

Одеський національний університет імені І.І.Мечникова  
Навчально-науковий центр медичної і біологічної фізики  
Кафедра експериментальної фізики

## **ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ В БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНІ**

Методичний посібник до лабораторних робіт для студентів спеціальностей 105 - Прикладна фізика і наноматеріали та 226 – Фармація. Промислова фармація.

Одеса-2020

Друкується за рішенням Вченої Ради  
факультету МФІТ

Укладач:

доктор фізико-математичних наук, професор  
Ваксман Юрій Федорович;

В методичному посібнику міститься опис лабораторних робіт до дисциплін «Оптичні методи діагностики», «Медична оптика» спеціальності 105-Прикладна фізика та наноматеріали»; «Біофізика. Фізичні методи аналізу» спеціальності 226 – Фармація. Промислова фармація.

В посібнику надаються короткі теоретичні відомості щодо виконуваної роботи, описана методика оптичних досліджень, схеми експериментальних установок, технологія приготування зразків для досліджень, завдання до робіт, а також порядок їх виконання.

Разом з тим, більш глибокі теоретичні знання студент може одержати з рекомендованої літератури.

## З М І С Т

Стор.

1. Якісний спектрофотометричний аналіз .....	4
2. Кількісний спектрофотометричний аналіз .....	8
3. Дослідження спектрів флуоресценції .....	12
4. Рефрактометричний аналіз розчинів .....	15
5. Поляриметричний аналіз оптично активних речовин.....	20

## Лабораторна робота №1. ЯКІСНИЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ

Спектрофотометрія – це метод дослідження і аналізу речовин, оснований на поглинанні молекулами речовин монохроматичного випромінювання. Смуги поглинання (електронні спектри) в ультрафіолетовій (УФ) і видимій областях спектру зумовлені електронними переходами в поглинаючих молекулах та іонах.

В даній роботі використовується метод *абсолютної спектрофотометрії*, оснований на вимірюванні поглинання світла розчином, що аналізується, щодо розчину порівняння. В якості розчину порівняння може слугувати чистий розчинник або розчин, що містить додаткові компоненти для підсилення (контрастування) процесу поглинання.

### 1. Закон Бугера – Ламберта -Бера

Спектрофотометричні методи аналізу ґрунуються на використанні закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 e^{(-kIC)} , (1)$$

де  $I_0$ ,  $I$  – інтенсивність світлового потоку, що падає та виходить з досліджуваної речовини;  $k$  – показник поглинання даної речовини;  $l$  – довжина кювети (см);  $C$ - концентрація розчину (моль/л).

Поглинання світла в середовищах характеризують *оптичною густиною (D)*:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} , (2,a)$$

або коефіцієнтом поглинання

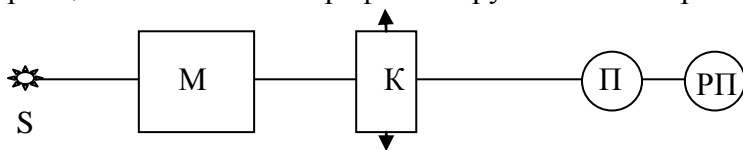
$$\tau = I_0 / I. (2,б)$$

В даній роботі розглядається метод якісного аналізу лікарських препаратів шляхом дослідження спектрів їх оптичної густини. *Спектр оптичної густини* являє собою залежність оптичної густини від довжини хвилі в УФ або видимому діапазоні випромінювання  $D(\lambda)$ . Якісний спектрофотометричний аналіз забезпечується наявністю в

спектрах поглинання характерних для даної речовини максимумів і мінімумів. Тим самим встановлюється достовірність складу розчину (в даному разі лікарських препаратів). Такий аналіз дозволяє також виявити присутність в лікарських засобах домішок інших речовин.

## 2. Методика спектрофотометричних вимірювань

В лабораторній діагностиці для вимірювання спектрів оптичної густини використовують спектрофотометри. Принципова схема спектрофотометру показана на рис.1.



*Рис.1. Принципова схема спектрофотометру*

Випромінювання джерела світла (S) проходить через монохроматор (М) і спрямовується на кювету, розташовану в кюветному відділенні (К) спектрофотометра. В кюветному відділенні розташовано 4 кювети (одна - для розчину порівняння а три інші - для досліджуваних розчинів). Конструкція кюветного відділення дозволяє проводити переміщення кювет відносно падаючого променя світла. Світло, що проходить через кювету, реєструється фотоелектронним перетворювачем (П). Сигнал з виходу перетворювача підсилюється і попадає до реєструючого приладу (РП) або електронної системи обробки інформації.

