

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Приладобудівний факультет

Кафедра наукових, аналітичних та екологічних приладів і систем

«На правах рукопису»
УДК _____

«До захисту допущено»

В.о. завідувача кафедри

_____ Защепкіна Н.М.

«__» _____ 20__ р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

зі спеціальності 152 «Метрологія та інформаційно-вимірювальна техніка»

на тему: «Кількісний аналіз фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом»

Виконала:

студентка VI курсу, групи ПН-71мп

Кулик Надія Вікторівна _____

Керівник:

к.т.н., ст. викл. Таранов В.В. _____

Консультант з «Розроблення стартап-проекту»:

к.е.н., доцент Бояринова К.О. _____

Рецензент:

к.т.н., доц. Павловський О.М. _____

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2018 року

Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”

Факультет приладобудівний
Кафедра наукових, аналітичних та екологічних приладів і систем
Освітній ступінь “магістр”
Галузь знань 15 - Автоматизація та приладобудування
Спеціалізація 151 - «Інформаційно-вимірювальні системи та технології
екологічного моніторингу»

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
В.о. завідувача кафедри
_____ Защепкіна Н.М.

_____” _____ 2018 р.

ІНДИВІДУАЛЬНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ПЛАН
НА ДРУГИЙ РІК НАВЧАННЯ
МАГІСТРАНТКИ КУЛИК НАДІЯ ВІКТОРІВНА

1. Тема дисертації «Кількісний аналіз фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом», затверджена наказом по університету від “__” _____ 2018 р. №__

2. Термін здачі оформленої дисертації “30” листопада 2018 р.

3. Об’єкт дослідження – фотодіодні детектори в якості первинних перетворювачів.

4. Предмет дослідження – процес реєстрації показників вибраних хімічних сполук в продуктах переробки житніх культур та їх кількісний аналіз.

5. Перелік питань, які мають бути досліджені.

5.1 Теоретичні дослідження:

5.1.1 Провести огляд методик виявлення інформативних показників органічних сполук певного хімічного складу методами оптичностимульованої люмінесценції.

5.1.2 Провести огляд та дослідження характеристик фотодетекторів, придатних для використання у якості первинних перетворювачів для реєстрації оптичних показників вибраних хімічних сполук в системах відомого та маловідомого складу методами оптичними методами.

5.1.3 Виконати порівняльний аналіз і підбір джерел освітлення здатних до збудження квантового виходу люмінесценції та напівпровідникових фотодетекторів придатних в якості первинних перетворювачів.

5.1.4. Виконати дослідження факторів та ефектів, які визначають похибку вимірювання люмінесценції (ефект внутрішнього фільтра та вторинного поглинання), провести дослідження динамічних параметрів експериментальної установки відповідно до умов експерименту.

5.1.5. Виконати аналіз шляхів вдосконалення підходів до використання напівпровідникових фотодетекторів у якості первинних перетворювачів для реєстрації та ідентифікації вибраних органічних сполук методами оптично стимульованої люмінесценції.

5.2 Експериментальні дослідження:

5.2.1 Розробити алгоритм проведення вимірювань та структурну схему стенду для визначення кількісних показників вибраних хімічних сполук в системах відомого та маловідомого складу люмінесцентним методом із застосуванням напівпровідникових фотодетекторів у якості первинних перетворювачів.

5.2.2. Провести апробацію вибраних первинних перетворювачів із фотодіодними детекторами згідно умов експерименту.

5.2.3. Побудова калібрувальних графіків для визначення концентрацій сполук фосфоліпідного ряду в житніх культурах.

5.2.4. Провести аналіз та узагальнення результатів, отриманих при проведенні досліджень.

6. Перелік публікацій:

6.1 Опублікувати 2 статті в наукових журналах.

7. Перелік ілюстративного матеріалу (4 арк.)

7.1 Результати апробації вибраних первинних перетворювачів із фотодіодними детекторами згідно умов експерименту.

7.2 Результати комплексних вимірювань оптичних показників продуктів переробки житніх культур засобами розробленої в рамках досліджень вимірювальної установки.

8. Педагогічна практика

8.1 Прийняти участь в обговоренні 2-х курсових робіт з дисципліни «Інформаційно-вимірювальні системи на ПЗЗ».

8.2. Провести під контролем викладача лабораторне заняття з дисципліни «Інформаційно-вимірювальні системи на ПЗЗ».

9. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5. Стартап проект «Кількісний аналіз фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом»	Бояринова К.О., кандидат економічних наук, доцент		

10. Дата видачі завдання 6 вересня 2018 р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Огляд та аналіз наукових праць із теми досліджень	до 15.09.2018 р.	
2	Провести огляд методик виявлення органічних сполук певного хімічного складу методами та засобами фотостимульованої люмінесценції	до 01.10.2018 р.	
3	Виконати порівняльний аналіз і підбір джерел збудження квантового виходу люмінесценції.	до 15.10.2018 р.	
4	Провести аналіз та підбір напівпровідникових фотодетекторів придатних до використання у якості первинних перетворювачів.	до 01.11.2018 р.	
5	Розробка структурної схеми стенду для експериментальної перевірки характеристик пропонованих первинних перетворювачів.	до 07.11.2018 р.	
6	Розробка методу та способу реєстрації квантового виходу люмінесценції слабोलюмінесціюючих сполук	до 21.11.2018 р.	
7	Проведення комплексу спектрофотометричних досліджень. Аналіз шляхів вдосконалення підходів до використання напівпровідникових фотодетекторів у якості первинних перетворювачів для реєстрації та ідентифікації вибраних органічних сполук методами оптично стимульованої люмінесценції.	до 30.11.2018 р.	
8	Аналіз та узагальнення отриманих результатів	до 05.12.2018 р.	

Дата видачі

“ ___ ” вересня 2017 р.

Науковий керівник

_____ В.В. Таранов

Прийняв до виконання

_____ Н.В. Кулик

РЕФЕРАТ

Актуальність теми. Завзятий розвиток виробництва харчових продуктів потребує особливих вимог до оцінки їх якості, а це, в свою чергу, вимагає розробки сучасних експрес-методів та засобів для отримання результатів аналізів та їх подальшої обробки. Експрес-методи дозволяють точно і швидко проводити оцінку якості харчових продуктів.

Запропонований нами метод кількісного аналізу фосфоліпідів в рідкій фазі в процесі реєстрації квантового виходу люмінесценції досліджуваних зразків дає точні результати та дозволяє проводити вимірювання в будь яких виробничих циклах.

Об'єктом дослідження є фотодіодні детектори в якості первинних перетворювачів, потужні УФ-світлодіодні випромінювачі в якості джерела збудження люмінесценції.

Предметом дослідження є процес реєстрації кількісного аналізу фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом розробленим в процесі роботи над магістерською дисертацією макетом вимірювальної установки.

Мета роботи вдосконалення методу проведення кількісного аналізу фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом, та розробка макету вимірювальної установки придатного для проведення кількісного та якісного аналізу.

Методи дослідження. Дана робота присвячена вдосконаленню методу проведення кількісного аналізу фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом.

Наукова новизна роботи полягає у вдосконаленні класичних методів реєстрації квантового виходу люмінесценції, з використанням сучасної елементної бази та апробація макету вимірювальної установки з потужними УФ-світлодіодами в якості джерела світла та малошумним фотодетектором з широким динамічним діапазоном, призначеним для реєстрації квантового виходу люмінесценції досліджуваних зразків.

Практична цінність полягає у впровадженні описаних вище методів та засобів і пропонується у вигляді промислового зразка вимірювального засобу, що може використовуватися у сферах харчової промисловості та установах метрологічного контролю.

Апробація роботи. Результати роботи висвітлені в наступних статтях що пройшли апробацію та знаходяться на стадії публікації:

- Івасенко В., Швайко В., Кулик Н., Гаврилюк В. Вимірювання викидів золи із заводу для спалювання радіоактивно забрудненої деревини /В. Івасенко, В. Швайко, Н. Кулик, В. Гаврилюк// Міжнародний науковий журнал «Технологічний аудит та резерви виробництва» - №6/3(38), 2017.

- Музика М. О., Кулик Н.В. Експрес-метрія моторної оливи засобами оптичної спектрофотометрії. /М.О. Музика, Н.В. Кулик// XIV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та вчених «Ефективність інженерних рішень у приладобудуванні», м. Київ, Україна, 4-5 грудня 2018 року. НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського». - С. 196-199.

- Музика М. О., Кулик Н.В. Вдосконалення засобу визначення кількісних параметрів сполук ліпідної природи в водних та спиртових дисперсних системах маловідомого складу люмінесцентними методами аналізу /М. О., Музика Н.В. Кулик// Міжнародна науково-практична конференція «Теоретичні та прикладні аспекти розвитку науки», м. Київ, 11-12 грудня 2018 року. [Прийнято до редакції (received) 10.12.2018].

Структура та обсяг роботи. Робота складається із вступу, чотирьох розділів, висновків, 43 рисунків, 23 таблиць, списку використаних джерел із 17 позицій. Загальний обсяг роботи – 120 сторінок, з яких основна частина викладена на 117 сторінках.

Ключові слова: вдосконалення методу, люмінесцентний метод, фотодіод, спектрофотометрія, фосфоліпіди, кількісний аналіз, довжини хвиль, спектрофотометр.

РЕФЕРАТ

Актуальность темы. Упорное развитие производства пищевых продуктов требует особых требований к оценке их качества, а это, в свою очередь, требует разработки современных экспресс-методов и средств для получения результатов анализов и их дальнейшей обработки. Экспресс-методы позволяют точно и быстро проводить оценку качества пищевых продуктов.

Предложенный нами метод количественного анализа фосфолипидов в жидкой фазе в процессе регистрации квантового выхода люминесценции исследуемых образцов дает точные результаты и позволяет проводить измерения в любых производственных циклах.

Объектом исследования является фотодиодные детекторы в качестве первичных преобразователей, мощные УФ-светодиодные излучатели в качестве источника возбуждения люминесценции.

Предметом исследования является процесс регистрации количественного анализа фосфолипидов в процессе переработки ржаных культур люминесцентным методом разработанным в процессе работы над магистерской диссертацией макетом измерительной установки.

Цель работы совершенствование метода проведения количественного анализа фосфолипидов в процессе переработки ржаных культур люминесцентным методом, и разработка макета измерительной установки пригодного для проведения количественного и качественного анализа.

Методы исследования. Данная работа посвящена совершенствованию метода проведения количественного анализа фосфолипидов в процессе переработки ржаных культур люминесцентным методом.

Научная новизна работы заключается в совершенствовании классических методов регистрации квантового выхода люминесценции, с использованием современной элементной базы и апробация макета измерительной установки с мощными УФ-светодиодами в качестве источника света и малошумным фотодетектором с широким динамическим

диапазоном, предназначенным для регистрации квантового выхода люминесценции исследуемых образцов.

Практическая ценность заключается в реализацию описанных выше методов и средств и предлагается в виде промышленного образца измерительного средства, которое может использоваться в сферах пищевой промышленности и учреждениях метрологического контроля.

Апробация работы. Результаты работы освещены в следующих статьях прошедшие апробацию и находятся на стадии публикации:

- Ивасенко В., Швайко В., Кулик Н., Гаврилюк В. Измерение выбросов золы с завода для сжигания радиоактивно загрязненной древесины / В. Ивасенко, В. Швайко, Н. Кулик, В. Гаврилюк // Международный научный журнал «Технологический аудит и резервы производства» - №6 / 3 (38), 2017.

- Музыка М. А., Кулик Н.В. Экспресс-метрия моторного масла средствами оптической спектрофотометрии. /М.О. Музыка, Н.В. Кулик // XIV Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и ученых «Эффективность инженерных решений в приборостроении», г. Киев, Украина., 4-5 декабря 2018 года. НТУУ «КПИ им. Игоря Сикорского ». - С. 196-199.

- Музыка М. О., Кулик Н.В. Совершенствование средства определения количественных параметров соединений липидной природы в водных и спиртовых дисперсных системах малоизвестного состава люминесцентными методами анализа / М. О. Музыка Н.В. Кулик // Международная научно-практическая «Теоретические и прикладные аспекты развития науки», г. Киев, 11-12 декабря, 2018 года. [Принято в редакцию (received) 10.12.2018].

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, 43 рисунков, 23 таблиц, список использованных источников из 17 позиций. Общий объем работы - 120 страниц, из которых основная часть изложена на 117 страницах.

Ключевые слова: совершенствование метода, люминесцентный метод, фотодиод, спектрофотометрия, фосфолипиды, количественный анализ, длины волн, спектрофотометр.

ABSTRACT

Actuality of theme. The thorough development of food products requires special requirements for assessing their quality, which in turn requires the development of modern express methods and tools for obtaining the results of analyzes and their subsequent processing. Express methods allow accurate and rapid evaluation of the quality of food products.

The proposed method of quantitative analysis of phospholipids in the liquid phase in the process of recording the quantum yield of luminescence of the samples under study gives precise results and allows us to perform measurements in any production cycles.

The object of the study is the photodiode detectors as primary converters, powerful UV-LED emitters as sources of excitation of luminescence.

The subject of the research is the process of registration of quantitative analysis of phospholipids in the processing of rye cultures by a luminescent method developed during the process of work on a master's dissertation by a model of a measuring device.

The purpose of the work is the improvement of the method of quantitative analysis of phospholipids in the processing of rye cultures by the luminescence method, and the development of a model of a measuring device suitable for quantitative and qualitative analysis.

Research methods. This work is devoted to the improvement of the method of quantitative analysis of phospholipids in the processing of rye cultures by the luminescence method.

The scientific novelty of the work is to improve the classical methods of recording the quantum yield of luminescence, using a modern element base and testing the model of a measuring device with powerful UV-light-emitting diodes as a light source and a low-noise photodetector with a wide dynamic range designed to record the quantum yield of luminescence of the samples under study.

The practical value is the introduction of the above-described methods and tools and is offered as an industrial sample of a measuring instrument that can be used in the food industry and metrological control institutions.

Test work. The results of the work are highlighted in the following articles that have been tested and are in the stage of publication:

- Ivasenko V., Schwaiko V., Kulik N., Gavrilyuk V. Measuring of ash emissions from the plant for combustion of radioactive contaminated wood / V. Ivasenko, V. Schweiko, N. Kulik, V. Gavryliuk // International scientific journal "Technological audit and reserves of production" - №6 / 3 (38), 2017.

- Music M.O., Kulik N.V. Express-meter of motor oil by means of optical spectrophotometry. /M.O. Music, N.V. Kulik // XIV All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Scientists "Efficiency of Engineering Solutions in Instrumentation", Kyiv, Ukraine, December 4-5, 2018. NTUU "KPI them. Igor Sikorsky ". - P. 196-199.

- Music M.O., Kulik N.V. Improvement of the means for determining the quantitative parameters of compounds of lipid nature in aqueous and alcohol disperse systems of low-known composition by luminescent methods of analysis / M. O., Music N.V. Kulik // International scientific and practical conference "Theoretical and applied aspects of science", Kyiv, December 11-12, 2018. [Accepted for editing (received) 12.10.2018].

Structure and scope of work. The work consists of an introduction, four sections, conclusions, 43 figures, 23 tables, list of used sources with 17 positions. The total volume of work - 120 pages, of which the main part is set out on 117 pages.

Key words: perfection of the method, luminescent method, photodiode, spectrophotometry, phospholipids, quantitative analysis, wavelengths, spectrophotometer.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

БЖ – блок живлення;

ЕКО – електронно-коливально-обертальний рух молекул;

ІЧ – інфрачервоний спектр;

ККД – коефіцієнт корисної дії;

ПАР – поверхнево-активна речовина;

ПЗЗ – пристрій з зарядовим зв'язком;

ПФОС- пристрій формування і обробки сигналу;

ЕСП – електронно-світловий перетворювач;

СЗС – синьо-зелений світлофільтр;

УФ – ультрафіолетовий спектр;

ФД – фотодіод;

ФЕ – фотоелемент;

ФЕП – фотоелектричний помножувач.

ЗМІСТ

ВСТУП	15
Розділ 1. ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ ПОКАЗНИКІВ ВИБРАНИХ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН В ПОЛЯРНИХ ТА НЕПОЛЯРНИХ РОЗЧИННИКАХ	17
1.1. Електромагнітне випромінювання оптичного діапазону та його основні характеристики	17
1.2. Взаємодія електромагнітного випромінювання оптичного діапазону з речовиною	18
1.3. Основні закономірності випромінювання і поглинання енергії речовинами при дії збуджуючого електромагнітного випромінювання.....	21
1.4. Молекулярні спектри та правила їх побудови	23
1.5. Види молекулярних спектрів	25
1.6. Класифікація спектральних методів дослідження якісного та кількісного складу речовин	27
1.7. Теоретичні основи фотолюмінесцентної спектроскопії	30
1.8. Основні закони люмінесценції	36
1.9. Методи люмінесцентного аналізу	39
1.9.1. Методи абсолютного виміру квантового виходу люмінесценції	41
1.9.2. Хемілюмінесцентний аналіз	43
1.10. Фізичні основи визначення кількісних параметрів молекулярних сполук методами спектрфотометрії	44
РОЗДІЛ 2	47
ВИМОГИ ДО МЕТОДІВ ТА ЗАСОБІВ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛІЗУ ВИБРАНИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК В УФ-ДІАПАЗОНІ ДОВЖИН ХВИЛЬ	47
2.1. Методичні підходи до інструментальної бази вимірювання кількісних та якісних параметрів вибраних хімічних сполук методами люмінесцентної спектрофотометрії.....	47
2.1. Фізико-хімічні методи кількісного аналізу	48
2.2. Вимірювання спектрів при кількісному оптичному аналізі.....	51

	13
2.2.1. Методи молекулярно-абсорбційного аналізу	52
2.2.2. Застосування ІЧ- і УФ-спектроскопії у аналітичному аналізі	52
2.2.3. Колориметрія.....	54
2.2.4. Фотоелектроколориметрія	54
2.2.5. Емісійні методи аналізу	55
2.2.6. Емісійний спектральний аналіз	56
2.2.7. Емісійна полум'яна фотометрія	57
2.2.8. Флуориметрія	58
2.3. Техніка та практичні аспекти люмінесцентних вимірювань.....	59
2.3.1. Загальні схеми люмінесцентних спектрофлуориметрів	59
2.3.2. Корекція спектрів збудження і люмінесценції	63
2.4. Вибір умов проведення люмінесцентних вимірювань.....	67
2.5. Дослідження факторів та ефектів, які визначають похибку вимірювання люмінесценції.....	69
РОЗДІЛ 3	74
АПРОБАЦІЯ МАКЕТУ ВИМІРЮВАЛЬНОЇ УСТАНОВКИ ТА РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИМІРЮВАНЬ.....	74
3.1. Застосування методики флуорисцентного аналізу.....	74
3.3. Конструктивні особливості промислових зразків спекроенергетичних вимірювальних засобів здатних до виміру квантового виходу люмінесценції досліджуваних зразків	79
3.4. Розробка макету вимірювальної установки	84
3.4.1. Вибір напівпровідникового фотодетектору у якості первинного перетворювача макету вимірювального засобу.....	86
3.4.2. Удосконалений метод та спосіб реєстрації квантового виходу люмінесценції слаболюмінесціюючих сполук	87
3.5. Аналіз об'єкту досліджень	89
3.6. Практичні положення вимірювання кількісних показників фосфоліпідів в продуктах переробки житніх культур методами люмінесцентної спектрофотометрії.....	92
Висновки до розділу	98
РОЗДІЛ 4	99

РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ «КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ФОСФОЛІПІДІВ В ПРОЦЕСІ ПЕРЕРОБКИ ЖИТНІХ КУЛЬТУР ЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ»	99
4.1 Опис ідеї проекту	99
4.2 Технологічний аудит ідеї проекту.....	102
4.3 Аналіз ринкових можливостей запуску стартап проекту	104
4.4 Розроблення ринкової стратегії проекту	110
4.5 Розроблення маркетингової програми стартап-проекту.....	112
4.6 Висновки	114
ВИСНОВКИ.....	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	117

ВСТУП

Одним із основних факторів, що визначає здоров'я населення, є харчування. Проблема повноцінної і здорової їжі завжди була однією із найважливіших для людства. В умовах техногенного забруднення довкілля та інших негативних чинників хімічної, фізичної та біологічної природи, що вимагають посиленого функціонування багатьох систем організму, все більше уваги необхідно приділяти якості харчування. Через це, все більш актуальним стає розробка і впровадження у виробництво харчових продуктів, до складу яких входять інгредієнти з корисними для поліпшення та збереження здоров'я властивостями.

Тому досить перспективним є застосування оптичних методів експрес-аналізу продуктів харчування (в лабораторних та виробничих умовах), з яких найбільш ефективними по відношенню затрати/результат є оптичні методи аналізу.

В оптичних методах дослідження кількісних властивостей продуктів харчування застосовується ультрафіолетова (УФ), видима та інфрачервона (ІЧ) області спектру випромінювання. Методи, які використовуються для дослідження спектрів виборчого поглинання випромінювання аналізованою речовиною, називаються спектроскопічними. [2].

Метою магістерської дисертації є вдосконалення методу кількісного аналізу фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом.

Для вирішення даної мети необхідно виконати такі завдання:

1. Провести огляд методик виявлення органічних сполук певного хімічного складу методами та засобами фотостимульованої люмінесценції.
2. Провести порівняльний аналіз і підбір напівпровідникових фотодетекторів придатних до використання у якості первинних перетворювачів.

3. Виконати дослідження факторів та ефектів, які визначають похибку вимірювання люмінесценції (ефект внутрішнього фільтра та вторинного поглинання).

4. Провести комплекс спектрофотометричних досліджень. Аналіз шляхів вдосконалення підходів до використання напівпровідникових фотодетекторів у якості первинних перетворювачів для реєстрації вибраних органічних сполук методами оптично стимульованої люмінесценції.

Розділ 1. ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ ПОКАЗНИКІВ ВИБРАНИХ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН В ПОЛЯРНИХ ТА НЕПОЛЯРНИХ РОЗЧИННИКАХ

1.1. Електромагнітне випромінювання оптичного діапазону та його основні характеристики

Електромагнітне випромінювання інфрачервоного, видимого та ультрафіолетового діапазонів взаємодіє з будь-якими речовинами, в тому числі і з біооб'єктами, і вивчення цих взаємодій дає важливу інформацію як про молекулярну структуру цих об'єктів, так і про процеси, що відбуваються в них на атомному і молекулярному рівнях.

Якщо електромагнітне випромінювання проходить через речовину, то частина цього випромінювання поглинається, причому на різних частотах (довжинах хвиль) поглинається різна кількість електромагнітної енергії. Залежність показника поглинання речовини від частоти або довжини хвилі випромінювання називають спектром поглинання (абсорбційним спектром) цієї речовини.

Разом з тим, будь-яка речовина за певних умов здатна випромінювати електромагнітні хвилі і має свій певний спектр випускання. Залежність інтенсивності електромагнітного випромінювання речовини від частоти або довжини хвилі називається спектром випускання (емісійним спектром) цієї речовини.

Спектри випускання і поглинання у кожної речовини строго індивідуальні і є як би його "паспортом", тому, зареєструвавши спектр випромінювання або поглинання речовини або суміші речовин, можна визначити і вид речовини, склад і процентний вміст компонентів суміші, тобто провести і якісний і кількісний спектральний аналіз, що часто використовується не тільки у фізиці, але і в аналітичній і біологічній хімії.

Спектри, що лежать в ультрафіолетовому, видимому і інфрачервоному діапазонах називають оптичними спектрами. Спектри атомів і молекул відображають їх енергетичні стани (енергію зв'язків), тому оптичні спектри речовин вельми чутливі до зміни хімічних зв'язків атомів і молекул, до зміни

їх оточення, рН середовища, до впливу зовнішніх електричних і магнітних полів і ін. З цих причин спектральний аналіз є одним із найважливіших неруйнівних методів дослідження як структури речовини, так і фізичних і хімічних процесів, що відбуваються в цій речовині на атомному і молекулярному рівнях і широко використовується як метод дослідження в біохімії, молекулярній біології та медицині.

1.2. Взаємодія електромагнітного випромінювання оптичного діапазону з речовиною

У цьому розділі під світлом ми будемо розуміти електромагнітне випромінювання оптичного діапазону, тобто не тільки видиме оком випромінювання, але також випромінювання ультрафіолетового і інфрачервоного діапазонів.

Явище поглинання такого випромінювання речовиною добре вивчено. Так, експериментально встановлено, що при проходженні випромінювання через тонкий поглинаючий шар інтенсивність його змінюється на величину ΔI , яка прямо пропорційна товщині Δx цього шару і інтенсивності I падаючого на нього випромінювання (див. Рис. 1.1):

$$\Delta I = -kI \Delta x, \quad (1.1)$$

де k - коефіцієнт пропорційності, а знак «-» вказує на зменшення інтенсивності випромінювання після проходження через шар. Записуючи це співвідношення як диференціальне рівняння: $dI = -kI dx$, і вирішуючи його:

$$dI / I = -k dx,$$

$$\int dI / I = -k \int dx,$$

$$\ln I = -kx + \ln C,$$

отримаємо спочатку загальне рішення:

$$I = Ce^{-kx}, \quad (1.2)$$

а потім і приватне рішення, користуючись тим, що $I = I_0$ при $x = 0$, звідки випливає, що $C = I_0$. В результаті остаточно отримуємо закон поглинання світла, що зв'язує інтенсивність I випромінювання, що пройшов через шар

речовини товщиною x , і інтенсивність I_0 падаючого на нього випромінювання:

$$I = I_0 e^{-kx}, \quad (1.3)$$

який відомий як закон Бугера - Ламберта.

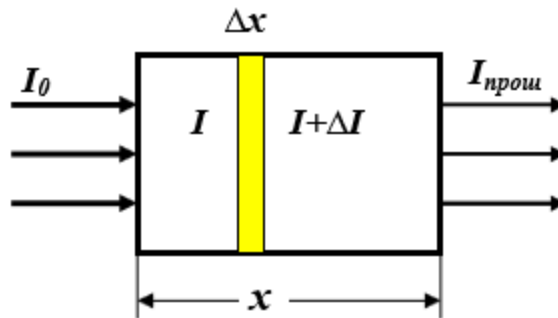


Рис. 1.1. Проходження світла через поглинаючу речовину.

Поглинаючі властивості речовини тут повністю визначаються величиною k , яка називається показником поглинання і є однією з найважливіших оптичних характеристик речовини, вимірюється в зворотних метрах (m^{-1}) або зворотних сантиметрах (cm^{-1}). Величина показника поглинання k залежить від довжини хвилі λ падаючого випромінювання і ця залежність $k(\lambda)$ або $k(\nu)$ і визначає спектр поглинання, індивідуальний для кожної речовини.

Закон Бугера справедливий для всіх речовин, але у кожній з них своя залежність показника поглинання k від довжини хвилі, що і визначає різне поглинання ними одного і того ж випромінювання.

Для розчинів при невеликих концентраціях " C " справедливий закон Бера - показник поглинання розчину прямо пропорційний концентрації поглинаючої речовини:

$$k = \alpha c, \quad (1.4)$$

де α - питомий (у розрахунку на одиницю концентрацію) показник поглинання речовини. Оскільки концентрацію прийнято вимірювати в моль/л або г/л, то α вимірюється відповідно в л/м·моль або в л/г·см. Таким чином,

для розчинів закон поглинання світла набуває вигляд, відомий як закон Бугера - Ламберта - Бера:

$$I = I_0 e^{-\alpha c x} \quad (1.5)$$

Введемо тепер кілька загальноприйнятих визначень.

Коефіцієнтом пропускання зразка називають відношення інтенсивності світла, що пройшла через зразок, до інтенсивності падаючого на нього світла:

$$T = I / I_0 \quad (1.6)$$

Оптичною щільністю зразка називають десятковий логарифм величини, зворотної коефіцієнту пропускання T :

$$D = \lg(1/T) = -\lg T \quad (1.7)$$

Підставляючи в ці співвідношення закони (1.3) або (1.5), отримаємо залежності коефіцієнта пропускання і оптичної щільності від товщини x поглинаючого шару і концентрації c розчиненої поглинаючої речовини:

для твердих зразків: $T = I / I_0 = e^{-kx}$,

$$D = kx \cdot \lg e = 0,43kx = k_1 x, \quad (1.8)$$

для розчинів: $T = I / I_0 = e^{-\alpha c x}$;

$$D = \alpha c x \cdot \lg e = 0,43\alpha c x = a_1 c x. \quad (1.9)$$

Видно, що залежність коефіцієнта пропускання T і від товщини x зразка, і від концентрації " C " розчиненої поглинаючої речовини експоненціальна, тоді як оптична щільність D зразка лінійно залежить від цих параметрів, що дуже зручно при вимірах концентрації речовин за їхніми спектрами поглинання.

