

Министерство образования Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова

В.Н. Казин, Г.А. Урванцева

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
В ЭКОЛОГИИ И БИОЛОГИИ**

Учебное пособие

Ярославль 2002

ББК Ес25я73
К 14
УДК 543.87

Казин В.Н., Урванцева Г.А.

Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: Учебное пособие / Яросл. гос. ун-т. Ярославль, 2002. 172 с.

Учебное пособие написано в соответствии с содержанием Государственных образовательных стандартов и программой дисциплины “Физико-химические методы анализа” по специальности “013100-Экология”, направлению “511100-Экология и природопользование” и программой большого практикума (раздел “Физико-химические методы анализа”), который выполняется студентами по специальности “011600-Биология”.

В нем изложены основы физико-химических методов анализа. Даны принципиальные схемы основных установок и приборов. Рассмотрены условия и области применения методов, их достоинства и недостатки, ограничения, перспективы развития и другие особенности и характеристики.

В конце каждой главы дано описание практических работ, приведены контрольные вопросы.

Предназначено для студентов-экологов, биологов, химиков, аспирантов, научных работников и учителей школ.

Рецензенты: кафедра аналитической химии и контроля качества продукции Ярославского государственного технического университета; М.В. Дорогов, д-р хим. наук, профессор кафедры органической химии Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского.

ISBN

© Ярославский государственный университет, 2002
© Казин В.Н., Урванцева Г.А., 2002

Казин Вячеслав Николаевич
Урванцева Галина Александровна

Физико-химические методы исследования в экологии и биологии

Редактор, корректор А.А. Аладьева
Компьютерная верстка И.Н. Ивановой

Подписано в печать 16.09.2002 г. Формат 60x84/16. Бумага тип.
Усл. печ. л. 10,2. Уч.-изд. л. 8,9. Тираж 100 экз. Заказ .

Оригинал-макет подготовлен в редакционно-издательском отделе
Ярославского государственного университета.
150000 Ярославль, ул. Советская, 14.

Основные обозначения

$C(A)$ – молярная концентрация вещества “А” (в СИ основной единицей является моль/м³, а рекомендуемой для практики единицей является моль/дм³ или моль/л)

A - абсорбция вещества (оптическая плотность)

ПААГ – полиакриламидный гель

ОЭП – относительная электрофоретическая подвижность

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ПАУ – полиароматические углеводороды

ТСХ – тонкослойная хроматография

АМХП – автоматизированное многократное хроматографическое проявление

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

R_f – коэффициент скорости движения

K_d - коэффициент распределения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ПИД – пламенно-ионизационный детектор

Введение

Физико-химические методы анализа и исследования - это условное название большого числа способов количественного и качественного определения веществ, которые предполагают, как правило, применение различных, часто довольно сложных, измерительных приборов. За рубежом в большом распространении термин “инструментальные методы анализа” или “приборные методы”. В основе физико-химических методов лежат законы физики и физической химии, а аппаратное оформление основано на применении современных достижений оптики и электроники.

В последние десятилетия наблюдается быстрое совершенствование физико-химических методов анализа и исследования, за которым не успевают следить ни промышленность, ни вузовские программы. Постоянно открываются новые свойства веществ, которые могут привести к созданию новых методов. Поэтому важно и нужно прежде всего знать фундаментальные свойства и общие закономерности, на которых основано развитие тех или иных родственных методов. Для Вас важно уметь выбрать метод, наиболее подходящий в данных обстоятельствах, дающий наибольшую информацию. Вы должны отметить, что не существует универсального метода, пригодного на все случаи жизни. В последние годы получило развитие совместное использование двух или более методов.

Методы анализа, основанные на наблюдении измерений физических свойств анализируемой системы (интенсивность окраски, электропроводность, потенциал электрода и т.п.), происходящих в результате определенных химических реакций, называют физико-химическими методами.

Общее число физико-химических методов анализа довольно велико – оно составляет несколько десятков. Наибольшее практическое значение среди них имеют следующие:

- 1) спектральные и другие оптические методы;
- 2) электрохимические методы;

3) хроматографические методы анализа.

Среди указанных трех групп наиболее обширной по числу методов и важной по практическому значению является группа спектральных и других оптических методов анализа. Она включает методы эмиссионной атомной спектроскопии, атомно-абсорбционной спектроскопии, электронной и инфракрасной спектроскопии, спектрофотометрии и другие методы, основанные на измерении различных эффектов при взаимодействии вещества с электромагнитным излучением.

Группа электрохимических методов анализа, основанная на измерении электрической проводимости, потенциалов и других свойств, включает методы кондуктометрии, потенциометрии, вольтамперометрии и т.д.

В группу хроматографических методов входят методы газовой и газожидкостной хроматографии, жидкостной распределительной, тонкослойной, ионообменной и других видов хроматографии.

Перечень групп является далеко не полным, так как сюда не вошли многие методы (резонансные методы радиоспектроскопии, масс-спектрометрические и др.). Эти методы будут рассмотрены отдельно, что, конечно, ни в коей мере нельзя считать признаком их второстепенности.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ (ОПТИЧЕСКИЕ) МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Сочетание высокой чувствительности, точности и быстродействия объясняет широкое распространение спектральных методов в биологии, экологии, химии, медицине, сельском хозяйстве и других областях знаний. Оптические методы позволяют получить сведения о строении и свойствах молекул и веществ в целом и применяются для изучения состояния биообъектов и характера изменений этого состояния в биологических системах (процессы полимеризации, деградации, связывание с другими молекулами, образование и распад фермент-субстратных комплексов, первичные фотофизические, а также фото- и радиационно-химические процессы с участием неустойчивых лабильных продуктов радикальной природы и т.д.).

Спектральные методы анализа основаны на взаимодействии электромагнитного излучения с веществом. Можно представить себе два случая такого взаимодействия. В первом из них излучение направляется на вещество и частично им поглощается. Метод анализа, в котором используются спектры поглощения, называется абсорбционной спектроскопией.

Другая область спектрального анализа рассматривает собственное излучение вещества, приведенного в возбужденное состояние каким-либо посторонним источником энергии. В большинстве случаев вещество нагревают в пламени газовой горелки, вольтовой дуги, в плазме электрического искрового разряда. В люминесцентных методах и при изучении комбинационного светорассеяния анализируемое вещество облучают потоком электромагнитных волн, энергия которых превращается во вторичное излучение. Перечисленные методы относятся к эмиссионной спектроскопии.

Основные характеристики электромагнитного излучения

Электромагнитное излучение имеет двойственную природу - оно обладает волновыми и корпускулярными свойствами. К волновым характеристикам относятся частота колебаний, длина волны и волновое число, к квантовым – энергия квантов.

Частота колебаний (ν) – число колебаний в единицу времени. Единицей частоты служит герц (Гц) или с^{-1} (1 Гц = 1 колебание в секунду).

Длина волны (λ) есть расстояние между соседними максимумами. Длина волны в Международной системе единиц (СИ) измеряется в метрах (м) и его долях - сантиметрах (см), миллиметрах (мм), нанометрах (1 нм = 10^{-9} м), ангстремах (1 Å = 10^{-10} м).

Еще одной весьма удобной величиной является волновое число ($\bar{\nu}$):

$$\bar{\nu} = 1/\lambda \text{ [см}^{-1}\text{]}.$$

Волновое число показывает, сколько длин волн данного излучения укладывается в 1 см. По сложившейся традиции излучение в инфракрасной области определяют в волновых числах.

Спектр электромагнитных колебаний удобно разбить на несколько областей (табл. 1.1.). Деление спектра на области важно потому, что взаимодействие излучения с изучаемой системой в каждой из них протекает по различным механизмам и дает разную информацию.

Таблица 1.1.

Спектр электромагнитных колебаний

Область спектра	Интервал длин волн (λ)
Радиоволны	> 1 м
Микроволны	10^{-3} –1 м
Инфракрасное излучение	750– 10^6 нм или $7,5 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-3} м
Видимый свет	400–750 нм или $4 \cdot 10^{-7}$ – $7,5 \cdot 10^{-7}$ м
Ультрафиолетовое излучение	10–400 нм или 10^{-8} – $4 \cdot 10^{-7}$ м
Рентгеновское излучение	10^{-2} –10 нм или 10^{-11} – 10^{-8} м
γ -Излучение	10^{-4} –0,1 нм или 10^{-13} – 10^{-10} м

Каждая область электромагнитных колебаний охватывает определенный интервал длин волн и характеризуется определенным уровнем энергии. Энергия электромагнитного излучения определяется соотношением Бора:

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda = hc \bar{\nu}$$

где h - постоянная Планка, равная $6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж·с,

c - скорость света в вакууме ($c = 3 \cdot 10^8$ м/с).

Количество поглощаемой энергии может иметь только строго определенные значения, т.е. поглощается излучение только определенной частоты. Поглощение излучения, а следовательно, и энергии происходит в том случае, если квант излучения соответствует разности между двумя энергетическими уровнями облучаемого вещества.

В органической химии для исследования строения молекул чаще всего используются следующие области, различающиеся энергией квантов:

- наибольшая энергия требуется для возбуждения электронов; эта энергия соответствует излучению в ультрафиолетовой и видимой области (электронная спектроскопия);

- меньшие затраты энергии необходимы для изменения колебательных уровней молекулы, связанных с изменением длин связей и углов в инфракрасной области (колебательная спектроскопия);

- еще меньшая энергия необходима для переориентации спинов ядер, которая может вызываться квантами радиочастотного излучения (спектроскопия ядерного магнитного резонанса).

Глава 1.

Абсорбционная спектроскопия

Абсорбционная спектроскопия имеет дело со спектрами, характеризующими способность веществ поглощать энергию электромагнитного излучения. Нами будут рассмотрены только основные методы абсорбционного спектрального анализа – анализ по электронным и колебательным спектрам.

1.1. Законы поглощения света

Атом, ион или молекула, поглощая квант света, переходит в более высокое энергетическое состояние. Обычно это бывает переход с основного, невозбужденного уровня на один из более высоких, чаще всего на первый возбужденный уровень.

В спектроскопии применяются источники излучения, которые испускают лучи в широкой спектральной области. Такие излучения называются полихроматическими. Из полихроматического излучения выделяют узкие по интервалу длин волн излучения, которые принято называть монохроматическими. Для этой цели пользуются светофильтрами или монохроматорами. Монохроматическим называют излучение, заключенное в таком узком интервале длин волн, что дальнейшее его сжатие не позволяет получить о веществе дополнительную информацию.

Оптические свойства растворов исследуют, наливая их в специальные кюветы. На стенке кюветы обычно указывается ее длина “ l ” (толщина).

Ослабление монохроматического светового луча, направленного сквозь кювету с анализируемым веществом, происходит в простейшем случае по трем причинам. Во-первых, может иметь место рассеяние света мутной средой, во-вторых, часть падающего излучения может отражаться поверхностью образца и, в-третьих, - поглощаться им. В дальнейшем будет принято во

внимание только поглощение света, когда рассеянием и отражением можно пренебречь.

Пропустим сквозь слой вещества длиной “ l ” монохроматический световой поток “ I_0 ”. Выходящий световой поток “ I ”, вообще говоря, слабее падающего.

Закон Бугера–Ламберта утверждает, что одинаковые слои одного и того же вещества поглощают свет в одинаковой степени независимо от интенсивности падающего потока:

$$I=I_0 \cdot 10^{-kl},$$

где k - коэффициент поглощения, который зависит от оптических свойств вещества.

Исследуя окрашенные растворы, Беер установил, что коэффициент поглощения $k=\varepsilon \cdot C$, где C - концентрация (моль/л), ε - молярный коэффициент ослабления или экстинкции (л/моль·см). Значение молярных коэффициентов ослабления различных соединений может меняться от долей единицы до 100 000. Коэффициент экстинкции во многих случаях может служить характеристикой вещества, подобно показателю преломления или удельному весу.

Уравнение, переписанное в виде:

$$I=I_0 \cdot 10^{-\varepsilon C l},$$

называют законом Бугера-Ламберта-Беера, который связывает уменьшение интенсивности света, прошедшего через слой светопоглощающего вещества, с концентрацией вещества и толщиной слоя. Чтобы учесть потери света на отражение и рассеяние, сравнивают интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор и чистый растворитель.

Отношение I/I_0 называется светопропусканием или прозрачностью образца “ T ” (изменяется от 0 до 100 % или от 0 до 1).

$$T=10^{-\varepsilon C l}, \text{ или } \lg T=-\varepsilon \cdot C \cdot l, \text{ или } \lg 1/T=\varepsilon \cdot C \cdot l.$$

Обозначив $\lg 1/T=A$, где A – абсорбция вещества (или используется термин “оптическая плотность”), запишем уравнение в следующей форме (закон Беера):

$$A=\varepsilon \cdot C \cdot l.$$

Абсорбция вещества (безразмерная величина) изменяется от нуля (абсолютно прозрачные растворы) до бесконечности (абсолютно непрозрачные растворы).

Таким образом, концентрацию растворенного вещества можно определить без каких-либо химических операций, измеряя абсорбцию вещества в монохроматических лучах с заранее выбранной длиной волны. Такой метод анализа называется колориметрическим.

Закон Бееера удобно изображать в графической форме, откладывая опытные значения “А” и концентрации раствора по осям координат (рис. 1.1.).

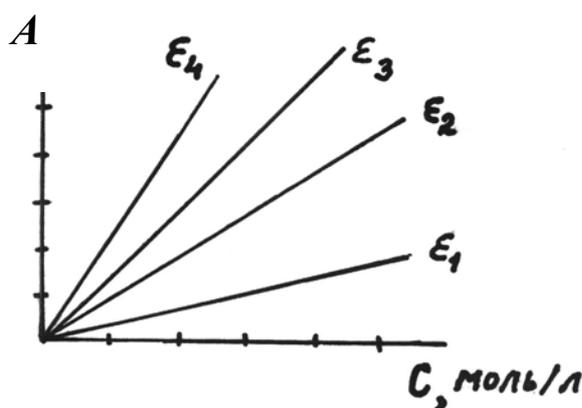


Рис. 1.1. Графический способ выражения закона Бееера:
 $l = \text{const}; \epsilon_4 > \epsilon_3 > \epsilon_2 > \epsilon_1$

Угловой коэффициент прямых, проходящих через начало координат, равен $\text{tg} \alpha = \epsilon \cdot l$, откуда можно найти коэффициент ослабления. Чувствительность колориметрического метода определяется величиной $dA/dC = \text{tg} \alpha = \epsilon \cdot l$. Чем выше коэффициент экстинкции (при $l = \text{const}$), тем чувствительнее метод.

Широкое применение находит в химии простая аналитическая процедура определения концентрации по методу калибровочных кривых. Она не требует вычисления коэффициента ослабления, концентрация находится непосредственно по графику. Приготавливают несколько растворов анализируемого вещества с известными концентрациями и измеряют в одной и той же кювете абсорбцию вещества. Результаты наносят на график. Затем в той же кювете измеряют величину “А” анализируемого раствора и находят концентрацию.

Закон Бееера, вообще говоря, выполняется во всех случаях, когда вещество не изменяет своих свойств при разбавлении или концентрировании растворов (рис. 1.2., кривая 1). Изменения в

поглощению могут возникать при сольватации растворенных веществ, ассоциации молекул друг с другом (кривая 2 - положительное отклонение) или, напротив, при диссоциации с образованием большего числа поглощающих частиц (кривая 3 - отрицательное отклонение).

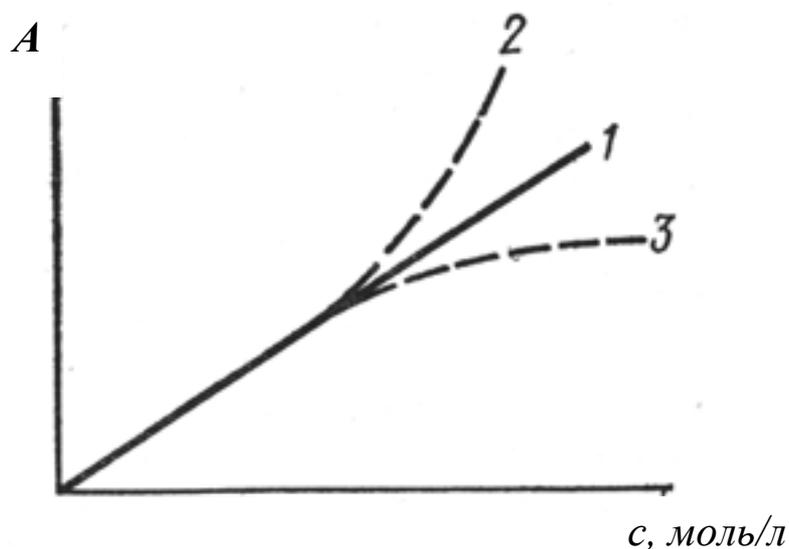


Рис. 1.2. Отклонения от закона Бейера

Отклонения от закона Бейера - весьма распространенное явление, особенно для растворов красителей при достаточно высоких концентрациях. Построение калибровочной кривой, кроме своего основного назначения (определение концентрации), позволяет проверить выполнимость закона Бейера для растворов. Метод калибровочных кривых применим и для растворов, не подчиняющихся закону Бейера.

1.2. Электронная спектроскопия (ультрафиолетовая и видимая области)

1.2.1. Механизм поглощения видимых и ультрафиолетовых лучей

По механизму взаимодействия с веществом видимые лучи близки прилежащей к ней ультрафиолетовой части спектра (табл. 1.1). Выделение видимой части спектра в самостоятель-

ную область обусловлено субъективными причинами - границами восприятия электромагнитного излучения человеческим глазом.

При поглощении видимых и ультрафиолетовых лучей изменяется энергетическое состояние электронных оболочек атомов и молекул. Спектры поглощения, полученные в этих областях, называются электронными.

Поглощение веществом электромагнитных колебаний в ультрафиолетовой и видимой области обусловлено переходом электронов со связующих орбиталей на разрыхляющие орбитали. Такое состояние молекулы называется возбужденным (обычно изображается *).

При взаимодействии с квантом света, поглощая энергию, электрон может переходить с высшей заполненной на низшую вакантную орбиталь. Электроны в атомах и молекулах занимают орбитали со строго определенной энергией. В обычных органических молекулах присутствуют электроны σ - и π -связей, а также электроны неподеленных пар гетероатомов (O, N, S и т.д.) или n - электроны. Их относительные энергетические уровни и сравнительные энергии возможных переходов представлены на рис. 1.3.

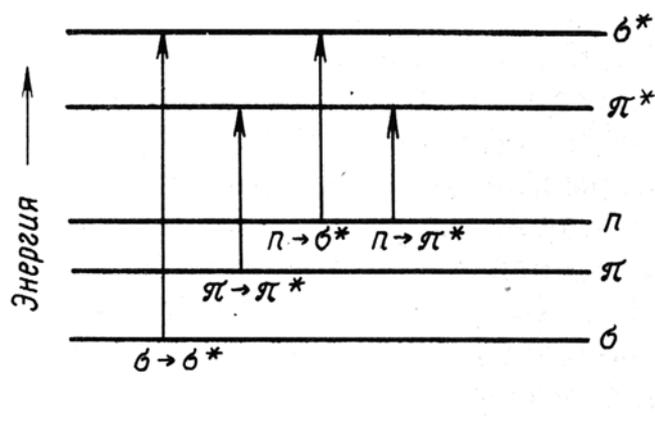


Рис. 1.3. Схема электронных уровней и энергия возможных электронных переходов

Наибольшая энергия кванта необходима для осуществления перехода $\sigma \rightarrow \sigma^*$, т.е. для возбуждения электронов наиболее прочной σ -связи необходимы кванты света минимальной дли-

ны. Энергия переходов $n \rightarrow \sigma^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ меньше, и, следовательно, длина волны света, возбуждающего такой переход, соответственно больше. Практическое значение имеют переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$, поскольку только им соответствуют длины волн, попадающие в рабочий диапазон прибора.

Группировки, вызывающие избирательное поглощение электромагнитного колебания в видимой и ультрафиолетовой части спектра, называются **хромофорами**.

Основными хромофорами, дающими максимум поглощения в области 200 – 800 нм, являются системы сопряженных двойных связей. Сопряженные двойные связи будут поглощать кванты света с большей длиной волны, чем изолированные двойные связи. Для изолированных кратных связей в используемом для измерений интервале проявляется только переход карбонильной группы $C=O$ ($\lambda_{\max} = 270$ нм). В ароматических системах переход электрона в возбужденное состояние осуществляется также при меньшей затрате энергии, чем в случае изолированной двойной связи.

Таким образом, основными хромофорами в УФ-спектроскопии являются сопряженные $C=C$ -связи, карбонильная группа $C=O$, системы $C=C-C=O$, ароматическое ядро. Исключение составляют переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ изолированных двойных связей $C=C$ и $C=N$ -, а также тройных связей $C \equiv C$ и $C \equiv N$ ($\lambda_{\max} = 650-180$ нм).

1.2.2. Спектры поглощения

Если плавно изменять длину волны падающего на вещество светового потока, то коэффициент ослабления вещества изменяется по довольно сложной зависимости.

Функция, связывающая коэффициент ослабления с длиной волны, называется **спектром поглощения (абсорбции) вещества**.

Спектрами называются также и другие оптические характеристики веществ: абсорбция вещества и светопропускание, вычерченные в зависимости от длины волны, частоты или волнового числа (рис. 1.4.).

Спектр поглощения удобен для качественного анализа и идентификации, и может претендовать на роль своеобразного паспорта вещества. Практически нет случаев, чтобы различные по химическому строению вещества имели полностью совпадающие спектры.

УФ-спектр органического вещества характеристичен, т.к. поглощение определяется только собственно хромофором и его ближайшим окружением, т.е. один и тот же хромофор проявляется практически одинаково как в исключительно простых, так и самых сложных молекулах.

В зависимости от непосредственного окружения одной и той же хромофорной группировки положение максимума поглощения в УФ-спектрах различных соединений может несколько меняться. Введение в молекулу различных заместителей или изменение внешних условий, например растворителя, обычно вызывает сдвиг полосы поглощения. Сдвиг максимума в сторону более длинных волн принято называть батохромным сдвигом (обусловлен наличием атома галогена, гидрокси-, аминно-, алкильных групп), а сдвиг в сторону более коротких волн – гипсохромным (например, образование водородной связи с растворителем).

А А А

Рис. 1.4. Некоторые способы изображения спектров поглощения

УФ-спектр в большинстве случаев представляет собой кривую с одним пологим максимумом (рис. 1.5.).

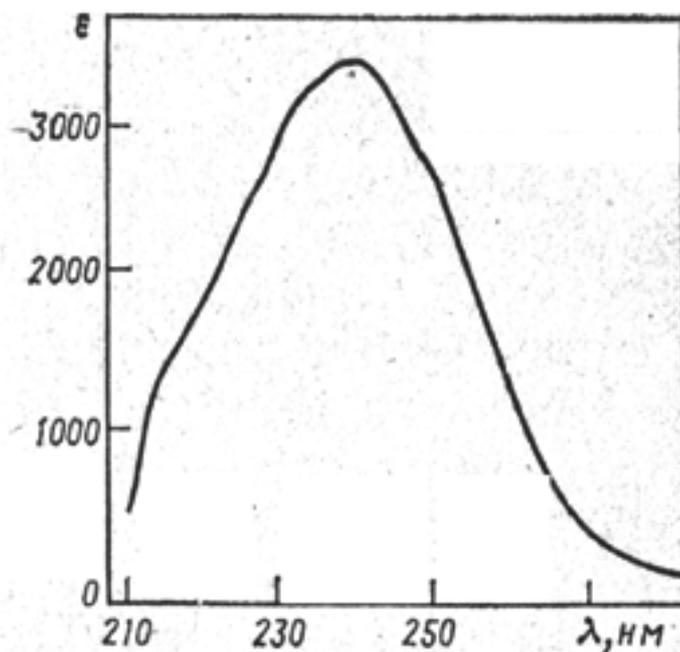


Рис. 1.5. УФ-спектр циклопентадиена

Уширение полос связано с сильным влиянием молекул растворителя на энергетические уровни электронов, ответственных за светопоглощение, и наложением колебательных переходов на электронный переход (помимо основных уровней электронных переходов существуют подуровни, связанные с колебаниями молекулы).

Обычно УФ-спектр характеризуют длиной волны, при которой наблюдается максимум поглощения, и молярным коэффициентом ослабления в этом максимуме. Например, спектр циклопентадиена (рис. 1.5.) достаточно точно может быть передан записью: λ_{max} (в гексане) 240 нм (ϵ 3400). УФ-спектр вещества может иметь несколько максимумов поглощения, каждый из которых соответствует различным типам электронных переходов. В этом случае при цифровой записи спектра перечисляются длины волн максимумов поглощения и в скобках приводятся значения “ ϵ ”, соответствующие данному максимуму.

Молярный коэффициент ослабления для каждого поглощающего в УФ-области вещества при данной длине волны в одном растворителе имеет строго постоянное значение (издаются атласы спектров поглощения веществ, таблицы).

В качестве растворителей в УФ-спектроскопии используются вещества, не имеющие поглощения в исследуемой области спектра и не реагирующие с растворенным веществом (гексан, гептан, циклогексан, спирты, вода, галогенопроизводные, простые эфиры, кислоты и др.).

Интенсивность поглощения в спектре связана с вероятностью данного типа электронного перехода. Наибольшей интенсивностью в спектрах поглощения обладают полосы, обусловленные переносом электрона от одного атома к другому (полосы переноса заряда). Более правильно следует говорить о переносе электрона между молекулярными орбиталями, локализованными у разных атомов. К ним относятся многие $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходы. Однако не все переходы осуществляются в действительности. Существуют так называемые правила отбора, определяющие разрешенные и запрещенные переходы. Эти правила учитывают в основном симметрию молекулы, а также симметрию основного и возбужденного состояний. Запрещены переходы, при которых происходит изменение спина электрона. Интенсивность поглощения, соответствующего разрешенным переходам, обычно более высока, молярный коэффициент ослабления достигает тысяч, а иногда и сотен тысяч единиц, тогда как для запрещенных переходов значение “ ϵ ” составляет десятки, реже – сотни единиц.

