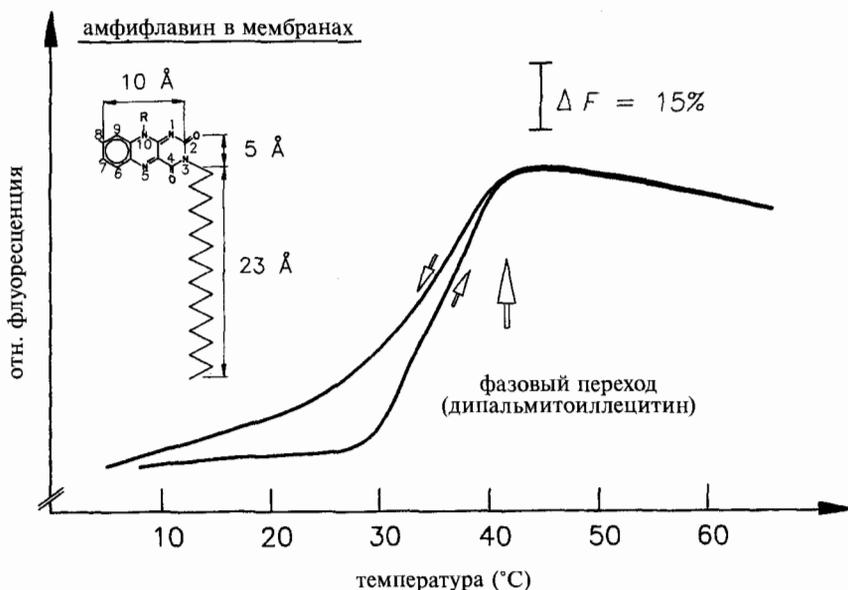


**Рис. 6.5.** Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции антрацена проявляют зеркально-симметричный характер. Стоксов сдвиг составляет примерно 5 нм, оба  $0 \rightarrow 0$  перехода существенно отличаются



**Рис. 6.6.** Спектры поглощения и скорректированной эмиссии флавина (длина волны возбуждения 380 нм, спектральное разрешение 5 нм) в растворах различной полярности (выражена через диэлектрическую постоянную  $\epsilon$ ). Отметим, что квантовый выход флуоресценции, колебательная структура полос и длина волны максимумов зависят от полярности растворителя

Однако спектральные сдвиги не всегда объясняются изменением полярности растворителя. Затруднение переориентации молекул растворителя вокруг возбужденной молекулы будет приводить к уменьшению сдвига. Следовательно, спектр флуоресценции, так же как спектр поглощения, при более низких температурах ( $-196^\circ\text{C}$ ) будет гипсохромно сдвинут (в голубую



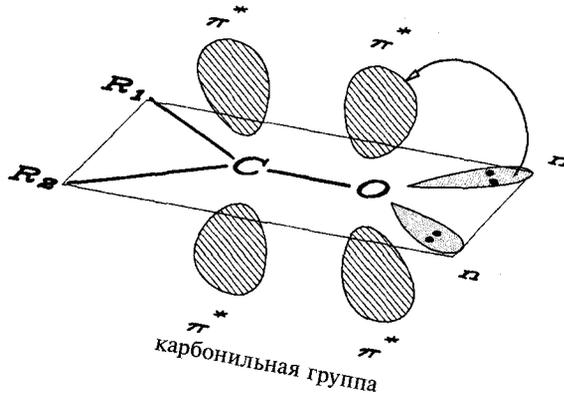
**Рис. 6.7.** Температурная зависимость флуоресценции амфифлавина, связанного через положение 3 длинной алифатической углеводородной цепочки с однослойными везикулами дипальмитоиллецитиновой мембраны (см. рис. 6.22). (Длина волны возбуждения составляет 370 нм, длина волны эмиссии равна 540 нм). Следует обратить внимание на значительный гистерезис флуоресценции, хорошо воспроизводимый при циклическом изменении температуры

область) по сравнению с таковыми при комнатной температуре. Кроме того, (частичное) затормаживание молекулярного вращения приводит к проявлению колебательных полос (см. кривые 4 и 5  $\beta$ -каротина на рис. 5.34).

В биологических исследованиях часто используется влияние микроокружения на флуорофоры. Например, можно более детально определить локализацию и тип мембранного связывания флуорофора. На рис. 6.7 представлена температурная зависимость флуоресценции флавина (витамина В<sub>2</sub>), связанного посредством длинной алифатической С<sub>18</sub>-цепочки (амфифлавин: «голова» гидрофильная, а «хвост» гидрофобный) с модельной мембраной дипальмитоиллецитина. При нагреве до  $\sim 41^\circ\text{C}$  мембрана претерпевает обратимый фазовый переход от кристаллического к жидкокристаллическому состоянию, сопровождающемуся интенсивным возрастанием флуоресценции, в отличие от ожидаемого снижения флуоресценции в растворе (тушение при столкновении, см. ниже). Это означает, что хромофор флавина смещается от полярной поверхности мембраны в более гидрофобную внутреннюю область мембраны (см. рис. 6.20).

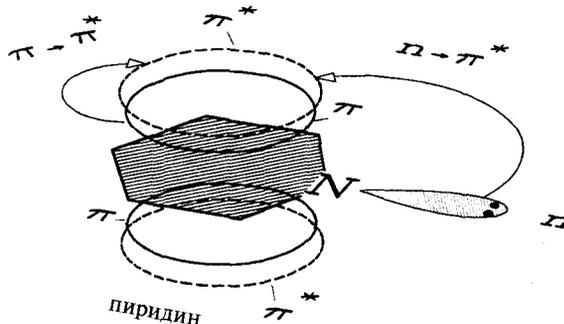
### 6.2.5. Основы квантовой механики

В главе 2 были рассмотрены два типа электронных переходов в молекулах, которые особенно важны в люминесцентной спектроскопии; а именно  $n \rightarrow \pi^*$  и  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходы (см. рис. 2.20). Для небольших молекул  $n \rightarrow \pi^*$  по-



**Рис. 6.8.** Трехмерная схема энергетически низкого  $n \rightarrow \pi^*$  перехода неподеленных электронов карбонильной группы.  $R_1$  и  $R_2$  — органические остатки

лосы обладают меньшей энергией, чем  $\pi \rightarrow \pi^*$  полосы, что не всегда соблюдается для более сложных систем типа ароматических кетонов. Например, самое низкое возбужденное состояние ацетона соответствует  $n \rightarrow \pi^*$  переходу (270 нм) с очень малой интенсивностью ( $\epsilon = 20 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) неподеленной пары электронов на атоме кислорода. А  $\pi \rightarrow \pi^*$  переход (180 нм) с более сильным поглощением ( $\epsilon = 1000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) соответствует  $\pi$ -электрону  $\text{C}=\text{O}$  связи. Квантово-механическая причина такого поведения основана на различии пространственных перекрываний взаимодействующих орбиталей: орбитали первого типа ( $n \rightarrow \pi^*$ ) перехода перекрывают друг друга в меньшей степени, чем орбитали перехода второго ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) типа. Схема этого различия для карбонильной группы ацетона представлена на рис. 6.8, а для атома азота в пиридине — на рис. 6.9. По этой же причине время жизни  $n \rightarrow \pi^*$  перехода будет больше, чем время жизни  $\pi \rightarrow \pi^*$  перехода. Следовательно, вероятность интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние с последующей релаксацией в основное синглетное состояние значительно возрастает. По этой же причине при  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходе возможна флуоресценция, тогда как кетоны или азотсодержащие гетероциклы вследствие более низко расположенных  $n \rightarrow \pi^*$  переходов не флуоресцируют, а как правило,



**Рис. 6.9.** Аналогично карбонильной группе энергетически низко лежащий  $n \rightarrow \pi^*$  переход в пиридине ингибирует его флуоресценцию

фосфоресцируют. Фосфоресценция и флуоресценция в анализе проявляют комплементарное поведение: с увеличением вероятности интеркомбинационной конверсии флуоресценция уменьшается, а фосфоресценция увеличивается.

Из более чем 2 000 пигментов, представленных в американском справочнике по красителям US Color Index, только 200 являются флуоресцирующими. Способность к флуоресценции никак не связана с цветом пигмента. Однако пигменты с сильной флуоресценцией представлены лишь несколькими классами, включая ксантеновую (флуоресцеин, родамин) и акридиновую (зукризин) группы, цианиновые красители, тетрапирролы и конденсированные ароматические соединения. Следует отметить, что ни один из азокрасителей не обладает флуоресценцией.

На рис. 6.10 представлены некоторые примеры структурных свойств, предопределяющих флуоресценцию, даже если не всегда ясно, соответствует ли нижнее возбужденное состояние  $S_1$  благоприятному  $\pi \rightarrow \pi^*$  или  $n \rightarrow \pi^*$  переходу.

- Флавин в окисленной форме является жесткой, плоской и ароматической молекулой с сопряженной  $\pi$ -электронной системой, а в восстановленной форме это не ароматическая молекула, согнутая по оси между атомами азота в положениях 5 и 10 молекулы (в форме бабочки). Низко лежащая неподеленная пара электронов у атомов азота ответственна за низкоэнергетический  $n \rightarrow \pi^*$  переход. В этом случае молекула не флуоресцирует.

- Как показано на рис. 6.10, пиридин не проявляет флуоресцентных свойств, в то время как *хинолин* флуоресцирует. Возможной причиной этого является большая сопряженность его  $\pi$ -электронной системы.

- В пирроле атом азота соединен тремя одинарными связями с кольцом и атомом водорода, образуя гибридные  $sp^2$ -орбитали, в то время как две неподеленные пары электронов занимают оставшуюся  $p$ -орбиталь и образуют таким образом сопряженную с электронами кольца систему. Состояние  $S_1$  молекулы соответствует  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходу, и молекула флуоресцирует.

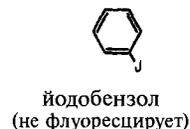
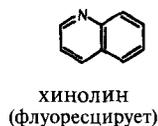
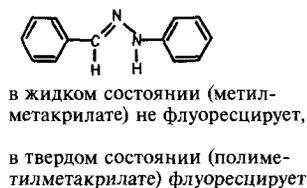
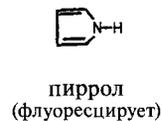
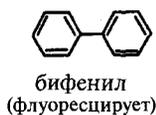
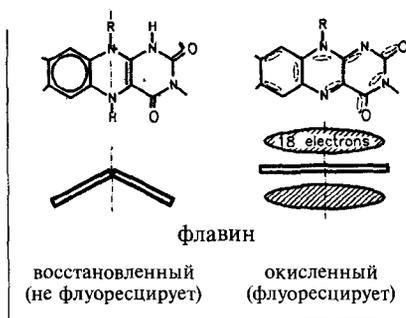
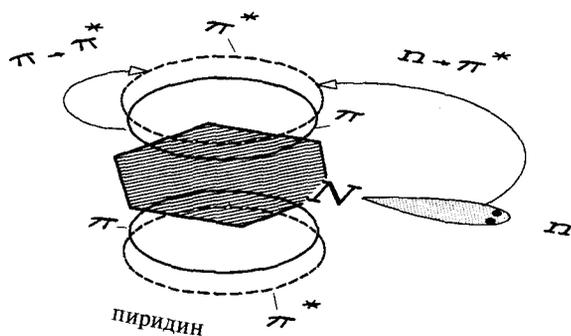
- Йодобензол не является флуоресцирующим веществом, так как тяжелый атом йода способствует интеркомбинационной конверсии посредством спин-орбитальной связи, слишком быстро способствующей депопуляции (незаселенности) потенциально флуоресцирующего первого возбужденного синглетного состояния.

- Очевидно, бензофенон не является флуоресцирующим веществом из-за низкого положения  $n \rightarrow \pi^*$  перехода.

- Флуоресцеин, родамин Б и хинин являются классическими флуорофорами. Очевидно, неподеленные пары электронов кислородного мостика в родамине образуют сопряженную  $\pi$ -электронную систему, т.е.  $S_1$  состояние с  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходом.

- Стильбен в изомерных цис- и транс-формах является высоко сопряженным и поэтому флуоресцирует.

- Обычно наблюдается четкая зависимость квантового выхода флуоресценции от стерической жесткости молекулы, независимо от ее структуры (см. рис. 6.10, внизу слева). В жидком окружении эта молекула не флуоресцирует, но приобретает интенсивную флуоресценцию в жестком окружении.



**Рис. 6.10.** Благодаря некоторому опыту на основании структуры молекулы можно сделать вывод, будет она флуоресцировать или нет (детали см. текст)

### 6.2.6. Квантовый выход флуоресценции

В то время как величина поглощения определяется логарифмом отношения интенсивности  $\log(I_0/I)$ , аналогичная величина флуоресценции определяется *эффективностью флуоресценции*  $\Phi_F$  или *квантовым выходом*:

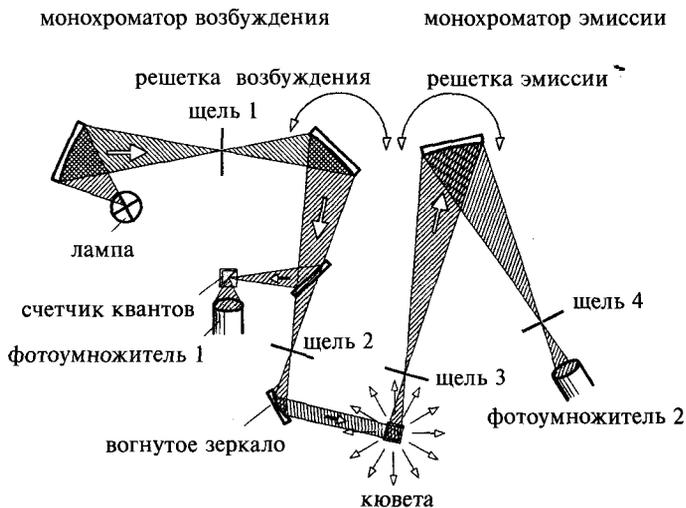
$$\Phi_F = \frac{\text{число эмитированных фотонов}}{\text{число поглощенных фотонов}} = \frac{I_F}{I_A} \quad (6.1)$$

Согласно определению, величина  $\Phi_F$  больше нуля, но меньше единицы (или между 0 и 100%) и определяется, главным образом, индивидуальной структурой молекулы. Более детально измерение квантового выхода флуоресценции будет рассмотрено в главе 6.5.3.

### 6.3. Измерение флуоресценции

#### 6.3.1. Флуориметр

На рис. 6.11 изображена схема типичного флуориметра, используемого для измерений спектров флуоресценции. В нем предусмотрено разделение траекторий возбуждающего и эмиссионного луча света (конструкция согласно модели JY3 фирмы «Jobin-Yvon», ср. с путем света на рис. 3.22). Луч от широкополосного источника возбуждающего света проходит через решетку, разлагаясь на монохроматический возбуждающий свет. Малая часть этого света через полупрозрачное зеркало подается на счетчик квантов (см. ниже). Этот сигнал используется для электронной коррекции флуктуаций интенсивности источника возбуждения во время измерения (что особенно важно для УФ ламп). Спектр эмиссии флуоресценции соединения получается через возбуждение молекул в полосе ее поглощения и сканированием длины волны эмиссионного света с помощью детектирующей системы. Наоборот, установив детектирующую длину волны в эмиссионной полосе и разворачивая монохроматор возбуждения, можно получить спектр возбуждения эмиссии флуоресценции. Последнее бывает полезным для выяснения наличия примесных соединений в исследуемом образце (спектр



**Рис. 6.11.** Принцип действия флуориметра с указанием траекторий возбуждающего и эмиссионного луча света. Часть возбуждающего света используется для коррекции шума лампы. Во флуоресцентной спектроскопии достаточно применять перестраиваемые фиксированные щели различной ширины вместо дорогостоящих щелей с непрерывным изменением ширины

возбуждения и спектр поглощения индивидуального образца должны совпадать, а их несоответствие свидетельствует о наличии люминесцирующей примеси).

В отличие от возбуждающего света, эмиссионный свет является изотропным и рассеянным, и поэтому его более сложно собрать на фотодетекторе при прохождении через оптические компоненты. Предпочтительно, чтобы кювета с образцом размещалась как можно ближе к входной щели (щель 3 на рис. 6.11) детектирующего пути света.

Детектирующая система состоит из щелей различной ширины, от чего зависит качество получаемых данных. Более широкая щель собирает больше света, но ухудшается спектральное разрешение. Обычно достаточно ширины щелей, позволяющих получить спектральное разрешение  $\Delta\lambda$  от 5 до 20 нм, так как спектры молекулярной эмиссии сравнительно широки с незначительной тонкой структурой. Ширина щели монохроматора возбуждения выбирается гораздо меньших размеров, так как возбуждающий свет хорошо коллимируется ( $\Delta\lambda \approx 2\text{--}5$  нм). Тем не менее, приведенная ранее (рис. 3.7) структура УФ эмиссионного спектра газоразрядных ламп приводит к фотометрической недостоверности на уровне  $\pm 10\%$  несмотря на коррекцию спектров возбуждения.

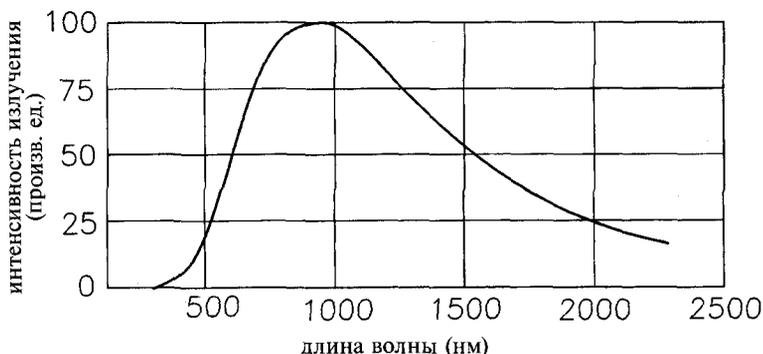
### 6.3.2. Коррекция спектров флуоресценции

Как уже упоминалось выше, неисправленный спектр флуоресценции искажен приборными диспергирующими факторами, такими как спектральная эффективность лампы, монохроматор и фотодетектор. Существует ряд способов корректировки этого влияния. Теоретически спектр возбуждения флуоресценции должен быть идентичен спектру поглощения (при условии, что в образце присутствует единственное чистое вещество), следовательно, коррекционная кривая  $A(\lambda)$  для возбуждающего света (лампы и монохроматора возбуждения) получается нормализацией измеренного неисправленного спектра возбуждения молекулы по отношению к ее спектру поглощения. В другом методе коррекционная кривая  $A(\lambda)$  для монохроматора возбуждения получается с использованием так называемого счетчика квантов. Наиболее эффективный счетчик квантов основан на высококонцентрированном (3 г/л) растворе родамина Б в этиленгликоле. Такой счетчик поглощает практически все попадающие на него фотоны независимо от их длины волны  $\lambda$  (см. рис. 6.14). При этом используется треугольная кювета, на и с передней поверхности которой происходит возбуждение и эмиссия света (так называемая геометрия передней грани). Так как эмиссия наблюдается при фиксированной длине волны, то дисперсия эмиссионного луча света ничего не дает, и измеряемый сигнал пропорционален количеству уловленных фотонов. К сожалению, счетчик квантов на основе родамина Б эффективен только в диапазоне от 200 до 600 нм. В спектральном диапазоне свыше 600 нм подходящего счетчика квантов не имеется, что затрудняет корректировку при больших длинах волн.

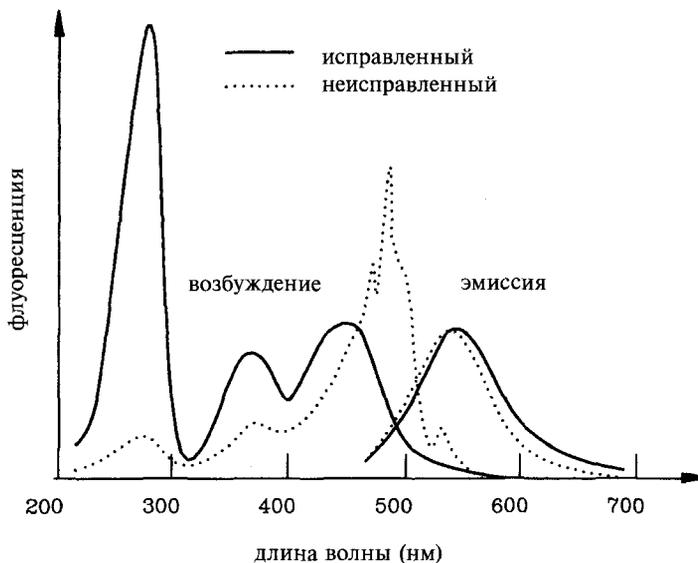
Строго говоря, для получения истинного спектра флуоресценции также требуется коррекционная кривая  $E(\lambda)$  в отношении эмиссионной части флуориметра (решетка эмиссии + ФЭУ). Абсолютное определение  $E(\lambda)$  по-

лучить достаточно трудно, поэтому применяется сравнительная корректировка спектра. Измеренный эмиссионный спектр стандартного вещества сравнивается с его реальным (исправленным) спектром эмиссии. Ряд таких модельных спектров, как спектр сульфата хинина,  $\beta$ -нафтола или 3-аминофталимида, опубликован. Подобным образом можно использовать стандартные калиброванные лампы накаливания (чернотельный излучатель) (см. рис. 3.6). Коррекционная кривая  $E(\lambda)$  для эмиссионной части флуориметра получается делением измеренного сигнала на предполагаемый (документированный) «истинный» сигнал. Простым, но полезным примером является использование галогеновой лампы с температурой нагрева нити накаливания  $3\ 200^\circ\text{C}$ , излучение которой в наибольшей степени приближается к излучению черного тела при этой температуре (см. главу 3.4.1 и рис. 6.12). Кривую  $E(\lambda)$  можно получить и без внешних источников, используя только счетчик квантов и белую нефлуоресцирующую пластину (например, покрытую оксидом магния), которая рассеивает свет всех длин волн с одинаковой эффективностью. Оно вставляется в кюветодержатель вместо треугольной кюветы (настройка по отражению). Сначала получают коррекционную кривую  $A(\lambda)$  возбуждающего света с помощью счетчика квантов. Далее определяют общую чувствительность флуориметра  $G(\lambda)$  в зависимости от длины волны  $\lambda$ . Это производится при синхронном сканировании длин волн возбуждения и эмиссии. Затем получают коррекционный спектр эмиссионной части монохроматора  $E(\lambda)$  делением кривой общей чувствительности  $G(\lambda)$  на предварительно полученную кривую  $A(\lambda)$ .

На рис. 6.13 представлены исправленные и неисправленные спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции фламина в водном растворе. Действительная необходимость корректировки измеренного спектра возбуждения очевидна. В то же время измеренный эмиссионный спектр искажен незначительно и при корректировке лишь слегка смещается в длинноволновую сторону (батохромно) на 10–20 нм в зависимости от индивидуальных особенностей конкретного флуориметра. Поэтому следует заключить, что детальное сравнение неисправленных спектров флуоресценции, полученных на разных флуориметрах, сомнительно.



**Рис. 6.12.** Эмиссионный спектр галогеновой лампы при требуемом напряжении питания. При температуре нагрева нити накаливания  $3\ 200^\circ\text{C}$  излучение лампы с хорошей степенью аппроксимации соответствует излучению черного тела



**Рис. 6.13.** Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции флавина в водном растворе, полученные на конкретном приборе и откорректированные соответствующим образом. Спектр возбуждения значительно искажен оптической системой и требует коррекции в любом случае, в то время как спектр эмиссии изменен незначительно и слегка гипсохромно смещен

### 6.3.3. Линейность флуоресцентного сигнала

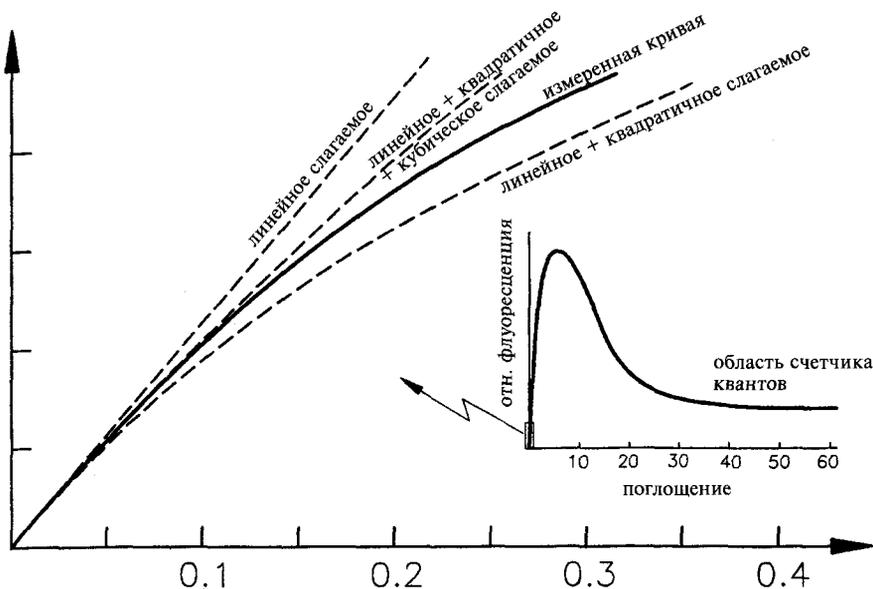
Линейность сигнала флуориметра является немаловажным фактором практического использования данного метода исследований. Все флуоресцирующие вещества без исключения проявляют сильную нелинейность между поглощением и эмиссией флуоресценции при поглощении выше  $A = 0,05$  (при условии выполнения закона Ламберта — Бера: поглощение пропорционально концентрации) (см. рис. 6.14). При очень больших величинах поглощения флуоресцентная кривая зависимости от поглощения в действительности асимптотически изгибается вниз (см. вставку рис. 6.14). Это та концентрационная область, в которой работают счетчики квантов. Причины заключаются в следующем.

Если уравнение 6.1 для определения квантового выхода флуоресценции записать в виде:

$$I_F = \Phi_F I_A \quad (6.2)$$

где  $I_A$  — количество поглощенных фотонов, в отличие от  $I_T$  — количества прошедших фотонов. Если снова число падающих (возбуждающих) фотонов обозначить как  $I_0$ , то получим:

$$I_F = \Phi_F (I_0 - I_T) \quad (6.3)$$



**Рис. 6.14.** Зависимость флуоресценции от поглощения (концентрации) флуорофора. Вплоть до  $A \approx 0,05$  измеренная кривая линейна и практически не зависит от типа молекулы. Пунктирной линией обозначены кривые, соответствующие математическим аппроксимациям согласно уравнению 6.8. Вставка: Чрезвычайно высокая концентрация специально подобранных молекул (типа родамина Б) приводит к независимой от длины волны, но зависимому от падающего потока квантов, поглощению/эмиссии квантов. Этот эффект используется для счета фотонов и исправления флуоресценции

и

$$I_F = \Phi_F \left( 1 - \frac{I_T}{I_0} \right) \tag{6.4}$$

Здесь  $I_T/I_0$  — пропускание образца  $T$ . Из уравнений 4.4 и 4.5 поглощение записывается как:

$$A = -\frac{1}{T} = e \cdot \epsilon \cdot x \cdot c$$

Если поглощение записать через натуральный логарифм:

$$\ln \frac{I_0}{I_T} = a(\lambda)xc \tag{6.5}$$

то получим экспоненциальную форму:

$$\frac{I_0}{I_T} = e^{-a(\lambda)xc} \tag{6.6}$$

Если полученное выражение подставить в уравнение 6.4, то получим:

$$I_F = \Phi_F I_0 (1 - e^{-a(\lambda)xc}) \quad (6.7)$$

Из уравнения 6.7 очевидно, что величина эмиссионного сигнала пропорциональна квантовому выходу и количеству падающих квантов  $I_0$ , но не концентрации  $c$ !

В соответствии с правилами разложения экспоненты, можно записать:

$$e^x = 1 + \frac{x}{1} + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots \quad (6.8)$$

При отрицательных значениях  $x$  последующие члены ряда последовательно вычитаются и прибавляются.

Для «небольших» значений  $x$  уравнение 6.8 упрощается за счет исключения больших степеней  $x$ :

$$e^{-x} = 1 + \frac{-x}{1} = 1 - x \quad (6.9)$$

Следовательно, уравнение 6.7 можно записать в следующем виде:

$$I_F = \Phi_F I_0 xca(\lambda) \quad (6.10)$$

Если использовать определение молярного коэффициента экстинкции (см. уравнение 5.3), то получим формулу, известную как закон Паркера:

$$I_F = 2,303 \Phi_F I_0 xc\epsilon(\lambda) \quad (6.11)$$

Отсюда следует, что линейность поглощения и флуоресценции соблюдается для адекватно разбавленных образцов, и только в этом случае можно говорить о количественных измерениях флуоресценции! На практике это условие часто игнорируется. Однако, что означает «адекватно разбавленные»? Практически, в пределах точности измерения, для флуорофоров с весьма различающимися молярными коэффициентами экстинкции линейность гарантирована вплоть до поглощений  $A \approx 0,05$ . Конечно, точного значения предсказать нельзя (см. рис. 6.14). Соответствующая максимальная концентрация флуорофора определяется по закону Ламберта — Бера:

$$c_{\max} = \frac{0,05}{2,303x\epsilon(\lambda)} \quad (6.12)^{-1}$$

Например, интенсивность флуоресценции хлорофилла, у которого  $\epsilon(670 \text{ нм}) = 85\,000 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , при длине оптического пути  $x = 1 \text{ см}$  увеличивается линейно до концентрации  $c_{\max} = 0,05 / (2,303 \times 1 \times 85\,000) = 0,255 \text{ мМ}$ .

Если в уравнении 6.9 не пренебрегать большими степенями  $x$ , что при современном уровне развития компьютерной техники не является пробле-

мой, то можно получить нелинейную калибровочную кривую для флуоресцентных измерений при более высоких концентрациях флуорофора. Тем не менее, данный метод имеет ограничения, связанные с эффектом внутреннего фильтра, который был описан выше. Этот эффект вызван реабсорбцией эмитируемого света.

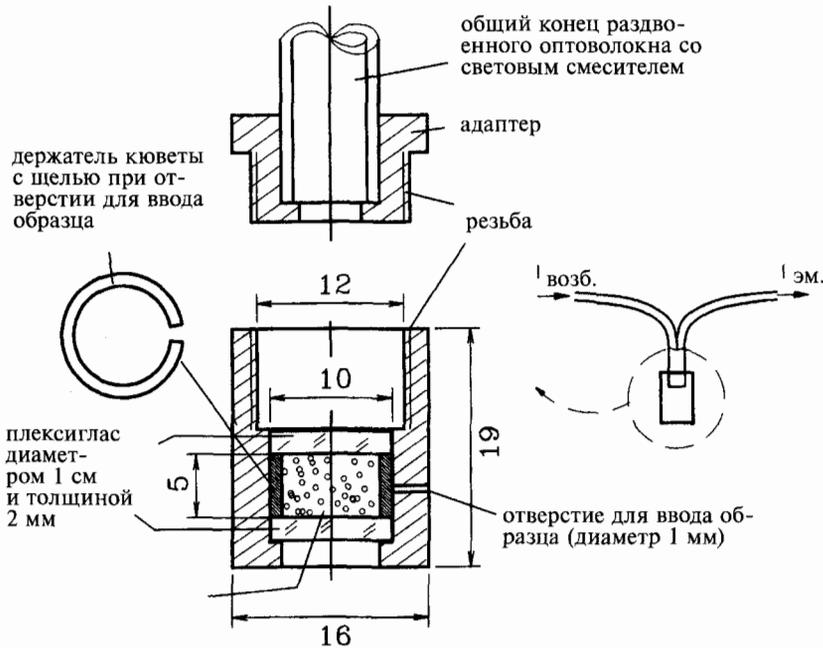
### 6.3.4. Мутные образцы и измерения при низких температурах

Особенно проблематичными являются измерения флуоресценции мутных сильно поглощающих образцов (суспензий), таких как хлоропласты зеленых листьев растений, в которых происходит фотосинтез. Даже если подобная суспензия в целом будет сильно разбавлена, то локальная концентрация хлорофилла в хлоропластах сохранится на уровне молей/л, что не гарантирует линейность флуоресценции от концентрации даже при условии выполнения закона Ламберта — Бера (см. главу 5.1). В таких случаях оправданы только относительные, качественные и кинетические измерения, при которых используется эталон с такими же поглощательной и рассеивающей способностями, что и образец. Количественные измерения производятся на основе калибровочной кривой, полученной на эталонном образце.

В некоторых случаях оказывается предпочтительной низкотемпературная флуориметрия, например, при температуре жидкого азота  $-196^\circ\text{C}$  (77 К). Так как интенсивность флуоресценции проявляет сильную зависимость от температуры (вероятность безызлучательных переходов  $S_1 \rightarrow S_0$  уменьшается со снижением температуры), флуоресценция некоторых веществ может быть обнаружена только при очень низких температурах. В этом случае может подойти устройство с разветвленным оптоволоконном, работающее в режиме отражения, так как большинство образцов в состоянии глубокой заморозки становятся мутными и высоко рассеивающими (см. рис. 6.15).

Монохроматический свет по одной ветви оптоволоконна подается на образец, помещенный в специальную кювету из латуни — плексигласа. Объем образца составляет обычно 0,25 мл. Кювета помещается в сосуд Дьюара с жидким азотом, либо в простой стеклянный стакан в полистирольном кожухе. После ввода образца в кювету с помощью шприца выжидается примерно 1 мин, чтобы температура образца достигла  $-196^\circ\text{C}$ , а потом начинаются измерения. Флуоресцентное излучение собирается второй ветвью оптоволоконна и передается на монохроматор эмиссии. Для этих целей легко приспособить обычный флуориметр. В зависимости от растворимости образца применяются различные растворители. Например, смесь эфира, изопентана и этанола в соотношении 5 : 5 : 2 при замерзании остается в застеклованном виде. Следует избегать трещин, так как они будут рассеивать свет и искажать измерения. На практике это возможно с образцами тоньше 1 мм.

Если производятся только кинетические измерения образцов с известными спектрами возбуждения и эмиссии флуоресценции, то вместо монохроматоров можно воспользоваться цветными фильтрами с гораздо более высоким светопропусканием (интерференционными, стеклянными или пластиковыми, см. главу 3.7). Максимум пропускания фильтров подбира-



**Рис. 6.15.** Схема кюветы для измерений флуоресценции в отражательном режиме при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  (температура жидкого азота). Образец в кювету вводится (без пузырьков воздуха!) с помощью шприца через отверстие диаметром 1 мм. Измерение осуществляется разветвленным оптоволоконном, соединенным с кюветой через адаптер. Одна ветвь оптоволоконна связана со входной щелью, а другая — с выходной щелью обычного флуориметра. Все устройство помещается в сосуд Дьюара вне флуориметра и закрывается светонепроницаемой тканью

ется соответствующим максимумам возбуждения и эмиссии флуорофора. В качестве фотодетектора обычно используется фотоумножитель с большим торцевым фотокатодом, который располагается в непосредственной близости от образца. Таким образом, угол сбора и, следовательно, чувствительность возрастают на несколько порядков (см. измерения мутных образцов в главе 5.2.8).

Предпочтительным источником света для возбуждения флуоресценции в УФ области является 254 нм линия ртутной лампы, легко выделяемая специальным ртутным фильтром. Превосходными источниками УФ света для флуоресцентной спектроскопии являются также маленькие, недорогие и легкие лампы с узкой направленностью луча, обычно используемые для калибровки.

### 6.3.5. Дополнительные источники ошибки

На практике очень часто получают флуоресцентные спектры с неожиданными свойствами, даже после коррекции. Эти полосы, пики, плечи и даже «отрицательные» флуоресцентные сигналы могут быть вызваны различными причинами, некоторые из которых приведены ниже.

- Отсутствие в флуориметре фильтров подавления более высоких порядков.
- Влияние Рамановской полосы растворителя (см. главу 8.3) существенно возрастает с уменьшением концентрации образца вследствие высокой чувствительности флуориметрии. Например, длина волны Рамановской полосы воды всегда энергетически на  $3\,600\text{ см}^{-1}$  ниже длины волны возбуждающего света, т.е. для длины волны возбуждающего света  $\lambda_{\text{возб.}} = 600\text{ нм}$  она будет на  $762\text{ нм}$ , а для  $\lambda_{\text{возб.}} = 200\text{ нм}$  — на  $215,5\text{ нм}$ . Этот тип ошибки выражается в изменении профиля и интенсивности спектра при изменении длины волны возбуждения. Следовательно, это обстоятельство надо иметь в виду, когда получают сверхострые эмиссионные полосы, наложенные на основной спектр флуоресценции. В случае отсутствия Рамановского эффекта при изменении длины волны возбуждения изменяться должна только «высота», но не форма или положение максимума в спектре эмиссии.
- При измерении флуоресценции (а также фосфоресценции) очень важна чистота растворителя. Бесструктурированные широкие полосы в спектре флуоресценции часто обусловлены примесями, поэтому в случае сомнений в корректности спектра следует предпринять меры по очистке даже «аналитически чистого» растворителя.
- Большое число оптических компонентов (включая загрязнение отпечатками пальцев!), таких как отрезные фильтры или дихроические зеркала, проявляют коротко- и длительноживущую люминесценцию. Следует осуществлять их проверку на «чистоту» функционирования. Часто причиной удивительных измерений флуоресценции является загрязнение кюветы.
- Необходимо также предотвращать и подавлять появление интенсивного пика Релеевского рассеяния (эластичного рассеяния возбуждающего света), включая его хвост, так как он может вызвать необратимое повреждение ФЭУ. Поэтому эмиссионные сигналы следует измерять на достаточном расстоянии от длины волны возбуждающего света. Это расстояние определяется шириной щелей.

## 6.4. Поляризация и анизотропия

С физической точки зрения, флуоресцентное излучение является поперечной волной или так называемым дипольным излучением со строго определенным направлением по отношению к структуре излучающей молекулы (дипольному моменту перехода, см. главу 2.3.3.4). Если на образец, содержащий растворенные и изотропно распределенные флуорофоры, будет падать поляризованный свет, то флуоресцентное излучение также будет в большей или меньшей степени поляризовано. Это свойство флуоресценции очень важно для аналитических целей.

### 6.4.1. Определения

Предположим, что вектор  $E$  электрического поля возбуждающего света ориентирован по оси  $z$ , а дипольные моменты перехода поглощения и эмиссии параллельны (вложенный угол  $\beta = 0$ ) и образуют общий угол  $\Theta$  с осью  $z$ , проекция

которого на плоскость  $x$ - $y$  соответствует азимуту  $\Phi$  (см. рис. 6.16). Вероятность поглощения пропорциональна  $\cos^2 \Theta$ . Интенсивность  $I_{vv}$  флуоресцентного света, излучаемого параллельно оси  $z$ , также пропорциональна  $\cos^2 \Theta$ :

$$I_{vv} \propto \cos^2 \Theta \quad (6.13)$$

а интенсивность  $I_{vh}$  света, поляризованного ортогонально этому направлению, равна:

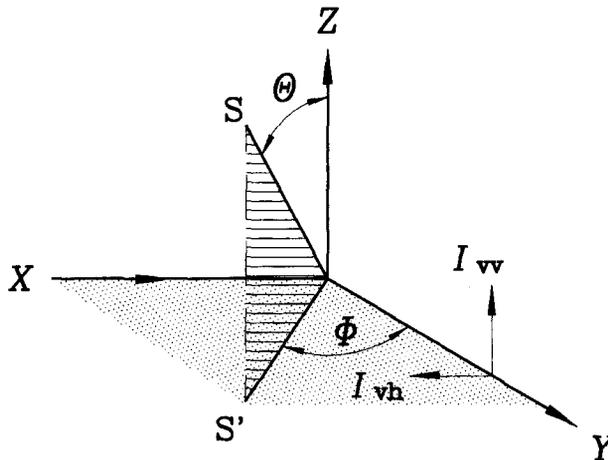
$$I_{vh} \propto \sin^2 \Theta \sin^2 \Phi \quad (6.14)$$

Если проинтегрировать плоско поляризованное возбуждающее и эмиссионное излучение по всему пространству, то получим величину поляризации

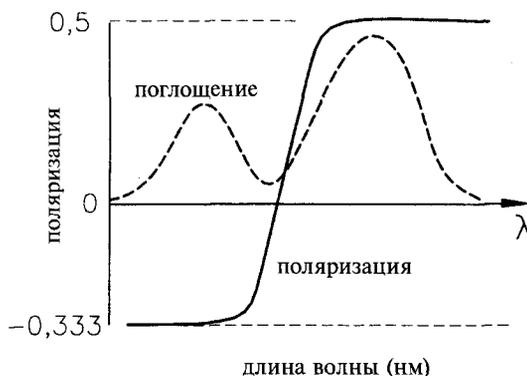
$$p_0 = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + I_{vh}}, \quad (6.15)$$

равную  $S$ . Однако, если дипольные моменты возбуждения и эмиссии будут ортогональны друг другу ( $\beta = 90^\circ$ ), то получим минимальное значение, равное  $-1/3$ . Для любого угла  $\beta$  величина поляризации будет иметь значение между этими двумя пределами:

$$-\frac{1}{3} \leq p_0 \leq +\frac{1}{2}, \quad (6.16)$$



**Рис. 6.16.** Схематическое представление зависимости двух ортогонально ориентированных компонент флуоресцентного света  $I_{vh}$  и  $I_{vv}$  в  $y$ -направлении с перпендикулярно поляризованным возбуждающим светом в  $x$ -направлении ( $E$ -вектор имеет  $z$ -направление). Для упрощения схемы полагается, что дипольные моменты перехода поглощения и эмиссии ориентированы параллельно в  $S$ -направлении (вложенный угол  $\beta = 0$ ). Проекция вектора  $S$  на плоскость  $x$ - $y$  соответствует азимуту  $\Phi$



**Рис. 6.17.** Идеализированный спектр поляризации  $p_0(\lambda)$  гипотетической молекулы, который может теоретически изменяться от  $-1/3$  до  $+0,5$

как показано на рис. 6.17, где представлен идеализированный спектр поляризации  $p_0(\lambda)$  гипотетической молекулы.

К сожалению, по физическим причинам все монохроматоры на основе решеток обладают значительной собственной поляризацией, что ограничивает прямое применение уравнения 6.15. Чтобы сделать применимой эту формулу, поляризацию света, связанную с аппаратурой, следует исключать. Это достигается простой, но несколько громоздкой процедурой измерения, требующей получения четырех отдельных спектров с различным расположением поляризационных фильтров. Однако эта процедура легко реализуется с помощью соответствующей компьютерной программы:

$$p(\lambda) = \frac{I_{vv} - I_{vh} \left( \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \right)}{I_{vv} + I_{vh} \left( \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \right)} \quad (6.17)$$

В этой формуле первый индекс относится к возбуждающему, а второй — к эмитируемому свету.

Несмотря на эту проблему, определение поляризации  $p$  в соответствии с уравнением 6.15 все еще широко используется в научной работе с фильтровыми монохроматорами. Таким образом, суммарное значение поляризации  $p$  смеси флуорофоров с индивидуальными интенсивностями  $F_i$  и поляризацией  $p_i$  определяется как:

$$\left( \frac{1}{p} - \frac{1}{3} \right)^{-1} = \sum \frac{F_i}{\frac{1}{p_i} - \frac{1}{3}} \quad (6.18)$$

Так называемая анизотропия  $r$  определяется как:

$$r_0 = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2I_{vh}} \quad (6.19)$$

Это понятие вместо поляризации было введено в первой половине 60-х годов прошлого века. Анизотропия отличается от поляризации только коэффициентом 2 в знаменателе формулы (сравните уравнения 6.19 и 6.15). Как показано на рис. 6.18, дипольное излучение распределяется симметрично вокруг оси  $z$ , давая суммарное значение световой энергии  $I_{vv} + 2I_{vh}$ , что более соответствует сути, чем  $I_{vv} + I_{vh}$ . В результате анизотропия  $r$  смеси флуорофоров определяется линейным соотношением:

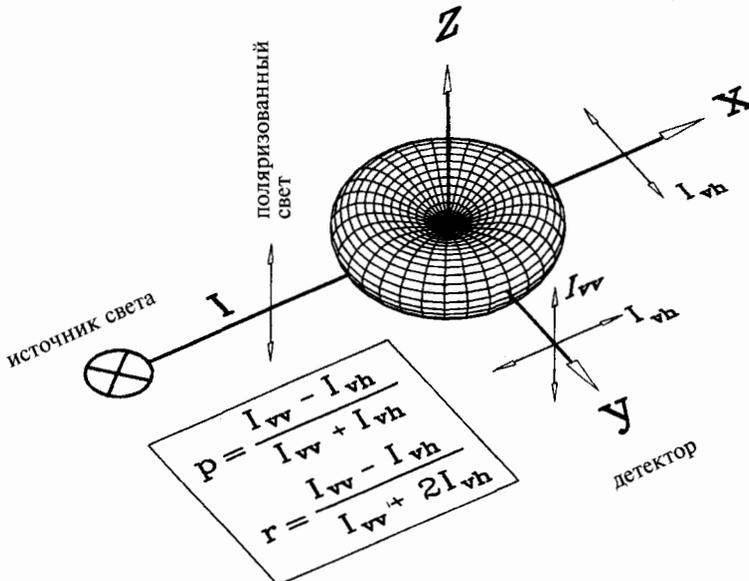
$$r = \sum_i F_i f_i \quad (6.20)$$

Помимо этого, в отличие от поляризации, кинетика затухания анизотропии единичного флуорофора, вызываемой импульсным возбуждающим светом, строго экспоненциальна. В случае смеси флуорофоров она равна сумме экспонент отдельных компонентов. Следовательно, при изучении сложных смесей целесообразней использовать анизотропию, а не поляризацию.

В соответствии с уравнениями 6.16 и 6.20, анизотропия и поляризация взаимно конвертируются:

$$p = \frac{3r}{2+r} \quad \text{или} \quad r = \frac{2p}{3-p}$$

В соответствии с этими формулами, значения анизотропии лежат в пределах между  $-0,2$  и  $+0,4$ .



**Рис. 6.18.** Трехмерное представление пространственного распределения флуоресцентного света при возбуждении перпендикулярно поляризованным к оси  $x$  светом. Приведены также определения поляризации и анизотропии

### 6.4.2. Перенос энергии

Для понимания теоретических основ деполяризации, о которой пойдет речь в главе 7, сначала следует провести различие между механизмами переноса энергии от одной электронно возбужденной молекулы к другой:

- при механизме электронного обмена орбитали возбужденной молекулы-донора и молекулы-акцептора в ее основном состоянии должны в существенной степени пространственно перекрываться. В этом случае энергия возбуждения переносится через взаимный обмен электронами. Область такого взаимодействия невелика и требует непосредственного «контакта» молекул (столкновения): она не превышает расстояния 10 Å. Спектральные свойства обеих молекул при таком механизме переноса энергии не имеют значения;
- второй, «тривиальный» механизм переноса энергии заключается в излучении и последующем поглощении кванта света: возбужденная молекула излучает фотон, который поглощается другой молекулой, переходящей таким образом в возбужденное состояние. Для этого требуется прозрачный растворитель. Такой механизм переноса энергии не только не представляет аналитического интереса, но даже мешает измерениям;
- третий, так называемый Ферстеровский механизм переноса энергии (резонансный перенос, диполь-дипольный перенос) имеет наибольшее аналитическое значение. Он обусловлен тем обстоятельством, что энергия возбуждения переносится на большие расстояния без излучения кванта света. Энергия переносится прямо пропорционально перекрыванию спектра эмиссии донора и спектра поглощения акцептора (в волновых числах, т.е. эквивалентно энергетическому представлению), обратно пропорционально шестой степени расстояния  $R$  между молекулами и характеризуется параметром  $R_0$ , экспериментальное определение которого приводится в главе 7.

### 6.4.3. Деполяризация

Только в идеальном случае можно измерить «реальную» собственную поляризацию молекул  $p_0(\lambda)$ . На практике, вследствие двух причин, всегда получают меньшую величину, т.е. происходит постепенная деполяризация света:

- энергия возбуждения будет переноситься от флуорофора к другим соседним молекулам того же типа. При этом их дипольные моменты перехода необязательно будут параллельны перед тем, как акцептирующая энергию молекула излучит свет. Процесс переноса энергии усиливается с увеличением концентрации флуорофора, что приводит к постепенной деполяризации эмиссии флуоресценции. Таким образом можно определить критическое расстояние  $R_0$ , т.е. согласно определению, расстояние, при котором вероятность переноса энергии возбуждения между двумя молекулами с парал-

тельными дипольными моментами перехода будет равна вероятности эмиссии  $1/\tau$ ;

- благодаря процессам вращательной релаксации, флуорофор будет вращаться в течение времени между процессами возбуждения и эмиссии. Этот процесс характеризуется так называемым временем вращательной релаксации  $\zeta$ , описывающим вращательную подвижность молекулы, которую можно определить, например, по вязкости микроокружения («микровязкости»).

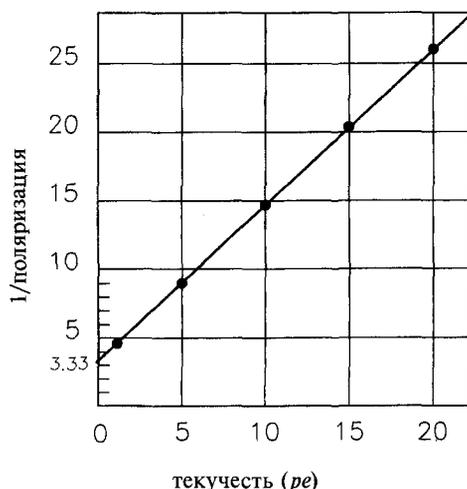
Перрен в 1926 г. вывел следующее соотношение:

$$\frac{1}{p} - \frac{1}{3} = \left( \frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \left( 1 + \Phi \frac{3T\chi\tau}{4\pi a^3} \right) \quad (6.21)$$

где  $p$  и  $p_0$  — кажущаяся и действительная («натуральная») поляризации, соответственно,  $\chi$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $\tau$  — время жизни флуоресценции,  $a$  — средний радиус Эйнштейна,  $\Phi$  — текучесть растворителя, измеряемая в ре (не следует путать с квантовым выходом, который также обозначается  $\Phi$ ).

Величина, обратная текучести, — вязкость  $\eta$ . При температуре  $20^\circ\text{C}$  текучесть воды составляет 100 ре, а вязкость соответственно 0,01 пуаз или 1 сантипуаз(сп).