Крім того, з співвідношень (1.8) і (1.9) видно, що залежність оптичної щільності від довжини хвилі випромінювання така ж, як і у показників поглинання k або α : $D(\lambda) \sim k(\lambda) \sim \alpha(\lambda)$, і тому теж являє собою спектр поглинання зразка. Тому на практиці в якості спектра поглинання зазвичай реєструють саме залежність оптичної щільності від довжини хвилі $D(\lambda)$ [5].

Оптична щільність розчинів, як уже зазначалося, прямо пропорційна концентрації поглинаючої речовини (див. (1.9)). Тому, вимірявши оптичну

щільність розчину на певній довжині хвилі (поблизу максимуму поглинання), можна визначити концентрацію поглинаючої речовини. Для цих цілей використовуються прилади, які називаються фотоелектроколориметрами. Схема однопроменевого фотоелектроколориметра представлена на Рис. 1.2.

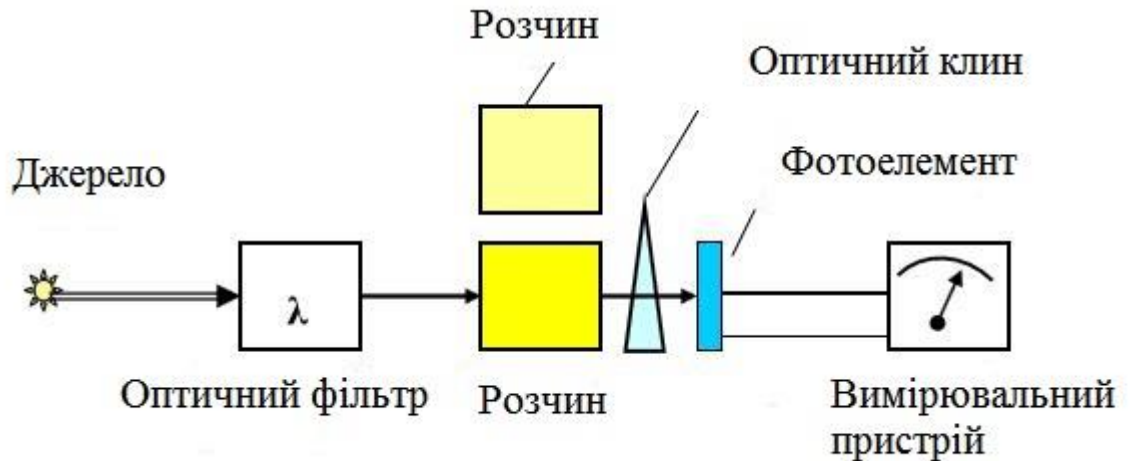


Рис. 1.2. Схема однопроменевого фотоелектроколориметра.

Світло від джерела суцільного спектра проходить через оптичний фільтр, що пропускає випромінювання лише певної довжини хвилі λ . Це монохроматичне випромінювання спочатку проходить через кювету з чистим розчинником, потрапляє на фотоелемент і за допомогою поглинаючого оптичного клина показання вимірювального приладу встановлюють точно на 100 відсотків пропускання. Потім замість кювети з розчинником на шляху променя поміщають кювету з досліджуваним розчином: - вимірювальний прилад відразу показує його коефіцієнт пропускання і оптичну щільність, знаючи які можна визначити концентрацію поглинаючої речовини в розчині.

1.3. Основні закономірності випромінювання і поглинання енергії речовинами при дії збуджуючого електромагнітного випромінювання

Оптичні спектри багатьох речовин були добре відомі і систематизовані вже в XIX столітті, але фізична природа їх виникнення була неясна.

Вперше правильне пояснення спостерігаючими спектрами випромінювання і поглинання атомів дав Нільс Бор на початку XX століття.

Грунтуючись на планетарній моделі атома, висунутої Резерфордом, і на квантових властивостях світла, встановлених Планком, він постулював такі положення:

1. Електрони в атомі можуть перебувати тільки в певних енергетичних станах $E_1, E_2, E_3 \dots E_n$, які є стаціонарними і перебуваючи в яких електрон не випромінює і не поглинає енергію.

2. При переході електрона з одного стаціонарного стану E_n в інший E_k він або випромінює енергію у вигляді кванта світла (якщо $E_n > E_k$), або поглинає квант відповідної енергії (якщо $E_n < E_k$), при цьому енергія $h\nu$ кванта і частота ν випромінювання визначаються співвідношенням (умова Бора):

$$h\nu = |E_n - E_k| \quad (1.10)$$

3. Стаціонарними є ті стани, в яких момент імпульсу електрона приймає значення, кратне величині $\hbar = h/2\pi$,

$$mvr = n \cdot h/2\pi = n \cdot \hbar, \quad (1.11)$$

де h - постійна Планка, $\hbar = h/2\pi$, а m , v і r - маса, швидкість і радіус орбіти електрона, $n = 1, 2, 3, 4, \dots$ - ціле позитивне число.

Постулати Бора дали можливість обчислити радіуси стаціонарних орбіт і енергію електрона в цих станах для найпростішого атома - атома водню і воденьподібних іонів (тобто мають тільки один електрон) і потім розрахувати їх спектри випромінювання і поглинання.

Теорія Бора вперше пояснила і правильно описала спостерігаючи спектри випромінювання і поглинання атома водню і воденьподібних іонів, вказала правильний напрямок для подальшого розвитку всієї квантової механіки, що пояснила явища, що відбуваються на атомному і молекулярному рівнях.

Таким чином, було встановлено, що випускання атомами квантів електромагнітного випромінювання відбувається при переході електронів з вищих енергетичних станів в більш низькі, а поглинання квантів

електромагнітної енергії супроводжується переходами електронів з нижніх енергетичних станів на більш високі відповідно до умови (1.10).

Оскільки енергія електрона в атомі прямо залежить від заряду ядра Ze і, отже, від номера Z елемента, то набір можливих енергетичних станів у атома кожного хімічного елемента або у молекули строго індивідуальний, тому і спектри випускання і поглинання атомів і молекул також строго індивідуальні. Завдяки цьому за спектрами випускання або поглинання можна визначати хімічний склад зразка. У цьому полягає один з основних напрямків практичного застосування спектрального аналізу.

1.4. Молекулярні спектри та правила їх побудови

У молекулах крім руху електронів навколо ядер, існують і інші види руху, які теж квантуються, тобто приймають дискретні значення і описуються відповідними квантовими числами. Це коливальний рух ядер атомів щодо їх положення рівноваги і обертання всієї молекули в цілому навколо осей, що проходять через її центр мас:

$$E_{\text{мол.}} = E_{\text{эл.дв.}} + E_{\text{кол.дв.}} + E_{\text{вращ.}} \quad (1.12)$$

при цьому енергія електронного руху значно більша енергії коливального руху ядер, а та, в свою чергу, значно більша енергії обертання молекули, тобто виконуються нерівності:

$$E_{\text{эл.дв.}} \gg E_{\text{кол.дв.}} \gg E_{\text{вращ.}} \quad (1.13)$$

Енергія електронного руху описується квантовими числами n і ℓ , а коливального і обертального рухів - квантовими числами ν і j відповідно.

В результаті структура енергетичних рівнів молекули значно ускладнюється в порівнянні з енергетичною структурою атома. У кожного електронного стану ($n = 1, 2, 3, \dots$) з'являються свої коливальні ($\nu = 1, 2, \dots$) і обертальні (j) підрівні, як схематично показано на Рис. 1.3. Наявність коливальних і дрібних обертальних підрівнів призводить до утворення у кожного електронного стану суцільних зон коливально-обертальних станів, причому в звичайних умовах краще "заселені" нижні підрівні цих. Переходи

молекули з нижніх енергетичних рівнів на верхні будуть супроводжуватися поглинанням енергії молекулою, а оптичні переходи з верхніх станів на нижні супроводжуються випусканням електромагнітних хвиль.

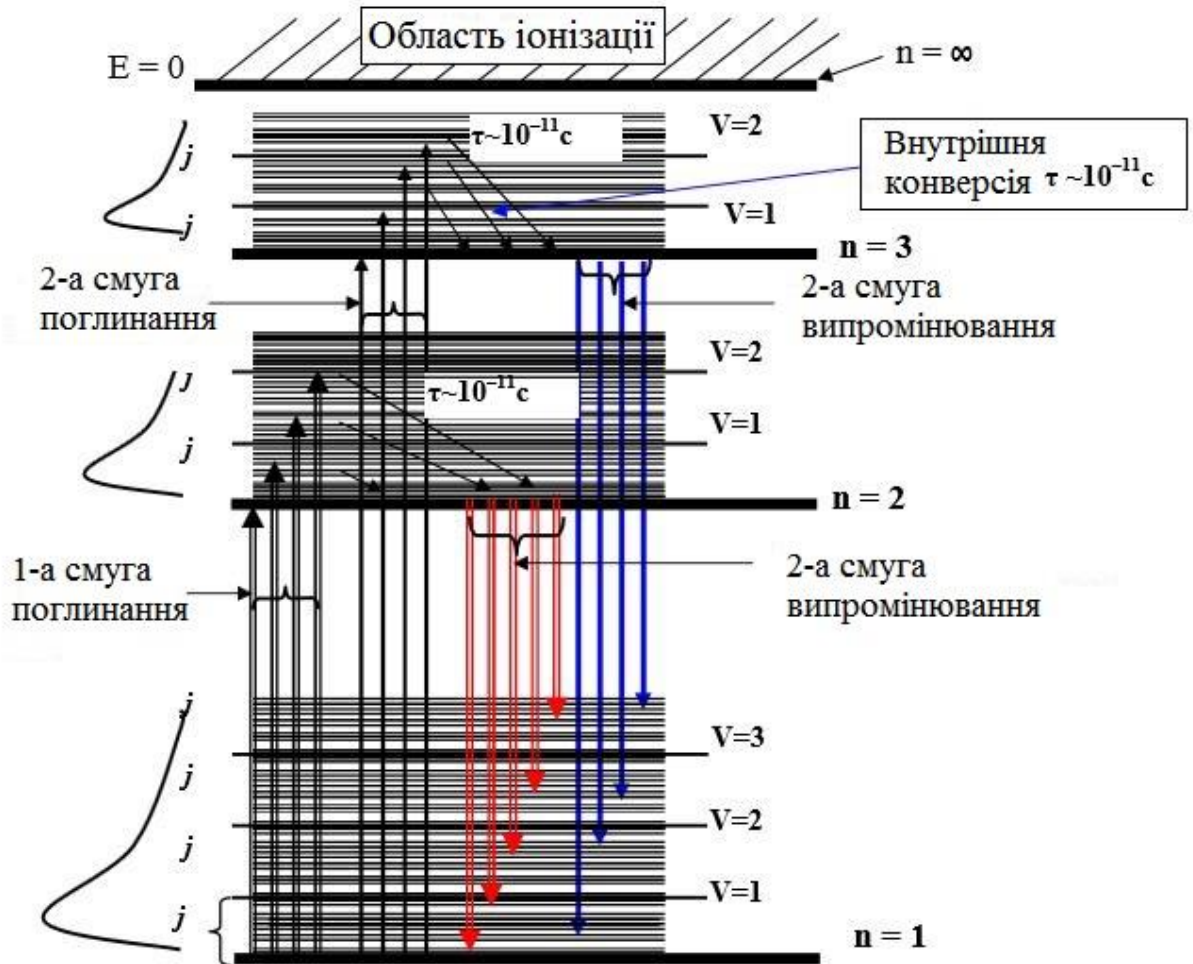


Рис. 1.3. Діаграма енергетичних рівнів молекули. Схема утворення спектрів поглинання і випускання.

Поглинання зазвичай йде з найнижчих, найбільш заселених, підрівнів основного стану на будь-які коливально-обертальні підрівні верхніх електронних станів, що утворюють суцільну зону станів (див. Рис. 1.3), тому в спектрах поглинання молекул спостерігаються не окремі лінії (як у атомів), а широкі спектральні смуги поглинання.

Перша смуга поглинання відповідає переходам з основного стану на різні-обертальні підрівні 1-го збуджуючого електронного стану.

Друга смуга поглинання відповідає переходам з основного рівня на коливально-обертальні підрівні 2-го збудженого електронного стану і т.д. (див. Рис. 1.3).

У збуджених коливально-обертальних станах молекула довго перебувати не може і за час 10^{-11} - 10^{-12} секунди робить безвипромінюючі переходи на енергетично більш вигідні, самі нижні коливально-обертальні підрівні цього ж електронного стану, - це явище називається внутрішньою конверсією. Внаслідок внутрішньої конверсії випускання електромагнітних квантів відбувається з найнижчих підрівнів збуджених станів на будь-які підрівні нижчих (головним чином основного) електронних станів.

В результаті утворюються смуги випускання (люмінесценції) - перша, друга і т.д., які не збігаються за частотою зі смугами поглинання, а зміщені щодо них в сторону менших частот (великих довжин хвиль) - ця закономірність молекулярних спектрів відома як закон Стокса [2].

1.5. Види молекулярних спектрів

Частоти окремих ліній в спектрах молекул так само визначаються умовою Бора:

$$\nu = \frac{|E_{\text{мол.2}} - E_{\text{мол.1}}|}{h} = \frac{\Delta E_{\text{эл.}} + \Delta E_{\text{кол.}} + \Delta E_{\text{вращ.}}}{h} \quad (1.14)$$

Якщо змінюються всі три види енергії при переході молекули з одного стану в інший, то спектри називаються електронно-коливально-обертальними або, простіше, електронними (за найбільшою енергією) спектрами. Вони мають вигляд досить широких спектральних смуг, розташованих в ультрафіолетовій (УФ), видимій або ближній інфрачервоній (ІЧ) областях спектру (див. Рис.1.4).

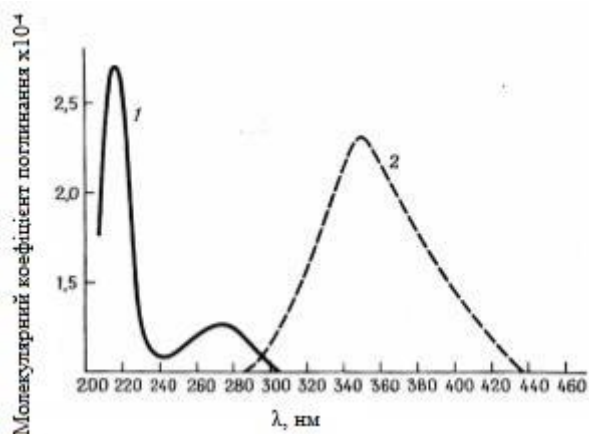


Рис. 1.4. Електронні спектри поглинання (1) і випускання (2) триптофану.

Електронні спектри поглинання більшості біомолекул (білків, нуклеїнових кислот і ін.) лежать в УФ-області спектра. Вони використовуються для ідентифікації досліджуваної речовини, для дослідження кінетики хімічних реакцій, а також для визначення концентрації розчиненої речовини шляхом вимірювання оптичної щільності розчину поблизу максимуму смуги поглинання речовини. Спектри поглинання дозволяють отримувати інформацію про властивості макромолекул і їх взаємодії з іншими молекулами, оскільки ці спектри істотно залежать від найближчого і зовнішнього оточення поглинаючої молекули.

Поглинання білків в області довжин хвиль 250-300 нм обумовлено головним чином ароматичними амінокислотами: триптофаном (див. Рис. 1.4), тирозином і фенілаланином, хоча УФ-випромінювання з довжиною хвилі 250 нм поглинають також гістидин і сірум'ясті амінокислоти - цистин, цистеїн і метіонін [15].

Електронні спектри випускання називають також спектрами люмінесценції і вони будуть докладніше розглянуті нижче.

Коливальні-обертальні (простіше - коливальні) спектри молекул спостерігаються тільки в поглинанні, коли енергія руху електронів не змінюється, тобто $\Delta E_{\text{ел.}} = 0$, а змінюються лише коливальна і обертальна

енергії молекули в межах основного електронного стану. Вони лежать в інфрачервоній області спектра і мають вигляд смуг, які часто перекриваються між собою. Коливальні спектри дають інформацію про енергії валентних зв'язків молекули, енергії міжмолекулярних взаємодій, про конформаційні та інші зміни в структурі молекул і тому широко використовуються при спектральних дослідженнях молекул. Обертальні спектри молекул утворюються при переходах між обертальними підрівнями одного і того ж електронно-коливального стану, тобто при $\Delta E_{\text{эл.}} = 0$ і $\Delta E_{\text{кол.}} = 0$ але $\Delta E_{\text{вращ.}} \neq 0$ і можуть спостерігатися лише в радіодіапазоні [12].

1.6. Класифікація спектральних методів дослідження якісного та кількісного складу речовин

В загальному випадку, спектроскопію і спектри класифікують за рядом ознак:

1. По областях електромагнітного випромінювання (радіочастотна, мікрохвильова, інфрачервона (ІЧ), видима і ультрафіолетова (УФ), рентгенівська, γ -променева). Спектри УФ, видимої та ІЧ-областей називають оптичними, а відповідний розділ спектроскопії – оптичною спектроскопією.

2. За характером взаємодії випромінювання з речовиною спектроскопію ділять на спектроскопію поглинання (абсорбційну спектроскопію), випускання (емісійну спектроскопію), розсіювання (спектроскопію комбінаційного розсіювання) і відображення (спектроскопію відображення).

3. За типом досліджуваних об'єктів спектроскопію поділяють на атомну і молекулярну [7].

Атомна спектроскопія вивчає речовину, що знаходиться в стані розрідженого атомарного газу або пари, і, отже, може дати інформацію лише про елементний склад аналізуючої речовини. Молекулярні спектри містять інформацію не тільки про елементний склад аналізуючої речовини, а й про те, як атоми з'єднані між собою в молекулі. Інша важлива відмінність (і перевага) молекулярної спектроскопії від атомної (за винятком

рентгенівської) полягає в тому, що в процесі отримання спектрів речовина може залишатися незмінною.

4. За фазового стану аналізуючої речовини (спектроскопія газів, рідин, розчинів, твердих тіл).

5. За характером вивчення спектроскопію підрозділяють на класичну спектроскопію (некогерентного випромінювання) і лазерну спектроскопію (спектроскопію когерентного випромінювання).

Реєстрація оптичних спектрів проводиться за допомогою спектральних приладів, які в основному бувають двох типів: призмений і дифракційні. У першому випадку розкладання випромінювання в спектр здійснюється скляною або кварцовою призмою завдяки явищу дисперсії світла. У другому випадку використовується явище дифракції світла на дифракційних ґратах з великим числом штрихів на 1 мм (від 600 до 1800 штр/мм).

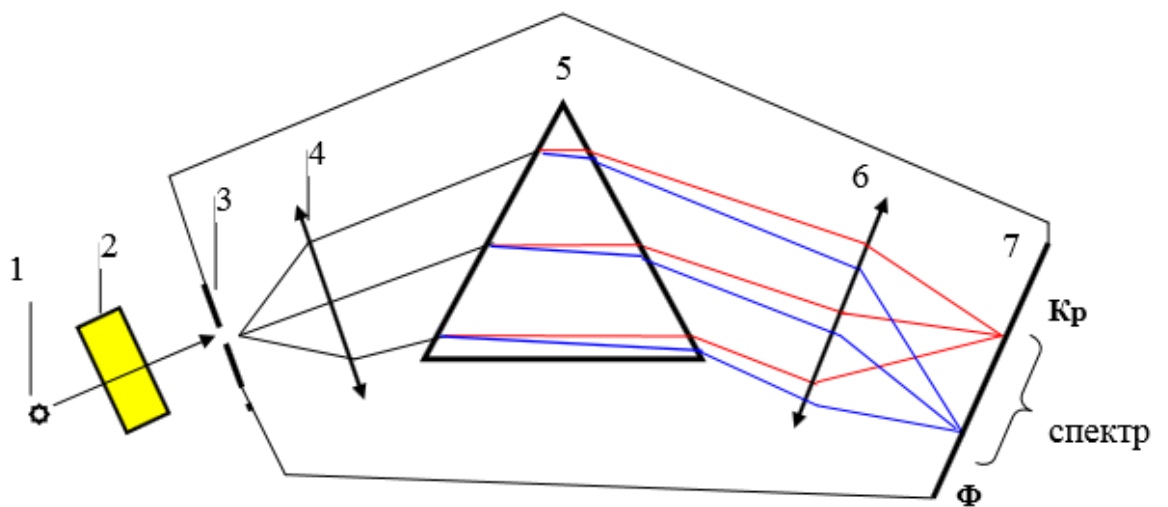


Рис. 1.5. Схема призменийого спектрального приладу. 1 - джерело випромінювання, 2 - поглинаючий зразок, 3 - вхідна щілина приладу, 4 - коліматорна лінза, 5 - призма, 6 - камерна лінза, 7 - фокальна площина камерної лінзи [6].

На Рис. 1.5 представлена схема призменийого спектрального приладу в режимі реєстрації спектрів поглинання речовини. Світло від джерела 1, що має в цьому випадку суцільний спектр випромінювання, проходить через досліджуваний поглинаючий зразок 2 і падає на вузьку вхідну щілину 3

спектрального приладу. Лінза 4 перетворює випромінювання, що йде від щілини, в паралельний пучок, який потім падає на прозору призму 5. Внаслідок дисперсії світла в призмі промені з різною довжиною хвилі заломлюються нею на різні кути спочатку на першій, а потім і на другій гранях призми, причому зі збільшенням довжини хвилі кут відхилення променя призмою зменшується. Але всі промені з однаковою довжиною хвилі залишаються паралельними між собою і збираються другою лінзою 6 в одну точку (точніше, в вертикальну вузьку смужку) в її фокальній площині 7. Випромінювання різних довжин хвиль збираються в різних точках фокальної площини, в результаті чого в площині 7 спостерігається спектр поглинання речовини у вигляді темних або сірих ліній і смуг на тлі кольорового суцільного спектра джерела випромінювання (див Рис. 1.6).



Рис. 1.6. Вид спектру поглинання деякої речовини в спектроскопі: на тлі суцільного спектра випромінювання джерела видно темні лінії поглинання досліджуваної речовини.



Рис. 1.7. Вид спектру випускання в спектроскопі: на темному тлі видно яскраві лінії випускання речовини.

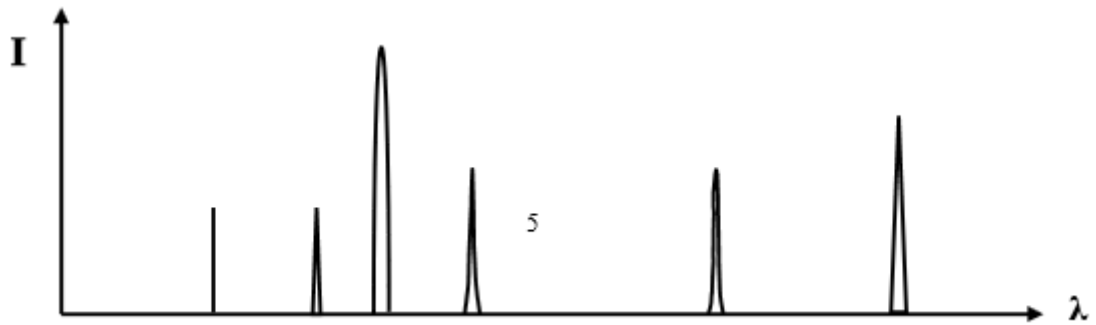


Рис. 1.8. Спектр випускання тієї ж речовини, отриманий методом фотоелектричної реєстрації (залежність інтенсивності випромінювання від довжини хвилі).

При реєстрації спектрів випускання в якості джерела 1 використовують світіння самої досліджуваної речовини (поглинаючий зразок 2 в цьому випадку відсутній), і в площині 7 спостерігають досліджуваний спектр (див. Рис. 1.7 і 1.8).

1.7. Теоретичні основи фотолюмінесцентної спектроскопії

Експериментальні методи дослідження спектрів люмінесценції ґрунтуються на релаксаційних процесах, що відбуваються при електронному збудженні частинок речовини. Перехід молекул в збуджений стан може здійснюватися різними шляхами, як і витрачання отриманої при цьому молекулами енергії. Світіння речовини, що виникає при переході молекул зі збудженого стану в основний, називають люмінесценцією, а якщо збудження відбувалося за рахунок поглинання електромагнітного випромінювання в оптичній області, то випускання випромінювання в процесі релаксації називають фотолюмінесценцією на відміну, наприклад, від рентгенолюмінесценції, електролюмінесценції, термо- і хемілюмінесценції і т.д.

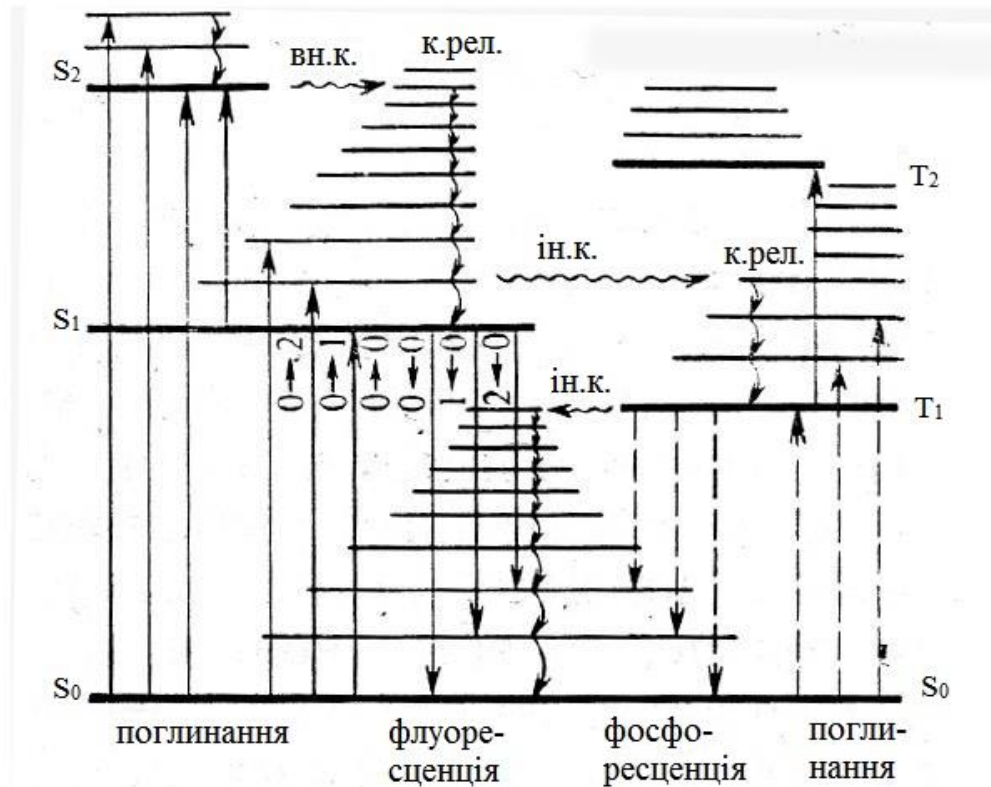


Рис. 1.9. Схема нижчих енергетичних рівнів молекули і переходів між ними при фотолюмінесценції (за діаграмою Яблонського).

Коли прямий і зворотний переходи, що відбуваються одночасно, здійснюються між одними і тими ж фіксованими енергетичними рівнями, частоти емісійного спектра точно збігаються з частотами спектра поглинання. Якби заселеності нижнього і верхнього станів були однакові, то не спостерігалось б ні поглинання, ні випускання електромагнітного випромінювання. Оскільки найбільш заселеним є основний електронний стан, а ще точніше - його нульовий коливальний рівень енергії, то при опроміненні спостерігаються смуги поглинання, пов'язані з переходами молекул з цього рівня на коливальні підрівні того чи іншого збудженого електронного стану, як це схематично показано на Рис. 1.9. При цьому може виникати нерівноважна заселеність коливальних рівнів. У збудженому електронно-коливальному стані надлишок коливальної енергії може втрачатися в результаті міжмолекулярних зіткнень або якихось інших

безвипромінювальних коливальних переходів - відбувається коливальна релаксація (к. рел), яка представляє перехід від нерівноважного розподілу по коливальним рівням, енергії в даному електронному стані до рівноважного теплового розподілу. В кінцевому рахунку найбільш заселеним знову-таки виявляється нульовий (всі $\nu_k = 0$) коливальний рівень (див. Рис. 1.9) [9].