1.2.3. Устройство приборов

Приборы для селективного поглощения излучения растворами называются спекрофотометрами. При всем многообразии схем и конструктивных особенностей приборов абсорбционной спектроскопии в каждом из них имеется несколько основных узлов, функции которых примерно одинаковы в разных приборах. Такими узлами являются: источник света, монохроматор света, кювета с исследуемым веществом, приемник света.

В приборах абсорбционной спектроскопии свет от источника освещения проходит через монохроматор и падает на кювету с исследуемым веществом. Интенсивность монохромати-

ческого света, прошедшего через кювету, измеряется приемником света.

В видимой области источником света являются специальные лампы накаливания с вольфрамовой спиралью с высокой температурой нити, чтобы максимум испускания был смещен как можно дальше в видимую область. Такие лампы называют перекальными.

В качестве источника УФ-излучения обычно применяется водородная (дейтериевая) лампа: электрическая дуга в атмосфере водорода при низком давлении, которая дает практически непрерывный спектр излучения в области 200 – 400 нм. Кроме того, используют ртутные лампы. В ртутной лампе разряд происходит в парах ртути. Возбужденные атомы ртути испускают линейчатый спектр, в котором преобладает излучение с длиной волны 254, 302, 334 нм.

Монохроматоры и светофильтры предназначены для выделения из полихроматического спектра источника узкого участка, который в условиях опыта можно считать монохроматическим.

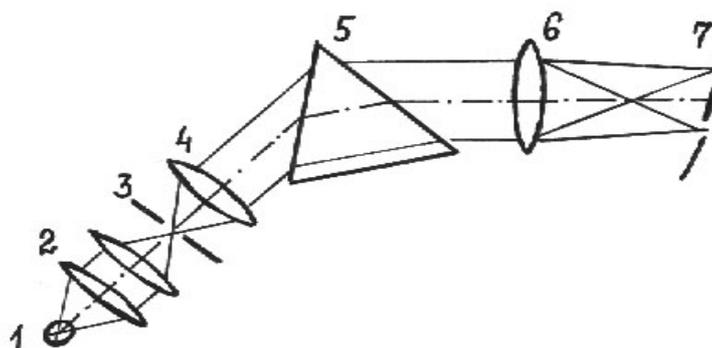
Светофильтры – это окрашенные стекла, пропускающие полосу 20 – 50 нм. Светофильтры применяют в колориметрах для выделения спектрального участка, в котором анализируемый раствор имеет наибольшую величину абсорбции (поглощения). Колориметры имеют набор светофильтров, непрерывно перекрывающих весь видимый участок спектра.

Плавное изменение длины волны светового потока возможно с помощью монохроматоров. Наибольшее распространение имеют призмные монохроматоры и монохроматоры с дифракционной решеткой.

Основным элементом призмного монохроматора является диспергирующая призма, которая разлагает полихроматическое излучение в спектр (рис. 1.6).

Излучение источника фокусируется конденсором на входной щели монохроматора. Входная щель установлена в фокусе коллиматорной линзы, направляющей параллельный пучок лучей на грань призмы. Диспергированные лучи фокусируются объективом в фокальной плоскости монохроматора, где нахо-

дится выходная щель, пропускающая только небольшую часть спектра. Для изменения длины волны выходящего из монохроматора потока излучения можно либо перемещать выходную щель в фокальной плоскости, либо поворачивать призму, последовательно фокусируя на неподвижную щель различные участки спектра. Существует много схем монохроматоров, отличающихся от изображенной на рис. 1.6.



*Рис. 1.6. Устройство призмного монохроматора:
1 – источник излучения, 2 – конденсорные линзы, 3 – входная щель, 4 –
коллиматорная линза, 5 – диспергирующая призма,
6 – объектив, 7 – фокальная плоскость*

Монохроматическое излучение пропускается через кювету. Материал кюветы и призмы должен быть прозрачен во всем рабочем интервале длин волн монохроматора. В видимой области применяют призмы и кюветы из различных сортов (оптического) органического стекла, в ультрафиолетовой – кварц.

Приемником света в видимой и ультрафиолетовой областях является фотоэлемент, величина тока которого пропорциональна интенсивности падающего света. Ток усиливается и регистрируется потенциометром. Практически обычно определяют отношение интенсивностей монохроматического света, прошедшего через исследуемый раствор и через чистый растворитель или специально выбранный раствор сравнения.

1.2.4. Практическое применение

Электронные спектры поглощения для целей качественного анализа используются значительно реже, чем колебатель-

ные, так как они обычно бывают представлены небольшим числом широких полос поглощения, которые часто накладываются одна на другую и полностью или частично перекрываются. Однако по электронным спектрам поглощения иногда удается провести достаточно эффективный анализ качественного состава (см. раздел 1.2.2.): определить в исследуемых соединениях наличие или отсутствие группировки-хромофора, например в нефтехимии.

УФ-спектроскопия дает прекрасную возможность для количественного анализа веществ. Для этого записывают спектр поглощения анализируемого вещества при одной концентрации, выбирают максимум поглощения. Если в спектре имеется несколько полос, выбор обычно останавливается на наиболее интенсивной, так как работа в области максимума светопоглощения обеспечивает наиболее высокую чувствительность определения. Далее делают несколько разведений и при выбранном одном максимуме поглощения снимают значения абсорбции вещества. Строят калибровочную кривую, затем измеряют величину "А" анализируемого раствора и по графику определяют неизвестную концентрацию (рис. 1.7.).

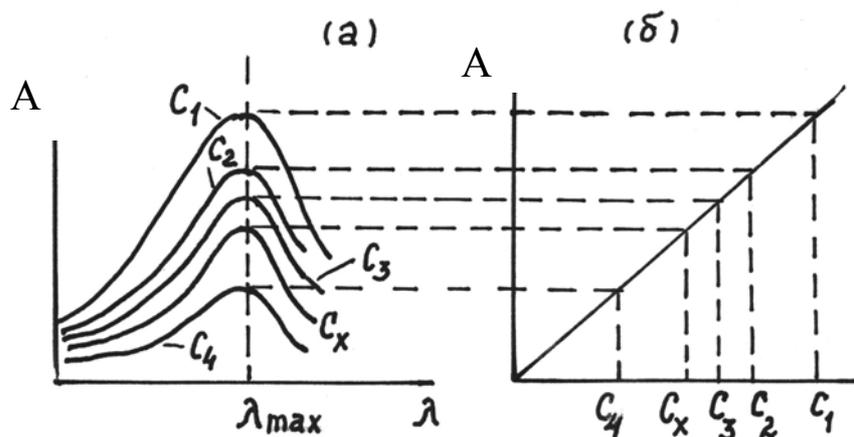


Рис. 1.7. Построение калибровочной кривой (б) по спектрам поглощения (а)

Цвет растворов, поглощающих в видимой области, зависит от положения главной полосы поглощения в спектрах. Окраска в проходящем солнечном свете является результатом избирательного поглощения веществом отдельных участков спектра. Выходящий световой поток имеет иной световой баланс, отли-

чающийся от соотношения цветов в падающем световом потоке. Окраска придается раствору теми составляющими белого света, которые менее других поглотились веществом. Естественно, что красный раствор пропускает красные, а поглощает лучи другого цвета, в результате доля красных лучей в выходящем световом потоке увеличивается. Такие цвета называются дополнительными (табл. 1.2.).

Таблица 1.2.

Цвет раствора	Область максимального поглощения , нм	Дополнительный цвет (цвет светофильтра)
Желто-зеленый	400-450	Фиолетовый
Желтый	450-480	Синий
Оранжевый	480-490	Зелено-синий
Красный	490-500	Сине-зеленый
Пурпурный	500-560	Зеленый
Фиолетовый	560-575	Желто-зеленый
Синий	575-590	Желтый
Зелено-синий	590-625	Оранжевый
Сине-зеленый	625-700	Красный

Раствор марганцовокислого калия окрашен в красный цвет, он поглощает зеленые лучи, и его полоса поглощения лежит в области 440 – 650 нм. Бихромат калия, согласно установленному соотношению, поглощает фиолетовые лучи, т.е. область, близкую 400 нм.

В простейших приборах для определения абсорбции вещества (колориметрах) имеются наборы светофильтров, выделяющих узкие интервалы видимого спектра. Для определения величины "А" растворов необходимо выбрать светофильтр, пропускающий те лучи, которые всего сильнее поглощаются анализируемым веществом. Чтобы правильно выбрать светофильтр, необходимо определить абсорбцию раствора на каждом светофильтре. Цвет светофильтра должен соответствовать области максимального поглощения раствора. Окраска раствора и цвет светофильтра относятся друг к другу, как дополнительные цвета. Таким образом, для анализа растворов $KMnO_4$ требуется зеленый светофильтр, а для $K_2Cr_2O_7$ – фиолетовый.

Большинство приборов, предназначенных для определения абсорбции вещества имеют шкалу с отчетом $A=0 \div 2$. Теоретические расчеты показывают, что ошибка при определении концентрации исследуемого вещества минимальна, когда $A \approx 0,44$. Практически хорошие результаты получаются при абсорбции раствора вещества от 0,2 до 0,8. Приборы снабжены набором кювет, отличающихся длиной (толщиной). Эмпирически выбирают кювету, для которой абсорбция анализируемого раствора попадает в указанный интервал.

Определение концентрации по закону Бееера называется анализом по собственному поглощению. Анализ веществ с низким молярным коэффициентом ослабления во многих случаях имеет недостаточную чувствительность, а неокрашенные вещества, такие как вода, бензол, вообще нельзя определять по собственному поглощению в видимой части спектра, так как коэффициент ослабления близок к нулю.

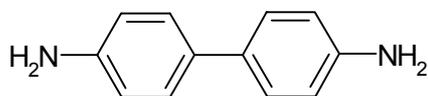
Неокрашенные соединения составляют основную часть известных органических и неорганических веществ, поэтому колориметрический анализ по собственному поглощению в видимой области имеет ограниченное применение. Для расширения круга веществ, которые можно анализировать в видимой области, используют специальные реагенты (колориметрический анализ с помощью реagensов).

Реагенты - это соединения, которые взаимодействуют с анализируемым веществом и образуют продукты, обладающие высоким коэффициентом ослабления. Анализ с применением реагентов проводят также, как и по собственному поглощению – методом калибровочных кривых. Коэффициент ослабления в законе Бееера в этом случае характеризует продукты реакции.

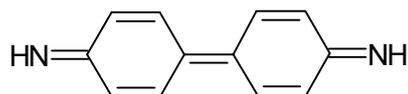
Применение реагентов обусловлено двумя причинами. Во-первых, стремлением расширить круг веществ, которые можно анализировать в видимой области, во-вторых, способностью некоторых реагентов взаимодействовать с одним веществом, входящим в состав сложной смеси. Эта важная особенность реагентов называется избирательностью. В настоящее время число органических реагентов исчисляется тысячами. Для но-

вых развивающихся отраслей промышленности разработаны реагенты на германий, индий, уран, редкоземельные элементы. Реагенты применяются и для анализа окрашенных веществ, которые, вообще говоря, можно было бы анализировать и по собственному поглощению, если необходимо увеличить чувствительность или определить концентрацию лишь одного из компонентов сложной смеси.

Одним из механизмов возникновения окраски растворов является окисление реагента анализируемым веществом с образованием продуктов, обладающих высоким коэффициентом ослабления. Так, бензидин (I) окисляется некоторыми ионами в (II) – интенсивно окрашенное вещество.

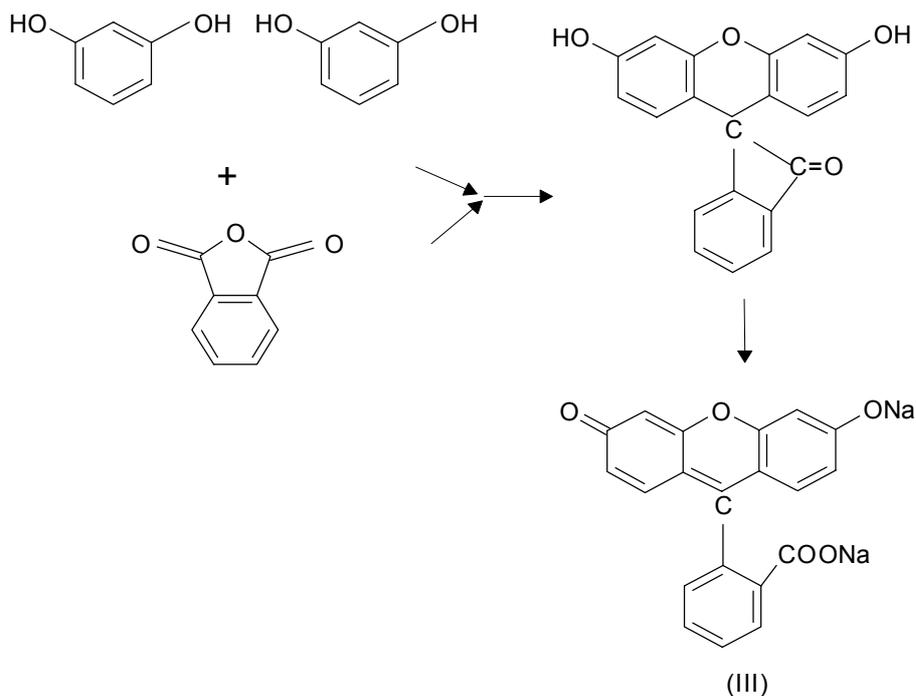


(I)

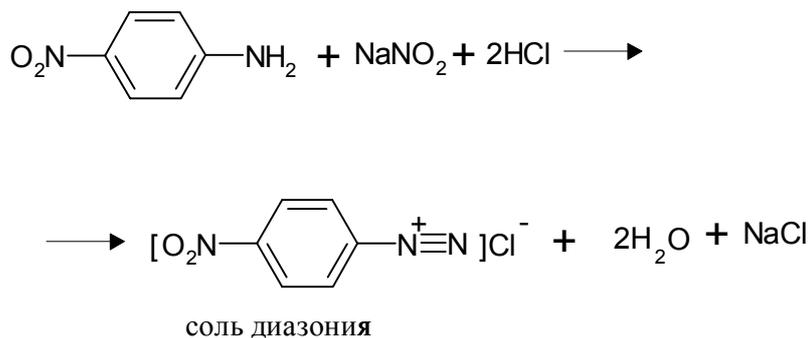


(II)

С помощью реагентов определяют многие органические вещества, в некоторых методиках для этого пользуются способностью органических соединений образовывать молекулярные окрашенные соединения. При анализе аминов реагентами могут служить нитросоединения, а при анализе нитросоединений - амины. Другой путь, приводящий к окрашиванию растворов, - синтез красителей, в котором принимает участие анализируемое вещество. Для определения резорцинов в сточных промышленных водах сухой остаток, полученный выпариванием пробы, сплавляют с фталевым ангидридом и, подщелачивая раствор, получают трифенилметановый краситель - флуоресцеин (III). Трифенилметановые красители имеют наибольшие коэффициенты ослабления, поэтому чувствительность анализа очень высока.

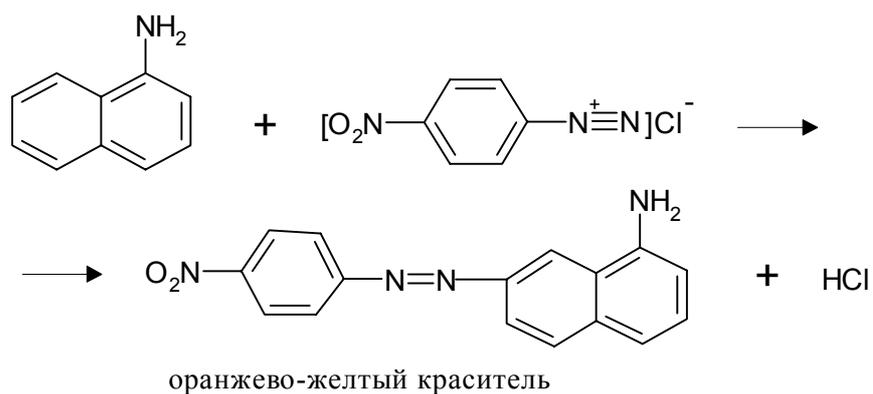


Многие распространенные реагенты представляют собой соли диазония, которые можно получить по следующей схеме:



1. Определение фенолов.

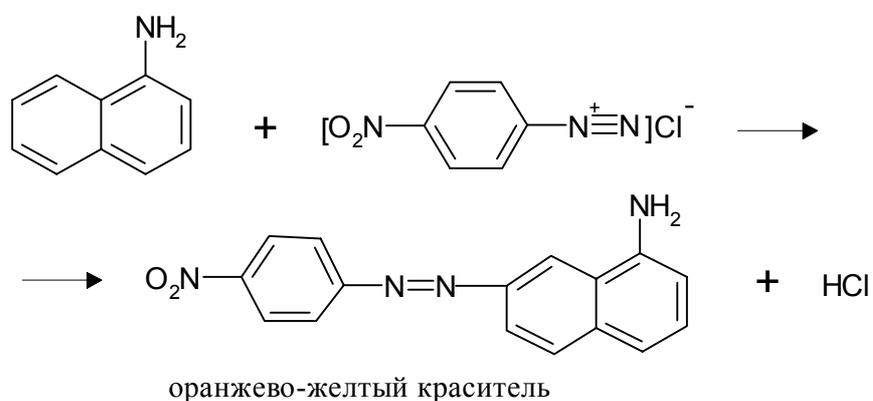
Фенол, как известно, очень слабо окрашенное вещество. В видимой области коэффициент ослабления фенола близок к нулю и чувствительность анализа по собственному поглощению ничтожно мала. Если сочетать фенол с солью диазония, взятой в избытке по сравнению со стехиометрическим соотношением, соответствующим протекающей реакции, то всегда имеется уверенность, что концентрация образовавшегося красителя пропорциональна концентрации анализируемого вещества. Это соотношение концентраций должно всегда выполняться при использовании реагентов. Для определения фенола проводят реакцию азосочетания с солью диазония:



Раствор полученного в реакции красителя поглощает в наибольшей степени лучи с $\lambda = 485$ нм, что соответствует оранжевому окрашиванию раствора. При определении других гидроксипроизводных получают красители со следующими оптическими характеристиками:

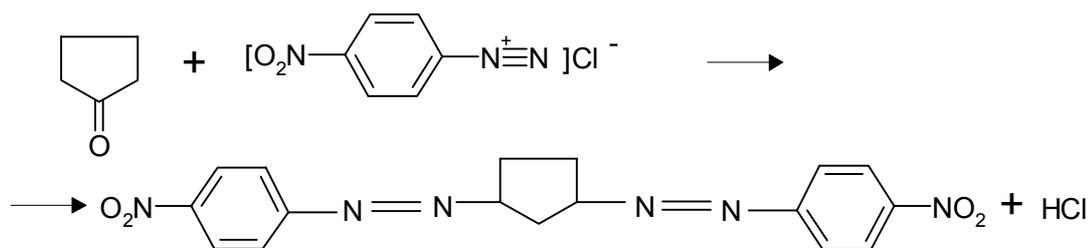
Определяемое вещество	λ_{max} , нм	ϵ , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹
о-крезол	504	25000
м-крезол	500	28000
п-крезол	530	6000
α -нафтол	577	18000
β -нафтол	549	5600

2. Определение аминов.

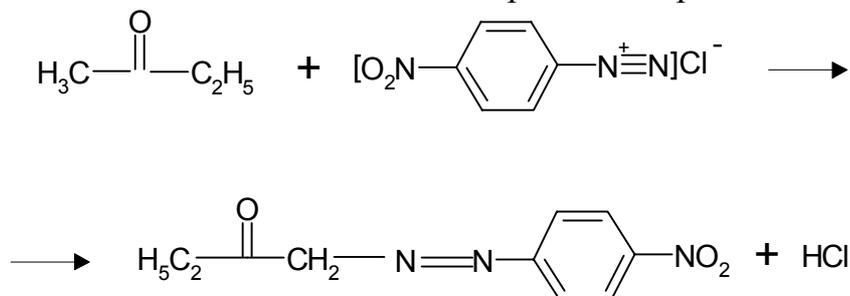


3. Определение кетонов.

Циклопентанон, взаимодействуя с солями диазония, дает бисазо-краситель.



Метилэтилкетон дает моноазокраситель красного цвета.



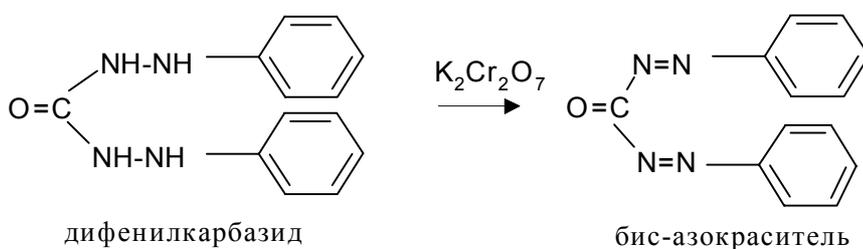
Рассмотренный метод применяют для определения кислот, альдегидов, нитросоединений, спиртов и др.

Реагенты находят применение в органической химии, особенно в тех случаях, когда необходимо обнаружить и количественно определить микропримеси веществ; в промышленной санитарии (определение вредных соединений, отравляющих веществ в воздухе), в биологии.

1.2.5. Практические работы

Работа 1. Определение хрома дифенилкарбазидным методом

Принцип определения основан на том, что бихромат калия, имеющий низкий коэффициент ослабления (≈ 500), окисляет в кислой среде дифенилкарбазид, превращая его в бис-азокраситель с коэффициентом ослабления около 10^4 . Дифенилкарбазид, являющийся реагентом на хром, требуется брать в избытке по отношению к бихромату, поскольку необходимо, чтобы во взятой пробе весь бихромат провзаимодействовал с реагентом.



Азокраситель имеет фиолетово-красную окраску, его максимальное поглощение лежит в зеленой области спектра, что определяет выбор зеленого светофильтра.

Выполнение работы

Раствор дифенилкарбазида готовят перед употреблением, растворяя 0,1 г реагента в 15 мл ацетона в мерной колбе на 50 мл и доводят водой до метки.

Для построения калибровочной кривой отбирают из бюретки 1, 2, 3, 4 и 5 мл раствора бихромата калия с концентрацией $6,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л в колбочки на 50 мл, добавляют в каждую по 2 мл раствора дифенилкарбазида и по 2 мл серной кислоты с концентрацией 5 моль/л.

Растворы разбавляют дистиллированной водой, доводят до метки, тщательно перемешивают и измеряют оптические плотности.

Для измерения абсорбции вещества кюветы заполняют на 2/3 высоты, соответственно, раствором и растворителем (дистиллированная вода). Кюветы осушают снаружи фильтровальной бумагой и помещают в держатели для кювет. Не следует касаться пальцами стенок кюветы, сквозь которые проходят световые лучи.

Результаты измерения абсорбции растворов заносят в таблицу, где указывают рассчитанную концентрацию бихромата калия в каждой пробе, а затем строят калибровочную кривую. Получают анализируемую пробу в колбочке на 50 мл, добавляют, как прежде, серную кислоту, реагент, доводят колбу водой до метки и измеряют оптическую плотность. Концентрацию анализируемой пробы находят по калибровочной кривой.

Расчет концентрации производят по формуле:

$$C_k = C_b \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{V_b}{V_k},$$

где C_k , C_b – молярные концентрации (моль/л) в колбе и бюретке, соответственно; V_b – объем раствора, отобранного из бюретки; V_k – объем колбы.

Работа 2. Определение концентрации аминокислот спектрофотометрическим методом

Реактивы и посуда:

- 1) водный раствор тирозина, $C = 2,92 \cdot 10^{-4}$ моль/л,
- 2) водный раствор триптофана, $C = 6,07 \cdot 10^{-5}$ моль/л,
- 3) кварцевые кюветы (2 шт.),
- 4) спектрофотометр.

Выполнение работы

Кювету заполняют раствором аминокислоты (в кювету сравнения налить воду). Записывают спектр поглощения аминокислоты в области 200-350 нм и определяют расположение максимума поглощения. Разбавляя исходный раствор аминокислоты соответственно в 2, 4, 6, 8 и 10 раз, измеряют абсорбцию полученных растворов при максимуме поглощения. Строят кривую зависимости абсорбции растворов (при макси-

муме поглощения) от концентрации. Получают анализируемую пробу аминокислоты и измеряют абсорбцию при максимуме поглощения. Концентрацию анализируемой пробы находят по калибровочной кривой. Проверяют, соблюдается ли закон Беера.

Контрольные вопросы

1. Спектр электромагнитных колебаний. Применение различных областей спектра в химии и биологии. Длина волны, частота и волновое число, связь их друг с другом. Единицы измерения этих величин.
2. Закон поглощения света. Светопропускание, абсорбция вещества. Вывод закона Беера. Отклонения от закона Беера.
3. Определение концентрации растворенного вещества по величине "А". Зависимость чувствительности метода от коэффициента ослабления растворенного вещества. Органические реагенты. Метод добавок и калибровочных кривых.
4. Правило выбора светофильтра и длины кюветы.
5. Спектры поглощения. Определение коэффициента экстинкции по спектам поглощения.
6. Механизм поглощения видимых и ультрафиолетовых лучей.
7. Количественный и качественный анализ по УФ-спектрам.
8. Источники, монохроматоры, приемники излучения, материал оптики в видимой и ультрафиолетовой области.

Литература

1. Миронов В.А., Янковский С.А. Спектроскопия в органической химии. М.: Химия, 1985. С. 5-30.
2. Казицина Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971. С. 65-95.
3. Иоффе Б.В., Костиков Р.Р., Разин В.В. Физические методы определения строения органических соединений. М.: Высшая школа, 1984. С. 45-68.
4. Вилков Л.В., Пентин Ю.А. Физические методы исследования в химии. Структурные методы и оптическая спектроскопия. М.: Высшая школа, 1987. С. 293-356.
5. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 50-97.
6. Крешков А.П. Основы аналитической химии: В 3-х ч. Ч. 3. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. М.: Химия, 1970. С. 244-265.

7. Черняковский Ф.П. основы физико-химических методов исследования и анализа органических веществ: Учеб. пособие / Ярослав. политехн. ин-т. Ярославль, 1981. С. 9-30.