В роботі використовується спектрофотометр СФ-46, що працює в діапазоні довжин хвиль від 200 до 1100нм. В якості джерела УФ випромінювання використовується дейтерієва лампа (190-350нм). Перетворення світлового потоку в електричний сигнал здійснюється сурмажно - цезієвим фотодіодом (190-700нм).

## 3. Методика приготування досліджуваних розчинів

В даній роботі методом фотометричного аналізу вивчається розчин арбідолу. Капсули арбідолу зважують. Знаючи вміст

лікарського препарату в капсулі, готують розчин: 0,001% субстанції в суміші (96%-го спирту етилового і 0.1М НСІ (9:1).

Розчин порівняння являє собою суміш 96%-го спирту етилового і 0.1М НСІ (9:1).

#### **4.Послідовність роботи з спектрофотометром:**

- 1.Закрити доступ світла до фотоелементу.
- 2.Включити тумблер «Вкл» та витримати прогрівання блоків живлення спектрофотометра не менш 20хв.
- 3.Встановити рекомендовану ширину вихідної щілини монохроматора.
4. Встановити темновий струм фотоелементу.
- 6.Відкрити доступ світла до фотоелементу.
- 7.В рекомендованому інтервалі довжин хвиль провести вимірювання інтенсивності світла, що пройшло через кювету з розчином порівняння та досліджуваним розчином.

#### **5. Вимірювання спектрів оптичної густини**

Підготувати спектрофотометр СФ-26 до роботи як описано вище. Для вимірювань використовуються кварцові кювети в яких товщина шару досліджуваної рідини складає  $l=10\text{мм}$ . Вимірюються інтенсивності світла, що проходить через розчини порівняння (кювета №1) та досліджуваного розчину (кювета №2).

Коефіцієнт поглинання досліджуваного розчину розраховується по формулі (2) і заповнюється таблиця:

$\lambda$ , нм	$I_0$ , отн.ед.	$I$ ,отн.ед.	$\tau$

Побудувати графік залежності  $\tau(\lambda)$  і визначити довжини хвиль максимумів і мінімумів спектру оптичного поглинання розчину арбідолу.

Одержані результати занести в таблицю:

Довжини хвиль максимумів поглинання (нм)			Довжини хвиль мінімумів поглинання (нм)		
Виміряні	Паспортні	Розходження $\Delta\lambda, нм$	Виміряні	Паспортні	Розходження $\Delta\lambda, нм$
	225			244	
	255			284	
	316				

### У висновках:

- зробити висновок щодо відповідності препарату паспортним даним з урахуванням того, що розходження результатів вимірювань довжин хвиль в максимумах і мінімумах не повинні перевищувати  $\pm 2$  нм.

### Література:

1. <https://docplayer.ru/29115108-Opticheskie-metody-v-farmaceuticheskom-analize-laboratornyy-praktikum.html>

2. Личковський Е.І. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. - Вінниця: Нова Книга, 2014. - С.341-345.

## Лабораторна робота №2. КІЛЬКІСНИЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ

В даній роботі використовується метод *абсолютної спектрофотометрії*, оснований на вимірюванні поглинання світла розчином, що аналізується, щодо розчину порівняння. В якості розчину порівняння може слугувати чистий розчинник або розчин, що містить додаткові компоненти для підсилення (контрастування) процесу поглинання.

### 1. Закон Бугера – Ламберта - Бера

Спектрофотометричні методи аналізу основані на використанні закону Бугера – Ламберта - Бера:

$$I = I_0 e^{(-kIC)} , (1)$$

де  $I_0$ ,  $I$  – інтенсивність світлового потоку, що падає та виходить з досліджуваної речовини;  $k$  – показник поглинання даної речовини;  $l$  – довжина кювети (см);  $C$ - концентрація розчину (моль/л).

Формулу (1) подамо у вигляді:

$$\lg \frac{I_0}{I} = D = kIC , (2)$$

де  $D$  – *оптична густина розчину*.

Як видно з (2), оптична густина розчину прямо пропорційна його концентрації, значить *залежність  $D(C)$  є лінійною*. Проте така лінійність зберігається тільки при невеликих концентраціях розчинів.

*При підвищенні концентрації розчину порушується закон Бугера-Ламберта-Бера і залежність  $D(C)$  стає нелінійною*. В такому випадку за допомогою стандартних розчинів з відомим вмістом досліджуваної речовини вимірюють залежність оптичної густини від концентрації розчинів і будують калібровочний графік залежності  $D(C)$ . В подальшому, користуючись таким графіком, визначають концентрації даної речовини в розчинах де її вміст невідомий.

В даній роботі розглядається *метод визначення вмісту речовини за допомогою калібровочного графіку*.



## 2. Методика спектрофотометричних вимірювань

В лабораторній діагностиці для вимірювання оптичної густини розчинів використовуються спектрофотометри. Принципова схема спектрофотометру показана на рис.1.