Например, если измерять значения поляризации флуоресценции люмифлавина в растворителе с различными значениями текучести (полученной строго определенным смешением глицерина и воды), то график зависимости  $1/p$  от  $\Phi$  будет выражаться прямой линией. При экстраполяции этой линии до  $\Phi = 0$  получаем действительную поляризацию  $p_0 = 0,3$  (см. рис. 6.19). Получив значение  $p_0$  и экстраполируя линию на рис. 6.19 до текучести воды с  $\Phi = 100$ , можно определить эффективный радиус Эйн-



**Рис. 6.19.** Линейная зависимость обратного значения поляризации  $p$  от текучести  $\Phi$  растворителя (изменения текучести получены различным соотношением глицерина и воды в смеси)

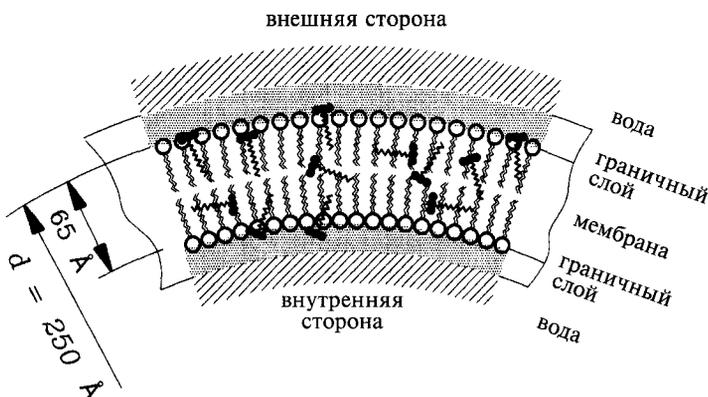
штейна для люмифлавина  $a = 6,2 \text{ \AA}$ . Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации  $\zeta$  по формуле:

$$\zeta = \frac{4a\pi}{\chi T\Phi} \quad (6.22)$$

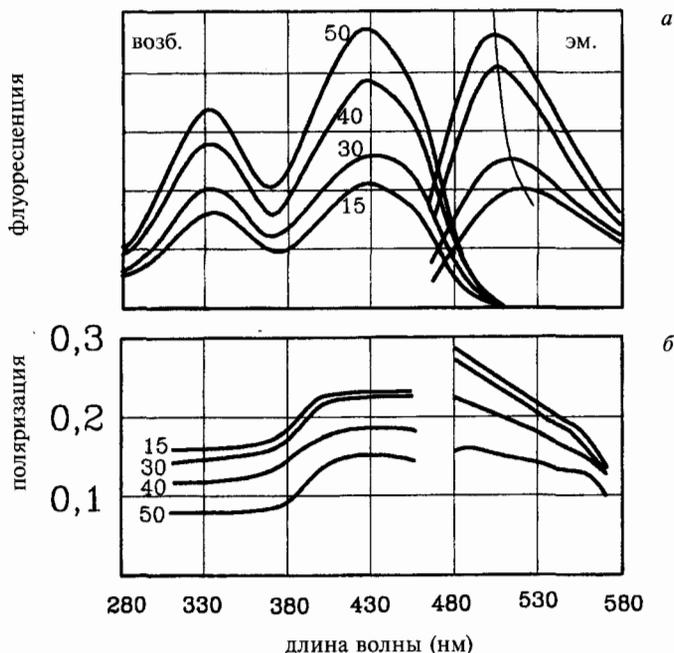
Отсюда, время вращательной релаксации люмифлавина в воде при комнатной температуре будет равно  $\zeta = 0,38 \text{ нс}$ , т.е. приблизительно в 10 раз меньше времени жизни флуоресценции, которое составляет 4,5 нс. Следовательно, в водном растворе люмифлавин не будет проявлять какую-либо кажущуюся поляризацию флуоресценции.

Однако, если молекула флавина связана с мембраной (см. рис. 6.20) длинной алифатической цепочкой (амфифлавин, см. рис. 6.7), то его вращательная подвижность будет затруднена, и поляризация флуоресценции будет наблюдаться в зависимости от температуры, т.е. состояния фазового перехода мембраны. Спектры поляризации отражают спектральные свойства поляризации (см. рис. 6.21) и позволяют различать электронные состояния (см. рис. 6.17) — особенность, которая не наблюдается в обычных спектрах поглощения. Таким образом спектрально подтверждается заключение, полученное из кинетических измерений (см. рис. 6.7). С увеличением температуры хромофор переориентируется в гидрофобные внутренние мембранные домены, что проявляется в гипсохромном смещении эмиссионного спектра и сопутствующем возрастании квантового выхода флуоресценции.

Комбинируя уравнения 6.21 и 6.22, на основе температурной зависимости поляризации флуоресценции можно определить время вращательной релаксации  $\zeta$  (см. рис. 6.21). Это наблюдалось на везикулярных мембранах, сконструированных из трех различных липидов (димиристоил-, дипальмитоил-



**Рис. 6.20.** Масштабированное представление связанного с везикулой амфифлавинов. При переходе сквозь биологические мембраны существует очень значительное изменение полярности: с внутренней стороны диэлектрическая постоянная  $\epsilon = 4$ , а с внешней — достигает  $\epsilon \sim 80$ . Этот градиент приводит к значительным изменениям флуоресценции хромофора при связывании с мембраной

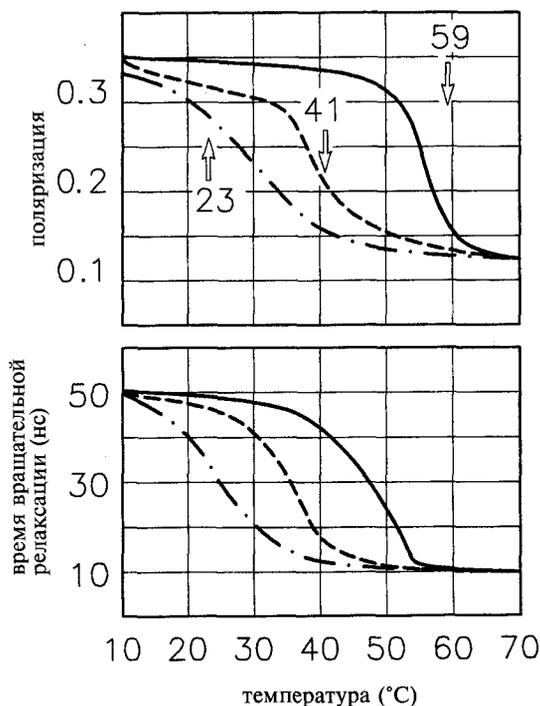


**Рис. 6.21.** *а* — Если флуорофор флавина связан с мембраной (рис. 6.20) длинной алифатической цепочкой (амфифлавин, см. рис. 6.7), то его вращательная подвижность будет затруднена, что приведет к существенному возрастанию поляризации флуоресценции, величина которой будет зависеть от температуры, т.е. фазового перехода мембраны от кристаллического к жидкокристаллическому состоянию (для дипальмитоиллецитина эта температура равна  $41^{\circ}\text{C}$ ); *б* — спектральные характеристики поляризации

и дистеароиллецитина) с температурами фазовых переходов  $23$ ,  $41$  и  $59^{\circ}\text{C}$  (см. рис. 6.22). В соответствии с уравнением 6.23 (и при  $1/\Phi = \eta$ ), с помощью флуорофоров можно определить микровязкость мембраны в кристаллическом ( $125 \text{ сп}$ ) и жидкокристаллическом ( $25 \text{ сп}$ ) состоянии.

Измерением поляризации (деполяризации) флуоресценции можно быстро и легко определить, в какой степени флуоресцирующий кофермент типа НАД-Н (никотинамидадениндинуклеотид восстановленный) или флавин (витамин В2) связан с белками или мембранами, или в какой степени они солюбилизированы в свободной форме. Времена вращательной релаксации белков находятся в миллисекундном диапазоне. Например, для родопсина, большого мембранного белка размером  $50 \text{ \AA}$  (см. рис. 6.23), время вращательной релаксации  $\zeta$  составляет  $20 \text{ мс}$ . В течение его времени жизни флуоресценции (порядка наносекунд) молекула белка фактически неподвижна. В каждом отдельном случае предположения относительно связывания должны подтверждаться спектральными свойствами.

На основе соотношения Перрена (уравнение 6.21) в 1966 г. Вебер вывел следующее уравнение для трехмерного гомогенного распределения флуорофоров:



**Рис. 6.22.** По известной температурной зависимости поляризации флуоресценции (см. рис. 6.23) можно определить время вращательной релаксации  $\zeta$  (нс). Данные зависимости были получены для трех разных липидов (димиристоил-, дипальмитоил- и дистеароиллецитина) с температурами фазового перехода 23, 41 и 59°С, соответственно

$$\frac{1}{p} - \frac{1}{3} = \left( \frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \left( 1 + c \frac{4\pi NR_c^6}{15(2a)^3} \right) \quad (6.23)$$

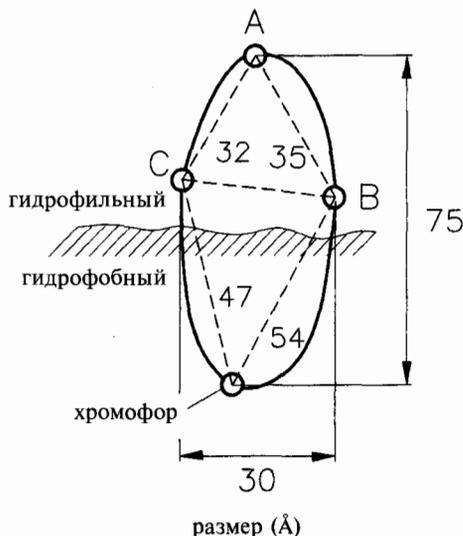
где  $N$  — число Лошмидта,  $2a$  — эффективный диаметр молекулы,  $c$  — концентрация флуорофора. Решение этого уравнения относительно  $R_c$  дает прямую линию с наклоном  $s = p/c$ :



**Джорджи Вебер**  
(1916—1997)

$$R_c = \sqrt{2a} \left( \frac{15s}{4N\pi (1/p_0 - 1/3)} \right)^{1/6} \quad (6.24)$$

Измерением поляризации люмифлавина в растворителях с различной вязкостью, например, в смесях глицерина и воды в различных соотношениях, было получено значение  $R_c = 29 \text{ \AA}$ . Таким образом, измерение эффективности флуоресценции позволяет определять субмикроскопические расстояния на основе известных значений  $R_c$ . На основе этого



**Рис. 6.23.** Флуориметрическое определение размера молекулы родопсина, содержащей в трех различных положениях флуорофоры различного спектрального поведения ( $A$  — йодоацетамид,  $B$  — флуоресцентный дисульфид,  $C$  — акридин). Зная параметры спектров возбуждения и эмиссии, а также величину  $R_c$ , можно определить геометрические размеры молекулы (согласно Wu и Stryer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, v.69, p.1104 — 1108)

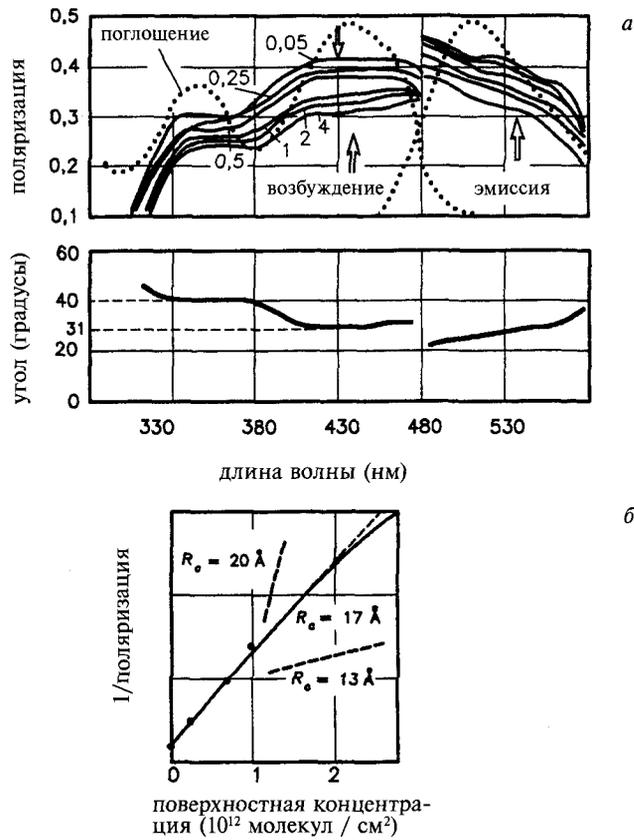
метода в 1972 г. Ву и Страйер определили структуру и размеры молекулы родопсина, которая играет важную роль в такой функции, как зрение (см. рис. 6.23).

Двумерный аналог уравнения 6.24 будет иметь вид:

$$R_c = (2a)^{2/3} \left( \frac{15s}{\pi (1/p_0 - 1/3)} \right)^{1/6} \quad (6.25)$$

Если изменять поверхностную концентрацию флавина, связанного с мембраной, то, в соответствии с уравнением 6.25, вновь получим зависящие от концентрации спектры поляризации, из которых можно определить критическое расстояние:  $R_c = 17 \text{ \AA}$ . Так как наклон кривой пропорционален шестой степени  $R_c$ , то его можно определить с высокой точностью, как показано на рис. 6.24, сравнением наклонов при слегка отличающихся значениях  $R_c$ . Таким образом, перенос энергии флавина внутри мембраны гораздо более эффективен по сравнению со свободно солюбилизированным флавином. Этот пример подчеркивает важное различие между изотропной и анизотропной фотохимией. Данные, полученные на растворах определенных веществ «в пробирке», нельзя использовать просто так, перенося на мембранно-связанные компоненты, играющие существенную роль в биологических механизмах.

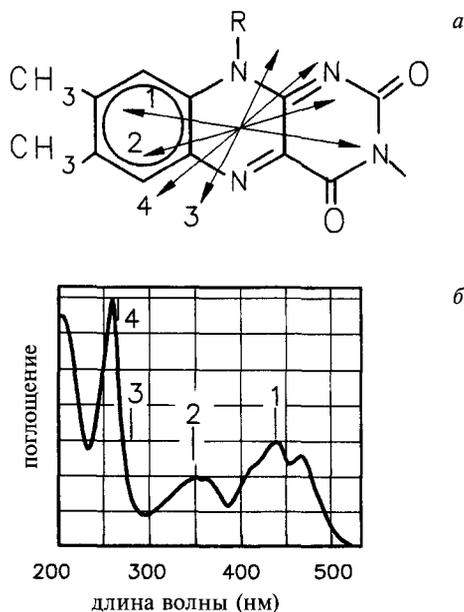
Как было установлено Перреном в 1929 г., спектр поляризации можно преобразовать в так называемый угловой спектр:



**Рис. 6.24.** а — изменение спектров поляризации амфифлавина (алифатическая цепочка в положении 3 рис. 6.7) в липидных везикулах дипальмитоиллецитина в зависимости от поверхностной плотности (приводимой в размерности 10<sup>12</sup> молекул / см<sup>2</sup>;  $\lambda_{эм} = 540 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{возб} = 440 \text{ нм}$ ); б — значения поляризации при 430 нм позволяют определить по формуле 6.25 критическое расстояние  $R_c = 17 \text{ \AA}$ . Так как наклон кривой пропорционален шестой степени  $R_c$ , то его можно определить с высокой точностью, как видно из сравнения наклонов при слегка отличающихся значениях  $R_c$ . В центре: Перерасчет спектра поляризации дает так называемый угловой спектр, по нему определяется угол  $\beta(\lambda)$  между дипольными моментами переходов:  $(S_0 \rightarrow S_1)/(S_0 \rightarrow S_2) = 40^\circ - 31^\circ = 9^\circ$

$$\beta(\lambda) = \arccos \sqrt{\frac{1 + 3p_0}{3 - p_0}} \quad (6.26)$$

который сразу показывает угол  $\beta(\lambda)$  между соответствующими дипольными моментами переходов (см. рис. 6.25). В приводимом примере угол между дипольными моментами переходов составляет  $(S_0 \rightarrow S_1)/(S_0 \rightarrow S_2) = 40^\circ - 31^\circ = 9^\circ$ . Теоретическое представление дипольных моментов молекулы флавина, проведенное Зонгом на основании анализа спектра поглощения флавина (рис. 6.25, б), изображено на рис. 6.25, а.



**Рис. 6.25.** *a* — векторное представление дипольных моментов перехода в различных полосах поглощения молекулы флавина; *б* — спектральное отнесение дипольных моментов перехода, изображенных выше. (Согласно Song, Int. J. Quantum. Chem., 1969, v.3, p.303)

## 6.5. Время жизни флуоресценции

### 6.5.1. Определения

Как уже упоминалось, флуоресценция — это излучение молекулы, находящейся в основном колебательном состоянии первого электронного возбужденного состояния  $S_1$ , имеющего время жизни  $\sim 10^{-9}$  с. Прочие механизмы затухания флуоресценции, такие как *перенос электрона (ПЭ)*, фотохимия, *внутренняя конверсия* и *интеркомбинационная конверсия*, конкурируют с «флуоресцентным каналом». Можно измерить только кажущееся время жизни  $\tau$  первого возбужденного синглетного состояния  $S_1$ . Вследствие различных процессов тушения оно всегда меньше собственного (естественного или «излучательного») времени жизни  $\tau_0$ . Количество возбужденных молекул  $n$  уменьшается во времени, и это описывается простым дифференциальным уравнением:

$$dn = -kndt \quad (6.27)$$

где  $k$  — суммарная константа скорости, описывающая временную зависимость перехода из возбужденного в основное состояние.  $k$  является суммой отдельных констант скорости: флуоресценции ( $k_{\phi}$ ), фотохимических процессов ( $k_{ПЭ}$ , переноса электрона), безызлучательных переходов ( $k_{BK}$ ) и интеркомбинационной конверсии ( $k_{ИКК}$ ):

$$k = k_{\phi} + k_{BK} + k_{ИКК} + k_{ПЭ} \quad (6.28)$$

Интегрирование уравнения 6.27 дает следующий результат:

$$n = n_0 e^{-kt} \quad (6.29)$$

Время  $t = \tau$ , для которого  $k = 1/t$ , является временем жизни возбужденного состояния. К этому времени  $1/e \approx 37\%$  молекул все еще находятся в возбужденном состоянии. Период полупревращения  $t_{1/2}$  определяется как время, за которое только половина молекул возвращается в основное состояние  $S_0$ . Соотношение между двумя параметрами очень простое:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{2k} = \ln 2\tau = 0,693\tau \quad (6.30)$$

### 6.5.2. Экспериментальное определение времени жизни флуоресценции

Существуют два способа экспериментального определения времени жизни флуоресценции  $\tau$  — прямой и непрямой. Первый метод, не совсем удачно называемый импульсным или флеш-фотолизом<sup>1</sup>, стал применяться с появлением в качестве источников возбуждающего света импульсных ламп с короткой длительностью импульса и импульсных лазеров. Импульсные измерения, в зависимости от вида возбуждающего импульса, можно осуществлять несколькими путями. В простейшем, так называемом методе единичного импульса, хромофор возбуждается отдельным сильным коротким импульсом, и производится мониторинг затухания флуоресценции в режиме реального времени, а для расчетов используется формула 6.30.

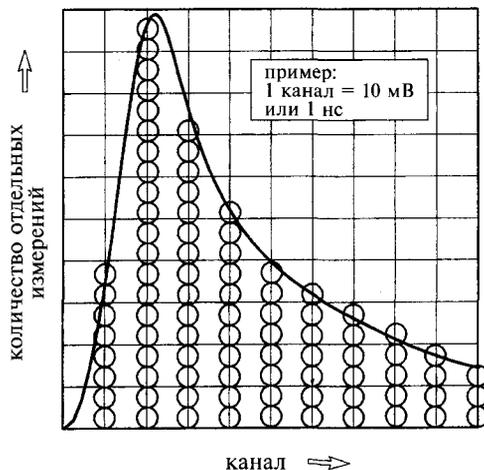
При многократном импульсном возбуждении (импульсном отборе) образец облучается высокочастотной последовательностью импульсов слабой интенсивности. Каждый импульс дает одну точку измерения (задержку между возбуждением и эмиссией единичного фотона), и кинетика полного затухания представляется в виде гистограммы отдельных случаев (счета единичных фотонов, см. рис. 6.26). Хотя время жизни флуоресценции очень короткое (наносекунды), измерения при этом методе осуществляются несколько минут. При использовании в этом методе импульсных ламп измерения можно производить, только если длительность их импульсов меньше или сравнима с измеряемым временем жизни флуоресценции  $\tau$ . Следовательно, измеряемая кинетика затухания «растянута» конечной длительностью возбуждающего импульса, а с математической точки зрения — свернута с кинетикой затухания импульсного света. Используя математическую процедуру развертки (деконволюции) (см. главу 5.4.4.4), можно определить истинную кинетику флуоресценции хромофора, если известен

<sup>1</sup> Прим. редактора: к фотолизу — фотохимическому превращению системы под действием мощного короткого импульса света — этот метод совсем не имеет отношения. Вернее его назвать просто импульсным измерением времени жизни

временной профиль импульсной лампы, причем длительность импульсов лампы меньше или сравнима с временем жизни флуоресценции  $\tau$ . Представленным способом возможно измерение времен жизни флуоресценции  $\tau$  порядка 100 пс.

Метод счета единичных фотонов основан на том, что эмиссия флуоресценции подобно радиоактивному распаду является статистическим процессом: в течение воздействия светового импульса молекулы образца возбуждаются, и запускается отсчет. Первый зафиксированный фотон останавливает отсчет, после чего измеряется и записывается время задержки между импульсом и этим определением фотона. В соответствии с кинетикой эмиссии флуоресценции, вероятность излучения фотона возбужденной молекулой уменьшается со временем. На практике для определения полной кинетики затухания статистически достоверным считается проведение измерений  $10^5$  отдельных сигналов. Интенсивность импульсов возбуждения должна быть небольшой, чтобы эмиссия и измерение фотона осуществлялись приблизительно на каждом двадцатом импульсе. Это условие позволяет также измерять более длительную временную кинетику (см. рис. 6.26).

Второй, непрямой, гармонический метод измерения времени жизни флуоресценции основан на соотношении амплитуды и фазы у возбуждающего и эмиссионного света. Основным компонентом фазового флуориметра является газоразрядная лампа, излучающая последовательность световых импульсов длительностью несколько наносекунд с повторяемостью примерно каждую миллисекунду. Источники света непрерывного излучения применяются при амплитудной модуляции электрооптическими модуляторами (см. рис. 3.28). Такие модулированные сигналы более воспроизводимы по форме и интенсивности сигнала, чем импульсные. Вследствие конечности времени жизни флуоресценции эмиссия не следует точно за модуляцией возбуждающего света — эмитируемый свет появляется через определенную временную задержку. Кроме того, степень модуляции эмитируемого света



**Рис. 6.26.** Визуальное представление метода счета единичных фотонов. Каждый кружок обозначает отдельное измерение (детали см. текст)

уменьшается из-за того, что между двумя последовательными импульсами не все возбужденные молекулы переходят в основное состояние. Временная задержка и коэффициент демодуляции  $m = B a / b A$  зависят от фазового угла  $\Phi$  (см. рис. 6.27), поэтому можно определить время жизни флуоресценции по одному из этих параметров:

$$\tau(\Phi) = \frac{1}{\omega} \times \tan \Phi \quad \text{или} \quad \tau(m) = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{1}{m^2} - 1} \quad (6.31)$$

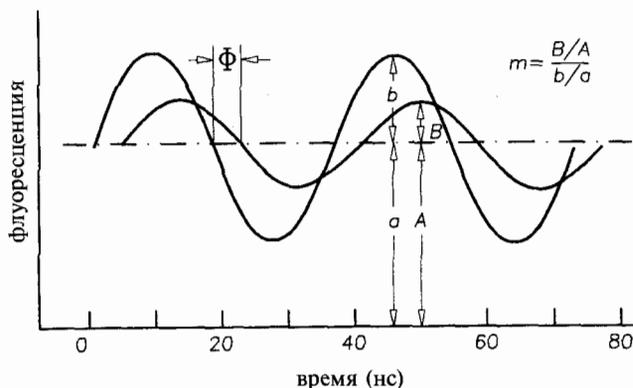
где  $f$  — частота модуляции,  $\omega$  — угловая частота,  $\omega = 2\pi f$ . Эти формулы можно объяснить на примере синусоидальной модуляции.

К сожалению, в различных областях науки и техники одни и те же символы применяются для обозначения разных параметров. Например, буквой « $\Phi$ » обозначают и фазовый угол, и текучесть, и квантовый выход, и азимутальный угол. Это может привести к некоторой путанице.

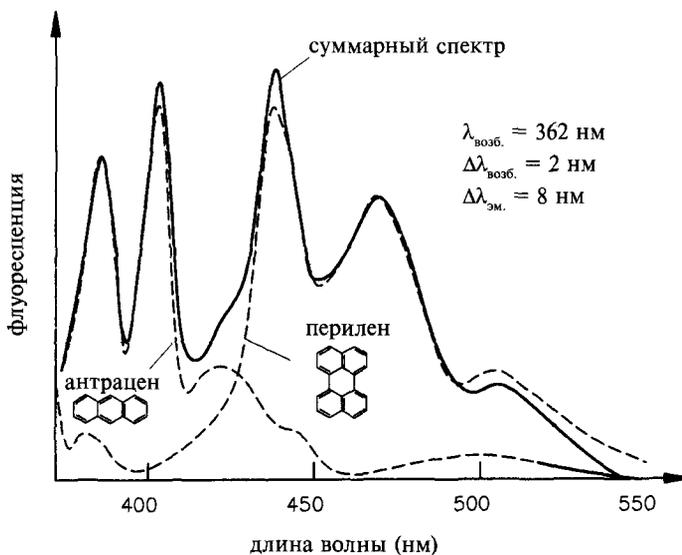
Если прямой метод измеряет сложно-кинетическое поведение в его частотно-комплексной форме, то непрямой, гармонический метод измерения времени жизни флуоресценции  $\tau$  направлен на измерение  $\Phi$  или  $m$ . Однако в последнем случае несоответствие времен жизни, полученных на основе измерения  $\Phi$  или  $m$ , свидетельствует о более сложной кинетике затухания (присутствии нескольких флуорофоров). В этом случае

$$\tau(m) > \tau(\Phi) \quad (6.32)$$

Время жизни флуоресценции  $\tau$  отдельных компонентов смеси определяется фазовым методом при изменении частоты модуляции  $f$ . Применение этого метода в биохимии белков более детально обсуждается в книге Лаковича (см. дополнительную литературу к главе: Lacowicz, 1999).



**Рис. 6.27.** Определение времени жизни флуоресценции  $\tau$  на основе модулированного возбуждающего света (большая амплитуда  $b$ , смещение  $a$ ). Вследствие присущему возбужденному состоянию времени жизни  $\tau_0$ , эмитируемый свет смещен по фазе ( $\Phi$ ), и при этом его амплитуда меньше ( $B$ , смещение  $A$ ). Коэффициент демодуляции  $m$ , так же как и фазовый угол  $\Phi$ , будучи независимыми друг от друга, позволяют определить время жизни флуоресценции  $\tau$



**Рис. 6.28.** Флуоресцентная спектроскопия временного разрешения позволяет определять спектральные характеристики отдельных компонентов смеси с различными временами жизни флуоресценции. В данном случае модуляционным методом проанализирована 50 : 50 смесь антрацена и перилена в метаноле. Времена жизни были определены равными 4,5 и 6,1 нс, соответственно. Разница только в 1600 пс позволяет провести четкое разделение обоих компонентов при условии, что настройка фаз синхронного усилителя была точно отъюстирована

Используя преимущества отличающихся времен жизни, флуоресцентная спектроскопия временного разрешения позволяет проводить и спектральное разрешение различных компонентов в сложной смеси. На рис. 6.28 продемонстрирована техническая возможность этого аналитического метода на примере модельной смеси антрацена и перилена, которые немного отличаются по своим временам жизни флуоресценции.

### 6.5.3. Определение квантового выхода

Квантовый выход флуоресценции  $\Phi_f$  определяется не только собственными молекулярными свойствами, но также и внешними факторами. Он измеряется вероятностью превращения энергии поглощенного кванта в квант излученного света. Уравнение 6.1 можно переписать в форме кинетических параметров:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET}} = k_F \times \tau \quad (6.33)$$

где максимальное значение  $\Phi_F$  равно «1», при условии, что не работает ни один из других каналов релаксации. Квантовый выход флуоресценции  $\Phi_F$  можно определить экспериментально несколькими способами.

• В принципе, поглощенный и эмитированный кванты можно определить прямо в количественном виде. Однако это — слишком дорогостоящий эксперимент, недоступный для большинства умеренно оборудованных лабораторий.

• Вторая возможность — через сравнение собственного ( $\tau_0$ ) и кажущегося ( $\tau$ ) времени жизни флуоресценции:  $\Phi_F = \tau/\tau_0$ .

• Самым простым и наиболее широко применяемым методом определения квантового выхода является относительное сравнение эмиссионного спектра обнаруживаемого соединения, молекулы  $x$ , с эмиссионным спектром эталонной молекулы (например, сульфата хинина), абсолютный квантовый выход которой уже установлен (см. Eaton D.F., J.Photochem. Photobiol., 1988, v.2, p.523 — 531). Сначала определяются пересечения двух соответствующих спектров поглощения — облучение на этой длине волны гарантирует идентичное поглощение (при этом их аддитивные поглощения должны быть меньше, чем  $A = 0,05$ ). Соотношение площадей под обоими эмиссионными спектрами (откорректированными и представленными в шкале волнового числа — энергетической шкале) дает квантовый выход  $\Phi_F$ .

В таблице 6.1 приведены значения квантового выхода некоторых типичных флуорофоров, а также их оптимальные длины волн возбуждения и эмиссии.

Табл. 6.1. Длины волн поглощения и эмиссии и эффективность квантового выхода некоторых показательных молекул

Молекула	Растворитель, комментарий	Максимум поглощения (нм)	Максимум эмиссии (нм)	Квантовый выход флуоресценции (%)
Триптофан	pH 7, H <sub>2</sub> O	280	348	14
Тирозин	pH 7, H <sub>2</sub> O	274	303	21
Фенилаланин	pH 7, H <sub>2</sub> O	257	282	4
Люмифлавин	pH 7, H <sub>2</sub> O	450	540	34
Дансилхлорид	Ковалентная метка белков	330	510	10
Этидиум бромид	Флуоресцентный зонд нуклеиновых кислот	515	600	~100
Флуоресцеин	0,1 N NaOH	490	515	85
Хининдисульфат	0,1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250	461	55
Родамин В	Этанол	544	571	73
Антрацен	Этанол	252	400	30
Эозин	0,1 N NaOH	518	540	23
Хлорофилл а	Этанол	666	675	23
Тионин	0,1 N NaOH	598	621	2,5

## 6.5.4. Тушение флуоресценции

Безызлучательная релаксация состояния  $S_1$  может быть вызвана различными механизмами, приводящими к тушению флуоресценции (см. рис. 6.1). Это явление часто используется в флуориметрическом анализе. Так как различные факторы не одинаково воздействуют на все флуорофоры, то используется большое число специфических тушителей флуоресценции. Например, доступность определенного флуорофора можно проконтролировать отдельными специфическими тушителями. При этом возникает много вопросов. Погружен ли флуорофор во внутреннюю часть макромолекулы? Насколько точна его локализация в мембране? Насколько велика проницаемость мембраны тушителю? Чему равен коэффициент диффузии  $D$  флуорофора или тушителя? Молекулярная флуоресценция обычно тушится молекулярным кислородом, ксеноном, йодидом или атомами тяжелых металлов, так как они индуцируют переход  $S_1 \rightarrow T_1$  ( $k_{ИКК}$ ) в результате спин-орбитального связывания (см. рис. 2.12). Таким образом, кажущийся квантовый выход флуоресценции  $\Phi_F$ , контролируемый процессами тушения, служит обратным показателем иных путей дезактивации. Большому значению  $k_{пэ}$  соответствует меньшее значение квантового выхода флуоресценции (однако обратное утверждение не всегда верно, см. уравнение 6.33).

Уравнение 6.33 можно записать в следующем виде:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum k_i} \quad (6.34)$$

В присутствии тушителя  $Q$ , который взаимодействует с флуорофором с константой скорости тушения  $k$ , уравнение 6.34 будет иметь вид:

$$\Phi_Q = \frac{k_F}{\sum k_i + k[Q]} \quad (6.35)$$

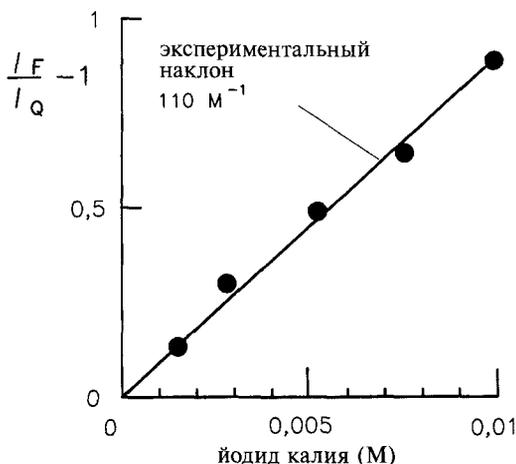
Очевидно, что происходит уменьшение квантового выхода. При  $t = 1/Sk_i$  отношение уравнений 6.34 и 6.35 будет иметь вид:

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_Q} = \frac{\sum k_i + k[Q]}{\sum k_i} = 1 + k \times [Q] \times \tau \quad (6.36)$$

Для упрощения квантовый выход не измеряется сам по себе, а сразу измеряется отношение интенсивностей флуоресценции без ( $I_F$ ) и с ( $I_Q$ ) тушителем. Вводя так называемую динамическую константу тушения флуоресценции:  $K \times [Q] = k \times \tau$ , получаем уравнение Штерна — Фольмера:

$$\frac{I_F}{I_Q} = 1 + K \times [Q] \quad (6.36)$$

График зависимости  $[(I_F/I_Q) - 1]$  от  $[Q]$  — прямая линия с наклоном  $K$ . Например, флуоресценция люмифлавина эффективно тушится йодидом. На-



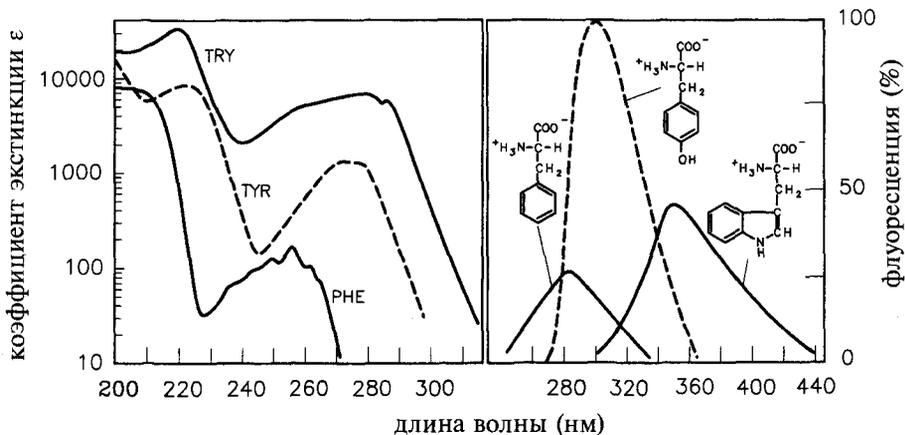
**Рис. 6.29.** В соответствии с уравнением Штерна — Фольмера, график зависимости  $[(I_F/I_Q)-1]$  от  $[Q]$  для тушения флуоресценции флавина йодидом выражается прямой линией с наклоном  $K = 110 \text{ М}^{-1}$

клон графика Штерна — Фольмера  $K$  (см. рис. 6.29) составляет  $K = 110 \text{ М}^{-1}$ . Используя известное время жизни флуоресценции  $\tau = 5 \times 10^{-9} \text{ с}$ , получаем:  $k = 22 \times 10^9$ , указывающее на то, что тушение флуоресценции контролируется диффузией. Произведя аналогичные вычисления для флавина, связанного с мембраной (см. рис. 6.20), получаем константу тушения в 500 раз меньше, что свидетельствует о том, что мембрана эффективно защищает флавинов от внешних воздействий.

## 6.6. Отдельные приложения

### 6.6.1. Редкоземельные элементы и актиноиды

Флуориметрический анализ неорганических веществ весьма ограничен. Единственными веществами, которые флуоресцируют в растворах, являются ионы редкоземельных элементов, таких как церий, празеодимий, неодимий и вплоть до лютетия. Однако больший коммерческий интерес представляют актиноиды типа тория, протактиния или урана. Поверхностное объяснение их флуоресценции заключается в том, что у них запрещена безызлучательная релаксация. Но почему? Если мы рассмотрим строение электронных оболочек этих элементов, то увидим, что у них постепенно заполняются  $f$ -оболочки лежащего внутри электронного уровня, а вышерасположенный уровень ксенонового типа с  $5s$ - и  $5p$ -электронами уже заполнен (см. рис. 2.9 и Приложение 2), что защищает  $f$ -электроны от внешнего влияния. Значительный интерес представляют флуоресцентные свойства хелатов редкоземельных элементов, отличающихся узостью спектров эмиссии со значительным Стоксовым сдвигом ( $> 200 \text{ нм}$ ), длительными временами жизни люминесценции — до 1 мс и отсутствием зеркального характера флуоресцентного спектра и спектра поглощения. Это все объясняется низкорасположенными  $f$ -атомарными уровнями, которые возбуждаются



**Рис. 6.30.** Спектры поглощения (слева, логарифмический масштаб) и спектры флуоресценции (справа) трех флуоресцирующих аминокислот: триптофана, тирозина и фенилаланина (согласно Wetlauffer, *Advan. Protein Chem.* 1962, 17, 303 и Teale, Weber, *Biochem.J.* 1957, 65, 476)

при внутримолекулярном переносе энергии с более высоко расположенных уровней триплетного состояния лиганда, образующегося в результате ин-теркомбинационной конверсии.

### 6.6.2. Белки

Помимо хромофорных групп (например, гем, флавин, ретиналь и фитохром), имеющих во многих белках, все без исключения белки обладают флуоресценцией в УФ области, которая обусловлена наличием в них остатков ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана (см. таблицу 6.1). Их спектры поглощения и флуоресценции представлены на рис. 6.30. Максимум поглощения фенилаланина находится на длине волны 250 нм, при этом у него очень маленький коэффициент поглощения и квантовый выход флуоресценции, поэтому он не имеет большого аналитического значения. В основном, поглощение и флуоресценция белков обусловлены тирозином и, особенно, триптофаном. Важное аналитическое значение имеет тот факт, что при длине волны возбуждения свыше 295 нм наблюдается практически флуоресценция одного триптофана (тирозин слабо поглощает на этих длинах волн).

### 6.6.3. Метки и зонды

Собственная флуоресценция клеток и тканей часто слабая, сложная и довольно неспецифическая. Она обусловлена наличием нуклеиновых кислот<sup>1</sup>, белков или продуктов метаболизма, таких как порфирины, а также

<sup>1</sup> Прим. редактора: в обычных условиях нуклеотиды и нуклеиновые кислоты не флуоресцируют; исключение составляет тРНК из дрожжей, содержащая так называемое Y-основание, интенсивно флуоресцирующее вблизи 470 нм

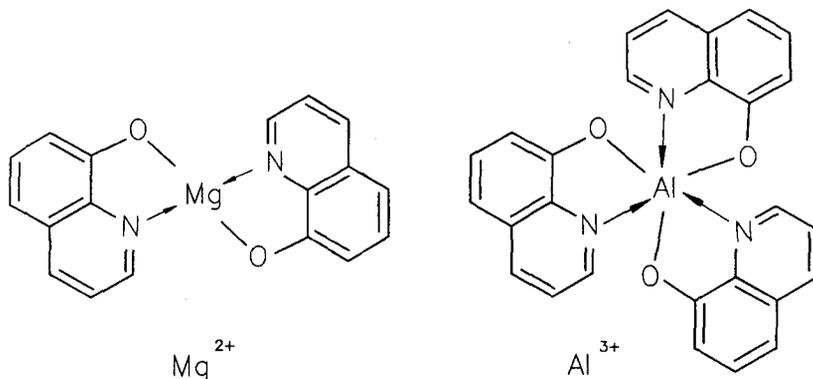
наличием пигментов и коферментов. Последние очень важны, так как они вовлечены в определенные метаболические процессы, и флуоресценция отражает их функциональное состояние. Например, аутофлуоресценция многих клеток при возбуждении голубым или близком к ультрафиолету светом вызвана, в зависимости от состояния их окисления, НАД-Н, флавинами и птеринами. Нарушение обмена веществ, например, в дыхательной цепи митохондрий, приводит к меньшей степени окисления НАД-Н и, следовательно, к возрастанию интенсивности флуоресценции.

Для более четкого выявления определенных клеточных участков или органелл используются так называемые флуоресцентные маркеры (метки). Например, для мечения клеточных ядер и лизосом используется акридин оранжевый, митохондрий — родамин 123 и карбоцианины, а для исследования мембран — 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС). В иммунофлуоресценции часто используются красители флуоресцеинового и родаминового ряда (ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцианат, ТРИТЦ — тетраметилродаминизотиоцианат). Они ковалентно соединяются с антителами или антигенами, что позволяет производить мониторинг высокоспецифических реакций антиген-антитело. Чувствительность обнаружения этих меток в благоприятных обстоятельствах может достигать концентраций  $10^{-18}$  М. Для специфического количественного обнаружения ферментов применяются флуорогенные субстраты, молекула которых состоит из двух частей: способной к флуоресценции, например, 4-метилумбеллферона (МУФ), и другой, являющейся субстратом для определенного фермента, например, фосфата или ацетата. В таком виде она, однако, не флуоресцирует, но в результате ферментативного расщепления флуороген высвобождается, и возникает флуоресценция, интенсивность которой пропорциональна количеству присутствующего фермента. В настоящее время существует множество коммерчески доступных наборов для обнаружения большого числа практически значимых ферментов.

#### 6.6.4. Хелаты

Широко используется обнаружение металлов флуориметрическим методом с помощью хелатирующих агентов. Обычно они имеют две функциональные группы, одна из которых представляет подвижный атом водорода, а вторая — неподеленную пару электронов. Эти группы должны иметь правильную пространственную структуру, чтобы образовывать 5- или 6-членные циклы с металлом. Имеются тысячи подобных комплексообразующих агентов и достаточно много обладающих весьма большой специфичностью по отношению к определенным металлам.

Классическими примерами являются морин для определения бериллия и алюминия ( $\lambda_{возб} = 420$  нм,  $\lambda_{эм} = 525$  нм) или 8-гидроксихинолин (оксин), образующий комплексы с различными металлами. Комплексы этого лиганда с магнием (плоская структура) и алюминием (октаэдр) нейтральны (рис. 6.31). Для лучшей растворимости комплексов в воде в положение 5 вводится сульфогруппа. При образовании цикла увеличивается жесткость и размер хромофора, что приводит к возрастанию



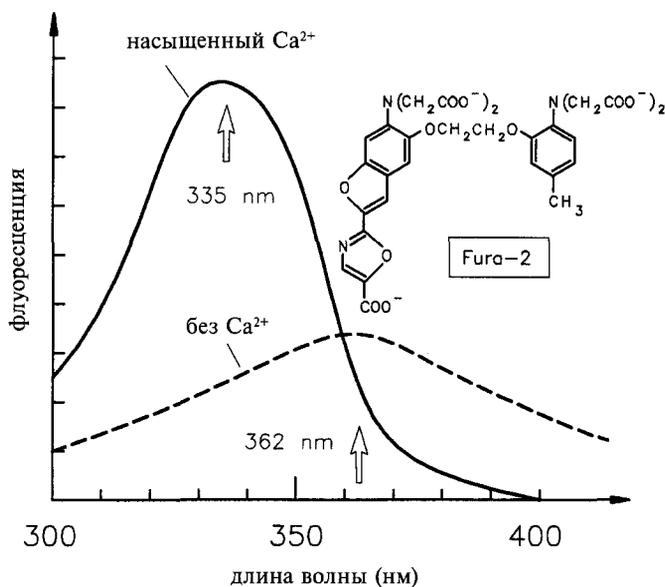
**Рис. 6.31.** 8-гидроксихинолин используется в различных областях аналитической химии, таких как гравиметрия или колориметрия. Он образует комплексы с рядом металлов, таких как ионы магния (плоская структура) или алюминия (октаэдр). При образовании цикла увеличивается жесткость и размер хромофора, что приводит к возрастанию коэффициента поглощения  $\epsilon$  комплекса. С другой стороны, неподеленная пара электронов акцептируется ионом металла, и это делает невозможным вероятность  $n \rightarrow \pi^*$  перехода на нижележащий уровень, и комплекс становится флуоресцирующим

коэффициента поглощения  $\epsilon$  комплекса. С другой стороны, неподеленная пара электронов акцептируется ионом металла, и это делает невозможным вероятность  $n \rightarrow \pi^*$  перехода на нижележащий уровень, и комплекс становится флуоресцирующим.

### 6.6.5. Определение кальция

Был разработан целый ряд меток для определения внутриклеточного кальция, играющего роль посредника во многих биохимических процессах. Одним из наиболее употребляемых меток является ФУРА II. Эта молекула состоит из двух частей: тетракарбоксилированного хелатора типа ЭДТА и интенсивно флуоресцирующего стильбена<sup>1</sup> (ср. с рис. 6.10). При связывании с ионом  $\text{Ca}^{2+}$  максимум поглощения комплекса гипсохромно смещается с 362 до 335 нм (см. рис. 6.32), тогда как максимум эмиссии смещается всего на 7 нм — с 512 до 505 нм. Специфичность к  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с  $\text{Mg}^{2+}$  весьма высока. Константа диссоциации при ионной силе 0,1 составляет для магния 6 мМ, а для кальция — 200 нМ. Для определения  $[\text{Ca}^{2+}]$  измеряют интенсивность флуоресценции на длине волны 510 нм при длине волны возбуждения 340 и 380 нм. Соотношение соответствующих сигналов флуоресценции вместе с известными коэффициентами поглощения и квантовыми выходами (0,33 для комплекса и 0,27 для несвязанной молекулы) позволяют определить концентрацию кальция. Мы не будем здесь вдаваться в подробности определения, а отошлем читателя к оригинальной работе (Grynkiewicz et al., J. Biol. Chem., 1966, v.6, p.3440).

<sup>1</sup> Прим. редактора: эта молекула содержит не стильбеновый (этилендифенильный), а оксазолилбензофурановый хромофор

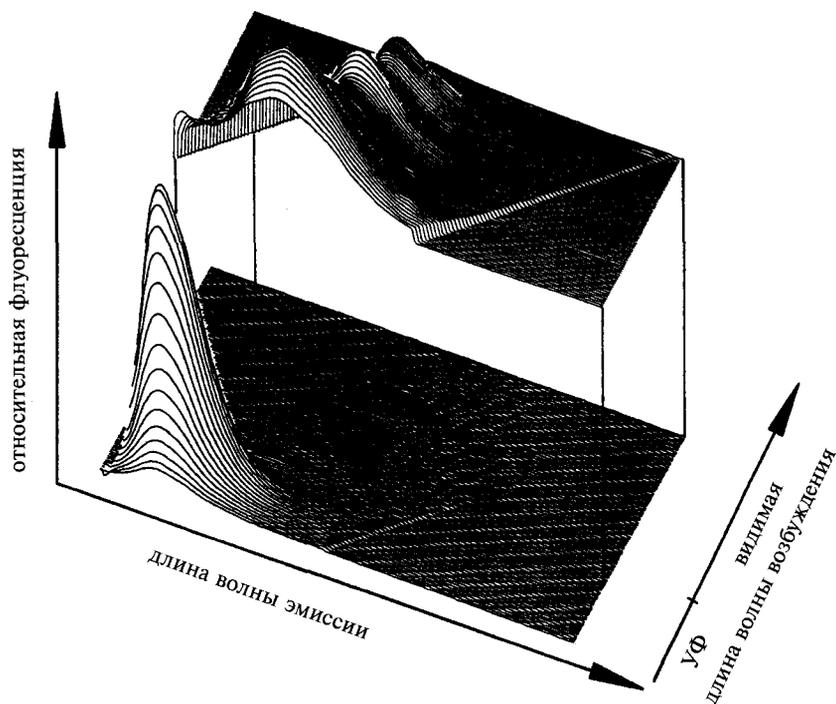


**Рис. 6.32.** Определение внутриклеточного кальция с помощью ФУРА II. При комплексообразовании с  $\text{Ca}^{2+}$  спектр возбуждения метки смещается с 362 нм до 335 нм. Это позволяет проводить количественное обнаружение кальция

### 6.6.6. Суммарная флуориметрия

В флуоресцентной спектроскопии обычно изменяют длины волн возбуждения и эмиссии, и соответствующие спектры называются спектрами возбуждения и эмиссии (или для краткости — спектрами флуоресценции). Чтобы получить полную спектральную информацию о смеси многих флуоресцирующих компонентов, следует поэтапно изменять длину волны возбуждения и каждый раз измерять соответствующий спектр эмиссии. Все длины волн возбуждения и эмиссии отображают затем в ортогональной  $x$ - $y$  системе координат. Эмиссионные сигналы изображаются контурными линиями или трехмерным (3D) образом (см. рис. 6.33). Таким способом для каждого образца получают характерный спектральный «ландшафт».

При рутинных измерениях такого типа большинство обычных флуориметров не эффективны, так как измерения одного суммарного спектра на них продолжались бы несколько часов. Спектральное разрешение подобных суммарных спектров не столь важно, поэтому для таких измерений применяются специальные спектрометрические системы, основанные на простом принципе. Во-первых, с помощью призмы формируется спектрально разрешенный «верный» многоспектральный источник света. Этот свет направляется на кювету с образцом. Затем вторая призма, расположенная под прямым углом к первой призме, диспергирует эмиссионный свет, излучаемый из различных точек кюветы (различных длин волн возбуждения). Таким образом получается требуемое двухмерное спектральное распределение, где каждая точка содержит



**Рис. 6.33.** Полный флуоресцентный спектр сыворотки человека в фосфатном буфере в трехмерной системе координат. Интенсивность флуоресценции в видимом спектральном диапазоне представлена с 800-кратным увеличением в верхней части изображения (6,7 ммоль/л, рН 7,4, воспроизведено из Leiner M.J.P., Wolfbeis O.S., Time-resolved Laser Spectroscopy in Biochemistry, Proc.SPIE, 1988, 909)

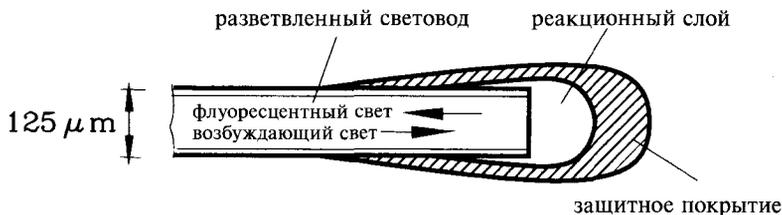
информацию об интенсивности флуоресценции. И наконец, в системе применяется специальный детектор пространственного разрешения, например, обычная ССD-камера, и получается требуемое трехмерное представление флуоресценции образца в виде матрицы возбуждение-эмиссия (ВЭМ). Требуемая корректировка на нелинейность дисперсии призм, спектральной чувствительности лампы и камеры производится с помощью встроенного компьютера. На рис. 6.33 представлен суммарный спектр флуоресценции сыворотки человека в фосфатном буфере в трехмерной системе координат.

### 6.6.7. Флуоресцентные сенсоры

Химические сенсоры позволяют производить непрерывное и автоматическое измерение химических параметров в режиме реального времени и широко применяются в науке, медицине и промышленности. В идеальном случае не требуется проводить пробоотбор и предварительную подготовку образцов. Помимо классических электродных сенсоров для измерения кислорода, рН или ионов различных металлов все большее

применение находят так называемые оптоды или оптроды. В отличие от первых они измеряют не электрический, а как следует из их названия, оптический сигнал. Благодаря большей чувствительности по сравнению с абсорбционными гораздо более важны флуоресцентные измерения. Различают два типа оптродов. Первый тип представляет просто световод (определенной длины, диаметра и материалов). С его помощью могут быть измерены, например, флуоресцирующие соединения урана, находящиеся, вследствие своей радиоактивности, на отдаленном и недоступном расстоянии, или ИК поглощение метана в полостях горных пород, или флуоресценция НАД-Н в биореакторах. Во втором типе флуоресцентных сенсоров на оптоволокно наносят специфический индикатор или фермент. Подобный оптрод может оптически контролировать реакции, возникающие при его погружении в реакционный сосуд, содержащий вещества, способные вступать в специфические реакции в присутствии компонентов оптрода.

К сожалению, многие представляющие интерес вещества не поглощают и не флуоресцируют в видимой, наиболее легко контролируемой, области. В этом случае для их анализа применяют колориметрию, основанную на индикационной химии. Практически для всех определяемых веществ, например в биохимии или при анализе окружающей среды, можно найти реагенты, образующие обратимые, специфически окрашенные и/или флуоресцирующие продукты, что позволяет производить количественное обнаружение (см. фотометрический анализ Lange-Verjédek, Verlag Chemie, 1980). Типичным примером является оптод на молекулярный кислород. Принцип его действия основан на тушении молекулярным кислородом флуоресценции индикаторного флуорофора, заполимеризованного, например, в силиконовую матрицу. Полимер находится на одном (дистальном) конце стеклянного оптоволокна, которое является проводником возбуждающего и эмитируемого света (см. рис. 6.34). Такие сенсоры используются для измерения кислорода в очень тонких кровеносных сосудах. В таблице 6.2 приведены примеры принципов функционирования и диапазонов определения некоторых веществ посредством оптодов.