1.3. Инфракрасная (колебательная) спектроскопия

1.3.1. Элементарная теория колебательных спектров

Закон Бугера-Ламберта-Беера выполняется и в инфракрасной области, поэтому все виды анализа, рассмотренные для видимой и УФ-области, можно проводить и в инфракрасной части спектра.

ИК-спектроскопия наибольшее употребление находит для определения структуры органических соединений. Изучение структуры оказывается возможным, благодаря особенностям взаимодействия инфракрасного излучения с веществом. Как было показано выше, электронные спектры несут ограниченную информацию о строении скелета молекулы. Поглощение видимых и ультрафиолетовых лучей сопровождается изменением энергии электронных оболочек атомов и молекул. Энергия квантов инфракрасного излучения значительно ниже интервалов между электронными энергетическими уровнями, поэтому состояние электронной оболочки при поглощении инфракрасных лучей не изменяется. В поглощении инфракрасных излучений веществом принимает участие система колебательных энергетических уровней молекулы, расстояние между которыми соответствует энергии квантов инфракрасных лучей. Колебательные спектры обусловлены в первую очередь смещениями ядер атомов, вследствие этого по ИК-спектрам можно устанавливать структуру молекул.

Колебания молекул проявляются в спектрах поглощения в инфракрасной области. Основными типами колебаний являются валентные и деформационные.

Валентными колебаниями называются колебания ядер атомов вдоль линии связи, они обозначаются буквой ν ($\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$ и т.д.). Приближенной механической моделью валентных коле-

баний может служить система из двух шаров, связанных жесткой пружиной (рис.1.8.А).

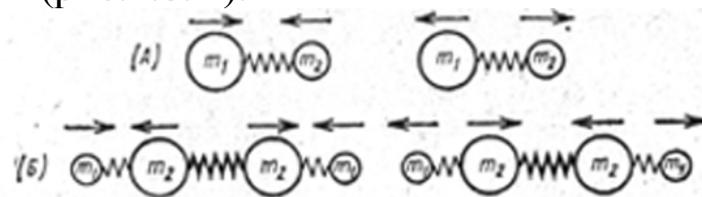


Рис. 1.8. А – механическая модель валентных колебаний атомов в молекуле. Б – модель симметричных и асимметричных колебаний в системе 4 атомов.

Валентные колебания подразделяются на синфазные, или симметричные (ν^s), и антифазные, асимметричные (несимметричные) - ν^{as} . Это возможно в системе из трех или четырех (рис. 1.8.Б) атомов (например, молекула ацетилена).

Деформационные колебания связаны с изменением валентного угла, образованного связями у общего атома. Они обозначаются буквой δ (дельта). Для возбуждения деформационных колебаний требуется меньшая энергия, чем в случае валентных колебаний, и, следовательно, они имеют меньшую частоту (меньшее волновое число):

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda = h \cdot c \cdot \bar{\nu}$$

Деформационные колебания подразделяются на ножничные, маятниковые, веерные и крутильные (рис. 1.9.).

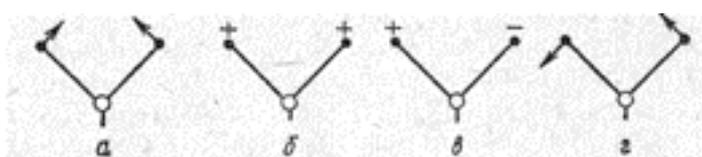


Рис. 1.9. Деформационные колебания метиленовой группы (CH_2): а – ножничное, б – веерное, в – крутильное, г – маятниковое

1.3.2. Спектры поглощения

Колебательными инфракрасными спектрами обладают не все молекулы, а только те, у которых при колебании происходит изменение их электрического дипольного момента. ИК-спектрами обладают, например, молекулы HCl , CO , HBr и т.д., но не H_2 , O_2 и др. В симметричных молекулах (например, таких, как этан) дипольный момент не зависит от

длины связи С-С, и колебания, отвечающие таким связям, не проявляются в инфракрасных спектрах.

Сравнительная простота колебательных или колебательно-вращательных спектров двухатомных молекул обусловлена тем, что колебания происходят только вдоль линии, соединяющей ядра (валентные колебания).

В многоатомной молекуле происходят колебания всех атомов. Число колебательных степеней свободы у нелинейной молекулы, состоящей из N атомов, равно $3N-6$, а у линейной $3N-5$, так как у них отсутствует одна вращательная степень свободы.

Вследствие ангармоничности колебаний, кроме основных частот, в спектрах наблюдаются, обычно в виде слабых полос, обертоны и составные частоты. Обертоны – колебания, частота которых больше в целое число раз, чем у основных (2ν , 3ν и т.д.). Составные частоты являются суммой или разностью двух различных фундаментальных частот. Каждому из типов колебаний в молекулах и их суперпозициям отвечают соответствующие полосы, что придает инфракрасным спектрам значительную сложность по сравнению с электронными.

Для высокосимметричных молекул, обладающих осью симметрии не ниже третьего порядка, различные колебания могут иметь одинаковые частоты, вследствие чего в спектре таких соединений появляется вместо нескольких полос одна – осуществляется так называемое *вырождение*.

Бензол, содержащий 12 атомов, имеет $3 \cdot 12 - 6 = 30$ колебаний, из которых 7 колебаний происходят с изменением дипольного момента и поэтому активны в ИК-спектре. Вследствие вырождения в ИК-спектре будет наблюдаться меньшее число полос, а именно – 4 полосы.

Инфракрасные спектры многоатомных соединений сильно отличаются от УФ- и видимых спектров. Различия вытекают из природы взаимодействия поглощающих молекул и их окружения. В УФ-спектрах линии поглощения уширяются и стремятся слиться в широкие полосы поглощения. Большая ширина полосы поглощения обусловлена окружением хромофора, а также тем, что помимо основных уровней электронных переходов в хромофоре существуют подуровни, связанные с колебаниями молекулы. В ИК-спектре, наоборот, частота и коэффициент поглощения, соответствующие отдельному фрагменту (связи), обычно мало меняются с изменением окружения. Поэтому линии в ИК-спектре не сливаются в полосу.

Обычно по оси ординат при построении ИК-спектров откладывают светопропускание в процентах, а не абсорбцию вещества. По оси абсцисс откладывают волновое число в обратных сантиметрах (см^{-1}), а иногда длину волны (рис. 1.10.).

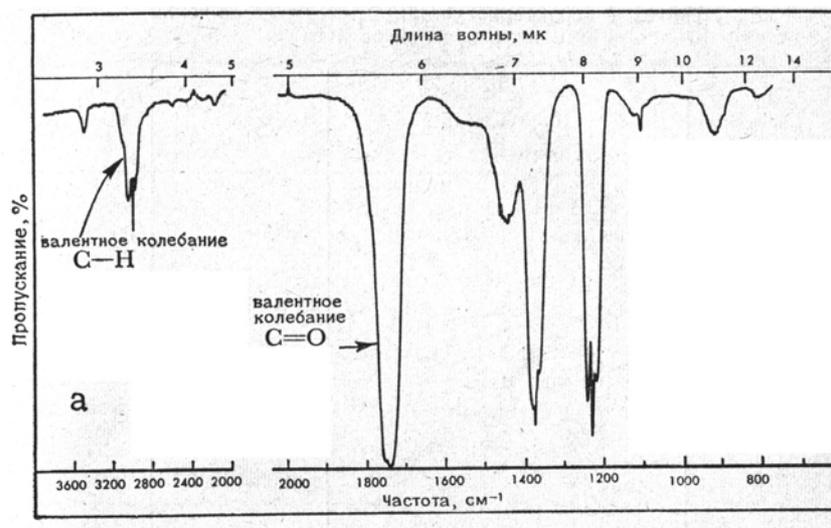


Рис. 1.10. Спектр поглощения ацетона в инфракрасной области

Полосы в колебательных спектрах делятся на два типа: характеристические (в основном валентные колебания), присутствие которых в спектре доказывает наличие в исследуемом веществе определенных структурных элементов, и нехарактеристические.

Характеристическое колебание принадлежит определенной связи (C-H, O-H, N-H, C-O и др.) и, следовательно, имеет достаточно постоянную частоту в различных веществах.

Нехарактеристические колебания занимают область $400-1000\text{ см}^{-1}$. Это область колебаний углеродного скелета молекулы, которая резко реагирует на малейшие изменения в структуре молекулы.

ИК-спектр может быть разделен на несколько областей (корреляционные диаграммы):

$3700-2500\text{ см}^{-1}$ – валентные колебания атомов водорода. Группе OH соответствует частота $3600-3700\text{ см}^{-1}$. Если гидроксигруппа образует водородную связь, то последняя снижает эту частоту на $300-1000\text{ см}^{-1}$. Поглощение группы N-H наблюдается в области $3300-3400\text{ см}^{-1}$, а группы C-H в области $2850-3000\text{ см}^{-1}$.

$2500-2000\text{ см}^{-1}$ – область колебания тройной связи. Поглощение группы $\text{C}\equiv\text{C}$ обычно наблюдается в диапазоне $2050-2300\text{ см}^{-1}$, но оно может быть слабым или отсутствовать. Поглощение группы $\text{C}\equiv\text{N}$ лежит вблизи $2200-2300\text{ см}^{-1}$.

$2000-1600\text{ см}^{-1}$ – область колебания двойной связи. Карбонильная группа (C=O) кетонов, альдегидов, кислот, амидов дает обычно сильное поглощение около 1700 см^{-1} . Группа C=C в олефинах имеет поглощение вблизи 1650 см^{-1} .

$1700-1500\text{ см}^{-1}$ – область валентных и деформационных колебаний одинарной связи. В этой области нельзя идентифицировать определен-

ные функциональные группы, однако она показывает различия между подобными молекулами и поэтому может служить областью “отпечатков пальцев”.

Органические соединения обычно дают пики поглощения между $1300-1475\text{ см}^{-1}$.

$1000-700\text{ см}^{-1}$ – область деформационных колебаний олефинов и ароматических групп СН.

Полный спектр органического соединения (от 4000 до 400 см^{-1}) дает возможность устанавливать идентичность веществ. Вещества идентичны, если их инфракрасные спектры, измеренные в одинаковых условиях, совпадают.

Изменение групповых частот внутри интервала, приведенного в корреляционных таблицах, связано с межмолекулярными и внутримолекулярными взаимодействиями в веществе.

Межмолекулярные взаимодействия практически отсутствуют в газообразном состоянии, поэтому истинный спектр вещества получают для его паров. В жидкости под влиянием диэлектрических свойств среды или в результате ассоциации может произойти изменение частот колебаний. Спектр твердого соединения изменен еще в большей степени не только благодаря усилению межмолекулярных взаимодействий, но и вследствие влияния кристаллической решетки. Смещение полос поглощения в спектре кристаллического соединения под влиянием межмолекулярных взаимодействий (за исключением соединений с сильными водородными связями) редко превышает 25 см^{-1} . Растворители оказывают небольшое влияние на положение полос поглощения, и только в случае образования водородных связей может происходить существенное изменение частот колебаний групп, участвующих в ее образовании.

Наиболее существенное изменение в положении групповых частот наблюдается под влиянием внутримолекулярных взаимодействий. Эти взаимодействия определяются массой присоединенных атомов, геометрией молекулы и электронными эффектами заместителей.

1.3.3. Возможности метода и практические рекомендации

Возможности метода: доказательство присутствия в веществе группировок, обладающих характеристическими частотами колебаний; доказательство тождественности образцов; качественный и количественный анализ смесей при известных спектрах компонентов.

Качественный анализ. Благодаря кропотливому изучению огромного числа спектров известных веществ установлены корреляции (зави-

симости) между положением максимумов поглощения индивидуального колебания и соответствующими атомными группировками.

Для расшифровки инфракрасного спектра необходимо идентифицировать полосы поглощения, т.е. установить принадлежность каждой из полос спектра определенным атомным группировкам. Значения волновых чисел для различных групп находят в корреляционных диаграммах и таблицах характеристических частот.

С помощью корреляционных диаграмм устанавливают приблизительно, какая часть инфракрасного спектра представляет для данного исследования наибольший интерес. Затем по таблицам характеристических частот уточняют положение ожидаемых полос в спектрах. В расшифровке спектров помогают атласы, объединяющие спектры веществ определенного класса.

Стараясь получить максимум информации о строении вещества из ИК-спектров, следует учитывать, что содержащиеся в них полосы обладают различной степенью характеристичности. Поэтому, изучая ИК-спектр, следует в первую очередь обратить внимание на те области, в которых наличие интенсивной полосы однозначно свидетельствует о присутствии в исследуемом веществе определенной функциональной группы. Обнаружив основную характеристическую частоту, обязательно убедитесь в наличии других полос, характерных для данного структурного элемента.

При определении характеристических полос важнейшее значение имеет их интенсивность. Различают полосы сильной, средней и слабой интенсивности. Так, слабая полоса в области 1700 см^{-1} не может служить доказательством присутствия в исследуемой молекуле карбонильной группы, поскольку характеристическая для этой группы полоса является одной из самых интенсивных в спектре.

Рассмотрим в качестве примера поглощение карбонильной группы. В первую очередь проверьте наличие наиболее характеристических полос в области $1700\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ (группа $\text{C}=\text{O}$ в составе любой возможной функции). Если полосы соответствующей интенсивности в этой области отсутствуют, то можно утверждать, что молекула не содержит данного структурного элемента. Если присутствует полоса $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, то по ее положению с помощью таблиц можно предположить, к какой функциональной группе она относится. Надо учитывать, что поглощение карбонильной группы меняется под действием собственного молекулярного окружения: поглощение связи $\text{C}=\text{O}$ в карбоновых кислотах, способных образовывать внутримолекулярную водородную связь, сильно отличается от поглощения связи $\text{C}=\text{O}$ в сложном эфире, в котором такая связь образовываться не может. Если вещество представляет собой сложный эфир, ему должны соответствовать две полосы $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ сильной интенсивности в

области $1280-1200\text{ см}^{-1}$. Если предполагаемая группа альдегидная, надо отыскать в спектре полосу $\nu_{\text{C(O)H}}$ в области $2695-2830\text{ см}^{-1}$ слабой интенсивности. Если полос $\nu_{\text{C=O}}$ две и они имеют соответствующие значения частот, то весьма вероятно, что вещество является ангидридом кислоты; в этом случае в области $\nu_{\text{C=O}}$ ($1280-1200\text{ см}^{-1}$) должны также наблюдаться две полосы.

Анализ по ИК-спектрам требует значительного опыта, хорошего знакомства со справочной литературой и химией исследуемых веществ. Отнесение полос и определение структуры по инфракрасным спектрам не всегда однозначно. Для полного определения структуры могут потребоваться дополнительные исследования, выполненные другими методами.

Количественный анализ по инфракрасным спектрам.

Количественный анализ по инфракрасным спектрам осуществляется в двух направлениях, во-первых, для определения концентраций веществ в растворе и, во-вторых, для определения числа групп, входящих в состав молекулы.

Для того, чтобы определить концентрацию вещества, выбирают в ИК-спектре анализируемого вещества характеристическую полосу сильной интенсивности. Приготавливают несколько стандартных концентраций исследуемого вещества, записывают ИК-спектр и находят светопропускание (T), соответствующее выбранному значению волнового числа (длине волны). Строят калибровочный график, затем измеряют " T " анализируемого раствора и по графику определяют концентрацию анализируемого вещества.

Существуют различные способы введения образца в ИК-спектрометр.

1. Растворы веществ (применяют кюветы с длиной, равной 0,1-1,0 мм).

Затруднения при анализе связаны с выбором растворителя, потому что они обладают собственным поглощением. Для ИК-области в качестве растворителя наиболее подходит четыреххлористый углерод, но в нем растворяется ограниченный круг веществ. Также используют сероуглерод, хлороформ, циклогексан и др.

2. Тонкие пленки.

Высоковязкие жидкости часто помещают в виде слоя между двумя пластинками из соли, поскольку ввести вязкую жидкость в кювету не так просто.

3. Пасты (суспензии).

Пасты приготавливают тщательным растиранием твердого образца с вазелиновым маслом и помещают в виде тонкого слоя между солевыми пластинками.

4. Твердые вещества в виде порошка тщательно измельчают, растирая в агатовой или яшмовой ступке с порошком бромида калия, и затем спрессовывают в специальном устройстве под давлением в таблетки. Полученную таблетку устанавливают вместо кюветы и прописывают спектр. В двухлучевых приборах в потоке сравнения устанавливают таблетку из чистого бромида калия.

1.3.4. Устройство приборов

Инфракрасный спектрометр - прибор, наиболее широко используемый для исследования структуры соединений. Промышленностью выпускаются записывающие инфракрасные спектрофотометры, обладающие отличным разрешением и воспроизводимостью.

В качестве источников освещения наиболее употребительны ртутные лампы высокого давления, штифты Глобара (или просто глобары) и Нернста. Глобар – стержень из карбида кремния (SiC), который можно нагревать путем пропускания электрического тока. Температура глобара значительно ниже, чем у ламп накаливания, и составляет около 1200°C . Глобар-штифт дает излучение в интервале 2 - 16 мкм. Штифт Нернста конструктивно не отличается от штифта Глобара, он сделан из оксидов редкоземельных элементов (циркония, тория и иттрия) и может быть нагрет без разрушения до более высокой температуры ($1800 - 1900^{\circ}\text{C}$). Максимум излучения штифта Нернста при 1900°C лежит около 1,3 мкм, т.е. между полосами испускания перекальных ламп и глобаров.

Наиболее универсальными монохроматорами являются призмы, изготовленные из солей щелочных и щелочно-земельных металлов (LiF, NaCl, KBr). Эти же материалы применяются для изготовления кювет. Призмы из хлорида натрия применяется для записи спектров в широком интервале волновых чисел. Призмы из фторида лития – для сравнительно узкого участка области $1700-4000\text{ см}^{-1}$.

В кюветы нельзя заливать растворы, содержащие воду, или агрессивные вещества, взаимодействующие с материалом кювет. В качестве растворителей применяют осушенные жидкости.

Для измерения интенсивности инфракрасного излучения применяют термоэлементы и болометры. В термоэлементах используется термоЭДС, возникающая при изменении температуры спая между металлами или сплавами под действием инфракрасного излучения. Широко применяются для этих целей термопары медь-константан, серебро-висмут и др.

Принцип действия болометра основан на изменении электросопротивления материала при нагревании. Термочувствительный элемент, представляющий собой зачерненную платиновую, сурьмяную или другую тонкую металлическую пластинку, включают в мостовую схему. Инфракрасное излучение вызывает нагревание термочувствительного элемента и разбаланс моста, пропорциональный интенсивности падающего излучения.

1.3.5. Практические работы

Работа 1. Определение строения ароматических соединений по инфракрасным спектрам

Цель работы: знакомство с устройством инфракрасного спектрофотометра и методикой записи инфракрасных спектров; расшифровка инфракрасных спектров ароматических соединений, записанных студентами на спектрофотометре ("Specord M80" и др.) или выданных преподавателем.

Выполнение работы

Образцы для инфракрасной спектроскопии изготавливают в виде суспензии в вазелиновом масле или растворов в растворителях, прозрачных для ИК-лучей. Следует учитывать при изготовлении образцов высокую гигроскопичность солевой оптики. Все растворители должны быть тщательно высушены.

Расшифровку спектра можно начинать только после подробного ознакомления с принципом инфракрасной спектроскопии и рекомендациями, приведенными в теоретической части. Отнесение полос поглощения следует проводить согласно имеющимся литературным данным. Вначале необходимо обратить внимание на общий вид спектра. Обращаясь к корреляционным диаграммам, а затем к таблицам характеристических волновых чисел, найти области, характеризующие замещение в бензольном кольце; полосы, соответствующие колебаниям самого ядра и других функциональных групп. Следует учесть возможности многозначных решений некоторых задач и обосновать правильный выбор структуры.

Работа 2. Определение концентрации циклогексанона в циклогексане

Выполнение работы

Циклогексанон сильно поглощает инфракрасные лучи при волновом числе $\sim 1718 \text{ см}^{-1}$, а циклогексан в этой области почти не поглощает инфракрасных лучей, т.е. оказывается возможным определять циклогексанон в циклогексане спектрофотометрическим методом в инфракрасной области спектра. Исследуемая проба циклогексана должна содержать не больше 3% циклогексанона.

В мерные колбы емкостью 50 мл помещают циклогексанон (концентрация циклогексанона в циклогексане в 50 мл, %: 0,125; 0,25; 0,5; 1,000; 2,000), доводят циклогексаном до метки и перемешивают.

Оптическую плотность полученных эталонных растворов определяют при волновом числе $\sim 1718 \text{ см}^{-1}$. В качестве нулевого раствора берут циклогексан. Затем строят калибровочный график. Концентрацию циклогексанона в пробе находят по калибровочному графику.

Контрольные вопросы

1. Сопоставление механизма поглощения видимых, ультрафиолетовых и инфракрасных лучей. Обоснование возможности определения строения молекул по инфракрасным спектрам.
2. Валентные и деформационные колебания атомов в молекулах. Проявление различных видов колебаний в инфракрасных спектрах.
3. Колебательные спектры.
4. Расшифровка инфракрасных спектров по корреляционным диаграммам и таблицам характеристических частот.
5. Количественный анализ по ИК-спектрам.
6. Способы введения образца в ИК-спектрометр.
7. Источники, монохроматоры и приемники излучения в инфракрасной области.
8. Особенности солевой оптики.

Литература

1. Миронов В.А., Янковский С.А. Спектроскопия в органической химии. М.: Химия, 1985. С. 30-71.
2. Казицина Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971. С. 9-65.
3. Иоффе Б.В., Костиков Р.Р., Разин В.В. Физические методы определения строения органических соединений. М.: Высшая школа, 1984. С. 8-35.
4. Вилков Л.В., Пентин Ю.А. Физические методы исследования в химии. Структурные методы и оптическая спектроскопия. М.: Высшая школа, 1987. С. 169-292.
5. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 50-97.
6. Крешков А.П. Основы аналитической химии: В 3-х ч. Ч. 3. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. М.: Химия, 1970. С. 244-264.
7. Черняковский Ф.П. Основы физико-химических методов исследования и анализа органических веществ: Учеб. пособие / Яросл. политехн. ин-т. Ярославль, 1981. С. 30-42.

Глава 2. Эмиссионная спектроскопия

2.1. Теоретические основы эмиссионной спектроскопии и возможности метода

Методы эмиссионного спектрального анализа используются во многих областях науки и техники и в различных отраслях народного хозяйства. Этим методом выполняется значительная часть анализов в металлургической промышленности. Очень эффективным оказалось применение спектральных методов при анализе разного рода геологических проб при поиске полезных ископаемых.

Существенную роль играет спектральный анализ природных и сточных вод, почвы, атмосферы и других объектов окружающей среды, а также в медицине и биологии. Важное значение имеет спектральный анализ чистых материалов в электронной технике и других областях, анализ реактивов и т.д.

Под эмиссионным спектральным анализом понимается совокупность методов определения химического состава вещества по наблюдению его возбужденного спектра. Для целей эмиссионного спектрального анализа необходимо перевести анализируемое вещество в возбужденное состояние. Наиболее подходящим для этого является перевод всей или части пробы в парообразное состояние и возбуждение паров пробы нагреванием их до достаточно высокой температуры (1000 - 5000⁰С). Источниками для этого могут быть дуга, искра или высокотемпературное пламя.

При возбуждении молекулярное строение анализируемого вещества нарушается: происходит диссоциация большинства молекул и образование новых молекул, устойчивых при температуре разряда. Поэтому, за редким исключением, результаты анализа дают возможность судить об элементарном, а не молекулярном составе пробы, т.е. о количествах входящих в ее состав элементов, а не о тех соединениях, в виде которых эти элементы входят.

При возбуждении паров анализируемого вещества в высокотемпературном источнике наблюдаются три типа спектров: линейчатые, полосатые и сплошные.

Линейчатые спектры обязаны своим появлением переходам электронов между энергетическими уровнями возбужденных атомов и ио-

нов. Дискретный характер спектров связан с квантовым характером уровней. Полосатые уровни принадлежат молекулам, присутствующим в разряде, и являются результатом возбуждения электронных, колебательных или вращательных уровней молекул.

Испускание атомами световой энергии происходит за счет изменения внутренней энергии, обусловленной взаимным расположением ядра атома и окружением его электронов. Законы атомной динамики таковы, что атомы могут находиться только в определенных энергетических состояниях, т.е. обладать только определенными запасами внутренней энергии E_0 , E_1 , E_2 и т.д. В нормальном состоянии атомы обладают минимальной энергией E_0 . Для того, чтобы получить излучение атомов, последние необходимо возбудить, сообщив им энергию, переводящую атом в одно из состояний с более высоким уровнем энергии. Освобождающаяся при таком переходе энергия $E=E_1-E_0$ излучается в виде светового кванта. Частота получающегося излучения равна $\nu=(E_1-E_0)/h$. Каждый акт соответствует излучению одной линии.

Механизм возбуждения и излучения можно представить схемой (рис. 2.1.)

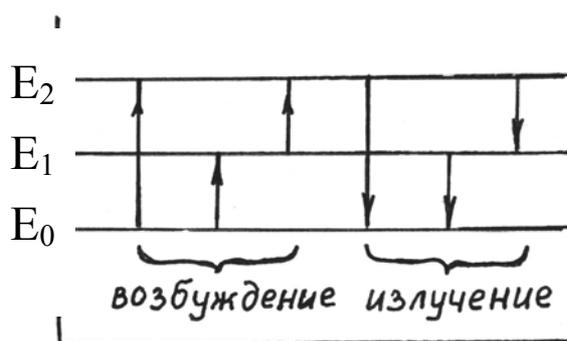


Рис. 2.1. Переходы, соответствующие процессам возбуждения атомов и испусканию атомами световой энергии

Спектры ионов и атомов состоят из бесконечно большого числа линий с частотами $\nu_{i,j}$. Вся совокупность и взаимное расположение линий является однозначной характеристикой элемента. Мы одновременно наблюдаем излучение, соответствующее комбинациям всех возможных энергетических состояний атомов данного элемента, т.е. излучение всего спектра данного элемента.