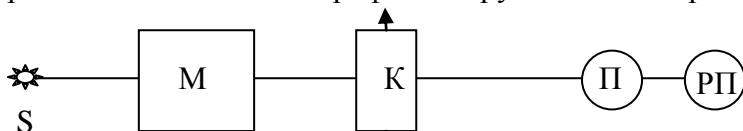


Рис.1. Принципова схема спектрофотометру

Випромінювання джерела світла (S) проходить через монохроматор (М) і спрямовується на кювету, розташовану в кюветному відділенні (К) спектрофотометра. В кюветному відділенні розташовано 4 кювети (одна - для розчину порівняння а три інші - для досліджуваних розчинів). Конструкція кюветного відділення дозволяє проводити переміщення кювет відносно падаючого променя світла. Світло, що проходить через кювету, реєструється фотоелектронним перетворювачем (П). Сигнал з виходу перетворювача підсилюється і попадає до реєструючого приладу (РП) або електронної системи обробки інформації.

В даній роботі використовується спектрофотометр СФ-46, що працює в діапазоні довжин хвиль від 200 до 1100нм. В якості джерела видимого світла слугує лампа розжарювання (340-1100нм). Перетворення світлового потоку в електричний сигнал здійснюється сурмяно-цезієвим фотодіодом (190-700нм).

### **Послідовність роботи з спектрофотометром:**

1. Закрити доступ світла до фотоелементу.
2. Включити тумблер «Вкл» та витримати прогрівання блоків живлення спектрофотометра не менш 20хв.
3. Встановити рекомендовану ширину вихідної щілини монохроматора.
4. Встановити темновий струм фотоелементу.
5. Встановити довжину хвилі 450нм на шкалі монохроматора.
6. Відкрити доступ світла до фотоелементу.
7. Провести вимірювання оптичної густини, контрольного

розчину порівняння (кювета №1) та трьох розчинів з відомою концентрацією речовини (кювети №2,3,4).

8.Зняти кювети №2,3,4 і встановити інші дві кювети №2,3 з розчинами, концентрація яких невідома та провести вимірювання їх оптичної густини.

### 3. Методика приготування розчинів

Дослідження проводяться на забарвленому водному розчині фурациліну з додаванням  $NaOH$  (колір розчину оранжевий) і наступному вимірюванні оптичного поглинання на довжині хвилі  $\lambda = 450\text{nm}$ .

*Приготування розчину фурациліну.* Зважують таблетку фурациліну, розмільчують її в фарфоровій ступці. Розраховують масу навіски для приготування  $50\text{cm}^3$  0,02%-го розчину фурациліну з урахуванням того, що кожна таблетка містить 0,02г діючої речовини. Навіску переносять в мірну колбу на  $50\text{cm}^3$ , додають  $30\text{cm}^3$  води і витримують на водяній бані при  $70-80^{\circ}\text{C}$  до повного розчинення. Охолоджений розчин доводять водою до мітки  $50\text{cm}^3$  і перемішують.

*Приготування стандартних розчинів фурациліну* для одержання калібровочного графіку. В три мірні колби на  $50\text{cm}^3$  додають відповідно 1,00; 1,50 и  $2,00\text{cm}^3$  0,02%-го робочого розчину фурациліну, приготовленого раніше. Потім в кожен колбу додають  $5\text{cm}^3$  0,1М розчину  $NaOH$  і доводять водою до мітки  $50\text{cm}^3$ , одержавши *стандартні розчини* з вмістом відповідно 0,0004%; 0,0006% и 0,0008% фурациліну. Розчини витримують до 20хв. для встановлення стабільного забарвлення та проводять вимірювання їх оптичної густини.

В якості розчину порівняння в колбі на  $50\text{cm}^3$  готується водний розчин, що містить  $5\text{cm}^3$  0,1М  $NaOH$ .

### 3. Вимірювання оптичної густини

Підготовка спектрофотометру СФ-26 описана вище. Вимірювання оптичної густини проводять на довжині хвилі 450nm. Кювети скляні з товщиною шару досліджуваних

розчинів  $l=10\text{мм}$ . Для побудови каліброчного графіку вимірюють оптичні густини стандартних розчинів (кювети 2,3,4) відносно розчину порівняння (кювета 1).

Провести вимірювання оптичної густини двох досліджуваних розчинів фурациліну (кювети 2,3) для визначення їх концентрацій ( $C_x$ ).