**Рис. 6.34.** Кислородный оптод, основанный на тушении флуоресценции ряда флуорофоров молекулярным кислородом. Индикатор растворен в полимере типа силиконовой смолы и нанесен на конец (здесь очень тонкий) оптоволокна, проводящего возбуждающий и эмитируемый свет. Помимо реакционного слоя имеется тонкий защитный слой, предохраняющий от механических повреждений. (согласно Wolfbeis O.S. Optical Fiber Sensors, Springer, Berlin, 1989)

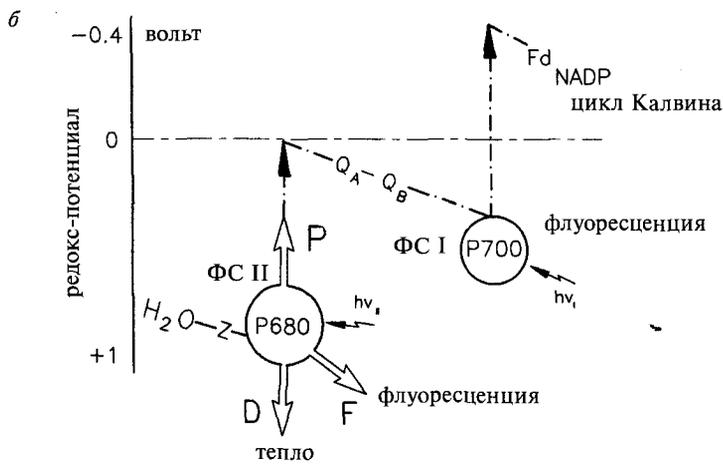
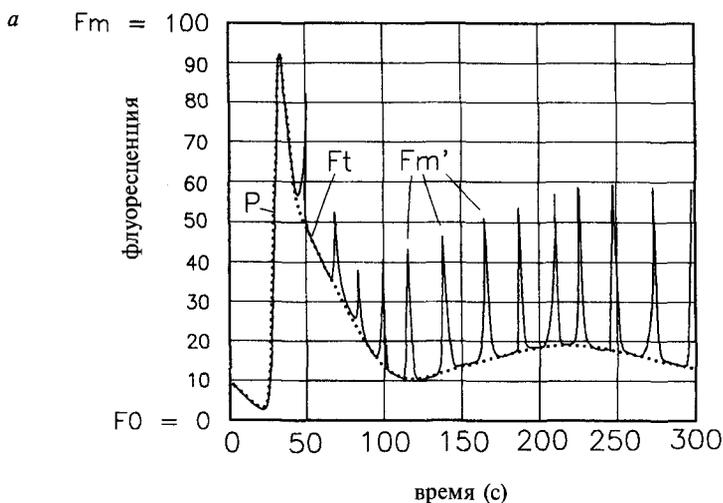
Табл. 6.2. Примеры оптодов, их принципы детектирования, назначение и диапазоны измерения

Определяемые молекулы	Принцип детектирования	Диапазон измерения
Кислород	Тушение флуоресценции Тушение фосфоресценции	0,5—300 Торр 0,0005—0,1 Торр
CO <sub>2</sub>	Измерение pH во внутреннем буфере	0,5—100 Торр
SO <sub>2</sub>	Тушение флуоресценции	0,007—5%
Токсичные газы	Поглощение в видимом диапазоне	0,01—5%
Ионы натрия и калия	Хромоинонофоры	1—100 ммоль/л
Галогены	Тушение флуоресценции	20—200 ммоль/л
Нитраты	Ионная коэкстракция	5—100 мг/л
Глюкоза	Ферментный, на потреблении кислорода	1—30 ммоль/л
Водород	Интерферометрический	0,0005—0,2%

### 6.6.8. Импульсный амплитудно-модулирующий флуориметр (ИАМ)

Фотосинтез, т.е. синтез углеводов из воды и CO<sub>2</sub> под воздействием света в растениях, — ключевой процесс жизни. Поколения биологов изучали фотосинтез посредством манометрии Варбурга и позже — с помощью кислородных электродов. Сопутствующая фотосинтезу флуоресценция хлорофилла скорее имеет свое происхождение из фотосистемы II (ФС II), чем из фотосистемы I (ФС I) (см. рис. 6.35, б), и первоначально рассматривалась как вспомогательная. Однако с развитием теории и систем измерения флуоресценции хлорофилла, существенно прогрессирувавших в последние десятилетия, и сопутствующим упрощением подготовки образца, измерения газового обмена все в большей степени отходят на второй план. В настоящее время все более доминирующими становятся так называемые импульсные амплитудно-модулирующие флуориметры (ИАМ), разработанные Шрайбером в университете Вюрцбурга (Германия) и производимые фирмой Walz в Эффельтрихе, (Германия). Существует простое и четкое соотношение между флуоресценцией хлорофилла и эффективностью преобразования энергии в фотосинтезе: 100% полученной световой энергии = флуоресценция + фотохимия + тепло или для краткости:  $E = F + P + D = 1$  (или 100%,  $D$  — диссипация или тепло).

В этом уравнении три неизвестных, среди которых особый интерес представляет фотохимия  $P$ , т.е. преобразование энергии света в биохимический/биофизический эквивалент. Если мы сможем определить  $F$  (флуоресценцию) и  $D$  (диссипацию), то можно вычислить  $P$  (фотохимию). Именно это и можно получить с помощью ИАМ флуориметра.



**Рис. 6.35.** *a* — кинетика индуцированной модифицированной флуоресценции (эффект Каутского), измерения которой производились ИАМ флуориметром.  $F_0$  — исходная незначительная флуоресценция адаптированного к темноте образца;  $P$  — максимум флуоресценции в течение индуцирования флуоресценции;  $F_t$  — функциональная зависимость флуоресценции от времени;  $F_m$  — максимальная флуоресценция, вызываемая импульсами насыщенного красного света;  $F_f$  — конечная асимптотическая флуоресценция. *б* — типичная Z-схема фотосинтеза, показывающая перенос электрона через две связанные фотосистемы и энергетические соотношения. *In vivo* флуоресценция хлорофилла генерируется в основном фотосистемой II (ФС II)

Если облучить (как в классическом флуориметре) адаптированное к темноте фотосинтетически активное растение, возникнет замечательное явление «индукции флуоресценции» (эффект Каутского, см. рис. 6.35, *a*). С включением постоянного фотосинтетически активного красного света

флуоресценция  $F$  возрастает в течение 1–2 с от начального значения ( $F_0$ ) до максимума  $P$ , а затем начинает спадать определенным образом в минутной временной шкале до низшего уровня ( $F$ ): — фотосинтетический аппарат активен в темноте лишь частично. Следовательно, электроны не могут переноситься так же быстро, как это происходит при их переносе ФС II из воды. Когда спустя 1–2 с после облучения красным светом становятся активными темновые реакции, электроны снова в возрастающей степени покидают ФС II, и флуоресценция медленно снижается до низкого стабильного уровня. В сущности, кинетика Каутского зеркально отражает выстраивание градиента протона сквозь тилакоидную мембрану и сопровождающую это диссипацию энергии. Если при этом, в соответствии с идеей Шрайбера, в добавление к постоянному свету осуществлять облучение очень короткими (3 500 — 10 000 мкЕ/м<sup>2</sup> с) насыщающими импульсами красного света ( $P = 0$ ) с частотой следования 20 с, то на выходе будут фиксироваться максимальная флуоресценция и теплорассеяние. По полученным данным измерений можно вычислить фотохимический квантовый выход  $P$  ФС II по формуле:

$$P = 1 - F - D = 1 - F - F \frac{1 - F_m}{F_m} = \frac{\Delta F}{F_m}$$

## 6.7. Фосфоресценция

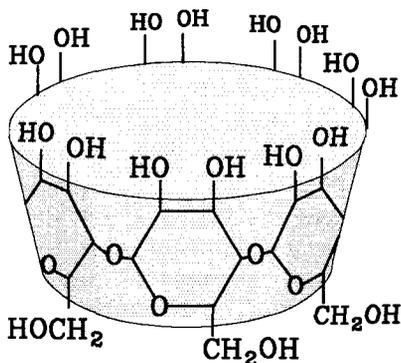
В принципе аналитические результаты флуоресценции и фосфоресценции сравнимы. Однако вследствие запрещенного по спину перехода  $T_1 \rightarrow S_0$  так называемое собственное время жизни состояния  $T_1$  (т.е. время жизни, не сниженное внешними воздействиями, например тушителями) составляет примерно от нескольких миллисекунд до нескольких секунд, так что большинство молекул не фосфоресцируют при комнатной температуре и в растворах, т.е. при столкновениях они релаксируют безызлучательно.

Были разработаны различные методы, препятствующие преждевременной безызлучательной релаксации первого триплетного состояния:

- Охлаждение образца (обычно до  $-196^\circ$ , жидкий азот).
- Внедрение фосфоресцирующих молекул в мицеллы или в полостную структуру типа циклодекстрина.
- Иммобилизация в фиксированной матрице типа ацетата натрия, полиакриловой кислоты или просто бумаге.

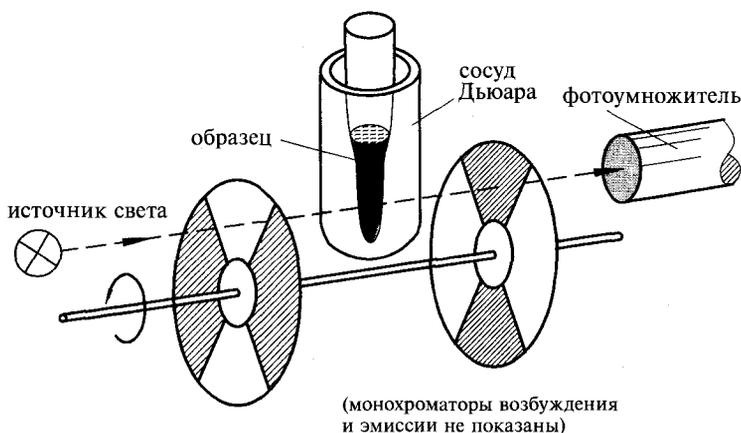
Наиболее простым и широко применяемым методом для стимулирования фосфоресценции ионов органических веществ при комнатной температуре действительно является адсорбция на фильтровальной бумаге. В этом методе основную роль играют водородные связи гидроксильных групп бумаги: при их разрушении силилированием фосфоресценция падает более чем на 90%.

Фосфоресценция измеряется так называемыми фосфороскопами. Образец облучается последовательностью световых импульсов, а измерения производятся в темновых промежутках между импульсами. В классическом фосфороскопе Беккереля это достигается использованием двух механически связанных вращающихся дисков (см. рис. 6.37). В модификации такого



**Рис. 6.36.** Структура полости циклодекстрина, в которую внедряется фосфоресцирующая молекула, что позволяет наблюдать фосфоресценцию даже при комнатной температуре

фосфороскопа образец помещается в цилиндр, который вращается вокруг своей оси. Облучающая лампа и детектор расположены ортогонально друг другу и радиально оси вращения. Отверстие в корпусе цилиндра открывает поочередно путь свету от лампы, который попадает на образец, и от образца на фотодетектор. Скорость вращения подбирается в зависимости от времени жизни фосфоресценции. В настоящее время в фосфороскопах применяют импульсные источники света, перекрывающие большой частотный диапазон, в основном импульсные лазеры или светоэмитирующие диоды (СЭД) определенных длин волн. Измерение производится в темновой период между импульсами, что позволяет исключить какие-либо механически вращающиеся детали. Фотодетекторы следует защищать от возбуждающего света (помните: большинство блокирующих фильтров обладает собственной фосфоресценцией!).

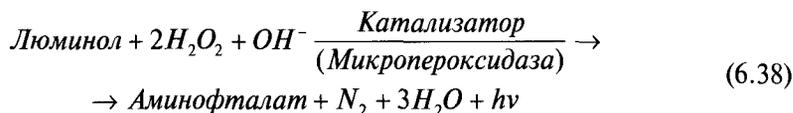


**Рис. 6.37.** Схема классического фосфороскопа Беккереля. Образец помещается в сосуд Дьюара. Благодаря использованию в конструкции вращающихся заслонок происходит прерывистое возбуждение образца светом, а фосфоресценция измеряется в темных промежутках, когда свет на образец не попадает

## 6.8. Хеми- и фотобиолуминесценция

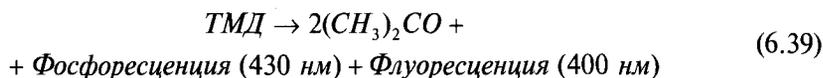
### 6.8.1. Хемилуминесценция

При протекании интенсивных экзотермических реакций возникает хемилуминесценция возбужденных молекул, которые являются также хорошими флуорофорами (см. главу 6.2). Основным свойством всех люминесцентных методов является их высокая чувствительность по сравнению с другими аналитическими процедурами. Например, пределы определения АТФ и НАД-Н лежат в диапазоне фемтомолей, а пероксида водорода — в диапазоне наномолей. С одной стороны, это достигается использованием фотоумножителей, а с другой стороны, это зависит от квантового выхода флуоресценции флуорофоров. Различают три основных метода образования хемилуминесцентного сигнала: (1) окисление субстрата молекулярным кислородом; (2) перенос электронов; (3) фрагментация. Наиболее интенсивные хемилуминесцентные реакции связаны с разложением пероксидов. Большое применение в анализе находит реакция люминола с пероксидом водорода:



где в качестве меток могут служить либо люминол (в подходящей модифицированной форме), либо пероксид.

Многие такие реакции включают экзотермическое разложение промежуточных диоксетанов (так называемый механизм МакКапра). При нагревании тетраметилдиоксетан проявляет слабую хемилуминесценцию, которая, однако, существенно возрастает благодаря переносу энергии на флуорофор (усилитель). Существует ряд хорошо изученных и аналитически важных механизмов хемилуминесценции, в которые вовлечен промежуточный диоксетан. Например, термолитическое разложение тетраметил-1,2-диоксетана (ТМД), разлагающегося с 0,5% эффективностью до синглетного ацетона и с 50% эффективностью до триплетного ацетона, сопровождается одновременно и флуоресценцией, и фосфоресценцией:



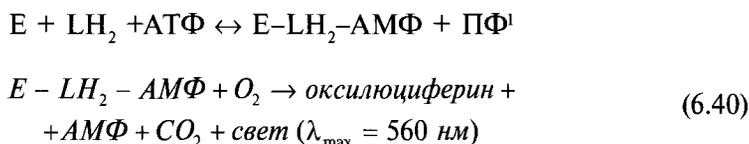
### 6.8.2. Биолуминесценция

С механистической точки зрения, биолуминесценция является одним из видов хемилуминесценции. Для анализа в биохимии, фармакологии и в большинстве биотехнологий часто используется природная биолуминесценция жуков-светлячков и бактерий. В данной главе будут рассмотрены наиболее важные применения биолуминесценции. Во всех случаях это так называемое катализируемое ферментом люциферазой окисление молеку-

лярным кислородом субстрата люциферина (реакция с выделением энергии и света).

### 6.8.2.1. БиOLUMИнесценция жуков-светляков

Обычно определение АТФ/АТФазы происходит в диапазоне концентраций от  $10^{-6}$  до  $10^{-13}$  М. Для обнаружения присутствия бактерий, т.е. признаков жизни в межпланетном пространстве, NASA декларировало предел чувствительности  $2 \times 10^{-17}$  М. Основой для этого является люциферин ( $\text{LH}_2$ )/люциферазная (Е) система американского жука-светляка *Photinus pyralis*. Цепочка реакций с АТФ приводит к эмиссии света:

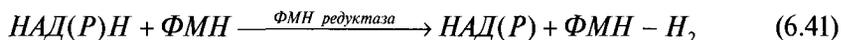


Интенсивность света прямо пропорциональна концентрации АТФ. Период полураспада этой реакции равен всего лишь нескольким секундам. Существенный коммерческий успех был достигнут модификацией этой реакции в направлении замедления падения интенсивности света; что упростило измерения. На сегодняшний момент доступны многочисленные наборы на основе люциферин/люциферазных реакций.

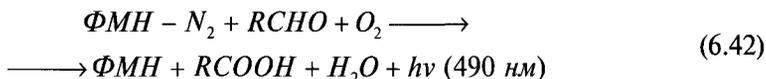
### 6.8.2.2. Бактериальная биOLUMИнесценция

Другая люциферин/люциферазная система было выделена из некоторых океанских бактерий. В принципе механизм получения света такой же, как в предыдущем случае. При прохождении ряда последовательных реакций НАД(Р)-Н определяется в диапазоне от  $10^{-7}$  до  $10^{-11}$  М, а при использовании азотного лазера — даже в более низких концентрациях. Следовательно, флуориметрическое определение НАД(Р)-Н в 1 000—10 000 раз чувствительнее, чем в фотометрическом методе.

Сначала восстанавливается флавиномононуклеотид (ФМН):



Затем он вновь окисляется с участием алифатического длинноцепочечного альдегида, в котором как минимум 8 атомов углерода, и с эмиссией света:

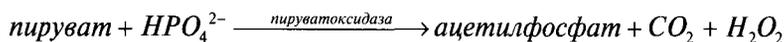
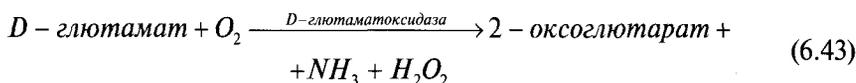
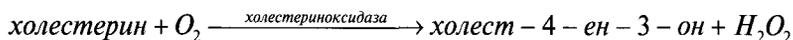
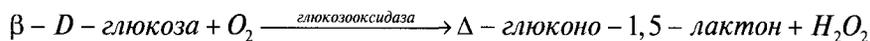


<sup>1</sup> Прим. редактора: АТФ — аденозинтрифосфат, АМФ — аденозинмонофосфат, ПФ — пиррофосфат

Именно с этой реакцией связано прогоркание жира. Этот процесс всегда сопряжен с образованием длинноцепочечных альдегидов, стехиометрически необходимых для протекания подобных реакций.

### 6.8.2.3. Катализируемые ферментами системы, продуцирующие пероксид водорода

Пероксид водорода генерируется при целом ряде реакций, катализируемых ферментами-оксидазами:



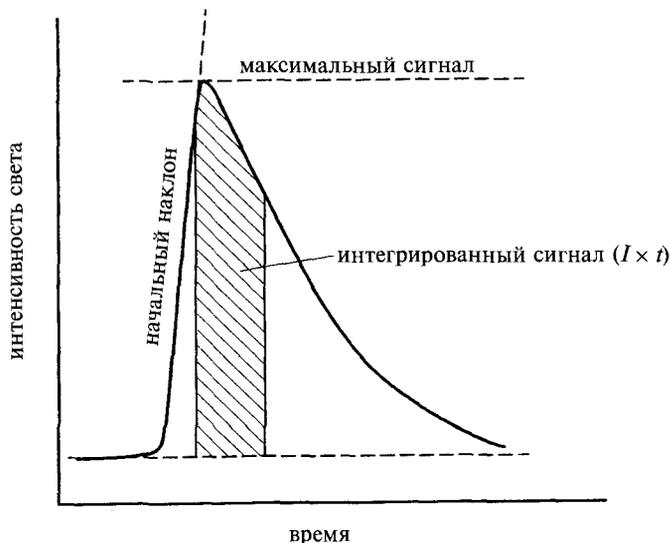
Пероксид водорода, в свою очередь, может быть определен затем методом, описанным в главе 6.8.1.

### 6.8.2.4. Приборы и оборудование

За многие годы разработано достаточное количество более или менее усложненных люминометров. Есть очень простые, портативные, работающие от батарей, предназначенные для работы в полевых условиях, а есть более сложные термостатически контролируемые, с автоматическим вводом образца, проточными кюветами и микрокомпьютерным интерфейсом. Но даже самый простой прибор работает в двух режимах измерения: (1) максимальной эмиссии света и (2) интегрированной эмиссии света. В последнем режиме излученный свет интегрируется в течение 5—60 с. Иногда определяется скорость первоначального возрастания излучаемого света (начальный наклон кривой интенсивности, см. рис. 6.38). Абсолютный предел обнаружения хемилюминесценции ограничен темновым током фотоумножителя, все еще остающегося наиболее чувствительным фотодетектором. Темновой ток можно снизить охлаждением фотоумножителя. Сигнал вблизи предела обнаружения будет строго линейным.

### 6.8.2.5. Сверхслабая люминесценция

Если излучается только несколько фотонов в секунду, хеми- и биолюминесценция называется *сверхслабой люминесценцией*. Для ее регистрации



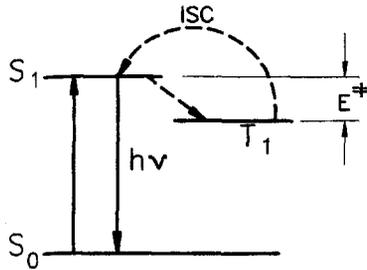
**Рис. 6.38.** Люминометры работают в двух режимах измерений: (1) максимальной световой эмиссии и (2) интегрированной световой эмиссии. В последнем режиме излученный свет интегрируется в течение 5—60 с ( $I \times t$ ). Иногда определение проводят по начальному возрастанию кривой эмиссионного света

применяется наиболее чувствительный метод счета единичных фотонов (см. рис. 6.26). Неудивительно, что при такой чувствительности возможно обнаружение крайне слабой люминесценции таких природных образцов, как клетки, ткани, суспензии крови и прочие, и влияния на нее различных факторов (в том числе таких болезней как рак, диабет). Даже если сигналы могут нести ценную информацию, интерпретировать такие изменения люминесценции, естественно, очень сложно (Popp F.A., Biophotonen, Dr. Fisher Publisher, Heidelberg, 1976).

## 6.9. Замедленная люминесценция

### 6.9.1. Теоретические основы

Замедленной люминесценцией (замедленной флуоресценцией — ЗФ) называется такое излучение света возбужденными молекулами, которое длится более времени жизни короткоживущей флуоресценции  $\tau_0$  и которое иногда наблюдается в течение нескольких минут или даже часов. Различают два типа ЗФ. При E-типе ЗФ (как у эозина — молекулы, у которой этот тип люминесценции был открыт в 1930 г.), энергия с возбужденного  $T_1$ -состояния перетекает, вследствие потребления энергии активации  $E^*$ , обратно на  $S_1$ -состояние (см. рис. 6.39). ЗФ обладают молекулы, энергии активации которых составляют от 20 до 90 кДж/моль. Время жизни такой люминесценции соответствует времени жизни фосфоресценции, но спектр соответствует спектру флуоресценции. Так как процесс является мономолекулярным, то интенсивность замедленной



**Рис. 6.39.** При замедленной люминесценции  $E$ -типа электрон, после потребления энергии активации  $E^*$ , перескакивает с возбужденного триплетного состояния  $T_1$  обратно на возбужденное синглетное состояние  $S_1$ , и излучается типичный флуоресцентный свет, спектр которого соответствует спектру эмиссии флуоресценции

люминесценции пропорциональна интенсивности падающей световой энергии.

При втором типе замедленной люминесценции молекулы в  $T_1$ -состоянии образуют эксимер (синглет), одна из молекул которого пребывает в  $S_0$ -состоянии (основном), а другая — в  $S_1$ -состоянии (возбужденном), с которого и происходит излучение флуоресцентного света с ожидаемым спектром:

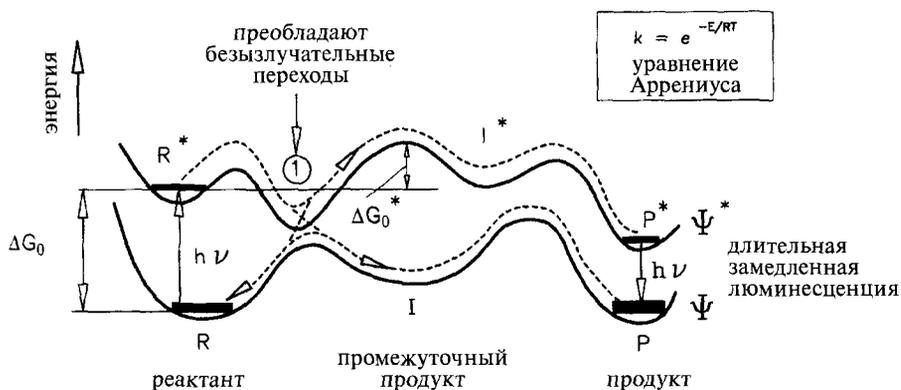


Время жизни ЗФ этого типа, в соответствии с бимолекулярной реакцией, равно половине времени затухания фосфоресценции, а интенсивность пропорциональна квадрату интенсивности падающего света  $I^2$  и сильно зависит от концентрации, а также от вязкости и температуры растворителя. Впервые этот тип ЗФ наблюдался в растворе пирена, поэтому Паркер и Хетчард назвали ее  $P$ -типом ЗФ.

Особый интерес для биологов представляет более сложный тип ЗФ, так называемая рекомбинационная люминесценция, которая образуется целыми молекулярными системами. Существуют три критерия возникновения люминесценции такого типа, основанные на понятии потенциальной поверхности (см. рис. 6.40):

- $\Delta G_0$  должно быть равно или больше  $hc/\lambda_m$ , где  $\Delta G_0$  описывает свободную энергию, а  $\lambda_m$  — максимально предельную длину волны возбуждения молекулы продукта;
- чтобы не было потерь энергии возбуждения за счет безызлучательных переходов, реакционный путь от исходной возбужденной молекулы  $R$  (реактанта) до молекулы  $P$  (продукта) должен быть весьма эффективным;
- квантовый выход флуоресценции  $\Phi$  продукта  $P$  должен быть адекватным, т.е. расстояние между обеими потенциальными кривыми должно быть достаточно большим.

Если последнее требование не выполняется, то остается возможность получения люминесценции с помощью интенсивно люминесци-

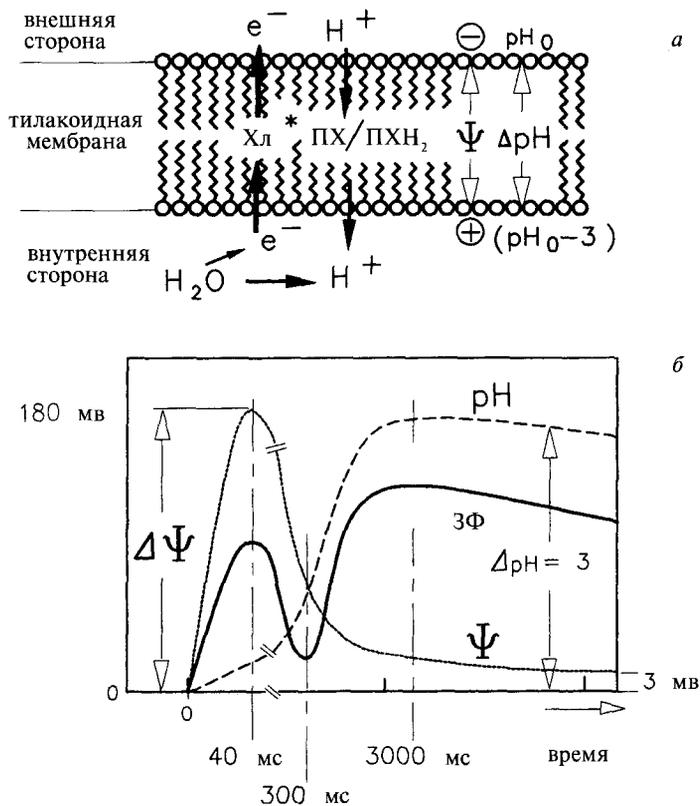


**Рис. 6.40.** Схема двумерной потенциальной диаграммы сложной системы, состоящей из поверхности основных состояний и более высокой поверхности первого возбужденного состояния, которые описываются волновыми функциями  $\Psi$  и  $\Psi^*$ . В системе существуют два стабильных состояния  $R$  (реактанта) и  $P$  (продукта), которые могут преобразовываться друг в друга в результате воздействия света. Световая энергия обеспечивает требуемую энтальпию реакции ( $G_0$ ) для перехода  $R \rightarrow R^*$ . Подпитка активирующей энергией ( $\Delta G_0$ ) от окружения преобразует систему через различные промежуточные продукты  $I^*$  в возбужденное состояние продукта  $P^*$ , из которого она релаксирует в основное состояние  $P$ , излучая при этом обычный флуоресцентный свет. Задержка эмиссии света определяется уравнением Аррениуса, которое содержит  $\Delta G_0$ . Квантовый выход люминесценции определяется безызлучательными переходами, которые возникают в случае, когда потенциальные поверхности  $\Psi$  и  $\Psi^*$  сближаются друг с другом (см. точку 1)

рующей молекулы (усилителя). В качестве таковых часто используют люциферин, 6-гидроксibenзотриазол или *n*-иодфенол. Мы часто имеем дело с замедленной люминесценцией, когда свет испускается с первого возбужденного состояния  $S_1$  молекулы — продукта  $P$ , даже если при этом иногда имеет место фосфоресценция (эмиссия с триплетного  $T_1$  состояния).

Рекомбинационную люминесценцию можно наблюдать, например, в фотосинтезирующих адаптированных к темноте организмах. При попадании кванта света в объединенные фотосистемы ФС II и ФС I происходит нормальный транспорт электрона — от электроположительного места ( $H_2O$ ) до электроотрицательного места (НАД-Р) в транспортной цепи электрона. Одновременно через тилакоидную мембрану выстраивается большой электрический и протонный градиент (положительный, несколько миллионов вольт/см и по крайней мере 3 единицы рН в кислотной области). Это приводит к незначительному обратному току вытекания (не «требуемого» природой). Хотя этого, конечно, нельзя заметить невооруженным взглядом, но можно обнаружить чувствительными фотоумножителями и контролировать кинетически. В течение первых секунд кинетика обнаруживает высокоструктурированную на-

чальную фазу, отражающую временной ход градиента электрического потенциала  $\Psi$  и следующего за ним градиента протона  $\Delta pH$  сквозь тилакоидную мембрану (см. рис. 6.41). В этом случае спектр флуоресценции существенно отличается от спектров быстрой флуоресценции, что исключает простую замедленную флуоресценцию Р- или Е-типа (Schmidt W., Senger H., Biochim. Biophys. Acta, 1987, v.890, p.15). Подобно индуцированной кинетике быстрой импульсной флуоресценции



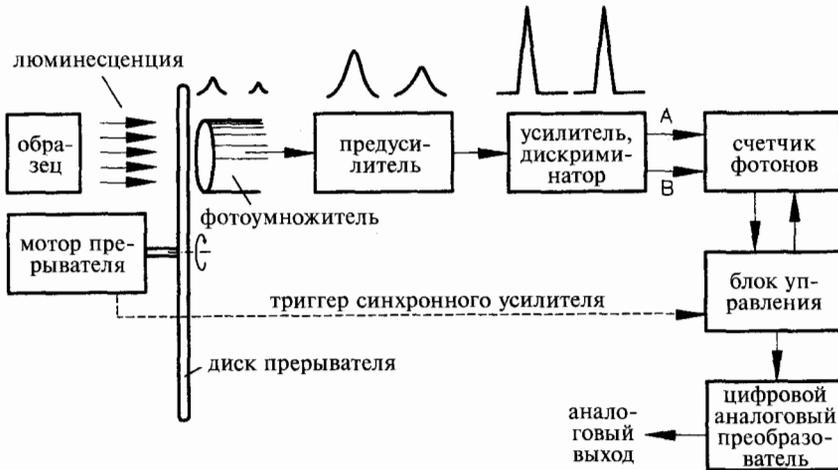
**Рис. 6.41.** а — запускаемый светом транспорт электронов и протонов через тилакоидную мембрану фотосинтезирующих организмов опосредован хлорофиллом (Хл). В результате этого возникают градиент электрического потенциала  $\Psi$  и градиент протона  $\Delta pH$  (ПХ = пластохинон); б — сложная временная зависимость индуцированной светом замедленной флуоресценции (ЗФ) фотосинтезирующих и адаптированных к темноте организмов объясняется наличием небольшого, но значимого реверсивного тока электронов через тилакоидную мембрану, сопровождающегося световой эмиссией. Измерения ЗФ адаптированных к темноте зеленых листьев растений проводились на лабораторном флуориметре с компьютерным управлением. Листья облучались в миллисекундном диапазоне прямоугольными импульсами красного света, а измерения люминесценции производились чувствительным к красному свету торцевым фотоумножителем в промежутках между импульсами света

(флуориметр ИАМ, гл. 6.6.8) кинетические измерения позволяют определять цепь транспорта электрона и жизнедеятельность отдельного растения. Аналогичным образом этот тип кинетики был успешно использован в качестве аналитического средства, контролирующего увядание леса (Schmidt W., Schneckenburger H., Photochem. Photobiol., 1995, v.62, p.745 — 750).

### 6.9.2. Технические требования

Причиной того, что метод замедленной люминесценции мало используется при исследованиях окружающей среды, вероятно, является его сложность, а также низкая интенсивность. Величина токов квантов света обычно составляет  $10^{-16}$  Е/см<sup>2</sup> с (для сравнения: дневной свет излучает  $\sim 10^{-10}$  Е/см<sup>2</sup> с). Из данного факта вытекают особые требования к аппаратуре измерения замедленной люминесценции. Обычные флуориметры недостаточно чувствительны даже для обнаружения  $10^7$  квантов/см<sup>2</sup> с (солнечный свет составляет  $10^{16}$  квантов/см<sup>2</sup> с). Спектрофотометры, предназначенные для измерения замедленной люминесценции, разделяются на два типа. Они значительно отличаются по чувствительности, цене и комплектации. Био- и хемилюминесценция измеряется относительно просто и недорого на основе простых спектрофотометров постоянного тока. Различными производителями выпускаются специальные модификации таких устройств, предел детектирования которых составляет  $10^5$  квантов в с. Даже если такие устройства не обеспечивают счета единичных фотонов, они достаточно чувствительны вследствие отсутствия фонового излучения. Образцы в таких люминометрах помещают в непосредственной близости от фотокатода фотоумножителя и после соответствующего усиления измеряется фототок. Если необходимо собрать свет, излучаемый в определенном спектральном диапазоне, то между образцом и фотоумножителем помещают соответствующие широкополосные фильтры с большим коэффициентом пропускания. Вследствие очень низких световых интенсивностей, применение сканирующих монохроматоров невозможно (за исключением спектрометров Фурье).

При сверхслабых световых сигналах (*сверхслабой люминесценции*) применяется метод *счета единичных фотонов*. При измерении биологических/медицинских образцов очень часто измерения искажает фоновая люминесценция, не имеющая отношения к самому образцу. Исключить ее позволяет проведение сравнительных измерений. Вращающийся прерыватель последовательно перекрывает свет между образцом и фотодетектором, что позволяет отдельно измерять эмиссию образца и фоновое излучение. Вычитание полученных сигналов даст исправленную интенсивность флуоресценции образца (см. рис. 6.42). Импульсы с фотоумножителя сначала усиливаются, нормализуются дискриминатором и окончательно усиливаются, после чего подсчитываются электроникой. Данный метод позволяет измерить очень слабый поток фотонов — до нескольких фотонов в секунду.



**Рис. 6.42.** Схема установки для измерения крайне малых потоков квантов света (метод *счета единичных фотонов, сверхслабая люминесценция*). Последовательность световых импульсов, исходящих от образца, последовательно перекрывается специальным механически вращающимся прерывателем и обнаруживается торцевым фотоумножителем. Это позволяет поочередно измерять неисправленную (общую) эмиссию образца и фоновое излучение. Далее, после усиления и дискриминации («единичного импульса»), отдельные сигналы обрабатываются и подсчитываются. Для получения исправленного значения интенсивности производится вычитание фонового сигнала из общего сигнала

### 6.9.3. Термолюминесценция

Замедленная люминесценция, возникающая под воздействием тепла, называется термолюминесценцией (см. рис. 1.1). Так называемые кривые свечения представляют зависимость термолюминесценции фотосинтезирующих организмов от температуры (см. Prafullachandra, Rurherford, 1986). Они получают следующим образом: (1) фотосинтетически активные организмы/образцы замораживают до температуры жидкого азота  $-196^{\circ}\text{C}$ , при этом они облучаются белым светом; (2) при последующем нагревании в темноте до  $60^{\circ}\text{C}$  в определенном температурном диапазоне фиксируется термолюминесценция — специфическая световая эмиссия определенных длин волн. Анализ полученных кривых позволяет получить ценную информацию о фотосинтетической цепи переноса электрона.

Термолюминесценция много лет успешно используется при определении возраста археологических образцов керамики и минералов. В результате таких исследований было выявлено множество подделок. Временной диапазон этого метода очень большой. Например, керамика эры викингов, расцвет которой был 900—1 000 лет назад, датируется очень точно. Особый интерес вызывает применение термолюминесценции для определения возраста более древних предметов (например, 50 000-летних), так как более обычный радиоуглеродный метод ( $^{14}\text{C}$ ) в этих случаях не дает удовлетворительных результатов.

Основа термолюминесцентного анализа очень проста. Все минералы имеют определенную кристаллическую структуру. В результате естественного радиоактивного облучения они становятся в определенной степени сами ионизованными, удерживая электроны в так называемых ловушках кристаллической решетки. В результате нагрева до нескольких сотен градусов Цельсия такие структуры расшатываются, приобретая колебательные степени свободы. Электроны становятся мобильными, как свободные электроны в решетке (более точно — в зоне проводимости), и снова попадают в ловушки так называемых *центров люминесценции* с или без излучения света. Центры люминесценции образуются такими ионами металлов, как  $\text{Ag}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$ , что и определяет термолюминесценцию. Следует отметить, что метод требует определенного технического навыка.

Наконец, следует упомянуть об успешном применении термолюминесценции при контроле качества продуктов питания. Во многих странах консервирование продуктов осуществляется радиоактивным облучением. Однако в некоторых странах, например, в Германии, это запрещено законом. И термолюминесцентный метод позволяет выявить продукты, которые подвергались радиоактивному облучению.

## 6.10. Дополнительная литература

Aitken, M.J. *An Introduction to Optical Dating: The Dating of Quaternary Sediments by the Use of Photon-Stimulated Luminescence*, Oxford University Press, Oxford, **1998**.

Bach, P.H., Reynolds, C.H., Clark, J.M. *Biotechnology Applications of Microinjection, Microscopic Imaging and Fluorescence*, Plenum, New York, **1993**.

Baeyens, W.R.G., de Keukaleire, D., Korkidis, K. eds., Marcel Decker, New York, **1991**.

Barnes, R.M., ed. *Emission Spectroscopy*, Dowden, Hutchinson & Ross, **1976** (a historically oriented, general application book of optical spectroscopic emission methods).

Boetter-Jensen, L. *Optically Stimulated Luminescence Dosimetry: Survey of Theory and Applications*, Elsevier Science, Amsterdam, **2003**.

Brand, L., ed., *Fluorescence Spectroscopy, Methods in Enzymology*, Vol. 278, Academic Press, New York, London, **1997**.

Brandl, H., Albrecht, S. *Experimentelle Chemolumineszenz und Biolumineszenz*, Hutling Verlag, Heidelberg, **1998** (in German).

Cundall, R.B., Dale, R.E. *Time Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology*, Plenum, New York, London, **1983**.

Deell, J.R., Toivonen, M.A. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, Kluwer Academic Publishers, **2003**.

Demas, J.N. *Excited State Lifetime Measurements*, Academic Press, New York, London, **1983**.

Demtröder, W. *Laser Spectroscopy*, Springer Verlag, Berlin, **1998** (general and comprehensive textbook, in German).

Dewey, T.G. *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York, **1991**.

- Dick, J.R. *Fluorescence*, University of Georgia Press, Atlanta, **2004**.
- van Dyke, K. *Luminescence Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL, **2001**.
- Garcia-Campana, A.M., Baeyens, W.R.G. *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, **2001**.
- Guilbault, G.G. *Practical Fluorescence*, 2nd revised edn., Marcel Dekker, New York, **1990**.
- Geddes, C.D. *Who's Who in Fluorescence 2004*, Plenum, New York, **2004**.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y.J. *Biol. Chem.*, **1966**, 6, 3440-3450.
- Haugland, R.P. *Handbook of Fluorescence Probes and Research Products*, 9th edn., Molecular Probes Inc. **2004** (a valuable book, includes theory and practice).
- Hurtubise, R. *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications*, Verlag Chemie (VCH), Weinheim, 1990 (one of the rare books on phosphorimetry).
- Jameson, D.M., Reinhart, G.D., eds. *Fluorescent Biomolecules: Methodologies and Applications*, Plenum, New York, London, **1989**.
- Jursinic, P.A. *Delayed Fluorescence: Current Concepts and Status*, in Govindjee et al., eds. *Light Emission by Plants and Bacteria*, Academic Press, New York, London, **1986**, pp. 291-223.
- Lakowicz, J.R., ed. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Techniques*, Plenum, New York, London, **1991**.
- Lakowicz, J.R., ed. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Biochemical Applications*, Plenum, New York, London, **1992**.
- Lakowicz, J.R., ed. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Nonlinear and Two-photon-induced Fluorescence*, Plenum, New York, London, **1992**.
- Lakowicz, J.R., ed. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles*, Plenum, New York, London, **1992**.
- Lakowicz, J.R., ed. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Probe Design and Chemical Sensing*, Plenum, New York, London, **1992**.
- Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York, London, **1999**.
- Lakowicz, J.R., Thompson R.B., eds. *Advances in Fluorescence Sensing Technology V*, Progress in Biomedical Optics and Imaging, SPIE-International Society for Optical Engineering, Bellingham, WA, **2001**.
- Lakowicz, J.R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic Publishers, **2003**.
- Lichtenthaler, H. K., ed. *Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing*, Kluwer Academic Publishers, **2002**.
- Mycek, M.-A., Pogue, B.W. *Handbook of Biochemical Fluorescence*, Marcel Dekker, New York, **2003**.
- Nalwa, H.S., Rohwer, L.S. *Handbook of Luminescence, Display Materials, and Devices*, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, California, **2003**.
- Niemantsverdriet, J. W. *Spectroscopy in Catalysis, Handbook*, Wiley, New York, **2000**.
- Parker, C.A. *Photoluminescence of Solutions*, Elsevier, Amsterdam, **1968**.
- Rendell, D. *Fluorescence and Phosphorescence*. John Wiley, New York, **1987**.

Rettig, W, Strehmel, B., Schrader, S., Seifert, N., eds. *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*, Springer, Berlin, **1998**.

Rost, M., Karge, E., Klinger, W.J. *Biolumin. Chemilumin.* **1998**, 13(6), 355-63.

Schmidt, W, Senger H. *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 890, 15-22.

Schulman, S., Sharma, A., Schulman, S.G. *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, Techniques in Analytical Chemistry, John Wiley, New York, **1999**.

Sharma, A., Schulman, S. G. *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, Wiley-Interscience, New York, **1999**.

Slavik, J., ed. *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*, Plenum, New York, **1998**.

Szöllösi, J., Damjanovich, S. Mulhern, S.A., Tron, L. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1987**, 49, 65-87.

Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., Herman, B. *Measurement of Intracellular Calcium*, Physiological Reviews, American Physiological Society, **1999**, Vol. 79, No. 4, pp. 1089-1125.

Taylor D.L., Wang, Y-L, eds. *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture Part B: Quantitative Fluorescence Microscopy — Imaging and Spectroscopy*, Academic Press, New-York, London, **1990**.

Tsien, R.Y. *Trends Neur. Sci.* **1988**, 11, 419-424.

Wang, X.F., Herman, B. *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*, Chemical Analysis, Vol. 137, John Wiley, New York, **1996**.

Wilde, E., *Geschichte der Optik 1 + 2, 1838-1843*, Sandig Reprint Verlag, H. R. Wohlwend, reprinted unchanged, **1967** (a valuable book on the history of optics; in German).

Wolfbeis, O. S., ed. *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Vols. 1 and 2, CRC Press, Boca Raton, FL, **1991**.

# ГЛАВА 7

## ФОТОАКУСТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Longum iter est per praecepta, breve efficax per exempla

*Можно страшиться учения, но примеры  
делают его гораздо более привлекательным*

*Сенека*

### 7.1. Введение

Абсорбционная и люминесцентная спектроскопия, как наиболее типичные методы спектрального анализа, стали неотъемлемой частью современного аналитического контроля в науке и промышленности. Однако несмотря на то, что посредством абсорбционного (см. главы 5.2.8 и 5.5) и флуоресцентного (см. главу 6.3.4) методов можно анализировать интенсивно поглощающие/рассеивающие вещества, эти измерения имеют определенные пределы. Поэтому возникает потребность в другой измерительной технологии, не ограниченной оптической консистенцией образца. Без сомнения, отвечает этой потребности фотоакустическая спектроскопия (ФАС) — метод, дополняющий абсорбционную и флуоресцентную спектроскопию. Практически ФАС — единственная из всех методов — обеспечивает «оптический анализ» и измерения параметров, недостижимых или редко достижимых другими методами, используя сочетание спектрофотометрического и калориметрического методов.

Основы ФАС были заложены такими великими учеными конца 19-го века как Белл (1881 г.), Релей (1881 г.), Рентген (1881 г.), Прик (1881 г.) и Тиндаль (1888 г.). Но только за последние 30 лет этот метод стал лидирующим благодаря работам Розенцвейга, Адамса и Киркбрайта, когда были оценены его преимущества в различных областях химии, физики поверхностей, медицине и биологии. Тем не менее, несмотря на доступность фотоакустических спектрометров, изготавливаемых различными производителями, ФАС все еще остается экзотическим методом по сравнению с общепринятыми.

### 7.2. Основной принцип фотоакустической спектроскопии (ФАС)

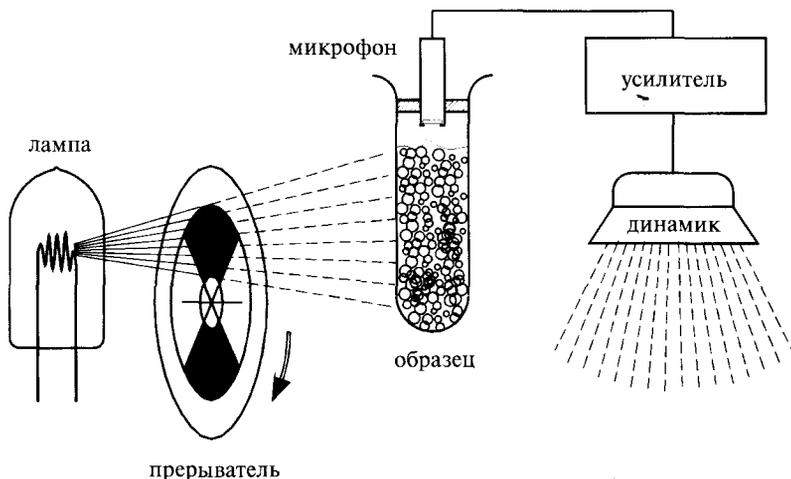
Основная идея ФАС удивительно проста, что проиллюстрировано на рис. 7.1. Молекулы исследуемого вещества облучаются лучом света, который модулируется с частотой  $f$ . В течение короткого периода времени — *времени жизни* возбужденного состояния молекулы — энергия возбужде-



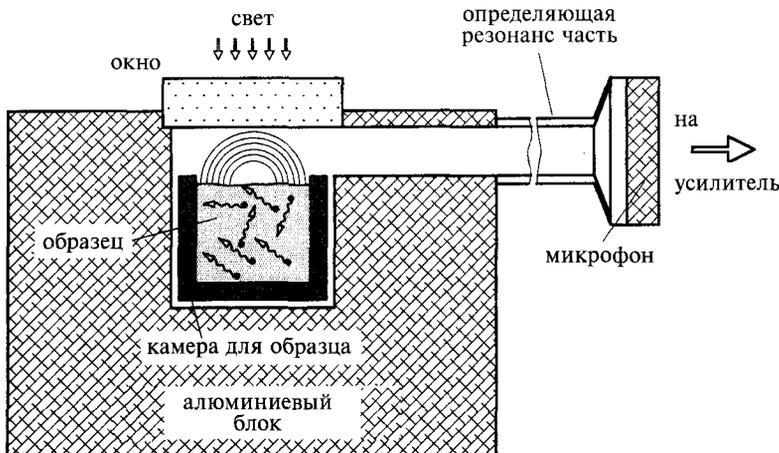
**Александр  
Грехем Белл**  
(1847—1922)

ния сохраняется, а затем частично или полностью релаксируется, т.е. высвобождается в форме тепла (см. рис. 6.1). Так как возбуждающий свет модулирован по интенсивности, то выделение тепла будет также модулировано. Периодическое нагревание образца, в свою очередь, вызывает периодическое поступление тепла в окружающий образец газ. Это приводит к периодическим изменениям объема газа и его давления, т.е. к возникновению акустических волн. Они регистрируются чувствительным микрофоном, преобразующим их в электрический сигнал, который затем усиливается и измеряется, или, как это изображено на рис. 7.1, преобразуется в звуковой сигнал динамика.

*Работая над изобретением телефона и проводя многочисленные эксперименты, Белл, используя свой фотофон, осуществил свето-акустические опыты по превращению акустических колебаний в электрический сигнал, передачи его на большое расстояние и, в конечном итоге, обратного преобразования в акустический сигнал. В своей первой попытке — без применения электричества — он направлял световой луч, модулируемый прерывателем с частотой 1 000 Гц, на тонкую твердую диафрагму из определенного материала. С помощью подсоединенного раструба и без какого-либо усиления этот сигнал можно было акустически распознать.*



**Рис. 7.1.** Экспериментальная установка, демонстрирующая основной принцип фотоакустической спектроскопии (ФАС). Образец облучается источником света. Луч света прерывается вращающимся прерывателем. Образец поглощает часть падающего света, энергия которого превращается в тепло. В зависимости от частоты модуляции  $f$  эмиссия тепла вызывает изменение давления и объемное расширение газа, т.е. генерирует звук. Последний преобразуется микрофоном в электрический сигнал, который после усиления можно услышать в динамике



**Рис. 7.2.** Фотоакустическая ячейка для образца с перестраиваемой резонансной частотой  $f$ . Требуемая резонансная частота достигается выбором площади поперечного сечения ячейки. На этой частоте отношение сигнал/шум значительно увеличивается (Rosencwaig, 1977)

Метод отличается высокой чувствительностью — применяя его, можно измерить изменение температуры порядка  $10^{-6}$  °C и изменение плотности энергии менее чем  $10^{-6}$  Дж см<sup>-3</sup> с<sup>-1</sup>. На рис. 7.2 изображена «кювета ФАС», состоящая из массивного алюминиевого блока, в котором располагается собственно камера с исследуемым образцом. При температурных измерениях очень важна относительно большая масса блока, т.е. его масса в отношении к размеру камеры с образцом. Размеры камеры можно изменять для получения определенной резонансной частоты. На этой частоте достигается наиболее чувствительное обнаружение благодаря наилучшему соотношению сигнал/шум.

## 7.3. Теория фотоакустической спектроскопии

### 7.3.1. Общие сведения

Измеренный фотоакустический сигнал прямо пропорционален поглощенной энергии. С одной стороны, он зависит от глубины проникновения поглощаемого света в исследуемый образец, а с другой — от эффективности передачи тепла сквозь образец, с поверхности образца на пограничный слой и далее через окружающий образец газ до микрофона.