Качественный анализ. Основой качественного спектрального анализа является свойство каждого химического элемента излучать характерный линейчатый спектр. Задача качественного спектрального анализа сводится к отысканию линий определяемого элемента в спектре пробы. Принадлежность линии данному элементу устанавливается по длине

волны и интенсивности линии. Однако общее число линий в спектре многих элементов очень велико. Нет необходимости, конечно, определять длины волн всех спектральных линий в пробе. Для целей качественного анализа необходимо установить наличие или отсутствие в спектре так называемых аналитических или последних полос.

При уменьшении содержания элемента в пробе интенсивность линий этого элемента в спектре будет уменьшаться, некоторые линии исчезнут, и число линий уменьшится. При какой-то очень малой концентрации останется всего несколько линий. Это и есть последние линии, по которым обычно проводится качественный анализ. Последние линии хорошо изучены, их длины волн и характеристику интенсивности можно найти в специальных таблицах и атласах спектральных линий.

Для расшифровки спектра и определения длины волны анализируемой линии пользуются спектрами сравнения, в которых длины волн отдельных линий хорошо известны. Чаще всего для этой цели используют спектр железа, имеющий характерные группы линий в разных областях длин волн.

Отсутствие последней линии определяемого элемента в спектре гарантирует отсутствие других линий этого элемента. Однако наличие линии с длиной волны, характерной для последней линии какого-либо элемента, еще не означает, что линия действительно принадлежит именно этому элементу. Окончательную идентификацию проводят, проверяя последние линии всех “подозреваемых” элементов.

Спектральным анализом качественно можно определить более 80 элементов. Предел обнаружения методами качественного спектрального анализа колеблется для разных элементов в очень широких пределах: от 10^{-2} (Hg, Os, U и др.) до 10^{-5} % (Na, B, Bi и др.).

Количественный анализ. Попытки использовать зависимость интенсивности спектральных линий от концентрации элемента в пробе для количественного определения долгое время оставались безуспешными. Даже в начале XX в. возможности количественного спектрального анализа оценивались очень невысоко. Одной из основных причин неудач была недостаточная стабильность условий возбуждения.

В практике количественного спектрального анализа обычно используют интенсивность не отдельной линии, а отношение интенсивностей двух спектральных линий, принадлежащих разным элементам. Таким образом, в качестве свойства, связанного с концентрацией элемента, используется отношение интенсивности линии определяемого элемента к интенсивности линии другого элемента в этом же спектре. Такая методика позволяет снизить требования к постоянству условий возбуждения и регистрации спектров.

Линию определяемого элемента обычно называют аналитической линией и ее интенсивность обозначают I_a . Вторую линию, обычно называемую линией сравнения, выбирают так, чтобы отношение интенсивностей зависело только от концентрации определяемого элемента, но не от условий возбуждения и регистрации спектра. Интенсивность линии сравнения обозначают I_c . Существенно также, чтобы интенсивности выбранных линий не слишком резко отличались между собой. Обычно выбирают линии, отношение интенсивностей которых не превышает 10, т.е. находится в пределах $0,1 \leq I_a / I_c \leq 10$, так как в противном случае точность определений уменьшается. Иногда в анализируемую пробу специально вводят так называемый внутренний стандарт, т.е. элемент, линию которого используют в качестве линии сравнения. При анализе проб, содержащих большое количество какого-то элемента, в качестве линии сравнения обычно выбирают линию этого элемента.

2.2. Фотометрия пламени (пламенная эмиссионная спектроскопия)

Появление специализированных пламенных эмиссионных спектрометров привело в какой-то степени к обособлению метода фотометрии пламени и приданию ему известной самостоятельности, хотя, конечно, фотометрия пламени осталась одним из методов эмиссионного спектрального анализа.

Как и любой другой прибор эмиссионной спектроскопии, фотометр для фотометрии пламени имеет источник возбуждения (пламенная горелка), диспергирующий элемент (обычно светофильтр) и приемник света – обычно фотоэлемент. В спектрофотометрах для пламени вместо светофильтров применяют призмы и дифракционные решетки. Анализируемый раствор в пламя горелки вводится в виде аэрозоля. При этом растворитель испаряется, а соли металлов диссоциируют на атомы, которые при определенной температуре возбуждаются. Возбужденные атомы, переходя в нормальное состояние, излучают свет характерной частоты, который выделяется с помощью светофильтров, и его интенсивность измеряется фотоэлементом.

Количественные определения проводят методом градуировочного графика или методом добавок. Методы фотометрии пламени характеризуются низким пределом обнаружения (до 0,001 мкг/мл для щелочных металлов и 0,1 мкг для других) при погрешности 1-3 %. Этим методом могут быть определены Li, Na, K, Rb, Cs, Sr, Ba, Ca, In, Ag и другие элементы. Одним из достоинств метода фотометрии пламени является также высокая производительность.

Спектры, получаемые в пламени, более просты, чем дуговые или искровые, так как температура пламени ниже, чем в электрических источниках возбуждения. Это облегчает анализ, но вместе с этим сужает возможности метода в отношении числа определяемых элементов.

2.3. Практические работы

Работа 1: Определение щелочных и щелочноземельных металлов методом пламенной фотометрии

Описание пламенного фотометра (рис. 2.2.)

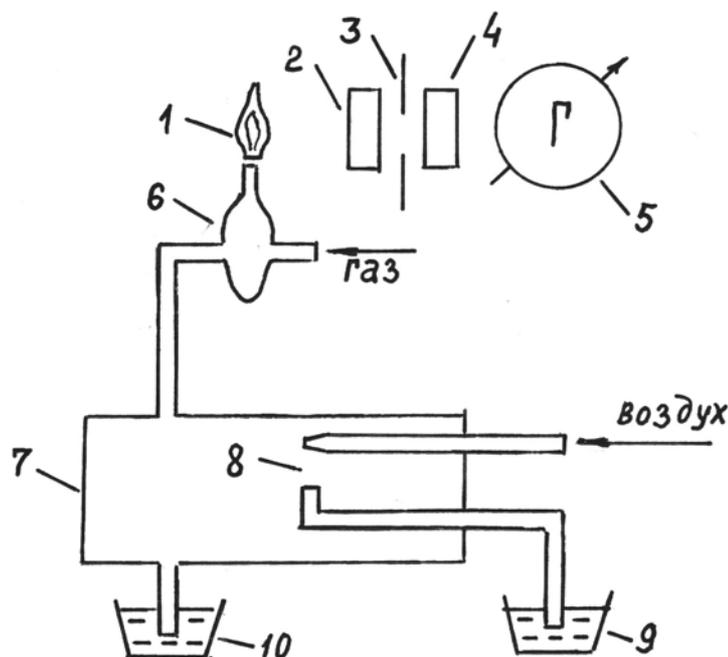


Рис. 2.2. Принципиальная схема пламенного фотометра:
 1 - пламя, 2 - светофильтр, 3 - диафрагма, 4 - фотоэлемент,
 5 - гальванометр, 6 - смеситель, 7 - распылительная камера,
 8 - распылитель, 9 - стаканчик с исследуемым веществом,
 10 - водяной затвор.

Воздух при давлении 0,8 атм поступает в распылитель (8), который засасывает раствор из стаканчика (9) и распыляет его в камере (7). Крупные капельки раствора, осевшие на стенках, стекают через водяной затвор (10) в сосуд. Водяной затвор необходим для того, чтобы предотвратить утечку воздуха и газа через распылительную камеру.

Воздух, обогащенный мелкими капельками раствора-аэрозоля, содержащего анализируемое вещество, попадает в смеситель 6 и смешива-

ется с потоком газа. Из смесителя смесь газа, воздуха и исследуемого вещества подается в пламя (1), факел которого расположен перед светофильтром (2). Светофильтр пропускает на фотоэлемент только лучи, расположенные в узком участке спектра, в котором находится характерная для данного элемента частота излучения и соответствующая ей спектральная линия. Диафрагмой (3) в случае необходимости можно ограничить интенсивность светового потока и подобрать, таким образом, необходимую чувствительность прибора. Световой поток падает на фотоэлемент (4), а ток фотоэлемента отклоняет стрелку гальванометра (5). Чем больше вещества внесено в пламя, тем интенсивнее спектр испускания, тем больше отклонение стрелки гальванометра.

Прибор имеет три фотометрических головки с фотоэлементами и светофильтрами, приспособленными для определения K^+ , Na^+ , Ca^{2+} . Одновременное присутствие всех трех или других посторонних ионов не мешает определению каждого, так как характеристические линии K^+ , Na^+ , Ca^{2+} достаточно удалены друг от друга (табл. 2.1.) и хорошо разделяются светофильтрами.

Таблица 2.1.

Определяемый ион	Максимум светопропускания светофильтра, нм	Тип фотоэлемента
Na^+	589	Селеновый
K^+	768	Сернисто-серебряный
Ca^{2+}	620	селеновый

Методика определения одного из трех ионов состоит в следующем. Готовят серию растворов (4 - 6) с известным содержанием каждого из анализируемых ионов. Затем включают соответствующую фотометрическую головку и снимают показания гальванометра для всех концентраций приготовленных растворов, содержащих данный ион. Полученные величины наносят на график – калибровочную кривую и определяют по ней содержание иона в смеси.

После этого анализируют другие ионы смеси, переключая соответствующим образом фотометрические головки. При снятии показаний давление воздуха в системе, расход газа и режим работы распылителя должны оставаться неизменными, поскольку, как показано выше, интенсивность испускаемого света зависит как от концентрации анализируемого вещества в пламени, так и от температуры пламени. В свою очередь эти величины зависят от подачи газа и воздуха в прибор.

Выполнение работы

Готовят серии из 4 - 6 стандартных растворов для каждого иона. Исходные растворы с содержанием $C(\text{KCl}) = 0,013$ моль/л; $C(\text{NaCl}) = 0,022$ моль/л; $C(\text{CaCl}_2) = 0,125$ моль/л отбирают в необходимых количествах из бюретки в мерные колбочки на 50 мл и доводят до метки дистиллированной водой, после чего тщательно перемешивают.

Расчет концентрации производится по формуле:

$$C_k = C_b \cdot (V_b / V_k),$$

где C_k , C_b – концентрация в колбе и бюретке соответственно; V_b - объем вещества, отобранного из бюретки; V_k – объем колбы (50 мл).

После приготовления этих растворов берут колбочку с анализируемой (неизвестной концентрации) жидкостью на 50 мл, раствор в которой разбавляют водой, доводя до метки.

Пропуская через прибор дистиллированную воду, устанавливают по воде стрелку гальванометра на нуль, пользуясь ручкой установки нуля.

Берут стандартный раствор с наибольшей концентрацией, наливают его в стаканчик и определяют отклонение гальванометра. Затем повторяют опыты для других растворов того же иона и анализируемой смеси.

После каждого определения прибор промывают дистиллированной водой до тех пор, пока стрелка гальванометра не вернется на нуль. Результаты заносят в таблицу, строят калибровочную кривую для определения концентрации анализируемого иона в смеси.

Если в задании указана смесь трех ионов, строят три калибровочные кривые и по ним определяют содержание всех трех ионов.

Контрольные вопросы

1. Каковы физические основы эмиссионной спектроскопии?
2. На чем основан качественный спектральный анализ?
3. От чего зависит интенсивность спектральных линий?
4. Дать общую характеристику метода фотометрии пламени. Какие основные приемы работы используются в методе фотометрии пламени? Какие достоинства и недостатки имеет этот метод?
5. Принципиальная схема пламенного фотометра.

Литература

1. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 9-49.
2. Практикум по физико-химическим методам анализа / Под. ред. О.М. Петрухина. М.: Химия, 1987. С. 12-87.
3. Крешков А.П. Основы аналитической химии: В 3-х ч. Ч. 3. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. М.: Химия, 1970. С. 224-244.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Электрохимические методы анализа основаны на использовании электрохимических процессов, происходящих в электролитической ячейке (гальваническом элементе, цепи). Электролитическая ячейка представляет собой электрохимическую систему, состоящую из электродов и электролитов, контактирующих между собой. На границе раздела фаз может происходить электродная реакция между компонентами этих фаз, в результате которой электрический заряд переходит из одной фазы в другую, и на межфазной границе устанавливается потенциал. В состав электролитической ячейки входят два или три электрода, один из которых - индикаторный или рабочий, второй - электрод сравнения и третий - вспомогательный. Электрод, действующий как датчик, реагируя на фактор возбуждения и на состав раствора (не оказывая влияния на состав раствора за время измерения), является индикаторным. Электрод сравнения служит для создания измерительной цепи и поддержания постоянного значения потенциала индикаторного (рабочего) электрода. Используемый в трехэлектродной ячейке вспомогательный электрод (противоэлектрод) вместе с рабочим электродом включен в цепь, через которую проходит электрический ток. В состав электролитической ячейки могут входить два идентичных электрода, выполняющих одинаковую функцию.

Электрохимические методы анализа основаны на использовании зависимости электрических параметров от концентрации, природы и структуры вещества, участвующего в электродной (электрохимической) реакции или электрохимическом процессе переноса зарядов между электродами. Согласно рекомендациям ИЮПАК электрохимические методы анализа можно классифицировать следующим образом: 1) методы без протекания электродной реакции, в которых строение двойного электрического слоя в расчет не принимается (кондуктометрия); 2) методы, основанные на электродных реакциях в отсутствие тока (потенциометрия) или под током (вольтамперометрия, кулонометрия, электрогравиметрия).

Электрические параметры (сила тока, напряжение, сопротивление) могут служить аналитическими сигналами, если они измерены с достаточной точностью. Электрохимические методы анализа используют либо для прямых измерений, основанных на зависимости “аналитический сигнал- состав”, либо для индикации конечной точки титрования в тит-

рометрии. Электрохимические методы анализа позволяют определять концентрацию вещества в широком интервале ($1 - 10^{-9}$ моль/л) с достаточной точностью и воспроизводимостью, могут быть легко автоматизированы.

Глава 3. Кондуктометрия

Кондуктометрия – это метод определения различных физико-химических величин, основанный на измерении электрической проводимости (электропроводности).

3.1. Электропроводность растворов электролитов

Электропроводностью называют способность растворов электролитов проводить электрический ток под действием внешнего электрического поля.

Величину, обратную электрическому сопротивлению ($1/R$), называют электропроводностью. Единицей электропроводности является сименс (См). Таким образом, $1 \text{ См} = 1 \text{ Ом}^{-1}$.

Для определения электропроводности может использоваться кондуктометрическая ячейка – стеклянный сосуд без дна с двумя электродами известной площади (S), прочно укрепленными на фиксированном расстоянии друг от друга (L). Электроды выполнены из платиновой черни. Ячейку погружают в раствор электролита, как показано на рис. 3.1.

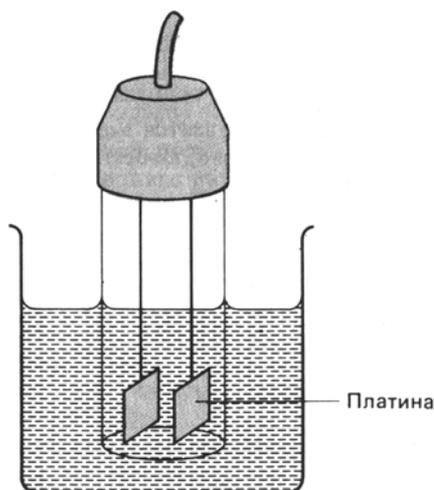


Рис. 3.1. Кондуктометрическая ячейка

Сопротивление кондуктометрической ячейки измеряют при помощи специального устройства – мостика Уитстона (рис. 3.2). Скользящий контакт перемещается по проволочному сопротивлению до тех пор, пока осциллограф не зарегистрирует минимальный сигнал. В этом положении контакта (точка X) сопротивление ячейки определяется соотношением:

$$R_{\text{я}} = BX \cdot R_{\text{р}} / AX,$$

где $R_{\text{р}}$ – сопротивление реостата.

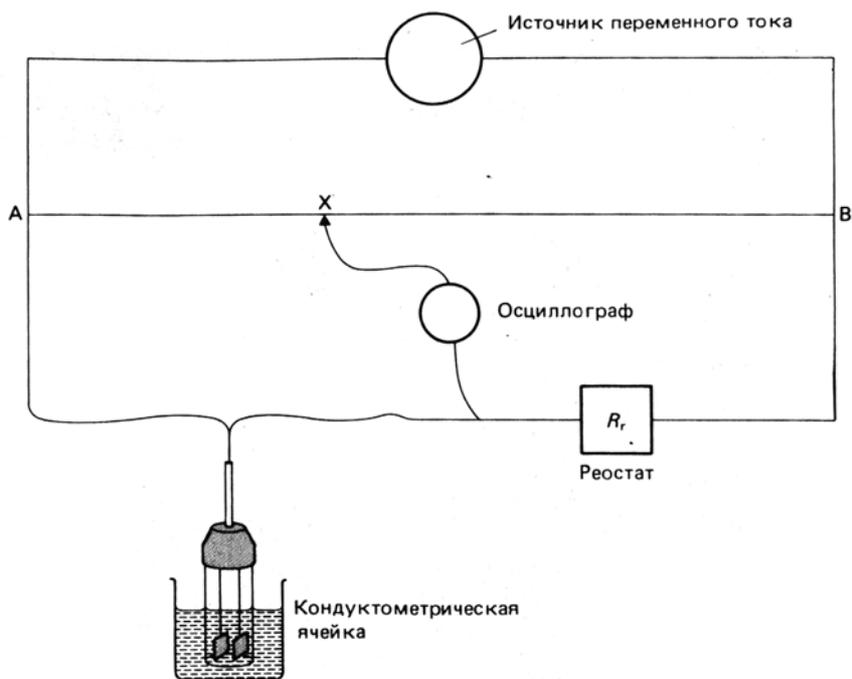


Рис. 3.2. Мостик Уитстона

После того, как найдено сопротивление ячейки, можно вычислить электропроводность раствора. Для измерения электропроводности необходимо использовать высокочастотный источник переменного тока. Использование источника постоянного тока невозможно из-за того, что это вызовет электролиз раствора.

Отношение (L/S) представляет собой постоянную величину, характерную для данной ячейки. Она называется постоянной или константой ячейки (сосуда.). Ее можно определить, измеряя с помощью данной ячейки сопротивление какого-либо раствора с известной электролитической проводимостью.

Постоянная сосуда является очень важной характеристикой ячейки. Она зависит от площади электродов, расстояния между ними, от формы сосуда и объема раствора, проводящего ток. Вследствие того, что в переносе электричества участвует заметно больший объем раствора, чем тот, который заключен между электродами (рис. 3.1.), уровень жидкости, которая заливается в сосуд для измерения электропроводности (из-

мерительную ячейку), должен превышать край электродов примерно на два расстояния между электродами.

Постоянную сосуда находят экспериментально по электрической проводимости стандартных растворов с хорошо известными значениями удельной электропроводности (“ χ ”) в широкой области температур и концентраций. Обычно в качестве стандартных используют водные растворы хлорида калия. Для определения константы сосуда измеряют сопротивление раствора хлорида калия. Удельная электропроводность хлорида калия приведена в таблице.

Таблица

**Удельная электропроводность раствора хлорида калия
[C(KCl) = 0,02 моль/л] при различных температурах**

Температура, °С	$X\chi$, См·см ⁻¹	Температура, °С	$\chi\chi$, См·см ⁻¹
0	0,001521	20	0,002606
10	0,001994	25	0,002765
14	0,003193	30	0,003036
18	0,002397	35	0,003320

Различают удельную и эквивалентную электропроводности.

3.1.1. Удельная электропроводность

Удельная электропроводность является величиной, обратной удельному сопротивлению, и обозначается символом χ (каппа). Таким образом,

$$\chi = 1/\rho,$$

где ρ - удельное сопротивление (измеряется в единицах Ом·м).

$$\text{Если } R = \rho \cdot L/S,$$

где R – сопротивление проводника (Ом); L – длина проводника (м); S – площадь поперечного сечения (м²), то

$$\rho = R \cdot S/L,$$

$$\chi = L/R \cdot S.$$

Удельная электропроводность измеряется в единицах Ом⁻¹·м⁻¹ либо Ом⁻¹·см⁻¹. Вместо этого для нее могут использоваться См·м⁻¹ либо См·см⁻¹. Нетрудно видеть, что

$$1 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} = 1 \text{ См} \cdot \text{см}^{-1}.$$

Удельной электропроводностью называют электропроводность столбика раствора электролита длиной 1 см и поперечным сечением 1 см².

$$\text{Если } K = L/S,$$

где $K [см^{-1}]$ – постоянная (константа) сосуда, то

$$\chi = K/R.$$

Электропроводность растворов электролитов зависит от скорости движения ионов, концентрации ионов и температуры.

Зависимость удельной электропроводности от скорости движения ионов определяется соотношением:

$$\chi = F \cdot C \cdot \alpha \cdot (V_+ + V_-) / 1000,$$

где F - число Фарадея, C – концентрация раствора, α - степень диссоциации, V_+ , V_- - абсолютные скорости движения катионов и анионов.

В разбавленных растворах слабых и сильных электролитов удельная электропроводность с увеличением концентрации растет, но при некоторой достаточно высокой концентрации достигает максимума и затем падает. На рис. 3.3. приведены типичные примеры этой зависимости. Электрическая проводимость слабого электролита (CH_3COOH , кривая 3) значительно ниже соответствующей величины для растворов HCl (кривая 1) или KOH (кривая 2).

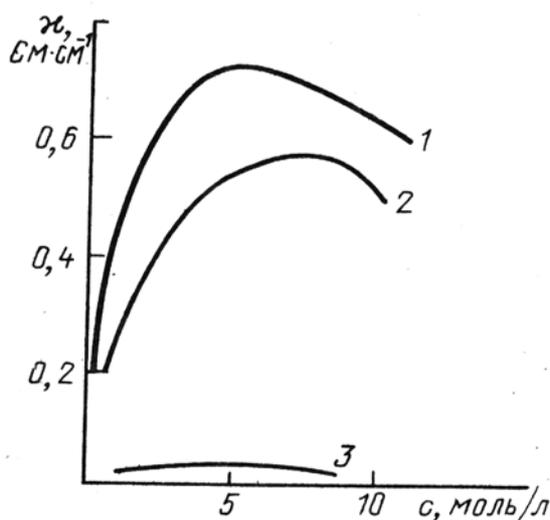


Рис. 3.3. Изменение удельной электропроводности с концентрацией

Возрастание электрической проводимости с ростом концентрации в растворах происходит вследствие увеличения числа ионов. Однако в концентрированных растворах возникают и другие эффекты, приводящие к уменьшению электропроводности.

В концентрированных растворах сильных электролитов ($\alpha=1$) возрастают силы межйонного взаимодействия, вследствие чего происходит образование межйонных ассоциатов или ионных пар, что приводит к снижению скорости движения ионов и, следовательно, уменьшению электрической проводимости. Для слабых электролитов в концентрированных растворах удельная электропроводность падает, т.к. уменьшается степень диссоциации (чем больше концентрация, тем ниже α).

3.1.2. Эквивалентная электропроводность

Эквивалентной электропроводностью (λ) называют электропроводность раствора, содержащего 1 моль эквивалента вещества и находящегося между двумя параллельными электродами, расстояние между которыми 1 см.

Удельная и эквивалентная электропроводность взаимосвязаны соотношением

$$\lambda = 1000 \cdot \chi / C = \chi \cdot \varphi,$$

где C - молярная концентрация эквивалента, моль/л; φ - разведение (объем раствора в мл, содержащий 1 моль эквивалента вещества).

Ее единицей измерения является $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль-экв}^{-1}$.

Кроме эквивалентной электропроводности в электрохимии используется молярная электропроводность (μ), когда раствор содержит один моль растворенного вещества. Молярная электропроводность измеряется в единицах $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$ или $\text{См} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$. Для одновалентных электролитов молярная электропроводность равна эквивалентной электропроводности; для электролитов типа H_2SO_4 и CaCl_2 $\mu=2\lambda$, для AlCl_3 $\mu=3\lambda$ и т.п.

Эквивалентная электропроводность как для сильных, так и для слабых электролитов возрастает с увеличением разведения, т.е. с уменьшением концентрации, и достигает некоторого предельного значения (рис. 3.4.).

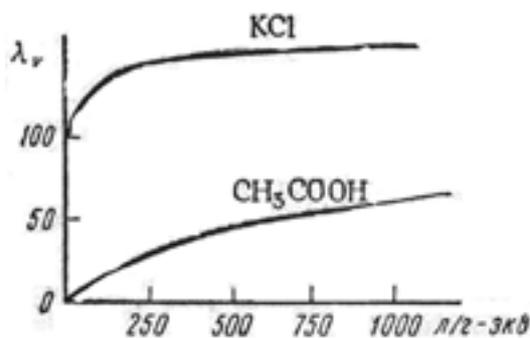


Рис. 3.4. Изменение эквивалентной электропроводности с разведением раствора

Это объясняется тем, что у слабых электролитов по мере разбавления растет степень диссоциации, т.е. увеличивается число ионов; у сильных электролитов увеличивается расстояние между ионами, ослабляются силы взаимного притяжения между ними и, следовательно, увеличиваются скорости движения ионов.

Электропроводность бесконечно разбавленных растворов, для которых достигается максимальное значение эквивалентной электропро-

водности, называется эквивалентной электропроводностью при бесконечном разведении (λ_{∞}).

Удельная и эквивалентная электропроводности растворов электролитов повышаются с увеличением температуры за счет понижения вязкости раствора и уменьшения степени гидратации ионов. В водных растворах повышение составляет 2 - 2,5% на градус. Для бесконечно разбавленных растворов эквивалентная электропроводность может быть вычислена по уравнению:

$$\lambda_{\infty(t)} = \lambda_{\infty(25)^0} [1 + \alpha (t - 25)],$$

где α - эмпирический коэффициент, зависящий от природы ионов и растворителя.