Вимірювання оптичної густини проводять три рази для кожного стандартного і досліджуваного розчинів та заносять в таблицю середнє значення:

Концентрація розчинів, $C, \%$	Оптична густина, $D$
0 (розчин порівняння)	0
0,0004	
0,0006	
0,0008	
Досліджуваний розчин, $C_{x1}$	
Досліджуваний розчин, $C_{x2}$	

Побудувати каліброчний графік залежності оптичної густини від концентрації фурациліну в стандартних розчинах. Використовуючи каліброчний графік, визначити вміст фурациліну ( $C_{x1}$  и  $C_{x2}$ ) в досліджуваних розчинах.

#### **У висновках:**

- вказати вміст фурациліну в досліджуваних розчинах;
- за каліброчним графіком залежності  $D(C)$  визначити максимальну концентрацію розчину, за якої виконується закон Бугера-Ламберта-Бера;

#### **Література:**

1. <https://docplayer.ru/29115108-Opticheskie-metody-v-farmaceuticheskom-analize-laboratornyy-praktikum.html>
2. Личковський Е.І. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. - Вінниця: Нова Книга, 2014.-С.341-345.

## Лабораторна робота №3. ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕКТРІВ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

Люмінесценцією називають спонтанне, надлишкове над тепловим випромінювання світла з тривалістю післясвітіння більшою періоду світлової хвилі.

Розрізняють люмінесценцію з коротким післясвітінням, що зумовлюється син глет – синглетними переходами в молекулах, та люмінесценцію з тривалим післясвітінням, зумовленим триплет-синглетними переходами.

В біології, фармації частіше використовують термін «флуоресценція». При флуоресценції молекула речовини, поглинаючи квант світла, переходить на збуджений енергетичний стан ( $S^*$ ) та, через малий проміжок часу, вивільнює свою енергію у вигляді кванту флуоресцентного випромінювання, переходячи в основний стан ( $S_0$ ).

### 1. Характеристики флуоресценції

*Спектр флуоресценції* – розподіл інтенсивності випромінювання за довжинами хвиль або частотами:  $I(\lambda), I(\nu)$ .

*Енергетичний вихід флуоресценції* – це відношення енергії флуоресцентного випромінювання ( $E_{випр}$ ), до енергії світлового потоку, що поглинається ( $E_{погл}$ ):

$$\eta_{ен} = \frac{E_{випр}}{E_{погл}}. \quad (1)$$

Енергетичний вихід флуоресценції характеризує ефективність перетворення світлової енергії, що поглинається речовиною, в енергію флуоресцентного випромінювання.

*Квантовий вихід флуоресценції* – це відношення числа квантів флуоресценції ( $N_{випр}$ ) до числа світлових квантів ( $N_{погл}$ ), що поглинулись речовиною (квантів збудження):

$$\eta_{кв} = \frac{N_{випр}}{N_{погл}}. \quad (2)$$

Чим більший квантовий вихід, тим ефективніше

перетворення збуджуючого світла в флуоресцентне випромінювання.

Квантовий вихід залежить від довжини хвилі збуджуючого світла, природи флуоресцентної речовини і розчинника, концентрації розчину, температури, наявності домішок в розчинах.

## **2. Основні закони флуоресценції**

*Закон Стокса-Ломмеля* – спектр флуоресценції зміщений в сторону більших довжин хвиль порівняно зі спектром поглинання речовини.

*Правило зеркальної симетрії спектрів поглинання і флуоресценції.* Спектри поглинання і флуоресценції приблизно дзеркально симетричні щодо прямої, що проходить перпендикулярно до осі частот через точку перетину обох спектрів. Відстань між положеннями максимумів спектру поглинання і спектру флуоресценції називають *стоковими втратами*.

Чим більшими є стокові втрати, тим більш надійно можна здійснювати ідентифікацію речовин флуоресцентним методом.

## **3. Методика приготування флуоресцентних розчинів**

Для дослідження готується 0.5%-ний водний розчин дипіридамола. При збудженні цього розчину синім світлом спостерігається зелено-голуба флуоресценція.

Додатковими об'єктами дослідження є флуоресцентні барвники, що набули широкого використання в біології і медицині для контрастування мілких судин.

## **4. Методика вимірювання спектрів флуоресценції**

Схема установки, що використовується для вимірювання спектрів флуоресценції, показана на рисунку.

Збудження флуоресценції забезпечується світлодіодом (S), що випромінює світло в голубій області спектру. Випромінювання світлодіода фокусується лінзою ( $L_1$ ) на об'єкт дослідження (O).