*Пограничный слой — это тонкий слой порядка 1 мм. Он играет очень важную роль в ФАС, так как в нем происходит преобразование тепла в акустические волны. В англоязычной технической литературе место, на котором генерируются плоские звуковые волны, называется пистоном.*

Следовательно, величина измеряемого сигнала зависит от всех промежуточных этапов и, в первую очередь, определяется суммарным коэффициентом оптического поглощения  $\beta(l)$  и константой тепловой диффузии  $S$ . Значения  $\beta$  и  $S$  определяются уравнениями:

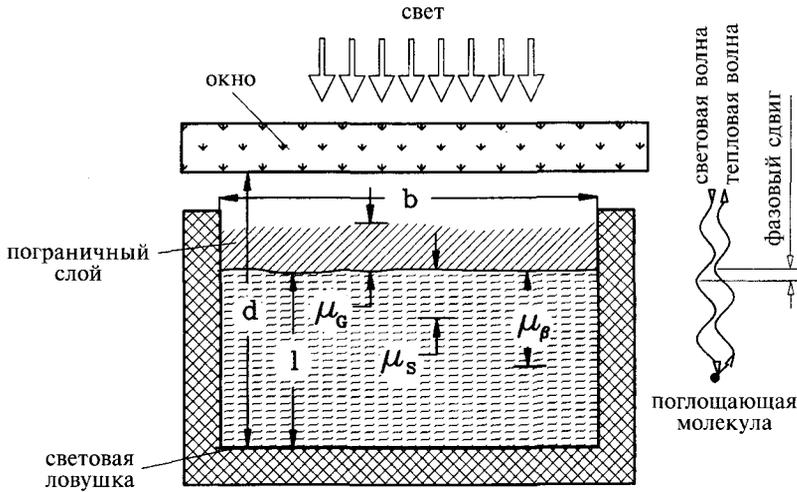
$$\begin{aligned} dI &= -\beta I dx \\ d\delta &= S\Delta\delta dx \end{aligned} \quad (7.1)$$

где  $dI$  — изменение интенсивности света  $I$  на толщине  $dx$ , а  $d\delta$  — изменение диффузии, связанное с падением градиента тепла  $\Delta\delta$  в  $dx$ . Обе константы  $\beta$  ( $\beta = \ln 10 \times \epsilon \times c = 2,3026 \times \epsilon \times c$ , где  $\epsilon$  — молярный коэффициент экстинкции, а  $c$  — концентрация) и  $S$  имеют одинаковую размерность:  $\text{см}^{-1}$  (уравнение 7.1). Они определяют расстояние, на котором энергия падающего света (длина оптического поглощения  $\mu_\beta = 1/\beta$ ) или амплитуда тепловых волн снижается в  $1/e$  раз от первоначального значения.

Как уже упоминалось, звуковые волны в камере с образцом образуются на пограничном слое между образцом и окружающим образцом газом. Только этот тонкий слой газа из всей толщины теплового диффузионного пути в пистоне  $\mu_G$  ритмично нагревается поверхностью образца. Если таким газом является воздух, то при частоте модуляции 20 Гц толщина пограничного слоя равна  $\sim 0,6$  мм. Конечно, шероховатая поверхность образца более эффективно распространяет тепло, чем гладкая, полированная поверхность, и дает более мощный ФА сигнал. Длина тепловой диффузии  $\mu_S$  внутри образца соответствует расстоянию, на которое распространяются тепловые волны за один период модуляции (см. рис. 7.3). Это можно записать в виде формулы (Cahen et al., 1980):

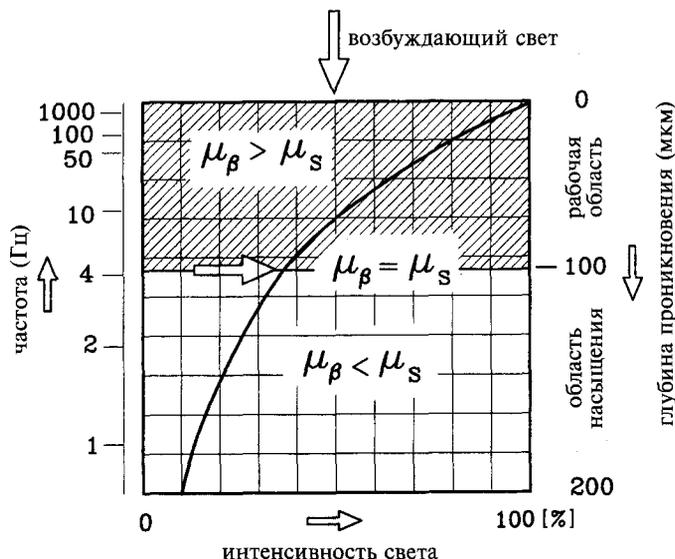
$$\begin{aligned} dI &= -\beta I dx \\ d\delta &= S\Delta\delta dx \end{aligned} \quad (7.2)$$

где  $\chi$  — теплопроводность ( $\text{Дж см}^{-1} \text{с}^{-1}\text{град}^{-1}$ ),  $\zeta$  — удельный вес ( $\text{г см}^{-3}$ ),  $c$  — удельная теплоемкость ( $\text{Дж г}^{-1} \text{с}^{-1}$ ),  $\omega = 2\pi f$  — угловая частота,  $a, f$  — частота модуляции ( $\text{с}^{-1}$ ). Например, для частот модуляции от 1 до 1 000 Гц величина  $\mu_S$  равна от 170 до 4 мкм (см. рис. 7.4) при типичном значении  $\chi = 0,001 \text{ Дж см}^{-1} \text{с}^{-1}\text{град}^{-1}$ . Зная длину тепловой диффузии  $\mu_S$  и толщину образца  $l$  (измеряемую в направлении оптической оси падающего луча света), можно идентифицировать шесть различных ситуаций (Rosenzwaig, Gercho, 1975 a,b). В первую очередь, можно различить два типа образцов: оптически прозрачные образцы с большой длиной оптического поглощения  $\mu_\beta$ , где свет поглощается по всей толщине образца  $l$ , и оптически непрозрачные/мутные образцы с маленьким значением  $\mu_\beta$ , где свет поглощается только в небольшом, по сравнению с общей толщиной образца, слое. В свою очередь, каждый из них, в зависимости от длины тепловой диффузии  $\mu_S$ , подразделяется на образцы с малой, средней и высокой теплопроводностью. Здесь мы рассмотрим только наиболее важную на практике ситуацию, касающуюся оптически непрозрачных и обладающих малой теплопроводностью образцов, которая демонстрирует экстраординарные возможности ФАС в тех условиях, когда общедоступная оптическая спектроскопия не работает. Предположим,  $\mu_S \ll l$ . В первом приближении (см. главу 5.1.1) интенсивность света снижается экспоненциально с толщиной образца (см. рис. 5.1). На глубине, где  $\mu_S = \mu_\beta$ , проходит граница между рабочей областью ( $\mu_S < \mu_\beta$ ) и областью насыщения ( $\mu_S > \mu_\beta$ , см. рис. 7.4).



**Рис. 7.3.** Увеличенное изображение камеры с образцом из рис. 7.2. Чтобы минимизировать фоновый сигнал, камера внутри полируется (покрывается кварцем) и зачерняется, так как является световой ловушкой. Параметры  $d$  и  $b$  — размеры камеры,  $l$  — толщина образца.  $\mu_G$ ,  $\mu_S$  и  $\mu_B$  обсуждены в тексте. Показан сдвиг фазы между световой и тепловой волной

Теоретические предпосылки ФАС базируются на теории Розенцвейга — Гершо, однако для практического применения этого метода ее полное понимание не обязательно. Достаточно знать принцип возникновения фотоакустического сигнала. Возбуждающий свет является синусоидально модулированным, что позволяет применить соответствующий математический аппарат для решения практических задач. Временное ( $t$ ) и пространственное (только в одном направлении  $x$ ) изменение температуры описывается так называемыми волновым или транспортным уравнением. Математически это дифференциальное уравнение в частных производных второго порядка для  $x$  и первого порядка для  $t$ . Как и для всех дифференциальных уравнений, для решения необходимо определение граничных условий, определяющих предельные значения функции. Ниже будут приведены наиболее важные результаты решений этих дифференциальных уравнений. Наконец, подобное волновое уравнение будет решено для практической ситуации с вовлечением всех «транспортирующих сред», например, для суспензии хлоропластов (органелл, опосредующих фотосинтез в высших растениях) (см. рис. 7.13), включая ее саму, окружающую жидкую среду, пограничный слой и окружающий образец газ вплоть до микрофона. Следует отметить, что преобразование тепловой волны в звуковую происходит не только в пограничном слое окружающего образец воздуха (даже если это — главный источник звука). Это происходит также в самом образце. Ясно, что в практической работе только эксперимент имеет действительное значение, а теоретические рассуждения представляют лишь академический интерес.



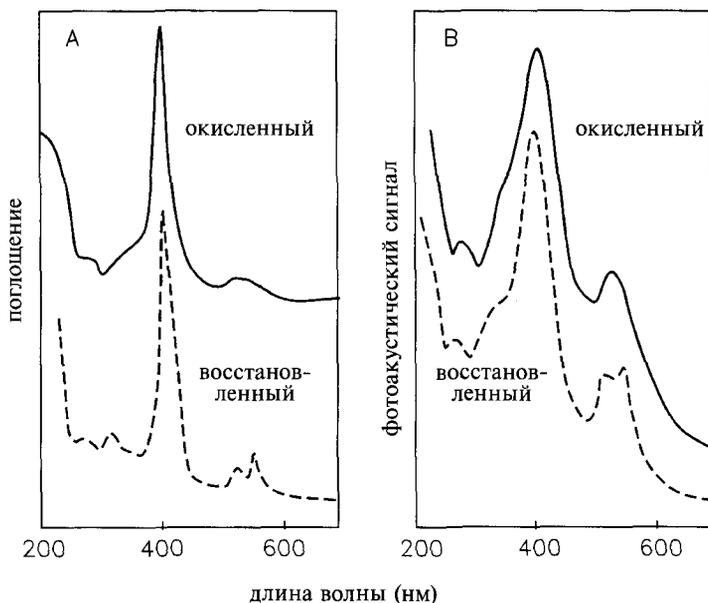
**Рис. 7.4.** Зависимость интенсивности возбуждающего света и амплитуды результирующего фотоакустического сигнала от толщины образца и угловой частоты  $\omega = 2\pi f$ . Определяющим фактором является соотношение между длиной оптического поглощения  $\mu_\beta$  и длиной тепловой диффузии  $\mu_s$ . Фотоакустический спектр соответствует спектру поглощения образца, если  $\mu_s$  меньше  $\mu_\beta$ . В противном случае эффекты насыщения будут искажать спектр. Соответствующая граница между рабочей областью и областью насыщения определяется равенством  $\mu_s = \mu_\beta$ , при этом  $I = I_0 \times e^{-\beta x}$

### 7.3.2. Фотоакустически определяемые спектры поглощения

ФА сигнал возникает в очень тонком слое образца порядка  $\mu_s$  (измеряемом от места поглощения). Для  $\mu_s \ll \mu_\beta$  суммарная энергия поглощенных квантов света пропорциональна  $\beta$ . Следовательно, волновая зависимость ФА сигнала непосредственно отражает спектр поглощения образца (см. главу 5). Конечно, затем такой рудиментарный спектр следует исправить на волновую зависимость системы освещения. На рис. 7.5 приведено сравнение обычного спектра поглощения разбавленного раствора цитохрома *c* (А) с ФА спектром (В) цитохрома *c* в твердом состоянии. Этот результат показывает, что ФАС позволяет получать спектры поглощения твердых биологических образцов, сравнимых с обычными спектрами поглощения веществ в растворе, что очень важно для исследования нерастворимых материалов.

### 7.3.3. Свойства насыщения

Когда  $\mu_s$  становится сравнимой с  $\mu_\beta$  или немного превышает ее, ФА сигнал не содержит больше информации о спектре поглощения образца. Это продемонстрировано на рис. 7.6 (ср. со спектром поглощения крови на рис. 5.32), отражающем тенденцию насыщения при уменьшении

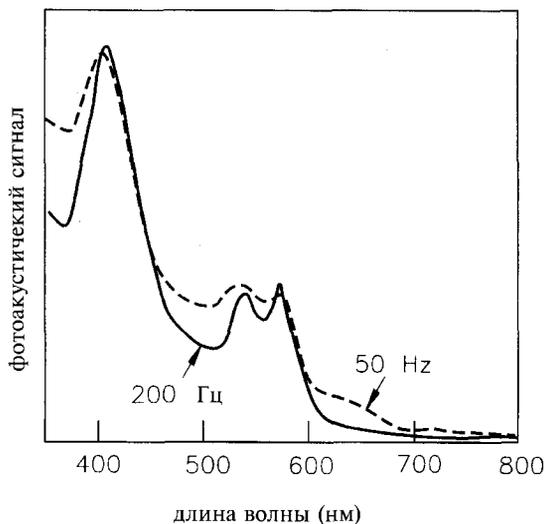


**Рис. 7.5.** Сравнение спектров поглощения водного раствора окисленного и восстановленного цитохрома *c* (А) с ФА спектром твердого цитохрома *c* (порошок) (В). Разница между спектрами, полученными разными методами, и выражающаяся в основном в расширении полос в ФА спектре, обусловлена различием агрегатных состояний молекулы, а не методологическими причинами (согласно Rosenzwaig, 1973)

частоты модуляции  $f$  на примере исследования мазка крови человека. Наконец, при дальнейшем снижении частоты модуляции происходит полное насыщение ФА сигнала, т. е. в тонком поверхностном слое образца «видны» все поглощенные кванты света. Сигнал становится независимым от длины волны и просто представляет волновую характеристику измерительной системы (энергетический спектр, Rosenzwaig, 1978). Как следует из уравнения 7.2,  $\mu_s$  в принципе можно понизить подбором более высокой частоты модуляции, избежав таким образом насыщения. Однако эта возможность ограничена, так как ФА сигнал становится меньше с возрастанием частоты модуляции — уменьшается толщина измеряемого образца (рис. 7.4) и одновременно падает отношение сигнал/шум. Теоретически, при насыщении фотоакустический сигнал пропорционален  $\omega^{-1}$ , в остальных случаях он пропорционален  $\omega^{-3/2}$ . Это свойство ФА сигнала используется для тестирования насыщения.

#### 7.3.4. Глубинные профили фотоакустических спектров

Глубинное профилирование — это специфическая особенность ФАС, которая обычно может быть изучена только спектроскопией ослабленного внутреннего отражения (см. главу 8.4.1). В ФАС существуют две незави-

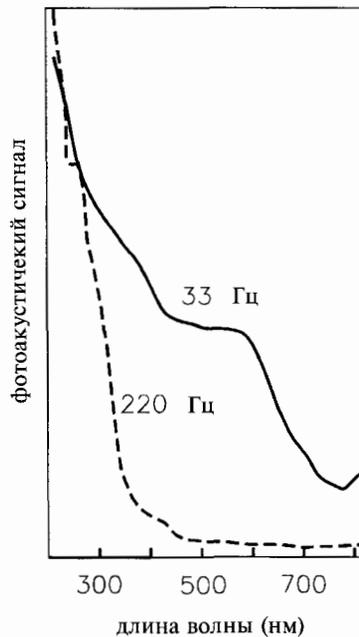


**Рис. 7.6.** В соответствии с рис. 7.4 во избежание насыщения ФА сигнала длина тепловой диффузии  $\mu_s$  должна быть значительно меньше длины волны оптической диффузии  $\mu_b$ . Требуемая граничная частота определяется только экспериментально. Существенное насыщение ФА спектра мазка крови человека наблюдается при частоте 50 Гц. Частота 200 Гц все еще находится в рабочей области (согласно Munroe, Reichert, 1976)

симые процедуры. Первая, основанная на теории Розенцвейга — Гершо, устанавливающей зависимость  $\mu_s$  от частоты модуляции  $f$  (уравнение 7.2), предопределяет рабочую область для ФАС с достаточно высокими частотами модуляции  $f$ .

На рис. 7.7 представлен впечатляющий пример спектров поглощения кожуры красного яблока. При частоте  $f = 220$  Гц наблюдается только типичное поглощение белка на длине волны 280 нм, обусловленное бесцветным тонким слоем воскового налета. При частоте  $f = 33$  Гц наблюдается дополнительное поглощение более глубоко расположенного слоя красного пигмента с максимумом в зеленой области спектра. Следует отметить, что три слоя различных пигментов посредством ФАС четко отличить уже нельзя (даже с применением фазового метода, описываемого ниже).

Фазовый метод разработан группой Киркбрайта (ср. с двуволновой спектрофотометрией, см. рис. 5.44 и 5.46). В принципе, ФА сигнал — это сигнал переменного тока, в отличие от сигнала обычной флуоресценции или однолучевого спектрофотометра. Таким образом, для биохимических и биологических систем ФАС дает дополнительную информацию: помимо амплитуды и частоты возможен и анализ сдвига фазы относительно возбуждающего света. В случае образца с малой теплопроводностью, т.е. когда  $\mu_s \ll l$  (см. рис. 7.3), может быть определена относительная фаза  $\theta$ , между возбуждающим и измеренным светом. Если не учитывать различные, большей частью технологические, влияния наподобие фазового сдвига между проводящим газом и микрофоном или внутри электронных



**Рис. 7.7.** Фотоакустические спектры неповрежденной кожи красного яблока. В соответствии с уравнением 7.2, разные слои исследуются за счет изменения частоты модуляции  $f$ . На частоте  $f = 220$  Гц наблюдается только белковая полоса на длине волны 280 нм (см. рис. 6.30). Однако на частоте  $f = 33$  Гц наблюдается также полоса поглощения красного пигментного слоя. В ФАС выбор частоты модуляции является решающим, главным фактором (согласно Rosenzweig, 1978)

компонентов, то в первом приближении получим следующее хорошее соотношение:

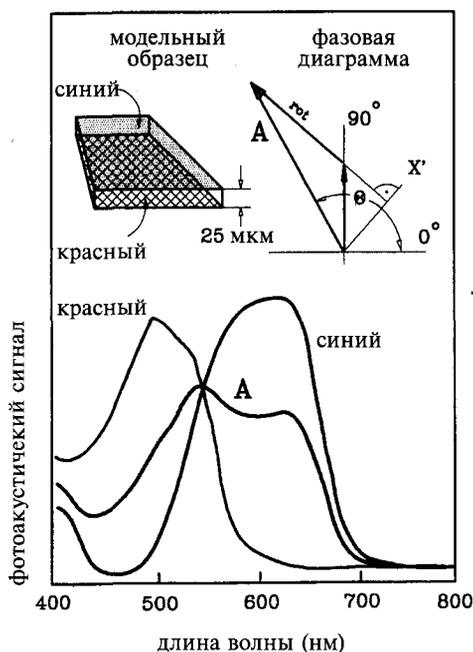
$$\tan \theta_r = \beta \times \mu_s + 1 = \frac{\mu_s}{\mu_b} + 1 \quad (7.3)$$

При  $\beta \mu_s \ll 1$  сдвига фаз не будет во всем диапазоне длин волн поглощения. Однако если  $\beta \mu_s \geq 0,1$ , то это уравнение позволяет определить  $\beta(l)$ , т.е. спектр поглощения. При  $\mu_s < \mu_b$  (рабочая область на рис 7.4)  $\theta_r$  достигает своего максимального значения, равного  $\pi/4$ . При исследовании биологических образцов, качественная и количественная структура которых неизвестна, частотная зависимость ФА сигнала оказывается сложной. Несмотря на это, можно относительно надежно определить распределение хромофоров в тонком слое образца от 1 до 200 мкм, как при измерениях от поверхности образца.

Величина ФА сигнала зависит от настройки фазы усилителя синхронизации (см. рис. 7.8). В соответствии с правилами векторного анализа, фаза сигнала определяется двумя ортогональными компонентами. Таким образом, необходимо выбрать две компоненты, фазовый сдвиг которых со-

ставляет  $90^\circ$ , которые называются квадратурой. Предположим, что одна из компонент является фиксированной в отношении ФА сигнала, происходящего из области, в которой  $\mu_s = \mu_b$  (см. рис. 7.4). Благодаря тому, что для распространения тепла до поверхности образца требуется какое-то время, ФА сигналы, зародившиеся внутри образца, появляются с некоторой фазовой задержкой, т.е. сдвигом фазы.

На рис. 7.8 продемонстрирован спектральный анализ модельного образца. Пластмассовая пленка толщиной 25 мкм покрыта сверху синим, а снизу красным пигментом с оптической плотностью  $A = 0,5$  каждый. Спектры записаны при значении  $\mu_s > 20$  мкм, что соответствует частоте модуляции  $f = 26$  Гц. Из графиков видно, что ФА сигнал полностью определяется только двумя параметрами: либо результирующей компонентой  $A$  и соответствующим суммарным фазовым углом  $\theta_m$ , либо математически эквивалентными двумя компонентами  $A \sin \theta_m$  и  $A \cos \theta_m$ . Последние величины и, таким образом, вся информация элегантно измеряются с помощью двухфазного синхронного усилителя (см. главу 5.5.2) и двухканального аналогово-цифрового преобразователя. Фазовая диаграмма на рис. 7.8 пока-



**Рис. 7.8.** Спектральный анализ по глубине модельного образца на основе ФАС. Пластмассовая пленка толщиной 25 мкм покрыта сверху синим, а снизу красным пигментным слоем с поглощением  $A = 0,5$  каждый. За счет изменения сдвига фазы между возбуждающим и измеренным светом возможно определение спектра поглощения на разной глубине. Суммарный ФА сигнал можно описать величиной (длиной) вектора  $A$  и фазового угла  $\theta_m$ . На фазовой диаграмме во вставке показано построение суммарного сигнала из отдельных «синей» и «красной» компонент. Фазовая диаграмма и результирующий спектр поглощения координированы друг с другом

зывает, что измерение под фазовым углом  $0\pi$  дает чистый сигнал красной, а измерение под углом в направлении  $X'$  — чистый сигнал синей компоненты. Все остальные фазовые углы дают смешанные спектры. С помощью соответствующей программы встроенного компьютера ось  $X'$  может непрерывно вращаться, а соответствующие спектры рассчитываться и представляться в визуальном отображении. В случае с неизвестными образцами возникает проблема «правильного» выбора фазового угла, определяющего соответствующие спектры.

### 7.3.5. Измерение фотофизических параметров с помощью ФАС

Одним из преимуществ ФАС является возможность измерения фотофизических параметров, таких как квантовый выход флуоресценции или измерение энергии и времени жизни долгоживущих метастабильных квантовых состояний. В главе 6 рассматривались механизмы процессов релаксации возбужденных молекул (см. рис. 6.1). С одной стороны, первое возбужденное синглетное состояние может рассеивать свою энергию через быстрые процессы, такие как эмиссия флуоресценции, фотохимические реакции или просто безызлучательный переход в основное синглетное состояние. С помощью ФАС можно исследовать только последний процесс. С другой стороны, первое возбужденное синглетное состояние  $S_1$  может претерпевать изменение мультиплетности и релаксировать затем через внутреннюю конверсию с потерей небольшого количества энергии (см. главу 6.2.1) в первое возбужденное триплетное состояние  $T_1$ . Это триплетное состояние, в свою очередь, либо запускает фотохимический процесс, либо теряет свою энергию в виде фосфоресцентного света (гл. 6.7) или безызлучательного перехода в основное синглетное состояние. Последний процесс также может быть измерен напрямую ФАС. Вследствие относительно длительного времени жизни состояния  $T_1$  модулированная тепловая эмиссия будет наблюдаться после определенной фазовой задержки относительно возбуждающего света (см. рис. 6.27). Таким образом, зависимость фазового сдвига от частоты возбуждающего излучения  $f$  позволяет определять время жизни триплетного состояния. Кроме того, такими измерениями можно определить скорость заселения триплетного состояния, т.е. интеркомбинационную конверсию (Moore, 1984).

С помощью ФАС возможно измерение квантового выхода флуоресценции  $\Phi_F$  (см. главу 6.5.3). Для этого измеряют нефлуоресцирующий сравнительный образец с таким же поглощением на длине волны возбуждения, как и изучаемого образца. Чтобы гарантировать постоянство значения коэффициента коррекции  $R(f)$  (см. уравнение 7.5), образцы должны иметь одинаковую геометрию, одинаковый объем и находиться в одинаковом буфере. На этом основании определяется квантовый выход  $\gamma$  безызлучательной релаксации, а затем квантовый выход флуоресценции (см. главу 6.5.3):

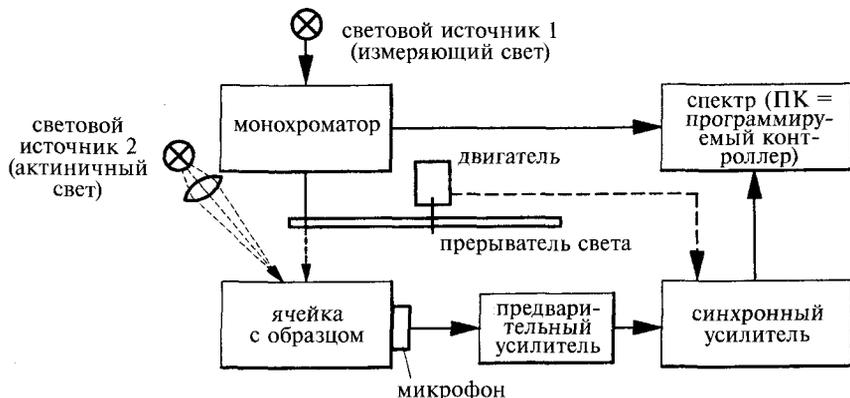
$$\mathcal{S}_F = \frac{\nu_F}{\nu} (1 - \gamma) \quad (7.4)$$

## 7.4. Экспериментальные методы

На рис. 7.9 изображена блок-схема типичного фотоакустического спектрометра. Источник света 1 генерирует требуемый возбуждающий свет, который направляется на дифракционный монохроматор, выделяющий монохроматический световой луч переменной длины волны. Полученный луч света модулируется прерывателем с определенной частотой. Оптимизация отношения сигнал/шум (см. главу 5.2.5) очень важна в ФАС, так как конечный сигнал получается неоднократным преобразованием исходного сигнала: сначала свет (в ваттах) преобразуется в звук (в паскалях), а затем звук преобразуется в электрический сигнал (в вольтах на ампер). Световой источник дает флуктуации, проходящие сквозь звуковые волны в виде электрического сигнала. Кроме того, исследуемый образец тоже является источником шума — теплового шума и рассеянного светового излучения (см. главу 5.2.7). Эти шумы достигают микрофона и усиливаются далее. Конечно, микрофон и предварительный усилитель также являются источниками шумов. Все эти шумы называются асинхронными, так как не зависят от частоты модуляции  $f$ .

Другим источником интерференции является так называемый синхронный шум. Он возникает главным образом благодаря ФА сигналу от пустой ячейки образца. Частой причиной является также механическая связь прерывателя и микрофона. В этом случае может помочь хорошее демпфирование ячейки и механическая автономизация, например, через оптоволокну и стабилизированную платформу спектрометра.

Сама ячейка для образца должна быть сконструирована таким образом, чтобы оптимизировать соотношение сигнал/шум. Главную роль в этом случае играет толщина пограничного слоя между образцом и опосредующим газом, которая реагирует на малейшее изменение температуры. Она должна быть порядка длины тепловой диффузии образца  $\mu_c$ , которая для



**Рис. 7.9.** Блок-схема фотоакустического спектрометра. Отличие данного спектрометра от общедоступного оптического однолучевого спектрометра с прерывателем (рис. 5.12, б) заключается в определении светового сигнала микрофоном, а не фотодетектором. Дальнейшая обработка сигнала идентична

воздуха и при частоте модуляции  $f = 50$  Гц равна приблизительно 0,34 мм. Расстояние между окном ячейки и поверхностью образца выбирается равной этому значению (см. рис. 7.3).

Для ФАС разработано много специфических микрофонов, наиболее обычным среди которых является конденсаторный или электретный микрофон с диаметром от 0,5 до 1 дюйма (1 дюйм = 2,54 см). Их чувствительность составляет от 10 до 60 мВ/Па. Следует отметить, что для импульсной фотоакустической спектроскопии (см. главу 7.6.2) микрофоны нельзя использовать, так как они работают только в акустическом диапазоне. В этом случае в качестве проводящих элементов применяются быстродействующие пьезоэлектрические кристаллы.

С целью оптимизации соотношения сигнал/шум ячейка с образцом должна быть тщательно изолирована от «окружающего мира», а сигнал от пустой ячейки должен быть как можно меньше. Материал окна ячейки, примесные соединения и даже стенки ячейки должны поглощать как можно меньше света, чтобы минимизировать фоновый сигнал. Для увеличения отношения сигнал/шум «тепловая масса» должна быть как можно больше (см. рис. 7.2), чтобы претерпевать как можно меньшее изменение температуры  $\Delta T$  при передаче тепла и таким образом генерировать незначительный фоновый ФА сигнал. Изменение температуры вычисляется по формуле:  $\Delta T = \Delta W m^{-1} c_p^{-1}$ , где  $\Delta W$  — величина излученного тепла,  $m$  — масса и  $c_p$  — теплоемкость ячейки при постоянном давлении.

Конечно, с помощью представленного на рис. 7.9 ФА спектрометра получают спектры, нескорректированные относительно длинноволновой зависимости всей системы. Аналогичная проблема встречалась при анализе спектров возбуждения флуоресценции, коррекция которых производилась посредством счетчика квантов (глава 6.3.2). Коррекция ФА спектра осуществляется аналогичным способом, т. е. необходимо получить спектр сравнительного образца, который поглощает все кванты независимо от длины волны возбуждающего света. Далее поглощенная энергия должна полностью высвободиться в форме тепла и, наконец, в отсутствие каких-либо химических процессов — целиком проявиться в виде ФА сигнала. В качестве сравнительного образца более всего подходит очень тонкий слой черного углерода. Коррекция ФА спектра осуществляется делением спектра образца на сравнительную кривую (углерода), т.е. так же, как и корректировка флуоресцентного спектра. Все аналитические процедуры, описанные ранее (см. главу 5.4.4), могут быть применимы к ФА спектрам.

## 7.5. Фотохимически активные образцы

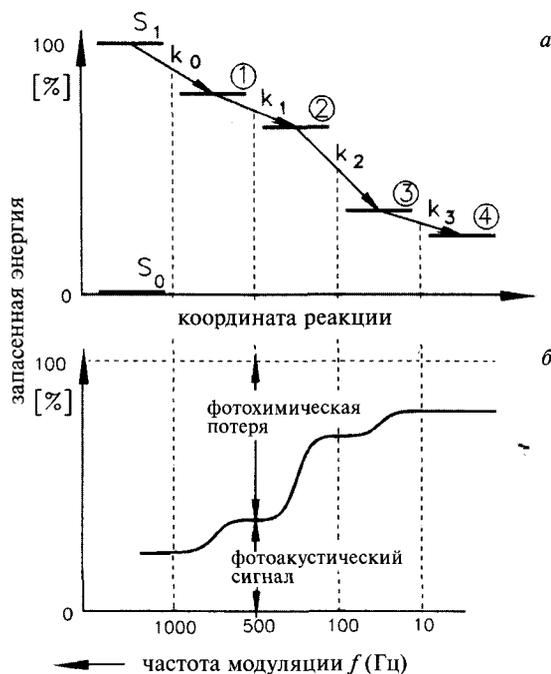
### 7.5.1. Модификация ФА сигналов

Фотобиологически активные образцы являются, как правило, и фотохимически активными, т. е. не все фотоны, первоначально преобразованные в возбуждающую энергию, преобразуются затем в форму обнаруживаемого тепла. Во-первых, возможно образование фотохимически стабильного конечного продукта с большей энтальпией. Помимо этого имеется возмож-

ность образования нескольких последовательно образующихся промежуточных продуктов, преимущественно в цепи переноса электрона, благодаря чему исходное состояние будет достигнуто вновь с некоторой задержкой в соответствии с его характеристическим временем жизни (см. рис. 7.10). Ниже приведена общая формула фотоакустического сигнала, полученная Кахеном в 1980 г.

$$\Phi_{AC}(f, \nu) = A_{\beta}(\nu)R(f) \left[ 1 - \frac{\sum_i \Phi_{pi} \Delta E_{pi}(f)}{Nh\nu} - \Phi_F \frac{\nu_f}{\nu} \right] \quad (7.5)$$

где  $A_{\beta}(\nu)$  описывает суммарную поглощенную энергию ( $\mu_s < \mu_{\beta}$ ),  $R(f)$  — коэффициент коррекции, который зависит от вида спектрометра и тепловых свойств исследуемого и сравнительного образцов,  $\Phi_{pi}$  — квантовый выход



**Рис. 7.10.** *а* — энергетическая диаграмма фотохимической реакционной цепи. Основное состояние большинства органических молекул — синглетное состояние. Сразу же после возбуждения они релаксируют в первое возбужденное синглетное состояние  $S_1$  за счет внутренней конверсии. Затем в результате интеркомбинационной конверсии происходит переход в первое возбужденное триплетное состояние ( $k_0$ ), которое, в свою очередь, запускает цепь фотохимических/фотофизических и/или фотобиологических реакций ( $k_1 - k_3$ ). В результате достигается новое равновесие (4); *б* — в соответствии с энергиями, выделяемыми на каждом этапе преобразований, измеряется фотоакустический сигнал. Разница между этими энергиями и первоначальной энергией возбуждения представляет химически запасенную энергию, которая называется *фотохимической потерей* (согласно Cahen et al., 1980)

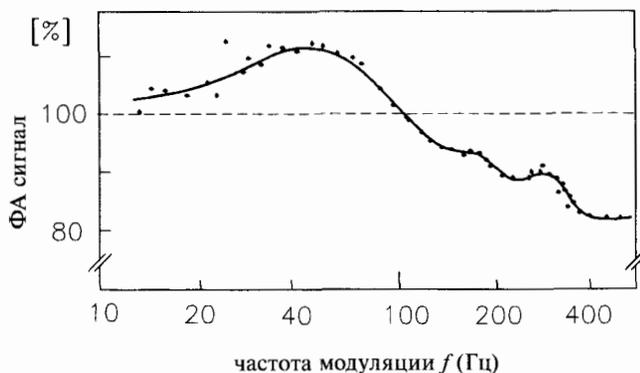
образования промежуточных продуктов  $i$  фотохимической реакции,  $\Delta E_{pi}$  описывает запасенную энергию отдельной стадии,  $Nh\nu$  — энергия в 1 Эйнштейн (1 моль квантов) на длине волны  $\lambda = c\nu^{-1}$ ,  $\nu$  — частота падающего света,  $f$  — частота модуляции,  $\Phi_f$  — квантовый выход флуоресценции, а  $\nu_f$  — частота флуоресцентного света. В скобках уравнения 7.5 указана так называемая фотохимическая потеря  $\Phi_A$  сигнала, снижающая максимально возможное значение измеряемого сигнала, включая какую-либо эмиссию люминесценции (Cahen et al., 1980).

### 7.5.2. Частотный спектр $\Phi_A$ сигнала

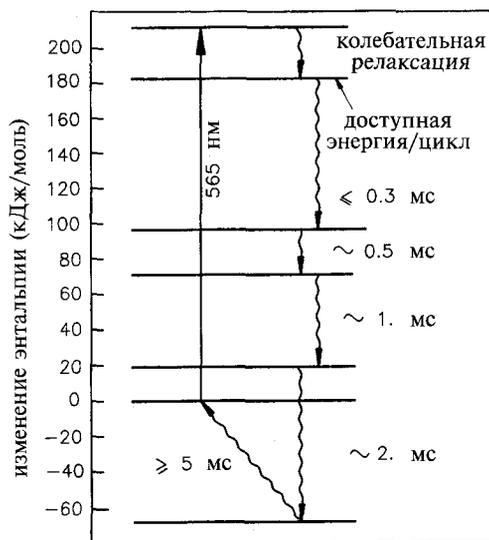
Применяя уравнение 7.5, необходимо принимать во внимание, что  $\Delta E_{pi}$  является функцией частоты модуляции  $f$ . Промежуточные состояния наблюдаются лишь в том случае, если их время жизни больше, а скорость образования меньше длительности полного цикла частоты модуляции ( $\omega^{-1} = 1/2\pi f$ ).

Поэтому, если  $\Phi_A$  сигнал определяется для заданной длины волны возбуждающего света  $\lambda$  в виде функции частоты модуляции  $f$ , то короткоживущие промежуточные состояния будут обнаруживаться рядом с более высоко и длительноживущими при более низких частотах. Факт образования стабильного конечного продукта фотохимической реакции устанавливается тем, что даже если частоту модуляции снизить до приближающихся к нулю значений, весь ожидаемый  $\Phi_A$  сигнал не измеряется. В качестве примера на рис. 7.11 представлена зависимость  $\Phi_A$  сигнала от частоты модуляции при исследовании бактериородопсина в мембране пурпурной бактерии *Halobacterium halobium* с известным светоиндуцированным циклом (см. Haeder, Tevini, 1985).

На графике рис. 7.11 можно различить три независимых экзотермических процесса с временами жизни  $\tau = 0,5$  мс (330 Гц), 0,85 мс (185 Гц) и 1,7 мс



**Рис. 7.11.** Зависимость  $\Phi_A$  сигнала от частоты модуляции при исследовании бактериородопсина в мембране пурпурной бактерии *Halobacterium halobium* (возбуждение — в максимуме полосы поглощения при 565 нм). На графике можно различить три экзотермических процесса с временами жизни  $\tau = 0,5$ , 0,85 и 1,7 мс и эндотермический процесс с временем жизни 5,3 мс (согласно Garty et al., 1978)



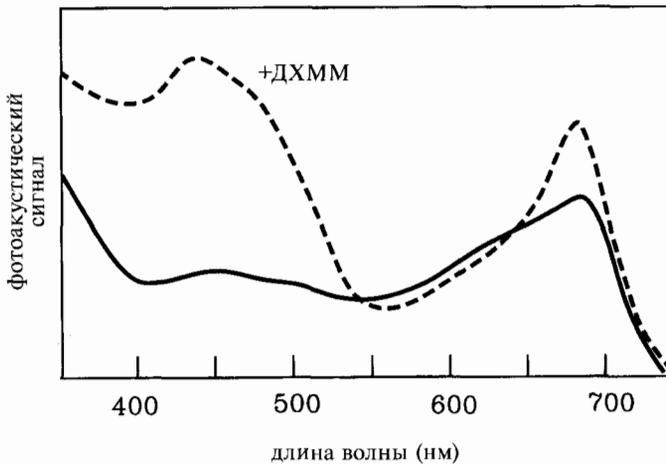
**Рис. 7.12.** Энергетическая схема фотоцикла бактериородопсина, полученная из частотной зависимости на рис. 7.11 (согласно Garty et al., 1978)

(92 Гц), а также эндотермический процесс с временем жизни  $> 5,3$  мс на частоте  $f > 20$  Гц. Если три самых медленных процесса легко соотнести с промежуточными состояниями  $N_{530}$ ,  $M_{412}$  и  $O_{660}$ , известными из импульсной световой спектроскопии (см. главу 6.5.2), то плечо на частоте 290 Гц не соответствует ни одному из известных промежуточных соединений.

ФА измерения позволили получить дополнительные калориметрические данные, характеризующие способность к сохранению энергии пурпурной мембраны. Во-первых, суммарная энергия первоначально поглощенных фотонов 212 кДж/Эйнштейн (650 нм) снижается на 38 кДж/Эйнштейн за счет тривиальной колебательной релаксации, оставляя на фотоцикл 184 кДж/Эйнштейн. Из оставшихся 100 кДж сохраняется в быстром процессе и около 70 и 20 кДж — в двух следующих процессах, соответственно. Наконец, ФА сигнал на частоте модуляции  $f \approx 50$  Гц превышает ожидаемое максимальное значение и соответствует уменьшению энтальпии на  $\sim 60$  кДж. Этого не наблюдается при низком рН (3,8) или при высокой ионной силе, что может указывать на конформационное изменение липопротеидного комплекса. Такие изменения могут приводить к возрастанию энтропии и, таким образом, снижению свободной энтальпии ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). Это является предпосылкой спонтанной реакции. На рис. 7.12 представлена энергетическая схема, выведенная на основании этого эксперимента.

### 7.5.3. Хлоропласты

Будучи неинвазивным методом, ФАС позволяет исследовать ткани и органеллы различного происхождения: из растений, микроорганизмов и организма человека, например листья, твердые костные ткани, мягкие ткани мышц или кожи. Метод ФАС является идеальным дополнением, а иногда



**Рис. 7.13.** ФА спектр листьев редиски в присутствии и отсутствии ДХММ [3—(3,4 дихлорфенил)—1,1-диметилмочевины]. ДХММ блокирует фотосинтетический транспорт электрона и, таким образом, преобразование световой энергии в биохимический эквивалент. Следовательно, при наличии ДХММ больше энергии преобразуется в тепло, что демонстрирует расширение и нарушение ФА спектра

и единственной альтернативой общедоступной абсорбционной спектроскопии для изучения суспензии любого типа.

Следующее может служить типичным примером. Транспорт электрона при фотосинтезе в хлоропластах зеленых растений строго ингибируется гербицидом ДХММ [3—(3,4 дихлорфенил)—1,1-диметилмочевиной], что выражается в снижении фотохимической активности. Следовательно, можно ожидать возрастания ФА сигнала в присутствии ДХММ. Это продемонстрировано в эксперименте с изолированными хлоропластами листа редиски (см. рис. 7.13). Интересно отметить, что изменилась не только высота, но и форма фотоакустического спектра, что позволяет сделать вывод о деталях ингибирования транспортной цепи электрона.

## 7.6. Некоторые методы ФАС

### 7.6.1. Фотоакустическая микроскопия

ФАС применяется при микроскопических исследованиях, известных как фотоакустическая микроскопия (ФАМ). Луч света диаметром в несколько микрометров фокусируется в определенной точке образца. Аналогично лазерной сканирующей микроскопии формируется «фотоакустическая картинка».

*В то время как при обычном микроскопировании светом облучается одновременно большая площадь, в лазерной сканирующей микроскопии происходит последовательное поточечное облучение образца с помощью двух зеркальных гальванометров по координатам  $x$  и  $y$ , как в телевизионной развертке. Сигнал от каждой точки фиксируется в электронной памяти установки.*

В настоящее время ФАМ используется уже рутинно, в частности, в металлургии и микроэлектронике. Как и в макрокопической ФАС, ФАМ осуществляет мониторинг образца по глубине на основе переменной частоты модуляции  $f$ . Многообещающие результаты показали уже первые измерения посредством ФАМ биологических образцов (отдельных хромосом) (Wong et al., 1978).

### 7.6.2. Индуцированная лазером ФАС

В дополнение к обычным скоростным спектрофотометрическим измерениям в качестве скоростной спектроскопии может быть использована и ФАС, известная как лазерно-индуцированная оптоакустическая спектроскопия (ЛИОАС). ЛИОАС успешно применяется при изучении механизмов скоростных фотохимических и фотофизических процессов. Как и в стационарной ФАС, электронные состояния исследуемых молекул должны быть возбуждены светом. Для этого производят облучение молекул посредством очень коротких, например, в наносекундном диапазоне, лазерных импульсов определенной длины волны, а интенсивность индуцированного ФА сигнала измеряют через относительно большой временной промежуток — порядка 20 мкс. Сигнал представляет собой затухающее колебание, интенсивность которого достигает нуля через несколько миллисекунд. Амплитуда так называемой *первой акустической волны*  $H$  определяет сигнал ЛИОАС и вычисляется по формуле (Tam, Patel, 1980):

$$H = \frac{\xi E_0 A}{\pi c_p \tau_p^2} \sqrt{\frac{v_a \tau}{2\pi f}} = \kappa E_0 A \quad (7.6)$$

где  $\xi$  — коэффициент теплового расширения,  $c_p$  — удельная теплоемкость при постоянном давлении,  $A$  — поглощение света образцом в направлении светового пути,  $E_0$  — энергия лазерного импульса,  $\tau_p = 2\tau$  — длительность лазерного импульса,  $v_a$  — скорость звука. В предположении, что поглощенная энергия в течение времени измерений полностью переходит в тепло, пропорциональность между  $H$  и  $E_0$  наблюдается в диапазоне нескольких порядков величины.

Как отмечалось ранее, обычные микрофоны не подходят для детектирования кратковременных акустических сигналов в микросекундном диапазоне. Обычно в этом случае в качестве передающих элементов используются пьезоэлектрические кристаллы, преобразующие звуковые волны в электрические сигналы за короткие временные периоды. После соответствующего усиления сигнал обрабатывается и сохраняется таким же образом, как и при других скоростных процессах типа импульсного фотолиза (см. главу 6.5.2).

Например, с помощью ЛИОАС можно обнаружить обратную реакцию фотопревращения  $P_r \rightarrow P_{fr}$  первого интермедиата (промежуточного продукта) фитохрома  $I_{700}$ , что не обнаруживается никаким другим спектральным методом (Jaben et al., 1984).

*Фитохром — важный фотохромный пигмент растений, который под воздействием света с длиной волны 660 либо 730 нм превращается в форму  $P_r$ , либо  $P_{fr}$ , что проявляется в изменении окраски и максимума поглощения ( $r$  — красный,  $fr$  — далекий красный). Физиологически активной является только  $P_{fr}$  форма, ответственная за многообразие световых реакций в царстве растений. Следовательно, анализ индивидуальных этапов фотопревращения  $P_r \leftrightarrow P_{fr}$  является весьма интересным в научном плане, будучи ключевым процессом в развитии растения.*

### 7.6.3. Фототермическая радиометрия

Периодические температурные изменения, причиной которых является поглощение модулированного света, можно определить не только с помощью фотоакустического сигнала. В соответствии с законом излучения Стефана — Больцмана (см. главу 3.4.1):

$$W = \epsilon \sigma T^4 \quad (7.7)$$

$$\delta W = 4\epsilon \sigma T^3 \delta T$$

небольшое изменение температуры генерирует модулированное тепловое излучение черного тела (см. главу 3.4.1), которое в данном контексте называется *фототермическим сигналом*. В уравнении 7.7  $\sigma$  — постоянная Стефана — Больцмана, а  $\epsilon$  — эмиссия соответствующего образца (не путайте с коэффициентом экстинкции  $\epsilon$  закона Бугера — Ламберта — Бера). Фототермическую радиометрию можно применять дистанционно — на расстоянии до 1 км. Детальное теоретическое исследование показало пропорциональность поглощения  $A_\beta$  и  $W$  (Там, 1986). Современные детекторы инфракрасного (ИК) излучения позволяют измерять энергию излучения  $W$  гораздо ниже  $10^{-7}$  Вт с хорошим отношением сигнал/шум. Важным преимуществом данного метода является отсутствие необходимости подготовки образца, и при этом методе не нужна специальная камера для образца: подобно флуоресцентному свету, ИК излучение образца фокусируется на детектор соответствующими ИК линзами. В то время как ФА сигнал в основном генерируется пограничным слоем между образцом и воздухом, фототермические сигналы формируются внутри исследуемого образца, при условии, что образец пропускает ИК излучение. В соответствии со временем тепловой релаксации, происходящей за  $10^{-11}$  —  $10^{-10}$  с (см. рис. 6.4), *фототермической радиометрией* обнаруживаются реакции, протекающие в этом временном диапазоне. Таким образом, этот метод может вполне успешно конкурировать с другими методами импульсного светового возбуждения. Помимо этого, доступные в настоящее время скоростные ИК детекторы позволяют контролировать быструю кинетику в пикосекундном диапазоне.

*Диффузное ИК излучение, подобно изотропному флуоресцентному, трудно сфокусировать. Поэтому наилучшим выбором здесь будет конструкция, в наибольшей степени приближающая образец к детектору.*

#### 7.6.4. Фотоакустическая спектроскопия на основе ИК преобразования Фурье (ИКПФ-ФАС)

По сравнению с другими методами оптической спектроскопии, ФАС обладает наиболее низким отношением сигнал/шум, особенно в ИК области, где сигналы значительно меньше, чем в видимом спектральном диапазоне. Поэтому в настоящее время в оптической спектроскопии все более популярным становится метод быстрого преобразования Фурье. Использование этого метода в ФАС аналогично применяемому при интерферометрическом получении спектров (см. рис. 5.8). Большинство производителей ИКПФ спектрометров в качестве дополнительных приспособлений предлагают специальные ячейки ФАС, позволяющие проводить ИКПФ-ФАС. Впервые этим методом были получены ИК спектры биологических образцов, слабо пропускающих в ИК области: гемоглобина, протопорфирина и пероксидазы; причем для анализа потребовался всего лишь миллиграмм образца (Rockley et al., 1980).

#### 7.7. Выводы и перспективы

Посредством ФАС можно получать новые данные относительно тепловых свойств образцов и изучать специфические (био)химические реакции метаболизма. Данный метод позволяет получать спектры поглощения совершенно мутных образцов *in vivo* и *in situ* (другую альтернативу общедоступной абсорбционной спектроскопии предоставляет диффузное отражение (глава 8.5) или полное внутреннее отражение (глава 8.6)). Кроме того, ФАС позволяет получать спектры поглощения целых образцов на различной глубине, в большой степени независимо от их оптических свойств. В отличие от классической абсорбционной спектроскопии в ФАС автоматически не измеряются эластично рассеянные и прошедшие фотоны. В абсорбционной спектроскопии сравнительный луч  $I_0$  (см. рис. 5.12 (в — д)) должен быть точно определен фотодетектором и последующей электроникой линейным и освобожденным от шумов образом как «балласт».

ФАС является дополнительным методом к обычной флуоресцентной спектроскопии, поэтому люминесцентные и фотохимические процессы измеряются косвенно. Неоптическая природа ФА сигнала, исключая оптические элементы между образцом и детектором, является его основным преимуществом.

Ограничения в применении ФАС связаны с относительно большими интенсивностями света, требуемыми по сравнению с абсорбционной и флуоресцентной спектроскопией (порядка 100 Вт/м<sup>2</sup>). Это может вызвать нежелательный фотолиз, например, неспецифическое фотоокисление и разрушение органических молекул. По-видимому, интерферометрия в сочетании с преобразованием Фурье обеспечит дальнейшее совершенствование этого метода в будущем (см. рис. 5.8). Чтобы исключить, насколько это возможно, влияние окна ячейки с образцом (источник интерферирующего сигнала) (см. рис. 7.2 и 7.3), оно должно плохо пропускать применяемые оптические источники излучения. Для многих спектральных диапазонов

это составляет огромную проблему. Поэтому в будущем фототермическая спектроскопия, для которой в принципе ячейка для образца, а следовательно, и окно не требуются, может стать основным методом ФАС. Несмотря на все ограничения, можно утверждать, что метод ФАС, как аналитический метод, будет приобретать все больший вес и в некоторых областях дополнять оптическую спектроскопию. Конечно, для расширения известных применений и открытия новых возможностей проблемой пока остается поиск производителей, выпускающих разнообразные и доступные ФА спектрометры.

## 7.8. Дополнительная литература

Adams, M.J., Beadle, B.C., King, A.A., Kirkbright, G.F. *Analyst* **1976**, 101, 5533.

Adams, M.J., King, A.A., Kirkbright, G.F. *Analyst* **1976**, 101, 73.

Adams, M.J., Kirkbright, G.F. *Analyst* **1977**, 102, 281.

Bell, A.G. *Philos. Mag.* **1881**, 11(5), 510.

Buschmann, C., Prehn, H. in: *Modern Methods of Plant Analysis*, Linskens, H.F., Jackson, J.F., eds. New Series, Vol 11, Physical Methods in Plant Sciences, Springer-Verlag, Berlin, **1990**, pp. 148-180.

Cahen, D., Bults, G., Garty, H., Malkin, S., *J. Biochem. Biophys. Meth.* **3**, **1980**, 293.

Campbell, S.D., Yee, S.S. *IEEE Trans. Biomedical Eng.* **1979**, 26, 220.

Garty, H., Caplan, S.R. *Biophys. J.* **1982**, 34, 405.

Garty, H., Cahen, D., Caplan, S.R., in: Caplan, S.R. and Ginzburg, M. (eds.), *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam: **1978**, 253-259.

Hader, D.-P., Terini, M. *Allgemeine Photobiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, **1985**.

Jabben, M., Heihoff, K., Braslavsky, S. E., Schaffner, K., *Photochem. Photobiol.* **40**, **1984**, 361.

Kanstad, S.O., Nordal, P.-E., Hellgren, L., Vincent, J. *Naturwissenschaften* **1981**, 68, 47.

Michaelian, K.H., Wineforder, J.D. *Photoacoustic Infrared Spectroscopy*, Wiley Inter-science, New York, **2003**.

Moore, T.A., in: *Photoacoustic Spectroscopy and Related Techniques Applied to Biological Materials*, Smith, K.C., ed., Photochemical and Photobiological Reviews, Vol. 7, Plenum, New York, **1984**, pp. 187-221.

Munroe, D.M., Reichard, H.S., *PAR Application Note* **147**, **1976**.

Pfund, A. H. *Science* **1939**, 90, 326.