Залежно від характеру електронного стану, з якого молекули переходять в основний стан з випусканням електромагнітного випромінювання, фотолюмінісценція підрозділяється на флуоресценцію і фосфоресценцію. Флуоресценція спостерігається при переході між станами, що мають однакову мультиплетність, зазвичай між синглетними першим збудженим і основним $S_1 \rightarrow S_0$. Можливі безвипромінювальні переходи між різними електронними станами однієї і тієї ж мультиплетності називають внутрішньою конверсією (вн.к) і позначають, як будь-які безвипромінювальні переходи, хвилястою стрілкою, зокрема $S_2 \rightarrow S_1$. Середній час життя молекули в збудженому синглетному стані мале, і явище флуоресценції пов'язане з високою ймовірністю спонтанного переходу молекул в основний синглетний стан, тобто характеризується відсутністю тривалого «післясвічення» (після припинення опромінення, що призводить до електронного збудження молекул).

Загасання флуоресценції відбувається за експоненціальним законом:

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad (1.15)$$

де I інтенсивність флуоресценції через час t після припинення опромінення; I_0 - постійна інтенсивність флуоресценції під час опромінення; τ - середній час загасання, за яке інтенсивність флуоресценції зменшується від вихідної величини в e раз (зазвичай має порядок $10^{-4} \dots 10^{-9}$ с).

Якщо спонтанний радіаційний перехід являє, єдиний процес, шляхом якого дезактивується збуджений стан, то звичайний середній час життя цього стану τ° збігається із середнім часом загасання τ і обернено пропорційно константі швидкості природного загасання фотолюмінісценції $k_{ф.л.}$:

$$\tau^{\circ} = 1/k_{ф.л.} \quad (1.16)$$

Сила осцилятора f , що характеризує ймовірність спонтанного переходу з більш високого в більш низький електронний стан, пов'язана з природним середнім часом життя збудженого стану рівністю

$$f = 1,5 \frac{g'}{g''} \frac{1}{\omega^2 \tau^0} \quad (1.17)$$

де g' і g'' - мультиплетності відповідно верхнього та нижнього станів.

Це рівність отримана стосовно атомним переходам, а для молекулярних переходів її можна використовувати лише з коригуванням, але й при цьому, особливо в разі малих інтенсивностей переходів, можливі лише грубі оцінки тільки по порядкам величин [1].

Як можливі з малою вірогідністю радіаційні (випромінювальні) переходи між електронними станами різної мультиплетності, також можливі і безвипромінювальні переходи між ними, звані інтеркомбінаційною конверсією (ін.к). Якщо, наприклад, перший збуджений синглетний стан близький по енергії до першого триплетному стану, то може здійснюватися безвипромінювальний перехід $S_1 \rightarrow T_1$, індукований «зіткненнями» молекул, які знаходяться на коливальних підрівнях цих станів поблизу «перетину» їх потенційних гіперповерхонь. У триплетному стані відбувається коливальна релаксація, тобто досягається рівноважний розподіл з найбільшою заселеністю нульового коливального рівня.

Оптичні переходи між електронними станами різної мультиплетності, зазвичай нижнім збудженим триплетним і основним синглетним $T_1 \rightarrow S_0$, призводять до явища фосфоресценції. В зв'язку з великим природним часом життя триплетного стану і дуже малою вірогідністю зазначеного переходу константа швидкості загасання фосфоресценції мала, що обумовлює тривале післясвітіння «фосфорів».

Реальний час життя люмінесціюючого збудженого стану, як і середній час загасання τ , залежить не тільки від ймовірності радіаційних переходів або

величини $k_{ф.л.}$, а й від констант швидкості (або ймовірностей) всіх інших процесів: внутрішньої ($k_{вн.к.}$) і інтеркомбінаційної ($k_{ін.к.}$) конверсії і фотохімічних реакцій ($k_{ф.р.}$).

На загальній схемі (Рис. 1.19) енергетичних рівнів k переходів між ними для молекул люмінесцюючої речовини заборонені по спіну переходи з поглинанням і фосфоресценції вказані пунктирними стрілками, а дозволені (поглинання, флуоресценція) - суцільні стрілками; хвилясті стрілки відповідають безвипромінювальним переходах (вн.к і ін.к), показана також коливальна релаксація (к.рел). Жирні горизонтальні лінії, які позначають електронні стани, можна вважати нульовими коливальними рівнями, енергія яких включає суму нульових коливальних енергій по всім нормальним координатам, а інші рівні (горизонтальні лінії) відповідають, як зазвичай, одному або декільком відмінним від нуля коливальним квантовим числам v_k .

За способом збудження атома або молекули люмінесценція ділиться на наступні основні види:

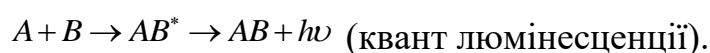
1. Фотолюмінесценція - збудження відбувається в результаті поглинання електромагнітної енергії (зазвичай видимого або ультрафіолетового діапазонів).

2. Катодолюмінесценція - збудження проводиться електронним ударом по атому або молекулі речовини (спостерігається в кінескопах, електронно-променевих трубках і т.п.).

3. Електролюмінесценція - збудження атомів і молекул проводиться електричним полем.

4. Рентгенілюмінесценція - збудження проводиться рентгенівськими променями.

5. Хемілюмінесценція - збудження відбувається в результаті хімічної реакції, за схемою:



6. Біоломінесценція - збудження молекул відбувається в результаті біохімічних реакцій, що відбуваються в живому організмі [4].

Існують і інші різновиди люмінесценції за способом збудження.

Зауважимо, що завдяки люмінесценції різні види енергії перетворюються в електромагнітне випромінювання, часто видимого діапазону і це широко використовується на практиці (екрани кінескопів, рентгенолюмінесцентні екрани, електронно-оптичні перетворювачі і ін.).

Якщо збудження молекули або атома відбувається безперервно, то і люмінесценція теж буде безперервною з деякою інтенсивністю I_0 і в цьому випадку її називають стаціонарною люмінесценцією.

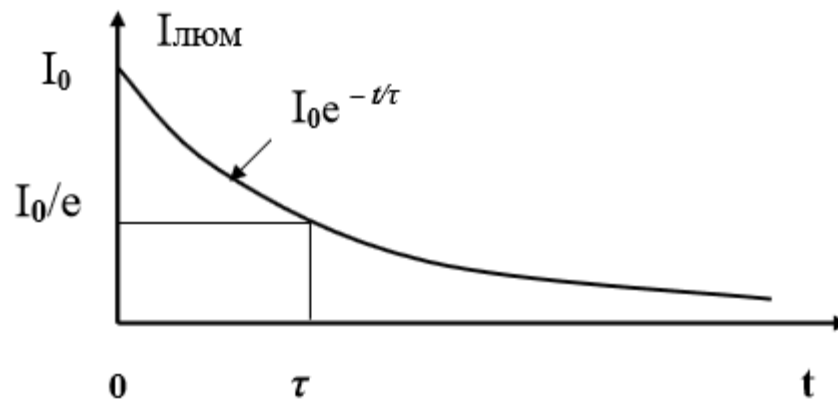


Рис. 1.10. Загасання інтенсивності люмінесценції в часі.

Якщо ж збудження молекули або атома раптово припинити, то інтенсивність люмінесценції почне експоненціально згасати (див. Рис. 1.10) згідно із законом:

$$I_{\text{люм.}} = I_0 e^{-t/\tau}, \quad (1.18)$$

де параметр τ називається тривалістю люмінесценції і є найважливішою характеристикою люмінесціуючої речовини. Він визначає час, за який інтенсивність люмінесценції зменшується в $e = 2,7$ раз. Цей час зазвичай знаходять з графіка, отриманого дослідним шляхом (див. Рис. 1.10).

За тривалістю післясвітіння τ (часто параметр τ називають також тривалістю післясвітіння або часом життя збудженого стану) люмінесценція ділиться на два види:

- флуоресценцію, якщо $\tau < 10^{-7}$ с, тобто загасання люмінесценції відбувається дуже швидко (для ока - миттєво),
- фосфоресценцію, якщо $\tau > 10^{-4}$ с, - в цьому випадку затухання йде порівняно повільно і часто добре спостерігається неозброєним оком.

З точки зору квантової механіки флуоресценція - це випромінювання, що виникає в результаті дозволених оптичних переходів, ймовірність яких дуже велика, тому час висвічування дуже малий: $\tau < 10^{-7}$ с.

Фосфоресценція, навпаки, виникає в результаті оптичних переходів, заборонених правилами квантової механіки, тому їх вірогідність дуже мала (в $10^6 - 10^4$ разів менше, ніж ймовірність дозволених переходів, тобто флуоресценції), а відповідно час висвічування (час життя в збудженому стані) дуже великий.

1.8. Основні закони люмінесценції

У конденсованих системах для високозбуджених молекул найбільш імовірним є процес внутрішньої конверсії, і радіаційний перехід з флуоресценцією зазвичай відбувається з найнижчого збудженого рівня даної мультиплетності. Тому, по-перше, смуга флуоресценції, як правило, зміщена в область більш низьких частот у порівнянні зі смугами поглинання, і, по-друге, її положення не залежить від довжини хвилі збуджуючого випромінювання, що відповідає якомусь електронному переходу з поглинанням.

Перша особливість: $\nu_{\text{погл.}} > \nu_{\text{ф.л.}}$ - отримала назву закону Стокса - Ломмеля, а довгохвильове (червоне) зміщення смуги випускання щодо поглинаючої частоти названо стоксовим. Іноді цей закон порушується і спостерігають компоненти смуги фотолюмінесценції з боку більш високих частот (менших довжин хвиль) щодо частоти 0-0- смуги поглинання, названі антистоксовими.

Якщо зіставити прямий і зворотний переходи між одними і тими ж електронними станами, тобто, наприклад, процеси поглинання $S_1 \leftarrow S_0$ і флуоресценції $S_1 \rightarrow S_0$, то легко побачити наступну характерну рису. Найнижча частота вібронного переходу в спектрі поглинання збігається з самою високою частотою в спектрі флуоресценції, так як обидві відповідають 0-0-смузі. Припустимо, що з'єднані з нульовим рівнем стрілками непульові коливальні підрівні електронних станів S_0 і S_1 характеризуються послідовно однаковими квантовими числами ν_k'' і ν_k' а відповідні коливальні кванти при $\Delta\nu_k''=1$ і $\Delta\nu_k'=1$ (індекс k один і той же) рівні або приблизно рівні. Тоді смуги спектра флуоресценції з низькочастотного боку 0-0-смузи будуть розташовані дзеркально симетрично відповідним смугам спектра поглинання, розташованим з високочастотного боку 0-0-смузи, тобто відбувається інверсія коливальної структури. Зі сказаного ще не випливає, що відносні інтенсивності смуг спектрів поглинання і випускання теж будуть дзеркально симетричні. Однак явище наближеної дзеркальної симетрії спектрів поглинання і люмінесценції, назване правилом Левшина, спостерігається експериментально (Рис. 1.11). У той же час повної дзеркальної відповідності немає ніколи, і відхилення від нього пов'язані, по-перше, з відмінностями функцій потенційної енергії в основному і збудженому електронних станах і, по-друге, з різною частотною залежністю інтенсивності спонтанного процесу випускання і вимушеного процесу поглинання. З перекриванням коливальної структури смуг спектрів поглинання і випускання може бути пов'язана і поява антистоксових компонентів в спектрі фотолюмінесценції [5].

Величину, що визначає частку радіаційних переходів по відношенню до всіх процесів, що призводить до зменшення заселеності збудженого електронного стану, називають виходом люмінесценції. Він характеризує ефективність перетворення збуджуючого випромінювання досліджуваною речовиною в світло фотолюмінесценції. Розрізняють енергетичний і

квантовий виходи. Перший являє собою відношення випромінюваної при люмінесценції енергії $E_{випр.}$, до поглиненої енергії випромінювання $E_{погл.}$, рівне при стаціонарному режимі безперервного опромінення та випускання відношенню відповідних інтенсивностей:

$$\Gamma = \frac{E_{випр.}}{E_{погл.}} = \frac{I_{випр.}}{I_{погл.}} \quad (1.19)$$

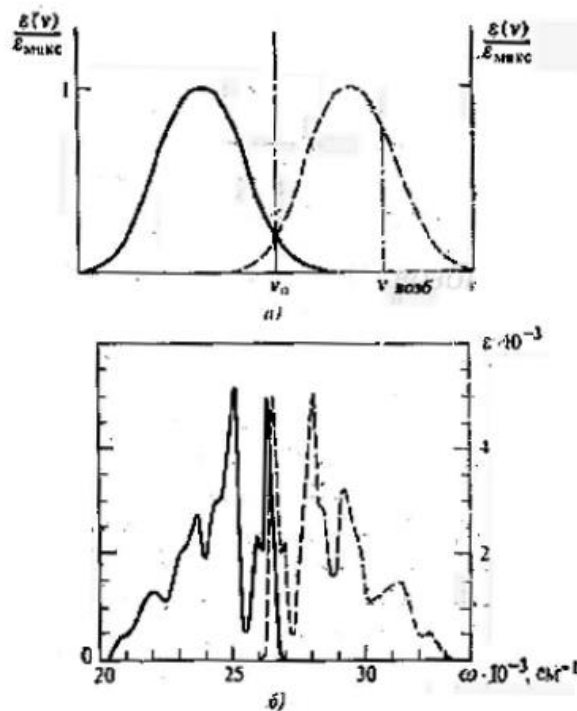


Рис. 1.11. Правило дзеркальної симетрії: а - загальна схема дзеркальної симетрії спектрів поглинання (пунктирна крива) і флуоресценції; б - наближена дзеркальна симетрія смуг переходів $S_0 \rightarrow S_1$ (пунктирна крива) і $S_1 \rightarrow S_0$ з інверсією коливальної структури для антрацену [1,8].

Квантовим виходом γ називають відношення числа квантів люмінесценції, що випускаються одиницею обсягу речовини в одиницю часу $N_{випр.}$ до числа поглинених фотонів збуджуючого випромінювання $N_{погл.}$:

$$\gamma = N_{випр.} / N_{погл.} \quad (1.20)$$

Його можна визначити також через константи швидкості загасання фотолюмінесценції і різних безвипромінювальних процесів наступним чином:

$$\gamma = \frac{k'_{\text{ф.л.}}}{k_{\text{ф.л.}} + k_{\text{вн.к.}} + k_{\text{ін.к.}} + k_{\text{ф.р.}}} \quad (1.21)$$

Енергетичний та квантовий виходи пов'язані співвідношенням:

$$\Gamma = \gamma \frac{\bar{\nu}_{\text{ф.л.}}}{\nu_{\text{збуд.}}} \quad (1.22)$$

де $\bar{\nu}_{\text{ф.л.}}$ - центр смуги фотолюмінесценції; $\nu_{\text{збуд.}}$ частота збуджуючого випромінювання. Можливо гасіння люмінесценції сторонніми домішками, температурне, концентраційне (при високих концентраціях), відомі й інші види гасіння.

Механізм гасіння зазвичай пов'язаний з розвитком безвипромінювальних процесів деградації енергії збудження за рахунок збільшення числа зіткнень частинок або появи нелюмінесціюючих асоціатів, або іонізації, дисоціації і т. д. Облік гасіння, впливаючого на інтенсивність люмінесценції, є важливим в люмінесцентному аналізі.

1.9. Методи люмінесцентного аналізу

Люмінесцентний аналіз широко застосовується в біології, медицині, фармакології, сільськогосподарській та харчовій промисловості, різноманітних наукових і екологічних дослідженнях.

Згідно С. І. Вавілова, люмінесценцією називається випромінювання надлишкове над температурним і володіє тривалістю не менше ніж 10^{-7} - 10^{-10} с, що перевищує період світлових коливань. На відміну від випромінювання нагрітих тіл він відрізняється неравновесністю: люмінесценція практично не використовує теплову енергію випромінюючої системи, тому її часто називають холодним світлом.

Люмінесценція виникає в результаті переходу електронів при поверненні молекул зі збудженого стану в нормальний. Таким чином,

поглинена енергія перетворюється молекулою в власне випромінювання, що являється характеристикою даної речовини. Люмінесціюючі речовини можуть перебувати в будь-якому агрегатному стані. Перевагою люмінесцентних реакцій є дуже низька межа їх виявлення.

У збуджений стан молекули люмінесціюючої речовини можуть переходити під дією світла і тоді люмінесценцію називають фотолюмінесценцію (флуоресценцією або фосфоресценцією), під дією рентгенівського випромінювання - рентгенолюмінесценцією, в результаті хімічної реакції - хемілюмінесценцією і т.д.

Найбільше практичне значення має флуоресценція - випромінювання, загасаюче відразу після припинення збудження.

Відношення випромінюваної при люмінесценції енергії до енергії поглиненого світла називають енергетичним виходом люмінесценції, а відношення числа випромінюваних квантів до числа поглинених називають квантовим виходом люмінесценції.

Залежність енергетичного виходу люмінесценції від довжини хвилі збуджуючого світла підкоряється закону Вавилова, згідно з яким енергетичний вихід люмінесценції зі збільшенням довжини хвилі збуджуючого світла зростає пропорційно довжині хвилі, потім залишається постійним і починаючи з деякої граничної довжини хвилі різко зменшується.

Пропорційність енергетичного виходу довжині хвилі поглиненого світла означає сталість квантового виходу люмінесценції в цьому спектральному інтервалі. Звідси випливає, що чим більший квантовий вихід люмінесценції, тим менша кількість люмінесціюючої речовини може бути виявлено за його світінням.

Інтенсивність люмінесценції пов'язана з концентрацією люмінесціюючої з домішками пропорційною залежністю, що лежить в основі кількісного люмінесцентного аналізу.

Ця залежність буде дотримуватися при сталості квантового виходу і інтенсивності збуджуючого випромінювання. Також важливою є умова досить низької концентрації люмінесціуючої речовини [10].

1.9.1. Методи абсолютного виміру квантового виходу люмінесценції

При вимірі енергетичного виходу люмінесценції $B_{ен.}$ необхідно точно виміряти абсолютне значення енергії, поглиненої молекулою світла і енергії її флуоресценції. Визначений таким способом енергетичний вихід люмінесценції отримав назву абсолютного. Розглянемо два способи вимірювання абсолютного енергетичного виходу люмінесценції, запропонованих С.І. Вавілов.

Перший заснований на вимірюванні інтенсивності збуджуючого світла, розсіяного дифузно відбивною поверхнею (платівкою, покритої окисом магнію) і порушуємо їм люмінесценції. Якщо $I_0(\lambda)$ – розподіл енергії в спектрі збудження, $\varepsilon(\lambda)$ – залежність коефіцієнта екстинції речовини від довжини хвилі, а енергії збуджуючого світла та люмінесценції, що йдуть в нормальному напрямку, в тілесному куті в один стерadian рівні $dE_{л}(\lambda)$ і $dE_{п}(\lambda)$, то, ввівши позначення $k(\lambda) = dE_{л}(\lambda) / dE_{п}(\lambda)$, отримаємо вираз, за допомогою якого можна визначити $B_{ен.}$:

$$B_{ен.} = \frac{E_{л}}{E_{п}} = \frac{4 \int k(\lambda) I_0(\lambda) d\lambda}{\int \varepsilon(\lambda) I_0 d\lambda} \quad (1.23)$$

У цій формулі всі величини можуть бути встановлені дослідним шляхом.

За допомогою цього методу може бути визначений і квантовий вихід люмінесценції. Якщо $S_{л}$ -площа спектра, вираженого в енергетичних одиницях, $S_{п}$ -площа спектра, розсіяного дифузної платівкою збуджуючого світла, то квантовий вихід люмінесценції може бути обчислений за формулою

$$B_{ен.} = 4n^2 \frac{S_{л} \bar{\lambda}_{л}}{S_{п} \bar{\lambda}_{п}} \alpha R \quad (1.24)$$

де n - показник заломлення розчину; $\alpha = 1 / [(1 - R_B) \times (1 - R_L)]$ - множник, що враховує відображення збуджуючого світла (коефіцієнт відображення R_B) і світла люмінесценції (коефіцієнт відображення R_L на вхідному вікні (при нормальному падінні збудливого ізлучення на розчин $\alpha = 1,09$); R - коефіцієнт розсіювання окису магнію, λ_L і λ_{Π} - середні довжини хвиль люмінесценції і збудження.

Другий метод заснований на вимірюванні відношення величини енергії, що йде на нагрівання люмінесцируючого речовини, і величини енергії, поглиненої нелюмінесцируючих речовиною, що володіє таким же пропусканням. Позначимо частину поглинається енергії збудження, що йде на нагрівання люмінесцируючого речовини, через

$$Q = E_{\Pi} - E_L \quad (1.25)$$

тоді

$$B_{en.} = E_L / E_{\Pi} = (E_{\Pi} - Q) / E_{\Pi}. \quad (1.26)$$

Даний метод зазнав ряд методичних удосконалень. Зокрема, був запропонований калориметрический метод визначення квантового виходу люмінесценції, в якому в якості вимірюваної величини використовується розширення досліджуваного розчину при його нагріванні. По відношенню змін обсягу досліджуваного і еталонного розчинів при їх одночасному опроміненні визначається частка поглиненого випромінювання D , що перетворюється в тепло. Ця величина пов'язана з квантовим виходом люмінесценції співвідношенням

$$\Delta = 1 - B_{kv.} \lambda_{зб.} / \bar{\lambda} \quad (1.27)$$

де $\lambda_{зб.}$ - довжина хвилі збуджуючого світла, $\bar{\lambda}$ - довжина хвилі випромінювання з усередненою по спектру флуоресценції енергією квантів. Слід зазначити, що для підвищення точності вимірювання $B_{kv.}$ цим методом необхідний високий термостатирование зразків, що, природно, ускладнює його широке використання [1].

Проведення абсолютних вимірювань - не просте завдання. Тому при визначенні ефективності люмінесценції абсолютні значення прагнуть замінити відносними.

Розглянемо як приклад метод визначення квантового виходу флуоресценції відносним способом. Суть цього методу полягає в порівняно площі, обмеженою спектром флуоресценції досліджуваного речовини, з відповідною площею еталона і внесенням корекцій на залежність інтенсивності збуджуючого світла від частоти, на поглинальну здатність речовини і на облік геометрії експериментальної установки. Сене такої корекції стає зрозумілим із простих теоретичних міркувань. Число квантів флуоресценції, що випромінювали в одиниці об'єму та в одиницю часу, визначається формулою

$$n = B_{\text{кв.}} C \varepsilon(\lambda) I / h\nu \quad (1.28)$$

де $B_{\text{кв.}}$ - квантовий вихід люмінесценції, C - концентрація люмінофора, ε - коефіцієнт екстинкції, I - інтенсивність збуджуючого світла, ν - частота збуджуючого світла, h - постійна Планка.

1.9.2. Хемілюмінесцентний аналіз

Хемілюмінесцентний аналіз заснований на вимірюванні спектру і інтенсивності випромінювання, що виникає за рахунок енергії хімічної реакції. Порушення хемілюмінесценції у видимій області спектра відбувається, якщо тепловий ефект реакції не менше 160 кДж/моль. Це зазвичай окислювально-відновні реакції за участю вільних радикалів.

У хемілюмінесцентному аналізі використовуються окислювальні реакції, що дають досить яскраве світіння, наприклад окислення люмінола, люцигенина і інших з'єднань пероксидом водню, гіпохлоритом, бромом. Розроблено методи аналізу, засновані на каталітичному або інгібіторному ефекті різних речовин. Зміст іонів заліза, кобальту, міді, титану, цирконію, платинових металів та інших визначається з межею виявлення 10^{-9} - 10^{-8} г/мл, проте селективність цих методик невелика.

Високою чутливістю і великою селективністю володіють хемілюмінесцентні методики газового аналізу, визначення аміаку, оксидів азоту і сірки, сірководню і т.д. Межа виявлення становить 10-7%. Хемілюмінесцентне випромінювання не вимагає зовнішніх джерел збудження і реєструється звичайним фотоелектронним помножувачем.

1.10. Фізичні основи визначення кількісних параметрів молекулярних сполук методами спектрфотометрії

Спектри люмінесценції, як і абсорбційні електронні спектри, застосовуються для якісного і кількісного аналізу, в структурних дослідженнях, вивчення електронно-коливальних станів молекул, фізико-хімічних властивостей розчинів, газоподібних, рідких і твердих зразків. Це зрозуміло з попереднього розгляду природи цих спектрів, і немає будь-яких принципових відмінностей у витягнутій з них інформації в порівнянні зі спектрами поглинання.

До особливостей якісного люмінесцентного аналізу, що дозволяє по спектру світіння виявляти і ідентифікувати речовину або групу речовини, можна віднести ще більшу вузькість кола об'єктів, що піддаються такому аналізу, ніж в абсорбційної спектроскопії. Чіткими, що мають характерну структуру спектрами люмінесценції володіють деякі речовини: сполуки рідкоземельних елементів, солі уранілу, ароматичні сполуки, порфірини і деякі інші. У більшості випадків спостерігаються широкі, позбавлені структури смуги, які для суміші флуоресціюючих речовин часто перекриваються і важко нероздільні.

В основі структурного аналізу по спектрах люмінесценції лежить не тільки залежність положення смуги, а й квантового виходу від структурних особливостей молекули.

Сильно флуоресціюють багато кисень- і азотовмісні гетероциклічні сполуки ароматичного ряду, металорганічні сполуки. Речовини, що відрізняються по «жорсткості» структури, але мають схожі спектри

поглинання, можуть часто сильно відрізнятись за інтенсивністю флуоресценції. Висновки про структуру на підставі спектрів флуоресценції носять досить загальний характер, але разом з іншими даними іноді можуть полегшити вирішення тих чи інших структурних проблем [4,9].

Положення, форма смуги і інтенсивність флуоресценції для з'єднань, здатних до іонізації і дисоціації в якомусь середовищі, можуть залежати від рН. Кислотність і основність можуть, в принципі, відрізнятись для основного і збудженого електронних станів молекул, тому не завжди спостерігається навіть приблизна відповідність змін спектрів поглинання і флуоресценції в залежності від рН.

Явище фосфоресценції використовується для вивчення метастабільних, збуджених триплетних фосфоресцентних станів молекул, парамагнетизму, що виникає при опроміненні, у зв'язку з особливостями будови як органічних, так і неорганічних сполук. Спектри фосфоресценції зазвичай досліджують для твердих розчинів речовин, при низьких температурах або в дуже в'язких рідинах, що дозволяє запобігти електронну дезактивацію молекул, обмежуючи їх рух, хоча іноді фосфоресценція спостерігається навіть у парів, наприклад діацетилу.

У разі неорганічних «домішкових» фосфорів вони разом з основною речовиною складають зазвичай єдину фосфоресцентну систему, тоді як фосфоресценція органічних сполук - властивість, притаманна самим молекулам. У першому випадку довжина хвилі збуджуючого випромінювання визначається часто спектром поглинання середовища, а не домішкових центрів світіння, у органічних ж фосфорів спектр флуоресценції в різних середовищах практично однаковий, так як порушується смугою випромінювання, що поглинається самою фосфоресцентною речовиною, і може лише злегка залежати від міжмолекулярних взаємодій.

Кількісний аналіз ґрунтується на залежності інтенсивності фотолюмінесценції від концентрації люмінесцентної речовини в розчині.

$$I_{\text{випр.}} = I_{\text{ногл.}} \cdot \Gamma \quad (1.29)$$

а за законом Бугера-Бера:

$$I_{\text{ногл.}} = I_0 - I = I_0(1 - e^{-2,3\epsilon c l}), \quad (1.30)$$

де I_0 - інтенсивність падаючого, збуджуючого випромінювання; I - інтенсивність пройшовшого непоглиненого випромінювання.

Після розкладання експоненти в ряд і підстановки $I_{\text{ногл.}}$ в (1.29) виходить співвідношення, що зв'язує $I_{\text{випр.}}$ з концентрацією флуоресцентної речовини, що для розбавлених розчинів являє лінійну залежність виду:

$$I_{\text{випр.}} = 2,3\epsilon c l I_0 \Gamma \quad (1.31)$$

Інтенсивність світіння прямо пропорційна інтенсивності збуджуючого випромінювання I_0 , і збільшуючи останню, можна добиватися дуже великої чутливості спектрофлуориметричних вимірювань. Надійно реєструється, наприклад, світіння розчинів з концентрацією флуоресціюючої речовини порядку $\sim 10^{-11}$ моль/л, що перевищує чутливість методу абсорбційної спектрофотометрії. Розчини для дослідження спектрів флуоресценції повинні готуватися з використанням розчинників особливо високою «флуоресцентної» чистоти, тобто очищених з допомогою спеціальних методів від мікродомішок, які самі можуть флуоресціювати.