Кондуктометрические методы анализа применяются в промышленности для аналитического контроля концентрации солевых растворов, содержания солей в поверхностных и подземных водах, для контроля очистки и качества воды, оценки загрязненности сточных вод. Кондуктометрические методы имеют определенные преимущества перед другими методами анализа:

1) проводить определения в мутных и окрашенных растворах, а также в присутствии окислителей и восстановителей, ограничивающих применение органических индикаторов;

2) анализировать не только концентрированные растворы, но и разбавленные до 10^{-4} моль/л;

3) проводить исследование не только водных, но и неводных, а также смешанных водно-органических растворов;

4) широко использовать разнообразные типы реакций: нейтрализации, осаждения, комплексообразования, окисления-восстановления, присоединения, замещения, омыления и т.д., сопровождающиеся изменением электропроводности исследуемых растворов;

5) во многих случаях избегать предварительного отделения примесей, обычно мешающих определению другими методами.

3.2. Электропроводность природных вод

В поверхностных водах, содержащих преимущественно неорганические вещества, удельная электропроводность служит приблизительным показателем суммарной их концентрации. Природные воды представляют, в основном, растворы смесей сильных электролитов. Минеральную часть воды составляют главным образом ионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- . Этими ионами обуславливается электропроводность природных вод. Присутствие других ионов, например Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , NO_3^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , не сильно влияет на электропроводность, т.к. эти ионы редко встречаются в воде в значительных количествах. Растворенные газы также не оказывают заметного влияния на электропроводность воды. Известные затруднения, возникающие при оценке суммарного содержания неорганических веществ (минерализации) по величине удельной электропроводности, обусловлены рядом причин. Главные из них – неодинаковая удельная электропроводность растворов различных солей, широкие вариации химического состава поверхностных вод.

Большинство рек имеют минерализацию от нескольких десятков миллиграммов на литр до нескольких сотен. Их удельная электропроводность заключена в пределах $2 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-2}$ См·см⁻¹. Минерализация подземных вод и соленых озер находится в интервале от 40-50 мг/л до 650 мг/л, атмосферных осадков – колеблется от 3 до 60 мг/л. Удельная электропроводность атмосферных осадков – 10^{-5} См·см⁻¹, а вод, минерализация которых больше 1 г/л – свыше 10^{-2} См·см⁻¹. Многие производства, сельское хозяйство, предприятия питьевого водоснабжения предъявляют определенные требования к качеству воды, в частности к минерализации, т.к. вода, содержащая большое количество солей, отрицательно влияет на растительные и животные организмы, качество продукции, вызывает ускоренное образование накипи на стенках котлов, коррозию металлов, засоление почв. В силу этого величина удельной электропроводности, являющаяся приближенным показателем концентрации электролитов, главным образом неорганических, и применяется для оценки минерализации.

3.3. Кондуктометрическое титрование

Электропроводность раствора может служить индикаторным свойством при проведении объемного анализа. Так, например, содержание вещества в растворе может быть определено по изменению электропроводности в процессе добавления к раствору соответствующего реагента.

Об эквивалентной точке титрования судят по изменению характера зависимости электропроводности раствора от объема добавляемого титранта. Точку эквивалентности определяют по резкому излому кривой титрования (пересечению двух прямых), отражающему изменение электропроводности исследуемого раствора по мере прибавления титранта в процессе титрования. Такой метод анализа называется кондуктометрическим титрованием. Метод особенно удобен при анализе мутных или окрашенных растворов, когда нельзя использовать обычные индикаторы.

Факторами, влияющими на электропроводность исследуемого раствора при титровании, являются изменение концентрации ионов и их подвижности.

Рассмотрим вид этих кривых применительно к кислотно-основному титрованию.

Титрование сильной кислоты сильным основанием

При титровании сильной кислоты, например HCl, сильным основанием, например раствором NaOH, в растворе в любой момент находятся ионы H^+ , Cl^- , Na^+ и OH^- , а электрическая проводимость будет определяться их концентрациями и подвижностями.

Изменение электропроводности до точки эквивалентности (рис. 3.5.) будет определяться действием двух взаимно противоположных тенденций: понижающей за счет уменьшения концентрации ионов водорода и возрастающей за счет увеличения концентрации ионов натрия.

Результатирующая этих вкладов приводит к резкому уменьшению электропроводности до точки эквивалентности. Таким образом, падение проводимости вызывается уменьшением концентрации иона H^+ , имеющего при 25 °C подвижность 350 См·см²/(моль-экв.), что намного превышает подвижность иона Na^+ [50 См·см²/(моль-экв.)]. В момент полной нейтрализации в растворе остаются только ионы Na^+ и Cl^- .

После точки эквивалентности начинается резкий подъем электропроводности, так как в растворе будет нарастать концентрация ионов Na^+ и OH^- , подвижность которых составляет 199 См·см²/(моль-экв.). Од-

нако возрастание будет более пологим, так как подвижность иона OH^- почти в 2 раза меньше подвижности иона водорода.

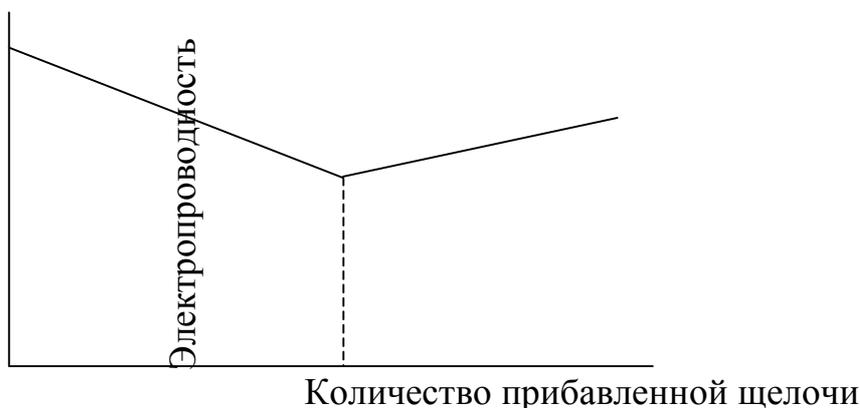


Рис. 3.5. Кривая кондуктометрического титрования сильной кислоты сильным основанием

Титрование слабой кислоты сильным основанием

Если кислота слабая, то электропроводность исходного раствора мала, так как ионов H^+ мало. По мере добавления раствора сильного основания (рис. 3.6.) электропроводность в отличие от предыдущего случая сразу же увеличивается из-за накопления ионов соли, то есть M^+ и A^- , так как соль диссоциирует полностью. После достижения точки эквивалентности электропроводность растет за счет увеличения концентрации ионов Na^+ и ионов OH^- с высокой подвижностью.

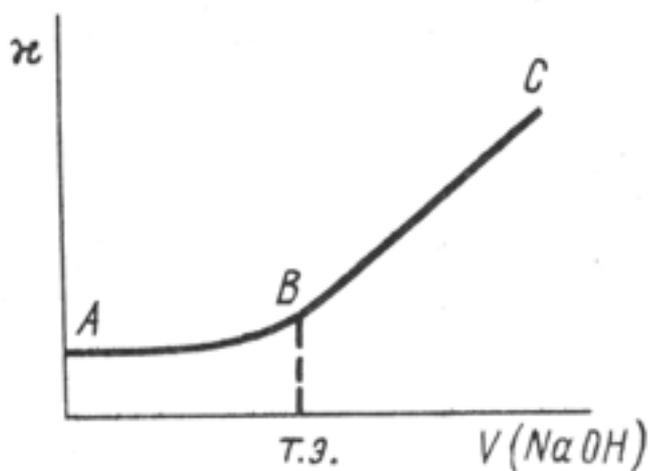


Рис. 3.6. Кривая кондуктометрического титрования слабой кислоты сильным основанием

Титрование смеси сильной и слабой кислоты сильным основанием

При титровании смеси сильной и слабой кислот сильным основанием в первую очередь оттитровывается сильная кислота, так как диссоциация слабой кислоты подавлена присутствием сильной. При дальнейшем прибавлении сильного основания происходит титрование слабой кислоты. Кривая титрования (рис. 3.7) имеет два излома, соответствующие двум точкам эквивалентности: первая показывает объем щелочи, пошедшей на титрование сильной кислоты, а вторая дает общий объем щелочи, израсходованный на титрование обеих кислот.

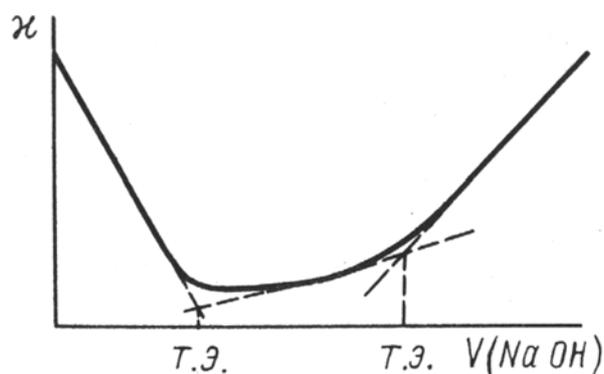


Рис. 3.7. Кривая кондуктометрического титрования смеси сильной и слабой кислот

Следует учитывать, что в ходе титрования исходный объем должен оставаться практически постоянным. Для получения прямых линий необходимо, чтобы объем прибавляемого титранта в эквивалентной точке не превышал 2% от объема анализируемого объема. Это достигается разбавлением исходного раствора в 15 - 20 раз либо концентрация титранта должна на порядок быть выше концентрации анализируемого раствора.

3.4. Практические работы

Кондуктометр ОК 102/1

Конструкция этого прибора исключает затруднительную компенсацию, имеющую место у обычных кондуктометров мостовой схемы. Прибор снабжен шкалой, отградуированной в обратных омах, Om^{-1} (в сименсах, См). Диапазон измерений от 0,1 микросименса (мкСм) до 0,5 сименса (См). Внешний вид кондуктометра представлен на рис. 3.8.

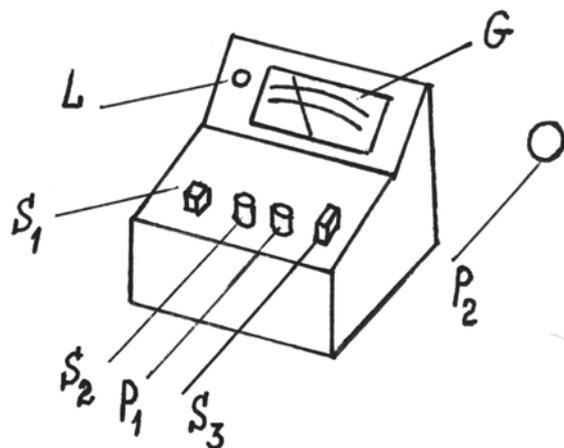


Рис. 3.8. Кондуктометр ОК 102/1

L - индикаторная лампа, *S*₁ - тумблер включения в сеть, *P*₁, *P*₂ - потенциометры, “calibration” - для калибровки шкалы, *S*₂ - переключатель пределов измерения, *S*₃ - нажимная кнопка “calibration”, *G* - микроамперметр

Порядок работы на приборе

1. Включить шнур питания в сеть.
2. Включить тумблер, прогреть прибор 5 мин.
3. Калибровка (калибровку перед началом работы следует производить лишь периодически – 1 раз в месяц).

Переключатель пределов измерения (*S*₂) поставить в положение 500 микросименс, затем нажать кнопку (*S*₃). Потенциометром “calibration” (*P*₁) стрелку прибора установить на красную метку. То же самое повторить в положение 150 микросименс переключателем измерения (*S*₂), но при этом стрелку прибора установить на красную метку с помощью потенциометра “calibration” (*P*₂), выведенного на заднюю панель прибора.

4. Погрузить электрод в исследуемый раствор так, чтобы все три платиновые кольца электрода полностью покрылись жидкостью.

5. Переключатель пределов измерения (*S*₂) поставить в такое положение, при котором на шкале прибора получится хорошо отсчитываемое показание. Затем проверить калибровку прибора: нажать кнопку “calibration” (*S*₃), стрелка прибора должна совпадать с красной меткой. В случае отклонения коррекция производится потенциометром “calibration”. После отпускания кнопки снять показания, учитывая положение ручки пределов измерений.

Работа 1. Анализ кислот и отдельных компонентов их смеси методом кондуктометрического титрования

Для выполнения работы производят кондуктометрическое титрование сильной и слабой кислоты, а также смеси сильной и слабой кислот сильным основанием.

Реактивы. 1. Раствор HCl (х.ч.), $C=0,1$ моль/л: измерительным цилиндром отмеривают 8,2 мл HCl, доводят до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе.

2. Раствор CH_3COOH (х.ч.), $C=0,1$ моль/л: 5,6 мл ледяной уксусной кислоты разбавляют до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе.

3. Раствор NaOH (х.ч.), $C=0,1$ моль/л: 4,0 г NaOH растворяют в 1 л дистиллированной воды в мерной колбе.

Выполнение работы

В измерительную ячейку заливают 5 мл исследуемой кислоты или смеси кислот. Кислоты разбавляют дистиллированной водой так, чтобы уровень жидкости над электродами был не менее 10 мм. Титрант приливают в процессе работы из бюретки порциями по 0,2 мл. При добавлении каждой порции титранта содержимое хорошо перемешивают и измеряют его электропроводность. Строят график $1/R$ от объема титранта.

Абсцисса пересечения прямых соответствует объему титранта в эквивалентной точке. Определив эквивалентную точку, рассчитывают концентрацию исследуемого раствора по формуле:

$$C_A = C_B \cdot V_B / V_A,$$

где C_A - молярная концентрация исследуемого раствора, моль/л; C_B - молярная концентрация титранта, моль/л; V_B - объем титранта, соответствующий эквивалентной точке, мл; V_A - объем аликвотной (кратной) части раствора, взятый для титрования, мл.

Если требуется определить содержание (г) анализируемого вещества, то используется формула:

$$g_A = C_B \cdot V_B \cdot M_{\text{р.в.}} \cdot V_K / 1000 \cdot V_A,$$

где g_A - содержание определяемого вещества, г; $M_{\text{р.в.}}$ - молярная масса растворенного (анализируемого) вещества, г/моль; V_K - объем анализируемого раствора, мл.

Работа 2. Определение удельной электропроводности воды

Реактивы. 1. Раствор KCl (х.ч.), $C=0,1$ моль/л: растворяют 7,456 г KCl в дистиллированной воде и объем доводят в мерной колбе до 1 л.

2. Раствор KCl ($C=0,02$ моль/л) получают разбавлением предыдущего раствора.

Выполнение работы

Электролитическую ячейку ополаскивают 3-4 раза сначала дистиллированной водой, а затем раствором KCl. Наливают в ячейку хлорида калия с концентрацией 0,02 моль/л и измеряют электропроводность раствора ($1/R$, См). Вычисление константы сосуда производят по формуле:

$$K=\chi/R,$$

где χ - удельная электропроводность ($\text{Ом}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) раствора KCl при температуре опыта, R – сопротивление раствора KCl в ячейке (Ом), K – постоянная сосуда (см^{-1}).

Затем электролитическую ячейку снова ополаскивают дистиллированной водой, а затем исследуемой водой (3-4 раза). Определяют сопротивление исследуемой воды, выдержанной в термостате при 25°C .

Удельную электропроводность воды рассчитывают по формуле:

$$\chi =K/R,$$

где $1/R$ – электропроводность исследуемой воды.

Контрольные вопросы

1. Что называется электропроводностью, какова ее размерность? В чем состоит принцип метода определения электропроводности?
2. Что называется удельной электропроводностью, какова ее размерность? Как зависит удельная электропроводность от концентрации ионов и их подвижности?
3. Что такое постоянная сосуда и какой смысл она имеет?
4. Что называется эквивалентной (молярной) электропроводностью, какова ее размерность? Как зависит эквивалентная электропроводность от концентрации ионов?
5. Как влияет температура на электропроводность? В чем причина зависимости электропроводности от температуры?
6. Почему нельзя проводить измерение электропроводности раствора, если электроды не полностью погружены в жидкость?
7. В чем состоит сущность метода кондуктометрического титрования?
8. От чего зависит ход кривых кондуктометрического титрования?
9. В каких случаях имеет место отклонение кривых от линейного хода?
10. В чем состоит преимущество метода кондуктометрического титрования перед другими объемными методами?

Литература

1. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 168-188.
2. Практикум по физико-химическим методам анализа / Под. ред. О.М. Петрухина. М.: Химия, 1987. С. 103-111.
3. Крешков А.П. Основы аналитической химии: В 3-х ч. Ч. 3. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. М.: Химия, 1970. С. 72-112.
4. Киреев В.А. Курс физической химии. М.: Химия. 1975. С. 516-550.

Глава 4. Потенциометрия

Потенциометрия - это метод определения различных физико-химических величин, основанный на измерении электродвижущей силы обратимых гальванических элементов.

$$E = \varphi_1 - \varphi_2,$$

где E – электродвижущая сила (э.д.с.); φ_1 и φ_2 – потенциалы электродов исследуемой цепи.

По данным потенциометрических измерений вычисляют константы равновесия, константы диссоциации кислот и оснований, константы устойчивости координационных соединений, произведение растворимости, определяют активность и коэффициент активности электролитов, водородный показатель (рН) и т.д. Если удается провести реакцию в гальваническом элементе и определить его э.д.с., то можно рассчитать значения основных термодинамических функций и характеристик:

$$\Delta G^0 = -z \cdot F E^0; \Delta S^0 = z F \cdot dE^0 / dT; \text{отсюда } \Delta H^0 = \Delta G^0 + T \cdot \Delta S^0;$$

$$E^0 = (RT/zF) \ln K,$$

где ΔG^0 - изменение стандартной молярной свободной энергии; z - число электронов, принимающих участие в электродной реакции; F - постоянная Фарадея, равная 96500 Кл/моль; E^0 - стандартная э.д.с. гальванического элемента; ΔS^0 – изменение стандартной молярной энтропии реакции; T - абсолютная температура, К; ΔH^0 - изменение стандартной молярной энтальпии реакции; R - универсальная газовая постоянная; K - константа равновесия окислительно-восстановительной реакции, протекающей в элементе.

4.1. Электродный потенциал

В настоящее время отсутствуют теоретические и экспериментальные методы определения абсолютных значений потенциалов, соответствующих отдельным электродам. Можно точно определить только э.д.с. цепи, составленной из данного электрода и стандартного водородного электрода, потенциал которого условно принимают равным нулю.

Потенциометрические методы анализа известны с конца прошлого века, когда Беренд сообщил (1883 г.) о первом потенциометрическом титровании, а Нернст (1889 г.) вывел уравнение, связывающее величину

потенциала электрода с активностью и концентрацией веществ, участвующих в электродном процессе:

$$\begin{aligned}\varphi &= \varphi^0 - (RT/zF) \ln [a_{\text{red}} / a_{\text{ox}}] = \\ &= \varphi^0 - (RT/zF) \ln [(\gamma \cdot C)_{\text{red}} / (\gamma \cdot C)_{\text{ox}}],\end{aligned}$$

где φ - потенциал электрода; φ^0 - стандартный электродный потенциал, т.е. потенциал данного электрода при активности реагентов, участвующих в электродной реакции, равной единице; a_{red} , a_{ox} , C_{red} , C_{ox} - активности и концентрации соответственно восстановленной и окисленной форм редокс-системы; γ_{red} , γ_{ox} - коэффициенты активности.

Коэффициент активности учитывает силы межмолекулярного взаимодействия, зависит от ионной силы раствора, а также от степени гидратации ионов и не зависит от химической природы отдельных ионных частиц. Для бесконечно разбавленных растворов $\gamma=1$; по мере повышения концентрации коэффициент активности сначала уменьшается, а затем возрастает, большей частью оставаясь все же меньше единицы.

Потенциометрические методы анализа подразделяют на прямую потенциометрию (ионометрию) и потенциометрическое титрование. Методы прямой потенциометрии основаны на прямом применении уравнения Нернста для нахождения активности или концентрации участника электродной реакции по экспериментально измеренной э.д.с. цепи или потенциалу соответствующего электрода. При потенциометрическом титровании точку эквивалентности определяют по резкому изменению (скачку) потенциала индикаторного электрода вблизи точки эквивалентности.

4.2. Электроды сравнения

На практике потенциометрия заключается в измерении э.д.с. гальванического элемента, составленного из двух полуэлементов: индикаторного электрода и электрода сравнения. Индикаторным называют электрод, потенциал которого зависит от концентрации (активности) определяемого иона. Потенциал электрода сравнения должен оставаться постоянным независимо от протекания каких-либо реакций в анализируемом растворе.

Электродвижущая сила (E) исследуемого элемента выражается как разность между потенциалом электрода сравнения ($\varphi_{\text{ср}}$) и потенциалом индикаторного электрода ($\varphi_{\text{инд}}$):

$$E = \varphi_{\text{ср}} - \varphi_{\text{инд}} + \varphi_{\text{д}},$$

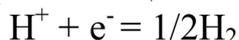
где $\varphi_{\text{д}}$ - диффузионный потенциал или потенциал жидкостного соединения.

Электроды сравнения должны обладать устойчивым во времени воспроизводимым потенциалом, не меняющимся при прохождении небольшого тока.

Водородный электрод является основным электродом сравнения. Его потенциал принимают равным нулю. Это газовый электрод первого рода. Используется в паре с исследуемым электродом для измерения электродного потенциала. Состоит из платиновой пластинки, электролитически покрытой мелко раздробленной чернью (платиновой чернью). Такая пластинка опускается в раствор, содержащий ионы водорода с активностью $a_{H^+} = 1$, и непрерывно омывается током чистого водорода с летучестью (f) равной 1. Водород адсорбируется на платиновой черни. Она является катализатором электродного процесса: ускоряет процесс адсорбции водорода, диссоциации молекул водорода на атомы и ионизации атома водорода с образованием протона и электрона.

Схема водородного электрода: $Pt, H_2 | H^+$.

Электродная реакция, протекающая на водородном электроде:



Уравнение Нернста для водородного электрода:

$$\varphi_{H_2} = \varphi_{H_2}^0 - (RT/F) \ln [(a_{H_2})^{1/2} / a_{H^+}],$$

так как $\varphi_{H_2}^0 = 0$, $a_{H_2} = f_{H_2} = 1$, $pH = -\lg a_{H^+}$, то

$$\varphi_{H_2} = (RT/F) \ln a_{H^+} = 2,303 (RT/F) \lg a_{H^+} = -2,303 (RT/F) pH.$$

Если $T = 298 \text{ K}$; $F = 96500 \text{ Кл /моль}$; $R = 8,314 \text{ Дж К}^{-1}\text{моль}^{-1}$, то

$$\varphi_{H_2} = -0,059 \text{ pH}.$$

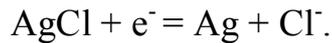
Водородный электрод обладает высокой точностью, хорошей воспроизводимостью результатов. Он может работать в интервале pH от 0 до 14 при любых давлениях водорода и при любых температурах. Недостатки: равновесие между электродом и раствором устанавливается в течение 20 – 30 мин., платина быстро отравляется каталитическими ядами, в присутствии окислителей и восстановителей он дает неверный результат.

На практике в качестве электродов сравнения используются электроды, потенциал которых по отношению к водородному (стандартному) точно известен (хлорсеребряный и каломельный).

Хлорсеребряный электрод представляет собой серебряную проволоку или пластинку, покрытую слоем $AgCl$ и помещенную в раствор KCl или HCl определенной концентрации (обратим относительно ионов хлора).

Схема полуэлемента: $Ag, AgCl | KCl$ или $Ag, AgCl | HCl$.

Электродная реакция, протекающая на хлорсеребряном электроде:



Уравнение Нернста для хлорсеребряного электрода:

$$\varphi_{\text{x. c.}} = \varphi_{\text{x. c.}}^0 - (RT/F) \ln (a_{\text{Ag}} a_{\text{Cl}^-} / a_{\text{AgCl}}),$$

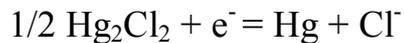
так как $a_{\text{Ag}} = 1$, $a_{\text{AgCl}} = 1$, получаем

$$\varphi_{\text{x. c.}} = \varphi_{\text{x. c.}}^0 - (RT/F) \ln a_{\text{Cl}^-}$$

В каломельном электроде паста из ртути и каломели (Hg_2Cl_2) помещена в раствор KCl (обратим относительно ионов хлора).

Схема полуэлемента: $\text{Hg}, \text{Hg}_2\text{Cl}_2 \mid \text{KCl}$.

Ему отвечает реакция:



Потенциал каломельного электрода равен:

$$\varphi_{\text{к.э.}} = \varphi_{\text{к.э.}}^0 - (RT/F) \ln a_{\text{Cl}^-}$$

Потенциалы хлорсеребряного, каломельного и ряда других электродов сравнения изучены при различных концентрационных и температурных условиях и их величины по отношению к стандартному водородному электроду хорошо известны (справочные данные).

4.3. Диффузионный потенциал

Диффузионный потенциал возникает на границе между растворами разных электролитов или растворов разной концентрации одного электролита. Возникновение диффузионного потенциала обусловлено неравномерным распределением катионов и анионов вдоль границы раздела растворов вследствие различия в скоростях диффузии ионов через поверхность раздела. Различие в скоростях диффузии вызывается разницей в подвижностях ионов или градиентом концентраций.

В зависимости от заряда ионов, их подвижностей, концентрации раствора, природы растворителя и других факторов диффузионный потенциал изменяется в очень широких пределах: от долей милливольт до десятков милливольт и более.

На практике диффузионный потенциал стремятся уменьшить (устранить) с помощью так называемого солевого мостика. Солевой мостик представляет собой U-образную трубочку, заполненную гелем (агар-агар), который пропитан раствором электролита. Основным назначением

солевого мостика является осуществление электролитического контакта, однако с целью элиминирования диффузионного потенциала для солевого мостика применяют концентрированный раствор электролита с приблизительно одинаковыми подвижностями катиона и аниона. Очень часто в качестве солевого мостика используют насыщенный раствор KCl, применяют также растворы NH_4NO_3 , KNO_3 и др. Солевой мостик помещают между растворами, заменяя таким образом границу раздела и существенно уменьшая диффузионный потенциал.