Poulet, P., Chambon, J., Unterreiner, P. *J. Appl. Phys.* **1980**, 51, 1738.

Preece, W.H., *Proc. R. Soc. London* **1881**, 31, 506.

Rayleigh (Lord), *Nature (London)* **1881**, 23, 274.

Rockley, M.G., Davis D.M., Richardson, H.H., *Science* **210**, **1980**, 218.

Röntgen, W.C. *Philos. Mag.* **11**, **1881**, (5), 308.

Rosencwaig, A., in: *Adv. Electronics and Electron Physics*, Vol 46, L. Marton (ed.): New York Academic Press, **1978**.

- Rosencwaig, A., *Science* **1973**, 181, 657.
- Rosencwaig, A., *Rev. Sci. Instrum.* **1977**, 48, 1133.
- Rosencwaig, A. *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy (Chemical Analysis)*, John Wiley, New York, **1990**.
- Rosencwaig, A., Gersho, A.J. *Appl. Phys.* **1975a**, 47, 64.
- Rosencwaig, A., Gersho, A. *Science* **1975b**, 190, 556.
- Tarn, A.C. *Rev. Modern Phys.* **1986**, 58, 81.
- Tarn, A.C. Patel, C.K.N. *Optics Lett.* **1980**, 5, 27.
- Tyndall, J. *Proc. R. Soc. London* **1881**, 31, 307.
- Viengerov, M.L. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1938**, 19, 687.
- Wong, Y, Thomas, R.L., Hawkins, G.F., *Appl. Phy. Lett.* 32, **1978**, 538.

# ГЛАВА 8

## РАССЕЯНИЕ, ПРЕЛОМЛЕНИЕ И ОТРАЖЕНИЕ

Natura expelles furca, tamen usque recurret  
*Даже если изгнать природу, она всегда вернется*  
*Гораций*

### 8.1. Введение

При анализе процессов поглощения света образцом ( $A = \log I_0 - \log I$ ) установлено, что часть падающего на него света и не поглощается, и не доходит до детектора, но теряется в виде рассеяния (см. рис. 5.18). Наиболее известный пример этого явления — эффект Тиндаля (1869 г.), наблюдается от распределения частиц коллоидного размера: если луч белого света падает на кювету с водой, в которой размешана одна капля молока, то при перпендикулярном к лучу света наблюдении будет заметно голубоватое свечение воды, тогда как прошедший через кювету свет будет казаться красноватым. Аналогично закону Ламберта — Бера (см. главу 5.1.1), суммарная интенсивность рассеянного света описывается уравнением:

$$I(x) = I_0 e^{-S'x} \quad (8.1)$$

где  $I_0$  — интенсивность падающего луча света,  $I(x)$  — интенсивность света на глубине  $x$  вследствие потери в результате рассеяния, а  $S'$  — коэффициент рассеяния, известный также как мутность, коэффициент ослабления или кажущийся коэффициент экстинкции. Для разбавленных растворов поперечное сечение рассеяния  $\sigma_s$  получается непосредственным измерением поглощения мутного образца по формуле:

$$S' = N \times \sigma_s \quad (8.2)$$

где  $N$  — плотность частицы. В соответствии с названием,  $\sigma_s$  является эффективной площадью поперечного сечения рассеивающих частиц, отклоняющих падающий на них квант света. Термин «рассеяние» подразумевает различные физические явления: отражение, дифракцию, преломление и другие, которые влияют на геометрию траектории луча света, а также изменяют его длину волны. Рассеяние этого типа называется *неэластичным (неупругим)* в отличие от *эластичного (упругого)*, при котором не происходит изменения длины волны. Наиболее важным примером неэластичного

рассеяния служит рамановское рассеяние<sup>1</sup>, происходящее в результате воздействия квантов света на колебательные уровни энергии рассеивающей молекулы, что приводит к смещению частоты порядка  $10^{11}$ — $10^{13}$  Гц (видимому излучению соответствует частота  $10^{14}$  Гц).

Звуковые волны также могут подвергаться рассеянию. Первым это продемонстрировал французский физик Бриллюэн в 1915 г. Эффект был вызван взаимодействием обычных тепловых колебаний молекул и высокочастотного ( $10^8$ — $10^{10}$  Гц) света, в отличие от ФАС, где возбуждающий свет низкочастотно модулирован. Результатом этого является доплеровское смещение — небольшие смещения частоты на  $10$ — $10^6$  Гц, наблюдаемые при взаимодействии света с поступательным или вращательным движениями молекул или частиц. Это называется квазиэластичным рассеянием. Посредством измерения усредненной временной интенсивности эластичного рассеяния получают временные изменения интенсивности квазиэластичного рассеяния, называемого в таком случае *динамическим светорассеянием*.

В оптической спектроскопии нельзя игнорировать эффект рассеяния как в положительном, так и в негативном аспекте. С одной стороны, оно является причиной множества некорректных фотометрических измерений, а с другой стороны — открывает новое поле исследований и дает возможность произвести измерения, неосуществимые другими методами. Теория рассеяния достаточно универсальна, хотя и сложна. В данной главе будут рассмотрены основные аспекты этой теории, а также, как и ранее, будут приведены адаптированные существенные результаты без пространных выводов. Сначала будет рассмотрено эластичное рассеяние, затем квазиэластичное, а потом неэластичное рассеяние (рамановское).

*Эксперименты по рассеянию света не ограничиваются видимым диапазоном спектра, на чем будет сосредоточено внимание в данной главе. С помощью видимого света можно определить молекулярную массу даже самой маленькой молекулы (см. рис. 8.11). Однако структуру и размеры меньше  $200 \text{ \AA}$  в этом диапазоне нельзя определить, так как разрешение обратно пропорционально  $\lambda^2$ . Кроме того, все молекулы, в частности, составляющие воздух, обладают сильным поглощением при этих длинах волн и становятся прозрачными снова только в рентгеновском диапазоне, например, при  $1,54 \text{ \AA}$  часто используемой  $K_{\alpha}$ -линии Си. Однако в этой области доминирует рассеяние в прямом направлении с отклонением всего несколько градусов от направления падающего луча света. На основе так называемого малоуглового рассеяния рентгеновских лучей можно определить размеры различных молекул, таких, например, как рибонуклеазы ( $10 \text{ \AA}$ ), катализирующей расщепление рибонуклеиновой кислоты, или родопсина (поглощающего свет зрительного пигмента, см. рис. 6.23). Однако в данной главе рентгеновский диапазон не будет рассматриваться.*

Рассеяние света зависит, прежде всего, от отношения длины волны падающего света  $\lambda$  к размеру частицы  $d$ , тип и форма рассеивающей час-

<sup>1</sup> Прим. редактора: в русскоязычной литературе для данного вида рассеяния более принято название «комбинационного»



тицы имеют вторичное значение. Например, телескопы, сконструированные для астрономических наблюдений ночного неба, иногда используются для наблюдения солнечных затмений в ИК области. Для предохранения от солнечного света их закрывают светонепроницаемой полимерной пленкой, интенсивно рассеивающей в видимом диапазоне. Однако это не мешает проходить лучам ИК диапазона и получать прекрасное изображение. При обсуждении процессов рассеяния мы будем полагать концентрацию и/или толщину образца настолько малой, что будет происходить лишь однократное рассеяние. При этом средняя длина рассеяния, т.е. среднее расстояние между двумя процессами рассеяния, должна быть значительно больше толщины слоя исследуемого образца. В этом случае произведение коэффициента рассеяния  $S'$  и толщины слоя  $x$  меньше 1, что имеет место при отсутствии многократного рассеяния, для которого на сегодня не существует стандартизированной теории (см. главу 8.5.1). В зависимости от размера частицы  $d$  относительно длины волны  $\lambda$ , например, 633 нм He-Ne лазера, можно теоретически и практически выделить определенные типы рассеяния: *релеевское рассеяние* — между  $d = 1$  нм и  $0,1 \lambda \approx 60$  нм; *рассеяние Релея — Ганса — Дебая* — между 60 и 200 нм; *рассеяние Ми* — между 200 нм и 5 мм и *рассеяние Фраунгофера* — от 5 мм до 1 см.

Многие образцы, особенно в биологических и медицинских исследованиях, непрозрачны, и поэтому являются причиной многократного рассеяния. Например, это происходит при измерении спектров поглощения тканей типа цветка, суспензии водоросли или мазка крови. Особый интерес представляет изучение живых тканей *in vivo*. Таким образом, неинвазивным путем можно изучить влияние гербицидов на развитие листа, компонентов питательной среды на рост микроорганизмов или изменение содержания кислорода в крови человека при дыхании. В результате многократного рассеяния спектры поглощения и (диффузного) отражения становятся практически неразличимыми, что очень важно при измерении оптически непрозрачных, интенсивно рассеивающих образцов. Соответствующее количественное описание этих явлений дает теория Кубелки — Муна, более детально представленная в конце главы.

## 8.2. Упругое рассеяние

### 8.2.1. Вывод уравнения Релея

В классической теории рассеяния вектор электрического поля  $E$  (в  $z$ -направлении) линейно поляризованной электромагнитной световой волны (см. рис. 2.1) вызывает усиленное синусоидальное колебание «электронного облака» рассеивателя. Легкость или степень, с которой это происходит, зависит от *поляризуемости*  $a$ , описанной ранее. В результате перемещений электронов возникает электрический дипольный момент  $\mu$ . В различных направлениях  $a$  имеет разные значения (математически  $a$  является тензором): мы называем это *анизотропией* (см. главу 6.4). Предположим, что дли-



Джон Вильям Струтт,  
лорд Релей  
(1842—1919)



Генрих Рудольф Герц  
(1857—1894)

на волны возбуждающего света спектрально находится далеко от полосы поглощения, и нет интерференции с поглощением (рассеяние с сопутствующим поглощением будет обсуждено позже), тогда, в соответствии с законами электродинамики, диполь проявляет свойства излучающей антенны. Электрическая составляющая  $E$  входящей световой волны будет описываться следующим уравнением:

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu \left(t - \frac{x}{c}\right) \quad (8.3)$$

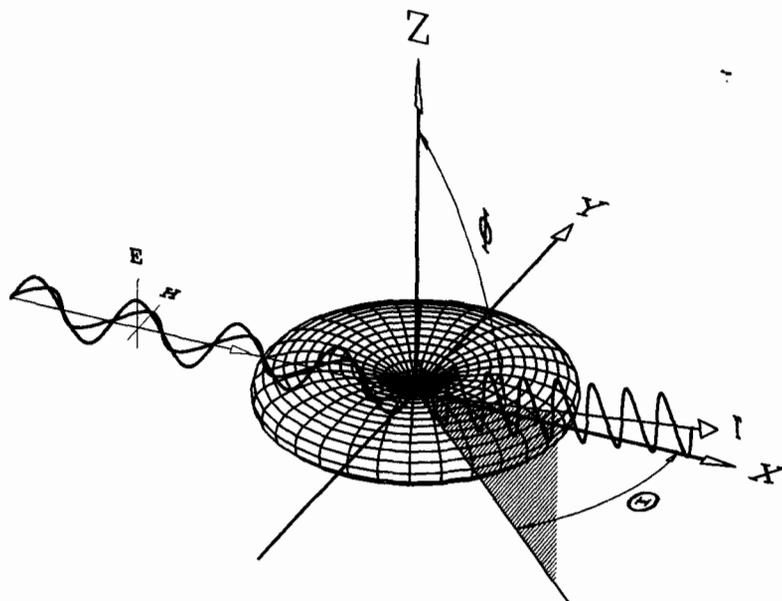


Рис. 8.1. Если возбуждающий свет монохроматический и вертикально поляризованный, то распределение релеевского рассеяния не зависит от азимутального угла  $\theta$ . Указаны электрическая ( $E$ ) и магнитная ( $H$ ) составляющие электромагнитного поля

а ортогональная ей магнитная составляющая  $H$  входящей волны будет описываться уравнением:

$$H = H_0 \cos 2\pi \nu \left(t - \frac{x}{c}\right) \quad (8.4)$$

Для последующих рассуждений важно только изменение электрического поля  $E$  в *рассеивающем центре*, где  $x = 0$ :

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu t \quad (8.5)$$

Электрическое рассеянное поле индуцирует, соответственно, осциллирующий диполь:

$$\mu = aE = aE_0 \cos 2\pi \nu t \quad (8.6)$$

В изотропных молекулах эти колебания осуществляются в ортогональном направлении  $z$ -оси. Прежде всего далее будет рассмотрен вариант мало рассеивающих частиц с размерами, существенно меньшими падающей длины волны (например,  $\lambda/20 = 25$  нм). В соответствии с теорией Максвелла, напряженность электрического поля  $E_r$  излучаемого (рассеянного) света на расстоянии  $r$  (см. рис. 8.1: точка  $r'$  на оси  $r$ ) и под углом  $\Phi$  к электрическому диполью  $\mu$  будет равна:

$$E_r = \left( \frac{aE_0 4\pi^2 \sin \Phi}{r\lambda^2} \right) \cos 2\pi \nu \left(t - \frac{r}{c}\right) \quad (8.7)$$

В уравнении 8.7 в скобках первая пара описывает амплитуду рассеянного света. А в соответствии с законами физики, интенсивность излучения пропорциональна квадрату амплитуды. По аналогии с определением пропускания света (см. уравнение 5.6) интенсивность рассеяния зависит от интенсивности падающего света  $I_0$ , и мы получаем знаменитое уравнение Релея:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{E_r}{E_0} = \frac{\left( \frac{aE_0 4\pi^2 \sin \Phi}{r\lambda^2} \right)^2}{E_0^2} = \frac{16\pi^4 a^2 \sin^2 \Phi}{r^2 \lambda^4} \quad (8.8)$$

Из этого уравнения можно сделать важные выводы:

- интенсивность рассеяния уменьшается с квадратом расстояния;
- интенсивность рассеяния зависит только от  $\sin^2 \Phi$ , а не от азимутального угла  $\theta$ . Визуально это можно представить вращающимся телом с соответствующим поперечным сечением вокруг оси  $z$  (см. рис. 8.1: поверхность с постоянной интенсивностью рассеяния);
- интенсивность рассеяния падает пропорционально четвертой степени длины волны. Этот вывод особенно важен для ультрафиолетовой спектроскопии. Например, рассеяние света с длиной волны

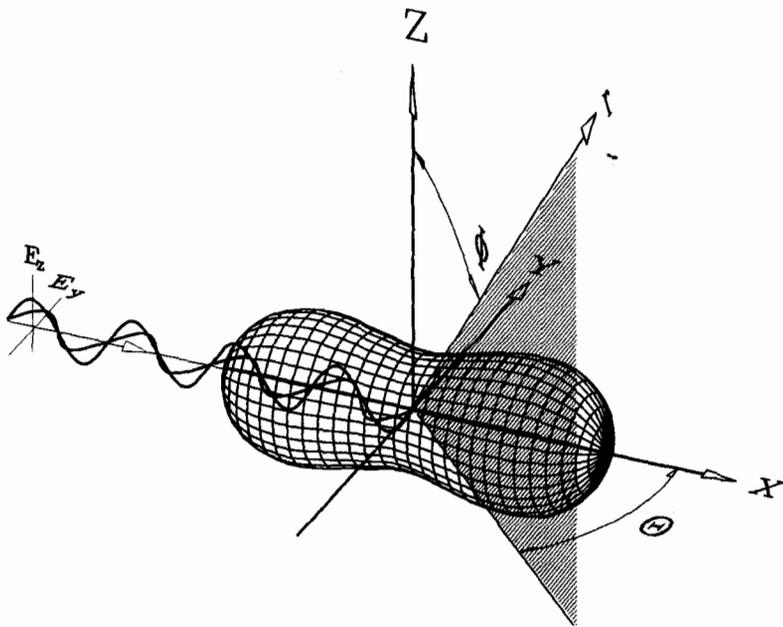
250 нм в 100 раз сильнее, чем рассеяние света с длиной волны 800 нм.

Наиболее часто приводимый пример релеевского рассеяния — голубой цвет неба, особенно яркий при высоком положении Солнца. Согласно релеевской теории рассеяния коэффициент рассеяния  $S'$  газом определяется по формуле:

$$S' = \frac{8\pi^3}{3N\lambda^4} (n^2 - 1)$$

где  $N$  — количество молекул в  $\text{см}^3$ , а  $n$  — показатель преломления. С уменьшением длины волны увеличивается коэффициент рассеяния. Яркие утренние и вечерние зори объясняются тем, что солнечный свет пересекает очень толстый слой газа, через который проходит в основном красный свет. Однако наименьшей длине волны видимого диапазона соответствует фиолетовый цвет, а не голубой. Но мы видим голубое небо, а не фиолетовое. Это объясняется спектральной восприимчивостью глаза человека и физической стимуляцией (см. главу 3.4; математически выражаясь, это — свертка (см. главу 5.4.4)).

При проведении экспериментов с рассеянием обычно используется неполяризованный падающий свет. Такой свет можно также назвать поляризованным во всех направлениях, поэтому мы должны вращать вращающееся тело (см. рис. 8.1) вокруг оси  $x$ , преобразуя зависимость от угла  $\Phi$



**Рис. 8.2.** Если возбуждающий свет монохроматический и неполяризованный, то распределение релеевского рассеяния зависит от азимутального угла  $\theta$  и угла  $\Phi$ . При этом электрическая ( $E$ ) и магнитная ( $H$ ) составляющая электромагнитного поля случайно распределены вдоль оси  $x$

в зависимость от угла  $\theta$ . Точный расчет, опущенный здесь, приводит после преобразований уравнения 8.8 к замене  $\sin^2 \Phi$  на  $(1 + \cos^2 \theta)/2$ :

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{8\pi^4 a^2}{r^2 \lambda^4} (1 + \cos^2 \theta) \quad (8.9)$$

Соответствующая поверхность рассеяния представлена на рис. 8.2. Она зеркально симметрична относительно плоскости  $y - z$ .

### 8.2.2. Определение молекулярной массы

Сначала будут рассмотрено рассеяние света множеством идентичных маленьких (по отношению к длине волны — точечных) не взаимодействующих друг с другом частиц, например, макромолекул в растворителе из гораздо более мелких молекул. Волны рассеяния, исходящие из определенных центров рассеяния (обычно атомов), обычно всегда совпадают по фазе, конструктивно интерферируя между собой, т.е. усиливают друг друга. В соответствии с законом Клауса — Мозотти, *поляризуемость*  $a$  независимых частиц в идеальном растворе зависит от показателя преломления  $n$ :

$$(n^2 - 1) = 4\pi N a \quad (8.10)$$

где  $N$  — плотность частиц.

В соответствии с уравнением 8.7, амплитуда рассеяния  $E_r$  пропорциональна поляризуемости  $a$ . Если облучить тонкий и чистый образец (например, воду) с толщиной слоя  $\Delta x$  монохроматическим светом

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu y \left( t - \frac{x}{c} \right),$$

то большая часть света пройдет через него. Только небольшая часть будет рассеяна в направлении пропускания:

$$E_s = E_0 \frac{4\pi^2 A a}{\lambda} \sin 2\pi \nu y \left( t - \frac{x}{c} \right)$$

После математических преобразований сложение прошедших сквозь образец и рассеянных световых волн дает синусоидальное колебание  $E_r$ , которое, однако, обладает небольшой фазовой задержкой  $\tau$  относительно волны падающего света:

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu y \left( t + \tau - \frac{x}{c} \right)$$

Это приводит к снижению скорости распространения света:  $c_{\text{H}_2\text{O}} = c_0/n$  в воде, откуда можно определить показатель преломления  $n$ .

Для растворенных рассеивающих макромолекул с поляризуемостью  $a$  по отношению к растворителю

$$n^2 - n_L^2 = 4N\pi a \quad (8.11)$$

или:

$$(n - n_L)(n + n_L) = 4\pi Na \quad (8.12)$$

Решение этого уравнения относительно  $a$ , при дополнении его концентрацией  $C$  (в г/см<sup>3</sup>) образца в растворе, дает:

$$a = \frac{(n + n_0)(n - n_0)}{4\pi} \frac{C}{C} \frac{C}{N} \quad (8.13)$$

Величина  $(n - n_0)/C$  характеризует специфическое возрастание показателя преломления  $n$  растворенного вещества, и его можно записать как  $dn/dC$ . Если  $N$  — общее количество растворенных молекул,  $M$  — молекулярная масса, а  $A$  — число Авогадро, то  $C/N = M/A$ . В хорошем приближении для сильно разбавленных растворов можно записать:  $n + n_0 = 2n_0$ . В результате получаем:

$$a = \frac{n_0}{2\pi} \left( \frac{dn}{dC} \right) \frac{M}{A} \quad (8.14)$$

Подставив уравнение 8.14 в уравнение 8.8, получаем рассеяние от одной частицы:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left( \frac{dn}{dC} \right)^2 M^2}{\lambda^4 r^2 A} (1 + \cos^2 \Theta) \quad (8.15)$$

Для  $N$  частиц интенсивность рассеяния увеличится в  $N = CA/M$  раз:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left( \frac{dn}{dC} \right)^2 (1 + \cos^2 \Theta)}{\lambda^4 r^2 A} CM \quad (8.16)$$

Введем понятие так называемого отношения Релея  $R_\Theta$ , включающего все измеряемые параметры:

$$R_\Theta = \frac{I_s}{I_0} = \frac{r^2}{1 + \cos^2 \Theta} \quad (8.17)$$

Применив еще одно обозначение

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left( \frac{dn}{dC} \right)^2}{A\lambda^4} \quad (8.18)$$

мы собираем вместе все оптические константы и окончательно получаем для идеального раствора, в котором рассеивающие молекулы не взаимодействуют друг с другом:

$$R_{\theta} = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dC}\right)^2}{A\lambda^4} = KCM \quad (8.19)$$

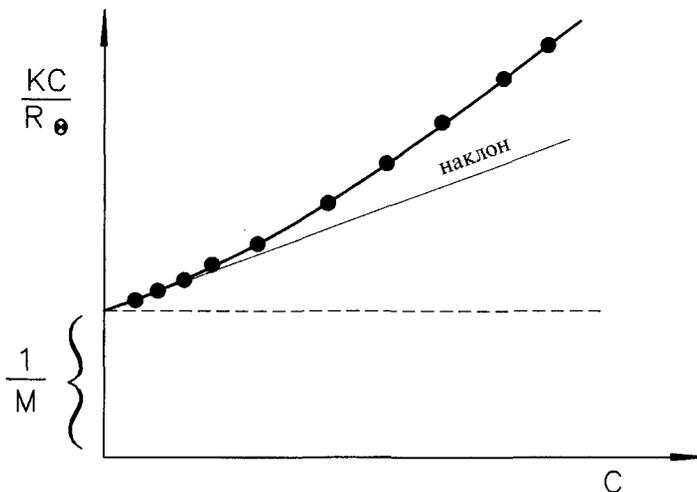
Уравнение 8.19 можно использовать для определения молекулярной массы  $M$ :

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \frac{1}{M} \quad (8.20)$$

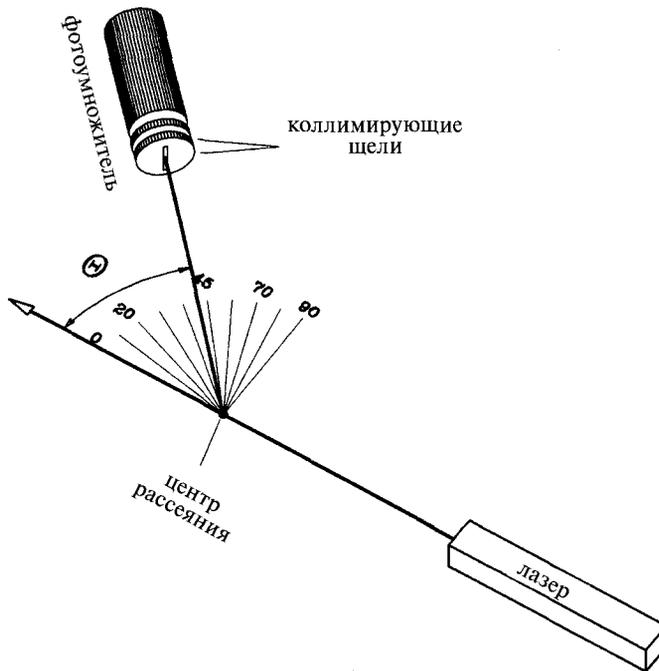
На практике, однако, имеют дело с неидеальными растворами, поэтому формула 8.20 в общем случае имеет вид:

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \frac{1}{M} + 2BC + \dots \quad (8.21)$$

В уравнении 8.21 присутствует так называемый второй (и даже более высокого порядка) вириальный коэффициент  $B$ , который учитывает взаимодействие частиц (с учетом того, что несколько частиц не могут находиться в пространстве в одном и том же месте в одно и то же время). Чтобы определить молекулярную массу  $M$ , необходимо построить зависимость рассеяния от концентрации и экстраполировать ее до  $C \rightarrow 0$  (см. рис. 8.3). Наклон этой функции прямо определяет коэффициент  $B$ . На рис. 8.4 представлена схема типичного устройства для измерения молекулярной массы,



**Рис. 8.3.** Измерение значений  $KC/R_{\theta}$  в зависимости от концентрации  $C$  позволяет из наклона полученной кривой при концентрации  $C \rightarrow 0$  определить вириальный коэффициент  $B$  и молекулярную массу  $M$



**Рис. 8.4.** Схема гониометра. Вращение защищенного от света фотодетектора позволяет определить зависимость интенсивности сигнала рассеяния от азимутального угла  $\theta$

так называемого гониометра. Раньше для получения коллимированного света применяли источники белого света с соответствующими фильтрами и точечными апертурами от 0,1 до 2 мм. Однако в настоящее время вместо них все чаще используется лазер, который является идеальным источником монохроматического и коллимированного света. В качестве фотодетектора применяется, как правило, помещаемый в светонепроницаемый корпус фотоумножитель, который может вращаться вокруг образца по специальной направляющей с точно отъюстированным в направлении падающего света азимутальным углом  $\theta$ .

Для определения молекулярной массы  $M$  в соответствии с уравнением 8.21 необходимо определить отношение Рэля  $R_\theta$  для нескольких концентраций  $C$ , например, при  $\theta = 90^\circ$ , и экстраполировать выражение  $KC/R_\theta$  до  $C \rightarrow 0$ . Кроме того, необходимо определить  $dn/dC$ , которое полагается постоянным. Так как разница между показателями преломления растворителя в присутствии и в отсутствие рассеивающих молекул незначительна (порядка  $10^{-5}$ , см. уравнение 8.14), то для этой цели используется наиболее чувствительный так называемый дифференциальный рефрактометр.

### 8.2.3. Рассеяние на больших частицах

В предыдущей главе были описаны рассеивающие свойства маленьких частиц, размеры которых намного меньше длины волны света. В этом случае



интенсивности рассеянного отдельными частицами света  $I_s$  можно просто сложить (см. уравнение 8.16). Если размеры рассеивающих частиц сравнимы с длиной волны падающего света  $\lambda$ , то в дополнение к показателям преломления частиц и среды ( $n_T - n_M$ ) необходимо учитывать размеры частиц и суммировать амплитуды, а не интенсивности рассеянных световых волн. Кроме того, возникает интерференция между центрами рассеяния. В отличие от релеевского рассеяния так называемое приближение Релея — Ганса — Дебая более сложно и трудно для интерпретации, но более информативно — кроме молекулярной массы  $M$  можно получить информацию о размерах и форме частиц. В анализе рассеяния больших частиц используются следующие параметры: длина волны  $\lambda$ , размер частицы  $d$  и расстояние  $r$  от частицы до детектора. В типичных экспериментах по рассеянию используется так называемое приближение дальнего поля ( $r > d^2/\lambda$ ). Ниже приводятся наиболее важные адаптированные результаты теории без подробностей их выводов.

В начале 20-го века немецкий ученый Ми получил абсолютное решение дифференциальных уравнений Максвелла для сферических частиц, используя общее приближение дальнего поля для сферических частиц (принимая во внимание граничные условия, уравнения Максвелла описывают пространственное и временное взаимодействие напряженности электрического ( $E$ ) и магнитного ( $H$ ) полей). Согласно ему, интенсивность рассеяния является комплексной функцией угла рассеяния  $\theta$ , отношения  $\lambda/d$ , направления поляризации и показателей преломления  $n_T$  и  $n_M$  частицы и среды. Расчеты на основе теории Ми весьма трудоемки, но достижимы с использованием компьютерной техники. Они показали, что, к сожалению, в «диапазоне Ми» (см. рис. 8.11) поперечное сечение рассеяния проявляет сильные вариации («осцилляции»), делая анализ затруднительным.

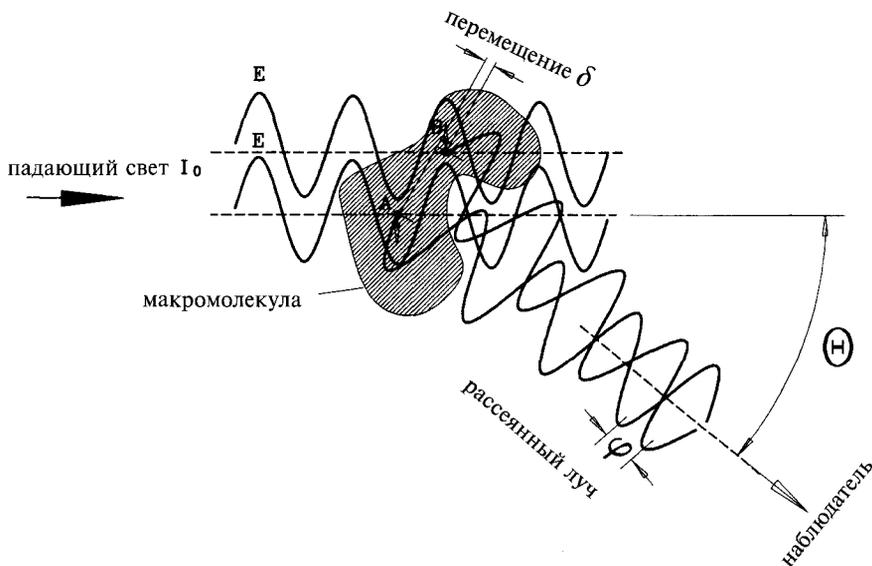


Рис. 8.5. Рассеяние коллимированного, монохроматического и когерентного света частицей, размеры которой сопоставимы с длиной волны света

Предположим, что коллимированный монохроматический луч света (лазера) попадает на рассеивающую частицу с молекулярной массой  $M$  (см. рис. 8.5). Этим светом возбуждаются с определенным фазовым сдвигом два центра рассеяния  $A$  и  $B$  (два отдельных атома молекулы), впоследствии излучающие свет с тем же фазовым сдвигом.

Для упрощения визуализации на рис. 8.5 изображены отдельные волны света, на самом деле, вследствие двойственной природы света, это — грубое приближение (см. главу 2.1): световое поле гомогенно. Если представлять свет как частицы, то типичный лазерный луч мощностью  $0,1$  мВт, длиной волны  $600$  нм и поперечным сечением  $1$  мм<sup>2</sup> представляет приблизительно  $10^{11}$  квантов/с = волне малой амплитуды на рассеивающей частице размером  $1$  мм<sup>2</sup>.

Если точка наблюдения ниже угла рассеяния  $\theta$ , то оба центра рассеяния оказываются на различных расстояниях  $\delta$ . В зависимости от рассеивающих частиц, показателей преломления и направления наблюдения возникает интерференция волн, которая может быть положительной или отрицательной. Если ввести так называемый коэффициент формы  $P(\theta)$ , учитывающий существенные эффекты интерференции, то свободное от интерференции релейское рассеяние малых (в сравнении с длиной падающей волны) частиц с одинаковой молекулярной массой  $M$  можно скорректировать в виде зависимости от  $\theta$  для получения текущей интенсивности рассеяния:

$$R_{\theta} \text{ (реальная частица)} = P(\theta) \times R_0 \text{ (чистое релейское рассеяние)} \quad (8.22)$$

Согласно теории, коэффициент формы в его общем виде можно записать как:

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{\sin hR_{ij}}{hR_{ij}} \quad (8.23)$$

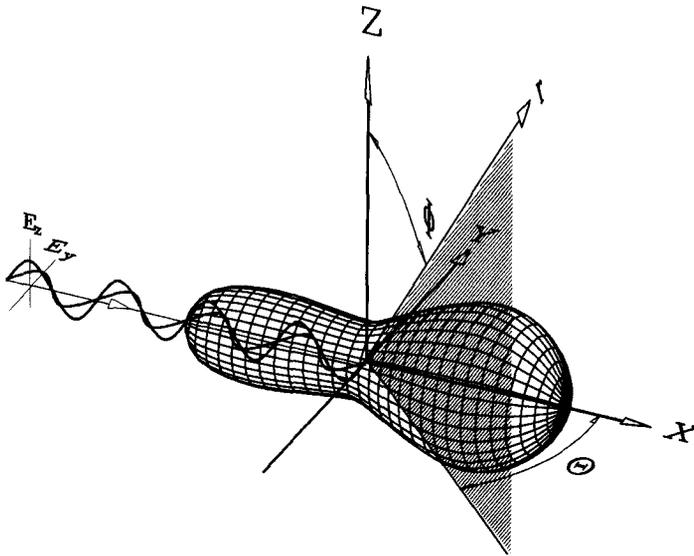
где  $N$  — количество центров рассеяния в молекуле (на рис. 8.5 только два центра рассеяния:  $A$  и  $B$ ),  $R_{ij}$  — расстояние между центрами рассеяния,  $h$  определяется как:

$$h = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (8.24)$$

где  $\lambda$  — длина волны света в исследуемой среде, связанная с длиной волны света в вакууме  $\lambda_0$  и показателем преломления  $n$  соотношением  $\lambda = \lambda_0/n$ . Уравнение 8.23 преобразуем, применяя ряды Тейлора:

$$\frac{\sin hR_{ij}}{hR_{ij}} = 1 - \frac{(hR_{ij})^2}{6} + \frac{(hR_{ij})^4}{120} + \dots \quad (8.25)$$

и, если рассматривать только два первых члена ряда, получаем для большинства рассеивающих молекул удовлетворительное приближение для коэффициента формы:



**Рис. 8.6.** С увеличением размеров частиц существенно увеличивается интенсивность рассеяния  $I_s$  с одновременным изменением распределения рассеянного света в направлении прямого рассеяния

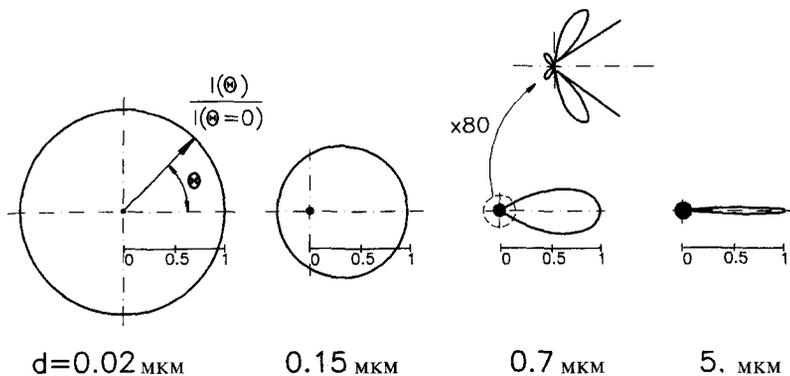
$$P(\theta) = 1 - \frac{h^2}{6N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N R_{ij}^2 \quad (8.26)$$

Для  $h \rightarrow 0$ ,  $R_{ij} \rightarrow 0$  и  $P(\theta) = 1$ , т.е. для очень малых частиц (в сравнении с  $\lambda$ ) и углов рассеяния получаем рассеяние Релея (см. рис. 8.7). По определению, коэффициент формы всегда  $\leq 1$ . С увеличением размеров частицы интенсивность рассеяния  $I_s$  существенно возрастает и в то же время изменяется распределение рассеянного света: умножение уравнения 8.9 на соответствующий коэффициент формы  $P(\theta) < 1$  приводит к прямому рассеянию, как показано на рис. 8.6. На рис. 8.7 это явление проиллюстрировано для различных размеров частиц и падающего на них лазерного света с  $\lambda_0 = 633$  нм.

Как и следовало ожидать, для молекулярных частиц различной формы, но с одинаковыми размерами, коэффициент формы будет принимать различные значения, так как условия для интерференции будут разными. Для оценки молекулярного размера был введен так называемый радиус гирации (вращения)  $R_G$ , который определяется распределением массы, т.е. момента инерции рассеивающей частицы: для частиц, состоящих из  $i$  элементов с массой  $m_i$  и расстоянием  $r_i$  от центра тяжести, можно записать:

$$R_G^2 = \frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i} = \frac{1}{2N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N R_{ij}^2 \quad (8.27)$$

Например, для сферы с радиусом  $r$  следует, что  $R_G = \sqrt{3/5} r = 0,775r$ , а для стержня длиной  $L$   $R_G = (12)^{-1/2} L = 0,289L$ .



**Рис. 8.7.** Рассеяние лазерного света с  $\lambda_0 = 633$  нм частицами различных размеров (согласно Wiese, GIT Fachz. Lab., 1992)

Для небольших углов  $\theta$  коэффициент формы  $P(\theta)$  будет определяться по формуле, даже если он недостаточно подходит для молекулярного объема среды:

$$P(\theta) \cong e^{-\frac{k^2 R_G^2}{3}} \quad (8.28)$$

Согласно этой формуле, например, расчетный радиус гирации вируса табачной мозаики (стержнеподобной формы длиной 300 нм и диаметром 18 нм) будет равен 92,4 нм, а молекулярная масса  $M = 39 \times 10^6$ ; а для миозина, необходимого для построения толстых волокон мышечной ткани,  $R_G = 46,8$  нм и  $M = 49 \times 10^4$ .

В более общем случае, представляемым уравнением 8.21<sub>2</sub> следует включить коэффициент коррекции  $P(\theta)$ :

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{P(\theta)} \left( \frac{1}{M} + 2BC \right) \quad (8.29)$$

Подставив уравнение 8.26 в уравнение 8.29, получаем:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left( 1 + \frac{16\pi^2 R_G^2}{3\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} \right) \left( \frac{1}{M} + 2BC \right) \quad (8.30)$$

Чтобы получить  $1/M$ , а затем и  $M$ , необходимо экстраполировать концентрацию  $C$  к 0 и угол рассеяния  $\theta$  к 0. Следуя элегантному методу Зимма, для этого строится обобщенная диаграмма. Каждое измерение  $R_\theta$  дает определенные значения  $C$  и  $\theta$ , которые откладываются на рис. 8.8 при условии, что либо  $C$ , либо  $\theta$  остается неизменным. Диаграмма получается в виде сетки, по ней определяются значения  $R_G$ ,  $B$  и  $M$ . Специально выбранная  $C = 2000$  просто позволяет изобразить соответствующую диаграмму. В соответствии с уравнением 8.30, можно получить требуемые зависимости при  $C = 0$  и  $\theta = 0$  простым перемещением  $C$  и  $\theta$  к 0, соответственно.

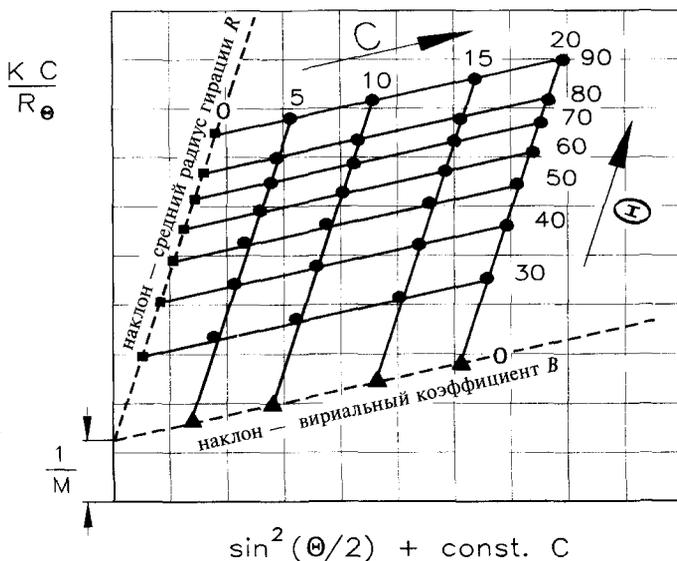


Рис. 8.8. На основе так называемой диаграммы Зимма можно одновременно определить параметры  $R_g$ ,  $R_g$  и  $M$

### 8.2.4. Рассеяние Фраунгофера

Рассеяние Фраунгофера следует из теории рассеяния Ми для больших сферических частиц и неполяризованного света, а также из приближения дальнего поля классической теории Френеля — Кирхгоффа по рассея-

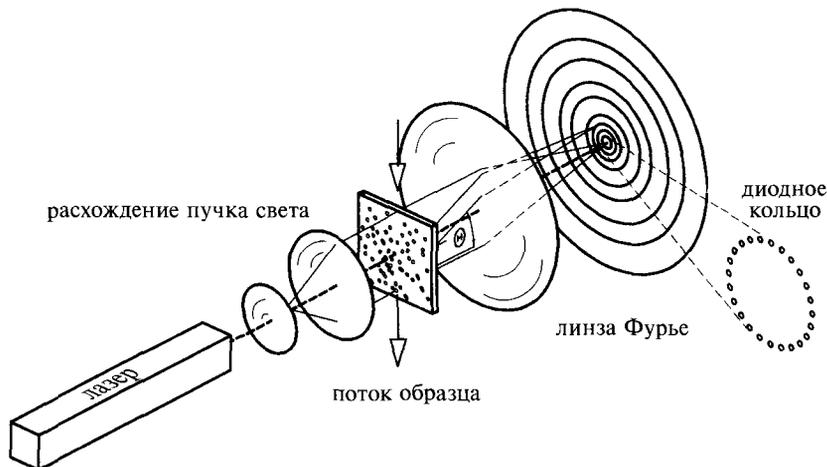
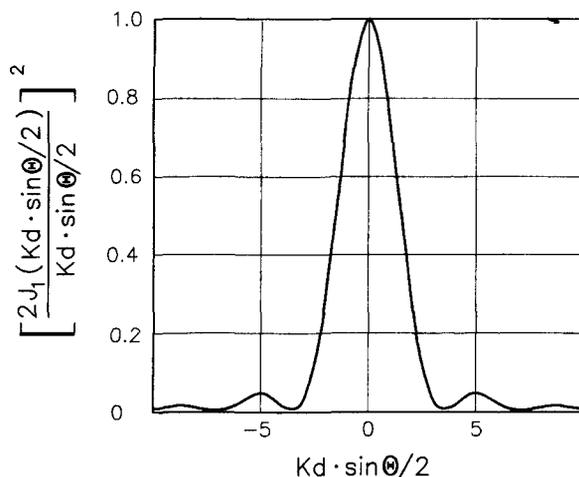


Рис. 8.9. Рассеяние Фраунгофера на больших частицах дает последовательность рефракционных колец, интенсивность которых быстро уменьшается с увеличением азимутального угла  $\theta$ . В устройстве для измерения рассеяния Фраунгофера используются до 30 детектирующих колец (или дуг от этих колец). С помощью так называемой линзы Фурье рассеянный свет фокусируется на одно и то же кольцо (согласно Wiese, GIT Fachz. Lab., 1992)

нию света (дифракция на узкой щели, см. главу 3.6.3). Согласно теории, сферические частицы дают картину рассеяния в виде ряда дифракционных колец, интенсивность которых быстро уменьшается с увеличением азимутального угла  $\theta$  (см. рис. 8.9). Интенсивность рассеяния  $I_s$  описывается так называемой функцией Эйри, где  $J_1$  — функция Бесселя первого порядка (цилиндрическая). Она является решением дифференциального уравнения Бесселя с параметром  $n$ , определяющим «порядок» и являющимся здесь целым числом; ниже указан только аргумент  $[Kd \sin(\theta)/2]$  функции:

$$I_s = \text{const.} \times d^4 \times K^2 \left[ \frac{2J_1(Kd \times \sin \theta / 2)}{Kd \times \sin \theta / 2} \right]^2 \quad (8.31)$$

$K$  описывается так называемый вектор волны. В зависимости от показателей преломления частицы и среды, можно определить частицы с размерами  $d \geq 5\lambda$ . Согласно уравнению 8.31, чем меньше частица, тем на больший угол будет рассеиваться падающий на нее свет (см. рис. 8.10). Например, для света  $\lambda_0 = 633$  нм и частицы с диаметром  $d = 4$  мкм мы получим первый максимум рассеяния на поверхности конуса с углом сбора  $\theta = 9^\circ$ . Специфической особенностью измеряющего рассеяние приспособления на рис. 8.9 является линза Фурье, фокусирующая рассеянный частицей определенного размера свет на одном из 30 детектирующих диодных колец независимо от их расположения и скорости. Эффект интеграции значительно увеличивает отношение сигнал/шум. Все это выполняется при условии отсутствия поглощения и множественного рассеяния, т.е. для сильно разбавленных рассеивателей (например, при концентрации 1 мг л<sup>-1</sup>). Этот метод

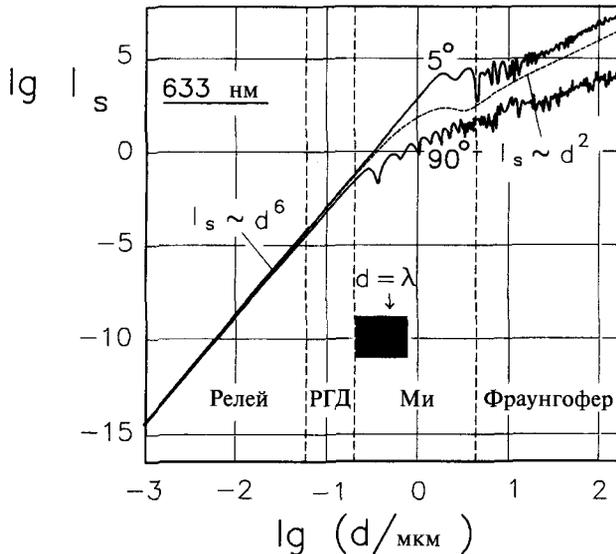


**Рис. 8.10.** Зависимость интенсивности  $I_s$  рассеяния Фраунгофера от азимутального угла  $\theta$ , описываемая так называемой функцией Эйри. При этом  $J_1$  — функция Бесселя первого порядка (цилиндрическая функция), скобки числителя которой указывают на то, что это — функция, и она не может быть разделена на знаменатель, являющийся реальным числом (согласно Wiese, GIT Fachz. Lab., 1992)

анализа достаточно быстрый (1 мин/анализ) и относительно простой. Как и в случае динамического светорассеяния, требуется лишь незначительная информация об образце.

### 8.2.5. Интенсивность рассеяния $I_s$ и размер частицы

На рис. 8.11 представлена нормализованная зависимость интенсивности рассеяния  $I_s$  и поперечного сечения рассеяния  $\sigma_s$  от размеров частицы  $d$  в диапазоне от  $10^{-3}$  до 200 мкм, [в значительной степени] перекрывающем видимый спектральный диапазон. В то время как интенсивность рассеяния во всем измеряемом диапазоне возрастает на 20 порядков, диаметр частицы увеличивается всего на 5 порядков. В этом примере сферические частицы с показателем преломления  $n_T = 1,59$  суспендировали в среде с показателем преломления  $n_M = 1,33$  и облучали светом с длиной волны  $\lambda_0 = 633$  нм (He-Ne лазер). Рассеяние наблюдали под азимутальными углами  $\theta = 5^\circ$  и  $90^\circ$ , соответственно, и, для большей наглядности, зависимость представили в логарифмическом масштабе по обеим осям. В соответствии с теориями Релея, Релея — Ганса — Дебая (РГД), Ми и Фраунгофера, можно провести разграничение между различными видами рассеяния в зависимости от размеров рассеивающих частиц.



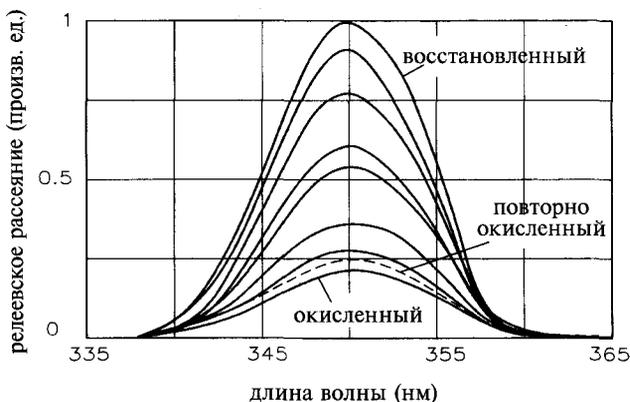
**Рис. 8.11.** Нормализованная зависимость интенсивности рассеяния  $I_s$  и поперечного сечения рассеяния  $\sigma_s$  от размеров частицы  $d$  в диапазоне от  $10^{-3}$  до 200 мкм. Интенсивность рассеяния возрастает на 20 (!) порядков, тогда как размер частицы увеличивается всего на 5 порядков. В соответствии с теориями Релея, Релея — Ганса — Дебая (РГД), Ми и Фраунгофера, можно выделить различные области размеров частиц, ответственных за эти виды рассеяния. Видимая область указана серым прямоугольником (согласно Wiese, GIT Fachz. Lab., 1992)

«Сглаженная» зависимость в области рассеяния Релея и РГД удивительна, она не зависит от угла рассеяния  $\theta$ , а интенсивность рассеяния в этой области пропорциональна диаметру частиц в 6-ой степени: если диаметр частиц мал по сравнению с падающей длиной волны, все центры рассеяния  $P$  рассеивающих частиц находятся в фазе (см. рис. 8.5). При когерентном рассеянии поле рассеиваемого света  $E_s$  пропорционально количеству центров рассеяния  $P$ , и интенсивность рассеянного света  $I_s$  будет равна:

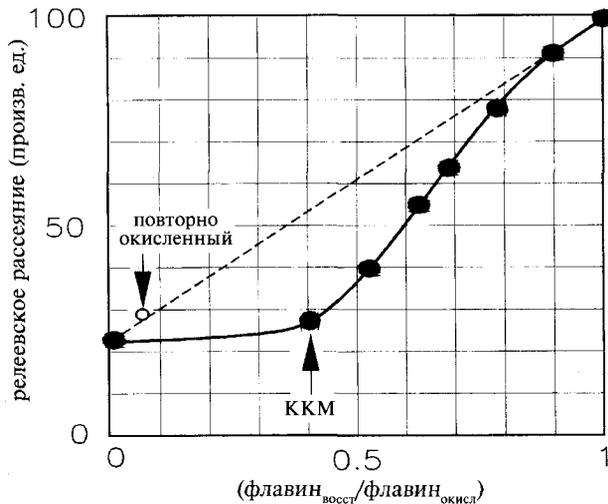
$$I_s = E_s^2 = (P \times E)^2 = P^2 \times E_s^2 \quad (8.32)$$

Ясно, что количество центров рассеяния на частицу  $P$  пропорционально объему частицы, т.е. пропорционально  $d^3$ , следовательно,  $I_s \approx d^6$ . Соответственно, даже самое небольшое загрязнение типа отпечатка пальца или небольшой прилипшей соринки способно привести к получению ошибочных результатов. Поэтому перед измерением рассеяния образцы тщательно очищают.