У зв'язку з високою чутливістю хімічний люмінесцентний аналіз широко використовується в різних галузях промисловості, включаючи хімічну та нафтохімічну, в біології, медицині та геології, а так званий люмінесцентний аналіз виявлення - також в харчовій промисловості, сільськогосподарському виробництві, дефектоскопії, археології, криміналістиці і т. д [13].

РОЗДІЛ 2

ВИМОГИ ДО МЕТОДІВ ТА ЗАСОБІВ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛІЗУ ВИБРАНИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК В УФ- ДІАПАЗОНІ ДОВЖИН ХВИЛЬ

2.1. Методичні підходи до інструментальної бази вимірювання кількісних та якісних параметрів вибраних хімічних сполук методами люмінесцентної спектрофотометрії

Залежно від способу реєстрації отриманого спектра і його подальшого використання спектральні прилади можна поділити на такі типи:

- Спектроскопи - призначені для візуального спостереження спектрів, головним чином при експрес-аналізі речовин. В цьому випадку в площині 7 приладу ставиться напівпрозорий екран (матова скляна пластинка), на якому і спостерігається спектр.

- Спектрографи - призначені для реєстрації спектрів на папері, фотоплівках або фотопластинках. При фотографічній реєстрації спектрів в площині 7 приладу розміщується фотоматеріал, на який і реєструється досліджуваний спектр.

- Монохроматори - призначені для виділення вузького спектрального діапазону (певної довжини хвилі) зі спостережуваного спектру, для цього в площині 7 приладу поміщається вузька вихідна щілина. Переміщаючи цю щілину вздовж фокальної площини 7 або зміщуючи спектр щодо неї (обертанням призми 5) можна виділити необхідну довжину хвилі, тобто отримати монохроматичне випромінювання. Ця схема використовується також для фотоелектричної реєстрації спектрів.

- Фотоелектроколориметри - призначені для вимірювання оптичної щільності забарвлених розчинів на певних довжинах хвиль (зазвичай для подальшого визначення концентрації поглинаючої речовини), схема і принцип роботи їх розглянуті нижче.

Традиційні спектрофотометри в УФ та видимому інтервалах довжин хвиль складаються з наступних основних вузлів:

- джерела випромінювання,
- диспергуючого елемента (системи світлофільтрів або монохроматора),

- камери зразка,
- детектора (приймально-реєструючого пристрою).

У спектроскопії УФ- і видимій областях спектра розрізняють два види приладів: фотометр і спектрометр [1].

Фотометри при обраних встановлених довжинах хвиль вимірюють поглинання, причому довжина хвилі вибирається за допомогою оптичних фільтрів в ході променів. Такі пристрої використовуються тільки для кількісних аналізів і не призначені для реєстрації спектрів.

Спектрометри послідовно і автоматично реєструють окремі довжини хвиль, причому довжина хвилі встановлюється за допомогою дифракційної решітки. Щоб компенсувати відмінності в залежній від довжини хвилі інтенсивності світла I_0 , спектрометри можуть мати двопроменеве виконання.

2.1. Фізико-хімічні методи кількісного аналізу

В загальному випадку, кількісний аналіз – це сукупність експериментальних методів, які дозволяють у зразку матеріалу, що аналізується, визначати кількісний вміст (концентрацію) окремих складових частин або домішок.

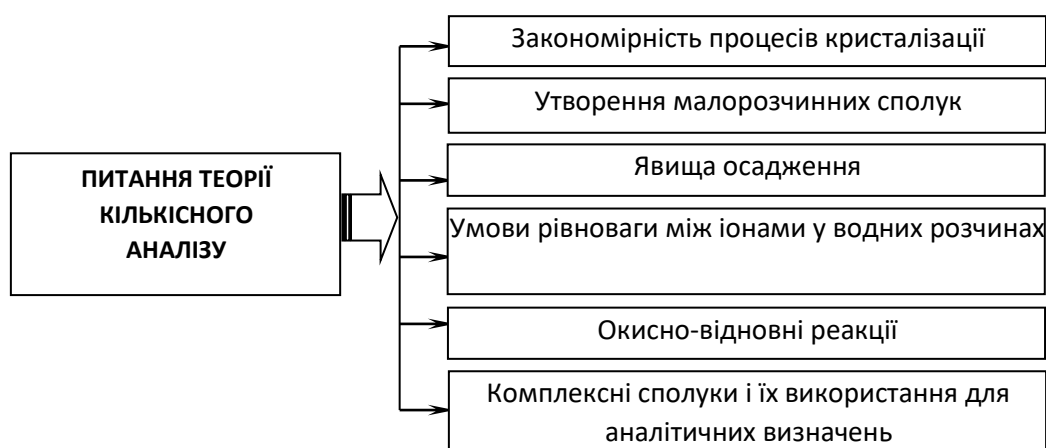


Рис. 2.1. Класифікація методів кількісного аналізу.

Кількісний аналіз за змістом є сукупністю хімічних і фізичних методів аналізу кількісного складу речовин або вмісту окремих компонентів у

відсотках. Метою кількісного аналізу є визначення кількісних співвідношень хімічних сполук, іонів і елементів, які входять до складу дослідних речовин.

Кількісний аналіз вирішує різні питання сучасної науки і виробництва. З його допомогою визначаються різні питання сучасної науки і виробництва. оптимальні умови проведення різних хіміко-технологічних процесів, контролюють якість сировини, ступінь чистоти продукції, що випускається, в тому числі і лікарських засобів, встановлюють вміст компонентів у сумішах, зв'язок між хімічним складом і фізичними властивостями речовини.

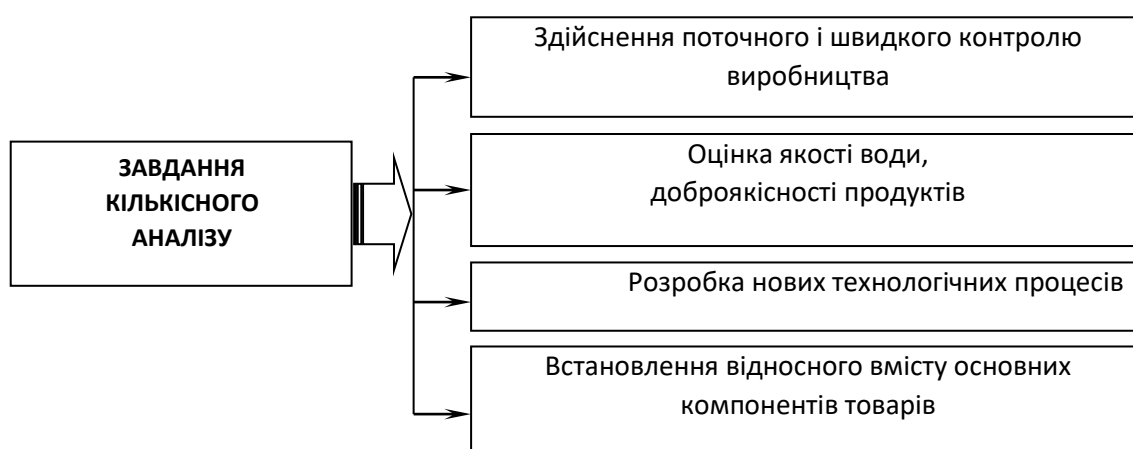


Рис. 2.2. Завдання кількісного аналізу.

Методи кількісного аналізу поділяють на три групи: хімічні, фізичні, фізико-хімічні.

1. *Хімічні методи кількісного аналізу* засновані на використанні різних типів хімічних реакцій, які кількісно протікають у розчинах, розплавах, твердих тілах або газах. Їх поділяють на:

– *гравіметричні (вагові)*, які засновані в точному вимірюванні маси компоненту, що аналізується, в досліджуваному розчині. Гравіметричний метод аналізу поділяють на: метод відгонки, осадження, виділення;

– *титриметричні (об'ємні)*, які якому кількісний склад досліджуваної проби визначають шляхом точного вимірювання об'єму розчину реагенту

відомої концентрації (титранту), який взаємодіє в еквівалентних кількостях з речовиною, що визначається.

Хімічні методи кількісного аналізу часто називають класичними. Це найбільш розроблені методи аналізу, які продовжують розвиватися. Вони точні, прості у виконанні, не потребують спеціальної апаратури. Але їх застосування іноді пов'язане з деякими труднощами (виділення компонентів із складних сумішей) і порівняно невисокою межею чутливості.

2. *Фізичні методи кількісного аналізу* ґрунтуються на вимірюванні фізичних параметрів речовин, що аналізуються, або їх розчинів, які є функцією їх кількісного складу. До них відносять методи, ґрунтовані на вимірюванні величин показника відбиття (рефрактометрія), оптичного обертання (поляриметрія), інтенсивності флуоресценції (флуориметрія) та інш. Фізичні методи характеризуються експресністю, низькою межею визначення, об'єктивністю результатів, можливістю автоматизації процесу. Але вони не завжди специфічні, так як на величину фізичного параметру впливає не тільки концентрація досліджуваної речовини, але й присутність інших речовин і домішок. Їх застосування часто потребує використання складної апаратури.

3. *Фізико-хімічні методи кількісного аналізу* ґрунтуються на вимірюванні величин фізичних параметрів системи, що аналізується, які з'являються або змінюються в результаті проведення хімічних реакцій. Вони характеризуються низькою межею визначення і швидкістю виконання. Фізико-хімічні методи поділяються на:

- 1) електрохімічні методи;
- 2) оптичні методи аналізу;
- 3) хроматографічні методи.

Фізичні і фізико-хімічні методи кількісного аналізу називають інструментальними, так як вони потребують застосування певних приладів.

2.2. Вимірювання спектрів при кількісному оптичному аналізі

До найбільш розповсюджених фізико-хімічних методів відносяться оптичні. Оптичні методи засновані на вимірі оптичних властивостей розчинів:

- поляриметричні – вимір кута обертання площини поляризації в розчині речовини;
- рефрактометричні – вимір кута переломлення світла в розчині;
- фотометричні – вимір пучка світла, що пройшов через розчин;
- спектрофотометричні – вимір інтенсивності пучка світла визначеної довжини хвилі, що пройшов через розчин.

Оптичні методи аналізу класифікують на:

I. Абсорбційні методи: засновані на вимірюванні поглинання речовиною світлового випромінювання:

- 1) колориметрія;
- 2) фотоколориметрія;
- 3) спектрофотометрія.

II. Емісійні методи: засновані на вимірюванні інтенсивності світла, що випромінюється речовиною:

- 1) емісійний спектральний аналіз;
- 2) полум'яна фотометрія.

III. Методи, засновані на вимірюванні інтенсивності світла після взаємодії його зі суспендованими частками в розчині (емульсії, суспензії):

- 1) флуориметрія;
- 2) турбидиметрія;
- 3) нефелометрія.

IV. Методи, засновані на явищі поляризації молекул під дією світлового випромінювання:

- 1) рефрактометрія;
- 2) поляриметрія.

2.2.1. Методи молекулярно-абсорбційного аналізу

Аналіз заснований на вимірюванні поглинання електромагнітного випромінювання молекулами або іонами у видимій, УФ- або ІЧ-області спектру:

1) колориметрія – метод оснований на візуальному порівнянні інтенсивності забарвлення розчинів різних концентрацій.

Світло немонохроматичне.

Не підлягають закону світлопоглинання.

Спектральна область: 400-700 нм. Точність вимірювань $\pm 5-10\%$. Для вимірювання використовують колориметричні пробірки;

2) фотоколориметрія – метод заснований на вимірюванні ступеню поглинання немонохроматичного або частково монохроматичного випромінювання речовиною, що визначається, у видимій області спектру.

Підлягає закону світлопоглинання.

Спектральна область: 300-700 нм. Прилад – фотоелектроколориметр. Точність вимірювань $\pm 3\%$;

3) спектроскопія у видимій, УФ- і ІЧ-області спектру – методи основані на вимірюванні поглинання речовиною монохроматичного випромінювання у видимій (360-760 нм), УФ- (180-360 нм) і ІЧ-області (760-1100 нм) спектру. Оптична густина розчинів підлягає закону світлопоглинання:

- спектральна область – 180-760 нм. Прилад – УФ-спектрофотометр. Точність вимірювань $\pm 2\%$;

- спектральна область – 7-1100 нм. Прилад – ІЧ-спектрофотометр. Точність вимірювань $\pm 2\%$.

2.2.2. Застосування ІЧ- і УФ-спектроскопії у аналітичному аналізі

1. ІЧ-спектроскопія:

1) якісний аналіз. Метод застосовується для ідентифікації речовин:

- за характерними максимумами в області «відбитків пальців» при відповідних характеристичних частотах ($600-1500\text{ см}^{-1}$);

- шляхом порівняння спектру речовини, що аналізується, із спектром речовини-стандарту.

Для визначення структури органічних і неорганічних сполук за характерним поглинанням (максимуму у спектрі) для кожної групи атомів;

2) кількісний аналіз. Визначення основанийі на використанні закону Бугера-Ламберта-Бера, проте це незручно, так як величина l дуже мала (вимірювання проводять в вузькій кюветі).

1) метод градуйованого графіку;

2) метод базової лінії.

2. УФ-спектроскопія:

1) якісний аналіз. Метод використовується для:

- встановлення структури органічних сполук (за характерним для окремих груп хімічних зв'язків довжин хвиль максимумів або мінімумів поглинання, за інтенсивністю поглинання);

- вивчення міжмолекулярної взаємодії, утворення комплексів з переносом зарядів (π -комплексів);

- для ідентифікації речовин за величиною ϵ у точці максимуму для розчинів з відомою концентрацією і за величиною на півширини хвилі полоси поглинання;

- для характеристики енергетичних рівнів електронів в органічних сполуках;

2) кількісний аналіз. В основі визначення лежить закон Бугера-Ламберта-Бера. Визначення концентрації речовин проводять одним із методів (колориметрія, фотоелектроколориметрія).

Аналіз можливий і для суміші поглинаючих речовин.

2.2.3. Колориметрія

Цей метод використовують для приблизної оцінки забарвлених розчинів. Якщо речовина не має забарвлення, проводять фотометричну реакцію, яка супроводжується утворенням забарвленої сполуки. Не потребує дотримання закону Бугера-Ламберта-Бера.

Кількісні визначення проводять:

1. Методом зрівнювання забарвлення: вимірюючи товщину шару дослідного і стандартного розчину, добиваються рівної інтенсивності їх забарвлення. Розрахунок концентрації дослідного розчину (C_x) проводять за формулою:

$$C_x = \frac{C_{cm} \cdot l_{cm}}{l_x} \quad (2.1)$$

де: C_{cm} – концентрація стандартного розчину;

l_{cm}, l_x – товщина шару стандартного і дослідного розчинів відповідно.

2. Методом стандартних серій: готують серію стандартних розчинів з точно відомою концентрацією аналізованого розчину і зрівнюють інтенсивність забарвлення з інтенсивністю забарвлення аналізованого розчину. Концентрація аналізованого розчину рівна концентрації стандартного розчину з рівною інтенсивністю забарвлення.

3. Колориметричне титрування: в рівних умовах додають фотометричний реагент до дослідного розчину і до води. Потім з бюретки до води додають стандартний розчин дослідної речовини. Одночасно до аналізованого розчину вводять воду, щоб об'єми рідин весь час були однаковими і домагаються зрівняння забарвлення двох розчинів.

2.2.4. Фотоелектроколориметрія

Метод придатний для визначення концентрації забарвлених розчинів шляхом вимірювання оптичної густини (A) або пропускання (T) розчину.

Дотримання закону Бугера-Ламберта-Бера обов'язково.

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (2.2)$$

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon Cl} \quad (2.3)$$

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (2.4)$$

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.5)$$

$$A = \lg \frac{1}{T} \quad (2.6)$$

$$\varepsilon^\lambda = \frac{A^\lambda}{C \cdot l} \quad (2.7)$$

$$E_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{A^\lambda}{C \cdot l} \quad (2.8)$$

ε – молярний коефіцієнт світлопоглинання, рівний оптичній густині (A), розчину з концентрацією $C = 1$ моль/л і товщиною шару $l = 1$ см;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ - питомий коефіцієнт світлопоглинання, рівний оптичній густині A розчину з концентрацією $C = 1\%$ і товщиною шару $l = 1$ см.

$$\varepsilon = E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \frac{M}{10}, \text{ де } M \text{ – молекулярна маса речовини.}$$

Визначення концентрації проводять:

- 1) методом градуйованого графіку;
- 2) за середнім значенням коефіцієнт (ε);
- 3) методом добавок;
- 4) методом диференційної фотометрії;
- 5) екстракційно-фотометричним методом.

2.2.5. Емісійні методи аналізу

Сутність методу: емісійний спектральний аналіз являє собою метод визначення якісної і кількісної сполуки речовини за спектрами випромінювання атомів і молекул.

1. Емісійний спектральний аналіз. Методи основані на вимірюванні довжини хвилі випромінювання і його потужності збуджених у

високотемпературних джерелах світла (електрична дуга, електрична іскра) атомів аналізуємих речовин.

2. Полум'яна фотометрія. В основі методу лежить використання спектрального випромінювання збуджених у газовому полум'ї атомів елементів, що визначаються. Застосовується для аналізу лужних і лужно-земельних елементів талію.

3. Флуориметрія. Метод оснований на вимірюванні інтенсивності флуоресценції аналізуємих речовин. Люмінесценцією (холодне світіння) називають світіння, яке виникає під дією на деякі речовини електромагнітного випромінювання і одразу припиняється після видалення джерела випромінювання. Люмінесценція виникає в результаті електронного переходу при поверненні часток із збудженого стану у нормальне, тобто молекула речовини перетворює поглинуту енергію у власне випромінювання. У збудженому стані частки речовини можуть переходити під дією:

- світла – флуоресценція;
- рентгенівського випромінювання – рентгенолюмінесценція;
- хімічної реакції – хемілюмінесценція.

2.2.6. Емісійний спектральний аналіз

1. Якісний аналіз. Основою методу є властивість збудженого хімічного атому аналізуємого елемента випромінювати лінійний спектр.

Задача якісного аналізу – відшукати лінії елемента, що визначається, в спектрі проби.

Належність аналітичної лінії даному елементу встановлюється за довжиною хвилі та інтенсивності лінії.

Границя виявлення 10^{-2} - $10^{-5}\%$.

2. Кількісний аналіз. В основі методу – зв'язок між інтенсивністю спектральної лінії та концентрацією елемента.

Звичайно використовують інтенсивність не окремої лінії, а відношення двох спектральних ліній, що належать різним елементам. У якості властивості, зв'язаної з концентрацією елемента, використовують

відношення інтенсивності аналітичної лінії визначає мого компоненту до інтенсивності аналітичної лінії другого компоненту (внутрішнього стандарту) в цьому ж спектрі (лінія порівняння).

В залежності від способу оцінки інтенсивності розрізняють наступні методи кількісного емісійного спектрального аналізу:

- візуальні;
- фотографічні;
- фотоелектричні.

Границя виявлення – до 0,1%, до 10^{-7} - 10^{-9} г.

2.2.7. Емісійна полум'яна фотометрія

1. Якісний аналіз. Основою методу є збудження в полум'ї спектру атомів визначаємих елементів.

Використовують полум'я газової суміші, що складається з газу-топлива і газу-окисника (наприклад: ацетилен + кисень).

Випромінювання визначає мого атому елементу виділяється за допомогою світлофільтра або монохроматору.

Світлофільтр вибирають так, щоб максимум його пропускання збігався з довжиною хвилі спектральної лінії атомів визначає мого елементу.

Аналіз проводять за спектрами атомів, що випромінюються в полум'ї

Визначають в основному лужні та лужноземельні елементи, талій.

2. Кількісний аналіз. Визначення елемента основано на функціональній залежності інтенсивності спектральної лінії (I) від концентрації елемента в розчині (C). Основне рівняння: $\lg I = \lg a + b \cdot \lg C$,

де: a – коефіцієнт пропорційності (залежить від температури джерела збудження, його стабільності); b – коефіцієнт самопоглинання, який враховує поглинання квантів світла не збудженими атомами.

Кількісні визначення проводять:

- методом градуйованого графіку (лінійна залежність $\lg I = f(\lg C)$);
- методом добавок.

- Середня границя виявлення 10^{-3} - $10^{-4}\%$.

2.2.8. Флуориметрія

1. Якісний аналіз. Аналіз оснований на здатності аналізованої речовини у відповідних умовах люмінесцювати. Ідентифікацію органічних сполук проводять за спектральними характеристиками флуоресценції або за кольором флуоресцентного випромінювання.

Для неорганічних іонів використовують реакцію утворення комплексних сполук з органічними реагентами, яка призводить до появи люмінесценції. Наприклад: натрій-цинк-уранілацетат люмінесцює зеленувато-жовтим кольором. При аналізі суміші речовин, що люмінесцюють, застосовують світлофільтри для виділення люмінесценції визначеної довжини хвилі.

2. Кількісний аналіз. Аналіз оснований на залежності інтенсивності флуоресценції розчинів від концентрації речовин, що флуоресцюють.

Інтенсивність флуоресценції для розбавлених розчинів в області концентрації 10^{-7} - 10^{-4} моль/дм³ визначають за формулою:

$$F = I_0 \cdot 2,3 \cdot \varepsilon \cdot C \cdot b \cdot \varphi, \quad (2.9)$$

де: F – інтенсивність флуоресценції, квант·с⁻¹;

I_0 – інтенсивність збудженого світла, квант·с⁻¹;

C – концентрація розчину, моль·л⁻¹;

ε – молярний коефіцієнт поглинання;

b – товщина шару, що флуоресцює;

φ – квантовий вихід флуоресценції, що залежить від природи речовини.

Границя виявлення 10^{-7} моль/дм³. Екстракційно-люмінесцентний кількісний аналіз використовують у аналізі речовин, які містять домішки, які заважають визначенню. Дослідна речовина екстрагує органічним розчином і визначають описаним вище засобом [4,7].

2.3. Техніка та практичні аспекти люмінесцентних вимірювань

2.3.1. Загальні схеми люмінесцентних спектрофлуориметрів

При проведенні люмінесцентних досліджень необхідно вимірювати різні спектрально-люмінесцентні характеристики аналізуючих зразків. Ці характеристики визначають за допомогою різних флуориметрів і спектрофлуориметрів.

Флуориметри призначені для вимірювання інтегральної яскравості світіння зразків і використовуються в основному при флуоресцентному аналізі. За допомогою цих приладів проводиться порівняння яскравості світіння досліджуваного і еталонного зразків.

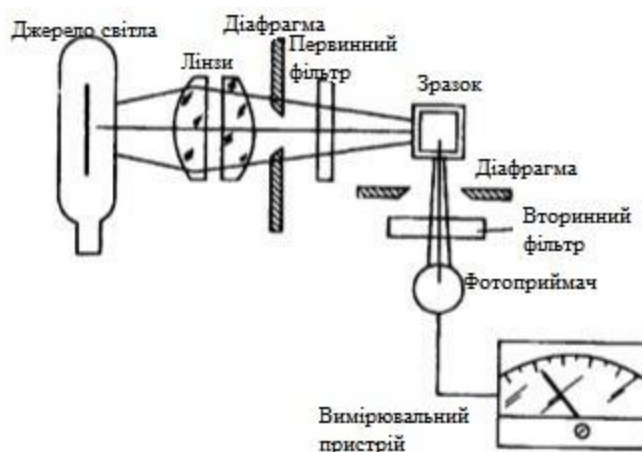


Рис. 2.1. Спрощена схема флуориметра

Принципова схема флуориметра показана на Рис. 2.1. У неї входять джерело світла, спектральні світлофільтри, кювети для досліджуваного речовини і реєструє система. В установці для вивчення флуоресценції приймач розташовується поза пучка падаючого світла (зазвичай під кутом 90°), для зменшення його фону.

При люмінесцентних вимірах найбільш часто використовуються наступні газорозрядні джерела випромінювання: водневі, дійте-ріїв і ртутні лампи високого тиску, а також лампи надвисокого тиску (аргонові, криптонові, ксенонові і ртутні).

Первинний світлофільтр служить для виділення довжин хвиль, відповідних спектру поглинання досліджуваних речовин. Вторинний спектральний фільтр розташовують перед приймачем, щоб виключити будь-

яке випромінювання, яке випускається не досліджуваною речовиною, - так званий метод схрещених фільтрів.

В якості первинних і вторинних світлофільтрів використовуються скляні світлофільтри з кольорового скла. В якості вторинних світлофільтрів можуть застосовуватися клеєні скляні і інтерференційні світлофільтри.

При люмінесцентних вимірах розчинів найчастіше використовуються прямокутні (10x10 мм) кювети. Для підвищення чутливості люмінесцентного аналізу застосовуються багатоходові кювети, в яких збудливий світло не втрачається після проходження через розчин, а направляється на нього знову за допомогою системи відображуючи поверхонь або дзеркал. Конструкція однієї з таких кювет представлена на Рис. 2.2. вона складається з кварцової осередку і двох кварцових призм, приклеєних до передньої і задньої стінок комірки.

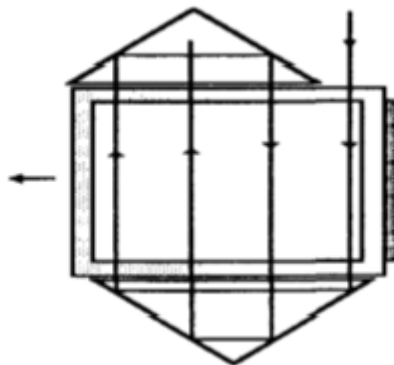


Рис. 2.2. Конструкція кювети повного пристрою для внутрішнього відображення для проведення люмінесцентних вимірювань.

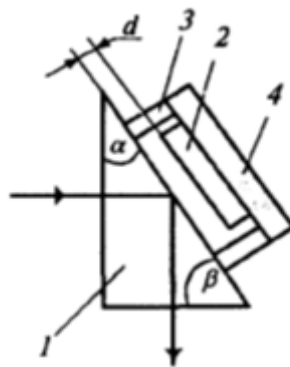


Рис. 2.3. Оптична схема пристрою для проведення люмінесцентних вимірювань в широкій області концентрацій.

Для усунення впливу реабсорбції випромінювання на спектри люмінесценції та збудження розчинів необхідно, щоб оптична щільність зразків D була $= 0,02$. Тому на промислових приладах зі стандартним блоком кювет істинні спектри збудження і флуоресценції досліджуваних розчинів вдається отримати лише для концентрацій люмінесцируючого речовини $C = 10^{-6} - 10^{-7}$ моль/л. Для великих концентрацій, через сильну реабсорбції необхідна додаткова корекція спектра. Разом з тим на практиці часто потрібне проведення вимірювань широкого діапазону концентрацій люмінесцируючого речовини. Для цього необхідно мати набір кювет, дозволяє за умови $Cd = const$ (1 - товщина шару розчину). Тому для таких вимірів використовують різні приставки, конструкція однією з них представлена на Рис. 2.3.

Хвилюючий світло через кварцеву прямокутну призму 1 потрапляє на кювету, яка складається з двох круглих кварцових пластин 2 і 4 різного ДКГ * Етра і кварцового кільця 3. Кути призми обрані такими, щоб відбите світло збудження не потрапляв в реєструє частина приладу. Всі кварцові деталі з'єднані на оптичному контакті. Проміжок < 1 (товщина шару розчину), представляє собою різницю товщини кільця 3 і пластини 2, підганяється до потрібного розміру. Шліфуванням кільця 3 можна отримати набір кювет, необхідних для концентраційних вимірювань. Світіння розчину потім з допомогою оптичних пристроїв направляється на реєструє частина приладу.

У зв'язку з тим що інтенсивність люмінесценції, особливо в окремих монохроматичних ділянках її спектра, мала, основними приймачами випромінювання при люмінесцентних вимірах є фотоелектронні помножувачі (ФЕП), що представляють собою електровакуумні прилади, робота яких заснована на використанні явища вторинної електронної емісії.

При проведенні люмінесцентних вимірювань найчастіше необхідно не тільки визначити інтегральну яскравість світіння досліджуваного зразка, а й встановити відносний розподіл енергії в його спектрах люмінесценції і збудження. Такі вимірювання виконуються за допомогою

спектрофлуориметр. На Рис. 2.4 приведена схема типового спектрофлуориметра [12].