4.4. Прямая потенциометрия

Методы прямой потенциометрии основаны на непосредственном применении уравнения Нернста для нахождения активности или концентрации участника электродной реакции по экспериментально измеренной э.д.с. цепи или потенциалу электрода. Наибольшее распространение среди прямых потенциометрических методов получил метод определения рН, хотя создание в последнее время надежно работающих ионоселективных электродов значительно расширило практические возможности прямых методов. Прямые потенциометрические методы часто стали называть ионометрическими методами анализа или ионометрией. Эта группа методов интенсивно развивается в связи с успехами в конструировании и улучшении качества ионоселективных электродов, позволяющих проводить быстро и точно определение концентрации или активности ионов и обладающих рядом других достоинств.

4.4.1. Водородный показатель и потенциометрический метод определения рН

Понятие о водородном показателе введено в 1909 г. Зеренсенем, который под водородным показателем понимал отрицательный десятичный логарифм молярной концентрации ионов водорода: $\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$.

В настоящее время величина рН считается характеристикой активности ионов водорода:

$$\text{pH} = -\lg a_{\text{H}^+} = -\lg C_{\text{H}^+} \cdot \gamma_{\text{H}^+}.$$

Для разбавленных растворов $\gamma_{\text{H}^+} = 1$, поэтому для расчета рН таких растворов можно пользоваться концентрациями.

Надо помнить, что рН является логарифмической функцией концентрации ионов водорода и изменение рН на единицу соответствует десятикратному изменению концентрации ионов H^+ .

Величины рН лежат в пределах от 0 до 14. Величины рН ниже нуля (отрицательная величина) и выше 14 возможны для растворов, с концен-

трацией более 1 моль/л, соответственно, сильной кислоты и сильного основания. Однако наиболее часто встречающиеся значения pH лежат в пределах от 0 до 14. В настоящее время трудно найти отрасль науки или производства, в которой не использовались величины pH. Величина pH характеризует процессы жизнедеятельности животных и растений, кислотность почв. Величиной pH пользуются в гидрохимии и гидрологии.

Потенциометрический метод определения pH основан на применении гальванических элементов, в которых индикаторный электрод обратим по отношению к ионам водорода.

Для экспериментального определения pH могут быть использованы различные индикаторные электроды: водородный, хингидронный, стеклянный и др. Наибольшее практическое применение в последнее время нашел стеклянный электрод, используемый в широком интервале pH и в присутствии окислителей.

Стеклянный электрод (рис. 4.1.) представляет собой тонкостенный стеклянный шарик (1), заполненный раствором HCl либо буферным раствором (2). Внутрь шарика помещают вспомогательный хлорсеребряный электрод (3).

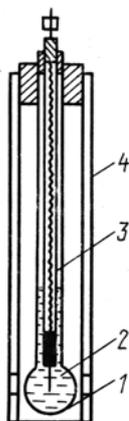


Рис. 4.1. Стеклянный электрод

Перед работой стеклянный электрод некоторое время вымачивают в растворе HCl. При этом ионы водорода из раствора обмениваются на ионы натрия из стеклянной мембраны и в системе устанавливается некоторое равновесие. Подготовленный таким образом электрод, в котором протоны поверхности стекла находятся в равновесии с протонами раствора, может быть использован для определения pH. Величина скачка потенциала на границе раствор - внешняя поверхность мембраны стеклянного электрода зависит от активности ионов водорода в исследуемом растворе.

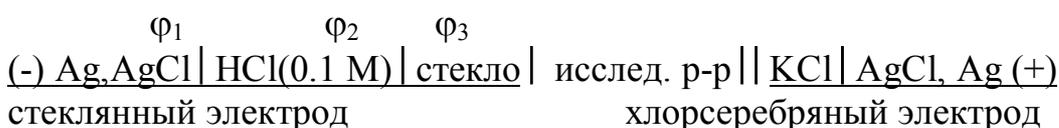
От ранее рассмотренных электродов стеклянный электрод отличается тем, что в потенциалопределяющей реакции электроны не прини-

мают участие. Электродная реакция на стеклянном электроде представляет собой обмен ионами водорода между анализируемым раствором и стеклом (стеклянной мембраной):



Стеклянный электрод является ионообменным электродом. Для его изготовления используются специальные сорта ионитов. Переход иона водорода из одной фазы в другую эквивалентен переносу единицы заряда, поэтому $z = 1$.

Стеклянный электрод обычно используют в паре с хлорсеребряным электродом сравнения. Применяемую при этом электрохимическую цепь можно записать следующим образом



Потенциал стеклянного электрода включает три скачка:

1) φ_1 - скачок потенциала на границе раздела металл внутреннего электрода - буферный раствор или $\text{C}(\text{HCl}) = 0,1$ моль/л, $\varphi_1 - \text{const}$;

2) φ_2 - скачок потенциала на границе буферный раствор или $\text{C}(\text{HCl}) = 0,1$ моль/л - внутренняя поверхность мембраны (стекло), $\varphi_2 - \text{const}$;

3) φ_3 - скачок потенциала на границе внешняя поверхность мембраны (стекло) - исследуемый раствор, $\varphi_3 \neq \text{const}$.

ЭДС этой цепи равна

$$E = \varphi_{\text{правый}} - \varphi_{\text{левый}} = \varphi_{\text{х.с.}} - \varphi_{\text{ст}}$$

Потенциал стеклянного электрода выражается уравнением Нернста:

$$\varphi_{\text{ст}} = \varphi_{\text{ст}}^0 + (RT/F) \ln (a_{\text{H}^+})$$

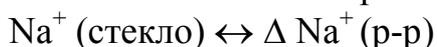
Стандартный потенциал стеклянного электрода ($\varphi_{\text{ст}}^0$) зависит от сорта стекла мембраны, состава внутреннего раствора и температуры. Рассчитать его невозможно, так как он включает потенциал асимметрии, обусловленный различием электрохимических свойств внутренней и внешней поверхностей стеклянной мембраны. С целью уменьшения потенциала асимметрии стеклянный электрод вымачивают в растворе HCl и после этого хранят в дистиллированной воде. Так как рассчитать $\varphi_{\text{ст}}^0$ невозможно, поэтому эта операция заменяется настройкой приборов (рН-метров) по стандартным буферным растворам, так как шкала рН-метров проградуирована непосредственно в единицах рН.

Основными достоинствами стеклянного электрода являются: простота работы, не подвержен действию ядов, применимость в широкой области рН, быстрое установление равновесия и возможность определения рН в окислительно-восстановительной системе (так как электроны не участвуют в электродном процессе). К недостаткам относят хрупкость их конструкции и усложнение работы при переходе к сильно щелочным и сильно кислым растворам.

4.4.2. Ионоселективные электроды

Решающее влияние на развитие и успехи ионометрического метода анализа оказало удачное конструирование ионоселективных электродов на основе различных мембран. Стеклянные ионоселективные электроды чувствительны к ионам щелочных металлов Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , а также к ионам Ag^+ , Tl^+ и NH_4^+ . Их устройство и принцип действия такие же, как и у стеклянного электрода. Наиболее существенным отличием является состав стекла, из которого готовятся мембраны. Установлено, в частности, что введение Al_2O_3 в стекло положительно влияет на селективность мембраны к ионам металлов, но не к H^+ .

Селективный электрод, например, с натриевой функцией находится в равновесии с ионами натрия в растворе:



Важной характеристикой ионоселективного электрода является его коэффициент селективности, показывающий, во сколько раз электрод более чувствителен к данным ионам, чем к посторонним (мешающим). Например, в паспорте электрода на калий указано, что электрод селективен в присутствии ионов Na^+ и NH_4^+ при превышении их концентрации соответственно в 200 и 20 раз по сравнению к ионам K^+ .

Стеклянные ионоселективные электроды широко используются для определения катионов щелочных металлов в различных биологических пробах - крови, плазме, сыворотках и т.д., в объектах окружающей среды - водах, растениях, различных экстрактах и т.д. Определения с помощью ионоселективных электродов успешно конкурируют с пламенно-фотометрическими методами по точности и нередко превосходят их по скорости.

В твердых мембранных электродах ионочувствительный элемент изготавливается из малорастворимого кристаллического вещества с ионным характером проводимости. Из электродов этого типа широко применяется фторидный электрод, в котором мембраной является монокристалл LaF_3 , имеющий чисто фторидную проводимость. Чувствительность фторидного электрода позволяет проводить измерения равновесной концентрации фторид-ионов в широкой области концентраций от

10^{-6} до 1 моль/л. Селективность электрода очень высока - даже тысячекратный избыток посторонних ионов (галогенид-, нитрат-, сульфат-ионов и др.) по сравнению с фторид-ионом не мешает его определению и только в присутствии OH^- -ионов селективность падает.

Фторидный электрод используется для определения фторид-ионов (F^-) в питьевой воде, различных биологических пробах, витаминах, при контроле за загрязнением окружающей среды и т.д.

Практическое значение имеет ионоселективный электрод с мембраной из сульфида серебра, пригодный для измерения концентрации (активности) Ag^+ и S^{2-} -ионов.

На основе сульфида серебра конструируются также различные галогенидные электроды. Для этого в сульфид серебра вводят галогениды серебра. Электроды на основе сульфида серебра с добавкой соответствующего галогенида серебра чувствительны к ионам Cl^- , Br^- , I^- , CN^- и др.

4.5. Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование как метод количественного объемного анализа представляет собой особую ценность в тех случаях, когда по ряду причин (например, при титровании мутных и окрашенных растворов) для фиксирования точки эквивалентности не могут быть применены обычные индикаторы.

Сущность его состоит в том, что точка эквивалентности находится не по переходу окраски индикатора, а по резкому изменению (скачку) потенциала индикаторного электрода.

Потенциометрическое титрование применяют для реакций нейтрализации, осаждения, комплексообразования и окислительно-восстановительных. Во всех случаях индикаторный электрод должен быть обратим либо по отношению к ионам водорода в растворе, либо по отношению к ионам, образующим комплексное или труднорастворимое соединение, выпадающее в осадок.

Для потенциометрического титрования собирают гальванический элемент из индикаторного электрода в анализируемом растворе и электрода сравнения.

Индикаторный электрод - электрод, который служит для определения точки эквивалентности при титровании.

В кислотно-основном титровании в качестве индикаторного электрода обычно используют стеклянный электрод. В качестве электродов сравнения чаще всего применяют хлорсеребряный или каломельный.

В известный объем титруемого раствора прибавляют небольшими порциями при постоянном перемешивании титрант и каждый раз изме-

ряют э.д.с. элемента. Титрующий раствор (титрант) должен быть примерно в 10 раз более концентрированный, чем титруемый. Для нахождения точки эквивалентности строят кривую титрования, нанося по оси ординат изменение потенциала индикаторного электрода, а по оси абсцисс - количество миллилитров титранта (рис. 4.2.).

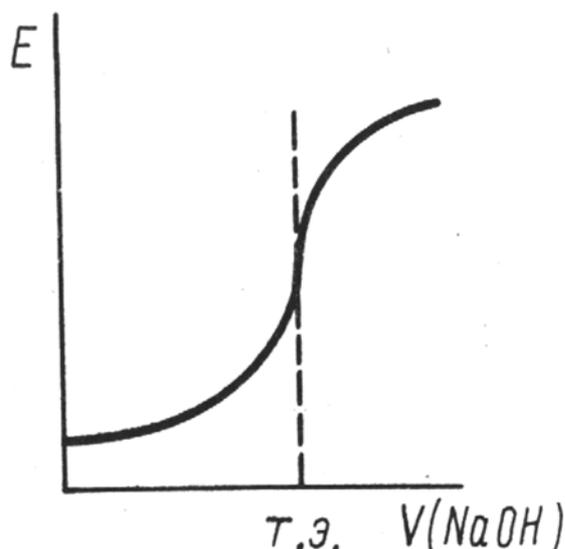


Рис. 4.2. Кривая потенциометрического титрования.

Как видно, в точке эквивалентности происходит резкий скачок э.с.д., вызванный резким изменением потенциала индикаторного электрода. По этому скачку можно определить точку эквивалентности: строят касательные к трем участкам кривой титрования; находят середину отрезка, соответствующего скачку потенциала; опускают перпендикуляр на ось абсцисс и определяют число миллилитров прибавляемого титранта. Зная объем титранта, израсходованного на титрование до точки эквивалентности, концентрацию титранта, можно рассчитать содержание анализируемого вещества во взятой пробе.

Потенциометрическое титрование может применяться не только для определения одного компонента, но и для дифференцированного титрования смеси кислот и оснований.

Потенциометрический метод позволяет провести количественное определение компонентов в смеси кислот, если константы диссоциации в воде различаются не менее чем на четыре порядка. Если константы двух кислот в воде отличаются на 2-3 порядка, то они не могут быть раздельно оттитрованы в водной среде. На кривой титрования имеет место один скачок потенциала, когда обе кислоты оттитрованы совместно.

Существует группа растворителей (неводные), которые обладают дифференцирующим действием. Так, если константы двух кислот в водном растворе близки, то в среде дифференцирующего растворителя раз-

личие в величинах констант диссоциации увеличивается: константа диссоциации слабой кислоты уменьшается в большей степени. Например, определение содержания соляной и монохлоруксусной кислот в смеси титрованием водного раствора является сложной задачей в связи с трудностью обнаружения двух скачков титрования. При титровании в ацетоне оба скачка выражены достаточно четко и содержание каждой кислоты в смеси может быть рассчитано. Некоторые двухосновные кислоты не удается ступенчато оттитровать в воде, тогда как в среде кетонов на кривых титрования наблюдается два скачка.

В общем случае дифференцирующее действие является результатом комплексного влияния свойств растворителя на константы диссоциации и отношение констант диссоциации электролитов. В каждом отдельном случае может преобладать то или иное действие растворителя на электролит: величина диэлектрической проницаемости (ϵ), сольватирующая способность, кислотно-основные свойства. Например, дифференцирующее действие ацетона объясняется очень низкими кислотно-основными свойствами.

Растворители с противоположными действиями, сближающие константы диссоциации, называются нивелирующими. Примером нивелирующих растворителей является вода.

4.6. Практическое применение и общая характеристика метода

Большое практическое значение имеют потенциометрические методы определения рН раствора со стеклянным и другими электродами, а также прямые потенциометрические определения концентрации (активности) других ионов с помощью ионоселективных электродов (ионометрия). Ионоселективные электроды на ионы Cu^{2+} , Ag^{2+} , Ag^+ , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , F^- , S^{2-} , NO_3^- и др. успешно применяют в анализе различных растворов, объектов окружающей среды и т.д.

Во многих областях находит практическое применение кальциевый ионоселективный электрод. Помимо традиционного анализа воды, различных растворов большое практическое значение кальциевый электрод имеет в медико-биологических исследованиях, клинической медицине и т.п., поскольку концентрация (активность) ионов кальция влияет на многие процессы жизнедеятельности и физиологические процессы (нервная деятельность, функция ферментов и т.д.). Известен мембранный ионоселективный электрод, позволяющий определять жесткость воды, так как он имеет примерно одинаковую чувствительность на оба иона (кальций и магний).

Основными достоинствами потенциометрического метода являются его высокая точность, высокая чувствительность и возможность проводить титрования в более разбавленных растворах, чем это позволяют визуальные индикаторные методы. Необходимо отметить также возможности определения этим методом нескольких веществ в одном растворе без предварительного разделения и титрования в мутных и окрашенных средах. Значительно расширяется область практического применения потенциометрического титрования при использовании неводных растворителей. Они позволяют, например, найти содержание компонентов, которые в водном растворе отдельно не титруются, провести анализ веществ, нерастворимых или разлагающихся в воде и т.д.

К недостаткам потенциометрического титрования можно отнести не всегда быстрое установление потенциала после добавления титранта и необходимость во многих случаях делать при титровании большое число отчетов.

4.7. Практические работы

Работа 1. Анализ кислот и отдельных компонентов их смеси методом потенциометрического титрования

Реактивы. 1) Бензойная кислота C_6H_5COOH (х.ч.).

2) Ацетон (х.ч.)

3) Раствор гидроксида натрия, $C(NaOH) = 1$ моль/л: 40 г NaOH растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л и доводят до метки.

4) Раствор уксусной кислоты, $C(CH_3COOH) = 0,1$ моль/л: 5,6 мл ледяной уксусной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 1 л в мерной колбе.

5) Раствор соляной кислоты, $C(HCl) = 0,1$ моль/л: 8,3 мл соляной кислоты (плотность 1,19) разбавляют водой до 1 л в мерной колбе.

6) Раствор серной кислоты, $C(H_2SO_4) = 0,05$ моль/л: 3 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) добавляют в дистиллированную воду и доводят объем в мерной колбе до 1 л.

7) Раствор муравьиной кислоты, $C(HCOOH) = 0,1$ моль/л: 3,7 мл концентрированной муравьиной кислоты (плотность 1,2) разбавляют дистиллированной водой и доводят объем в мерной колбе до 1 л.

Порядок работы

1. Приготовление титранта.
2. Подготовка пробы к работе.
3. Определение концентрации титранта.
4. Снятие кривых потенциометрического титрования кислот (по указанию преподавателя).

5. Титрование одной из следующих смесей кислот по указанию преподавателя в водной среде, а затем, если это необходимо, в среде неводного растворителя:

- а) уксусная кислота + соляная кислота,
- б) муравьиная кислота + соляная кислота,
- в) серная кислота + муравьиная кислота.

6. Построение графика в координатах значения рН (э.д.с. гальванического элемента) - прибавленный объем титранта (мл) и расчет по кривым титрования количества титруемых кислот как по отдельности, так и в смеси.

Ход работы

1. В мерную колбу емкостью 100 мл отбирают пипеткой 10 мл исходного раствора NaOH ($C = 0,1$ моль/л). Затем в колбу добавляют 10 мл

дистиллированной воды и объем доводят до метки водой или ацетоном по указанию преподавателя. Раствор тщательно перемешивают. Концентрацию полученного раствора определяют по бензойной кислоте (см. ниже).

2. Сухой стакан для титрования взвешивают на аналитических весах, затем повторяют взвешивание с навеской бензойной кислоты (0,05 - 0,07 г), рассчитывают точную навеску ($M = 122,12$ г/моль).

3. Навеску растворяют в 20 мл ацетона. В стакан для титрования аккуратно опускают мешалку и погружают электроды в раствор так, чтобы шарик стеклянного электрода находился на расстоянии не менее 5 мм от мешалки. Если при этом покрыто менее половины стеклянного шарика, то следует добавить в стакан воды, чтобы погрузить шарик.

4. Потенциометр включить в сеть.

5. Ополоснуть бюретку дистиллированной водой, смазать кран тонким слоем смазки. Затем бюретку ополоснуть раствором титранта и проверить надежность крана. После этого бюретку заполнить титрантом до нулевого деления при заполненном кончике бюретки.

6. В процессе титрования бензойной кислоты титрант добавляют в начале по 0,5 мл, а затем 0,1. После скачка потенциала в точке эквивалентности необходимо сделать еще 6-7 замеров рН, добавляя титрант по 0,1 мл. Полезен предварительный расчет числа мл титранта, требуемых для нейтрализации взятой навески бензойной кислоты.

Если g навеска бензойной кислоты (г); M - молярная масса бензойной кислоты (122,12 г/моль); $C(B)$ - приближенная молярная концентрация титранта, например 0,1 моль/л; V_B - искомый объем титранта (мл), то

$$V_B = g \cdot 1000 / M \cdot C(B) = g \cdot 1000 / 122,12 \cdot 0,1.$$

Предварительный расчет позволяет более рационально проводить титрование: прибавление титранта по 0,1 мл следует начинать за 2 мл до наступления эквивалентной точки. Полезно одновременно с титрованием наносить точки на график; после выхода на горизонтальный участок прилить еще несколько порций избытка титранта. По данным титрования строят график в координатах значения рН (э.д.с. гальванического элемента) - прибавленный объем титранта (V , мл) и рассчитывают

точное значение мл NaOH, пошедшее на титрование. Концентрацию титранта рассчитывают из соотношения:

$$C(B) = g \cdot 1000 / M \cdot V_B,$$

где V_B - объем титранта, соответствующий эквивалентной точке, мл.

7. В стакан для титрования отбирают определенный объем (5 мл) каждой из исследуемых кислот. К раствору добавляют 20 мл воды или ацетона (по указанию преподавателя), проверяют правильность расположения электродов и проводят титрование раствора, добавляя титрант по 0,1 мл.

8. Точно так же оттитровывают смесь кислот.

9. По данным титрования строят график в координатах значения рН (э.д.с. гальванического элемента) - прибавленный объем титранта (V , мл) и определяют число мл щелочи, пошедшее на титрование каждой кислоты (V_B). Затем рассчитывают концентрацию каждой кислоты во всех пробах по формуле:

$$C(A) = C(B) \cdot V_B / V_A,$$

где $C(A)$ - молярная концентрация исследуемого раствора, моль/л; $C(B)$ - молярная концентрация титранта, моль/л; V_A - объем аликвотной (кратной) части раствора, взятый для титрования, мл.

Работа 2. Определение нитрат-ионов в техническом образце (фторид-ионов и хлорид-ионов)

Приборы и реактивы: рН-метр рН-121 или иономер ЭВ-74; нитратселективный пластифицированный электрод; хлорсеребряный электрод сравнения; магнитная мешалка; мерные колбы вместимостью 100 мл; пипетка вместимостью 10 мл; стаканы вместимостью 50 мл; нитрат калия (х.ч.); сульфат калия, $C = 1$ моль/л раствор; технические образцы селитры с содержанием нитрата до 60%.

Как правило, определение нитрат-иона является сложной аналитической задачей, на выполнение которой затрачивается большое количество времени. Применение ионселективных пластифицированных электродов, чувствительным элементом которых является мембрана, содержащая нитратную соль четвертичного аммониевого основания, позволяет быстро решить поставленную задачу.

Выполнение работы

По точной навеске методом разбавления готовят серию стандартных растворов нитрата калия (10^{-1} - 10^{-5} моль/л). Так как нитратселективный электрод реагирует на изменение активности ионов нитрата, а не концентрации, то более правильно готовить растворы с постоянной ионной силой, создаваемой раствором сульфата калия. В этом случае стандартные растворы KNO_3 готовят на фоне раствора K_2SO_4 с концентрацией 1 моль/л. Исследуемый раствор также готовят на фоне сульфата калия. Погружают электроды в анализируемый раствор и регистрируют зависимость э.д.с. элемента, составленного из нитратселективного электрода и электрода сравнения, от концентрации калия. Строят калибровочный график зависимости $E = f(-\lg C)$. Перед началом измерений необходимо несколько раз тщательно промыть электроды дистиллированной водой. При использовании стандартных растворов измерения необходимо проводить, переходя от разбавленных к концентрированным растворам.

Навеску технического образца, в котором необходимо определить содержание нитрата ($\approx 0,10$ г), взвешенную на аналитических весах, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки дистиллированную воду. Измеряют э.д.с. элемента в исследуемом растворе.

Используя калибровочный график, определяют содержание нитрата в анализируемом растворе. Содержание нитрата (в %) в техническом образце рассчитывают по формуле:

$$x = C \cdot V \cdot M \cdot 100 / 1000 \cdot g,$$

где C – концентрация NO_3^- , определяемая из графика, моль/л;

V - вместимость мерной колбы;

M - молекулярная масса нитрата (NO_3^-), г/моль;

g - навеска технического образца, г.

Описанная методика может быть использована для определения содержания фторидов и хлоридов с помощью фторид- и хлоридселективных электродов соответственно. Для создания постоянной ионной силы целесообразно использовать ацетатный буферный раствор (при определении фторид-ионов) или раствор нитрата калия (при определении хлорид-ионов) с концентрацией 1 моль/л.

Контрольные вопросы

1. На чем основаны потенциометрические методы анализа?
2. Что такое гальванический элемент? Что называется э.д.с. гальванического элемента?
3. Что такое электродный потенциал? Уравнение Нернста для электродного потенциала. Стандартный электродный потенциал.
4. Типы электродов.
5. Диффузионный потенциал. Солевой мостик и его назначение.
6. Какие функции выполняют индикаторные электроды и какие – электроды сравнения?
7. Электроды сравнения: водородный, каломельный, хлорсеребряный.
8. В чем сущность потенциометрического определения рН раствора? Какие индикаторные электроды могут быть использованы для определения рН?
9. Как устроен стеклянный электрод? Указать достоинства и недостатки стеклянного электрода.
10. Ионоселективные электроды.
11. Указать достоинства, недостатки и области применения метода прямой потенциометрии.
12. Что такое рН? В каких пределах может изменяться рН?
13. Активность, коэффициент активности, их вычисление.
14. Расчет рН сильных и слабых электролитов.
15. Кривые потенциометрического титрования.
16. Назвать достоинства и области применения потенциометрического титрования в неводных средах.

Литература

1. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 188-220.
2. Практикум по физико-химическим методам анализа / Под. ред. О.М. Петрухина. М.: Химия, 1987. С. 115-138.
3. Крешков А.П. Основы аналитической химии: В 3-х ч. Ч. 3. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. М.: Химия, 1970. С. 32-71.
4. Киреев В.А. Курс физической химии. М.: Химия. 1975. С. 560-600.

Глава 5. Вольтамперометрия

Вольтамперометрия основана на изучении поляризационных или вольтамперных кривых (кривых зависимости силы тока от напряжения), которые получают, если при электролизе раствора анализируемого вещества постепенно повышать напряжение и фиксировать при этом силу тока.

Электролиз следует проводить с использованием легко поляризуемого электрода с небольшой поверхностью, на котором происходит электровосстановление или электроокисление вещества (индикаторный или рабочий электрод).

В полярографическом методе анализа используют два электрода - индикаторный поляризующий электрод и электрод сравнения (практически неполяризуемый каломельный электрод или хлорсеребряный).

Если в качестве индикаторного выбран электрод с постоянно обновляющейся поверхностью (например, ртутный капаящий электрод), то метод анализа называют **полярографическим**. За открытие и развитие этого метода чешскому ученому Я. Гейровскому в 1959 г. была присуждена Нобелевская премия.

5.1. Кривая ток-потенциал

Процесс прохождения постоянного тока через электролитическую ячейку характеризуется соотношением:

$$E = E_a - E_k + I \cdot R,$$

где E – приложенное извне напряжение;

E_a – потенциал анода;

E_k - потенциал катода;

I - ток в цепи;

R - сопротивление электролитической ячейки.