Чрезвычайная зависимость поперечного сечения рассеяния от размера частицы позволяет проводить высокочувствительные измерения. Например, при анаэробном фотовосстановлении 3-метилфлавина (см. рис. 6.7) спонтанно агрегирует в присутствии ЭДТА (этилендиаминететраацетата), хелатирующего агента (см. главу 6.6.4), образуя слабо связанный комплекс. Удивительно изменяющееся поперечное сечение рассеяния можно наблюдать с помощью обычного флуориметра (см. главу 6.3.1) при относительно низкой длине волны возбуждения 350 нм (рассеяние  $\sim \lambda^{-4}$ ). Сканирование длины волны эмиссии от 335 до 365 нм (см. рис. 8.12) позволяет наблюдать пик релеевского рассеяния под углом  $90^\circ$  (см. рис. 6.11). Если последовательно открывать кювету для того, чтобы образец контактировал с кислородом, молекулы флавина спонтанно и обратимо окисляются, что проявляется по возникновению флуоресценции, которой обладает только окисленная форма флавина. Комплекс распадается



**Рис. 8.12.** Зависимость релеевского рассеяния от фотовосстановления 3-метилфлавина в присутствии ЭДТА (этилендиаминететраацетата), хелатирующего агента. Реакция чрезвычайно обратима



**Рис. 8.13.** Зависимость релеевского рассеяния от образования агрегатов 3-метилфлавиона в присутствии ЭДТА (этилендиаминететраацетата). При определенном соотношении концентраций восстановленной и окисленной формы флавиона, соответствующем критической концентрации мицеллообразования (ККМ), происходит образование агрегатов

на отдельные составляющие. Зависимость, представленная на рис. 8.13, отображает состояние фотовосстановления в виде зависимости от рассеяния. Очевидно, что агрегация не является простым или тривиальным линейным эффектом, но проявляется более существенной кооперацией (явление, происходящее при связывании кислорода кровью), выражающейся в образовании мицелл. Измерения рассеяния в зависимости от температуры дают значение свободной энергии образования агрегатов  $\Delta G = 48$  кДж/моль, предполагая наличие 5–10 водородных связей на агрегат. Простые измерения рассеяния, особенно в (био)химическом анализе, весьма информативны для определения очень маленьких изменений размеров  $d$  и/или поляризуемости  $a$  молекулярного комплекса или рассеивающей частицы: можно контролировать фазовые переходы в мембранах без использования флуоресцентных зондов, могущих вызывать интерференцию (см. главу 6.6.3).

Если размер частицы  $d$  становится соизмеримым с длиной волны падающего света  $\lambda$ , ситуация становится более сложной, особенно при больших азимутальных углах  $\theta$  (см. рис. 8.11). Вследствие интерференции доминирующим становится прямое рассеяние. В области Ми начинают происходить существенные и быстрые изменения поперечного сечения рассеяния при изменении размера частицы, что весьма затрудняет анализ. Интересно, что кривая на рис. 8.11 обнаруживает значительный изгиб в видимом спектральном диапазоне, после чего рассеяние начинает зависеть приблизительно только от квадрата диаметра частицы (диаметра ее поперечного сечения). Следует отметить, что измерения рассея-

ния более чувствительны и точны, если размер частицы  $d$  меньше длины волны  $\lambda$ .

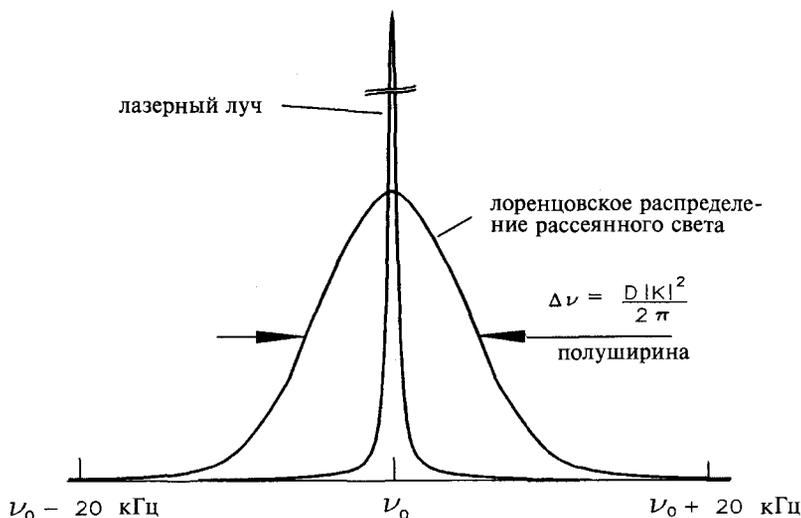
### 8.2.6. Динамическое рассеяние

Когда ранее мы изучали статический, усредненный во времени рассеянный свет, нас не интересовало динамическое или квазиупругое рассеяние. Измеряя временные флуктуации рассеяния интенсивности или (малые!) смещения длины волны, мы получаем информацию о динамике системы и о распределении размеров частиц. По-прежнему, мы полагаем рассеяние некогерентным, т.е. взаимную независимость частиц. Лазерный свет с полушириной  $\Delta\lambda = 0,01 \text{ \AA}$ , соответствующей  $\Delta\nu = 50 \text{ Гц}$ , расширяется до  $\Delta\nu = 20 \text{ кГц}$  за счет доплеровского уширения (см. рис. 8.14). Интенсивность рассеяния можно описать спектральным распределением Лоренца:

$$I_s(\nu) = \frac{\frac{DK^2}{2\pi}}{(\nu - \nu_0)^2 + \left[\frac{DK^2}{2\pi}\right]^2} \quad (8.33)$$

где  $\nu_0$  — частота лазерного света,  $D$  — коэффициент диффузии,  $K$  — модуль вектора волны рассеянного света:

$$|K| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (8.34)$$



**Рис. 8.14.** Вследствие доплеровского уширения лазерный свет полушириной  $\Delta\lambda = 0,01 \text{ \AA}$ , что соответствует  $\Delta\nu = 50 \text{ Гц}$ , расширяется рассеянием движущихся частиц до  $\Delta\nu = 20 \text{ кГц}$ . Интенсивность рассеяния описывается спектральным распределением Лоренца

Явления рассеяния описываются векторной символикой, так как «луч света» имеет направление. Вектор падающего света описывается как  $\mathbf{k}_0 = 2\pi/\lambda \mathbf{e}_0$ , где  $\mathbf{e}_0$  — единичный вектор, а  $2\pi/\lambda$  — его амплитуда. Соответственно, вектор рассеянного света  $\mathbf{k}_s$  в направлении  $\theta$  имеет ту же амплитуду и единичный вектор  $\mathbf{e}_s$ . Вектор волны определяется как разность векторов  $\mathbf{K} = \mathbf{k}_0 - \mathbf{k}_s$ , модуль этого вектора определяется уравнением 8.34 на основе геометрического аргумента.

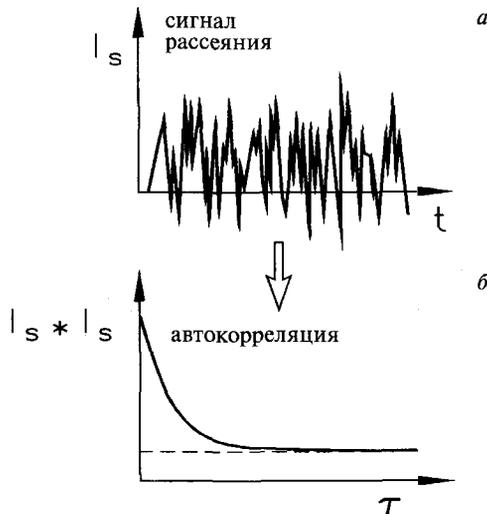
В соответствии с классической кинетической теорией газа, расстояние  $l$ , проходимое частицей вследствие диффузии за время  $t$ , пропорционально корню квадратному интервала времени. Постоянная пропорциональности  $D$  и среднее расстояние  $l$ , проходимое частицей в единицу времени, связаны соотношением:  $D = l^2/t$ . Диффузия в микромасштабе, в отличие от наших макроскопических представлений, — очень быстрый процесс. В соответствии с законами термодинамики, средняя скорость частиц газа с массой  $m$  равна:

$$\bar{u} = \sqrt{\frac{3}{m} \times \chi \times T} \quad (8.35)$$

где  $T$  — абсолютная температура,  $\chi$  — постоянная Больцмана. Так, в случае теплового равновесия (при комнатной температуре) частицы диаметром 0,5 мкм и плотностью 1 г/см<sup>3</sup> перемещаются со скоростью 5 000 мкм/с (что в 10 000 раз больше диаметра частицы). При упругом рассеянии теория дает величину доплеровского уширения (перераспределение энергии → квазиупругое рассеяние)  $\Delta\nu = DK^2/2\pi$ , что позволяет экспериментально определить  $D$ . Однако, как упоминалось выше, ожидаемое изменение частоты невелико.

Даже в сотом порядке рассеяния разрешающая способность дифракционной решетки шириной 10 см с 1 200 штрихами на мм составляет «только»  $R = 10^6$  (см. уравнение 3.34), что все еще далеко от требуемой  $R = \nu_0/\nu = 10^{14}/50$ . Следовательно, необходимо использовать другие методы измерения. Первый из них упомянем лишь вкратце: специальным опто-электронным способом (*самопенсирующей спектроскопией*) исключается сдвиг  $\nu_0$  рассеянного света, что позволяет легко измерить спектральное распределение рассеянного света, представленное на рис. 8.14. Для типичных макромолекул наподобие белков в водных растворах значения  $D$  были определены в интервале от  $10^{-6}$  до  $10^{-8}$  см<sup>2</sup> с<sup>-1</sup>.

Второй метод основан на статистическом измерении флуктуаций сигнала рассеяния, аналогично определению электронного шума (см. главу 5.2.5). Этот зависящий от времени сигнал рассеяния прямо связан с тепловым (Броуновским) движением образца и от влияющих на это условий. Маленькие частицы движутся быстрее больших, что отражается шириной полосы «шумового сигнала» (см. рис. 8.15). Средняя скорость релаксации переноса составляет  $10^2$ – $10^5$  Гц. Как упоминалось в главе 5.4.4.1, метод автокорреляции является универсальным инструментом анализа сигналов. Так, автокорреляция прямоугольных импульсов дает треугольный импульс (см. рис. 5.43). Соответственно, автокорреляция шумового



**Рис. 8.15.** *a* — изменение сигнала рассеяния  $I_s$  во времени; *b* — автокорреляция  $I_s * I_s$  сигнала рассеяния дает экспоненциальную функцию с временем корреляции  $\tau$  (согласно Wiese, GIT Fachz. Lab., 1992)

сигнала дает экспоненту с временем корреляции  $\tau$ :

$$g(\tau) = 1 + \xi \times e^{-2DK^2\tau} \quad (8.36)$$

где  $0 < \xi < 1$  представляет постоянную, зависящую от типа используемой аппаратуры. Коэффициент  $2DK^2$  в показателе степени уравнения 8.36 является средней скоростью релаксации, из которой определяется точно коэффициент диффузии  $D$ . А из него, в соответствии с уравнением Стока — Эйнштейна:

$$D = \frac{\chi T}{3\pi \eta d} \quad (8.37)$$

где  $\chi$  — постоянная Больцмана и  $\eta$  — вязкость дисперсионной среды, можно определить диаметр частиц  $d$ . Динамическое рассеяние света дает возможность определения коэффициентов диффузии в диапазоне от  $10^{-9}$  до  $10^{-6} \text{ см}^2\text{с}^{-1}$ , что соответствует размеру частиц от 5 нм до 5 мкм.

### 8.3. Рамановское рассеяние и инфракрасная спектроскопия

В отличие от упругого рассеяния рамановское рассеяние (Раман, 1928 г.) молекул изменяет длину волны падающего света. Экспериментальная установка аналогична представленной на рис. 8.4 с фиксированным углом наблюдения, как правило,  $90^\circ$ . Изменение длины волны рассеянного света происходит при взаимодействии падающего света с колебательными квантами рассеивающей молекулы. При упругом рассея-

нии мы имеем дело с усиленными колебаниями рассеивающей частицы, при облучении которой светом возникает дипольный момент, пропорциональный поляризуемости  $a$ , которая предполагается постоянной для данной молекулы. Однако в реальных условиях с изменением частоты колебаний молекулы  $\nu_0$  ее поляризуемость  $a$  будет тоже изменяться.

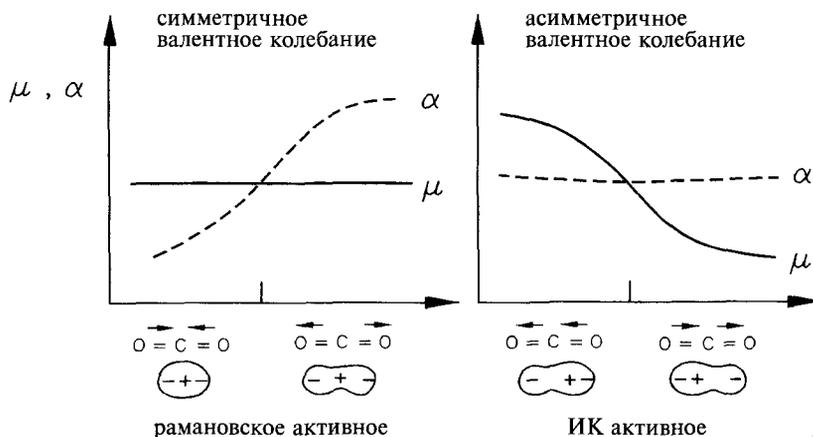
Это можно продемонстрировать на примере линейной молекулы  $\text{CO}_2$ . Наподобие того, как это было сделано в главе 2.3.3.3, рассмотрим соответствующие формы колебаний, изображенные на рис. 8.16. В принципе, колебания могут быть симметричными и асимметричными (см. рис. 10.2). При симметричных колебаниях с изменением частоты возбуждающей волны  $\nu_0$  изменяется размер «электронного облака» и его «пластичность», т.е. его поляризуемость  $a$ :

$$a = a_0 + a_M \cos 2\pi \nu_M t \quad (8.38)$$

где  $a_M$  — амплитуда изменения поляризуемости. После подстановки в уравнение 8.6 получаем:

$$\mu = a_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 + \frac{1}{2} a_M E_0 [\cos 2\pi (\nu_0 + \nu_M) t + \cos 2\pi (\nu_0 - \nu_M) t] \quad (8.39)$$

Первый член уравнения 8.39 соответствует обычному диполю Герца, т.е. релейевскому рассеянию с частотой  $\nu_0$ . Второй член этого уравнения соответствует диполю, который колеблется с частотой, изменяющейся на



**Рис. 8.16.** Представление форм активных рамановского и ИК колебаний молекулы  $\text{CO}_2$ . При активном рамановском колебании изменяется поляризуемость  $a$ , а при активном ИК колебании — дипольный момент  $\mu$

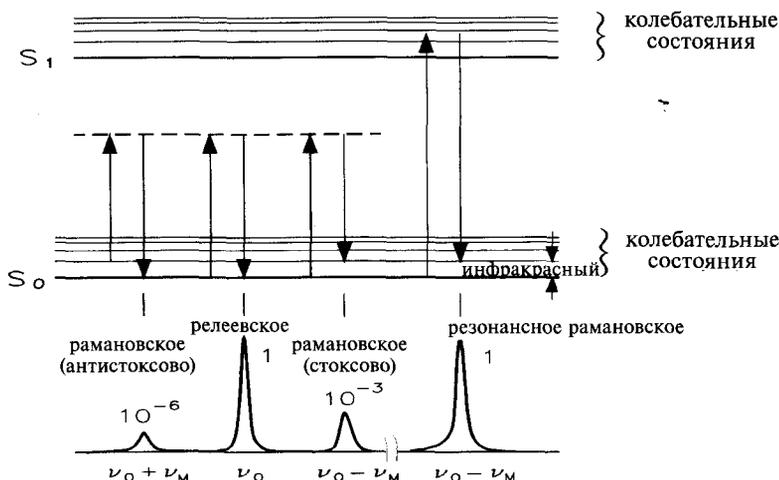


**Сэр Чандрасекхара  
Венката Раман**  
(1888—1970)

$\pm \nu_M$ . Продолжая аналогию с ранее упомянутыми антеннами, можно утверждать, что модуляция частоты  $\nu_0$  падающей световой волны, помимо релеевского пика, приводит к получению так называемых боковых полос (нижней и верхней) (см. рис. 8.17). Образно говоря, верхняя боковая полоса соответствует рассеянной волне, которая взяла квант от рассеивающей молекулы, а нижняя боковая полоса соответствует волне, которая отдала квант. Полосы, смещенные в низкочастотную область ( $\nu_0 - \nu_M$ ), называются стоксовыми, а в высокочастотную ( $\nu_0 + \nu_M$ ) — антистоксовыми рамановскими линиями. Конечно, колебательный квант, если он действительно существует, может быть отдан, только если рассеивающая молекула уже находится в возбужденном колебательном состоянии. Однако, в соответствии с распределением Больцмана, при комнатной температуре вероятность этого  $p$  очень мала:

$$p = e^{-\frac{h\nu_M}{kT}} \quad (8.40)$$

При комнатной температуре для типичной колебательной полосы эта вероятность приблизительно равна 0,001. Следовательно, антистоксово рамановское рассеяние чрезвычайно мало, и в практической работе используется исключительно стоксово рамановское рассеяние. Кроме того, вероятность возбуждения очень мала:  $I_s = 10^{-6} I_0$ . Это требует очень интенсивных и в то же время монохроматичных источников света, что в настоящее время вполне возможно благодаря современным лазерам. Возникающее в этом



**Рис. 8.17.** Пик релеевского рассеяния на частоте  $\nu_0$  и две боковые полосы рамановского [комбинационного] рассеяния с соответствующими энергетическими переходами. Приведенные относительные интенсивности рассеяния условны и не соответствуют точно изображенной диаграмме. Более низкочастотная полоса соответствует стоксову, а более высокочастотная полоса — антистоксову рассеянию. Резонансные рамановские линии наблюдаются, если рассеянный свет индуцируется только электронным переходом (поглощением)

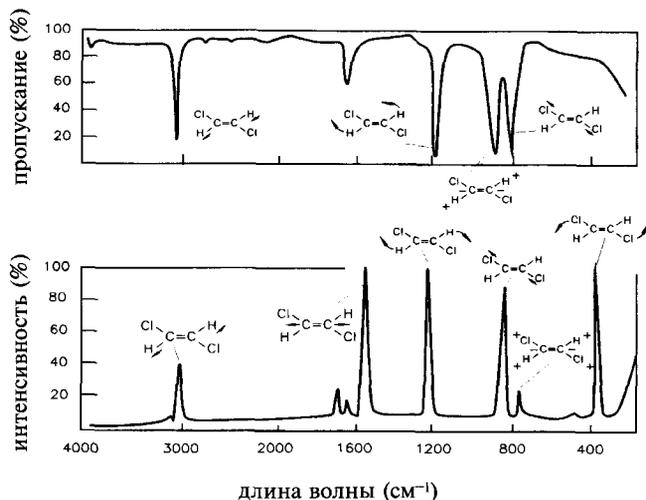
случае сильное релеевское рассеяние можно подавить использованием эффективных узкополосных фильтров (см. главу 3.6).

В случае асимметричных колебаний (см. рис. 8.16, справа) все происходит с точностью до наоборот: в отличие от дипольного момента  $\mu$  молекулы изменения поляризуемости  $a$  практически не происходит. Изменение электрического дипольного момента уже обсуждалось в главе 2.3.3.4, как необходимейшее условие любого поглощения, это сохраняется и при колебательных переходах. Таким образом, можно сделать выводы:

- асимметричные колебания вызывают изменения электрического дипольного момента  $\mu$  молекулы, что проявляется в активных ИК колебаниях и не имеет места в рамановских спектрах;
- симметричные колебания приводят к изменению поляризуемости  $a$  и, следовательно, активны в рамановских спектрах. Они не проявляются в инфракрасных спектрах.

В обоих случаях измеряется колебание молекул, однако оно основано на разных физических явлениях, в большой степени идеальным образом дополняющих друг друга. Иногда пики проявляются в обоих типах спектров, но с весьма различающимися интенсивностями: как это часто бывает в квантовой механике, разделение на симметричные и асимметричные колебания довольно условно, и мы имеем дело с колебаниями обоих типов.

На рис. 8.18 приведены ИК и рамановский спектр *транс*-дихлорэтана. Наиболее интенсивные пики соответствуют отдельным формам колебаний. Инфракрасный спектр обычно представляют в перевернутом виде



**Рис. 8.18.** Сравнение инфракрасного и рамановского спектра *транс*-дихлорэтана. Наиболее интенсивные пики отнесены к отдельным формам колебаний. Инфракрасный спектр принято изображать в «перевернутом виде» [в шкале пропускания], а рамановский — в «восходящем» [в шкале интенсивности рассеяния] (согласно Hesse et al., Thieme Verlag)

(часто в логарифмическом масштабе), а рамановские спектры — в обычном виде (и в линейном масштабе). В то время как длина волны инфракрасного спектра дается в абсолютных значениях, рамановский спектр всегда изображается в относительных частотах по отношению к длине волны возбуждения.

Так как интенсивность рассеяния зависит от поляризуемости  $a$ , то в сравнении с возбуждающим светом рассеянный свет будет всегда в некоторой степени деполяризован. Если падающий свет, например, вертикально поляризован, то деполяризация рассеянного света составит:

$$\rho = I_{\perp} / I_{\parallel} \quad (8.41)$$

которая, подобно измерениям поляризации флуоресценции, измеряется перпендикулярно к направлению возбуждающего света соответствующей поляризации. Если же падающий свет поляризован горизонтально, то интенсивность рассеянного света будет стремиться к 0 (см. рис. 8.1). Теперь можно показать, что для изотропной поляризуемости  $a$  степень деполяризации  $\rho$  изменяется от 0 до  $s$ . При анизотропной поляризуемости  $a$ , т.е. для асимметричных колебаний молекул, получаем  $\rho = s = \text{const}$ . Определение степени деполяризации позволяет соотнести отдельные рамановские пики с определенными элементами (поляризационная рамановская спектроскопия).

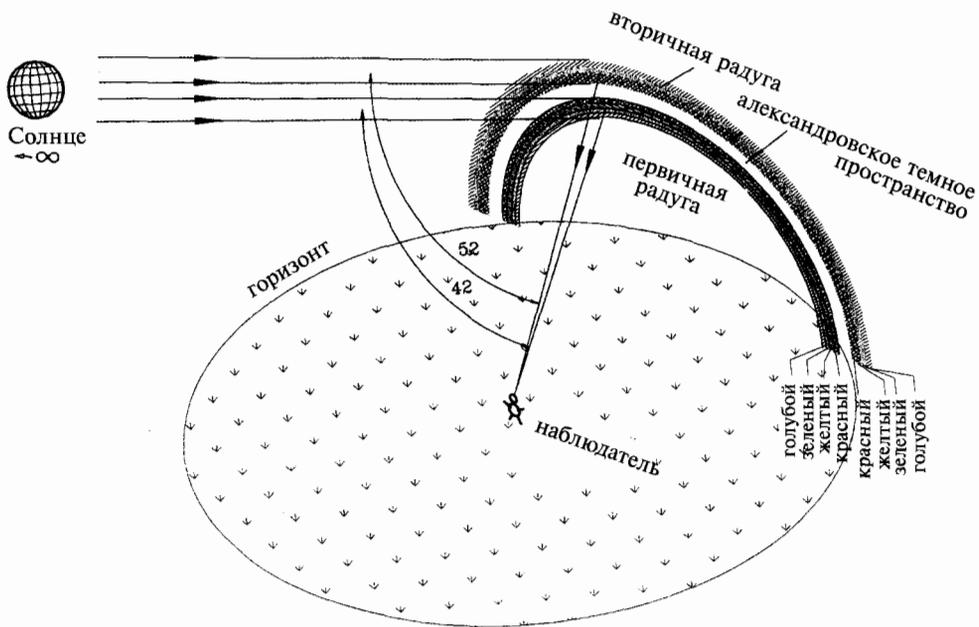
При описании рамановского рассеяния предусматривалось, что поглощение отсутствует. Рассеяние является результатом перемещения заряда внутри «электронного облака»: интенсивность рассеяния пропорциональна  $a^2$ . Однако если частота возбуждающего света индуцирует дополнительный электронный переход (поглощение, см. рис. 8.17), перемещение заряда драматически возрастает, и рамановский сигнал часто становится сравнимым с релеевским рассеянием (резонансное усиление) или с рассеянием в УФ спектроскопии поглощения. В частности, для хромопротеидов при возбуждении в полосе поглощения хромофора часто наблюдается гораздо менее сложный рамановский спектр вследствие того, что его обуславливает только хромофорная часть, а белковая остается «невидимой». Следует ожидать, что резонансная рамановская спектроскопия превратится вскоре в могущественное средство не только в исследовательских целях, но также и в аналитических и клинических применениях.

## 8.4. Радуга

Первый задокументированный спектр можно найти в Библии: в строфе 13 главы 9 Книги Бытия Бог говорит Ною:

«Я поставлю свою дугу на облака, и она будет заветом между Мной и Землей».

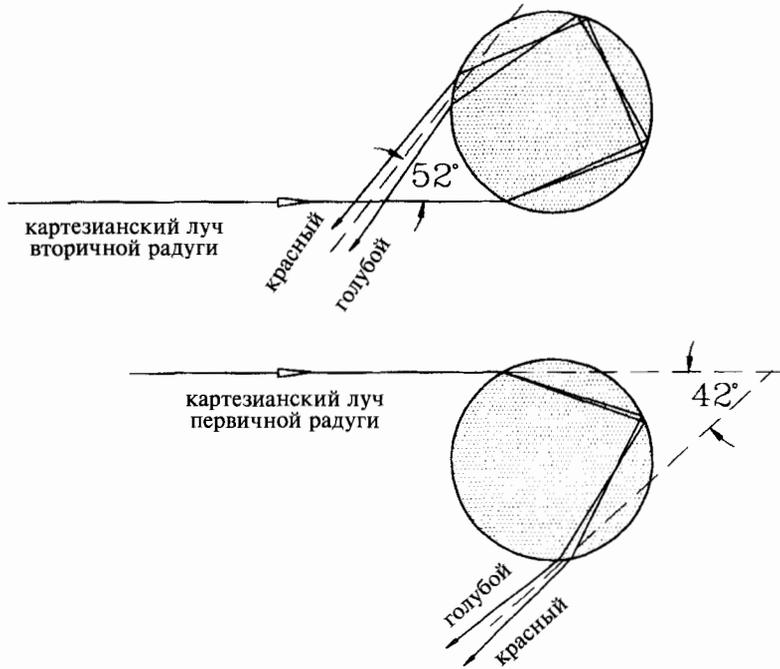
Радуга является видимым спектром солнечного света, который получается в результате рассеяния света маленькими капельками воды. Однако почему радуги так редки, хотя оба фактора ее образования бы-



**Рис. 8.19.** Изображение радуги со вторичной верхней радугой, включающее приблизительные углы между направлением солнечных лучей и положением наблюдателя. Вторичная радуга значительно слабее первичной. Центр окружности, которую описывает радуга, всегда лежит на прямой, проходящей через Солнце и глаз наблюдателя

вают представлены очень часто? Интересно, что иногда выше первичной радуги возникает более бледная и более широкая вторичная радуга с перевернутым порядком цветов: красная полоса внизу, а голубая сверху (см. рис. 8.19). Чаще всего радуга наблюдается в прямых лучах солнца после дождя или при искусственном разбрызгивании воды. При каких условиях возникает радуга? Ответ получили в результате проведения лабораторных экспериментов с лучом лазера и большими, хорошо выработанными, каплями воды.

Если луч света падает на сферическую каплю воды диаметром от 0,3 до 20 мм, часть света преломляется в капле, а остальной свет отражается. Только так называемые *картезианские лучи* (согласно французскому математику Рене Декарту), падая на каплю воды на расстоянии  $7/8$  (первичная радуга) или  $19/20$  (вторичная радуга) от радиуса средней линии, будут вызывать спектральные явления. Первичная радуга получается при одном внутреннем отражении, а вторичная радуга получается при двух внутренних отражениях (см. рис. 8.20). Все прочие лучи отклоняются так далеко, что не способны давать какую-либо усиленную интерференцию. Так как воде присуща относительно незначительная дисперсия (коэффициент преломления воды равен 1,333, см. рис. 3.15), углы цветных полос радуги весьма ограничены и зависят от диаметра капелек воды и количества внутренних отражений (см. таблицу 8.1).



**Рис. 8.20.** Траектория луча света внутри капель воды, приводящая к образованию радуги. Только так называемые *картезианские лучи*, падая на каплю воды на расстоянии  $\sim 7/8$  (первичная радуга, внизу) или  $19/20$  (вторичная радуга, вверху) от радиуса средней линии, способны вызвать спектральные явления

**Табл. 8.1.** Диспергирующие углы в радуге

Диаметр [водяной капли]	1 мм	20 мм
Первичная радуга	$40,5 \pm 2$	$41,5 \pm 1$
Александровское темное пространство	$46 \pm 3$	$46 \pm 3$
Вторичная радуга	$53 \pm 4$	$52 \pm 2$

С уменьшением размера капель радуга бледнеет. Когда диаметр капли становится меньше  $\sim 0,3$  мм, получается наложение отдельных спектральных цветов (неудовлетворительное спектральное разрешение), дополняющих друг друга, что приводит к осветлению радуги и, в конце концов, ее полному исчезновению. В соответствии с формулой Френеля, цветной свет в радуге высоко поляризован (тангенциально к радуге, *E*-вектор). Свет, поляризованный ортогонально плоскости рассеяния, отражается предпочтительно внутрь капли (см. рис. 3.16), тогда как прочий покидает каплю и становится видимым.

## 8.5. Спектроскопия отражения

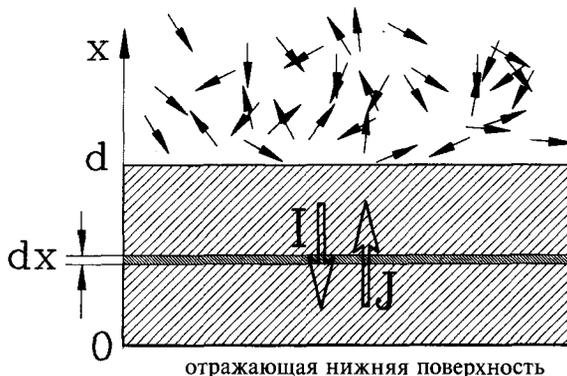
### 8.5.1. Теоретические основы

Спектроскопия отражения изучает закономерности отражения электромагнитного излучения от различных, в том числе твердых, сред. Существуют три типа отражений: зеркальное отражение, внутреннее отражение и диффузное отражение от шероховатых поверхностей. В реальности имеют место одновременно все три типа отражения, но в разных соотношениях. Часть падающего света, независимо от диаметра частиц, отражается от их поверхности (микрзеркал), часть входит внутрь образца, откуда, после определенного числа преломлений, дифракций, отражений и поглощений, вновь излучается с поверхности.

Хотя точной теории множественных рассеяний не существует, достаточно широко применяется теория диффузионного отражения и пропускания оптически непрозрачных образцов — так называемая двухкомпонентная теория, разработанная в тридцатых — сороковых годах 19-го века Кубелкой и Мунком в Германии. В данной области эта теория имеет такое же значение, как закон Бугера — Ламберта — Бера в абсорбционной спектроскопии прозрачных образцов (см. главу 5.1). Для практической работы она незаменима. В этой теории предполагается, что отраженное излучение является изотропным, т.е. не зависящим от направления (закон косинусов Ламберта, см. рис. 3.3), а облучающий свет — монохроматическим.

*Сначала Кубелка и Мунк работали над получением бумаги для газет, которая должна быть тонкой (т.е. газета должна быть легкой), но, тем не менее, как в можно большей степени, непрозрачной. Это классическая задача оптической спектроскопии.*

Чтобы описать излучение, которое и рассеивается, и поглощается, поток света делится на два противоположных потока (см. рис. 8.21). Входящий



**Рис. 8.21.** К выводу уравнения Кубелки — Мунка. Если образец толщиной  $d$ , не ограниченной в горизонтальном направлении, облучается сверху диффузным светом интенсивности  $I$ , то можно измерить обратный вертикальный поток вверх  $J$ . Если образец имеет ограниченную толщину, часть света будет отражаться от нижней поверхности образца

в верхнюю часть образца поток  $I$  (который может достичь отражающей нижней поверхности  $R_g$ ) имеет направление  $+x$ , а рассеянная часть светового потока  $J$  имеет направление  $-x$ . Образец при этом не имеет границ в горизонтальном направлении (это важное граничное условие для решения дифференциальных уравнений 8.43, см. ниже). При многократном рассеянии в сочетании с диффузным излучением усредненная длина волны  $dx$  внутри образца аналогична длине волны параллельного излучения, падающего под углом  $60^\circ$ , или, иначе говоря, точно равна удвоенному значению длины волны, получаемой при коллимированном вертикальном облучении:

$$\overline{d\xi_j} = \overline{d\xi_j} = 2 \times dx \quad (8.42)$$

В соответствии с теорией Кубелки — Мунка, коэффициент поглощения  $K$  и коэффициент рассеяния  $S$  (см. уравнение 8.2) влияют на потоки  $I$  и  $J$ , которые взаимосвязаны двумя дифференциальными уравнениями:

$$\begin{aligned} -dI &= -KIdx - SJdx + SJdx \\ dJ &= -KJdx - SJdx + SIdx \end{aligned} \quad (8.43)$$

С учетом граничных условий:

$$x = 0 : \left( \frac{J}{I} \right)_{x=0} = R_g \text{ — отражение от нижней поверхности образца;}$$

$$x = d : \left( \frac{J}{I} \right)_{x=d} = R \text{ — отражение от образца;}$$

$$x = \infty : \left( \frac{J}{I} \right)_{x=\infty} = R_\infty \text{ — отражение от образца неограниченной толщины} \\ (R_g = 0)$$

систему уравнений 8.43 можно решить. В результате решения диффузионное отражение  $R_\infty$  образца зависит только от отношения  $K/S$ , а не отдельно от коэффициента рассеяния или коэффициента поглощения:

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = F(R_\infty) \quad (8.44)$$

$F(R_\infty)$  называется функцией Кубелки — Мунка, значения которой приводятся в таблицах (Kortüm, 1969). Так же как в абсорбционной и, особенно, эмиссионной спектроскопии, должна быть исключена зависимость ответа аппаратуры от длины волны. Это получают (1) путем измерения отражения самого образца и (2) измерением бесконечно отражающей поверхности [ $R_{ref}(\lambda)$ ], например, поверхности, покрытой тонким слоем сульфатом бария, карбонатом или оксидом магния:  $R_\infty(\lambda) - R_{ref}(\lambda)$  (в логарифмической форме:  $\log[R_\infty(\lambda)/R_{ref}(\lambda)]$ ).

С этими стандартными или с более современными материалами, используемыми для приготовления сферы Ульбрихта, можно получить значение  $R_\infty$  лучше 99%. С другой стороны, гораздо сложнее получить абсолютно черную поверхность, не отражающую свет, что является прямым результатом теории Кубелки — Мунка. Эта проблема обсуждалась ранее при описании корректировки фотоакустических спектров с помощью черного образца сравнения, покрытого сажей, наилучшим из известных абсорбентов (см. главу 7.4).

Предположив, что коэффициент рассеяния  $S$  не зависит от длины волны  $\lambda$  в диапазоне измерения, можно определить теоретически концентрацию вещества посредством измерения отражения, заменив в уравнении 8.44  $K$  на  $2,3026 \times \epsilon \times C$ , где  $C$  — молярная концентрация, а  $\epsilon$  — молярный коэффициент экстинкции (см. уравнение 5.5). Для порошкообразных веществ с размерами гранул, близкими к 1 мкм, и толщиной образца по крайней мере 1 мм, уравнение 8.44 дает строго линейную зависимость. Корректировка измерений и получение графических зависимостей в соответствии с теорией Кубелки — Мунка легко осуществляется с помощью встроенных компьютеров. При неотражающем фоне  $R_g = 0$  и  $R = R_0$ , на основании чего для образца толщиной  $d$  можно вычислить коэффициент рассеяния  $S$ :

$$S = \frac{2,303}{d} \frac{R_\infty}{1 + R_\infty^2} \times \log \frac{R_\infty(1 - R_0 R_\infty)}{R_\infty - R_0} \quad (8.45)$$

и коэффициент поглощения  $K$ :

$$K = \frac{2,303}{2d} \frac{1 - R_\infty}{1 + R_\infty^2} \times \log \frac{R_\infty(1 - R_0 R_\infty)}{R_\infty - R_0} \quad (8.46)$$

### 8.5.2. Некоторые практические результаты

Сигнал поглощения непрозрачного и твердого образца, такого как молодой и очень тонкий прорастающий лист, значительно усиливается, если его покрыть сильно рассеивающей (но не поглощающей!) суспензией  $\text{CaCO}_3$  (см. главу 5.2.8) толщиной примерно в 1 мм. Благодаря этому обычно коллимированный измеряющий луч света сначала диффузно отражается (см. уравнение 8.42), а затем часть отраженного света снова попадает на фотодетектор. Таким образом легко достигается трехкратное увеличение сигнала. Для измерения отраженного света очень подходит сфера Ульбрихта (см. главу 3.5.6), так как она одинаково хорошо диффузно отражает и входящий, и отраженный свет.

Усиление оптического сигнала в абсорбционной спектроскопии сильно разбавленных и жидких образцов очень важно в биохимии. Например, концентрация описанного ранее универсального пигмента фитохрома в экстрактах растений очень мала. Обычной абсорбционной спектроскопией она не определяется (сигнал поглощения очень мал) без предварительно-

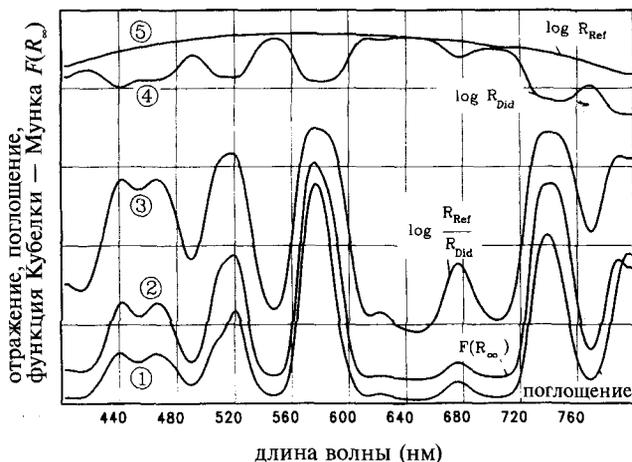
го концентрирования. Однако, если в экстракт фитохрома без какого-либо обогащения добавить инертную суспензию  $\text{CaCO}_3$ , то сигнал увеличится в  $\beta = 100\text{--}150$  раз. Согласно теории Кубелки — Мунка, коэффициент усиления  $\beta$  будет равен:

$$\beta = \left[ \frac{-4R_\infty^3}{(1 - R_\infty^2)^2 Sd} + \frac{1 + R_\infty^2}{1 - R_\infty^2} \right] \quad (8.47)$$

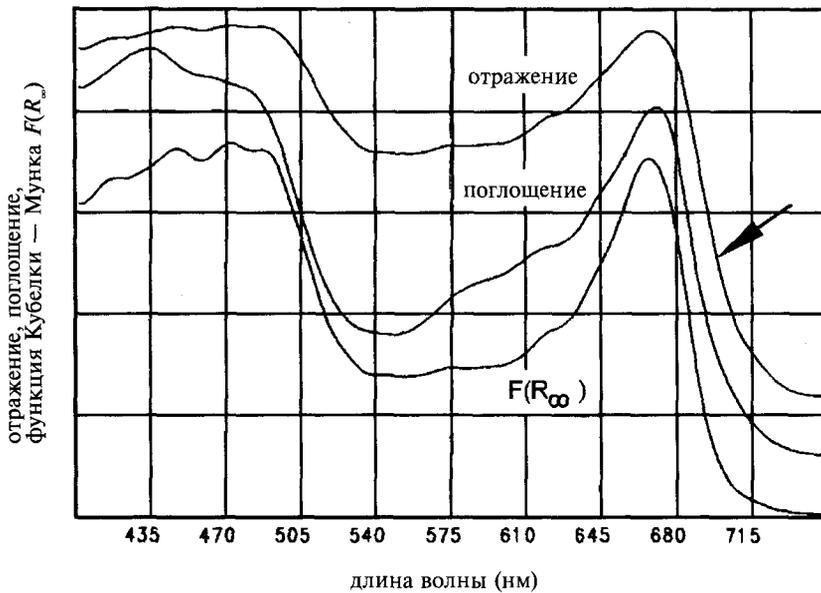
Для большинства белых и рассеивающих веществ так называемая *интенсивность рассеяния* ( $S \times d$ ) настолько велика, что первым членом уравнения 8.47 можно пренебречь и значительно упростить формулу. Однако, если размеры гранул рассеивающего материала меньше длины волны  $\lambda$ , то  $\beta$  будет небольшим, так как коэффициент рассеяния уменьшается (см. рис. 8.11).

Конечно, при измерении целого ряда, например, 100 образцов, необходимо поддерживать постоянным отношение в смеси жидкости и  $\text{CaCO}_3$  (обычно 1 мл на 1 г), так как нас интересуют относительные значения (например, в колоночной хроматографии). Так как  $\beta$  не зависит от длины волны  $\lambda$ , можно производить измерения неискаженных спектров отражения непрозрачных и сильно рассеивающих образцов. Рассеяние измеряется отдельно, например, путем сравнения с рассеянием белой нефлуоресцирующей бумаги с такой же интенсивностью рассеяния ( $S \times d$ ).

В качестве примера на рис. 8.22 представлены спектр поглощения (1) дидимиевого фильтра (BG 36, Schott, Mainz, Германия,  $A_{580} > 2$ ) в сравне-



**Рис. 8.22.** Сравнение спектра поглощения (1) дидимиевого фильтра с различными логарифмическими зависимостями соответствующих значений отражения. Спектр 5: спектр отражения белой нефлуоресцирующей бумаги (нулевая линия) при освещении ее коллимированным излучением. Спектр 4: спектр отражения дидимиевого фильтра, лежащего на поверхности белой бумаги ( $R_g \approx 100\%$ ). Спектр 3 — скорректированный на нулевую линию спектр отражения  $\log(R_{ref}/R_{didimium})$ . Спектр 2: пересчитанный по функции Кубелки — Мунка  $F(R_\infty)$  спектр 3

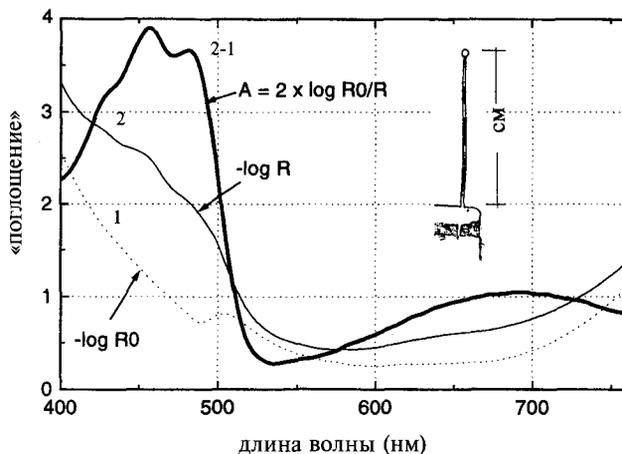


**Рис. 8.23.** Сравнение спектра поглощения, исправленного спектра отражения и спектра отражения с учетом функции Кубелки — Мунка зеленого листа молочая

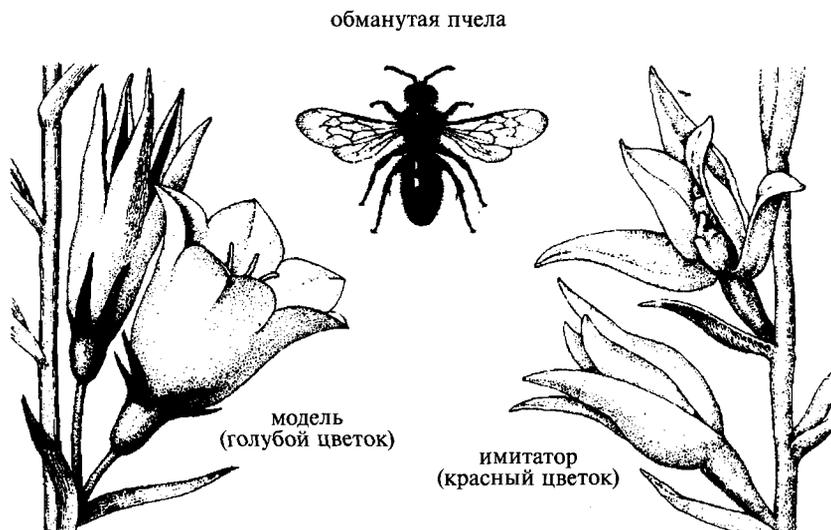
нии с полученными различными способами спектрами отражения. График 5 показывает спектр отражения белой нефлуоресцирующей бумаги ( $\log(R_{ref})$ , нулевая линия) при освещении ее коллимированным излучением. График 4 представляет спектр отражения дидимиевого фильтра, лежащего на поверхности белой бумаги ( $R_g \approx 100\%$ ). График 3 — скорректированный и нормализованный спектр отражения  $\log(R_{ref}/R_{didimium})$ . Отличия этого графика от спектра поглощения 1 достаточно заметны. Однако если представить этот спектр в соответствии с функцией Кубелки — Мунка (уравнение 8.44), разница значительно уменьшится (см. рис. 8.22.2), но полного совпадения не получится. Это объясняется невыполнением всех условий теории Кубелки — Мунка: (1) мелкодисперсность образца, (2) диффузное облучение и (3) независимость коэффициента рассеяния  $S$  от длины волны  $\lambda$ .

Другой пример приведен на рис. 8.23, где сравниваются спектр поглощения, исправленный спектр отражения и спектр отражения с учетом функции Кубелки — Мунка зеленого листа молочая. И в этом случае последний спектр отражения более точно отображает спектр поглощения, чем простой откорректированный спектр отражения. Ясно, что в специфических обстоятельствах спектроскопия отражения способна заменить абсорбционную спектроскопию.

На рис. 8.24 приведен исправленный «спектр поглощения» спорангиофоров (носителей спор) гриба *Phycomyces b.* Он является удвоенным разностным спектром и был получен путем вычитания неисправленного спектра отражения спорангиофора (2) из спектра отражения (1) белого эталонного образца (ZnS). Расстояние измеряющего конца раздвоенного



**Рис. 8.24.** Первый «спектр поглощения» тончайшей структуры спорангиофора гриба *Phycomyces b.*, полученного методом бесконтактной спектроскопии отражения *in situ* (на месте). Прямое измерение спектра поглощения невозможно. Около 1 000 отдельных спектров «нитей» приблизительно 500 спорангиофоров было получено в течение 20 с на высокочувствительном быстросканирующем спектрометре RSS (см. рис. 5.51). Этот результат соответствует  $5 \cdot 10^5$ -кратному усилению сигнала, который можно бы было получить на обычном абсорбционном спектрометре от единичного спорангиофора, изображенного на вставке



**Рис. 8.25.** Пчелы *Chelostoma fuliginosum* предпочитают голубые колоколообразные цветы *Campanula persicifolia*, в которых много нектара, и в то же время летают на красные орхидеи *Cephalanthera rubra*, в которых совсем нет нектара. Пчела и эти два типа цветов являются примером треугольной зависимости (согласно Barret, Spectrum der Wissenschaft, Nov. 1987, 102)

световода от спорангиофоров составляло примерно 5 см, что обеспечило неинвазивное и бесконтактное получение информации от весьма тонкой структуры спорангиофоров, недостижимое обычной абсорбционной спектроскопией.

В конце 1980-х годов посредством спектроскопии отражения было сделано впечатляющее разоблачение знаменитой мозаичной посмертной маски из захоронения Тикаля в Центральной Америке: было доказано, что из нефрита сделана не вся маска, а лишь ее уши (Ward, 1987, измерение с расстояния 30 см).

Сегодня дистанционные измерения отражения применяются для оценки больших лесных массивов с самолетов или со спутников. Особенно информативны спектры отражения в интервале от 690 до 730 нм (стрелка на рис. 8.23), позволяющие провести различие между здоровыми и усыхающими деревьями, что широко используется в картографии лесных повреждений.

В биологии широко известен феномен мимикрии. Имитационные преимущества одних видов позволяют выживать другим видам. Например, длительное время было загадкой, почему отдельные пчелы (*Chelostoma fuliginosum*), предпочитающие голубые колоколообразные цветы *Campanula persicifolia*, в которых много нектара, летают в то же время на красные орхидеи *Cephalanthera rubra*, в которых совсем нет нектара (см. рис. 8.25). Ответ был получен с помощью отражательной спектроскопии. Оказалось, что спектральные свойства этих двух цветков в ультрафиолетовом и голубом диапазоне, единственно видимом для насекомых, практически идентичны. В видимом для человеческого глаза диапазоне спектральные свойства этих двух цветов совершенно разные (см. рис. 8.26).

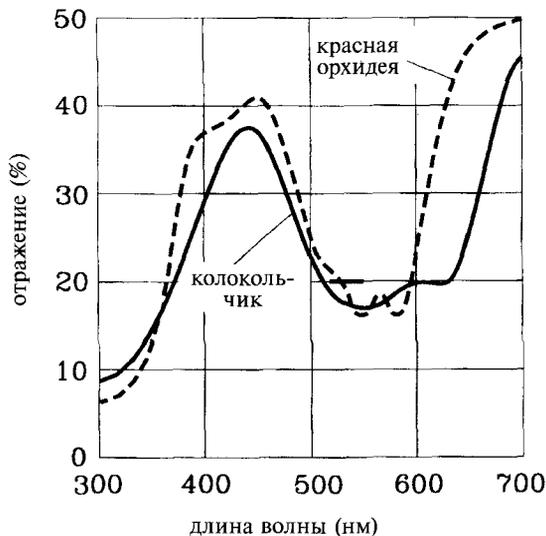


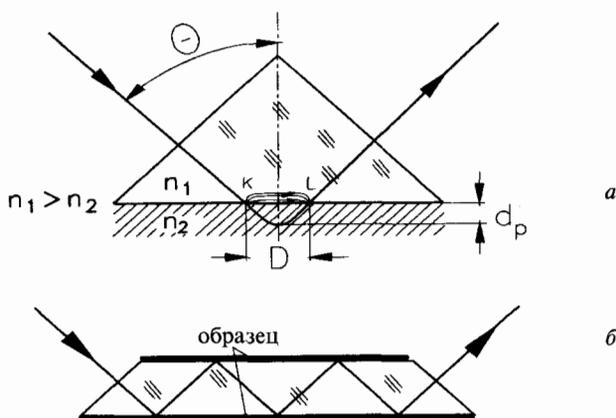
Рис. 8.26. Сравнение спектров отражения голубого колокольчика и красной орхидеи, изображенных на рис. 8.25 (согласно Barret, Spectrum der Wissenschaft, Nov. 1987, 102)

## 8.6. Спектроскопия ослабленного полного отражения (СОПО)

Хотя принцип полного отражения света, наблюдаемый при переходе из оптически плотной среды (с более высоким показателем преломления) в оптически менее плотную (с меньшим показателем преломления), включая теорию электромагнетизма, известен с работ Ньютона, спектроскопия внутреннего отражения не развивалась до 1947 г., когда Гус и Хенхен впервые установили, что полное отражение в тонком пограничном слое всегда сопровождается небольшим смещением луча, сопоставимым с длиной волны (см. рис. 8.27, *a*). Это объясняется теорией Максвелла и связано с ослаблением поверхностной волны в тонком слое между точками входа *K* и выхода *L*: свет слегка излучается в оптически менее плотную среду — среди многих причин и в зависимости от угла входа и таким образом переносит энергию через границу фаз. Внутри менее плотной среды возникает стационарное поле *E*, величина которого экспоненциально затухает с увеличением расстояния от поверхности раздела:

$$E = E_0 \times e^{\frac{-x}{d_p}} \quad (8.1)$$

Глубина проникновения  $d_p$  определяется как расстояние, на котором *E* уменьшается до  $1/e$  уровня, и вычисляется (Harric N.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, v.101, 928) по формуле:



**Рис. 8.27.** *a* — Полное отражение в пограничном слое между средами с различными показателями преломления всегда сопровождается небольшим смещением луча, сравнимым с длиной волны. Это объясняется теорией Максвелла, в соответствии с которой ослабление поверхностных волн в тонком слое от точки входа (*K*) до точки выхода (*L*) обусловлено поглощением потенциального абсорбера [исследуемого вещества] (ослабленное полное отражение). *б* — С помощью специальной призмы поглощение существенно возрастает при многократном отражении (до 25 раз)

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi \sqrt{\sin^2 a - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}; \quad a \geq a_g \quad (8.49)$$

Глубина проникновения пропорциональна длине волны  $\lambda$ , в оптически более плотной среде. Изменяя угол входа  $a$ , можно контролировать глубину профиля поглощения в тонком слое (например, в биологических мембранах), что аналогично методу модуляции частоты  $f$  в фотоакустической спектроскопии (см. главу 7.3.4).