Рис. 2.4. Схема типового спектрофлуориметра

Прилад оснащений джерелом світла і двома монохроматорами, сканування яких здійснюється за допомогою блоку управління монохроматоров. Розкладання світлового потоку в спектр у більшості спектрофлуориметр здійснюється не призмиами, а дифракційними ґратами.

Інтенсивність флуоресценції реєструється за допомогою різних типів ФЕП. На шляху потоку збуджуючого світла поміщають систему поділу пучка (Рис. 2.4). Вона відображає малу ($\sim 4\%$) частину збуджуючого світла на еталонний зразок. вимірюється інтенсивність флуоресценції еталонного зразка пропорційна інтенсивності збуджуючого світла.

Одним з основних відмінностей між флуоресценцією і фосфоресценції є значно більша тривалість останньої. Для того щоб відокремити фосфоресценцію від флуоресценції, зазвичай використовують різницю в часі між поглинанням і випромінюванням, яка в разі фосфоресценції значно більше ($\approx 10^{-3} - 10^{-1}$ с), ніж у флуоресценції ($\approx 10^{-8} - 10^{-9}$ с). Таке тимчасове поділ цих процесів досягається за допомогою механічних приладів, які отримали назву фосфороскоп [8].

2.3.2. Корекція спектрів збудження і люмінесценції

Спектри люмінесценції і збудження, отримані за допомогою більшості флуориметра, є наближеними. Для встановлення справжніх спектрів досліджуваних речовин необхідно провести корекцію безпосередньо отриманих спектрів на приладі. Розглянемо деякі методи корекції спектрів збудження і люмінесценції. Спектр збудження визначається наступним чином: реєструючий монохроматор Спектрофлуориметр встановлюють на довжину хвилі, відповідну максимуму спектра флуоресценції. Потім диспергируючий елемент монохроматора сканують в певному інтервалі довжин хвиль і записують зміна інтенсивності флуоресценції, яке буде представляти її спектр збудження. На практиці спектр збудження речовини не відповідає спектру поглинання. Як приклад на Рис. 2.5 представлений спектр збудження люмінесценції розчину сірчаноокислого хініну в 0,05 М H_2SO_4 . З нього видно, що спектр збудження цього розчину (крива 1) не має максимуму на довжині хвилі 350 нм, на відміну від його спектра поглинання (крива 2).

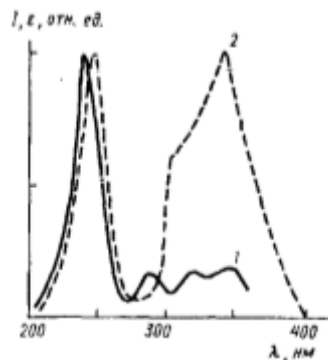


Рис. 2.5. Спектр збудження (1) і поглинання (2) розчину хініну в 0,5 М H_2SO_4

Таке розходження пояснюється наступними причинами:

- 1) залежністю інтенсивності світла, випромінюваного збудливим джерелом, від довжини хвилі;
- 2) нерівномірністю відображення дифракційних решіток монохроматорів. Наприклад, звичайна дифракційна решітка на довжині хвилі

200 нм відображає тільки 50% падаючого світла, в той час як на довжині хвилі 400 нм - 80%.

Для коригування реєстрованого спектра збудження необхідно визначити залежність інтенсивності збуджуючого світла (після монохроматора) від довжини хвилі. Існує кілька методів встановлення цієї залежності.

1. Метод хімічної актинометрії, що полягає в наступному. Розчин-реагент, який поглинає світло, що цікавить нас довжини хвилі і утворює в Внаслідок деякий фотопродукт, поміщають в клітинку спектрофотометра і опромінюють протягом деякого часу t . Кількість молекул продукту n , утворюється за час t , визначають аналітично. квантовий вихід утворення продукту відомий і дорівнює Φ_{II} . У цьому випадку інтенсивність світлового пучка, падаючого на передню стінку комірки, може бути визначена з виразу

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (2.10)$$

де A - концентрація реагенту, ε – його коефіцієнт екстинкції, l - товщина шару речовини. хімічні актинометри використовуються в основному для визначення абсолютної інтенсивності світла в УФ-області спектра. Цей метод вимірювання інтенсивності світла досить трудомісткий і вимагає великого часу. Тому він не отримав широкого застосування.

2. Вимірювання інтенсивності світла за допомогою термоелементів. цей метод дозволяє визначити інтенсивність світла в широкому діапазоні довжин хвиль (УФ, видима область). Він простий і ефективний, але вимагає спільного використання термопари і вимірювача термо-ЕРС (в найпростішому випадку - гальванометра). Систему термоелемент - вимірювач можна прокалібрувати за допомогою стандартних джерел випромінювання.

3. Вимірювання інтенсивності світла за допомогою каліброваних фотоелементів або ФЕП.

4. Використання флуоресцентного джерела світлових квантів. цей метод набув широкого застосування (досить сказати, що він

використовується в більшості промислових спектрофлуориметрів для корекції спектрів збудження люмінесценції) [6].

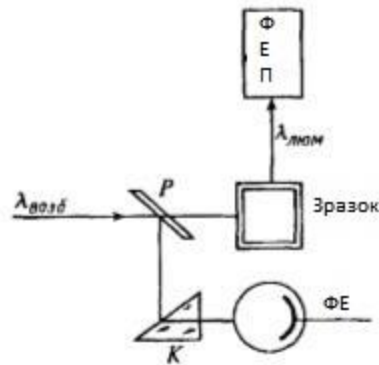


Рис. 2.6. Пристрій лічильника квантів

В основі роботи лічильника квантів лежить закон Вавилова про незалежність квантового виходу люмінесценції від довжини хвилі збуджуючого світла. Лічильник квантів (Рис. 2.6) складається з трикутної кювети (К) з розчином барвника великій концентрації (найчастіше це розчин родаміну С в етиленгліколь) і фотоелемента (ФЕ). Концентрація барвника повинна бути великою, для того щоб весь падаюче світло у всьому діапазоні довжин хвиль поглинався в тонкому шарі. При такій концентрації барвника розчин грає роль поглинає фільтра для збудливого світла і ФЕ реєструє одну і ту ж смугу флуоресценції незалежно від глибини проникнення в нього збудливого світла. вперше лічильники квантів були застосовані в спектрофлуориметрі, призначених для реєстрації виправлених спектрів збудження. В такому спектрофлуориметрі з монохроматора частина збуджуючого світла направляється на зразок, а інша, відбиваючись від дільника пучка (Р), що представляє собою кварцову пластинку, направляється на лічильник квантів (кювета К з розчином барвника). При цьому сигнал з ФЕ пропорційний потоку квантів світла, падаючому на кювету К. Люмінесценція зразка реєструється ФЕП. За допомогою електронної схеми проводиться нормування робочого сигналу ФЕП на величину сигналу I_2 з ФЕ - визначається їхнє ставлення I_1/I_2 , яке і буде

представляти спектр збудження досліджуваної речовини. Дійсно, сигнал з ФЕП (інтенсивність люмінесценції зразка) пропорційний інтенсивності падаючого світла I_0/λ , квантовому виходу люмінесценції досліджуваного зразка $B_{кв}$ і його коефіцієнту екстинкції ε :

$$I_1(\lambda) \approx I_0(\lambda) B_{кв} \varepsilon(\lambda) \quad (2.11)$$

Величина сигналу від лічильника квантів пропорційна інтенсивності падаючого світла:

$$I_2(\lambda) \approx I_0(\lambda) \quad (2.12)$$

Самописець реєструє їх ставлення

$$I_1(\lambda)/I_2(\lambda) \approx \varepsilon(\lambda) B_{кв}. \quad (2.13)$$

При цьому сигнал є виправленим з урахуванням зміни інтенсивності збуджуючого світла спектром збудження люмінесценції. подібно спектру збудження, спектр флуоресценції також повинен бути скоректований для отримання істинного спектра. На спектр флуоресценції впливає як дисперсія, так і спектральна чутливість фотоприймача. Ці два параметра залежать від довжини хвилі і тому вимагають коректування. Нехай кількість квантів люмінесценції всіх частот, що випускається в одиницю часу, дорівнює $N_{кв}$, тоді інтенсивність люмінесценції на частоті ν дорівнює $dN_{кв}/d\nu$. Залежність I від ν і буде визначати істинний спектр люмінесценції. Електричний сигнал з ФЕП (відхилення пера самописця) при реєстрації інтенсивності люмінесценції $I_{люм}^\nu$ на частоті ν дорівнює

$$A_\nu = I_{люм}^\nu (P(\nu) \Delta\nu L(\nu)) = I_{люм}^\nu K(\nu) \quad (2.14)$$

де $P(\nu)$ - відносна квантова ефективність ФЕП, $\Delta\nu$ - відносна ширина спектра, $L(\nu)$ - частка світла, що проходить через реєструючий монохроматор. Істинний спектр люмінесценції можна визначити, розділивши ординати експериментальної кривої на величину $K(\nu)$, яка є спектральною чутливістю реєструючої системи (коефіцієнтом корекції).

2.4. Вибір умов проведення люмінесцентних вимірювань

Видима інтенсивність люмінесценції і її спектральний розподіл можуть залежати від оптичної щільності зразка, від вибору довжин хвиль збуджуючого світла, а також від умов освітлення зразка. При виборі найбільш зручною довжини хвилі збудження досліджуваних молекул необхідно користуватися такими правилами. По-перше, довжина хвилі збудження повинна бути найбільш близькою до довжини хвилі самої інтенсивної лінії джерела збудження і одночасно бути близькою до довжини хвилі максимуму спектра поглинання. По-друге, довжина хвилі збуджуючого світла і область флуоресценції повинні бути спектрально розділені (~ 30-50 нм). Це пов'язане з тим, що в приймач, разом з досліджуваним випромінюванням (Люмінесценцією) частково потрапляє і розсіяне світло (тут мається на увазі розсіювання на стінках кювети, релеевське і комбінаційний розсіювання розчинника). Розсіяне світло може істотно спотворювати результати вимірювань, причому ці похибки будуть зростати для речовин з малим квантовим виходом люмінесценції і для реєструючих систем з високою чутливістю. В останньому випадку можуть виявлятися всі типи розсіювання, але релеевське розсіювання світла істотно інтенсивніше комбінаційного. Так, при порушенні водних розчинів складних органічних речовин світлом довжиною хвилі 365 нм (лінія спектра ртутної лампи) пік релеевського розсіювання світла буде припадати на довжини хвиль 365 нм (перший порядок) і 730 нм (другий порядок дифракційної решітки). При цьому одночасно буде спостерігатися пік комбінаційного розсіювання світла на довжині хвилі 416 нм. У разі, коли довжини хвиль збудження і люмінесценції близькі один до одного, спотворення через розсіювання світла не дозволять точно визначити люмінесцентні характеристики.

Третім правилом при виборі довжини хвилі збудження є наступне. Якщо досліджувана речовина має два або більше максимумів в спектрі збудження, то в загальному випадку для збудження вибирається довгохвильовий максимум. Це дозволяє звести до мінімуму фоторозложення

досліджуваного речовини. При цьому ефективність фотохімічного процесу зменшується зі збільшенням довжини хвилі збудження. Фотохімічні розкладання речовини призводить до різкого зниження інтенсивності його люмінесценції, що ускладнює вимір її параметрів.

Зазвичай спектр флуоресценції речовини повинен бути близький до дзеркального відображенню його спектра поглинання. Відсутність якісної дзеркальної симетрії між цими двома спектрами вже може означати, що відбулися зміни в концентрації молекул (або їх оточення), викликані збудженням. Зменшення числа максимумів в спектрі флуоресценції по порівнянню зі спектром збудження пояснюється тим, що флуоресценція частіше всього відбувається з першого збудженого рівня, в той час як поглинання здійснюється на першій, другий і т.д. рівні. Якщо інтенсивність максимуму в спектрі збудження більше, ніж інтенсивність максимуму спектра люмінесценції при збудженні світлом довжини хвилі, відповідної максимуму збудження, то це може вказувати на фоторозкладення, що протікає в досліджуваній речовині [11].

Інтенсивність люмінесценції і її спектральний розподіл залежать як від досліджуваного зразка, так і від вибору його геометричного розташування. Для розчинів виконується лінійна залежність між інтенсивністю їх люмінесценції і концентрацією люмінесцируючого речовини C :

$$I_{\text{л}} = k B_{\text{кв}} I_0 \alpha C d \quad (2.15)$$

де k - коефіцієнт пропорційності, $B_{\text{кв}}$ - квантовий вихід люмінесценції, I_0 - інтенсивність збуджуючого світла, d - товщина шару розчину, α - молярний коефіцієнт поглинання речовини.

На Рис. 2.7 (крива I) представлена теоретична залежність $I_{\text{л}}(C)$. Однак експериментально це лінійне співвідношення зберігається тільки до певної концентрації, а потім інтенсивність починає падати. Це пов'язане з так званим "ефектом внутрішнього фільтра". Слід відзначити, що між термінами "гасіння" і "ефект внутрішнього фільтру" існує відмінність. Під гасінням

маються на увазі всі процеси, які призводять до зменшення квантового виходу флуоресценції, - це внутрішня конверсія, перенесення енергії електронного збудження і т.д. "Ефект внутрішнього фільтра" представляє собою зменшення інтенсивності люмінесценції, пов'язане з методичними помилками при її вимірі.

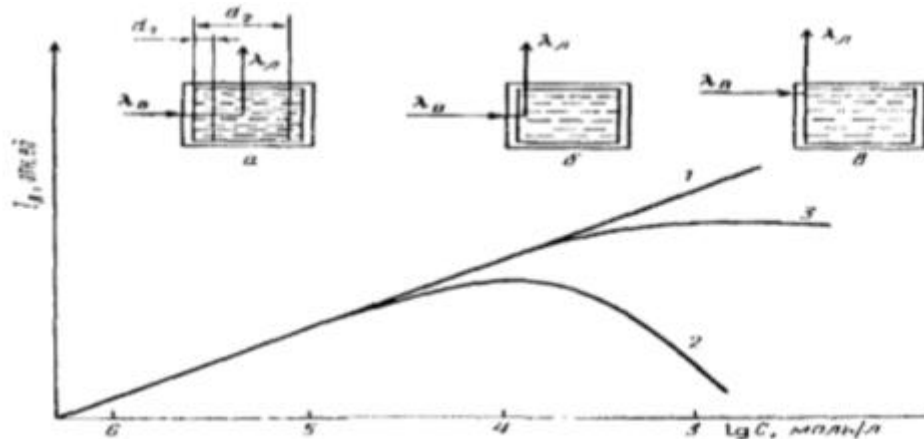


Рис. 2.7. Типова залежність інтенсивності флуоресценції розчину барвника від концентрації: а) центрально розташована кювета; б, в) нецентрально розташована кювета.

2.5. Дослідження факторів та ефектів, які визначають похибку вимірювання люмінесценції

Існують два види "ефекту внутрішнього фільтра ": а) додаткове поглинання збуджуючого світла; б) вторинне поглинання випромінюваної люмінесценції (реабсорбція).

"Ефект внутрішнього фільтра" залежить від геометричного розташування зразка по відношенню до збудливого світла, а також від вибору напрямку спостереження флуоресценції. Найбільшого поширення набула реєстрація флуоресценції під прямим кутом до середини центрально освітленої кювети (Рис. 2.7, а). При такому розташуванні зразка зменшується фонова засвітка ФЕП, пов'язана з розсіюванням світла і флуоресценції кювети. Однак за рахунок поглинання збуджуючого світла при проходженні ним кювети з розчином його інтенсивність зменшується, а отже, зменшується інтенсивність порушуємої люмінесценції, тобто при такому розташуванні

кювети дослідження люмінесцентних характеристик можливо тільки для розбавлених розчинів, з ростом же концентрації залежність $I_{\lambda}(C)$ стає нелінійною (Рис. 2.7, крива 2). При цьому для сильно поглинаючих розчинів флуоресценція концентрується близько передньої стінки кювети і повністю не реєструється приладом. Цей ефект може бути зменшений, якщо реєструвати флуоресценцію всього обсягу розчину в шарі між d_1 і d_2 (Рис. 2.7, а). При цьому справжня інтенсивність може бути визначена і спостерігається за допомогою виразу

$$I_{\text{випр.}} = I_{\text{снос.}} (2,303D(d_2 - d_1) / (10^{-Dd_1} - 10^{-Dd_2})), \quad (2.16)$$

де D - оптична щільність розчину. Однак при значенні відношення $I_{\text{випр.}} / I_{\text{снос.}} > 3$ така корекція стане неправильною. Вплив поглинання світла як при порушенні, так і при випромінюванні можна зменшити шляхом модифікації власника кювети. Так, при центральному освітленні кювети люмінесценцію слід реєструвати біля стінки кювети (Рис. 2.7, б). Можливе використання кута комірки для збудження і реєстрації люмінесценції (Рис. 2.7, в). При такому освітленні лінійність в залежності $I_{\lambda}(C)$ вже може бути отримана аж до концентрації розчину 10^{-4} моль/л (Рис. 2.7, крива 3).

Другий вид "ефекту внутрішнього фільтра" пов'язаний з вторинним поглинанням (реабсорбцією) світла флуоресценції, а також з виникненням вторинних світінь. Ці явища викликані тим, що у більшості речовин спектри поглинання і люмінесценції перекриваються між собою. У цих випадках довгохвильова частина спектра поглинання накладається на короткохвильову частину спектра люмінесценції. Тому світіння короткохвильової частини спектра люмінесценції виходить з товщі досліджуваної речовини в значній мірі ослабленим. Довгохвильова ж частина спектра люмінесценції не змінюється. В результаті спостерігаючий на досліді спектр люмінесценції виявляється істотно спотвореним за рахунок змін, що відбуваються через вторинне поглинання в його короткохвильовій частині.

Для отримання істинної форми спектра люмінесценції досліджуваної речовини експеримент намагаються проводити в таких умовах, коли вплив вторинного поглинання люмінесценції зведено до мінімуму. Оптимальними умовами будуть ті, при яких цей ефект настільки малий, що його можна не враховувати.

Розрахунки сильно спрощуються, коли для порушення світіння використовується монохроматичне випромінювання (виділяється одна монохроматична лінія зі збудливого спектра). В цих умовах при повному поглинанні збуджуючого світла справжня інтенсивність люмінесценції $I_{випр.}$ на деякій частоті ν пов'язана з спостерігаючою інтенсивністю люмінесценції $I_{спос.}$ на цій же частоті співвідношенням

$$I_{випр.}^{\nu} = I_{спос.}^{\nu} (\alpha_{збуд.} + \alpha_{люм.} \cos\varphi) / \alpha_{збуд.}, \quad (2.17)$$

де $\alpha_{люм.}$ і $\alpha_{збуд.}$ - показники поглинання люмінесценції і збудливого світла в досліджуваному зразку, φ - кут заломлення в ньому збудливого світла.

Насправді вторинне поглинання світла люмінесценції - набагато більш складний процес, ніж це було описано вище. Справа в тому, що цілком зайняте речовиною світло люмінесценції може знову порушувати його молекули, приводячи до виникнення вторинної люмінесценції. Вторинне світіння також може бути поглинене речовиною перш, ніж воно вийде з досліджуваного зразка, що може знову привести до виникнення люмінесценції і т. д. Спектри люмінесценції вторинних і наступних світінь також можуть бути перевернуті вторинним поглинанням. На досвіді спостерігається сумарний спектр люмінесценції всіх виниклих в розчині світінь. Формула (2.17) не враховує цих ефектів. Тому обчислення з її допомогою значень $I_{випр.}^{\nu}$ є не цілком точним.

Облік перерахованих ефектів вимагає проведення додаткових розрахунків. Спектр люмінесценції з введеними поправками на вторинне поглинання за формулою (2.17) виявляється зміщеним в сторону довгих

хвиль в порівнянні з істинним спектром, для якого враховано виникнення вторинного і наступних світінь.

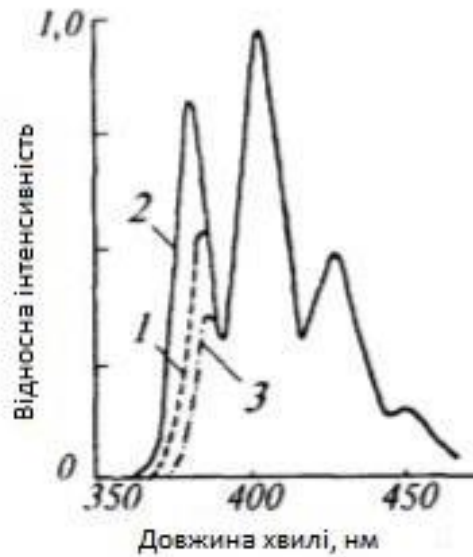


Рис. 2.8. Вплив самопоглинання на спектри випускні етанольних розчинів люмінесценції розчину барвника антранена при концентраціях: 1 – 10^{-5} , 2 – 10^{-4} , 3 – 4×10^{-4} М.

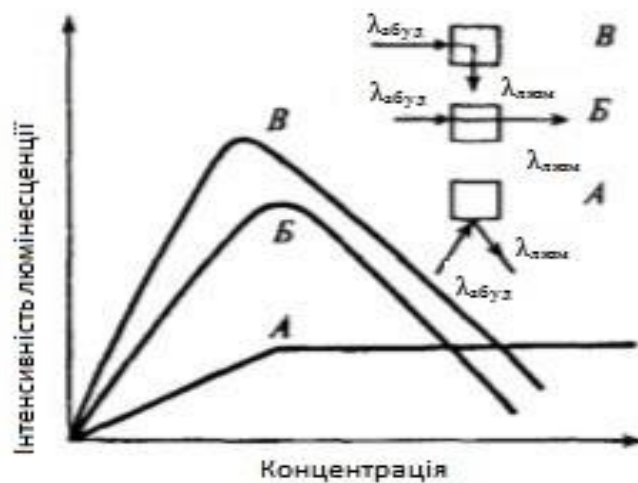


Рис. 2.9. Залежність інтенсивності люмінесценції розчину барвника від концентрації: А - при фронтальному освітленні; Б - при освітленні зразка в лінію; В - під прямим кутом.

Вплив процесів перепоглинання світла ілюструє Рис. 2.8, де представлені спектри люмінесценції антрацену при різних концентраціях. Видно, що в результаті перепоглинання світіння спостерігається істотне

спотворення спектрів флуоресценції. "Ефекти внутрішнього фільтра" можна усунути, якщо використовувати фронтальне порушення (збудження і спостереження люмінесценції здійснювати в протилежних напрямках, Рис. 2.9, А). При такій геометрії порушення світіння можна вимірювати спектри люмінесценції сильно поглинаючих речовин. Зі збільшенням концентрації інтенсивність люмінесценції зростає до деякого рівня, а потім залишається постійною (Рис. 2.9, А). Це пояснюється тим, що в концентрованих розчинах практично може спостерігатися лише флуоресценція поверхневого шару. При повному поглинанні збудливого світла на всіх довжинах хвиль інтенсивність флуоресценції не змінюється (спектр збудження являє при цьому пряму лінію). Фронтальне освітлення зазвичай використовується при дослідженні твердих і полікристалічних зразків. На практиці застосовується також метод освітлення зразка в лінію (на просвіт - Рис. 2.9, Б). При цьому неспотворені спектри флуоресценції отримують тільки для концентрованих розчинів. Однак, для розчинів з дуже малою концентрацією при освітленні зразка в лінію його слабка люмінесценція може бути замаскована накладенням фону від збудливого джерела. При великих концентраціях спотворення в спектрі збудження мають такий же вигляд, як і при фронтальному освітленні - спостережуваний спектр поглинання представляє собою пряму лінію. Спотворення ж спектра флуоресценції більше, ніж при фронтальному освітленні або освітленні під прямим кутом. Це пов'язано з тим, що при висвітленні в лінію все світло флуоресценції повинне пройти через весь шар рідини до того, як потрапити в реєструючий прилад. Залежність інтенсивності люмінесценції при освітленні в лінію (Рис. 2.9, В) схожа на залежність $I_{\lambda}(C)$ при освітленні під прямим кутом (Рис. 2.9, В).

РОЗДІЛ 3

АПРОБАЦІЯ МАКЕТУ ВИМІРЮВАЛЬНОЇ УСТАНОВКИ ТА РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИМІРЮВАНЬ

3.1. Застосування методики флуорисцентного аналізу

Кожна люмінесціююча речовина має свій індивідуальний спектр люмінесценції, що використовується при дослідженні структури речовини за допомогою люмінесцентного аналізу. За спектром люмінесценції можна визначити як вид, так і концентрацію люмінесціюючої речовини. Люмінесцентний аналіз чутливіший абсорбційного (за спектрами поглинання) спектрального аналізу більше ніж в 1000 разів. Так, він дозволяє визначити наявність люмінесціюючої речовини в суміші при мізерно малих концентраціях: до 10^{-12} г/л при квантовому виході всього близько одного відсотка [13].

Спектри люмінесценції дуже чутливі до хімічних властивостей оточення (полярності, рН, концентрації, в'язкості та ін.) люмінесціюючої молекули, що широко використовується в біохімічних дослідженнях. Люмінесценція дозволяє вивчати зміни конформації макромолекул, а при використанні люмінесцентного мікроскопа вивчати і локалізацію люмінесціюючих молекул всередині клітини.

Спектр люмінесценції характеризується довжиною хвилі або частотою ліній люмінесценції (або довжиною хвилі λ_{\max} або частотою ν_{\max}), що відповідає максимуму смуги люмінесценції, а також шириною цієї смуги $\Delta\lambda$ (або $\Delta\nu$). За спектром люмінесценції визначають вид люмінесціюючої речовини, а за інтенсивністю - його концентрацію і інші важливі характеристики.

1. Тривалість люмінесценції τ - як уже зазначалося, це час, за який інтенсивність люмінесценції зменшується в $e = 2,7$ раз; це час життя електронів у збудженому стані, в результаті оптичних переходів з якого в основний стан і виникає люмінесценція.

2. Квантовий вихід люмінесценції γ - це відношення числа квантів люмінесценції до кількості квантів, поглинених при порушенні молекули: $\gamma = n_{\text{люм.}} / n_{\text{погл.}}$. Квантовий вихід завжди менше одиниці ($\gamma < 1$) через наявність неоптичних переходів. Речовина вважається добре люмінесціуючою, якщо її квантовий вихід $\gamma > 0,01$, тобто якщо $\gamma > 1\%$.

3. Спектр збудження - це залежність інтенсивності фотолюмінесценції від довжини хвилі збуджуючого випромінювання (для багатьох молекул він збігається з їх спектром поглинання).

4. Ступінь поляризації люмінесценції - це ступінь поляризації випромінювання люмінесценції, коли її збудження проводиться лінійно поляризованим світлом, - дозволяє оцінити швидкість обертання люмінесціуючої молекули і мікрров'язкість її оточення [3].

Типова схема отримання та вимірювання спектрів фотолюмінесценції показана на Рис. 3.1. Фотозбудження здійснюється джерелом УФ або видимого випромінювання 1 (Рис. 3.1).

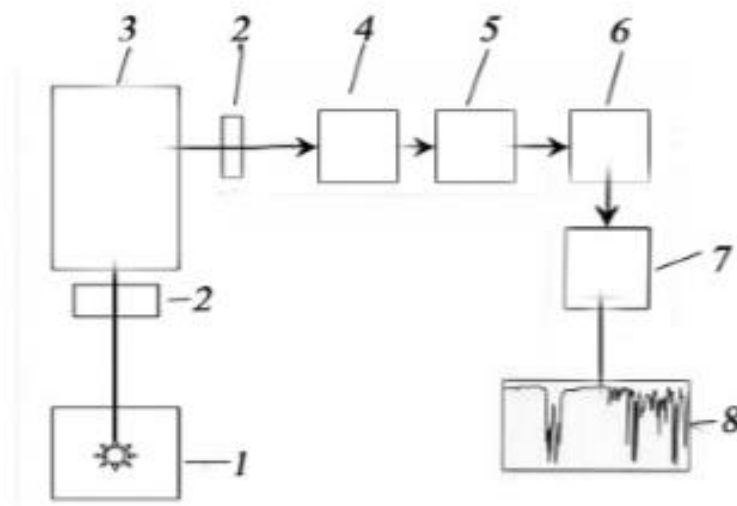


Рис. 3.1. Блок-схема установки для вимірювання спектрів фотолюмінесценції: освітлення зразка збоку; 1 - джерело випромінювання; 2 - світлофільтри і поляризатори; 3 - камера зразка; 4 - монохроматор; 5 - приймач; 6 - підсилювально-реєструючий пристрій; 7 - самописець; 8 - спектр.