При вольтамперометрических измерениях к анализируемому раствору добавляют индифферентный электролит (полярографический фон) большой концентрации, поэтому $R \approx 1$ кОм и, так как ток в вольтамперометрии не превышает 10^{-5} А, падением напряжения на ячейке $I \cdot R$ можно пренебречь.

Поскольку в вольтамперометрии один из электродов не поляризуется и для него потенциал остается постоянным (электрод сравнения), подаваемое на электролитическую ячейку напряжение проявляется в изменении потенциала только индикаторного электрода. Если потенциал ин-

дикаторного электрода измерять относительно потенциала электрода сравнения, условно приняв последний за нуль, то $E = E_a$ для рабочего микроанода и $E = -E_k$ для рабочего микрокатада.

Таким образом, регистрируемая вольтамперная кривая (полярограмма) отражает электрохимический процесс, происходящий только на одном электроде. Если в растворе присутствуют вещества, способные электрохимически восстанавливаться или окисляться, то при наложении на ячейку линейно изменяющего напряжения (скорость не превышает 200 мВ/мин) кривая $I = f(E)$ имеет форму волны (рис. 5.1, кривая 1). В отсутствие электрохимической реакции эта зависимость линейна, как следует из закона Ома (кривая 2).

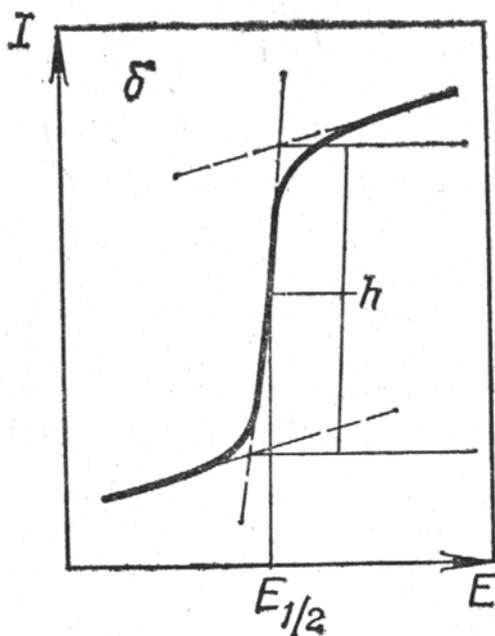


Рис. 5.1. Вольтамперная кривая в присутствии (1) и в отсутствие (2) полярографически активного соединения

Если приложить разность потенциалов к электродам, опущенным в раствор электролита, и постепенно увеличивать эту разность потенциалов, то вначале ток через раствор протекать почти не будет. На участке кривой А (рис. 5.1.) электролиз не протекает. Ток в этом месте вызывается зарядением ртутной капли и восстановлением примесей. По достижении потенциала восстановления на катоде начинается разряд ионов электрохимически активного вещества, называемого деполаризатором (вещество, снижающее поляризацию индикаторного электрода), и сила тока резко возрастает, стремясь к предельной величине диффузионного тока. Участок В характеризует прохождение процесса электролиза, сопровождающегося все более интенсивным обеднением приэлектродного слоя. Участок С - все ионы анализируемого вещества успевают разрядиться.

5.2. Полярографический фон

Для того чтобы ионы определяемого вещества перемещались к индикаторному электроду только вследствие диффузии, а не за счет диффузии и электростатической силы притяжения, в исследуемый раствор добавляют какой-либо индифферентный электролит с катионом, восстанавливаемым гораздо труднее анализируемого катиона, например KCl , NH_4Cl , KNO_3 , при концентрации в 100 - 1000 раз превышающей концентрацию определяемого вещества.

Индифферентную соль, добавляемую для устранения движения анализируемого вещества под действием электрического тока, называют полярографическим фоном или просто фоном.

Катионы электролита-фона движутся к катоду, но не могут разрядиться на нем при данном потенциале. Они остаются у поверхности электрода, образуя двойной электрический слой. Электрическое поле индикаторного электрода экранируется этими ионами фона, и поэтому катионы определяемого вещества не притягиваются электрическим полем катода, а движутся к нему только за счет диффузии. Органические молекулы не имеют обычно электрического заряда и для них в еще большей степени, чем для ионов, справедливо утверждение, что перемещение происходит только под действием диффузионного переноса. Фон имеет еще и другое значение - он увеличивает электропроводность раствора.

Ход полярографических кривых существенно искажается растворенным кислородом, восстанавливаемым на ртутной капле. Кислород удаляют из растворов продувкой азотом, аргоном и др., и только после этого записывают полярограммы. В случае кислых растворов для удаления кислорода можно использовать CO_2 . В щелочных средах удобно удалять кислород при помощи Na_2SO_3 . В раствор фона во многих случаях вводят специальные поверхностно-активные вещества, которые устраняют так называемые максимумы на полярографических кривых. Происхождение максимумов связано с изменением поверхностного потенциала растущей ртутной капли. Максимумы сильно искажают полярограммы главным образом в области плато, где устанавливается предельный диффузионный ток. Для устранения максимумов в раствор добавляют небольшие количества высокомолекулярных соединений (желатин, агар-агар) или некоторых органических красителей (метиловый красный, фуксин и др.).

5.3. Диффузионный ток

Силу тока, при которой достигается разряд всех ионов анализируемого вещества (участок С), поступающих в приэлектродное пространство ртутного катода за счет диффузии, называют предельным или диффузионным током.

Диффузионный ток пропорционален концентрации определяемого иона в растворе (концентрация ионов у поверхности катода приближается к нулю, когда ток достигает предельного значения).

Зависимость силы диффузионного тока от концентрации выражается уравнением, выведенным Ильковичем:

$$I_d = 605 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot \tau^{1/6} \cdot C,$$

где I_d - диффузионный ток, мкА; 605 - числовой множитель, в который входят геометрические факторы, константа Фарадея, плотность ртути; n - число электронов, принимаемых ионом при восстановлении или отдаваемых при окислении; D - коэффициент диффузии иона, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$; m - масса ртути, вытекающей из капилляра за секунду, $\text{г} \cdot \text{с}^{-1}$; τ - время жизни ртутной капли, с; C - концентрация определяемого иона, $\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Если полярографирование проводят с каким-нибудь одним типом ионов, то для них “ n ” и “ D ” - const; в случае, если работают с одним и тем же капилляром и с одной и той же скоростью вытекания ртути, то $m^{2/3} \cdot \tau^{1/6}$ - const, тогда $I_d = k \cdot C$.

Полученная линейная зависимость является основой количественного полярографического анализа. Высота волны “ h ” (рис. 5.1.) характеризует предельный ток и дает возможность определить концентрацию анализируемого вещества.

5.4. Количественный полярографический анализ

В полярографическом анализе для определения неизвестной концентрации наиболее широко применяют метод градуировочного графика на основе уравнения: $I_d = k \cdot C$. График строят по данным полярографирования нескольких стандартных растворов. На оси ординат откладываются пропорциональная силе диффузионного тока высота полярографической волны – h , а по оси абсцисс – концентрация анализируемого вещества. Градуировочный график должен представлять прямую линию, проходящую через начало координат.

При анализе некоторых хорошо изученных систем часто применяется менее трудоемкий метод стандартных растворов. В этом методе в строго одинаковых условиях снимают полярограммы стандартного и

анализируемого растворов и рассчитывают неизвестную концентрацию (C_x):

$$C_x = C_{ст} h_x / h_{ст},$$

где $C_{ст}$ - концентрация стандартного раствора,

h_x и $h_{ст}$ – высота волны при полярографировании соответственно анализируемого и стандартного растворов.

Широко распространен в количественной полярографии метод добавок. Пусть при полярографировании исследуемого раствора сила диффузионного тока равна

$$I_x = k C_x.$$

Добавим к этому раствору известное количество стандартного раствора ($C_{ст}$) и снова определим диффузионный ток:

$$I_{x+ст} = k (C_x + C_{ст}).$$

При почленном делении этих уравнений получаем

$$I_x / I_{x+ст} = C_x / (C_x + C_{ст}), \text{ откуда}$$
$$C_x = C_{ст} I_x / (I_{x+ст} - I_x).$$

5.5. Качественный полярографический анализ

Для качественного анализа удобно пользоваться потенциалом полу-волны. Если отрезок В (рис. 5.1) разделить пополам, восстановить перпендикуляр, то получим отрезок на оси абсцисс, характеризующий потенциал, необходимый для достижения половины предельного тока (потенциал полуволны $E_{1/2}$). Он не зависит от концентрации растворенного вещества, а зависит только от природы восстанавливаемого иона. Потенциал полуволны является, таким образом, качественной характеристикой иона в растворе данного фонового электролита и определение потенциала полуволны составляет основу качественного полярографического анализа (по соответствующим таблицам можно определить, какой ион находится в растворе).

Если в растворе находится несколько веществ, потенциалы полу-волны которых различаются на 100 мВ и больше, то на полярограмме будет не одна волна, а несколько - по числу восстанавливаемых ионов, а возможно и больше, так как при ступенчатом восстановлении один ион может давать две волны. Например, две волны дает ион Cu^{2+} в присутствии NH_3 ($C = 1$ моль/л): первую при потенциале полуволны - 0,20 В и вторую при -0,48 В. Можно получить таким образом полярографический спектр ионов, а затем по этим данным и измеренному потенциалу полуволны идентифицировать неизвестное вещество. Вполне понятно, что положение элемента в таком спектре будет зависеть от фонового электролита: его природы и концентрации.

Для анализа смесей, содержащих ионы или вещества с близкими потенциалами полуволны, применяют методы дифференциальной полярографии, использующие кривые $dI/dE - E$ (первая производная от полярографической кривой). Дифференциальная полярография имеет значительно более высокую разрешающую способность, позволяя определять в одном растворе ионы с близкими потенциалами полуволны.

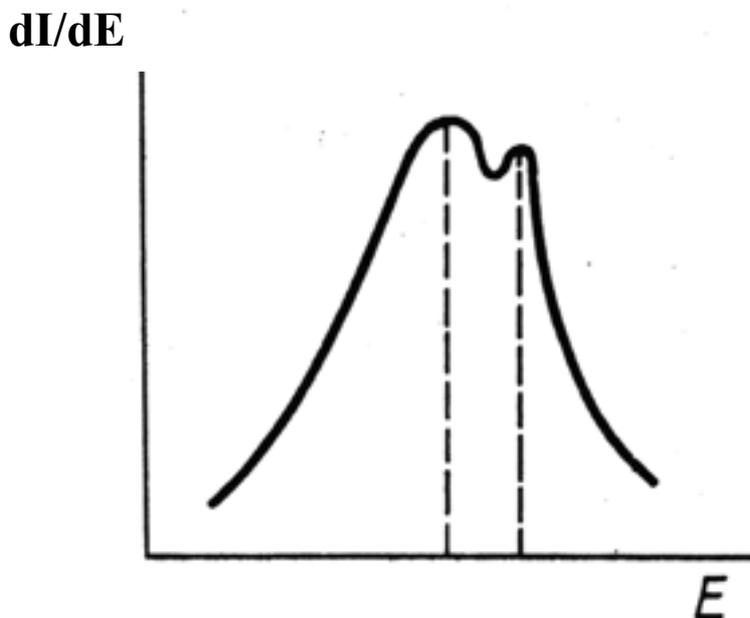


Рис. 5.2. Полярограмма раствора, содержащего $Pb(NO_3)_2$ и $TlNO_3$ на фоне KNO_3

Например, этим методом могут быть определены свинец и таллий, у которых потенциалы полуволны на фоне KNO_3 (с концентрацией 2 моль/л) различаются только на 0,06 В. В методе обычной полярографии (интегральная полярограмма) оба иона образуют одну общую волну, а на дифференциальных кривых четко видны два максимума (рис. 5.2). Кроме того, методы дифференциальной полярографии более точны, так как фиксировать положение максимума и измерять его высоту можно с более высокой точностью.

5.6. Полярографическая установка

Систему электродов для вольтамперометрических измерений выбирают таким образом, чтобы плотность тока на этих электродах существенно различалась: на индикаторном (рабочем) электроде плотность тока должна быть велика, на электроде сравнения - ничтожно мала. В этом случае поляризоваться будет только рабочий электрод и, естественно, только на нем возможны электрохимические процессы восстановления или окисления ионов из раствора. Рабочий электрод, как правило, имеет очень малую поверхность по сравнению с поверхностью электрода сравнения – это микроэлектрод, который может быть изготовлен из твердого материала (Pt, Ag, Au, графит специальной обработки и др.) или в виде ртутной капли, вытекающей из капилляра.

Ртутный капающий электрод в качестве рабочего микроэлектрода используют широко при полярографическом анализе веществ, восстанавливающихся в области потенциалов $+0,3 \div -2,0$ В (в щелочных или нейтральных растворах) или до $-1,0$ В (в кислых растворах) относительно насыщенного каломельного электрода. Постоянно обновляющаяся поверхность ртутной капли, а также высокое перенапряжение выделения водорода, позволяющее электрохимически восстанавливать на таком электроде ионы металлов, расположенных в ряду напряжений левее водорода (т.е. почти все катионы), делает ртутный капающий электрод одним из наиболее широко используемых.

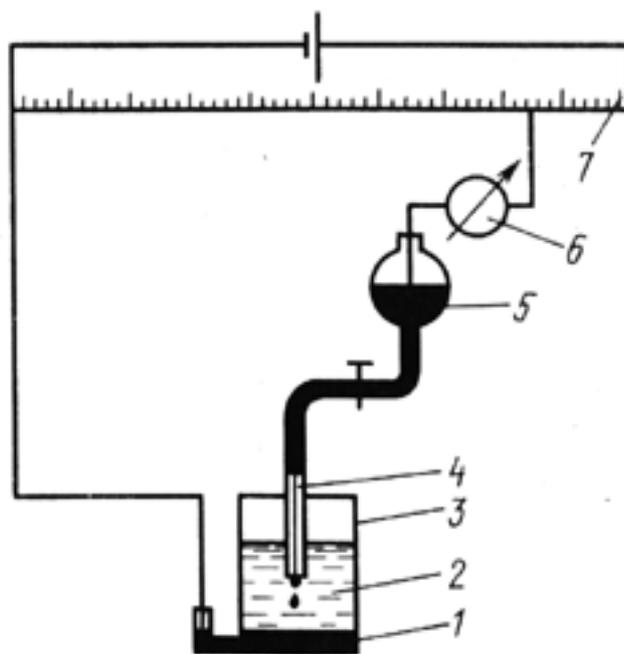


Рис. 5.3. Схема полярографической установки

Принципиальная схема полярографической установки представлена на рис. 5.3.

Анализируемый раствор 2 находится в электролизере 3, на дне которого имеется слой ртути 1, являющийся анодом. Часто в качестве анода используют насыщенный каломельный электрод. Катодом служит ртутный капающий электрод 4, соединенный с резервуаром ртути 5. Внешнее напряжение, подаваемое на электроды, можно плавно менять с помощью реохорда или делителя напряжения 7 и измерять при этом гальванометром 6 силу тока, проходящего через раствор.

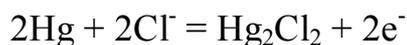
Рассмотрим процессы, происходящие на ртутном капающем электроде (катоде) и на электроде сравнения, который является анодом (каломельный электрод).

На катоде происходит процесс восстановления:



Образовавшийся свободный металл диффундирует в глубь капли. Затем капля амальгамы (раствор металла друг в друге) падает и процесс начинается снова на новой капле. Благодаря очень малой силе тока, протекающего через электролизер (порядка 10^{-6} А), концентрация вещества в растворе очень мало изменяется и остается почти постоянной во время электролиза (величина предельного тока не изменяется с течением времени).

Процесс на аноде заключается в том, что атомы ртути отдают электроны, причем ионы ртути образуют с ионами хлора, находящимися в растворе, осадок каломели:



Полярографический метод применяют также для определения органических веществ, способных восстанавливаться на ртутном капающем электроде. Одним из недостатков полярографического метода является необходимость применения ртути. Ртуть обладает способностью накапливаться в организме, что приводит к тяжелым отравлениям. В связи с этим полярографы устанавливаются в специально оборудованных ртутных комнатах с хорошей вентиляцией.

В вольтамперометрии с успехом применяют также твердые микроэлектроды, изготавливаемые из благородных металлов (платины, золота и т.д.) или различных углеродных материалов (графит, стеклоуглерод, углеститалл, угольная паста). Твердые электроды представляют собой проволочки или стержни, запрессованные в изолирующий материал (стекло, тефлон и др.). Рабочая поверхность такого электрода приблизительно $0,2 \text{ см}^2$. Конструктивно твердые электроды более удобны и безопасны, чем ртутные, но область их использования ограничена. Использование твердых электродов позволяет проводить анализ в более положительной

области потенциалов (до +1,3 В). Наиболее удобным из твердых электродов является платиновый электрод. Перенапряжение водорода на платине невелико, поэтому водород восстанавливается при потенциале (-0,1 В). Это ограничивает использование платины в отрицательной области потенциалов. Из металлов на платиновом электроде могут быть определены серебро, золото и ртуть. Использование твердых электродов также имеет свои трудности, связанные, главным образом, с обновлением поверхности электродов. Стационарные твердые электроды не нашли широкого применения в практике из-за медленности установления предельного тока, невысокой чувствительности и других недостатков.

Значительно более широкое применение имеют вращающиеся и вибрирующие платиновые микроэлектроды (вращающийся дисковый электрод), на которых устойчивая сила тока устанавливается быстро. При работе таких электродов раствор непрерывно перемешивается, благодаря чему к поверхности электрода ионы доставляются не только за счет диффузии, но и за счет механического перемешивания. Вращающийся дисковый электрод позволяет кроме простой съемки кривых $I = f(E)$ изучать механизм электрохимических процессов. Каждый раз перед началом работы твердые электроды следует промывать раствором HNO_3 (1:1), а затем многократно водой.

5.7. Хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала

Новые возможности в анализе и изучении электродных процессов открывает хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала. Обычная скорость изменения потенциала в этом методе составляет до 50 мВ/с вместо 2-3 мВ/с в классической полярографии. Для измерения силы тока здесь вместо гальванометра используют безынерционный осциллограф.

Полярограмма, получаемая в этом методе, представлена на рис. 5.4.

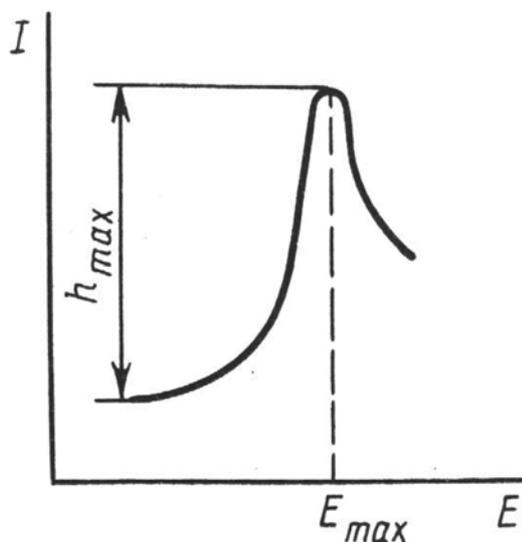


Рис. 5.4. Осциллографическая полярограмма

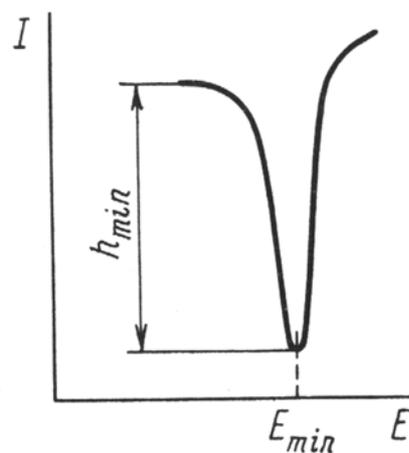


Рис. 5.5. Кривая анодного растворения

При достижении потенциала восстановления ток резко возрастает и достигает максимума, превышая величину (I_d) классической полярографии, поскольку происходит электровосстановление практически всех ионов приэлектродного слоя, и затем падает, так как приэлектродный слой обедняется ионами, а скорость диффузии недостаточна, чтобы пополнить дефицит за столь короткое время. Потенциал максимума на этой кривой (E_{max}) является качественной характеристикой иона, а высота максимума (h_{max}) пропорциональна концентрации иона. Хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала имеет более низкий предел обнаружения, чем обычная вольтамперометрия.

5.8. Инверсионная вольтамперометрия

Существенное увеличение чувствительности дает инверсионная вольтамперометрия. Идея метода инверсионной полярографии состоит в выделении определяемого элемента из очень разбавленного раствора на ртутной капле или тонкой пленке ртути на графитовом электроде или просто на графитовом электроде электролизом с последующим анодным растворением полученного на электроде соединения. Процесс накопления происходит при потенциале, соответствующем предельному току.

Зависимость силы тока от напряжения при анодном растворении имеет вид характерного пика (рис. 5.5.), глубина которого h пропорциональна концентрации определяемого иона, а потенциал минимума (E_{min}) определяется природой иона. Предел обнаружения в методике инверсионной вольтамперометрии на 2-3 порядка ниже предела обнаружения в

обычных полярографических методиках. Рабочая область потенциалов для инверсионных электрохимических методов находится от +1,5 до – 0,7 В для графитовых электродов в водной среде.

5.9. Практическое применение

Вольтамперометрический метод достаточно универсален и применим к многочисленному кругу объектов. Основными достоинствами метода являются быстрота анализа, возможность определения нескольких веществ в смеси без предварительного разделения, достаточно высокая точность и применимость к анализу небольших содержаний определяемого элемента. Погрешность полярографического анализа в обычных условиях составляет $\pm 2\%$ для растворов концентрации порядка 10^{-3} - 10^{-4} моль/л и около $\pm 5\%$ для более разбавленных растворов.

Вольтамперометрический метод применяют для определения многих металлов. Кадмий, кобальт, медь, свинец, марганец, никель, олово, цинк, железо, висмут, уран, ванадий и многие другие могут быть определены в рудах, концентратах, сплавах и иных природных и технических объектах.

В условиях вольтамперометрического анализа легко восстанавливаются и могут быть определены соединения с сопряженными кратными связями, многие альдегиды, кетоны, галогенсодержащие соединения, хиноны, гидроксиламины; нитро-, нитрозо-, азо-, азоксисоединения; соли диазония, многие серусодержащие и гетероциклические соединения; пероксиды и редуцирующие сахара.

Широко используется полярографический метод для анализа биологически важных материалов: крови, сыворотки и т.д.

5.10. Практические работы

Методика выполнения анализа вольтамперометрическим методом на полярографе любого типа сводится к выполнению следующих операций.

1. Готовят систему электродов: выбирают соответствующий электрод сравнения, очищают поверхность твердого электрода или устанавливают режим капания ртутного капяющего электрода, регулируя высоту столба ртути над капилляром.

2. Электролитическую ячейку заполняют анализируемым раствором, погружают в него рабочий микроэлектрод и электрод сравнения.

3. Проводят деаэрацию анализируемого раствора, продувая азот или аргон.

4. Соблюдая полярность, подключают электроды к соответствующим клеммам на полярографе.

5. Полярограф включают в сеть и прогревают согласно паспортным указаниям к прибору.

6. Устанавливают на полярографе необходимый режим работы: амплитуду развертки поляризующего напряжения, начальное напряжение, скорость изменения поляризующего напряжения, чувствительность и другие параметры. Чувствительность выбирают при потенциале, большем чем $E_{1/2}$ на 0,2 В; высота полярографической волны должна быть ~25 см.

7. Откорректируют чувствительность и потенциал начала поляризации, а затем регистрируют вольтамперную кривую. Следует учесть, что число волн на полярограмме не должно быть меньше, чем предполагаемое число полярографически активных компонентов в анализируемом растворе, но может быть больше за счет многоступенчатости электрохимического процесса. Полярограмму регистрируют несколько раз.

8. Отключают электролизер от полярографа. Выключают полярограф, соблюдая последовательность выключения тумблеров на нем, указанную в паспорте к прибору. Электролизер промывают и заливают дистиллированной водой. Электрод сравнения погружают в насыщенный раствор KCl, твердый электрод высушивают фильтровальной бумагой, ртутный капающий электрод оставляют в электролизере или помещают капилляр в стакан с дистиллированной водой. Опускают сосуд со ртутью в нижнее положение штатива или перекрывают соответствующий кран, прекращая капание ртути.

После окончания работы необходимо тщательно убрать рабочее место.

Работа 1. Обнаружение ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}

На фоне аммиачного буферного раствора полярографические волны ионов, образующих аммиакаты, достаточно четко выражены и $E_{1/2}$ существенно различаются.

Приборы и реактивы. Полярограф любой марки; электролизер; твердый электрод или ртутный капающий электрод; насыщенный каломельный электрод; очищенный азот; градуированные пипетки вместимостью 10 мл; кристаллический сульфат натрия; фоновый электролит – аммиачный буферный раствор; стандартные растворы сульфатов меди, кадмия, цинка, марганца, $C = 10^{-3}$ моль/л; анализируемый раствор сульфатов солей, $C = 10^{-3}$ моль/л.

Выполнение работы

Регистрируют полярограмму фонового электролита. Для этого в электролизер вносят 10 мл аммиачного буферного раствора, несколько кристаллов Na_2SO_3 , перемешивают, опускают электроды, ячейку подключают к полярографу и регистрируют полярограмму при потенциалах $-0,2 \div -1,8$ В.

Регистрируют полярограмму стандартных растворов: в электролизер вносят 10 мл аммиачного буферного раствора, 0,5 мл стандартного раствора CdSO_4 и полярографируют, как указано выше. Аналогично полярографируют растворы MnSO_4 , CuSO_4 и ZnSO_4 .

Исследуемые растворы анализируют, как стандартные растворы.

Полученные полярограммы обрабатывают графически и путем построения полулогарифмического графика рассчитывают $E_{1/2}$ и число электронов, участвующих в электродном процессе. Значение $E_{1/2}$ для полярограммы неизвестного раствора сравнивают с найденными значениями $E_{1/2}$ для стандартных растворов и табличными данными. Делают вывод о качественном составе анализируемого раствора.