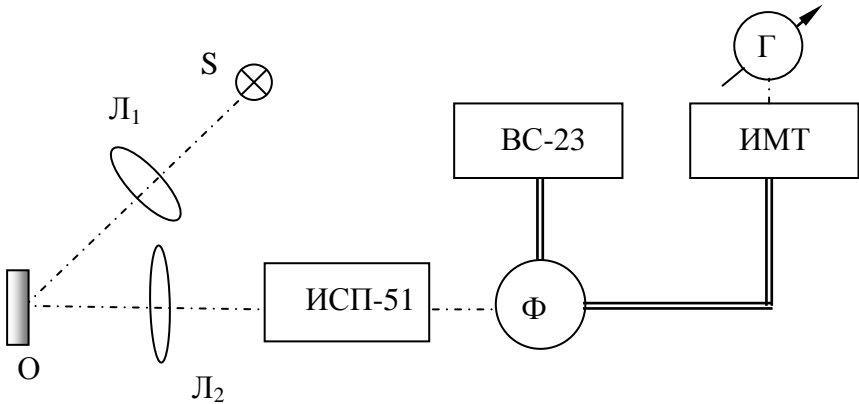


Рис. Схема установки для вимірювання спектрів флуоресценції.

Люмінесцентне випромінювання фокусується конденсором  $L_2$  на вхідну щілину монохроматора ИСП-51. За вихідною щілиною монохроматора розташований фотоелектронний помножувач ФЕП-22 (Ф), область спектральної чутливості якого 400-1000нм. Електричний сигнал з аноду ФЕП, пропорційний інтенсивності флуоресценції, проходить через підсилювач постійного струму ИМТ і реєструється гальванометром (Г). Живлення ФЕП забезпечується стабілізованим джерелом живлення ВС-23.

## 5. Послідовність виконання роботи і завдання:

1. Закрити доступ світла на ФЕП.
2. Включити блок живлення ФЕП.
3. Включити живлення на підсилювачі постійного струму і вимірювальному приладі.
4. Через 20хв. включити живлення світлодіоду, налаштувати зображення кювети з досліджуваним розчином на вхідну щілину монохроматора.

5. Записати значення темного струму.

6. Відкрити доступ світла на ФЭП та провести вимірювання спектрів флуоресценції у відповідності з рекомендаціями викладача.

7. Для досліджуваних розчинів побудувати нормовані спектри флуоресценції як функції  $I(\lambda)$ .

8. За спектрами флуоресценції визначити енергії квантів випромінювання в максимумах спектрів флуоресценції.

#### **У висновках:**

- вказати положення максимумів та півширину досліджуваних спектрів флуоресценції;
- встановити відповідність одержаних значень наявним стандартам для досліджуваних речовин

#### **Література:**

1. <https://docplayer.ru/29115108-Opticheskie-metody-v-farmaceuticheskom-analize-laboratornyu-praktikum.html>
2. Илларионова Е.А., Сыроватский И.П. Метод флуориметрии. Применение в фармацевтическом анализе.-Иркутск: ИГМУ.-2017.-30с.
3. Личковський Е.І. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. - Вінниця: Нова Книга, 2014.-С.226-232, 341-345.

### **Лабораторна робота №4. РЕФРАКТОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ РОЗЧИНІВ**

**1. Фізичні основи рефрактометрії.** *Рефрактометр* (від лат. *refractus* — заломлений) — метод аналізу, оснований на вимірюванні показника заломлення. Якщо промінь світла переходить з середовища, що є менш оптично густим, в середовище більш густе, то кут заломлення завжди менше кута падіння і навпаки.

Закон заломлення світла можна сформулювати так. Відношення синуса кута падіння променя ( $\alpha$ ) до синуса кута заломлення ( $\beta$ ) є величиною сталою для даної довжини хвилі, що не залежить від кута падіння:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{n_2}{n_1} = n_{21}, \quad (1)$$

де  $n$ - відносний показник заломлення світла (індекс рефракції). Індекс рефракції можна представити як відношення швидкості світла у вакуумі до швидкості світла у середовищі. В такому разі показник заломлення є абсолютним.

На практиці визначають відносний показник заломлення ( $n_{21}$ ), який є відношенням швидкості світла у повітрі ( $v_1$ ) до швидкості світла в досліджуваній речовині ( $v_2$ ). В такому випадку закон заломлення має вигляд (1).

На величину показника заломлення впливають наступні фактори:

- природа речовини, а саме склад і будова молекул;
- температура (при її підвищенні показник заломлення зменшується оскільки зменшується густина розчину). Температура рекомендована для проведення вимірювань показника заломлення становить  $20 \pm 0,3$  °С. Якщо вимірювання проводяться при іншій температурі, то вноситься поправка:

$$n' = n^{20} + (20 - t) \cdot 0,0002, \quad (2)$$

де  $t$  - робоча температура в °С;

- довжина хвилі світла (явище дисперсії). В сучасних рефрактометричних приладах вимірювання показника заломлення проводять на довжині хвилі  $D$ -лінії спектру натрію ( $\lambda=589,3$  нм). Показник заломлення, виміряний за вказаних умов позначається індексом  $n_D^{20}$ ;

- концентрація речовини у розчині ( $C$ );
- природа розчинника.