При проникновении световой волны в оптически менее плотную и поглощающую среду происходит ее ослабление. На этом законе основывается *спектроскопия ослабленного полного отражения (СОПО)*<sup>1</sup>. В случае свободного пропускания и слабопоглощающего вещества применяется следующая формула ( $m_n < 0, I$ ; согласно теории дисперсии  $m_n$  — это модуль экстинкции среды с показателем преломления  $n$ , определяемый произведением  $ac$ , см. уравнение 5.3):

$$\frac{I}{I_0} = e^{-m_n d} \equiv 1 - m_n d_e \quad (8.50)$$

где  $d_e$  — эффективная толщина слоя. Формула позволяет получить одну и ту же экстинкцию как при измерении обычных спектров пропускания, так и при измерении спектров полного отражения.

Отражательная способность при низкой поглощательной способности определяется как:

$$R \equiv 1 - m_n d_e \quad (8.51)$$

При много(N)-кратном отражении (см. рис. 8.27, б) получаем:

$$R^N \equiv (1 - m_n d_e)^N \quad (8.52)$$

где  $d_e$  — комплексная функция различных параметров, однако при низких концентрациях она не зависит от  $m_n$ .

Явление полного отражения нашло много различных применений: при прецизионном измерении углов, определении показателей преломления, в расщепителях пучка света, оптических фильтрах, модуляторах света, лазерах, зеркалах, измерении рельефа и абсорбционной спектроскопии. Этот метод применим там, где применение других методов невозможно или затруднено вследствие чрезвычайно высокого поглощения образца в тонких слоях. Материал образца приводят в контакт с оптически более плотным, но прозрачным материалом, и измеряют зависимость от длины волны полного отражения, начиная с более плотной среды. Полученный спектр яв-

<sup>1</sup> Прим. редактора: часто ее называют также спектроскопией нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) или многократно нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) — при многократном отражении от границы раздела

ляется результатом взаимодействия стационарного поля с образцом и представляет его спектр пропускания. В отличие от обычной спектроскопии пропускания в этом методе при определенном угле падения можно достичь многократного усиления [в результате многократного прохождения] поглощения образца.

Благодаря возможности исследования тончайших слоев в настоящее время СОПО используется в основном в инфракрасном диапазоне для определения, например, жиров. В зависимости от области применения на рынок поставляется много типов спектрометров ОПО. Наряду с однократно отражающими кюветами (т.е. кристаллами) (рис. 8.27, а) предлагаются кюветы, с помощью которых возможно осуществить многократное ( $\geq 25$ ) полное отражение (рис. 8.27, б). Обычные кюветы рассчитаны на 1–2 мл, а современные алмазные кюветы требуют всего 1 мкл образца. Алмаз с показателем преломления  $n = 2,4$  обеспечивает четырехкратное увеличение отражательной способности по сравнению со стеклом ( $n = 1,3$ , см. главу 3.6.2). В зависимости от назначения и требуемой длины волны (в мкм области) производители предлагают кюветы из различных кристаллов, например, из бромидистого таллия (от 0,6 до 30 мкм, нерастворимого в кислотах, но растворимого в щелочах и с более высоким, чем у алмаза, показателем преломления), из фторида кальция (0,13–12 мкм, твердого, но чувствительного к тепловым ударам), из хлорида натрия (0,25–16 мкм, растворимого в воде, но очень дешевого).

## 8.7. Дополнительная литература

Azzam, R. M.A., Bashara, N.M. *Ellipsometry and Polarized Light*, North Holland, New York, 1979.

Bohren, C.F., Huffman, D.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, John Wiley & Sons, New York, 1998.

Campbell, I.D., Dwek, R.A. *Biological Spectroscopy*, The Benjamin Publishing Company, Menio Park, CA, London, Amsterdam, Sidney, 1984.

Earnshaw, J.C., Steer, W.D., (eds.), *The Application of Laser Light Scattering to the Study of Biological Motion*, Plenum Press, New York, London, 1982.

Frei, R.W., MacNeil, J.D. *Diffuse Reflectance Spectroscopy in Environmental Problem-Solving*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1973.

Harrik, N.J. *Internal Reflection Spectroscopy*, Interscience, New York, 1968.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1984.

Kortüm, G. *Reflexionsspektroskopie*, Springer, Berlin, 1969.

Mirabella, F.M., ed. *Internal Reflection Spectroscopy*, Marcel Dekker Inc. NY, 1992.

Newton, R.G. *Scattering Theory of Waves and Particles*, Springer, Berlin, 1982.

Pecora, R., ed. *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, Plenum, New York, 1985.

Schmidt, W., *Die Biophysik des Farbensehens*, 5th edn. Color, Regenbogenverlag, Klaus Stromer, Konstanz, 2000.

Schrader, B., ed. *Handbook on Infrared and Raman Spectroscopy*, Wiley, New York, **1995**, p. 787.

Ward, F., *Nat. Geo. Sept.* **1987**, 282-315.

Wendlandt, W.W. *Modern Aspects of Reflectance Spectroscopy*, Plenum Press, New York, London, **1968**.

Wiese, H. *Lichtstreuung und Teilchengroßen-messung (Light Scattering and Particle Size)*, *GIT Fachz. Lab.* **1992**, three subsequent articles, 4/92, 385-389; 7/92, 762-768; 10/92, 1029-1032.

# ГЛАВА 9

## КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ И ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ

Relata refero

*Я только констатирую факты, установленные ранее*

*Геродот*

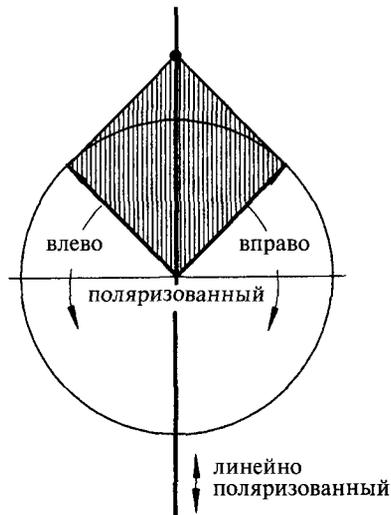
Круговой дихроизм (КД) и оптическое вращение (дисперсия оптического вращения (ДОВ)) — два оптических явления, которые тесно связаны с пространственной структурой молекул. При рассмотрении поляризационной флуориметрии в главе 6.4 упоминались различные аналитические методы, основанные на возбуждении электронов поляризованным светом. Деполяризация излучаемого света используется для получения информации о подвижности возбужденных молекул, о внутри- и межмолекулярном переносе энергии и об электронных дипольных моментах флуорофоров. Еще больше информации о пространственной структуре молекул позволяет получить использование плоско поляризованного по кругу или эллиптически света (двумерное свойство) с различно направленными вращениями векторов электрического и магнитного поля (отличающиеся пространственные свойства).

### 9.1. Поляризация света

В плоско поляризованном свете  $E$ -вектор колеблется в плоскости, перпендикулярной направлению распространения (обычно это изображается в направлении оси  $z$ ; см. рис. 2.1 и 8.1). Теоретически, плоско поляризованный свет эквивалентен сумме векторов двух компонентов поля  $E_L$  и  $E_R$ , которые вращаются в противоположных направлениях (см. рис. 9.1): мы относим их к эллиптически или поляризованному по кругу свету. Это без труда подтверждается экспериментом. Термин «интерференция» относится к поляризационным свойствам когерентного света (см. главу 2.2): два луча плоско поляризованного света со взаимно перпендикулярными  $E$ -векторами одинаковой амплитуды и фазы образуют плоско поляризованный свет с  $E$ -вектором, наклоненным под углом  $45^\circ$  к вертикали (рис. 9.2). Относительная фаза смещена на  $\pi$ , а плоскость поляризации соответственно наклонена на  $-45^\circ$ .

Если один из лучей смещен по фазе относительно другого на  $\pi/2 = 90^\circ$ , то их сочетание даст свет с круговой поляризацией. Направление вращения зависит от того, какой из лучей задержан относительно другого (см. рис. 9.3).

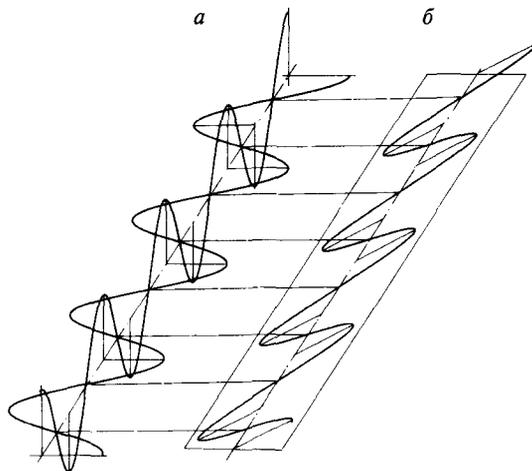
*При этом распространение световой волны не будет спиральным, она распространяется по прямой без вращения. Линия, где спираль пересекает*



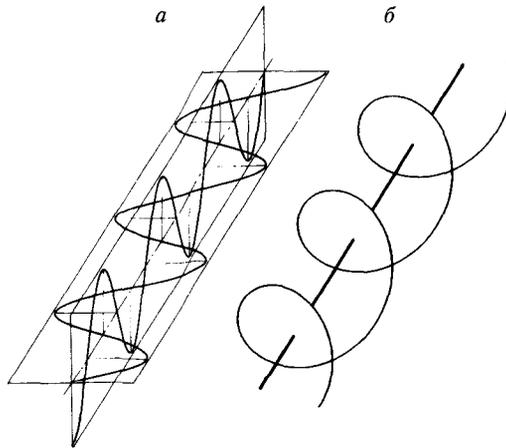
**Рис. 9.1.** Плоско поляризованный свет может быть представлен в виде наложения двух лучей света с круговой поляризацией, у которых  $E$ -вектора направлены в противоположные стороны

*пространственно фиксированную плоскость, перпендикулярную направлению распространения, вращается по кругу против направления поляризации (с вращающейся спиралью пересечение представляло бы фиксированную линию на плоскости). Световую волну принято считать правополяризованной, если наблюдатель, по отношению к которому она движется, видит ее вращающейся вправо, т.е. по часовой стрелке, и наоборот.*

Если взаимодействуют две волны с одинаковыми фазами, но с разными амплитудами, то плоско поляризованная волна образуется в плоскости, где



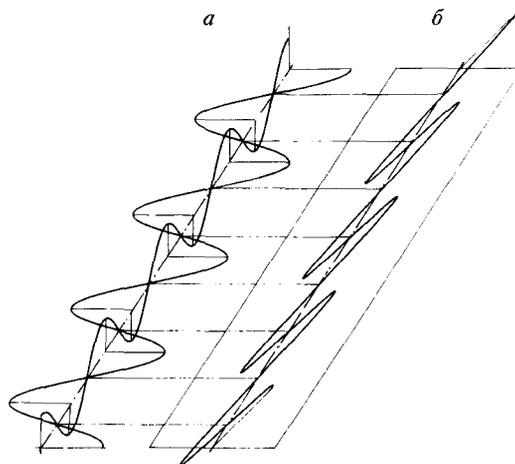
**Рис. 9.2.** *а* — сложение векторов двух волн света с одинаковой фазой, длиной волны и амплитудой, но с перпендикулярными плоскостями поляризации; *б* — результат сложения — волна плоско поляризованного света, где плоскость поляризации наклонена на  $45^\circ$



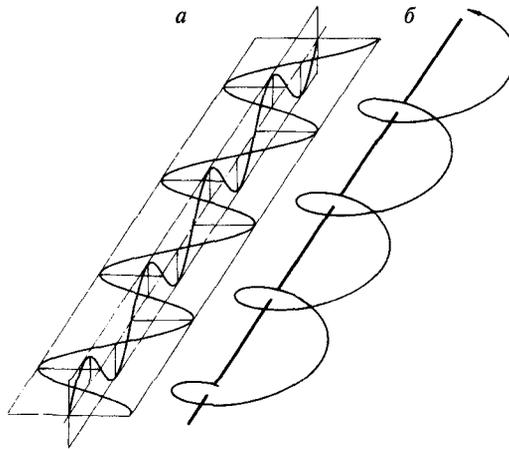
**Рис. 9.3.** *a* — сложение векторов двух световых волн с одинаковой длиной волны и амплитудой, но с перпендикулярными плоскостями поляризации. Интерферирующие волны сдвинуты на  $90^\circ$  относительно друг друга; *б* — результат: световая волна с круговой поляризацией

*E*-вектор в определенной степени наклонен (см. рис. 9.4). Сдвиг в относительной фазе приводит к световой волне с эллиптически вращающимся *E*-вектором (см. рис. 9.5). Эллиптически поляризованный свет характеризуется длинной и короткой осями эллипса, пространственным наклоном и направлением вращения *E*-вектора (см. главы 9.3 и 9.7).

На практике сдвиг фаз реализуется с помощью двоякопреломляющего кварцевого кристалла (см. главу 3.5.7). Если световой луч падает на плоскопараллельную кварцевую пластину, то, в соответствии с ее поляризационны-



**Рис. 9.4.** *a* — сложение векторов двух световых волн с одинаковыми фазой и длиной волны, но с разными амплитудами; *б* — результат сложения — волна плоско поляризованного света, где плоскость поляризации наклонена на  $\neq 45^\circ$  к вертикали



**Рис. 9.5.** *а* — сложение векторов двух волн света с одинаковой длиной волны, но с разными амплитудами, плоскости поляризации которых перпендикулярны друг другу; *б* — результат сложения — эллиптически поляризованная световая волна

*ми свойствами, он будет расщеплен на обычный (о) и необычный (е) лучи. Оба луча будут распространяться в кристалле с различной скоростью  $v = c/n$ , так как кварц обладает по отношению к этим лучам различными показателями преломления. При выходе из кристалла, толщина которого составляет  $d$ , у них будет смещение фазы  $\Delta\Phi$  относительно друг друга:*

$$\Delta\Phi = \Delta\Phi_e - \Delta\Phi_o = \frac{2\pi d}{\lambda}(n_e + n_o)$$

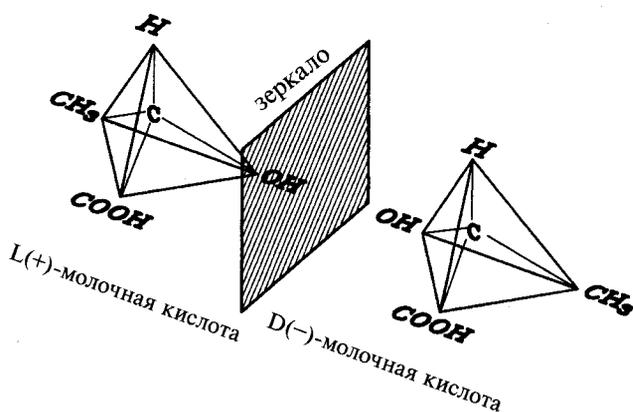
*Изменяя толщину кристалла  $d$ , можно получить любое смещение фазы для каждой длины волны  $\lambda$ . Технический интерес представляют определенные смещения фазы. Так, при  $\Delta\Phi = \pi/2$  (пластина четверти волны) плоскополяризованный свет преобразуется в поляризованный по кругу свет, а при  $\Delta\Phi = \pi$  (пластина полуволны) получается простое вращение плоскости плоскополяризованного света. Однако вследствие того, что такие пластины чрезвычайно тонки, на практике обычно используются пластины толщиной от 10 до 50 мкм. В них помещается кратное, например четверти волны, число длин волн:  $10 \times \lambda/4$ , а не  $\lambda/4$ . Такие пластины называются пластинами многократного порядка (МП). Однако, так как они очень чувствительны к изменениям длины волны и температуры, обычно используются так называемые пластины нулевого порядка (НП). Они состоят из двух скрещенных МП, например на  $10\lambda$  и  $10 \times \lambda/4$ , и обеспечивают смещение фазы на  $\pi/4$ .*

## 9.2. Дисперсия оптического вращения (ДОВ)

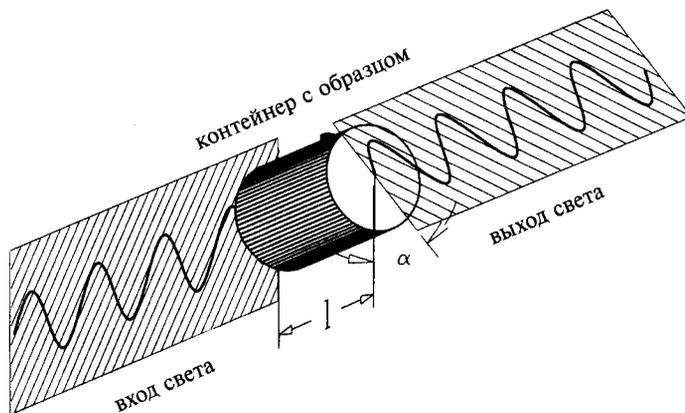
В настоящей главе будет рассмотрено действие поляризованного по кругу света на некоторые молекулы. В главе 8 были описаны рассеяние и дифракция как следствие отличающихся скоростей световых волн в различных

средах. Оба эти явления прямо зависят от поляризуемости  $a$ , т.е. от степени искажения электронного облака вектором электрического поля внешнего светового поля. Многим органическим молекулам присуща значительная хиральность: подобно левой и правой перчатке их структуры могут трансформироваться друг в друга только зеркально ([будучи неразличимы по химическому составу, стерически] они являются зеркальным отражением друг друга, т.е. энантиомерами). Аналогичным свойством обладает поляризованный по кругу свет: вращение вектора влево сохраняется, даже если повернуть волну «вверх ногами» (см. рис. 9.3).

Естественно, что энантиомерные молекулы проявляют оптическую активность, т.е. их поляризуемость  $a$  зависит от направления вращения поляризованного по кругу света. Показатели преломления в данном веществе лево- и правополяризованного света будут различными ( $n_L$  и  $n_D$ , соответственно; подстрочные индексы происходят от начальных букв латинских слов, означающих «лево» (laevus) и «право» (dexter)). Вант-Гофф (1852—1911) открыл, что этот эффект обусловлен асимметрическими атомами углерода. Как известно, углерод может связывать четыре различных остатка, как, например, в молекуле молочной кислоты (см. рис. 9.6). Падающий плоско поляризованный луч света «видит» различные показатели преломления для своих вращающихся влево ( $n_L$ ) и вправо ( $n_D$ ) компонент, поляризованных по кругу (см. рис. 9.1), которые распространяются поэтому с различными скоростями. После выхода из кюветы длиной  $l$  их фазы будут смещены друг относительно друга, и после их сложения свет станет снова плоско поляризованным, но плоскость поляризации будет наклонена (см. рис. 9.7). Молекула потеряет свою оптическую активность, если два остатка у атома углерода будут одинаковыми: тогда показатели преломления станут равными, что можно легко проверить (см. рис. 9.6). В зависимости от того, какое вращение, влево или вправо, запаздывает, наблюдается вращение света



**Рис. 9.6.** Пространственная структура молекулы молочной кислоты с асимметрическим атомом углерода  $C$ , вызывающим оптическую активность. Зеркальное изображение представляет стереоизомер. Показанные направления вращения (вправо обозначено как «+», влево — как «-») установлены экспериментально. Обозначения  $D$  и  $L$  относятся к абсолютной пространственной конфигурации



**Рис. 9.7.** Поворот плоскости поляризации на угол  $\alpha$  оптически активной молекулой в эксперименте, обнаруживающем ДОВ. Толщина образца равна  $l$  (обычно она составляет несколько дециметров)

в правую или левую сторону. Таким образом, бывают вращающие вправо или влево молекулы молочной кислоты. Это так называемые стерео- или зеркальные изомеры.

До применения понятия абсолютной конфигурации оптически активных молекул применялся термин «относительная конфигурация». В качестве эталона вращающей вправо молекулы был выбран глицериновый альдегид, и такая конфигурация была обозначена как «D». Другие оптически активные молекулы относят к этой конфигурации на основании методов синтеза. К сожалению, вследствие того, что правовращающая молекула молочной кислоты была обозначена как L(+)-форма молочной кислоты, вращение плоскости поляризации по часовой стрелке относительно направления распространения света обозначается как «+», а в обратном направлении — как «-».

Наблюдаемый угол вращения плоскости поляризации  $a_{obs}$  определяется по формуле:

$$a_{obs} = [a]_{\lambda}^T \times l \times c \quad (9.1)$$

где  $a$  измеряется в градусах, длина  $l$  — в дециметрах, а концентрация  $c$  — в г/мл (исторически сложившиеся единицы измерения). Удельный угол  $[a]_{\lambda}^T$  является постоянным для определенного соединения и зависит от температуры  $T$  и длины волны  $\lambda$ . Молярное вращение определяется как:

$$[\Phi]_{\lambda}^T = \frac{[a]_{\lambda}^T M_w}{100} = \frac{a_{obs} \times M_w}{100lc} \quad (9.2)$$

[где  $M_w$  — молекулярная масса]. С учетом поляризуемости  $a$  растворителя с показателем преломления  $n$  молярное вращение  $[\Phi]_{\lambda}^T$  корректируется умножением на  $3/(n^2 + 2)$ . В случае полимеров определяющим фактором в отношении молекулярной массы (молекулярного веса) скорее является молекулярная масса мономера (полимеризационного блока), а не молеку-

лы в целом, например, усредненная масса всех аминокислотных остатков в белке (mean residue weight =  $MRW$ ):

$$[m]_x^T = [a]_x^T \frac{MRW}{100} \quad (9.3)$$

В таблице 9.1 приведены значения удельных углов вращения некоторых оптически активных веществ при температуре 20°С; индекс D соответствует D-линии натрия 589 нм (см. рис. 2.13).

**Табл. 9.1.** Удельные углы вращения некоторых оптически активных соединений при температуре 20°С; индекс D соответствует D-линии натрия 589 нм (см. рис. 2.13).

Молекула	Растворитель	$[a]_D^{20}$
D-молочная кислота	Вода	– 2,3
L-молочная кислота	Вода	+ 2,3
D-глюкоза (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Вода	+ 19
L-манноза (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Вода	+ 30
D-рибоза (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	Гидрохлорид	– 24,6
Глюкозамин (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> )	Гидрохлорид	+ 49,5
L-аланин	Вода	+ 2,7
Тростниковый сахар	Вода	+ 66,4
Холестерин	Эфир	– 91,5
Витамин D <sub>2</sub>	Этанол	+ 102,5

Поворот плоскости поляризации, в отличие от КД сигнала, довольно значителен, и поэтому относительно просто распознается, особенно если проводить измерения только на одной, специфической, длине волны. Например, концентрация водного раствора тростникового сахара с относительно большим удельным углом вращения  $[a]_D^{20} = 66,4^\circ$  измеряется путем поворота по часовой стрелке плоскополяризованного света в простом устройстве, называемом *сахариметром*.

### 9.3. Круговой дихроизм (КД)

Дифракция и рассеяние являются результатом ускоренного, индуцированного светом колебания молекулярного диполя внешних электронных оболочек. Ускоренные колебания зависят от частоты возбуждающего света и от резонансной частоты индуцированного осциллятора. Частотная зависимость амплитуды и фазы колебаний аналогична механическим колебаниям системы, называемой маятниковой системой Бартона. Она состоит

(см. рис. 9.8) из тяжелого возбуждающего маятника и более легких возбуждаемых маятников разной длины. После возбуждения все маятники системы колеблются с одинаковой частотой, но с разными амплитудами и фазами. При этом маятник 3, длина которого равна длине возбуждающего маятника, возбуждается в резонансе, но со смещением фазы на  $\pi/2$ . Его амплитуда, в принципе, должна неограниченно возрастать по сравнению с амплитудой возбуждающего колебания, но ограничена условиями эксперимента. Вследствие того, что в системе всегда существуют демпфирующие процессы, так называемая резонансная катастрофа не происходит. Маятник поглощает энергию. Более короткие маятники 1 и 2 колеблются с меньшими амплитудами в фазе с большим маятником, более длинные маятники 4 и 5 также колеблются с меньшими амплитудами, но в противофазе (смещение фазы равно  $\pi$ ).

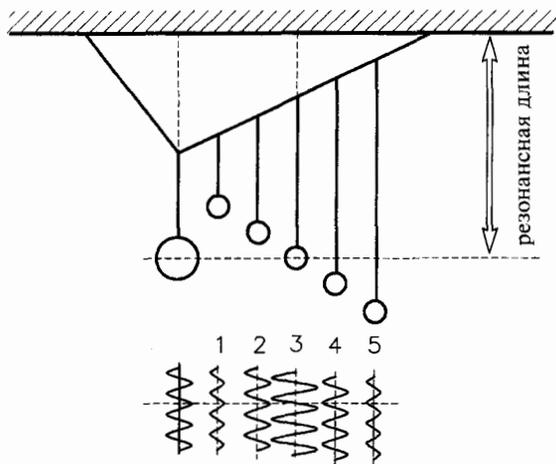
*Примечание: в целях эффективной демонстрации эксперимента возбуждающий маятник должен быть по крайней мере в 100 раз тяжелее остальных маятников, что позволяет исключить интерференцию.*

Теоретические аспекты оптической активности хиральных молекул вполне описываются аналитическим подходом классической механики. Основное дифференциальное уравнение для ускоренных и затухающих колебаний осциллирующей массы  $m$  (см. рис. 9.9, а и б) можно записать в следующем виде:

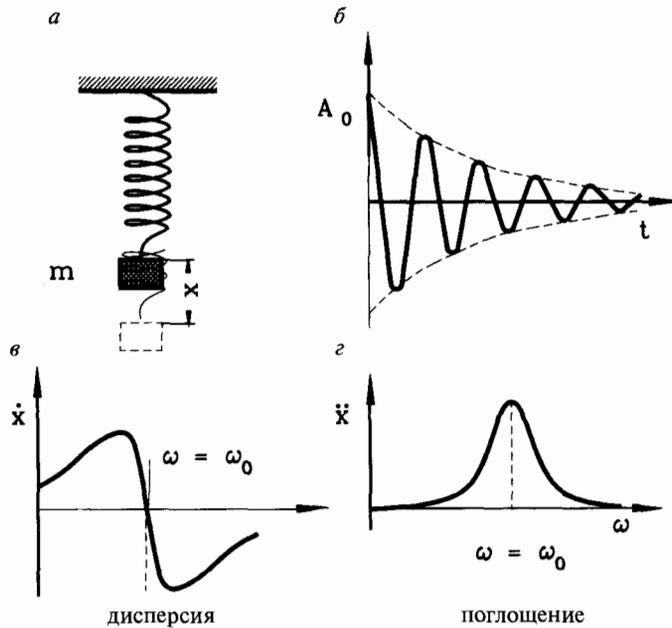
$$m\ddot{x} = -kx - f\dot{x} + F_0 \cos(\omega t) \quad (9.4)$$

где  $\omega = 2\pi\nu$  — угловая частота,  $-kx$  — возвращающая сила,  $-f dx/dt$  — сила затухания,  $F_0 \cos(\omega t)$  — возбуждающая сила.

Одна и две точки над параметром  $x$  в уравнении 9.4 означают первую и вторую производную этого параметра по времени, т.е. скорость и ускорение  $dx/dt$  и  $d^2x/dt^2$ , соответственно.



**Рис. 9.8.** Система маятников Бартона с энергией возбуждения, получаемой от маятника с большим шаром и передаваемой на маленькие шары. Фазы и амплитуды колебаний системы представлены на нижней диаграмме



**Рис. 9.9.** *a* — Масса  $m$  закреплена на упругой пружине и свободно колеблется. *б* — График затухающего колебания (кинетики). *в* — Дисперсия и *г* — поглощение системы, соответствующие решениям 9.6 и 9.7 дифференциального уравнения 9.5

Решением уравнения 9.4 будет:

$$x = \dot{x} \cos(\omega t) + \ddot{x} \sin(\omega t) \quad (9.5)$$

где:

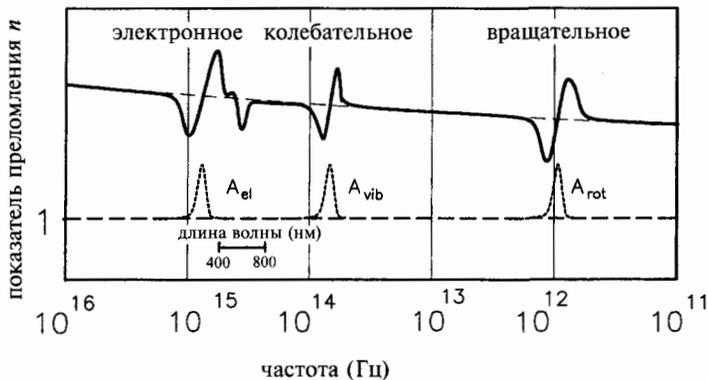
$$\dot{x} = F_0 \frac{m(\omega_0^2 - \omega^2)}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + f^2\omega^2} \quad (9.6)$$

и

$$\ddot{x} = F_0 \frac{f\omega}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + f^2\omega^2} \quad (9.7)$$

Графики функций 9.5 и 9.6 представлены на рис. 9.9, *в* и *г*. Они являются полными аналогами спектров дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД).

На рис. 9.10 схематично представлено изменение нормального показателя преломления  $n$  для неполяризованного света гипотетической молекулой в зависимости от частоты света. Можно отметить тенденцию увеличения показателя преломления  $n$  с возрастанием частоты света, что мы уже наблюдали на рис. 3.34 (глава 3.91) при обсуждении преломления света призмой. Это называется нормальной дисперсией.



**Рис. 9.10.** Уменьшение показателя преломления  $n$  гипотетической молекулы со снижением частоты света. Аномальная дисперсия наблюдается в районе полосы поглощения (электронного, колебательного или вращательного). Соответствующие полосы поглощения обозначены пунктирной линией

*Изменение показателя преломления  $n$  в зависимости от длины волны  $\lambda$  называется дисперсией, определяемой как  $dn/d\lambda$ .*

Как видно из рис. 9.10, в области поглощения любого типа (электронного, колебательного или вращательного) наблюдается «горб» на гладкой кривой частотной зависимости (сравни с дисперсионной кривой на рис. 9.9, в): молекула проявляет резонанс. Если показатель преломления  $n$  увеличивается с уменьшением частоты света, то такое явление называется аномальной дисперсией. Она проявляется в небольшом спектральном диапазоне поглощения, где  $dn/d\lambda$  становится положительным.

*Если к полосе поглощения на частоте  $\nu_0$  подходить с более длинноволновой стороны, то падающий возбуждающий свет с частотой  $\nu$  и скоростью  $c$  будут меньшей частоты, чем резонансная частота  $\nu_0$  поглощающей молекулы. Таким образом, фаза ускоренного колебания диполя будет запаздывать относительно фазы возбуждающего света (см. рис. 9.8 и главу 8.2.2 с рис. 8.10). В результате векторное сложение рассеянной и падающей волны тоже будет изменяться по синусоиде, но с фазовой задержкой по отношению к падающей волне. Это означает снижение скорости распространения результирующей волны ( $c_n = c/n$ ) и, следовательно, возрастание показателя преломления. При подходе к полосе поглощения со стороны более коротких волн верно противоположное утверждение.*

В соответствии с так называемым уравнением Друде, на длине волны  $\lambda = \lambda_0$  наблюдается упоминаемая ранее резонансная катастрофа ( $[\Phi]_\lambda^T \rightarrow \infty$ ):

$$[\Phi]_\lambda^T = \frac{96\pi N}{hc} \frac{R\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \quad (9.8)$$

где  $h$  — постоянная Планка,  $c$  — скорость света,  $N$  — число Лошмидта,  $\lambda_0$  — средняя частота полосы.  $R$  представляет так называемое вращательное сопротивление, пропорциональное интегралу  $\Delta\epsilon$  в отдельной полосе, что соответствует диполю или колебательной силе  $f$  изотропной полосы

поглощения, которая, в свою очередь, пропорциональна интегралу поглощения:

$$f \propto \int_{\text{полоса}} \varepsilon(\nu) d\nu \quad (9.9)$$

Энантиомерные молекулы обладают не только различными показателями преломления, но и отличающимися коэффициентами поглощения лево- или правополяризованного света ( $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_D$ ). Это явление называется круговым дихроизмом (КД), а все явление поглощения и преломления циркулярно поляризованного света оптически активными молекулами — *эффектом Коттона*. Разница в поглощении в зависимости от длины волны определяется следующим выражением:

$$\Delta A(\lambda) = \Delta\varepsilon(\lambda) \times c \times l = A_L(\lambda) - A_D(\lambda) \quad (9.10)$$

где  $A_D$  и  $A_L$  — поглощение право- и левополяризованного по кругу света, соответственно.

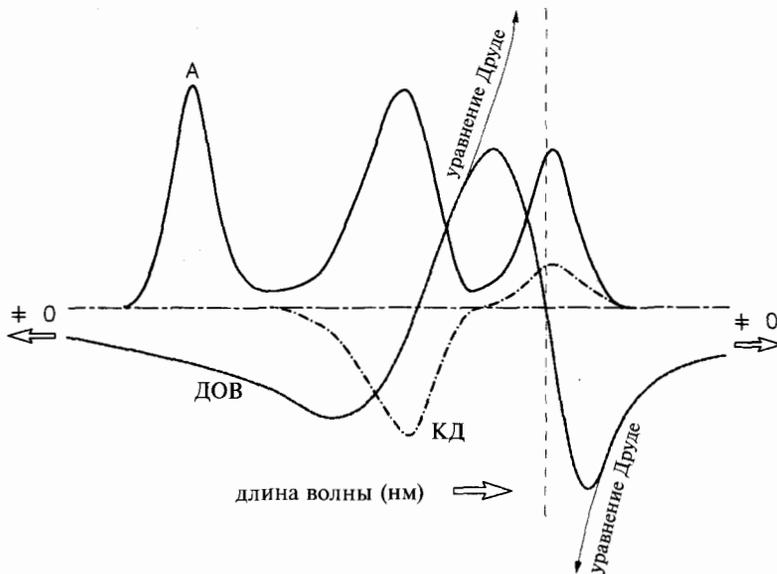
Обычно значение  $\Delta\varepsilon$  мало и составляет от  $10^{-3}$  до  $10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , в то время как значения  $\varepsilon$  составляют от  $10^2$  до  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  (см. таблицу 5.2). Для оптически активных молекул типично диссимметричное отношение  $g = \Delta\varepsilon/\varepsilon$ , которое изменяется от  $10^{-3}$  до менее чем  $10^{-6}$ . Таким образом мы сможем определить экспериментально очень незначительные различия между двумя большими числами. Данное явление будет подробно описано в главе 9.5.

В соответствии с теорией дисперсии, спектры ДОВ, КД и поглощения (A) коррелируют между собой, что на рис. 9.11 представлено для гипотетической молекулы, имеющей три полосы поглощения, две из которых оптически активны и обладают положительным и отрицательным круговым дихроизмом, соответственно. Естественно, полосы КД совпадают с обычными полосами поглощения (т.е. при неполяризованном свете). Поэтому можно записать:

$$\varepsilon = \frac{1}{2}(\varepsilon_L + \varepsilon_D) \quad (9.11)$$

Полосы спектра ДОВ менее выражены, чем полосы КД, и имеют размытые границы, что облегчает их измерение (см. ниже).

Для чистой полосы ДОВ лево- и правополяризованные компоненты плоско поляризованного света проявляют лишь различную задержку в процессе прохождения его через образец, и после выхода они рекомбинируют, давая вновь плоско поляризованный свет, но с поворотом плоскости поляризации (сравните рис. 9.12, а и рис. 9.4). В КД полосе одна компонента поглощается сильнее, чем другая (с противоположной поляризацией). Следовательно, выходящий из образца свет будет эллиптически поляризованным (сравните рис. 9.12, б и рис. 9.5). Причем можно определить отношение короткой и длинной оси эллипса как тангенс угла  $\theta$ , называемого эллиптичностью.



**Рис. 9.11.** Сравнение спектров ДОВ, КД и поглощения (А) гипотетической молекулы. Молекуле присущи три полосы поглощения. Две из них являются оптически активными, и им соответствуют положительный и отрицательный круговой дихроизм. Полосы ДОВ намного перекрывают всю область поглощения. На рисунке обозначена резонансная катастрофа в соответствии с уравнением Друде

Для наглядности эллиптичность на рис. 9.12, б сильно преувеличена. Вследствие, как правило, малого значения диссимметрического отношения ( $< 10^{-3}$ ) истинный эллипс близок к прямой линии, соответствующей длинной оси, и с исчезающе малой короткой осью, как показано на рис. 9.12, а.

Аналогично уравнению 9.1 для ДОВ можно определить удельную эллиптичность:

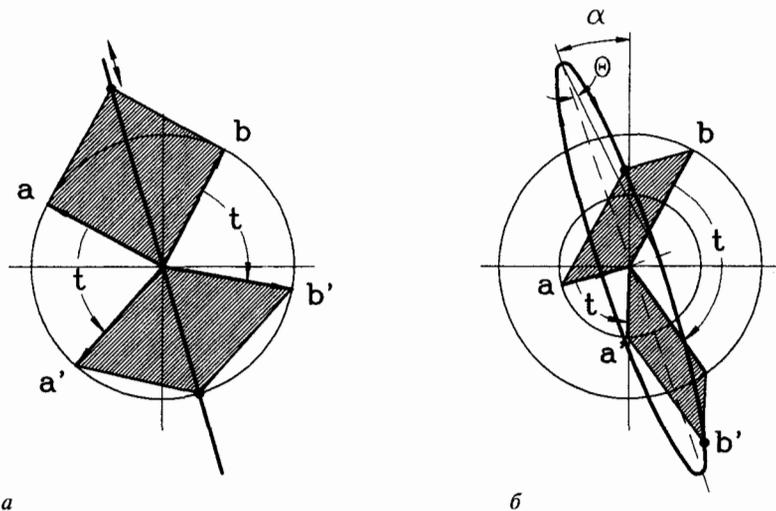
$$[\Psi]_h^T = \frac{\Psi_{obs}}{l \times c} \quad (9.12)$$

где  $\Psi_{obs}$  — измеренная эллиптичность, откуда определяется молярная эллиптичность:

$$[\Theta] = [\Psi] \frac{M_w}{100} \quad (9.13)$$

Для биополимеров (например, белков) и в этом случае используется средняя молярная масса оптически активных остатков (остатков аминокислот):

$$[\Theta]_{MRW} = [\Psi] \frac{MRW}{100} \quad (9.14)$$



**Рис. 9.12.** *а* — Для чистой полосы ДОВ лево- и правополяризованные компоненты плоско поляризованного света проявляют различную задержку в процессе прохождения его через образец, но после выхода они рекомбинируют, давая вновь плоско поляризованный свет, но с поворотом плоскости поляризации. *б* — В КД полосе одна компонента поглощается сильнее, чем другая, в результате чего выходящий из образца свет оказывается эллиптически поляризованным. Отношение короткой и длинной оси эллипса определяется как тангенс угла  $\theta$ , называется *эллиптичностью*

Интенсивность КД спектров выражают либо в виде разностей поглощения  $\Delta\epsilon$ , либо в виде эллиптичности  $[\theta]$ . Молярная эллиптичность и круговой дихроизм ( $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_D$ ) связаны между собой формулой:

$$[\theta] = 3\,300\Delta\epsilon \tag{9.15}$$

где  $[\theta]$  измеряется в  $^\circ\text{см}^2\text{дмоль}^{-1}$ .

#### 9.4. Теоретические основы эффекта Коттона

Как уже рассматривалось в главе 6, электронные переходы приводят к перемещению заряда, приводящего к наведению электрического дипольного момента перехода  $\mu_e$ . Такие перемещения заряда не всегда линейны, а часто содержат (обычно при  $n \rightarrow \pi^*$  переходах) круговые компоненты, так как возбужденное электронное облако изгибается. В соответствии с теорией Максвелла, круговые токи образуют магнитный переходной момент  $\mu_m$ , перпендикулярный круговому движению, которому соответствует  $\mu_e$ . Коллинеарность этих компонентов является необходимым и минимальным условиям оптической активности. В соответствии с теорией, «интенсивность» перехода определяется мнимой частью скалярного произведения  $[\text{Im } \mu_e \mu_m]$  (см. рис. 9.13). Даже если отдельные молекулы не столь упорядочены, как это представлено на рис. 9.13, но свободно движутся и вращаются в про-

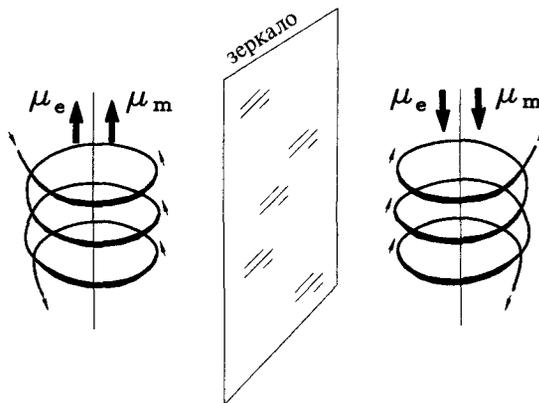
странстве (например, в растворе), то это не изменяет их хиральность — их оптическая активность сохраняется.

ДОВ и КД по сути разные явления, но возникают в соответствии с одними и теми же физическими законами:

- оптическое вращение (ДОВ) является следствием различных показателей преломления право- и левополяризованного света;
- круговой дихроизм (КД) является следствием различного поглощения право- и левополяризованного света;
- уравнение Кронига — Крамера (9.16) связывает эти два явления. Оно позволяет на определенной длине волны из параметров КД спектра вывести значения ДОВ:

$$[\Phi]_{\lambda}^T = 2,303 \frac{9000}{\pi^2} \int_0^{\infty} \Delta \epsilon_{\lambda'} \frac{\lambda'}{\lambda^2 - (\lambda')^2} d\lambda' \quad (9.16)$$

Тогда возникает вопрос: почему, несмотря на это соотношение, используют оба метода? Причина в том, что взаимное отнесение КД и ДОВ сигналов невозможно на поточечной основе. Чтобы получить оптическое вращение на определенной длине волны  $\lambda$ , необходимо принимать во внимание весь КД спектр. На практике, однако, бывает достаточным рассмотреть только наиболее интенсивные полосы КД спектра по соседству с соответствующей длиной волны анализируемой ДОВ полосы. Подобно соотношению корреляции и преобразования Фурье (см. главу 5.4.4), сегодня эти расчеты легко и доступно осуществляются с помощью встроенных компьютеров.



**Рис. 9.13.** Оптически активные молекулы характеризуются «хиральностью» структуры, т.е. невозможностью совмещения со своим зеркальным отображением. Электронные переходы в таких молекулах сопровождаются поступательным и вращательным переносом заряда. В результате возникают электрические токи,двигающиеся по спирали. В соответствии с законами электродинамики, электрический дипольный момент перехода  $\mu_e$  генерирует магнитный дипольный момент перехода  $\mu_m$ , ориентированный в том же направлении. Эта коллинеарность дипольных моментов является необходимым минимальным условием оптической активности

Каждый из этих методов измерения имеет свои преимущества и недостатки. (1) КД полосы определить намного проще, чем ДОВ полосы, так как они не меняют своего знака и более резко выражены (см. рис. 9.10). С другой стороны, поточечные измерения значений ДОВ выполняются на более простых и доступных приспособлениях (например, сахариметрах). (2) Измерения КД спектра более точные, так как они производятся с помощью переменного тока, но при этом требования к аппаратуре более высокие, например, необходимо использовать синхронные усилители (см. главу 5.5).

Следует отметить, что по сравнению с резко выраженными КД полосами полосы ДОВ более протяженные, с «хвостами», простирающимися далеко за полосы поглощения (см. рис. 9.11). Важным следствием этого является то, что даже если молекула поглощает в ультрафиолетовом диапазоне (а ультрафиолетовые измерения проводить гораздо сложнее), хвост ДОВ полосы может быть в видимом диапазоне, где измерения проводить проще (см. таблицу 9.1, где используется D-линия Na, расположенная в середине видимого спектрального диапазона).

### 9.5. Спектрометр КД

Современные КД спектрометры перекрывают весь спектральный диапазон от дальнего УФ (185 нм) до ближнего ИК (1 000 нм). Существенной особенностью этого типа спектрального анализа является измерение весьма малых разностей между сигналами на вершине значительных фоновых сигналов. Это требует чрезвычайно низкого уровня рассеянного света, относительно высоких измеряемых интенсивностей и превосходной эффективности. Вследствие этого КД спектрометры имеют большие габариты, трудны в эксплуатации и очень дороги. Кроме того, они редко используются полностью одной группой, работающей в этой области, как это бывает с абсорбционными или люминесцентными спектрометрами, и обычно КД

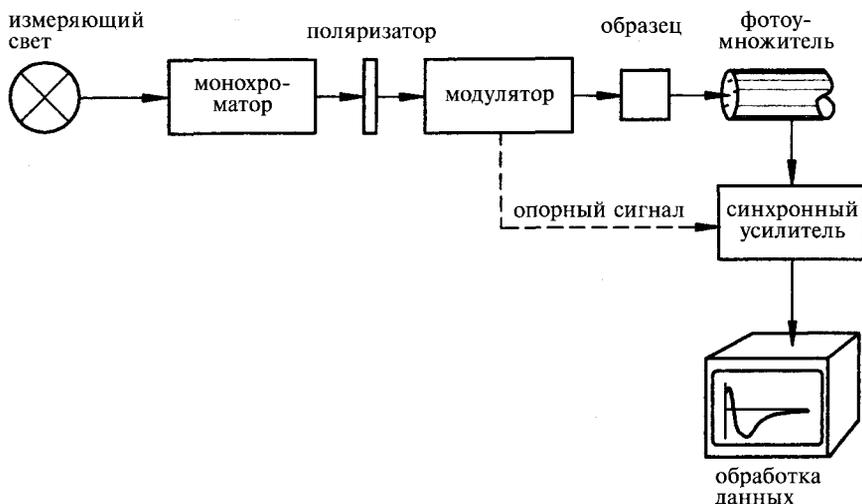


Рис. 9.14. Схема КД спектрометра с указанием всех основных компонентов

спектрометр эксплуатируется сообща несколькими группами. На рис. 9.14 представлена базовая схема КД спектрометра.

Свет от источника интенсивного УФ — видимого излучения диспергируется сканирующим (обычно двойным) монохроматором (см. главу 5.2.5), а затем плоско поляризуется поляризатором (призмой Николя) так, что плоскость поляризации наклонена под углом  $45^\circ$  по отношению к электрооптическому модулятору (ячейке Керра или Покеля, см. рис. 3.28). Модулятор смещает фазу, и получается лево- или правополяризованный свет (см. рис. 9.3) с частотой в килогерцевой области. Такой свет падает на образец, а затем обнаруживается фотумножителем в виде прошедшего света. Синхронный усилитель определяет разницу между исходной (референтной) интенсивностью и интенсивностью прошедшего сквозь образец лево- и правополяризованного света, т.е. измеряется КД сигнал. Изменяя модулятором смещение фазы между двумя лучами, можно оптимизировать (получить максимальное значение) разностного сигнала КД. Результаты измерений обрабатываются, представляются и хранятся во встроенном компьютере.

Здесь мы имеем дело с типичной однолучевой референтной процедурой высочайшей чувствительности — подобной двуволновой спеткроскопии, обсужденной в главе 5.5. В этом случае нулевая линия, т.е. зависимость эффективности спектрометра от длины волны, устраняется использованием обычных методов (см. главу 6.3.2). Аналогично абсорбционной спектроскопии, оптимальное отношение сигнал/шум получается при поглощении  $A = 0,869$  (см. главу 5.2.6). Следует отметить, что в КД спектрометрии следует уделять большое внимание выбору растворителя, так как многие из них проявляют значительное поглощение в УФ — видимом рабочем диапазоне. Толщину образца обычно снижают до 0,1 мм.

## 9.6. Применения

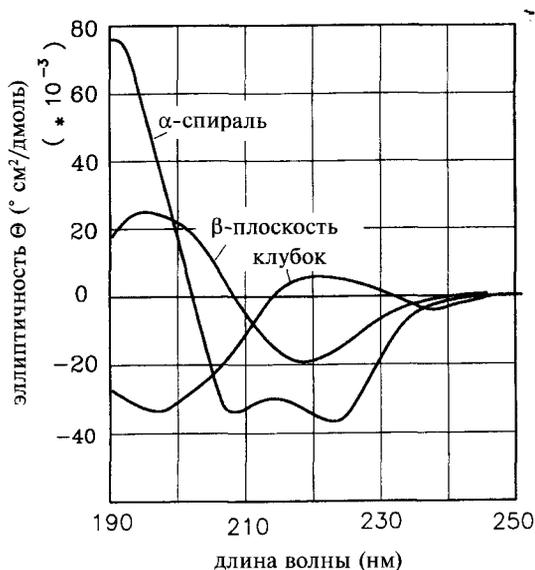
Хирооптические методы применяются для исследования структур молекул, особенно макромолекул. Ранее этот тип анализа ограничивался лишь определением посредством спектроскопии ДОВ содержания спиральных областей в полимерах, другие конформации, также обладающие оптической активностью, игнорировались. За некоторыми исключениями на сегодня КД спектроскопия является наиболее подходящим хирооптическим методом. Конечно, анализ на основе рентгеновских лучей более информативен при исследовании структуры (био-)полимеров. Тем не менее хирооптические методы позволяют получать дополнительную информацию или информацию, недостижимую никакими другими методами. Кроме того, они относительно просты, занимают немного времени и позволяют непосредственно наблюдать за кинетическими изменениями конформации молекул, что невозможно осуществить при проведении рентгеноструктурного анализа.

Получение и интерпретацию КД спектров неизвестных молекул в *поляриметрии* (термин, применяемый для измерений с использованием поляризованного по кругу света) облегчает использование КД спектров похожих соединений, структура которых известна. На основе известных алгоритмов это обеспечивает «математический структурный анализ» неизвестных мо-

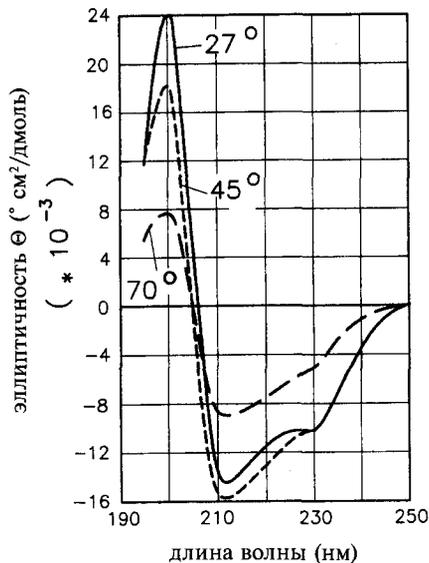
лекул. В качестве стандарта часто используются полипептиды, содержащие идентичные остатки аминокислот с хорошо известной конформацией. На рис. 9.15 представлены примеры референтных КД спектров поли-L-лизина в различных конфигурациях:  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -плоскости и клубка. Разница в спектрах очевидна. На рис. 9.16 показана зависимость КД спектра инсулина (белка с множеством остатков тирозина) от температуры. С увеличением температуры структура изменяется от  $\alpha$ -спирали к денатурированной неупорядоченной форме клубка с некоторыми частями, принадлежащими к  $\beta$ -структуре. Несмотря на большое подобие анализируемого спектра со спектром сравнения требуется большая осторожность в выводах. Даже небольшие фрагменты спиральной структуры или  $\beta$ -плоскости дают вторичные эффекты, которые очень трудно анализировать. Достоверность интерпретации возрастает при сравнении с КД спектрами стандартных белков, структура которых установлена с помощью рентгеновского анализа.