В якості джерел можуть служити ртутна, ксенонова, воднева та інші лампи, широко застосовуються також лазери. Світіння зразка 3 фокусується на вхідну щілину монохроматора 4 і розкладене в спектр потрапляє через вихідну щілину на приймач 5, пов'язаний з реєструючим пристроєм 6. При широких смугах випускання, які характерні для спектрів флуоресценції розчинів, для збудження використовується випромінювання з частотою $\nu_{збуд.}$, що лежить в межах смуги поглинання зразка, але поза межами його смуги випускання.

Для усунення можливості попадання на приймач збуджуючого випромінювання застосовують метод схрещених фільтрів. Це означає, що після джерела 1 встановлюють світлофільтр 2 (або світлосильний монохроматор), що виділяє лінію $\nu_{збуд.}$ (у разі лазерного джерела потреба в них відпадає), а між зразком 5 і монохроматором 6 поміщають світлофільтр 2', який поглинає збуджуюче випромінювання ($\nu_{збуд.}$). У спектрофлуориметрах передбачається також можливість установки поляризаторів і система лінз забезпечує відповідне фокусування і освітлення.

В даний час існують прилади - спектрофлуориметри, які дозволяють реєструвати двовимірні спектри люмінесценції. Під двовимірними спектрами маються на увазі спектри люмінесценції, зареєстровані в широкому діапазоні довжин хвиль збудження. Можливість отримання двовимірних спектрів люмінесценції дозволяє проводити обробку отриманих даних, не поєднуючи її з процесом реєстрації. Розроблений для цих цілей метод "послідовних виключень", заснований на обробці двовимірного спектра люмінесценції суміші. Якщо спектри індивідуальних компонент відомі, то завдання визначення спектральних властивостей компонент суміші в загальному випадку може бути зведена до вирішення системи лінійних рівнянь. Методи, які вирішують це завдання, широко відомі і описані в літературі.

При аналізі суміші в деяких випадках можна визначити спектри люмінесценції та збудження люмінесценції, як для відомих, так і невідомих

компонент без застосування спеціальних обчислювальних методів. По-перше, це можливо в тому випадку, якщо в спектрах збудження люмінесценції кожної з компонент існує область, при порушенні в якій люмінесціює тільки ця компонента. До другого випадку відноситься ситуація, коли спектри люмінесценції компонент суміші спектрально рознесені. В даних випадках можна ідентифікувати компоненти суміші за їхніми спектрами поглинання, оскільки в більшості випадків спектр збудження люмінесценції речовини збігається з його спектром поглинання.

У разі ж, коли спектри збудження люмінесценції невідомих компонент суміші сильно перекриваються один з одним, завдання визначення індивідуальних властивостей невідомих компонент суміші в загальному випадку не має однозначного вирішення.

При реєстрації двовимірних спектрів люмінесценції досліджуваних сумішей перед монохроматором реєстрації встановлювався фільтр БС8 (пропускання на рівні 90% від 400 нм до 2700 нм) для того, щоб в монохроматор реєстрації не проходило розсіяне світло від другого порядку дифракції збуджуючого випромінювання.

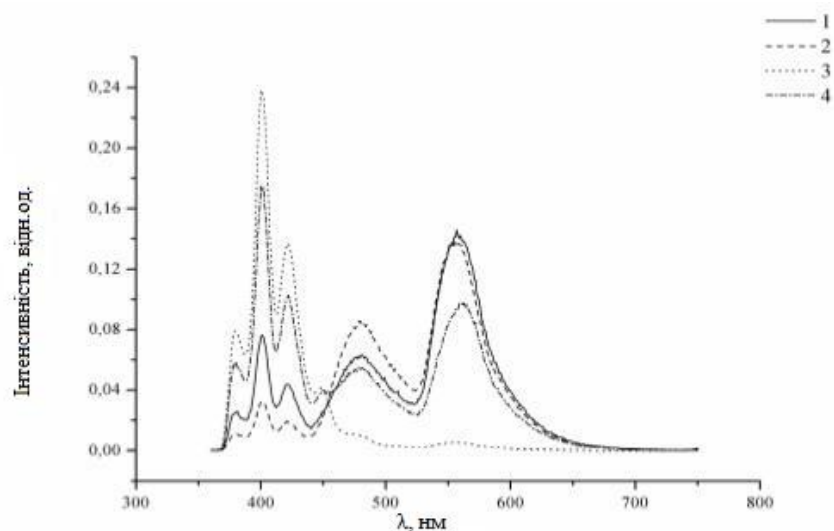


Рис. 3.4. Чотирьохкомпонентна суміш №1. Репрезентативні спектри люмінесценції. 1 - $\lambda_{зб\ddot{y}д.} = 250$ нм; 2 - $\lambda_{зб\ddot{y}д.} = 280$ нм; 3 - $\lambda_{зб\ddot{y}д.} = 300$ нм.

На Рис. 3.4 наведено двовимірні спектри люмінесценції суміші №1, зареєстровані на аналізаторі «Панорама-02» при наступних умовах. Область збудження люмінесценції була обрана від 220 нм до 340 нм з кроком по довжинах хвиль, область реєстрації люмінесценції - від 360 нм до 750 нм з кроком 1 нм. По довжинах хвиль реєстрації люмінесценції проводилось усереднення по 5 відліках в кожній точці. Як видно з рисунку, в даному двовимірному спектрі замість смуг люмінесценції чотирьох компонент, в явному вигляді присутні тільки три смуги.

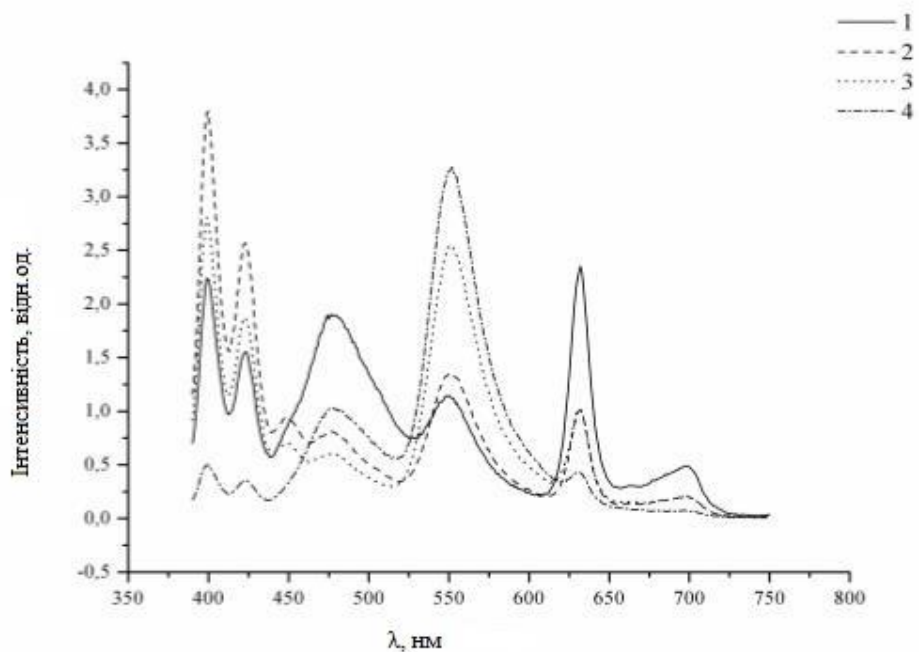


Рис. 3.5. Чотирьохкомпонентна суміш №2. Репрезентативні спектри люмінесценції. 1 - $\lambda_{збуд.} = 315$ нм; 2 - $\lambda_{збуд.} = 370$ нм; 3 - $\lambda_{збуд.} = 300$ нм.

Як видно з Рис. 3.5, в отриманих спектрах люмінесценції спостерігаються смуги всіх чотирьох компонент. З наведених даних випливає, що при виконанні умов неповного попарного перекривання спектрів люмінесценції компонент суміші за допомогою методу "послідовних виключень" при виконанні умов неповного попарного перекривання, можна визначати спектрально люмінесцентні характеристики компонент суміші по двовимірних спектрах люмінесценції.

3.3. Конструктивні особливості промислових зразків спекроенергетичних вимірювальних засобів здатних до виміру квантового виходу люмінесценції досліджуваних зразків

Кількісний аналіз для визначення кількості компонента, що утворює люмінесціюючі з'єднання в розчині, проводять за наступною схемою:

- розчиняють пробу і переводять компонент, що визначається, в люмінесціююче з'єднання;
- опромінюють розчин ультрафіолетовим випромінюванням;
- визначають інтенсивність люмінесценції аналізуючого і стандартних розчинів;
- будують градувальну характеристику і розраховують вміст компонента, що визначається.

Зазвичай досліджувану речовину висвітлюють ультрафіолетовими променями. Найбільшого поширення серед джерел освітлення, що викликають люмінесценцію, отримали газорозрядні лампи, найчастіше ртутно-кварцові і ксенонові. Приймачем люмінесцентного випромінювання в якісному аналізі можуть служити очі людини. У сучасних приладах для кількісного аналізу в якості приймача випромінювання використовують фотопомножувачі [2].

Схема приладу для проведення люмінесцентного аналізу представлена на Рис. 3.6. Випромінювання від джерела освітлення 1 проходить через світлофільтр 2 і падає на кювету 3 з досліджуваним розчином. Приймач світла 5 вимірює люмінесцентне випромінювання під прямим кутом до напрямку збуджуючого світла. Світлофільтр 4 пропускає світло люмінесценції і поглинає розсіяне світло від джерела збудження.

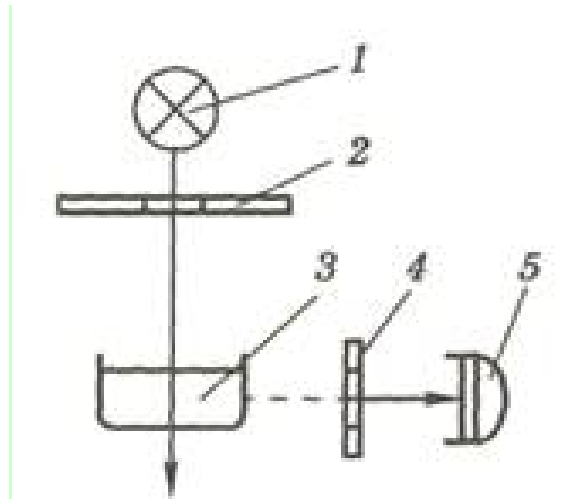


Рис. 3.6. Принципова схема приладу для вимірювання люмінесценції.

У якості прикладу можна навести наступні вимірювальні комплекси з можливістю реєстрації виходу люмінесценції і флуоресценції вітчизняного та зарубіжного виробництва, конструктивні рішення яких ми вирішили застосувати в розробці нашого проекту:

1. В даний час вітчизняною промисловістю випускається сімейство люмінесцентних аналізаторів типу «Флюорат», застосовуваних в самих різних областях науки і техніки. Їх найбільш універсальним представником є «Флюорат-02», представлений на Рис. 3.7.



Рис. 3.7. «Флюорат-02» - базовий прилад для групи аналітичних методів: флюориметрії, фотометрії, хемілюмінометрії [14].

За допомогою цього приладу нафтопродукти і феноли визначаються за власною люмінесценцією, поверхнево-активні речовини (ПАР) - по люмінесценції іонних пар з барвником, більшість катіонів та аніонів - по люмінесценції їх комплексів з органічним барвником, хром - хемілюмінесцентним методом (хром каталізує реакцію, що протікає з випусканням світла), ціаніди, ванадій і титан - фотометричним методом і т.д.

Ці методи обрані таким чином, щоб достовірно визначати 1/2 встановленого ГДК і забезпечити максимально просту пробопідготовку. Наприклад, пробопідготовка при аналізі нафтопродуктів займає 2-3 хвилини, фенолів - 5-7 хвилин, ПАР - 2-3 хвилини.

В аналізаторі «Флюорат-02» використовується імпульсна ксенонова лампа високого тиску, що забезпечує достатні світлові потоки у всьому спектральному діапазоні оптичних методів - від жорсткого ультрафіолету до червоної межі видимого світла.

Основний режим роботи аналізатора – флюориметрія. Прилад може також працювати як фотометр або хемілюмінометр.

2. Переносний спектрофотометр DR1900. Прилад DR1900 прекрасно підходить для використання в польових умовах, так як є найлегшим і компактним портативним спектрофотометром. При роботі в польових умовах нам доведеться використовувати прилад при наявності пилу і вологості. Спектрофотометр пристосований для використання в несприятливих умовах, універсальний, підтримує широкий діапазон розмірів ампул. Прилад DR1900 створений з урахуванням використання в польових умовах, оснащений великим зручним екраном і простим користувацьким інтерфейсом, що дозволяє більше, ніж коли б то не було, спростити тестування навіть у складних умовах. Компактний прилад DR1900, простий в обігу і управлінні - прекрасний пристрій для проведення досліджень в польових умовах.

Спектрофотометр володіє найбільшим діапазоном вбудованих стандартних запрограмованих методів тестування при вимірюванні в несприятливих умовах - більш 220. Також можна створити власні методи за

допомогою простого у використанні інтерфейсу. Перевірки здійснюються при діапазоні довжин хвиль від 340 до 800 нм, що робить даний прилад придатним для використання в польових умовах, при тому, що результати, які він дозволяє отримувати, зазвичай доступні тільки на лабораторних приладах.

Примітка: можна виконувати вимірювання за допомогою кюветного тесту LCK, але без ідентифікації штрих-коду, 10-кратного вимірювання і з виключенням ізольованої частини.



Рис. 3.8. Переносний спектрофотометр DR1900 [15].

3. Спектрофотометр DR6000. УФ-спектрофотометр видимої області DR6000 відрізняється високим рівнем продуктивності як при вирішенні повсякденних лабораторних завдань, так і при виконанні фотометричних вимірювань. Ця система підвищує ефективність роботи в професійній лабораторії. Інтелектуальне програмне забезпечення полегшує регулярне калібрування, гарантує точність і полегшує налаштування для спеціалізованого застосування.

Прилад DR6000 виконує високошвидкісне сканування довжини хвилі у видимому і УФ-спектрі, містить більше 250 заздалегідь запрограмованих методів, в тому числі і найбільш часто використовувані сучасні методи. Прилад оснащений додатковими аксесуарами, що дозволяють тестувати великий обсяг матеріалу за допомогою обертового перемикача зразків.

Можна збільшити точність вимірювань, використовуючи систему подачі зразків, яка виключає помилки через різницю оптичних сигналів. Прилад відповідає широкому спектру вимог до тестування води.



Рис. 3.9. Спектрофотометр DR6000 [16].

4. Спектрофотометр UV-VIS Solar. UV-спектрофотометри «Solar» працюють в ультрафіолетовій, видимій та ближній інфрачервоній областях спектру. Вони застосовуються в наукових лабораторіях, установах охорони здоров'я, ветеринарії, фармацевтиці, екології, біології тощо, в лабораторіях контролю якості продукції і сировини різних галузей господарства (промислові підприємства, сільське господарство, харчова промисловість і т.д.)

Цей спектрофотометр має такі переваги:

- рмінні кюветні тримачі та приставки;
- велике кюветне відділення спектрофотометра дозволяє легко і швидко змінювати кюветні тримачі і приставки для проведення різних вимірів;
- точність вимірювання;

В якості єдиного джерела світла в UV-спектрофотометрі використовується імпульсна ксенонова лампа. Термін її служби практично необмежений, на відміну від галогенової і дейтерієвої ламп. Крім зручності в експлуатації, це істотно знижує витрати на обслуговування.

Завдяки використанню імпульсної ксенонової лампи стороннє світло не впливає на точність вимірювань. Робота з досліджуваними зразками може проводитися з відкритим кюветним відділенням. Немає необхідності витрачати час на закриття і відкриття кришки під час роботи.



Рис. 3.10. Спектрофотометр UV-VIS Solar

Працювати в автономному режимі (без підключення спектрофотометра до комп'ютера) зручно завдяки наявності великого дисплея з сенсорною панеллю керування.

Роздруківка результатів вимірювання без підключення спектрофотометра до комп'ютера завдяки вбудованому термопринтеру.

Вимірювальні функції:

- вимірювання спектрів поглинання, пропускання, відбиття;
- вимірювання оптичної щільності, коефіцієнта пропускання і коефіцієнта відбиття на фіксованих довжинах хвиль;
- визначення концентрації на одній, двох, трьох довжинах хвиль по фактору, стандарту, графіку [17].

3.4. Розробка макету вимірювальної установки

Описані вище моделі приладів мають у своєму складі дорогі типи детекторів висока селективність яких обмежена, зазвичай, вузьким діапазоном лінійності (наприклад, для більшості найбільш поширених детекторів типу PbS, AsGa, AsInGa діапазон лінійності складає 0,4-0,7 мкм).

Таким чином доцільним є удосконалення засобу та методу вимірювання виходу люмінесценції використовуючи типову структурну схему люмінесцентного фотометра (типу «СФ-ХХ») із використанням у якості джерела збудження потужного УФ-світлодіоду (з виходом світлового потоку на рівні 1 Вт) з високим ступенем спектральної стабільності та малошумного фотодетектора, здатного працювати у всьому можливому діапазоні реєстрації люмінесценції при роботі із зразками, що мають вихід люмінесценції у діапазоні 0,3-1,2 мкм. Тому використовуючи типову структурну схему люмінесцентного фотометра та уникаючи потрапляння на фотодетектор збуджуючого випромінювання, можна виключити із схеми диспергуючий елемент, і обмежитися комплементарними парами світлофільтрів, та провести заміну джерела випромінювання і фотоприймача відповідно світло- і фотодіодними компонентами, що мають високу інерційність і дозволяють реєструвати низькі рівні випромінювання.

Враховуючи, що під час розробки макету вимірювального засобу для визначення кількісних параметрів сполук здатних до люмінесценції в рідкій фазі, основна частина наших досліджень проводилася на базі та з використанням обладнання науково-дослідного підприємства «ЛАМБІТ» . При розробці нашого макету за основу ми взяли прилад «Сенсор-Л» для визначення концентрації сполук нітратів у колоїдному розчині в рідкій фазі методом трихвильової фотометрії в ультрафіолеті.

При виборі конструктивних рішень макету ми застосували конструктивну схему приладу «Сенсор-Л» з метою розширення можливостей приладу в якості вимірювача квантового виходу люмінесценції, застосувавши пару світлодіодів у спектральному діапазоні 365 та 385 нм та систему комплементарних обрізуючих світлофільтрів на турелі у якості диспергуючих елементів. В якості фотодетектора знайшов застосування малошумний широкосмуговий фотоприймач TSL267 фірми «TAOS», що дозволило прийняти та зробити оцінку потужності світла, яке пройшло через кварцову кювету.

3.4.1. Вибір напівпровідникового фотодетектору у якості первинного перетворювача макету вимірювального засобу

Враховуючи наявність в макетній установці стабілізованого по струму джерела живлення з постійною напругою на виході $U = 5-24 \text{ В}$ і струмом споживання $I \geq 1000 \text{ мА}$ було застосовано малошумний фотодетектор TSL267 фірми «TAOS».

Фотодіодний приймач TSL267 є монолітним фотодіодом із можливістю підключення трансімпедансного підсилювача на виході. Комбінація фотодіода і підсилювача усуває високочастотні шуми, і дозволяє отримати прокращення частотної характеристики внаслідок усунення паразитних ємностей. Вихідна напруга лінійно збільшується з інтенсивністю світла. Підсилювач призначений для роботи із одним або із двома джерелами живлення.

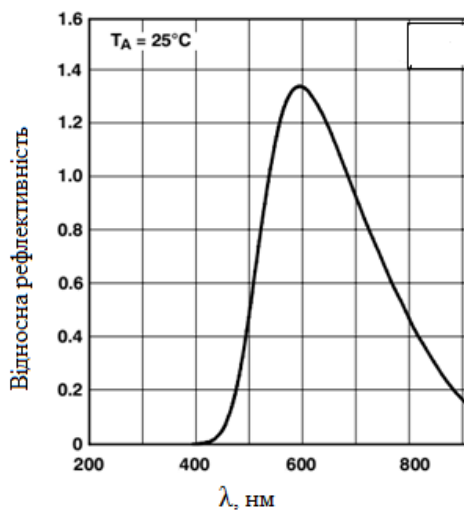


Рис. 3.11. Спектральна чутливість фотодіоду при використанні в сукупності із трансімпедантним підсилювачем.

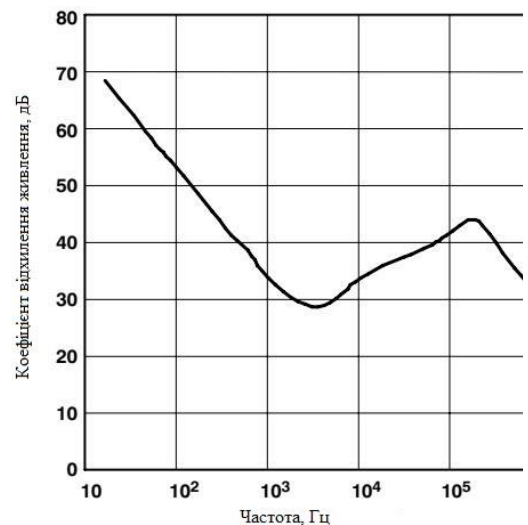


Рис. 3.12. Коефіцієнт частотних спотворень фотодіодного детектору.

В фотодіодному режимі фотодіод працює в режимі фотопровідності, забезпечуючи добру лінійність характеристик і низьке значення темнового струму. TSL267 працює з напругами від 2,4 В до 6 В і його темновий струм

становить всього 100 мА. Діапазон напруг на виході фотодіодного детектору при включенні в фотодіодному режимі становить 1,2-2,8 В. Температурний діапазон роботи фотодіодного приймача становить від 0°C до 70°C.

3.4.2. Удосконалений метод та спосіб реєстрації квантового виходу люмінесценції слаболюмінесціюючих сполук

Якісний люмінесцентний аналіз заснований на порівнянні форми спектрів досліджуваної суміші речовин з формою спектра індивідуальних сполук, які можуть входити до складу досліджуваної суміші. Як і в разі абсорбційної спектрофотометрії, для ідентифікації флуоресціюючих речовин найбільше значення мають положення максимуму, наявність та характер тонкої структури спектрів, півсмуга флуоресценції. Важлива особливість флуоресценції суміші декількох з'єднань полягає в тому, що спектр суміші змінюється при зміні довжини хвилі збудження, оскільки при різних довжинах хвиль можуть переважно збуджуватися різні сполуки.

Із загального числа поглинених фотонів частина, рівна квантовому виходу флуоресценції η , висвітиться зразком в різних напрямках і в усій спектральній $I_{\text{люм}} = I_0 K(1-T) \cdot \eta$ області люмінесценції. З світлового потоку за допомогою світлофільтрів або монохроматора можна виділити і сфокусувати на приймач світла світловий потік, який буде зареєстрований в вигляді фотоструму:

$$I_{\text{люм}} = I_0 K(1-T) \cdot \eta \quad (3.1)$$

Таким чином, інтенсивність люмінесценції $I_{\text{люм}}$ пропорційна інтенсивності збуджуючого світла I_0 , квантовому виходу люмінесценції η , коефіцієнту поглинання світла $(1-T)$. Коефіцієнт пропорційності K залежить від тілесного кута, в межах якого зібрано світло люмінесценції, ширини спектру, що обрізається монохроматором або світлофільтром спектральної області пропускання монохроматора або світлофільтру і чутливості приймача світла.

Якщо збудження люмінесценції здійснюється монохроматичним світлом, яке виділяється за допомогою монохроматора, то з'являється можливість виміряти залежність інтенсивності люмінесценції від довжини

хвилі збуджуючого світла. Характер цієї залежності ясний з рівняння. Оскільки квантовий вихід флуоресценції для конкретної флуоресціюючої речовини, відповідно до закону Вавілова, від довжини хвилі збудження не залежить (так само як і константа K) ясно, що форма спектра збудження повторює форму залежності від довжини хвилі коефіцієнта поглинання, тобто функції $T=f(\lambda)$. Так як K і η - постійні, то можна сказати, що спектр збудження флуоресценції в розведених розчинах збігається (за формою) зі спектром поглинання флуоресціюючого з'єднання.

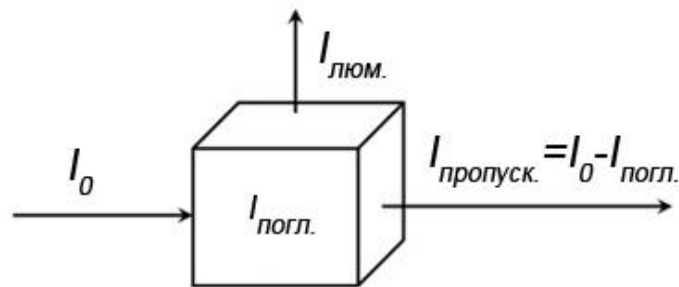


Рис. 3.13. Схема збудження люмінесценції в досліджуваних сполуках.

Одна з переваг методу реєстрації люмінесценції полягає в тому, що для вирішення багатьох біологічних завдань не потрібне використання складних і дорогих приладів. Якщо не потрібне проведення точних спектральних вимірювань або застосування техніки дослідження швидко протікаючих процесів, а потрібно виміряти інтенсивність флуоресценції при збудженні і реєстрації у відносно широкій області спектру (10 ± 1 нм), то можна використовувати найпростіший флуориметр зі світлофільтрами. При вимірі люмінесценції істотним є вибір світлофільтрів, необхідних для виділення спектру, що збуджує люмінесценцію, і обрізання виходу люмінесценції.

Світлофільтр для збудження люмінесценції повинен пропускати світло тільки в області поглинання досліджуваної речовини і не повинен пропускати світло в області, в якій зразок люмінесціює. Світлофільтр для реєстрації люмінесценції повинен пропускати люмінесценцію, але випромінювання збудження повинне повністю ним поглинатися. Підбираючи

таку пару світлофільтрів, слід домагатися їх комплементарного «схрещення»: складені разом ці два світлофільтри зовсім не повинні пропускати світло.

3.5. Аналіз об'єкту досліджень

Для перших експериментальних робіт обрані водні витяжки продуктів переробки житніх культур у якості тестових зразків.

Основною компонентною даних розчинів, яка підлягала визначенню, були фосфоліпідні сполуки, що є структурними елементами клітинних мембран розмільчених зерен жита.

У якості джерела аналізів використовували різні типи борошна житнього органічного у якості диспергованого порошку (помолу), що не містять дріжджевих включень та бактеріальних домішок.



Рис. 3.14. Борошно житнє цільнозмелене грубого помолу.



Рис. 3.15. Борошно житнє цільнозмелене тонкого помолу.

Борошно житнє повного помолу відрізняється тим, що при його виготовленні використовується все зерно, в тому числі і зародок. При цьому методі переробки усі ліпідні включення, що містяться у клітковині та зародку, потрапляють у помел і можуть бути виділені водною чи спиртовою екстракцією в розчин.

Фасовка – 2 кг в паперовий пакет.

Житнє обдирне борошно містить на 100 г продукту: білки - 8,9 г, жири - 1,2 г, вуглеводи - 73,0 г, калорійність - 325 Ккал.

Основною масовою компонентною клітинних оболонок зернових культур є ліпіди, що поділяють на дві групи: прості - тригліцериди жирних кислот (гліцероліпідів, гліколіпіди, ефіри холестерину) і складні (залишки високомолекулярних карбонових кислот + кислоти фосфорна і сірчана).

Прості нейтральні ліпіди - ацилгліцеріни (три-, ди-, моноацилгліцеріни) - це складні ефіри гліцерину і вищих карбонових кислот, складають до 95 ліпідів (по суті це жири і масла).

Інша група жирів - воски - складні ефіри вищих одноосновних карбонових кислот і одноатомних спиртів.

Гліколіпіди - група нейтральних складних ліпідів, до складу яких входять залишки моноз (ліпіди пшениці, вівса, кукурудзи, соняшнику), яким належить важлива роль у формуванні клейковини білків пшениці.

Найважливішими представниками складних ліпідів, що містяться у зернових культурах, є фосфоліпіди. Їх молекули побудовані із залишків спиртів (гліцерин, сфингозин), жирних кислот, фосфорної кислоти а також містять азотисті основи (холін, етаноламін, залишки амінокислот).

Вміст фосфоліпідів в різних культурах коливається від 1,8-1,7% (соя, бавовник, соняшник) до 0,6-0,9% (пшениця, жито, пшениця, кукурудза).

Вони виконують структурну функцію (будова мембран і субклітинних структур - органел), запасу поживних речовин (запасні ліпіди).