Вимірювання показника заломлення, як правило, проводять на рефрактометрах оснований на явищі повного

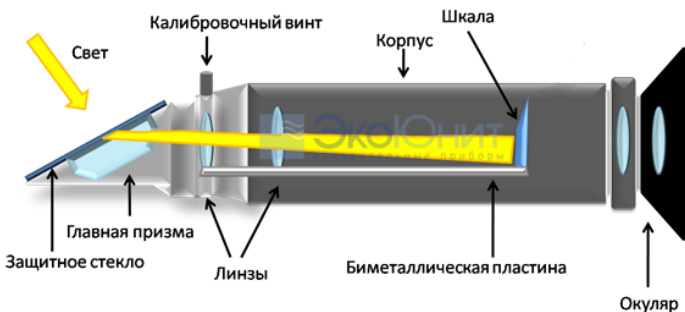


внутрішнього відбивання світла на межі поділу більш густе середовище - менш густе середовище. При цьому кут заломлення більший кута падіння.

Сучасні рефрактометри дозволяють застосовувати джерела білого світла. Це можливо завдяки використанню так званих компенсаторів відрегульованих таким чином, щоб показник заломлення відріховувався для жовтої  $D$ -лінії натрію.

**2.Принцип дії ручного рефрактометра.** Будова такого рефрактометра показана на рисунку. Основним оптичним елементом рефрактометра є головна призма на яку наноситься досліджувана рідина. Головна призма виготовлена з матеріалу з високим показником заломлення. Завдяки цьому світло що падає проходить через речовину і призму, заломлюючись під достатньо великим кутом

Далі через систему лінз світло падає на калібровану шкалу рефрактометра. Калібрування шкали може проводитись у величинах відносного показника заломлення, або в значеннях концентрації певного типу розчину речовин (наприклад, вмісту цукру і т.ін.). В залежності від кута заломлення промінь світла зміщується вздовж шкали приладу.



Освітлена частина шкали при цьому буде світлою, а неосвітлена темною. Величина кута заломлення світла залежить від складу розчину та його концентрації. Таким чином, по положенню межі розділу між світлою і темною частинами шкали визначається коефіцієнт заломлення або концентрація

розчину. Використаний в роботі рефрактометр автоматично враховує вплив зміни температури.

**3.Проведення вимірювань.** Перед проведенням вимірювань необхідно провести установку нуля ручного рефрактометра. Для цього використовують дистильовану воду. На головну призму за допомогою піпетки наноситься кілька капель води, потім закривають захисне скло. Далі проводиться перевірка наявності нульового показання приладу.

Проведення вимірювань здійснюється аналогічно попередній послідовності, але замість дистильованої води використовується досліджуваний розчин. Після нанесення розчину необхідно зачекати 30 секунд для того, щоб температура розчину зрівнялась з температурою приладу. Потім рефрактометр направляють на джерело світла (денне світло або лампа) та знімають показання приладу в % концентрації речовини.

#### **4.Завдання до роботи:**

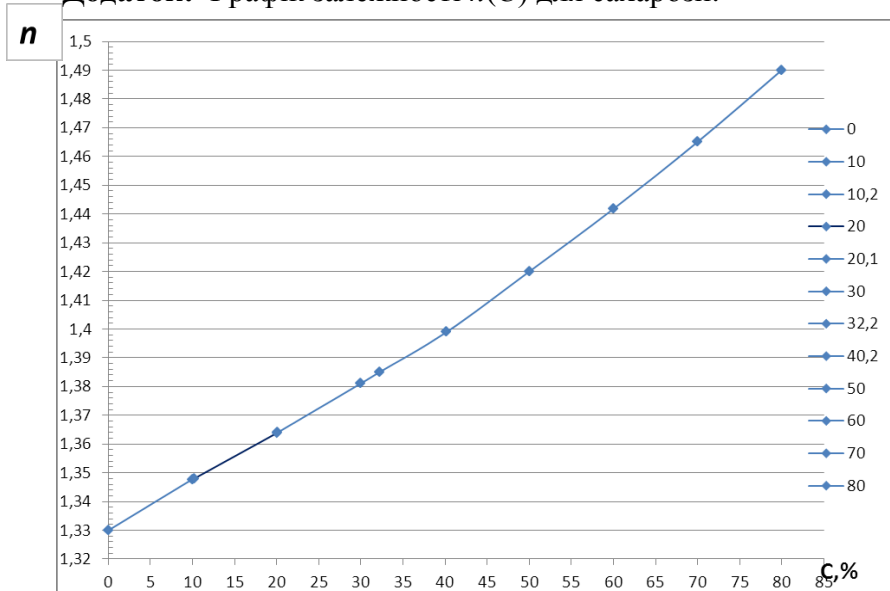
- 1.Перевірити установку нуля приладу.
- 2.Провести вимірювання вмісту глюкози в водному розчині.
- 3.По приведеному нижче графіку залежності  $n(C)$  для сахарози визначити показники заломлення досліджуваних розчинів.
- 4.Занести результати вимірювань до таблиці:

№	Концентрація розчинів, %	Показник заломлення ( $n$ )

5.У висновках до роботи навести похибку вимірювань концентрації розчинів глюкози.