## 9.7. Эллипсометрия

Методу эллипсометрии более 100 лет (она была разработана П. Друде в 1888 г.); это оптоаналитическая процедура, при которой эллиптический или плоскополяризованный свет отражается от подложки. При отражении поляризации света меняется. Этот процесс весьма чувствителен к тому, слой какого вещества нанесен на отражающую поверхность. От него зависит эллиптичность  $\Theta$  и ориентация плоскости поляризации  $a$ , измеряемые с высокой точностью и воспроизводимостью ( $<5 \cdot 10^{-4}$ ) (см. рис. 9.12). Однако следует учитывать, что окна кювет и сам образец должны быть анизотропными. Эллипсометрию используют для изучения реакций ан-



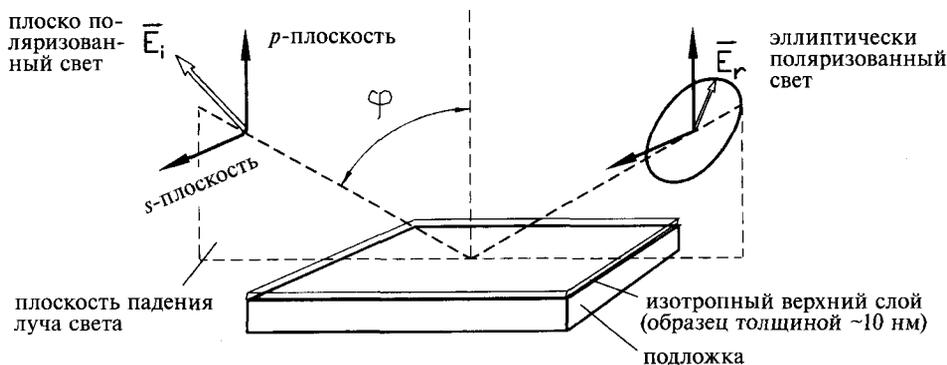
**Рис. 9.15.** Типичные референтные КД спектры поли-L-лизина в различных основных конфигурациях:  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -плоскости и клубка (согласно Ettinger M.J., Timashev S.N., Biochemistry, 1971, v.10, 824 - 830)



**Рис. 9.16.** Зависимость КД спектра инсулина (белка со множеством остатков тирозина) от температуры ( $^{\circ}\text{C}$ ) (согласно Ettinger M.J., Timashev S.N., *Biochemistry*, 1971, v.10, 824 - 830)

тиген — антитело, при исследовании липидных монослоев и биологических мембран, а также для обнаружения маркированных свободных ДНК (предел обнаружения  $\sim 100$  пг) (Azzam, Bashara, 1979). При использовании в качестве источника света лазера эллисометр можно использовать для кинетических исследований на определенной длине волны.

Принципиальное устройство эллисометра с указанием принятой терминологии приведено на рис. 9.17. Тип поляризации падающего света и угол падения  $\phi$  в эллисометрах могут изменяться. Полученные значения представляются в виде  $\gamma_{\text{obs}}$  и  $\Delta$ . Эти значения соответствуют определенным



**Рис. 9.17.** Для описания эллисометрического эксперимента используется так называемая  $p$ - $s$  система координат.  $S$ -плоскость перпендикулярна направлению распространения света и параллельна поверхности образца.  $P$ -плоскость также перпендикулярна направлению распространения света и совпадает с плоскостью падения света

образом соотношению коэффициентов отражения Френеля  $R_p$  и  $R_s$  для  $p$ - и  $s$ -поляризованного света, соответственно:

$$\tan(\Psi_{obs})e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_s} \quad (9.17)$$

Так как эллипсометрия по сути измеряет отношение двух величин, то их нужно получать с высокой точностью и воспроизводимостью. Отношение этих величин в соответствии с уравнением 9.17 должно быть комплексным числом, так как в уравнении имеется информация о фазе  $\Delta$ . В соответствии с формулой Френеля (см. главу 3.5.2) и рис. 9.17, для любого угла падения  $0^\circ < \phi < 90^\circ$   $p$ -поляризованный и  $s$ -поляризованный свет будут взаимодействовать с подложкой по-разному. Состояние поляризации света после отражения определяется вращающимся поляризационным фильтром. Преимуществами эллипсометрии являются высокая точность и воспроизводимость результатов, отсутствие образца сравнения и независимость ее от рассеяния и флуктуаций светового источника и системы фильтрации.

## 9.8. Завершающие комментарии

Молекулы являются оптически активными, если они взаимодействуют с лево- и правополяризованным светом различным образом. Эти взаимодействия можно обнаружить по относительному смещению фазы между циркулярно лево- и правополяризованным светом (дисперсия оптического вращения — ДОВ) или по разности поглощения двух противоположно поляризованных лучей измеряющего света (круговой дихроизм — КД). Однако только несколько хромофоров являются оптически активными сами по себе. В большинстве случаев оптическая активность, т.е. хиральность, генерируется асимметричным микроокружением асимметрично расположенных молекулярных групп. Как следует ожидать, оптическую активность можно индуцировать внешним магнитным полем (магнитный круговой дихроизм МКД). Основное применение КД спектроскопии — это спектральный и/или кинетический анализ вторичных структур белков. Эллипсометрия измеряет изменение эллиптичности и пространственной ориентации эллипса поляризации. Она применяется в основном для кинетического обнаружения тончайших изменений, происходящих в структуре биомолекул при связывании их с субстратом (подложкой).

## 9.9. Дополнительная литература

Auzinsh, M., Ferber, R. *Optical Polarization of Molecules*, Cambridge Monographs on Atomic, Molecular, and Chemical Physics, No. 4, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

Azzam, R.M.A., Bashara, N.M. *Ellipsometry and Polarized Light*, North Holland, Amsterdam, New York, 1979.

Barron, L.D. *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, Cambridge University Press, Cambridge, 2004.

Baszkin, A., Norde, W., eds. *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, Marcel Decker, New York, **2000**.

Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R.W., eds. *Circular Dichroism: Principles and Applications* 2nd Edition, Verlag Chemie (VCH), Weinheim, **1994**.

Brittain, H.G. *Analytical Applications of Circular Dichroism*, Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 14, Elsevier, Amsterdam, **1993**.

Brosseau, C. *Fundamentals of Polarized Light: a Statistical Approach*, John Wiley, New York, **1998**.

Charney, E. *The Molecular Basis of Optical Activity: Optical Rotary Dispersion and Circular Dichroism*, John Wiley, New York, **1985**.

Fasman, G.D., ed. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Siberian School of Algebra and Logic, Kluwer Academic Publishers, **1996**.

Huard, S., Caeca, G. (translator) *Polarization of Light*, John Wiley, New York, **1997**.

Kliger, D.S., Lewis, J.W, Randall, D.A. *Polarized Light in Optics and Spectroscopy*, Academic Press, London, Sydney, Tokyo, **1990**.

Lightner, A. Gurst, J.E. *Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism Spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.

Nakanishi, K. et al. *Circular Dichroism*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.

Rodger, A., Norden, B. *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford Chemistry Masters, Oxford University Press, Oxford, **1997**.

Striebel, C, Brecht, A., Gauslitz, G. *Biosens. Bioelectron.* 1994, 9(2), 139-46.

Sokolov, V.I. *Chirality and Optical Activity in Organometallic Compounds*, Gordon and Breach, New York, **1991**.

Thulstrup, E.W., Michl, J. *Elementary Polarisation Spectroscopy*, Verlag Chemie (VCH), Weinheim, **1997**.

Tompkins, H.G., McGahan, W.A. *Spectroscopic Ellipsometry and Reflectometry: a Users Guide*, John Wiley, New York, **1999**.

# ГЛАВА 10

## СПЕКТРОСКОПИЯ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА

*Legere enim et non intellegere neglegere est*

*Чтение без понимания бесполезно*

*Като*

### 10.1. Введение

В 1800 г. физик и астроном сэра Вильям Гершель открыл ближнее инфракрасное излучение (ближнее ИК). Хотя в настоящее время спектроскопия УФ — видимого диапазона и классическая ИК спектроскопия — широко применяемые аналитические методы, спектроскопия ближнего ИК используется в очень специфических целях. Установлено, что только около 1% всех анализов основано на этом виде спектроскопии. Почти все органические вещества и особенно вода обладают выраженным и специфическим поглощением в спектральном диапазоне от 1 000 до 2 500 нм (см. рис. 10.1). Посредством спектроскопии ближней ИК области легко провести различие между полимерами всех типов, включая полиэтилен, полипропилен, полистирол или полиамид.

Основные преимущества спектроскопии ближней ИК:

- в отличие от обычной ИК спектроскопии используются образцы «нормальной» толщины (10 мм) и кварцевые кюветы, как и в УФ — видимой спектроскопии, предварительной подготовки образца не требуется;
- использование хемометрических методов, таких, как так называемый анализ главного компонента (ГКА) или анализ множественной регрессии, позволяет рутинно проводить в целях контроля анализа большого количества образцов;
- вследствие наличия оптоволокон с прозрачностью до 2 500 нм (см. рис. 3.25) можно проводить измерения образцов, расположенных на расстоянии нескольких километров от спектроскопа, что особенно полезно в промышленных приложениях;
- в отличие от других спектральных методов можно измерять «неспектральные» параметры образца, такие как размер гранул, величина рН, содержание NaCl, кристаллизационная вода, октановое число бензина, старение скоропортящихся образцов, например, в банке крови, или даже температура биологической ткани. Кроме того, спектроскопия ближней ИК широко применяется в исследованиях

снежных покровов и льдов, в картографии растительности, усыхания лесов и т. п. исследований, дистанционно проводимых с самолетов и спутников.

Фактически диапазон применения спектроскопии ближней ИК области неограничен. В первой части данной главы будут рассмотрены теоретические основы и методология этого вида спектроскопии. Во второй части главы будут приведены отдельные примеры из различных областей науки и техники, подтверждающие ее потенциальные возможности. В 1987 г. был создан Германский Совет по спектроскопии ближней ИК области. В начале 90-х годов прошлого века был создан международный Совет по спектроскопии ближней ИК области (CNIRS), который регулярно проводит конференции и с 1993 г. издает журнал, в котором публикуется информация о новых достижениях в этой области. Продажи аппаратуры для ближней ИК области возрастают в среднем на 15% ежегодно.



Сэр Вильям Гершель  
(1738—1822)

## 10.2. Теория спектроскопии ближнего инфракрасного диапазона

Как уже упоминалось, атомы обладают только электронными энергетическими уровнями, переходы между которыми проявляются в виде узких спектральных линий. В молекулах, помимо этого, имеются еще колебательные и вращательные уровни энергий. Поэтому их спектры отличаются от спектров атомов: в них присутствуют как отдельные линии, так и полосы и даже системы спектральных полос большой сложности. Все они обусловлены состояниями так называемых валентных электронов, ответственных за химические свойства молекул, что, в свою очередь, объясняет интерес

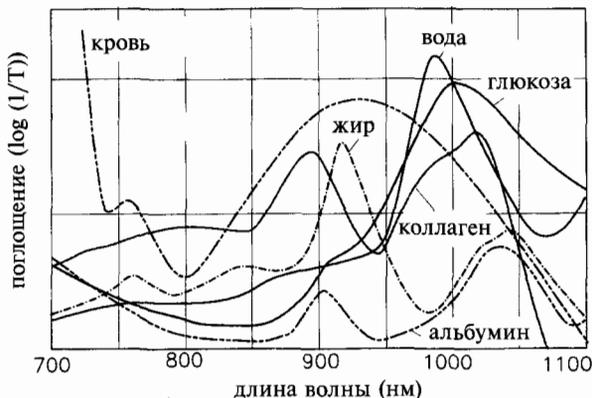


Рис. 10.1. Почти все вещества обладают выраженным поглощением в ближней ИК области, в том числе вода, кровь и различные ее компоненты

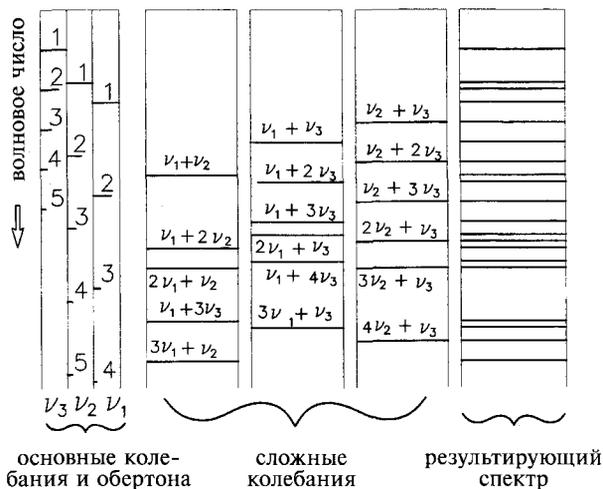
к спектроскопии ближней ИК области. Инфракрасная эмиссия практически незначительна, даже если ее можно измерить: она наблюдается только от очень нагретых образцов с возбужденными колебательными состояниями.

Хотя возбужденные состояния электронов ограничены спектральным диапазоном между 100 и 800 нм, энергия колебательных и вращательных полос имеет более расширенный диапазон (см. главы 1 и 2). Как уже обсуждалось ранее, основные колебания начинаются с 2,5 мкм и простираются до 25 мкм, а чисто вращательные полосы с длинами волн от 45 до 1 000 мкм находятся в дальнем ИК диапазоне. На первый взгляд, спектральная область между 800 и 2 500 нм кажется «необитаемой». Действительно, в первом издании немецкого справочника по ИК спектроскопии Günzler и Böck 1975 г. эта область названа неинформативной.

Тогда как только некоторые молекулы имеют цвет и, следовательно, поглощают в видимом диапазоне, в ближней ИК области спектрально представлены практически все органические молекулы, в которых доминируют СН-, NH- и OH-группы. Не проявляют ближнего ИК поглощения молекулы типа 1,2-дибром-1,1,2,2-тетрахлорэтана ( $C_2Br_2Cl_4$ ), сероуглерода ( $CS_2$ ) или бромида бора ( $BBr_3$ ). В зависимости от количества различных колебательных мод и в результате межмолекулярных взаимодействий мы наблюдаем либо очень острые ( $CO_2$ ), либо размытые или незначительные ( $H_2O$ ) пики поглощения, а иногда и сложное сочетание таких поглощений. Это так называемые «молекулярные отпечатки», которые более выражены, чем в УФ — видимом диапазоне, но менее характерны, чем в ИК области, где проявляются как простые органические молекулы типа кислот, сахаров или жиров, так и сложные — типа полимеров, полисахаридов или белков. Существуют спектральные библиотеки, в том числе и для ближней ИК области, которые позволяют быстро с помощью компьютера идентифицировать образец.

Естественно, возникает вопрос, в результате чего образовалось это спектральное разнообразие? Ответ заключается в следующем: оно физически обусловлено обертонами гармоник известных основных<sup>1</sup> ИК колебаний и, что наиболее важно, всеми типами сопутствующих интерферирующих *сложных колебаний*. Этот эффект можно рассмотреть на примере трехатомной молекулы  $CO_2$ , имеющей три основных колебания  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  и  $\nu_3$  (два валентных и одно деформационное) в средней ИК области (см. рис. 10.2). Интенсивность обертонов снижается с возрастанием порядка. По правилу отбора в ближней ИК области получаем множество сложных полос.

Количество сложных колебаний значительно увеличивается с возрастанием числа атомов в молекуле. Даже для относительно простых молекул суммарная плотность колебательных полос составляет порядка 1 000 на одно волновое число. Отдельные колебательные моды внутри молекулы интерферируют друг с другом, однако, не случайным образом. Существуют два типа инфракрасных колебаний: первый проявляется в ИК спектре (*ИК активные* колебания), если при возбуждении изменяется дипольный момент, а второй, связанный с изменением поляризуемости молекулы, проявляется только в КР спектрах (*Рамановски (КР) активный*). В зависимости от основных колебаний для сложных колебаний действуют правила сим-



**Рис. 10.2.** Основные колебания  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  и  $\nu_3$  трехатомной молекулы локализованы в средней ИК области. Интенсивность их обертонов снижается с возрастанием порядка и увеличением длины волны. По правилу отбора в ближней ИК области получаем множество сложных полос, образующих результирующий спектр (на схеме для упрощения указаны только длины волн без указания интенсивности)

метричного отбора. Количество комбинаций, проявляющихся в ближней ИК области, значительно возрастает по квантово-механической причине: случайное вырождение, т.е. когда колебания различного происхождения имеют одну и ту же энергию, так называемое Ферми-взаимодействие приводит к энергетическому расщеплению первых уровней вырождения. Ввиду высокой плотности колебательных полос такие вырождения — скорее правило, чем исключение. Хотя и последнее, но не менее важное, это то, что в отличие от УФ — видимой спектроскопии в ближней ИК области с применением статистического подхода удается интерпретировать кажущиеся неразрешимыми спектры сложных образцов со множеством различающихся молекул.

### 10.3. Инфракрасный спектрометр

Несмотря на то, что в ближней ИК области используется целый ряд оптических компонентов (зеркал, линз, дифракционных решеток, источников света и даже оптоволокон), классическим и старейшим детектором для нее является резистор из сульфида свинца (PbS, 1 000—4 000 нм). В последние годы, благодаря своим преимуществам, в качестве детектора все чаще используется полупроводниковый индий-галлий-мышьяковистый фотодиод (InGaAs). Для него не обязательно охлаждение, он имеет расширенный спектральный диапазон и улучшенные динамические характеристики из всех известных детекторов ближней ИК области. Однако для новых фотумножителей, используемых в этой области, охлаждение требуется (см. главу 3.7.1). В качестве монохроматоров могут быть использованы все клас-

сические и новые типы:

- фотометры со съёмными фильтрами (3—6 фильтров). Эти устройства являются самыми простыми и наиболее дешёвыми;
- классический монохроматор с решеткой для ближней ИК области и соответствующими фильтрами подавления высших порядков;
- спектрометр с диодной матрицей на InGaAs. Стоимость таких спектрометров все еще достаточно высока — в пять раз выше спектрометров с диодной матрицей для УФ — видимого диапазона;
- спектрометр Фурье: преимущества мультиплексности, светосилы и калибровки посредством лазера сравнения. Измерения производятся в секундной временной шкале и с высокой точностью. Однако стоимость таких устройств высока;
- быстросканирующий спектрометр с колеблющимися или вращающимися зеркалами;
- оптоакустическая перестраиваемая решетка (кристалл  $\text{TeO}_2$ , который методом спекания соединен с пьезоэлектрической пластиной).

Для калибровки в УФ — видимой области используются миниатюрные лампы, дающие острые атомные эмиссионные линии аргона, ксенона или криптона. В ближней ИК области для калибровки спектров поглощения/отражения используются оксиды редкоземельных металлов, таких как дидимий и эрбий, или силиконовая смазка и полистирол, даже если их спектральное разрешение много меньше интересующих эмиссионных линий. Компания «Brucker» (Германия) придумала оригинальное решение для калибровки спектрометров Фурье в ближней ИК области: пары воды, всегда присутствующие в качестве «загрязнителя», дают чрезвычайно узкие и энергетически хорошо определяемые вращательные линии в дополнение к более высокому порядку колебательным линиям. Это обеспечивает превосходную и автоматическую калибровку по длинам волн/волновым числам (см. рис. 10.5).

Конечно, даже в видимой и ближней ИК области в диапазоне от 600 до 1 000 нм присутствуют колебания более высокого порядка (обертон) различных молекул, что также используется (например, в тесте Futorex, США при определении сахара в крови). Преимуществом здесь является использование классического (более чувствительного и с большим динамическим диапазоном) фотоумножителя или недорогих и чувствительных кремниевых детекторов, но недостатком является более слабое поглощение и гораздо большая сложность спектров, а также перекрывание с электронными спектрами в видимом диапазоне.

#### 10.4. Представление спектров ближней ИК области

Спектры ближней ИК области могут быть представлены различными способами: (1) «реальным» представлением поглощения, получаемого при прохождении света через жидкий или газообразный образец; (2) «линейным» нескорректированным представлением пропускания (Т). Обычно спектры поглощения («А») в ближней ИК области представляют в режиме отражения:  $A = \log(R_0/R) = \epsilon \times x \times c$ , где концентрация дана в моль  $l^{-1}$ , а единица

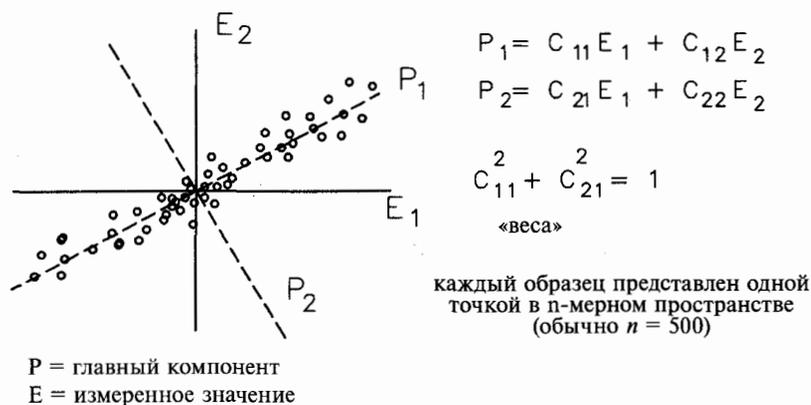
измерения  $\epsilon$  дана в моль<sup>-1</sup> см<sup>2</sup>. Причиной этого является малый динамический диапазон детекторов для ближней ИК области — всего 1—2 порядка, тогда как ФЭУ имеют 6—7 порядков. Однако имеется много преимуществ использования отражательной спектроскопии. Это ее неинвазивность, возможность исследования непрозрачных образцов и проведения спектральных измерений практически со всеми образцами без исключения.

В отличие от традиционной ИК спектроскопии, где в зависимости от волнового числа  $k$  (см<sup>-1</sup>) откладывается пропускание (так как энергия  $E = khc$ ), в ближней ИК области, так же как в УФ — видимой, изображают спектры поглощения в зависимости от длины волны (1 000—2 500 нм соответствуют 10 000—4 000 волновых чисел).

## 10.5. Алгоритмы анализа спектров ближней ИК области

Мало того, что спектры даже маленьких молекул в ближней ИК области характеризуются большой сложностью, реальные образцы часто состоят из смеси молекул, например из воды, жира, крахмала, сахара и белка, и их концентрации необходимо измерять одновременно. Подобный сложный спектр практически невозможно разделить на индивидуальные компоненты, как это делается со спектрами ЯМР (ядерного магнитного резонанса) или с ИК спектрами. Информация о структуре и составе спектра скрыта, как если бы она была закодирована, и классическая интерпретация невозможна. Количественный и качественный анализ возможен только на основе статистических, так называемых «хеометрических» методов.

За длительное время разработано множество способов идентификации большого набора данных, которые доступны по статистике. Общий принцип различных и часто математически очень сложных методов (множественной линейной регрессии, наименьших квадратов,  $P$ -матриц) может быть кратко объяснен на примере статистического метода анализа главного компонента (ГКА), часто используемого при анализе в ближней ИК области. Чтобы понять суть метода, ограничимся рассмотрением только двух длин волн (рис. 10.3). Однако ГКА позволяет проанализировать весь спектр, включающий, например, данные по 500 измеряемым точкам. Первым шагом является измерение спектров отражения в ближней ИК области так называемых *тестовых образцов* в количестве, например, 50 идентичных образцов, т. е.  $m = 50$ . Далее измеренные значения энергии отражения  $E$  (только  $E_1$  и  $E_2$  в данном примере) всех отдельных тестовых образцов (здесь 50) отображают в 500-мерном пространстве (на рис. 10.3 это двумерное пространство). Так как главные компоненты описываются различными данными, то энергии отражения  $E$  представлены как отклонения от их средних значений. Затем жестко поворачивают исходные оси координат  $E_1$  и  $E_2$  этого пространства таким образом, чтобы значения  $E$  максимально совпали с одной из новых осей координат. Эта ось  $P_1$  будет первым главным компонентом. Вторая новая ось  $P_2$ , которая, по определению, перпендикулярна первой, становится вторым главным компонентом. Новые оси координат можно линейно описать через исходные оси координат:



**Рис. 10.3.** Иллюстрация принципов хемометрии на основе широко используемого в ближней ИК области статистического метода анализа главного компонента (ГКА). Пример упрощен до использования только двух (обычно на практике используется 500) длин волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  с измеренными значениями энергии отражения  $E_1$  и  $E_2$

$$P_1 = C_{11}E_1 + C_{12}E_2 \quad (10.1)$$

$$P_2 = C_{21}E_1 + C_{22}E_2 \quad (10.2)$$

Коэффициенты  $C_{11}, \dots, C_{nn}$  обычно называются «весом» и всегда нормализованы таким образом, что сумма квадратов весов любого компонента равна единице. В примере на рис. 10.3 это:

$$C_{11}^2 + C_{12}^2 = 1 \quad (10.3)$$

$$C_{21}^2 + C_{22}^2 = 1 \quad (10.4)$$

Веса любого главного компонента получают из сравнения по отношению ко вращению, которое определяет положение новой оси. В рассматриваемом примере каждый образец представлен единственной точкой в двух измерениях. Измерение целого спектра, например, из 500 точек, приведет к 500-мерной диаграмме на рис. 10.3, внутри которой каждый образец будет представлен единственной точкой. Каждый главный компонент, следовательно, определяется через исходное значение отражения выражением:

$$P_n = C_{21}E_1 + C_{22}E_2 + \dots + C_{500}E_{500} \quad (10.5)$$

где  $E_i$  — энергия отражения на длине волны  $i$ , а  $C_i$  — коэффициент или вес этой энергии на длине волны  $i$ .

$$C_1^2 + C_2^2 + \dots + C_{500}^2 = 1 \quad (10.6)$$



Математически главные компоненты — это собственные векторы ковариационной матрицы  $S$  энергий отражения, а изменения его вдоль каждой компонентной оси являются собственными значениями  $S$  (подробнее см. дополнительную литературу к главе). Конечно, самые большие изменения в спектре будут происходить на тех длинах волн, где индивидуальные компоненты представлены в максимальной степени. Каждый главный компонент проявляет меньшие изменения, чем его предшественник. Практика показала, что в большинстве случаев принимают во внимание только первые шесть главных компонентов, которые описывают спектральные изменения практически полностью (до 99,8%).

Главные компоненты только «конструируют» спектр без какого-либо непосредственного значения, однако, вследствие своего математического происхождения именно они достаточно хорошо представляют основные индивидуальные компоненты образца. На основе этих главных компонентов для каждого химического компонента могут быть определены оптимальная длина волны измерения и соответствующий коэффициент для расчета концентрации. Таким образом, определяя «один из всех», получают калибровочную диаграмму концентраций  $l$  компонентов на основе  $m$  калибровочных образцов.

Обычные измерения, например, в химической и фармацевтической промышленности, требуют быстрого спектрального мониторинга. Главной особенностью количественных хемометрических процедур является возможность калибровки по интересующим компонентам без предварительной информации об образце и независимо от остальных компонентов. Общий состав образца редко известен, однако, в хемометрике отдельные компоненты не связаны. Наиболее приемлемые длины волн анализа выбираются на основании математического алгоритма. Другой важный аспект хемометрики — достоверная оценка всех стандартных отклонений, так как они автоматически обеспечиваются алгоритмом, например, компьютерной программой. Таким образом рутинный анализ в ближней ИК области может быть легко выполнен даже неспециалистом в этой области.

## 10.6. Применения

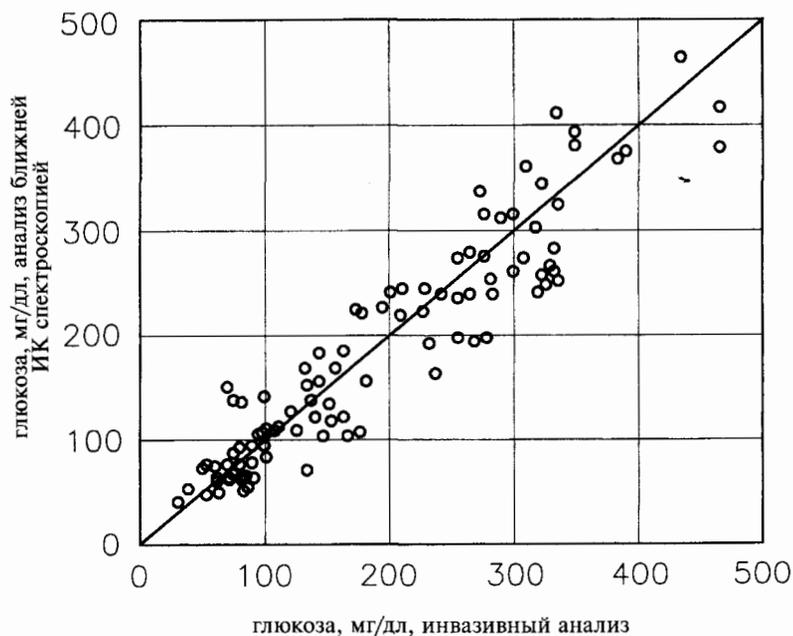
Возможности применения спектроскопии ближней ИК области практически безграничны и ограничены только фантазией пользователя. На сегодняшний день она уже используется для решения целого ряда задач как в научных исследованиях, так и в промышленности, а в будущем несомненно заменит более дорогостоящие и продолжительные классические аналитические методы, например:

- в переработке отходов и в безотходном производстве для разделения компонентов отходов (особенно пластмасс);
- для определения иодного числа (количества двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах), ОН-числа;
- для определения ароматики;
- в жидкостной хроматографии высокого давления, в тонкослойной хроматографии;

- в анализе окружающей среды, в исследованиях растительности, в лимнологии, в геологии, в почвенном анализе;
- в исследовании воды и водных ресурсов, снежных покровов, солености океанов, кристаллизационной воды, определения pH;
- при анализе продовольствия (мяса, хлеба, круп, соков, фруктов, кофе, содержания никотина, какао, молочных продуктов и т. д.);
- в нефтехимии (определение компонентов бензина, октанового числа);
- в биохимии (определение белков, углеводов, жиров, воды);
- в фармацевтической промышленности при контроле сырья на содержание таких веществ, как кофеин, теофиллин, салициловая кислота, парацетамол, новонал;
- в текстильной промышленности.

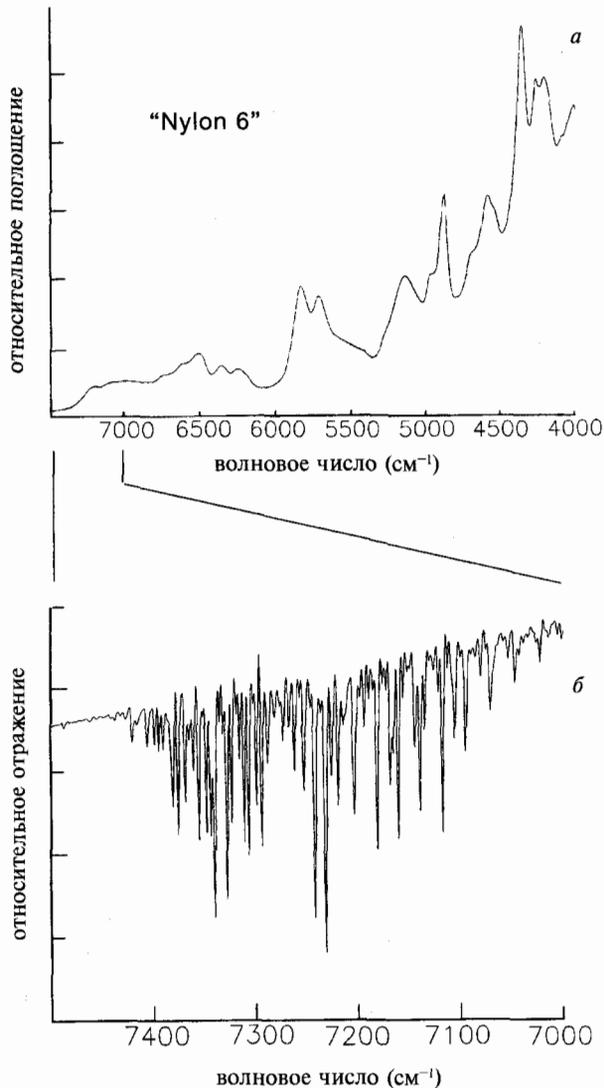
### 10.6.1. Медицина и фармакология

На рис. 10.1 приведен спектр некоторых компонентов крови. Подобно неинвазивному методу определения кислорода в крови посредством импульсного оксиметра, надеваемого на палец, в медицинской практике очень важны неинвазивные способы определения холестерина, альбумина, билирубина, глюкозы и прочих веществ. Спектроскопия ближней ИК области уже широко применяется в фармацевтической промышленности, и в оп-



**Рис. 10.4.** Сравнительные результаты определения глюкозы в крови неинвазивным (без прокола кожи) способом (используя для этого левый указательный палец пациента) и обычным (травматическим) способом взятия венозной крови из того же пальца. Для каждого образца статистически проанализирован весь спектр в ближней ИК области (согласно Futurex Inc., США)

ределенной степени — в медицине. Ее основные преимущества заключаются в быстроте выполнения высокоточного анализа, проводимого без контакта с жидким или твердым образцом в виде ткани, таблетки или порошка. Анализ может производить персонал без специального обучения. На рис. 10.4 представлены сравнительные результаты определения глюкозы в крови неинвазивным (без прокола кожи) способом (используя для этого левый указательный палец пациента) и обычным (травматическим) спосо-



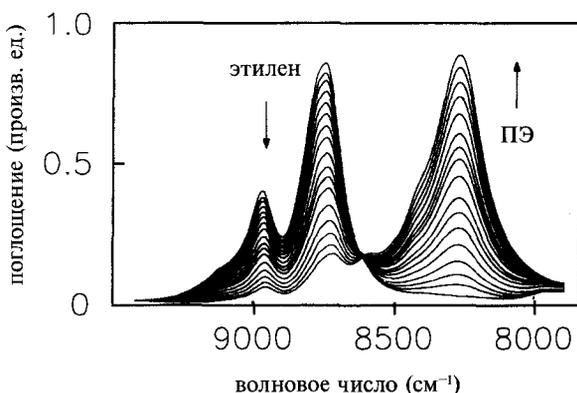
**Рис. 10.5.** *a* — скорректированный, измеренный в виде спектра отражения спектр поглощения нейлона 6 в ближней ИК области; *б* — в области от 7 000 до 7 400 см<sup>-1</sup> расположен обертон колебательной полосы присутствующих паров воды. Этот обертон, в свою очередь, состоит из большого количества очень узких вращательных линий, которые применяются для прецизионной калибровки по длинам волн

бом взятия венозной крови из того же пальца.

### 10.6.2. Пластмассы

На рис. 10.5, а представлен скорректированный, измеренный в виде спектра отражения спектр поглощения в ближней ИК области обычной пластмассы — нейлона 6. Сглаженная форма нулевой линии во всем диапазоне ближней ИК области искажается в диапазоне от 7 000 до 7 400  $\text{см}^{-1}$  обертонами колебательных полос всегда присутствующих паров воды. Обертоны воды представлены большим количеством очень острых, хорошо определяемых вращательных полос (см. рис. 10.5, б), которые применяются для калибровки по длинам волн.

Различные пластмассы типа полиамида (ПА), полипропилена (ПП) или полиэтилена (ПЭ) имеют специфические и хорошо выраженные спектры поглощения, которые позволяют отличать их друг от друга. Полимеризация этилена под высоким давлением была проведена впервые в 1933 г. и является наиболее важной реакцией, проводимой в больших масштабах. Только в Европе производится ежегодно около трех миллионов тонн полиэтилена при давлении 3 кбар и температуре 150–300°C. Управление технологическим процессом его производства осуществляется с применением спектроскопии в ближней ИК области и основано на сравнении характеристических полос спектров поглощения этилена и полиэтилена. На рис. 10.6 приведены колебательные спектры второго порядка этилена и полиэтилена. В третьем обертоне между волновыми числами от 10 000 до 12 000 подобная картина сохраняется и даже в более выраженной форме. Основное правило, гласящее, что спектры становятся все более резко выраженными и разделенными с увеличением порядка обертона, выполняется и здесь. Это объясняется возрастанием ангармоничности с увеличением

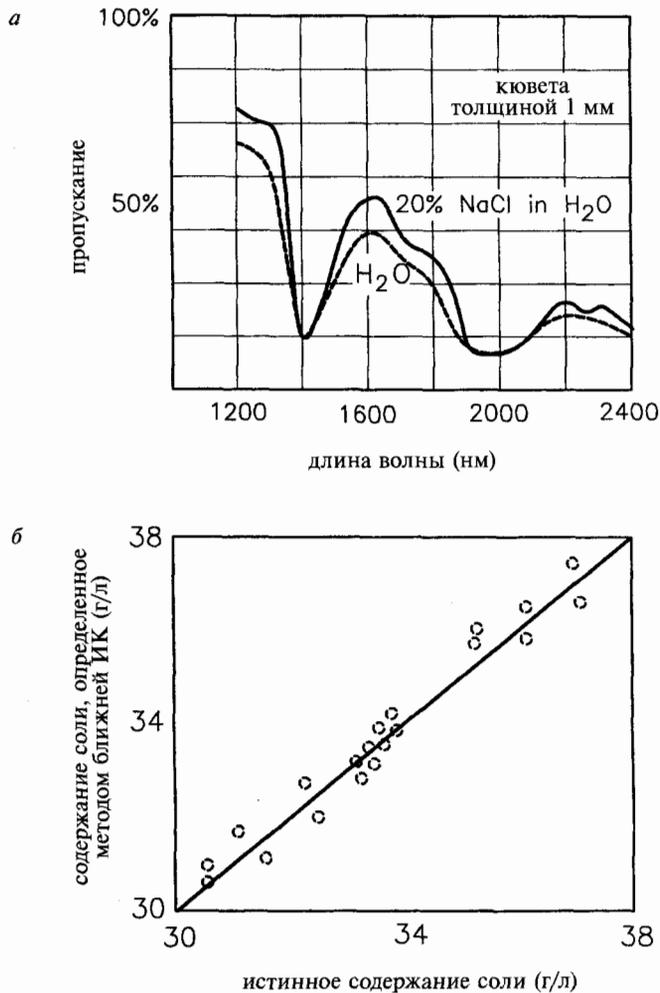


**Рис. 10.6.** Спектры поглощения в ближней ИК области (обертона второго порядка), полученные в процессе свободнорадикальной полимеризации этилена при температуре 190°C и давлении 2 630 бар (согласно Buback и Vögele, *FT-NIR Atlas*, Verlag Chemie (VCH), Weinheim, 1993). Четко выраженная изобестическая точка при волновом числе 8 600 свидетельствует непосредственно о прохождении реакции полимеризации

колебательного возбуждения (сравните с рис. 2.23).

### 10.6.3. Солевой состав морской воды

На первый взгляд определение солевого состава морской воды оптической спектроскопией кажется нереальным, так как хлористый натрий — типичный прозрачный для ИК излучения материал, поэтому подобное определение является типичным примером измерения с помощью спектроскопии ближней ИК области «неспектральных свойств» веществ. В этой связи



**Рис. 10.7.** Определение «неспектральных свойств» посредством спектроскопии ближней ИК области на примере определения содержания соли в морской воде: *а* — спектр пропускания в ближней ИК области чистой воды и воды с содержанием 20% соли; *б* — с помощью хемометрики получена, как описано в тексте, хорошая корреляция между действительным (по весу) и измеренным ближней спектроскопией содержанием соли

значением становится понятие *ИК-сдвигающего агента*. Хлористый натрий изменяет структуру воды, модифицируя водородные связи, что отражается на спектрах в ближней ИК области (см. рис. 10.7, а). Калибровочная кривая, приведенная на рис. 10.7, б была получена на основе одной из хемотрических обработок (модифицировано по Hirshfeld, Lawrence Livermore Laboratory, Livermore, США). По этой кривой очень быстро и недорого осуществляется определение солевого состава морской воды с борта судна, например. Помимо солевого состава морская вода может быть исследована посредством спектроскопии ближней ИК области и по другим параметрам: значению рН (концентрации протонов) и даже температуры. Это делается быстро, бесконтактно и очень точно.

## 10.7. Выводы

Хотя спектроскопия в ближней ИК области некоторыми «классическими спектроскопистами» считается псевдонаукой из-за присущей ей сложности и проблем, связанных с немедленной интерпретацией спектров, для исследователя-практика важен только результат. А он заключается в быстроте, доступности, дешевизне и неинвазивности получения ценной аналитической информации, желателен *in vivo* и без трудоемкой предварительной химической подготовки. Именно в этом отношении спектроскопия в ближней ИК области обеспечивает беспрецедентные преимущества и возможности. Ее будущее лежит в плоскости практического применения, а не в теоретических исследованиях.

## 10.8. Дополнительная литература

Batten, G.D., Flinn, P.C., Welsh, L.A., Blakeney, A.B. *Leaping Ahead with Near-infrared Spectroscopy*, NIR Publications, Chichester, **1995**.

Buback, M., Vögele, H.P. *FT-NIR Atlas*, Wiley-VCH, Weinheim, **1993**.

Burns, D.A., Ciurczak, E.W., eds. *Handbook of Near-Infrared Analysis, Practical Spectroscopy*, 2nd edn., Marcel Decker, New York, **2001**.

Cho, R.K., Davies, A.M.C., eds. *Near-infrared Spectroscopy*, Proceedings of the 10th International Conference, Chichester, UK, ISBN 0952 8666 33, NIR-Publications, **2002**.

Ciurczak, E.W., Drennen, J.K. *Pharmaceutical and Medical Applications of Near-infrared Spectroscopy (Practical Spectroscopy)*, Marcel Decker, New York, **2002**.

Conzen, J.-P., Schmidt, A. *Non-destructive Quality Control of Pharmaceutical Tablets by Near-infrared Reflectance Spectroscopy. Near-infrared Spectroscopy: The Future Waves*, Proceedings of the 7th International Conference on Near-infrared Spectroscopy, Montreal, Canada, **1995**.

Daehne, S., Resch-Genger, U., Wolfbeis, O.S. *Near-infrared Dyes for High Technology Applications*, Kluwer Academic Publishers, **1998**.

Davies, A.M.C., Williams, P.C., eds. *Near-infrared Spectroscopy: The Future Waves*, NIR Publications, Charlton, Chichester, **1996**.

Fearn, T. *Chemometrics for Near-infrared Spectroscopy: Past, Present and Future*, *Spectrosc. Europe* **2001**, 13/2, 10-14.

Gans, P. *Data Fitting in Chemical Sciences by the Method of Least Squares*, John Wiley & Sons, New York, **1992**.

Mardia, K.V., Kent, J.T., Bibby, J.M. *Multivariate Analysis*, Academic Press, New York, London, **1979**.

Mark, H. *Principles and Practice of Spectroscopic Calibration*, John Wiley & Sons, New York, **1991**.

Mark, H., Workman, J. *Statistics in Spectroscopy*, Academic Press, New York, London, **1991**.

Martens, H., Naes, T. *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, New York, London, **1992**.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Data Handling in Science and Technology Vol. 20, Elsevier, Amsterdam, **1998**.

McClure, W.F. *Near-infrared Spectrometry: Learning the Fundamentals*, book & disk edn., John Wiley & Sons, New York, **2006**.

Meier, P.C., Zund, R.E. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, **1993**.

Morgan, E. *Chemometrics: Experimental Design: Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, New York, **1991**.

Morrison, D.F. *Multivariate Statistical Methods*, McGraw-Hill, New York, **1967**.

Murray, I., Cowe, L.A. *Making Light Work: Advances in Near-infrared Spectroscopy*, Verlag Chemie (VCH), Weinheim, **1992**.

Osborn, B.G., Fearn, X., Hindle, P.H. *Practical NIR Spectroscopy in Food and Beverage Analysis*, 2nd. edn., Longman, London, **1993**.

Otto, M. *Chemometrics*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

Raghavachari, R. *Near-infrared Applications in Biotechnology (Practical Spectroscopy)*, Marcel Decker, New York, **2000**.

Zupan, J., Gasteiger, J. *Chemometrics: Experimental Design*, Verlag Chemie (VCH), Weinheim, **1991**.

General: <http://www.nirpublications.com> (books, periodicals, web, CD-ROM, training).

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1

## Основные физические константы

Скорость света в вакууме	$c$	$2,9979245 \cdot 10^8 \text{ м с}^{-1}$
Постоянная Планка	$h$	$6,626176 \cdot 10^{-34} \text{ Дж с}$
	$\hbar = h/2\pi$	$1,0545887 \cdot 10^{-34} \text{ Дж с}$
Константа Стефана-Больцмана	$\sigma = \frac{\pi^2 k^4}{60 \hbar^3 c^2}$	$5,67032 \cdot 10^{-23} \text{ Дж К}^{-4}$
Константа закона смещения Вина	$\lambda_{\text{max}} \text{ Т}$	$2,8978 \cdot 10^3 \text{ м К}$
Константа Ридберга	$R_y = \frac{2\pi^2 m e^4}{h^2}$	$1,0973731 \cdot 10^7 \text{ м}^{-1}$
Боровский радиус	$a_0$	$5,29167 \cdot 10^{-11} \text{ м}$
Масса покоя электрона	$m_e$	$9,1091 \cdot 10^{-31} \text{ кг}$
Масса покоя нейтрона	$m_n$	$1,67482 \cdot 10^{-27} \text{ кг}$
Масса покоя протона	$m_p$	$1,67252 \cdot 10^{-27} \text{ кг}$
	$m_p/m_e$	1836,151
Элементарный заряд	$e$	$1,602189 \cdot 10^{-19} \text{ Кл}$
Радиус электрона	$r_e$	$2,81777 \cdot 10^{-15} \text{ м}$
Магнетон Бора	$\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e}$	$9,2407 \cdot 10^{-24} \text{ Дж Т}^{-1}$
Ядерный магнетон	$\mu_N = \frac{e\hbar}{2m_p}$	$5,0508 \cdot 10^{-24} \text{ Дж Т}^{-1}$
Число Авогадро	$N_A$	$6,0225 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$
Газовая постоянная	$R$	$8,31441 \text{ Дж моль}^{-1} \text{ К}^{-1}$
Постоянная Больцмана	$(\chi =)k = \frac{R}{N_A}$	$1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ Дж К}^{-1}$
Молярный объем идеального газа при $T_0 = 273,15 \text{ К}$ , $p_0 = 101325 \text{ Па}$	$V_m = \frac{RT_0}{p_0}$	$2,2413 \cdot 10^{-2} \text{ м}^3 \text{ моль}^{-1}$
Постоянная Фарадея	$F = N_A e$	$9,6484 \cdot 10^4 \text{ Кл моль}^{-1}$
Гравитационная постоянная	$G$	$6,6720 \cdot 10^{-11} \text{ Н м}^2 \text{ кг}^{-2}$

	Дж	эрг	кВт ч	кал	эВ	см-1	Гц
1 Дж	1	$10^7$	$2,777778 \times 10^{-7}$	$2,388459 \times 10^{-1}$	$(6,2418 \pm 3) \times 10^{18}$	$(5,0345 \pm 3) \times 10^{22}$	$(1,5093 \pm 1) \times 10^{33}$
1 эрг	$10^{-7}$	1	$\frac{2,777778}{\times 10^{-14}}$	$2,388459 \times 10^{-8}$	$(6,2418 \pm 3) \times 10^{11}$	$(5,0345 \pm 3) \times 10^{15}$	$(1,5093 \pm 1) \times 10^{26}$
1 кВт ч	$3,600000 \times 10^6$	$3,600000 \times 10^{13}$	1	$8,598452 \times 10^5$	$2,2471 \times 10^5$	$(1,8124 \pm 1) \times 10$	$(5,4335 \pm 5) \times 10^{39}$
1 кал	4,1868	$4,1868 \times 10^7$	$1,163000 \times 10^{-6}$	1	$(2,6133 \pm 1) \times 10^{19}$	$(2,1078 \pm 1) \times 10^3$	$(6,3191 \pm 3) \times 10^{14}$
1 эВ	$(1,60210 \pm 7) \times 10^{-19}$	$(1,60210 \pm 7) \times 10^{-12}$	$(4,45028 \pm 19) \times 10^{-26}$	$(3,82655 \pm 16) \times 10^{-20}$	1	$(8,0658 \pm 6) \times 10^3$	$(2,4180 \pm 1) \times 10^{14}$
1 см-1	$(1,9863 \pm 2) \times 10^{-23}$	$(1,9863 \pm 2) \times 10^{-16}$	$(1,55175 \pm 5) \times 10^{-30}$	$(4,7442 \pm 5) \times 10^{-24}$	$(1,239 \pm 1) \times 10^{-4}$	1	$(2,997925 \pm 3) \times 10^{10}$
1 Гц	$(6,6256 \pm 5) \times 10^{-34}$	$(6,6256 \pm 5) \times 10^{-27}$	$(1,8404 \pm 2) \times 10^{-40}$	$(1,5825 \pm 1) \times 10^{-34}$	$(4,1356 \pm 4) \times 10^{-15}$	$(3,335640 \pm 3) \times 10^{-11}$	1



Заявки на книги присылайте по адресу:  
125319 Москва, а/я 594  
Издательство «Техносфера»  
**e-mail: [knigi@technosfera.ru](mailto:knigi@technosfera.ru)**  
**[sales@technosfera.ru](mailto:sales@technosfera.ru)**  
факс: (495) 956 33 46

В заявке обязательно указывайте  
свой почтовый адрес!

Подробная информация о книгах на сайте  
**<http://www.technosfera.ru>**

## **Шмидт Вернер**

### **Оптическая спектроскопия для химиков и биологов**

Компьютерная верстка – С. С. Бегунов  
Корректор – В. А. Баталина  
Дизайн – И. А. Куколева  
Дизайн книжных серий – С. Ю. Биричев  
Выпускающий редактор – О. Б. Токарева  
Ответственный за выпуск – С. В. Зинюк

---

Формат 70x100/16. Печать офсетная.  
Гарнитура Ньютон  
Печ. л. 23. Тираж 1500 экз. Зак. № 1462  
Бумага офсет №1, плотность 65 г/м<sup>2</sup>.

---

Издательство «Техносфера»  
Москва, Лубянский проезд, 27/1

---

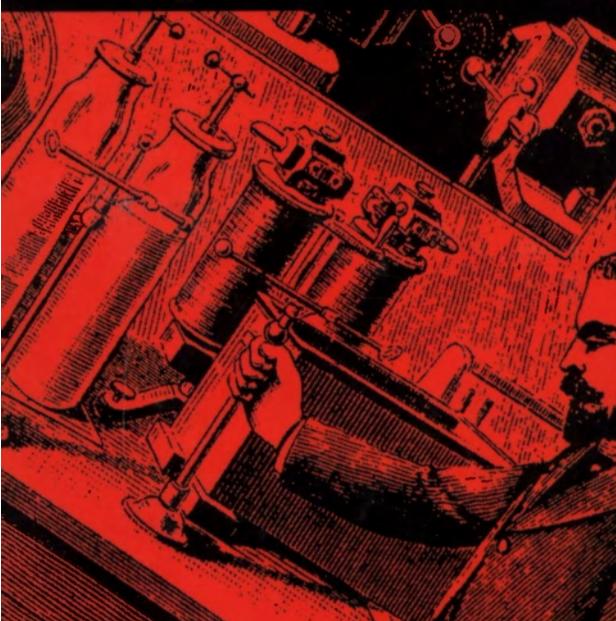
Диaposитивы изготовлены ООО «Европолиграфик»

Отпечатано в ППП «Типография «Наука»  
Академиздатцентра «Наука» РАН  
121099 Москва, Шубинский пер., 6

# мир физики и техники

В. ШМИДТ

ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ  
ДЛЯ ХИМИКОВ И БИОЛОГОВ



ВЕРНЕР ШМИДТ – ПРОФЕССОР,  
СПЕЦИАЛИСТ В ОБЛАСТИ  
СЕНСОРНОЙ ФИЗИОЛОГИИ  
РАСТЕНИЙ  
И МИКРООРГАНИЗМОВ,  
РАЗРАБОТЧИК НОВЫХ МЕТОДОВ  
ИЗУЧЕНИЯ МЕМБРАННЫХ  
СВОЙСТВ И РЕАКЦИЙ,  
СОЗДАТЕЛЬ  
ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ  
ОПТИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ

- ТЕОРИЯ ОПТИЧЕСКОЙ  
СПЕКТРОСКОПИИ
- КОМПЛЕКТАЦИЯ  
СПЕКТРОМЕТРОВ
- ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СПЕКТРОВ  
И ОЦЕНКА ПОЛУЧАЕМЫХ  
ДААННЫХ

интернет-магазин  
**OZON.RU**



29372820

ISBN 978-5-94836-140-6



9 785948 361406 >



ТЕХНОСФЕРА