Молекули фосфоліпідів побудовані із залишків спиртів (гліцерину, сфингозину), жирних кислот, фосфорної кислоти (H_3PO_4), а також містять азотисті основи (найчастіше холін $[HO-CH_2-CH_2-(CH_3)_3N]$ + OH або етаноламін $HO-CH_2-CH_2-NH_2$), залишки амінокислот і деяких інших з'єднань. Загальні формули фосфоліпідів містять залишки гліцерину і сфингозина має такий вигляд (Рис. 3.16):

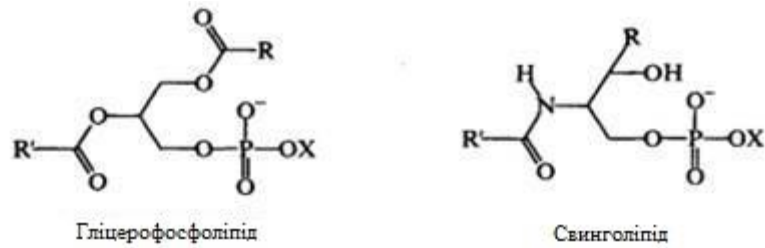


Рис. 3.16. Структурна молекула фосфоліпідів [8].

У молекулі фосфоліпідів є замісники двох типів: гідрофільні і гідрофобні. Як гідрофільних (полярних) угруповань виступають залишки фосфорної кислоти і азотистої основи («голова»), а гідрофобних (неполярних) - вуглеводневі радикали («хвости»).

Фосфоліпіди (фосфатиди) - обов'язкові компоненти рослин. Вміст фосфоліпідів в різних культурах (в%): соя - 1,8, бавовник - 1,7, соняшник - 1,7, рицина - 0,3, льон - 0,6, пшениця - 0,54, жито - 0,6, кукурудза - 0,9.

Склад жирних кислот фосфоліпідів і ацилгліцеринів, виділених з одної і тої ж сировини, неідентичний. Так, в ерукових сортах рапсової олії міститься близько 60% ерукової кислоти, в фосфоліпідах - 11-12%. Переважна більшість фосфоліпідів має в своєму складі залишки однієї насиченої (зазвичай в положенні 1) і однієї ненасиченої (в положенні 2) кислоти. [1]

Фосфоліпіди відіграють важливу роль в організмі людини. Входячи до складу клітинних оболонок, вони відіграють істотне значення для їх проникності і обміну речовин між клітинами і внутрішньоклітинним простором. Фосфоліпіди харчових продуктів розрізняються за хімічним складом і біологічною дією. У харчових продуктах в основному зустрічаються лецитин, до складу якого входить холін, а також кефалин, до складу якого входить етаноламін. Лецитин бере участь в регулюванні обміну холестерину, на відміну від властивостей які пропонують фосфоліпіди, запобігає накопиченню холестерину в організмі, сприяє виведенню його з

організму (проявляє так звану липотропну дію). Загальна потреба в фосфоліпідах становить близько 5 г в день.

3.6. Практичні положення вимірювання кількісних показників фосфоліпідів в продуктах переробки житніх культур методами люмінесцентної спектрофотометрії

В розробленому в рамках наших досліджень експериментальному пристрої використано світлодіодний випромінювач серії LTPL-C034UVH365 (1) з робочою вихідною потужністю 400 мВт в області 60 градусів, оптична формуюча система – короткофокусний об'єктив (2), кварцова кювета (3) з оптичним ходом до 10 мм. Реєстрацію люмінесценції здійснювали за допомогою напівпровідникового малошумного фотоприймача TSL267 фірми «TAOS» (5) з аналого-цифровою обробкою (6). Для екранування випромінювання збудження використовували синьо-зелений світлофільтр СЗС-21. Синьо-зелений світлофільтр СЗС-21 має діапазон поглинання в області 620-1500 нм, в комбінації зі склом ОС-11, ОС-12, ОС-13, ОС-14 дозволяє виділення ділянок спектру в області 520-600 нм. Функціональна схема макету вимірювальної установки представлена на Рис. 3.17. Використання світлофільтрів для вимірювання люмінесценції забезпечує більш чистий спектр і відповідно достовірний результат вимірювання.

В ідеалі спектрофлуориметр складається з двох монохроматорів; один - для виділення монохроматичного збуджуючого світла, інший - для вимірювання спектра люмінесценції. Комерційні прилади, як правило, забезпечені кварцовими кюветами товщиною 1 см, кут між напрямками збудження і люмінесценції дорівнює 90°. Таке розташування напрямків збуджуючого пучка і вимірюваного світла люмінесценції дозволяє збирати значну частину світла люмінесценції і, що не менш важливо, виключити люмінесценцію самої кювети, так як флуоресценція стінок не потрапляє на фотоприймач.

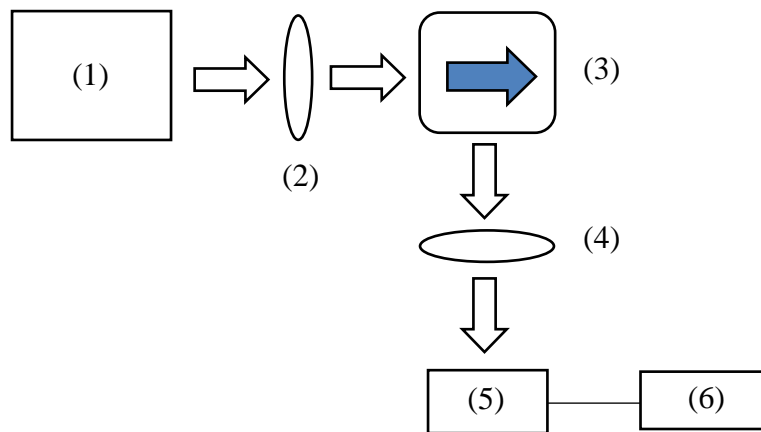


Рис. 3.17. Функціональна схема малогабаритного одноканального люмінесцентного реєстратора (вимірювача).

Однак ця конструкція передбачає вимір зразків з малою оптичною щільністю, які до того ж не дуже сильно розсіюють світло. У зразках з високою оптичною щільністю світиться тільки тонкий шар розчину, що примикає до передньої стінки кювети, і описаний прилад вимірює лише малу частину світла люмінесценції. Щоб уникнути цього, в серії зразків з високою оптичною щільністю потрібно використовувати тонкі кювети, а вимір флуоресценції проводити з того боку кювети, на яку падає збуджуваче випромінювання.

У нашому експериментальному зразку спектральну чистоту випромінювання збудження забезпечує світлодіод, півширина випромінювання якого не перевищує 20 нм в області 365 нм. Для виділення лінії люмінесценції використовувалися фільтри, в тому числі смугові інтерференційні.

Спектри поглинання водних та спиртових витяжок із житнього борошна знаходяться в області 200-400 нм [1], що добре узгоджується зі спектром випромінювання сучасних напівпровідникових джерел (LED). На фото представлені експериментальні зразки вимірювача при збудженні виходу люмінесценції в гумінових кислотах і розчині фолієвої кислоти.

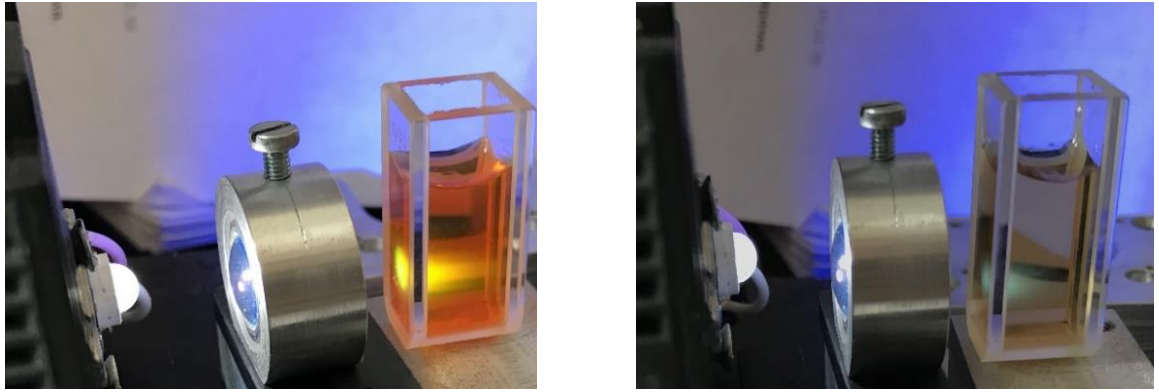


Рис. 3.18. Зовнішній вигляд оптичної системи та кюветного відділення вимірювальної установки.

У таблиці 3.1 наведено середні арифметичні значення результатів кількісних вимірів, які проведені за допомогою виготовленого експериментального зразку малогабаритного вимірюючого засобу. Кількість вимірювань для кожного зразку становила 40 разів для серії з певною концентрацією, при $P=0,95$.

Таблиця 3.1.

Інтенсивність люмінесценції фосфоліпідів житніх культур в спиртовій витяжці вибраних концентрацій.

Діапазон збуджуючого випромінювання	Тип світлофільтру, діапазон обрізки	Концентрація, C (мг/л), моль/л - контроль	Інтенсивність люмінесценції, од.
365 ± 5 нм	СЗС-21 ($\max_{\text{проп.}}=480\text{нм}$)	1	212
		8	1264
		20	2481
		30	3922
		50	5440

Результати вимірювалися в одиницях пропорційності, що відповідали зміні значення напруги на виході фотодетектора (10 од. інт. = 0,05 В) в робочому діапазоні фотодетектора з трансімпендантним підсилювачем

$U = 2,4-32,4$ В, при темновому струмі фотодетектора 100 мА та частотному діапазоні роботи $f_{роб.} = 10-10^4$ Гц. В даному випадку увесь відносний динамічний діапазон можливих значень напруги на виході фотодетектора склав 18000 відносних одиниць.

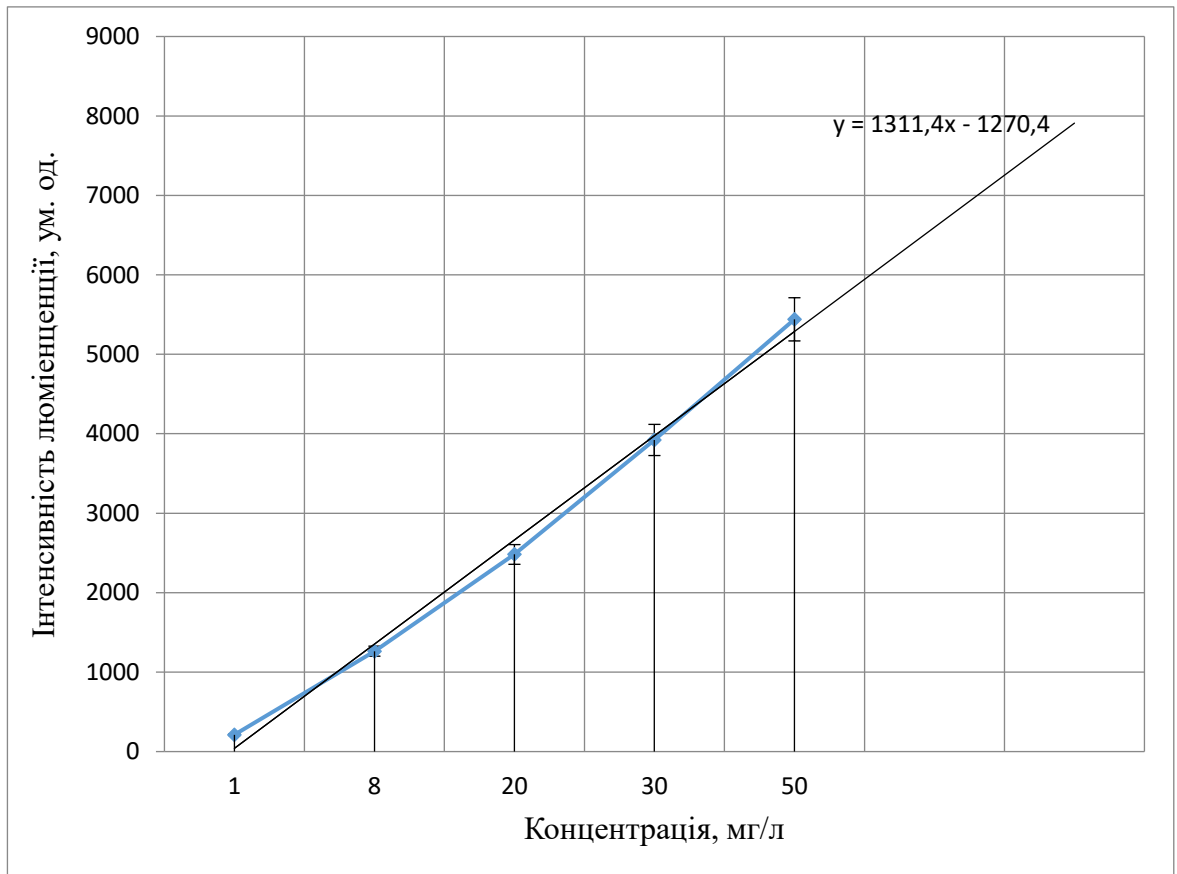


Рис. 3.19. Калібрувальний графік для визначення концентрації фосфоліпідів житніх культур в спиртовій витяжці.

У випадку підключення до виходу трансімпедантного підсилювача фотодетектора встроєного ПФОС приладу «Сенсор-Л», що має вхідний опір на рівні 1,2 МОм та розрахований на роботу із вихідною напругою фотодетектора $U_{роб.} = 2,0-36,0$ В та $f_{роб.} = 10-10^4$ Гц, з'являється можливість вносити відгуки вимірювального сигналу в умовних одиницях в ЕОМ, використовуючи встроєний АЦП ПФОС «Сенсор-Л».

Для вимірювання аналогових сигналів плата Arduino UNO R3 (мікроконтролер АТmega328) використовує АЦП послідовного наближення з аналоговим комутатором. Arduino UNO R3 (мікроконтролер АТmega328)

використовує 10 розрядний АЦП, що відповідає 1024 градаціям вихідного коду. Роздільна здатність або точність АЦП з ідеальною передавальною характеристикою дорівнює $100\% / 1024 = 0,098\%$.

В результаті проведення вимірів із використанням встроеного ПФОС приладу «Сенсор-Л» згідно структурної схеми і використанням синьо-зеленого світлофільтру СЗС-21 були отримані наступні залежності інтенсивності квантового виходу люмінесценції від концентрації (мг/л) при роботі із розчиненими в воді гуміновою і фолієвою кислотами різних концентрацій. В даному випадку, динамічний діапазон вимірюваних значень по напрузі становив 6000 відносних одиниць, що відповідають робочому діапазону по напрузі $U_{роб.} = 2,4-32,4$ В (Рис. 3.20, 3.21).

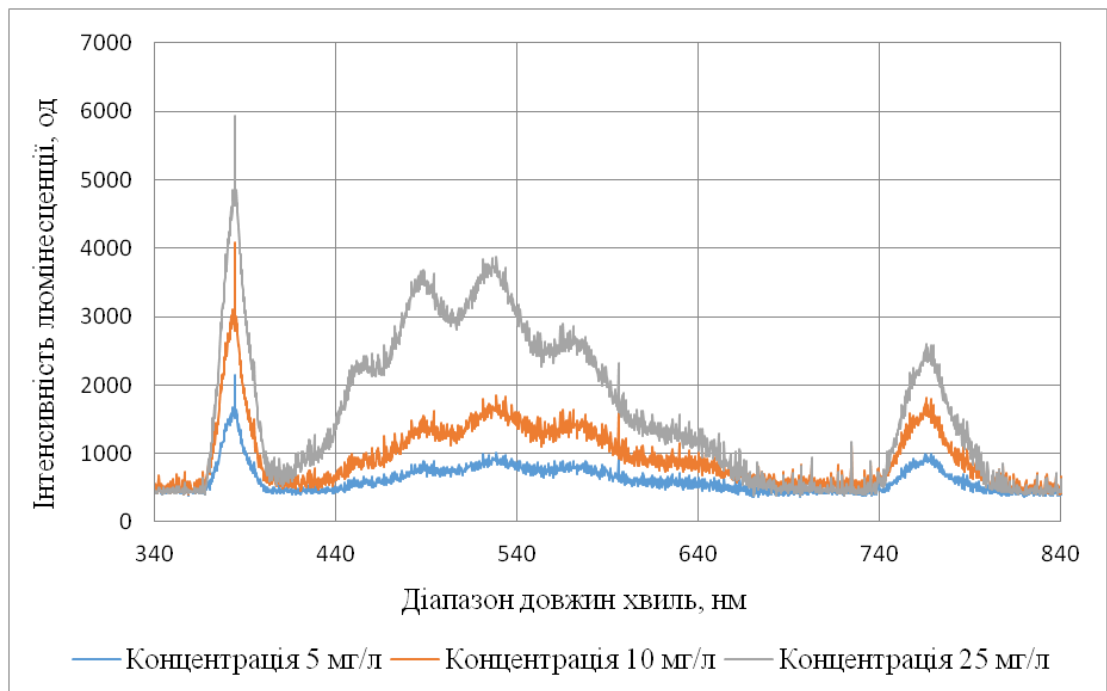


Рис. 3.20. Інтенсивність квантового виходу люмінесценції спиртової витяжки цільнозмеленого житнього борошна грубого помолу, що відповідає вмісту фосфоліпідів концентрації відповідно 5 мг/л, 10 мг/л. та 25 мг/л.

Молекули ФЛ є амфіфільними, оскільки вони складаються з двох частин, різних за розчинністю у воді: полярної частини, з високою спорідненістю до води (гідрофільна частина) і неполярними радикалами жирних кислот (гідрофобна частина). В водних розчинах ФЛ проявляють

поверхнево-активні властивості, утворюють міцні плівки на межі розділу вода (або жир): повітря. Цім обумовлено вспінювання жирових і водних розчинів. ФЛ також стабілізують емульсії.

При переробці або при розкладі, фракції фосфоліпідів взаємодіють з редукуючими вуглеводами і продуктами їх розкладу (фурфуролом і оксиметилфурфуролом). Ця реакція призводить до утворення низки темнозбарвлених продуктів – меланофосфоліпідів.

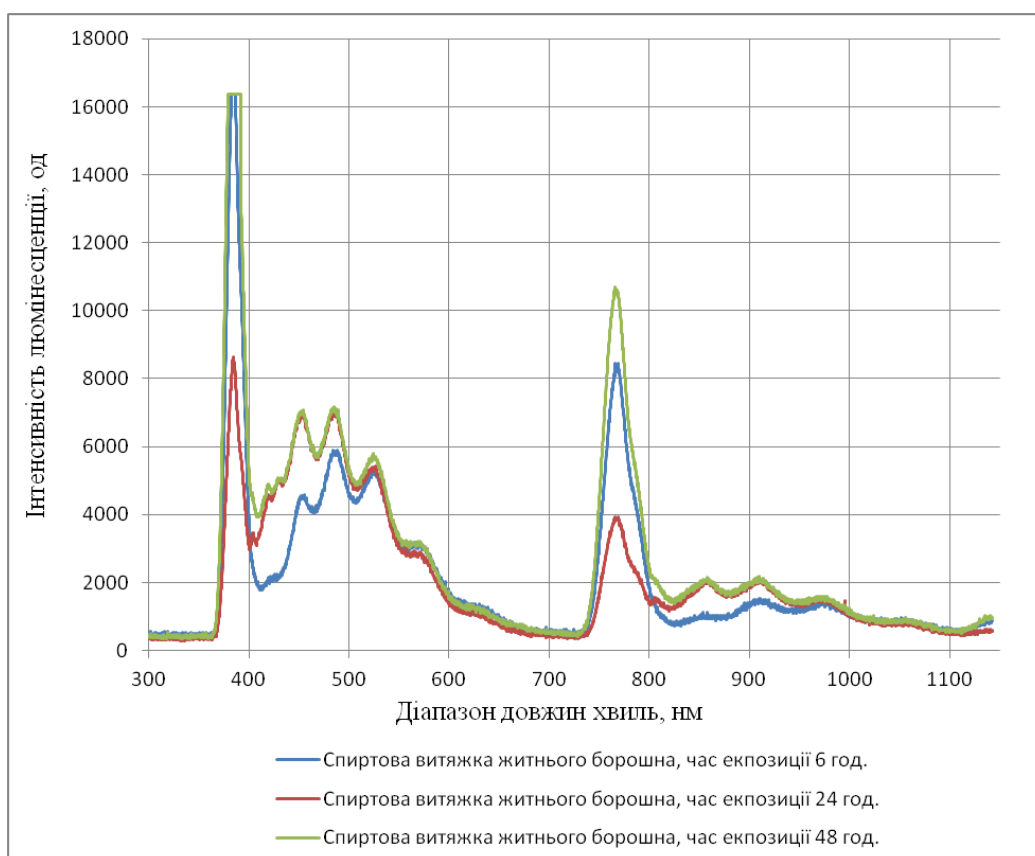


Рис. 3.21. Зміна інтенсивності (у відносних одиницях) люмінесценції в спиртових витяжках житнього борошна в залежності від часу експозиції.

На Рис. 3.21 показано, що максимально фосфоліпиди переходять в спиртовий розчин на 1 сутки після розчинення, потім починається їх деструкція. Статистичні дані зображені на Рис. 3.21 були отримані із застосуванням схеми досліду із застосуванням синьо-зеленого світлофільтра СЗС-21 в комбінації із оптичним склом ОС-11, ОС-12, ОС-13, ОС-14 що дозволило виділити робочий спектральний діапазон в області 520-600 нм.

Висновки до розділу

Підсумовуючи проведений огляд матеріалів по досліджуваній темі та проаналізувавши отримані статистичні дані, можна сказати, що встановлення основи розробки та сертифікації вимірювального обладнання, що визначає квантовий вихід люмінесценції $\Phi(f)$ хімічних сполук різної будови можна провести двома методами: тут оптична спектроскопія використовується для встановлення типу хімічної досліджуваної речовини в зразку (сканування по спектрам відбувається досить повільно, але при цьому досягається висока роздільна здатність), в той же час люмінесцентна УФ-спектрофотометрія використовується в якості експрес-аналізу для визначення концентрацій відомих типів хімічних сполук в розчинах по їх квантовому виходу люмінесценції.

Якщо проведення точних спектральних вимірювань швидко протікаючих процесів не потрібно, а потрібно виміряти інтенсивність флуоресценції при збудженні і реєстрації в відносно широкій області спектру (10 ± 1 нм), то можна застосовувати найпростіший флуориметр зі світлофільтрами. При вимірі люмінесценції істотним є вибір світлофільтрів, необхідних для виділення спектру, що збуджує люмінесценцію.

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ «КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ФОСФОЛІПІДІВ В ПРОЦЕСІ ПЕРЕРОБКИ ЖИТНІХ КУЛЬТУР ЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ»

4.1 Опис ідеї проекту

В умовах ринкової економіки інтенсивний розвиток виробництва харчових продуктів висуває особливі вимоги до оцінки їх хімічних показників, що вимагає розробки сучасних експрес-методів та засобів з урахуванням максимальної автоматизації отримання результатів аналізів та їх подальшої обробки. Впровадження малозатратних неруйнівних експрес-методів дозволяє швидко і точно проводити оцінку якості як готових продуктів харчування, так і сировини в лабораторних умовах під час виробничого процесу.

В такому випадку досить перспективним є застосування оптичних методів експрес-аналізу харчових продуктів (в лабораторних та виробничих умовах), з яких найбільш ефективними по відношенню затрати/результат є саме люмінесцентні методи аналізу.

В оптичних аналітичних методах дослідження якісних і кількісних властивостей продуктів харчування використовується ультрафіолетова (УФ), видима та інфрачервона (ІЧ) області спектру електромагнітного випромінювання.

Люмінесценція – один із широко поширених в природі видів світлового випромінювання. Люмінесцентний аналіз знайшов застосування в різних областях науки і техніки. Такий аналіз здійснюється в основному за допомогою візуальних спостережень або із застосуванням фотометричних детекторів з можливістю подальшої обробки відгуку досліджуваного зразка за допомогою ЕОМ.

У випадку кількісного визначення компонентів харчових продуктів використовуються методи флуоресценції, які включають в себе різні операції з розділення, очищення складових, обробки продукту флуорохромами та ін. Абсолютна чутливість люмінесцентного методу досить висока. Відносна

концентрація речовини також може бути дуже малою, – для яскраво люмінесціюючих речовин вона становить величину порядку 10^{-10} г/г. Даний метод застосовують для кількісного визначення поліциклічних органічних сполук, вітамінів, білків, нітратів, сульфідів, ціанідів, токсичних металів у складі харчових продуктів (молоці, м'ясі та рибі), для діагностики псування овочів, плодів і виявлення в продуктах консервантів, лікарських препаратів, канцерогенних речовин та ін.

В цьому розділі буде проведено аналіз стартап проекту, який має на меті визначити чи наш продукт має шанси вийти на ринок і конкурувати із вимірювальними засобами, які вже зайняли на ньому своє місце.

У таблиці 4.1 зображено зміст ідеї та можливі базові потенційні ринки, в межах яких потрібно шукати групи потенційних клієнтів.

Таблиця 4.1.

Опис ідеї стартап проекту.

Зміст ідеї	Напрямки застосування	Вигоди для користувача
Розробка приладу для ідентифікації та визначення концентрації сполук органічної природи здатних до люмінесценції в рідкій фазі	Визначення наявності домішок та їх відносних концентрацій в продуктах харчування під час виробництва та в процесі зберігання.	Впевненість в складі продуктів.
	Контроль наявності вибраних хімічних сполук (синтетичних та натуральних барвників нітратів, сульфідів, стабілізаторів) у виробничому циклі продуктів переробки зернових культур	Забезпечення себе від можливого негативного впливу небезпечних речовин, надмірних концентрацій дозволених до застосування домішок в харчових продуктах та органічній сировині.
	Контроль наявності небезпечних домішок у продуктах контролюючими державними лабораторіями та лабораторіями санепідемнагляду	
	Визначення наявності домішок у продуктах при їх експорті та імпорті.	Можливість реалізації вітчизняної продукції що відповідає стандартам держави імпортера на світових ринках. Отримання міжнародних сертифікатів на продукцію.

Основними конкурентами на ринку є аналізатор DR900 (Німеччина-Китай, 2016), спектрометр UV/VIS Excellence, мод.: UV5, UV7, UV5Bio (Швейцарія, 2016), та спектрометр Promega GloMax Discover PE4 (Німеччина-Китай, 2014).

Таблиця 4.2.

Визначення сильних, слабких та нейтральних характеристик ідеї проекту.

№ п/п	Техніко-економічні характеристики ідеї	(потенційні) товари/концепції конкурентів				W (слабка сторона)	N (нейтральна сторона)	S (сильна сторона)
		Мій проект	Конкурент1	Конкурент2	Конкурент3			
1.	Вартість приладу, грн	18600	61100	35800	55900	-	-	+
2.	Швидкість встановлення	5	15	21	13	+	-	-
3.	Вартість обслуговування	480	1200	960	1350	-	-	+
4.	Відсоток браку	4	9	3	5	-	+	-
5.	Затрати на виробництво	Високі	Середні	Низькі	Середні	+	-	-
6.	Відносини з органами державної влади	Добрі	Добрі	Нейтральні	Нейтральні	-	+	-
7.	Торгова марка	Немає	Є	Є	Є	+	-	-

Удосконалений засіб та методика вимірювання квантового виходу люмінесценції використовуючи типову структурну схему люмінесцентного фотометра (типу «СФ-ХХ») із використанням у якості джерела збудження потужного УФ-світлодіоду (з виходом світлового потоку на рівні 1 Вт) з високим ступенем спектральної стабільності та малошумного фотодетектору здатного працювати у всьому можливому діапазоні реєстрації люмінесценції при роботі із зразками що мають вихід люмінесценції у діапазоні 0,3-1,2 мкм.

Завдяки тому, що за своєю природою світлодіод випромінює потужне світло на досить вузькій частині спектру, відпадає необхідність в дисперсійному елементі. Застосування напівпровідникового фотодетектору з можливістю підключення до ЕОМ дозволяє в режимі реального часу

проводити кількісний та якісний аналіз вибраних хімічних сполук в динаміці. Зменшуються габарити пристрою, насамперед, через відсутність потужного блоку живлення, спрощується оптична система, зменшується металева конструкція. Зробити прилад

Розроблений в рамках наших досліджень прилад для визначення оптичних показників вибраних хімічних речовин здатних до люмінесценції у продуктах переробки зернових культур є доступним для широкого використання у експрес-діагностиці, та дозволяє зменшити вартість та тривалість вимірювань.