6. Побудувати графік залежності  $n(C)$  для досліджуваного розчину глюкози.

### Додаток: Графік залежності $n(C)$ для сахарози.



### Література:

1. <https://docplayer.ru/29115108-Opticheskie-metody-v-farmaceuticheskom-analize-laboratornyy-praktikum.html>
2. Личковський Е.І. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. - Вінниця: Нова Книга, 2014. - С.396-400.

# Лабораторна робота №5. ПОЛЯРИМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ОПТИЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

*Поляриметрия* - метод дослідження, оснований на вимірюванні кута повороту площини поляризації плоско поляризованого світла при його проходженні через оптично активну речовину. Визначення коефіцієнту питомого обертання дозволяє оцінити чистоту оптично активної речовини, а також її концентрацію у розчині.

## 1. Фізика обертання площини поляризації.

Площиною поляризації прийнято називати площину в якій розташовані вектори напруженості магнітного поля  $H$  і вектор  $k$ , що вказує напрям поширення хвилі. Якщо площина поляризації зберігає своє положення в процесі поширення хвилі, то хвиля є *плоско поляризованою*. При проходженні плоско поляризованого світла через деякі речовини, які називають *оптично активними*, спостерігається поворот (обертання) площини поляризації на деякий кут. Більшість органічних речовин проявляють оптичну активність, яка зумовлена асиметричною будовою молекул, що існують в двох формах - «правообертаючою» і «лівообертаючою».

Право- і ліво-обертаючі молекули оптично активних речовин є *оптичними ізомерами*: вони являють собою дзеркальні відображення одна в одну. Фізичні і хімічні властивості чистих оптичних ізомерів абсолютно однакові у відсутності будь-якого асиметричного агента, що впливає на дзеркальну симетрію молекул.

Обертання площини поляризації обумовлено особливістю явища подвійного променезаломлення в оптично активних речовинах. При цьому кожна з хвиль має праву і ліву циркулярну поляризації (а не є плоско поляризованими як при звичайному подвійному променезаломленні). Такі хвилі поширюються з різною швидкістю в оптично активному середовищі в одному напрямі. Знак кута обертання  $\alpha$  площини

поляризації визначається співвідношенням швидкостей таких циркулярно поляризованих хвиль:  $u_l$  і  $u_{np}$  – для хвиль, що мають ліву і праву поляризації. При  $u_{np} > u_l$  оптично активна речовина називається *право обертаючою*, а при  $u_{np} < u_l$  – *лівообертаючою*.

Кут обертання площини поляризації в розчинах залежить від природи розчинника і концентрації розчиненої речовини. Тому поляриметр широко використовується для вимірювання концентрації оптично активних розчинів.

## **2. Вимірювання кута повороту площини поляризації.**

Для вимірювання кута повороту площини поляризації оптично активними речовинами використовуються *поляриметри*.

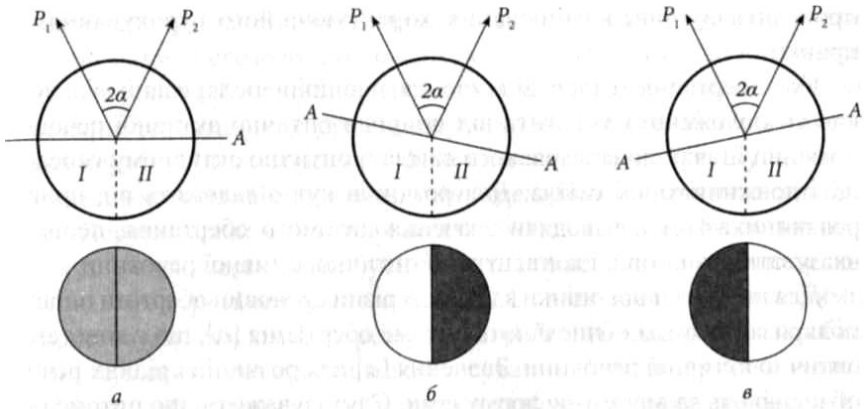
Поляриметр містить два поляроїди: поляризатор і аналізатор.