Далі проводимо аналіз потенційних техніко-економічних переваг ідеї порівняно із пропозиціями конкурентів:

- визначаємо перелік техніко-економічних властивостей та характеристик ідеї;

- визначаємо попереднє коло конкурентів (проектів-конкурентів) або товарів-замінників чи товарів-аналогів, що вже існують на ринку, та проводимо збір інформації щодо значень техніко-економічних показників для ідеї власного проекту та проектів-конкурентів відповідно до визначеного вище переліку;

- проводимо порівняльний аналіз показників: для власної ідеї визначено показники, що мають а) гірші значення (W, слабкі); б) аналогічні (N, нейтральні) значення; в) кращі значення (S, сильні) (табл. 4.2).

Для формування конкурентоспроможності запропонованого товару на ринку визначений перелік слабких, сильних та нейтральних характеристик та властивостей ідеї.

4.2 Технологічний аудит ідеї проекту

В межах даного підрозділу проводимо аудит технології (методу визначення), за допомогою якого можна реалізувати ідею створення проекту. Визначення технологічної здійсненності ідеї проекту передбачає аналіз складових які вказані в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3.

Технологічна здійсненність ідеї проекту.

№ п/п	Ідея проекту	Технології її реалізації	Наявність технологій	Доступність технологій
1.	Розробка приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук	Створення приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук на основі флуорисцентної фотостимульованої люмінесценції	Метод визначення на якому побудований прилад відкритий	Метод доступний
2.	Розробка приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук	Створення приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук на основі термостимульованої люмінесценції	Метод визначення на якому побудований прилад відкритий	Метод доступний
3.	Розробка приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук	Створення приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук на основі радіаційно стимульованої люмінесценції	Метод визначення на якому побудований прилад відкритий	Метод недоступний
4.	Розробка приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук	Створення приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук на основі хемостимульованої люмінесценції	Метод визначення на якому побудований прилад відкритий	Метод доступний
5.	Розробка приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук	Створення приладу для визначення концентрації барвників та слаболюмінісцюючих речовин на основі електростимульованої люмінісценції	Метод визначення на якому побудований прилад відкритий	Метод малодоступний
Обрана технологія реалізації ідеї проекту: Розробка приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук			Створення приладу для ідентифікації та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук на основі флуорисцентної фотостимульованої люмінесценції	

Проаналізувавши таблицю можна зробити висновок, що наш проект можна реалізувати за допомогою більшості методів, які доступні на даний момент, але серед доступних нам ми обираємо метод флуоресцентної спектроскопії та будемо використовувати його для реалізації нашої ідеї.

4.3 Аналіз ринкових можливостей запуску стартап проекту

Визначимо ринкові можливості, які можна використати під час ринкового впровадження проекту, та ринкові загрози, які можуть перешкодити його реалізації. Проведемо аналіз попиту: наявність попиту, обсяг, динаміка розвитку ринку (таблиця 4.4).

Таблиця 4.4.

Попередня характеристика потенційного ринку стартап-проекту

№ п/п	Показники стану ринку (найменування)	Характеристика
1	Кількість головних гравців, од	3
2	Загальний обсяг продаж, грн/ум.од	186000 (10x18600)
3	Динаміка ринку (якісна оцінка)	Зростає
4	Наявність обмежень для входу (вказати характер обмежень)	Патентування продукту, середня конкуренція, високий показник якості обслуговування.
5	Специфічні вимоги до стандартизації та сертифікації	ДСТУ EN 61326-2-1:2016 ДСТУ EN 61010-2-033:2017
6	Середня норма рентабельності в галузі (або по ринку), %	76%

За результатами аналізу таблиці можна зробити висновок що ринок є привабливим для входження за попереднім оцінюванням.

Надалі визначаємо потенційні групи клієнтів, їх характеристики, та формуємо орієнтовний перелік вимог до товару для кожної групи (табл. 4.5).

Таблиця 4.5.

Характеристика потенційних клієнтів стартап-проекту

№ п/п	Потреба, що формує ринок	Цільова аудиторія (цільові сегменти ринку)	Відмінності у поведінці різних потенційних цільових груп клієнтів	Вимоги споживачів до товару
	Спрощення та прискорення визначення	Промислові підприємства, які	Технічні стандарти які встановлюються	- до продукції Невеликі розміри приладу.

Продовження таблиці 4.5.

	масових концентрацій вибраних речовин методами експрес метрії	виготовляють продукцію і практикують додавання в її склад домішок Контролюючі державні лабораторії. Підприємства, які реалізують продукцію на території держави, або купують її для експорту.	на підприємствах. Після купівлі нашого засобу вимірювань з інтегрованим програмним забезпеченням клієнт може користуватися нею при розрахунках на протязі вказаного періоду після чого йому доведеться продовжити договір з продавцем.	Можливість проведення досліджень в польових умовах. Невелика чутливість приладу до зовнішніх чинників. Можливість виведення результатів на комп'ютер. - до компанії-постачальника Відповідність приладу заданим характеристикам. Можливість технічної підтримки при виникненні проблем. Ввідний інструктаж по роботі з приладом. Зрозуміле управління приладом.
--	---	---	--	---

При купівлі даного продукту клієнт може зіткнутися з певними проблемами. Для їх попередження і швидкого виправлення необхідні створення та доставка якісного приладу, наявність висококваліфікованих працівників для роботи із засобом вимірювань, забезпечення сприятливих умов роботи з вимірювальним засобом на об'єкті замовника для своєчасного усунення можливих технічних проблем в роботі вимірювального засобу (Таблиця 4.6).

Таблиця 4.6.

Фактори загроз

№ п/п	Фактор	Зміст загрози	Можлива реакція компанії
1.	Конкуренція	Можливість появи на ринку іноземних аналогів з кращими характеристиками і нижчою ціною.	Вивчення продукції конкурентів та вдосконалення своєї, для задоволення всіх потреб користувачів.
2.	Інфляція	Зміна курсу гривні, за рахунок чого можуть зменшитися продажі	Реалізація продукту в більш стабільній (іноземній) валюті та моніторинг економічної ситуації в країні

Продовження таблиці 4.6.

3.	Наявність локального конфлікту	Може вплинути на коло потенційних покупців.	Пошук нових клієнтів на міжнародному ринку
4.	Постачання	Проблема з фірмами постачальниками	Зміна політики розповсюдження продукту
5.	Технічний	Збої в роботі приладу.	Спрощення алгоритмів налаштування або впровадження постійної підтримки кваліфікованих техніків

Наявність певних загроз реалізації продукції дозволить вдосконалювати прилад та завжди бути в курсі всіх наукових новинок та економічної ситуації в країні. Окрім певних загроз, ми маємо ряд переваг та можливостей (Таблиця 4.7).

Таблиця 4.7.

Фактори можливостей

№ п/п	Фактор	Зміст можливості	Можлива реакція компанії
1.	Науково-технічні	Зміниться технологія виготовлення товару.	Впровадить технологію і змінить вартість товару.
2.	Попит	Збільшення попиту на товар на ринку.	Збільшення продажів, а відповідно і прибутків компанії
3.	Економічні	Політика протекціонізму; підтримка інноваційного виробництва.	Підвищення/пониження ціни на продукт; зменшення податкового тиску
4.	Політико правові	Може вплинути на купівлю/продаж товару.	Зміна напрямків імпорту
5.	Екологія	Підвищення зацікавленості людей до якості харчових продуктів	Реклама своєї продукція яка допомагає виявити підприємства які мають попит на товар.

Таблиця 4.8.

Ступеневий аналіз конкуренції на ринку

Особливості конкурентного середовища	В чому проявляється дана характеристика	Вплив на діяльність підприємства (можливі дії компанії, щоб бути конкурентоспроможною)
1. Тип конкуренції	Олігополія	Можливість домовленості з іншими олігополістами для отримання взаємної вигоди

Продовження таблиці 4.8.

2. Рівень конкурентної боротьби	Національний	Вдосконалення продукту і пошук можливості виходу на міжнародний ринок
3. За галузевою ознакою	Міжгалузева	Розширення ринку за рахунок збільшення попиту
4. Конкуренція за видом товарів	Товарно-видова	Вдосконалення та реклама для показу переваг
5. За характером конкурентних переваг	Нецінова	Вдосконалення свого продукту і при цьому невелике зменшення цін відносно конкурентів
6. За інтенсивністю	Не марочна	Розробка бренду і його активна реклама

Після аналізу конкуренції проведемо більш детальний аналіз умов конкуренції в галузі.

Таблиця 4.9.

Аналіз конкуренції в галузі за М. Портером

	Прямі конкуренти в галузі	Потенційні конкуренти	Постачальники	Клієнти	Товари-замінники
Складові аналізу	На даний момент на ринку присутні 3 прямі конкуренти, які займаються виготовленням даного обладнання.	Потенційними конкурентами є іноземні компанії які згодом можуть вийти на наш ринок. Патенти на продукти. Законодавчі обмеження. Гнучкі ціни.	Постачальникам є інтернет магазини який займаються розповсюдженням програмного забезпечення для контролю складу повітря. Диференціація витрат. Концентрація постачальників.	Основними клієнтами є підприємства легкої промисловості. Розмір закупівель. Система інформації. Прибутки. Контроль якості.	Компанія володіє доволі сильною пропозицією, максимальна схожі доступні аналоги практично відсутні
Висновки:	Проводити аналіз конкурентних пропозицій, працювати над зниженням собівартості.	Високий ризик входу нових гравців, адже вхідні бар'єри є не дуже високими. потенційних конкурентів немає	Так як концентрація постачальників доволі висока вони не диктують умови роботи на ринку.	Для клієнтів все вагомішим є питання ціни, вони хочуть платити менше. Для задоволення їх потреб потрібно розробляти нові пропозиції і підтримувати якість продукту	Підтримувати хороші позиції на ринку та конкурентну перевагу, розробляти нові види товарів

Провівши аналіз факторів робимо обґрунтування конкурентоспроможності. Точна оцінка конкурентоспроможності можлива лише після впровадження приладу, тому робимо лише попередню оцінку конкурентоспроможності.

Таблиця 4.10.

Обґрунтування факторів конкурентоспроможності

№ п/п	Фактор конкурентоспроможності	Обґрунтування (наведення чинників, що роблять фактор для порівняння конкурентних проектів значущим)
1	Ціна	Підтримка зворотного зв'язку з клієнтами, усунення виникнутих проблем при роботі, вдосконалення приладу, а відповідно збільшення попиту на продукт, що в результаті дозволить знизити ціну.
2	Велика кількість постачальників	Наявність приладу та своєчасна доставка продукту клієнту.
3	Висока якість	Висока якість і точність приладу, яка дозволяє клієнту отримувати максимально точний результат вимірювань.
4	Технічна підтримка	Наявність досвідчених спеціалістів, які зможуть швидко вирішити будь яку проблему в роботі приладу.
5.	Наявність патентів	Наявність патенту на приладу, це дає споживачу упевненість в тому що він купує сертифікований продукт

Таблиця 4.11.

Порівняльний аналіз сильних та слабких сторін приладу

№ п/п	Фактор конкурентоспроможності	Бали 1-20	Рейтинг товарів-конкурентів у порівнянні з нашим приладом							
			-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	
1	Наявність патентів	16	+							
2	Велика кількість постачальників	15				+				
3	Висока якість	17	+							
4	Технічна підтримка	19		+						
5.	Ціна	14								+

З таблиць 4.10 та 4.11 бачимо, що фактори конкурентоспроможності суттєві та мають великий позитивний внесок при впровадженні нового програмного забезпечення для розрахунку концентрації пилю. Основною перевагою та головним досягненням є висока якість продукту та технічна підтримка протягом всього терміну його використання споживачем.

Таблиця 4.12.

SWOT- аналіз стартап-проекту

<p>Сильні сторони: За наявності патентів споживач впевнений в якості отриманого продукту. Завдяки високій якості продукту з'являються нові клієнти.</p>	<p>Слабкі сторони: Так як на ринку багато постачальників, у клієнтів багатий вибір продукту, компанії необхідно проводити рекламу свого продукту і збільшувати кількість його постачальників. За рахунок високої ціни клієнти обирають більш дешевий продукт, що призводить до втрати потенційного заробітку.</p>
<p>Потенційні можливості: 1. Зміниться технологія виготовлення товару. 2. Збільшення попиту на товар на ринку. 3. Політика протекціонізму; підтримка інноваційного виробництва. 4. Може вплинути на купівлю/продаж товару. 5. Підвищення зацікавленості людей впливу різних речовин і продуктів на навколишнє середовище.</p>	<p>Загрози: 1. Можливість появи на ринку іноземних аналогів з кращими характеристиками і нижчою ціною. 2. Зміна курсу гривні, за рахунок чого можуть зменшитися продажі. 3. Може вплинути на коло потенційних покупців. 4. Проблема з підрядними організаціями під час серійного випуску вимірювального засобу 5. Наявність браку в партії виробів</p>

На основі SWOT-аналізу розробляємо альтернативи ринкової поведінки для виведення стартап-проекту на ринок та орієнтовний оптимальний час їх ринкової реалізації з огляду на потенційні проекти конкурентів, що можуть бути виведені на ринок.

Визначені альтернативи аналізуються з точки зору строків та ймовірності отримання ресурсів.

Таблиця 4.13.

Альтернативи ринкового впровадження стартап-проекту

№ п/п	Альтернатива (орієнтовний комплекс заходів) поведінки ринкової	Ймовірність отримання ресурсів	Строки реалізації
1	Стратегія нейтралізації ринкових загроз сильними сторонами стартапу	Висока	1 рік
2	Стратегія компенсації слабких сторін стартапу наявними ринковими можливостями	Висока	1 рік
3	Стратегія виходу з ринку	Низька	

З зазначених альтернатив обираємо стратегію компенсації слабких сторін стартапу наявними ринковими можливостями.

4.4 Розроблення ринкової стратегії проекту

Розроблення ринкової стратегії першим кроком передбачає визначення стратегії охоплення ринку: опис цільових груп потенційних споживачів.

Таблиця 4.14.

Вибір цільових груп потенційних споживачів

№ п/п	Опис профілю цільової групи потенційних клієнтів	Готовність споживачів сприйняти продукт	Орієнтовний попит в межах цільової групи (сегменту)	Інтенсивність конкуренції в сегменті	Простота входу у сегмент
	Промислові компанії	Зазначатиметься готовністю підприємств піти на додаткові витрати пов'язані з вдосконаленням приладу та розширення його функціональних можливостей.	Залежатиме від рівня та від темпу розвитку економіки взагалі і галузі споживача зокрема	Середня	Середні бар'єри входу на ринок
	Державні установи контролю якості продукції.			Середня	Середні бар'єри входу на ринок
	Інститути, вчені яких проводять дослідження в даній області			Середня	Середні бар'єри входу на ринок
	Компанії сфери аудиту промислових процесів				
Які цільові групи обрано: Під час аналізу потенційних груп споживачів було прийнято рішення що компанія буде працювати із промисловими компаніями.					

За результатами аналізу потенційних груп споживачів ми обрали цільові групи, для яких будемо пропонувати свій прилад та визначили стратегію охоплення ринку: стратегію диференційованого маркетингу, тому що працюємо із конкретним сегментом, розробляючи для нього програму ринкового впливу. Для роботи в обраному сегменті ринку необхідно сформувати базову стратегію розвитку.

Таблиця 4.15.

Визначення базової стратегії розвитку

№ п/п	Обрана альтернатива розвитку проекту	Стратегія охоплення ринку	Ключові конкурентоспроможні і позиції відповідно до обраної альтернативи	Базова стратегія розвитку*
	Підсилення сильних сторін стартапу за рахунок ринкових можливостей	Диференційований маркетинг	Якісний продукт, до якого прихильні споживачі, постійний зворотній зв'язок з клієнтами.	Стратегія диференціації

Наступним кроком є вибір стратегії конкурентної поведінки (Табл. 4.16).

Таблиця 4.16.

Визначення базової стратегії конкурентної поведінки

№ п/п	Чи є проект «першопрохідцем» на ринку?	Чи буде компанія шукати нових споживачів, або забирати існуючих у конкурентів?	Чи буде компанія копіювати основні характеристики товару конкурента, і які?	Стратегія конкурентної поведінки*
	Ні	Передбачається розвиток ринку	Ні, не буде. Буде проводитися випуск унікальної продукції	Зайняття конкурентної ніші

На основі вимог споживачів з обраного сегменту до постачальника і продукту, а також в залежності від стратегії розвитку та стратегії конкурентної поведінки розробляємо стратегію позиціонування, яка визначається у формування ринкової позиції, за яким споживачі мають ідентифікувати проект.

Таблиця 4.17.

Визначення стратегії позиціонування

№ п/п	Вимоги до товару цільової аудиторії	Базова стратегія розвитку	Ключові конкурентоспроможні позиції власного стартап-проекту	Вибір асоціацій, які мають сформувані комплексну позицію власного проекту (три ключових)
	Вдосконалення продукту враховуючи побажання споживачів	Стратегія диференціації	Висока якість продукту. Формування лояльності і прихильності споживачів	Якість. Ціна. Зворотній зв'язок із виробником. Технічна підтримка.

Результатом даного підрозділу є система рішень щодо ринкової поведінки компанії, вона визначає в якому напрямі буде працювати компанія на ринку.

4.5 Розроблення маркетингової програми стартап-проекту

Під час розроблення маркетингової програми першим кроком є розробка маркетингової концепції товару, який отримає споживач. У таблиці 5.18 підсумовуємо результати аналізу конкурентоспроможності товару.

Таблиця 4.18.

Визначення ключових переваг концепції потенційного товару

№ п/п	Потреба	Вигода, яку пропонує товар	Ключові переваги перед конкурентами (існуючі або такі, що потрібно створити)
	Потреба в контролі складу продуктів, для безпеки їх використання.	Отримання результатів про склад продукції, який важко або неможливо визначити іншими пристроями або методами.	Постійна технічна підтримка. Безперебійна робота приладу. Систематизація та спрощення обробки результатів досліджень.

Таблиця 4.19.

Опис трьох рівнів моделі товару

Рівні товару	Сутність та складові		
I. Товар за задумом	Створення приладу для розпізнавання та визначення концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук на основі флуорисцентної люмінесценції. Можна виділити наступні вигоди використання: Максимально точне визначення складу продуктів.; Можливість розповсюдження продуктів на міжнародні ринки, завдяки прозорості їх складу.		
II. Товар у реальному виконанні	Властивості/характеристики	М/Нм	Вр/Тх /Тл/Е/Ор
	1.Довговічність (немає строку давності)	Нм	Тх
	2. Гарантійний термін (довгий термін)	Нм	Е
	3.Досконалість виробничого виконання (Досконалий дизайн)	Нм	Тл
	4.Вартість обслуговування (Низька вартість обслуговування)	Нм	Вр
Якість: відповідає нормам ДСТУ EN 61326-2-1:2016, ДСТУ EN 61010-2-033:2017			
Пакування: прилад в портативному корпусі із стильним дизайном, антивібраційне пакування. Присутній паспорт на виріб та ТУ.			
Марка: реєстрована товарна марка на ринку України			

Продовження таблиці 4.19.

III. Товар із підкріпленням	До придбання товару, користувач може запросити до себе спеціаліста та протестувати прилад, провівши на ньому ряд необхідних досліджень протягом одного робочого дня.
	Після придбання товару один раз в квартал клієнта буду відвідувати спеціаліст для налаштування, калібровки, усунення несправностей, та неточностей у роботі приладу.
За рахунок чого потенційний товар буде захищено від копіювання: Від копіювання товар буде захищено шляхом патентування коду (отримання сертифікату про інтелектуальну власність) та надання кожній проданій копію індивідуального ліцензійного коду який необхідно вводити при запуску приладу.	

Далі визначаємо цінові межі, якими необхідно користуватися при визначенні ціни продукту, щоб він користувався попитом на ринку. При аналізі цінових меж та встановленні ціни необхідно враховувати ціни на прилад, які пропонують конкуренти та доходи потенційних клієнтів (Таблиця 4.20).

Таблиця 4.20.

Визначення меж встановлення ціни

№ п/п	Рівень цін на товари-замінники	Рівень цін на товари-аналоги	Рівень доходів цільової групи споживачів	Верхня та нижня межі встановлення ціни на товар/послугу
	28000 – 120 000 грн.	35800 – 61100 грн.	500 000 – 1 500 000 грн.	16740-20460 грн.

Таблиця 4.21.

Формування системи збуту

№ п/п	Специфіка закупівельної поведінки цільових клієнтів	Функції збуту, які має виконувати постачальник товару	Глибина каналу збуту	Оптимальна система збуту
	Покупка товару один раз	Доставка товару покупцю, його встановлення та пуск.	Канал збуту нульового рівня	Мережа інтернет

Таблиця 4.22.

Концепція маркетингових комунікацій

№ п/п	Специфіка поведінки цільових клієнтів	Канали комунікації, якими користуються цільові клієнти	Ключові позиції, обрані для позиціонування	Завдання рекламного повідомлення	Концепція рекламного звернення
	Необхідність	Мережа	Спеціаліз	Проінформувати	Вбережи себе від

	контролю якості	інтернет, виставки,	овані виставки	клієнта про те, що за допомогою	впливу небезпечних
--	-----------------	---------------------	----------------	---------------------------------	--------------------

Продовження таблиці 4.22.

	продукції та визначення наявності небезпечних домішок у них. Можливість виведення продукції на міжнародні ринки, через чистоту і прозорість їх складу.	семінари, друкована продукція.		приладу стає можливим максимально точно визначення складу продуктів, а відповідно наявності в них домішок і речовин, які важко визначити звичними методами, про які замовчують виробники, проте вони можуть нести загрозу здоров'ю та життю.	речовин у продуктах. Не знаєш, що всередині – не їж! Спочатку перевір! Не вір тому, що пишуть на етикетці – перевіряй. Хочеш бути здоровим – вживай лише корисне. Ми – це те, що ми вживаємо і в якій кількості.
--	--	--------------------------------	--	--	--

Результатом є ринкова програма просування розробленого в рамках наших досліджень вимірювального засобу яка включає концепцію збуту, просування, аналіз ціноутворення. Ринкова програма залежить від цінностей та потреб потенційних клієнтів, переваги ідеї, стан ринку на якому буде впроваджено проект на даний момент та його динаміку.

4.6 Висновки

Загальним результатом проекту «Кількісний аналіз фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом» є наукове обґрунтування доцільності використання засобів та методів визначення відносних концентрації здатних до люмінесценції хімічних сполук на основі флуорисцентної фотостимульованої люмінесценції в процесі визначення інформативних параметрів продуктів харчування методами експрес-аналізу.

Широке застосування методу пов'язано, в першу чергу, з доступністю, дешевизною і простотою обслуговування приладів, які використовуються для здійснення методу, – фотоелектроколориметрів і спектрофотометрів. При цьому аналітичні характеристики методу досить високі.. Метод відносно

багатьох визначених компонентів відрізняється високою універсальністю та вибірковістю.

Якщо не потрібно проведення точних спектральних вимірювань швидко протікаючих процесів, а потрібно виміряти інтенсивність флуоресценції при збудженні і реєстрації в відносно широкій області спектру (10 ± 1 нм), то можна використовувати найпростіший флуориметр зі світлофільтрами. При вимірі люмінесценції істотним є вибір світлофільтрів, необхідних для виділення спектру, що збуджує люмінесценцію, і обрізання виходу люмінесценції.

Проведені нами дослідження квантового виходу люмінесценції вибраних хімічних сполук та наведені в роботі статистичні дані, показують переваги даного методу в експрес-діагностиці та при поточних операціях контролю інформативних параметрів досліджуваних зразків. Даний метод має високу вибірковість та достатню точність вимірювань у рамках експрес-тестів, є мало затратним та потребує вимірювального обладнання з низькою металоємністю, а також характеризуються відсутністю впливу на об'єкт дослідження.

Подальше практичне впровадження вищезазначених методів та засобів пропонується у вигляді промислового зразка вимірювального засобу, що може використовуватися у багатьох сферах харчової промисловості та державних органах метрологічного контролю.

Довгостроковими результатами нашої роботи є апробація розробленого макету вимірювальної установки в різних режимах роботи, його удосконалення та формування бази даних відгуків хімічних сполук різних концентрацій в стандартних розчинниках.

В подальшому планується проведення дієвої рекламної компанії за допомогою електронних та друкованих профільних для галузі застосування засобу вимірювань видань, для зацікавлення продуктом потенційних користувачів.

ВИСНОВКИ

Метою нашої магістерської дисертації було вдосконалення кількісного аналізу фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом.

Дослідження проведені нами та наведені в роботі дані демонструють переваги даного методу в експрес-діагностиці. Даний метод має високу вибірковість та достатню точність вимірювань в рамках експрес-методів, є мало затратним та потребує вимірювального обладнання з низькою металоємністю.

У ході виконання магістерської дисертації було:

1. Проведено огляд методик виявлення органічних сполук певного хімічного складу методами та засобами фотостимульованої люмінесценції.

2. Виконано дослідження факторів та ефектів, які визначають похибку вимірювання люмінесценції (ефект внутрішнього фільтра та вторинного поглинання).

3. Проведено ряд спектрофотометричних досліджень. Аналіз шляхів вдосконалення підходів до використання напівпровідникових фотодетекторів у якості первинних перетворювачів для реєстрації вибраних органічних сполук методами оптично стимульованої люмінесценції.

Загальним результатом проекту «Кількісний аналіз фосфоліпідів в процесі переробки житніх культур люмінесцентним методом» є наукове обґрунтування ефективності використання засобів та методів визначення концентрації здатних до люмінесценції сполук на основі фотостимульованої люмінесценції в процесі визначення інформативних параметрів харчових продуктів методами експрес-аналізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Глоба И.И. Оптические методы и приборы контроля качества.- Минск, БГТУ, 2003, 424 с.
2. Берштейн И. Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И. Я. Берштейн, Ю. Л. Каминский. – Л. : Химия, 1975. – 232 с.
3. Другов Ю.С., Родип А.А. Пробоподготовка в экологическом анализе. С-Петербург, Анатолия, 2002.С 283.
4. Глоба И.И., Ламоткин С.А. Хроматографические и спектральные методы анализа.- Минск, БГТУ, 2008. 408 с.
5. Дрозд А. В. Внутрішньолабораторна перевірка якості спектрофотометричних вимірювань / А. В. Дрозд, Н. О. Леонова, О. С. Каліненко // Метрологія та прилади.– 2010. – № 5 (25). – С. 62–66.
6. Кижя Д. А., Лукин С.Б. Фотолюминесцентные методы контроля качества кофе. /Д.А. Кижя, С.Б. Лукин, // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2006. – №8 (31). – С. 131-138.
7. Лукин С.Б., Демин Р.Е. Исследование возможности диагностики качества мясных продуктов на основе спектров люминесценции. /С.Б. Лукин, Р.Е. Демин// Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2004. – №12. – С. 172-175.
8. Люминесцентный метод контроля / Е.И.Тимошкин, Г.А.Маршалкин, А.В.Титкова, И.С.Алехина // Пищевая пром-сть. 1989. - №12. - с. 54- 55.
9. Орлова А.О., Маслов В.Г. Применение метода последовательных исключений для определения люминесцирующих компонент фотосинтезирующих объектов. Оптический журнал, 2002, Т.69, №3, С.21-24
10. Специфікація мікроконтролеру АТmega328. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: http://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/Atmel-42735-8-bit-AVR-Microcontroller-ATmega328-328P_Data_sheet.pdf – Назва з екрану.

11. Гусева Е.В., Орлов Р.Ю. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (Рамановская спектроскопия). Применение в минералогии и материаловедении.- 2013-С.13-16
12. Горобец, Б. С. Спектры люминесценции минералов / Б.С. Горобец, А.А. Рогожин. - М.: Всероссийский научно-исследовательский институт минерального сырья. -2001-С.316
13. Столяров К. П., Григорьев Н. Н. Введение в люминесцентный анализ неорганических веществ. — Л., 1967. — 364 с.
14. Описание анализатора речовини Флюорат-02. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <https://www.lumex.ru/catalog/flyuorat-02-5m.php> – Назва з екрану.
15. Описание спектрофотометра DR1900. [Электронный ресурс]: <https://ru.hach.com/dr1900/product?id=38978855079> – Назва з екрану.
16. Описание спектрофотометра DR6000. [Электронный ресурс]: <https://ru.hach.com/-/dr6000/family?productCategoryId=22216202845> – Назва з екрану.
17. Описание спектрофотометра DR6000. [Электронный ресурс]: <https://solar.by/spektrofotometr-uv/> – Назва з екрану.