Між ними розташовується кювета з досліджуваним розчином. При повороті аналізатора навкруг променя що падає, як оптичної осі системи, інтенсивність світла на виході змінюється згідно закону Малюса: при схрещених поляроїдах вона мінімальна, а при паралельних -максимальна.

Розташувавши між схрещеними поляроїдами кювету з досліджуваним розчином, спостерігаємо просвітлення світлового поля на екрані. Якщо ж повернути аналізатор на певний кут, це поле знову затемняється, як і в відсутності речовини в кюветі. Це значить, що кут повороту аналізатора відповідає куту повороту площини поляризації оптично активною речовиною.

На практиці використовують схеми з так званими *напівтіньовими поляризаторами*, в яких поляризатор складається з двох поляроїдів з площинами поляризації  $P_1$  і  $P_2$ , що складають між собою малий кут  $2\alpha$  (рисунок).

Якщо площина поляризатора  $AA$  перпендикулярна бісектрисі кута  $2\alpha$  (рис. *а*), то обидві половини поля зору мають однакову напівтіньову освітленість. При найменшому повороті аналізатора відносна освітленість першої і другої половин поля зору різко міняються (рис, *б, в*).



*Рис.Напівтіньові поляризатори.*

*$P_1$  і  $P_2$  - площини поляризації двох частин поляризатора;  $2\alpha$  - малий кут між ними; а - обидві частини I і II поля зору мають однакову напівтіньову освітленість при перпендикулярному розміщенні площини аналізатору AA і бісектриси кута  $2\alpha$ ; б, в - зміна відносної освітленості I і II половин поля зору при повороті аналізатору.*

В таких поляриметрах вимірювання зводяться до візуального вирівнювання яскравості двох половин поля зору і подальшому запису показників за шкалою кута обертання, що має додатковий ноніус.

При вимірюванні кута обертання  $\beta$  в першу чергу перевіряють нульову точку шкали і визначають поправку приладу без кювети, якщо нуль шкали зміщений.

Кут обертання  $\beta$  залежить від природи речовини, розчинника, довжини шляху  $l$  поляризованого світла в оптично активній речовині ( це відповідає довжині кювети в якій знаходиться досліджуваний розчин) і довжини світлової хвилі  $\lambda$ . Для розчинів кут обертання площини поляризації визначається за формулою Ж.Біо:

$$\beta = a l C, \quad (1)$$

де  $a$  - питоме обертання,  $C$ -концентрація розчину.

Для порівняння оцінки здатності різних розчинів обертати площину поляризації розраховують питоме обертання  $a$ , яке є сталою величиною для даної оптично активної речовини і розчинника, по формулі

$$a = \frac{\beta}{l C}. \quad (2)$$

В даній роботі вимірювання кута обертання площини поляризації проводяться з метою визначення концентрації гліцерину у водному розчині. З формули (1) одержимо

$$C = \frac{\beta}{a l}. \quad (3)$$

Похибка визначення кута обертання в поляриметрі складає  $\pm 0,02$ град.

### **3.Порядок виконання роботи:**

- 1.Включити освітлювач поляриметра.
- 2.Через 10-15хв, коли натрієва лампа розгориться, визначити нульовий показник приладу ( $\alpha_0$ ) у відсутності кювети (вимірювання провести три рази і записати середнє значення.)
- 3.Встановити кювету №1 з відомою концентрацією глюкози і виміряти кут обертання площини поляризації  $\alpha - \alpha_0 = \beta$ .
- 4.Використовуючи формулу (2) розрахувати питоме обертання площини поляризації  $a$ .
- 5.Виконати вимірювання кута обертання площин поляризації досліджуваних розчинів (кювети №2,3) кожного разу не менш трьох разів і взяти середні значення. Записати в таблицю середні значення кутів обертання площини поляризації.
- 6.Розрахувати по формулі (3) концентрацію глюкози в розчинах (кювети №2,3).
- 6.Одержані результати занести в таблицю:

№	Довжина кювети, $l$ , см	Середнє значення кута обертання	Концентрація, %	Питоме обертання, $\alpha$
Кювета №1 (з відомою концентрацією глюкози)				
Кювета №2				
Кювета №3				

### Література:

1. <https://docplayer.ru/29115108-Opticheskie-metody-v-farmaceuticheskom-analize-laboratornyy-praktikum.html>
2. Илларионова Е.А., Сыроватский И.П. Метод поляриметрии. Применение в фармацевтическом анализе.- Иркутск: ИГМУ.-2017.-22с.
3. Мухин В.К. Жусь Г.В. Изучение сахариметра и определение концентрации сахара в растворе.- Ярославль: Ун-т Ушинского.-2014.-11с.
4. Личковський Е.І. Біофізика.Фізичні методи аналізу та метрологія. - Вінниця: Нова Книга, 2014.-С.383-388.