Работа 2. Обнаружение ионов Pb^{2+} и Tl^+

В кислых и нейтральных растворах полярографические волны восстановления ионов Pb^{2+} и Tl^+ практически сливаются: в растворе соляной кислоты ($C = 1$ моль/л) потенциал полуволны для ионов свинца равен $-0,44$ В, для ионов таллия $E_{1/2} = -0,48$ В. В щелочной среде на полярограмме смеси появляются две отдельные волны: свинец образует гидроксокомплекс $(\text{PbO})\text{OH}^-$, который восстанавливается при $-0,16$ В, незакомплексованные ионы таллия восстанавливаются при $-0,49$ В.

Приборы и реактивы. Полярограф любой марки; электролизер; твердый электрод или ртутный капаящий электрод; насыщенный каломельный электрод; очищенный азот; градуированные пипетки вместимостью 10 мл; раствор нитрата калия ($C = 0,1$ моль/л), сухой гидроксид натрия, 0,2%-ный раствор желатины, анализируемый раствор, $C[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2] \approx 10^{-3}$ моль/л и $C(\text{TlNO}_3) \approx 10^{-3}$ моль/л

Выполнение работы

В электролизер вносят 10 мл фонового раствора KNO_3 , 0,2 мл анализируемого раствора, 3 капли раствора желатины. Продувают азот 5 мин и регистрируют полярограмму. Затем в этот же раствор вносят примерно 0,5 г NaOH и после растворения пропускают азот 5 мин. Вновь регистрируют полярограмму. Полярограммы обрабатывают графически и делают вывод о качественном составе раствора и возможности определения ионов Pb^{2+} и Tl^+ в смеси.

Контрольные вопросы

1. Сущность вольтамперометрического метода.
2. Что такое вольтамперная кривая?
3. Полярографический фон и его назначение.
4. Диффузионный ток, его определение и связь с концентрацией растворенного вещества.
5. Потенциал полуволны, применение потенциала полуволны в качественном анализе.
6. Устройство простейшего полярографа, ртутного капающего и вращающегося платинового микроэлектродов. Электрохимические процессы, протекающие на ртутном капающем электроде.
7. Хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала.
8. Инверсионная вольтамперометрия.
9. Практическое применение вольтамперометрии.

Литература

1. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 220-244.
2. Практикум по физико-химическим методам анализа / Под. ред. О.М. Петрухина. М.: Химия, 1987. С. 138-153.
3. Крешков А.П. Основы аналитической химии: В 3-х ч. Ч. 3. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. М.: Химия, 1970. С. 147-190.
4. Киреев В.А. Курс физической химии. М.: Химия, 1975. С. 607-626.

Глава 6. Электрофорез

6.1. Общие принципы электрофореза

Электрофорезом называют движение заряженных коллоидных частиц в постоянном электрическом поле к противоположно заряженному электроду.

Биологические макромолекулы находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Кроме того, белки и нуклеиновые кислоты содержат ионизирующиеся группы, вследствие чего в растворе они могут существовать в заряженной форме, в виде катионов или анионов. Молекулы с близкими по величине зарядами, но различающиеся молекулярными массами, отличаются друг от друга отношением заряда к массе. На указанных различиях основано разделение ионов при их движении в растворе под действием электрического поля. В этом и состоит принцип электрофореза.

Суммарный электрический заряд белковой молекулы зависит от рН среды и соотношения радикалов аминокислот, обладающих кислотными и основными свойствами. Кислотные свойства радикалов аминокислот обусловлены карбоксильными и сульфгидрильными группами, а также фенольными гидроксильными. Основные свойства возникают за счет наличия в радикалах аминокислот амино-, имино- и гуанидиновых групп. Следовательно, белки, являясь амфотерными электролитами, могут диссоциировать как кислоты или как основания. Преобладание одного из этих процессов зависит от аминокислотного состава данного белка, а также от окружения, в котором находятся его молекулы, главным образом от рН среды. В кислой среде основные группы радикалов аминокислот протонированы, тогда как диссоциация кислотных групп подавлена, поэтому белки оказываются заряженными положительно. В щелочной среде, наоборот, основные группы не имеют заряда, а кислотные легко диссоциируют, вследствие чего в молекуле белка образуется избыток отрицательно заряженных групп и белок в целом имеет суммарный отрицательный заряд.

Скорость движения молекул в электрическом поле (электрофоретическая подвижность) возрастает с увеличением суммарного электрического заряда. Так как величина заряда зависит от рН раствора, то подвижность белковых молекул тем выше, чем больше рН раствора отличается от изоэлектрической точки самого белка.

На электрофоретическую подвижность белковых молекул влияют следующие факторы:

1. Форма и величина белковой молекулы.

Молекулы одного размера, но разной формы, например, фибриллярные и глобулярные белки, обладают различной подвижностью в электрическом поле. Это обусловлено различиями в силе трения и электростатическом взаимодействии с окружающей средой. Чем крупнее молекула, тем меньше ее подвижность, так как при этом возрастает сила трения и электростатического взаимодействия крупных молекул по сравнению с молекулами меньших размеров. Кроме того, молекулы с близкими по величине зарядами, но различающимися молекулярными массами отличаются друг от друга отношением заряда к массе. Это также способствует разделению ионов при движении их в растворе под действием электрического поля.

2. Электрическое поле.

Как известно, по закону Ома сила тока I (в амперах, А), напряжение V (в вольтах, В) и сопротивление R (в омах, Ом) связаны следующим соотношением: $I=V/R$. На разделение ионов в электрическом поле влияют все три фактора.

Сила тока. Поскольку ток в растворе между электролитами обусловлен исключительно переносом ионов буфера и образца, скорость их перемещения прямо пропорциональна силе тока. Длина пути, пройденного ионами, пропорциональна времени пропускания тока. Следовательно, для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электрофореза не должна меняться.

Напряжение. Электрофоретическая подвижность белковых молекул пропорциональна падению напряжения в поддерживающей (опорной) среде или градиенту потенциалов (приложенное напряжение, деленное на длину слоя носителя). Используются как низкие (100 – 600 В), так и высокие (600- 1000 В) напряжения. Высокие напряжения применяют в основном для разделения низкомолекулярных веществ.

Сопротивление. Подвижность молекул белка обратно пропорциональна сопротивлению, которое в свою очередь зависит от типа и размеров носителя и ионной силы буфера. Сопротивление возрастает с увеличением слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов. В ходе электрофореза выделяется тепло, сопротивление при этом уменьшается. Таким образом, при постоянном напряжении такое нагревание приводит к увеличению силы тока и испарению растворителя. Для обеспечения максимальной воспроизводимости результатов применяют стабилизированные источники питания, которые автоматически поддерживают на по-

стоянном уровне либо силу тока, либо напряжение, несмотря на неизбежные изменения сопротивления. Испарение сводят до минимума, накрывая прибор для электрофореза крышкой и проводя разделение веществ при температуре + 4 °С.

3. Характер буфера и его ионная сила.

Буфер создает и стабилизирует рН носителя, а также самым различным образом влияет на скорость движения разделяемых веществ. В качестве буферных растворов для электрофоретического разделения белковых молекул используют практически все буферные системы, применяемые для экстракции белков. Так, например, широко применяют трис-глициновый, трис-цитратный буферы и др. Они обеспечивают широкий выбор диапазонов рН, ионной силы и подвижности катионов и анионов буферной системы, что обуславливает разделение белков без изменения их растворимости, химических свойств и биологической активности.

По мере увеличения ионной силы буфера скорость движения образца уменьшается. При высокой ионной силе буфера суммарный ток, обусловленный переносом ионов буфера и образца, увеличивается, и, следовательно, возрастает количество выделяемого тепла.

При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. При этом подвижность образца увеличивается. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего разрешающая способность меньше, чем при высокой ионной силе. Таким образом, при выборе ионной силы приходится идти на компромисс. Применяющиеся обычно буферы имеют ионные силы в интервале концентраций от 0,005 до 0,10 моль/л.

4. Природа носителя.

Чаще всего в качестве носителей используют относительно инертные вещества, но их состав все же оказывает влияние на подвижность разделяемых веществ, поэтому выбор носителя зависит от природы образца.

Существует три основных типа электрофоретических систем: 1) электрофорез с подвижной границей (метод подвижной границы) без каких-либо опорных сред; 2) зональный (в основном с использованием опорных сред); 3) стационарный (или вытесняющий) электрофорез.

В системах первого типа электрическое поле прикладывается к исходно резкой границе между раствором макромолекул и буфером. Скорость миграции заряженных частиц определяется путем наблюдения за перемещением этой границы. Если раствор содержит гетерогенную смесь ионизированных макромолекул, то можно увидеть множество

движущихся частиц. В такой системе индивидуальные компоненты нельзя разделить на отдельные зоны, так как наслоенный сверху буферный раствор имеет более низкую плотность по сравнению с находящимся под ним раствором молекул. Если бы и удалось достигнуть разделения зон, то все равно произошло бы их перемешивание, так как плотность раствора внутри этих зон была бы выше, чем между ними. Электрофорез по методу подвижной границы нашел применение преимущественно при исследовании белков, в частности, свойств отдельных белков, анализе белковых смесей, оценке гетерогенности препаратов различных белков, изучению взаимодействий между белками и низкомолекулярными веществами, а также белков между собой. В настоящее время метод подвижной границы редко применяют в повседневной лабораторной практике ввиду доступности более удобных методик, не требующих такой сложной и дорогостоящей аппаратуры, как данный метод.

В случае зонального электрофореза смешивание разделенных зон предотвращено. В основном это достигается путем применения опорных, поддерживающих сред, таких как фильтровальная или хроматографическая бумага, пленки из ацетата целлюлозы или различные гели (например, крахмальный, агаровый, полиакриламидный). Все перечисленные вещества образуют капиллярную структуру. Выбор опорной среды определяется конкретными условиями анализа. При использовании зонального электрофореза общая особенность состоит в том, что разделяемые вещества движутся в виде отчетливых зон, которые легко обнаружить соответствующим аналитическим методом.

Оборудование, необходимое для зонального электрофореза, состоит из двух частей: источника питания и собственно электрофоретического блока. Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе. Для работы с низким напряжением применяют источники питания с выходным напряжением до 600 В и силой тока до 150 мА. В электрофоретический блок входят электроды (угольные или платиновые), буферные камеры, опора для носителя и прозрачная изолирующая крышка.

Итак, преимущество зонального электрофореза в сравнении с методом подвижной границы заключается в следующем:

- 1) приборы для зонального электрофореза имеют простое устройство;
- 2) необходимое количество исследуемого материала весьма мало;
- 3) разделяемые вещества движутся в виде отчетливых зон, которые можно фиксировать в поддерживающей среде и выявлять с помощью специфического окрашивания;
- 4) разделение белковых фракций происходит довольно быстро;

5) зональный электрофорез применяется как в аналитических, так и в препаративных целях.

Стационарный (или вытесняющий) электрофорез характеризуется тем, что через некоторое время после начала разделения зон устанавливается состояние равновесия, при котором ширина зон в дальнейшем не изменяется. К электрофорезу такого типа относятся два метода: изоэлектрическое фокусирование и изотахофорез.

6.2. Электрофорез на бумаге и ацетате целлюлозы

Этот метод стал широко применяться для разделения смесей макромолекул с 1950 года. Он фактически открыл путь для обширных аналитических исследований во многих отраслях биологии. К настоящему времени значение его снизилось в связи с использованием других сред, более подходящих для зонального электрофореза.

Электрофорез на бумаге – самый простой из электрофоретических методов. Носителем служит, как правило, специальная хроматографическая бумага, которая не требует никакой подготовки: ее просто нужно разрезать на куски требуемого размера. В зависимости от типа прибора и условий опыта электрофорез на бумаге длится от 4 до 16 часов. После электрофореза белки фиксируют высушиванием, а затем красят красителями, специфичными для белков. Окрашенные полосы белковых фракций можно хранить или, разрезав на участки, элюировать для фотометрического определения каждой фракции. При электрофорезе на бумаге белков сыворотки крови удается получить до 5 фракций.

Бумага не является абсолютно инертным носителем и может адсорбировать некоторые вещества (это нежелательное ее свойство удается устранить при использовании ацетата целлюлозы). Кроме того, при электрофорезе на бумаге вследствие особенностей ее химического состава в той или иной степени проявляется электроэндоосмос (то есть возникновение заряда между молекулами буферного раствора и поверхностью носителя), что резко снижает разрешающую способность метода.

Электроэндоосмос менее заметен в носителе из ацетата целлюлозы, к тому же ацетат целлюлозы менее гидрофилен, чем бумага, поэтому он удерживает меньшее количество буферного раствора. Пленки из ацетата целлюлозы в качестве поддерживающей среды для электрофореза были предложены в 1957 году и с тех пор нашли широкое применение. Они несколько дороже хроматографической бумаги. Во многих случаях это препятствует их применению вместо бумаги при электрофорезе. Данный метод целесообразно применять для разделения малых количеств ве-

ществ. К тому же электрофорез на ацетате целлюлозы обладает более высокой разрешающей способностью по сравнению с электрофорезом на бумаге.

В 60-е годы предложена модифицированная поддерживающая среда - желатинизированный ацетат целлюлозы, получивший название целлогеля.

6.3. Электрофорез в гелях

В этом методе в качестве опорной среды используют крахмальный, агаровый, полиакриламидный гели.

Характерной особенностью данной разновидности зонального электрофореза является высокая разрешающая способность. Дело в том, что гели являются не только поддерживающей средой, они функционируют как молекулярные сита. Принцип действия молекулярного сита состоит в том, что крупные молекулы двигаются через него тем медленнее, чем меньше размер пор в геле. Гель-электрофорез особенно ценен для разделения смесей веществ, имеющих одинаковые заряды, но слегка различающихся по массе.

Электрофорез в крахмальном геле был первым электрофоретическим методом, в котором для улучшения разделения веществ была использована среда, обладающая свойствами молекулярного сита. Этот метод предложен в 1955 году. Крахмал - это нерастворимый в воде полисахарид. В нативном состоянии он связывает некоторое количество воды и набухает, но не способен превратиться в жидкость при повышении температуры. Путем частичного кислотного гидролиза крахмал может быть превращен в форму, представляющую собой жидкий золь при температуре выше 70°C и твердый гидрогель при комнатной температуре. Для электрофореза вполне подходит картофельный крахмал. Размер пор в геле определяется концентрацией крахмала и степенью его гидролиза. Наибольшее применение крахмальные гели нашли при разделении сложных смесей структурных и физиологически активных белков. Так, при разделении белков сыворотки крови удается получить 20 – 30 полос.

Агар, используемый в качестве носителя при электрофорезе, выделяют из клеточных мембран различных водорослей. Чистота и химический состав отдельных препаратов значительно различаются в зависимости от источника получения и способа очистки. Точная структура агара неизвестна. Вероятно, он содержит, по крайней мере, два полисахарида, а именно агарозу и агаропектин. Агар растворяется в водных растворах при нагревании на кипящей водяной бане, при 38°C он застывает. Агаровый гель механически прочен. После высушивания он превращается в прозрачную пленку, которую удобно фотометрировать оптиче-

скими методами и легко хранить. Кроме того, агар является и нетоксичным материалом. Агар и особенно агароза широко используются в биохимии в качестве поддерживающей среды при электрофорезе, в основном для исследования макромолекул. Агаровый гель содержит большое количество воды (концентрация агарозы и агаропектина в геле всего 1%), вследствие чего ионы в процессе электрофореза движутся очень быстро. Благодаря этому свойству агар очень удобен для разделения и обнаружения антигенов методом иммуноэлектрофореза.

Общими недостатками рассмотренных вариантов гелеэлектрофореза являются наличие электроэндоосмоса (хотя и меньшего, чем на бумаге) и нестандартность материалов, используемых для приготовления гелей.

Самым перспективным из перечисленных выше гелей является полиакриламидный гель (ПААГ). Полиакриламидные гели введены в биологическую практику в 1959 году Раймондом. Они лишены недостатков, характерных для крахмального и агарового гелей.

Электрофорез в ПААГе в настоящее время является самым эффективным из существующих методов и широко используется в различных областях биологии. Этот метод обладает большей разрешающей способностью по сравнению с методами, где используются другие гели. Полиакриламидный гель прозрачен, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу, химически инертен. Размер пор у ПААГа можно варьировать в широких пределах, его можно применять с самыми различными буферами, удобно использовать для количественного определения разделяемых веществ.

Полиакриламидный гель получают непосредственно перед работой полимеризацией акриламида и метиленбисакриламида.

ление клеточного материала и уплотнение белков. В нижнем геле происходит разделение белков.

6.4. Диск-электрофорез

Электрофорез в ПААГе часто называют диск-электрофорезом. Это название происходит от двух английских слов – discontinuity, обозначающего в данном случае неоднородность электрофоретической среды, и discoid – дискообразный. Дело в том, что по случайному совпадению при стандартных условиях проведения опыта разделенные зоны имеют форму дисков.

Для диск-электрофореза характерны скачкообразные изменения pH, концентрации геля и градиента напряжения. Как известно, нижняя часть трубки заполнена разделяющим гелем с порами, которые действуют как молекулярное сито по отношению к разделяемым молекулам. Над разделяющим гелем имеется концентрирующий гель, имеющий крупные поры и поэтому не обладающий свойствами молекулярного сита, а еще выше располагается стартовый гель, содержащий пробу и краситель, используемый в качестве свидетеля. Смысл диск-электрофореза состоит в создании очень узкой стартовой зоны, которая обеспечивает высокую разрешающую способность. Как это достигается?

Дело в том, что в состав как электродного буфера, так и буфера концентрирующего геля входит слабое аминное основание - трис, но в электродный буфер к трису прибавлена слабая кислота глицин (трис-глициновый буфер, pH = 8,3), а концентрирующий гель содержит соляную кислоту, что дает буферную систему трис-HCl, pH = 6,7 (рис. 6.1.).

Глицин при pH = 8,3 находится в виде цвиттериона (биполярного иона) и только 5% приходится на долю глицинатного аниона. В электрическом поле глицинатные ионы, движущиеся из верхнего резервуара в концентрирующий гель, имеют гораздо меньшую подвижность, чем ионы хлора, и, следовательно, "тянутся" позади них. В среде верхнего геля при pH=6,7 подвижность глицинатных ионов становится еще меньше, так как в результате дополнительного протонирования увеличивается количество цвиттерионов (изоэлектрическая точка глицина). Ионы хлора, наоборот, продвигаются очень быстро, и между этими двумя разновидностями ионов возникает граница раздела. Так как и ионы хлора, и глицинатные ионы представляют собой часть одной и той же электрической системы, то в области локализации менее подвижных глицинатных ионов напряжение увеличивается, а в области более подвижных ионов хлора – уменьшается. Следовательно, замыкающие ионы будут стремиться догнать ведущие, а белковые анионы, промежуточные по подвижности, будут располагаться между первыми и вторыми иона-

ми. В итоге происходит концентрирование белковых анионов позади ведущих ионов. Образуется чрезвычайно узкая белковая полоса, которая подходит к разделяющему гелю вслед за ионами хлора.

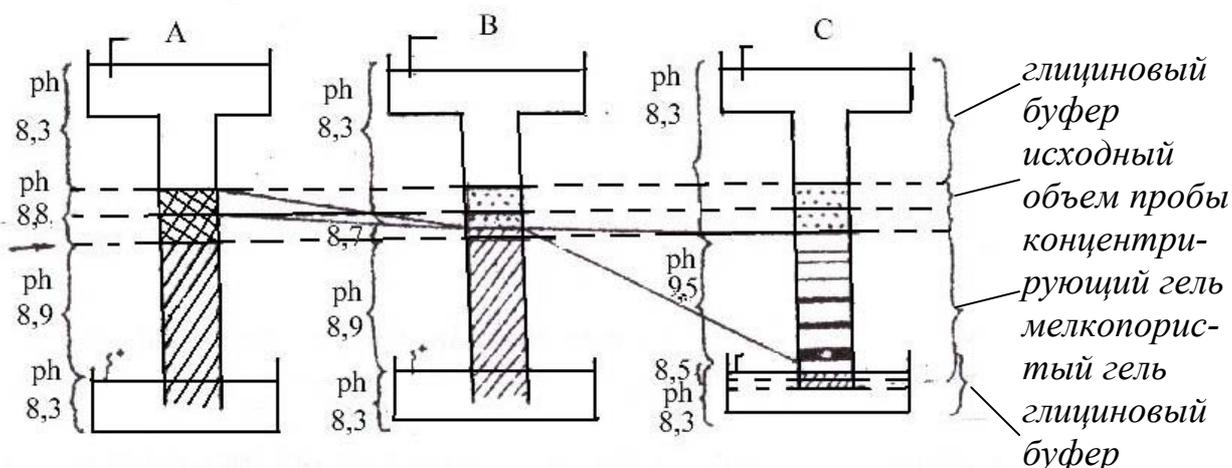
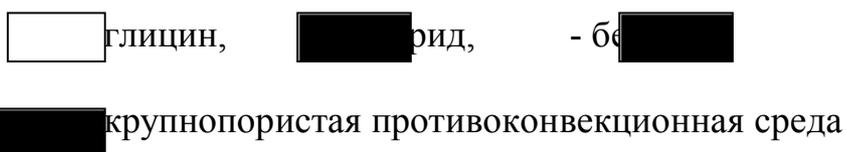


Рис. 6.1. Разделение белков с помощью диск-электрофореза



Когда замыкающие глицинатные ионы доходят до нижнего геля, их число и подвижность увеличиваются, поскольку значение $pH = 9,5$ приближается к pK глицина. Теперь подвижность глицинатных ионов становится выше, чем у белковых анионов, подвижность которых замедляется в разделительном геле вследствие эффекта молекулярного сита. Глицинатные ионы перегоняют все белковые молекулы и догоняют анионы хлора. Как только последний ион хлора уходит из нижнего геля, pH повышается, потому что ионы хлора заменяются более основными глицинатными, и вместо исходной буферной системы трис- HCl образуется трис-глициновый буфер. Вследствие этого возрастает отрицательный заряд белковых анионов, и их движение происходит в соответствии с величинами отношения заряд/масса.

6.5. Применение метода диск-электрофореза

Метод электрофореза в полиакриламидном геле широко используется в различных отраслях биологических, экологических и медицинских исследований. Приведем лишь некоторые примеры его применения:

- 1) в медицине (диагностика заболеваний - изучение белков и ферментов различных органов и тканей в норме и патологии);
- 2) в серологии (разделение белков сыворотки крови для определения родов и видов и их идентификации);
- 3) в генетике (выявление мутаций путем изучения белковых спектров);
- 4) в гистологии и цитологии (анализ компонентов клеточных фрагментов и тканей);
- 5) в ботанике (исследование белков семян растений);
- 6) в микробиологии (изучение белков бактерий, вирусов и фагов, определение принадлежности микроорганизмов к определенному штамму);
- 7) в биохимии (изучение белковых спектров, множественных молекулярных форм ферментов, разделение смесей нуклеиновых кислот в различных органах и тканях организмов);
- 8) в экологии (изучение влияния абиотических и биотических факторов окружающей среды на биохимические показатели обитающих в ней организмов).

6.6. Практические работы

Работа 1. Фракционирование белков методом электрофореза в полиакриламидном геле

Разделение белков осуществляют в слабощелочной среде (рН 8,3 - 8,9)

Оборудование и реактивы. Прибор для электрофореза фирмы “Реанал”, универсальный источник питания, рефрактометр, лейкопластырь, ножницы, парафин, набор пипеток и микропипеток, соляная кислота: $C(HCl) = 1$ моль/л, триоксиметиламинометан (трис), ТЕМЭД, акриламид, N,N - метиленбисакриламид, персульфат аммония, сахароза (40%-ный раствор), глицин, амидовый черный 10 В (1%-ный раствор в

смеси этанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30), уксусная кислота (7%-ный раствор), рибофлавин, свежепрокипяченная дистиллированная вода.

Материалы.

Сыворотка крови. Цельную кровь в широких пробирках оставляют на сутки в холодильнике. Для лучшего отделения сгустка содержимое пробирок обводят вязальной спицей. Через сутки сыворотку отбирают пипеткой с резиновой грушей. Чистая сыворотка имеет соломенно-желтый цвет. Если есть в сыворотке крови примесь форменных элементов (красный оттенок), то ее центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Экстракт белков хирономид, моллюсков. 1 г хирономид, моллюсков замораживают в морозильной камере холодильника, а затем растирают в фарфоровой ступке с 2 мл трис-глицинового буфера (рН = 8,6). Экстракт центрифугируют в течение 10 мин при 10 000 - 12 000 об/мин. Отбирают надосадочную жидкость. Для нанесения на гель готовят раствор в 40%-ной сахарозе.

Выполнение работы

Приготовление колонок полиакриламидного геля

Для приготовления нижнего и верхнего геля используют следующие исходные растворы (их можно хранить месяц в холодильнике):

Раствор А: раствор соляной кислоты: $C(HCl) = 1$ моль/л – 48 мл; трис – 36,6 г.; ТЕМЭД – 0,23 мл; вода – до 100 мл (рН = 8.6).

Раствор Б: раствор соляной кислоты $C(HCl) = 1$ моль/л - 48 мл; трис-5,98 г; ТЕМЭД – 0.46 мл; вода – до 100 мл (рН = 6.7).

Раствор В: акриламид - 30 г; бисакриламид – 0,735 г; вода – до 100 мл.

Раствор Г: акриламид – 10 г; бисакриламид – 2,5 г; вода – до 100 мл.

Раствор Д: рибофлавин – 4,0 мг; вода – до 100 мл.

Раствор Е: сахароза – 40 г; вода – до 100 мл.

Раствор Ж: персульфат аммония – 0,14 г; вода – до 100 мл.

Процесс полимеризации геля ведут без доступа кислорода. С этой целью нижние концы сухих обезжиренных электрофоретических трубок (диаметр 0,6 см, длина 8 см) закрывают водонепроницаемыми доньшиками из лейкопластыря и закрепляют их парафином. Из запасных растворов, доведенных до комнатной температуры, готовят смесь для нижнего, разделительного геля. Для этого смешивают 1 часть раствора А, 2 части раствора В, 1 часть воды и 4 части раствора Ж. Эту смесь перемешивают и заливают в электрофоретические трубки (примерно 2 мл). На смесь сразу наслаивают пипеткой по стенке колонки слой свежепро-

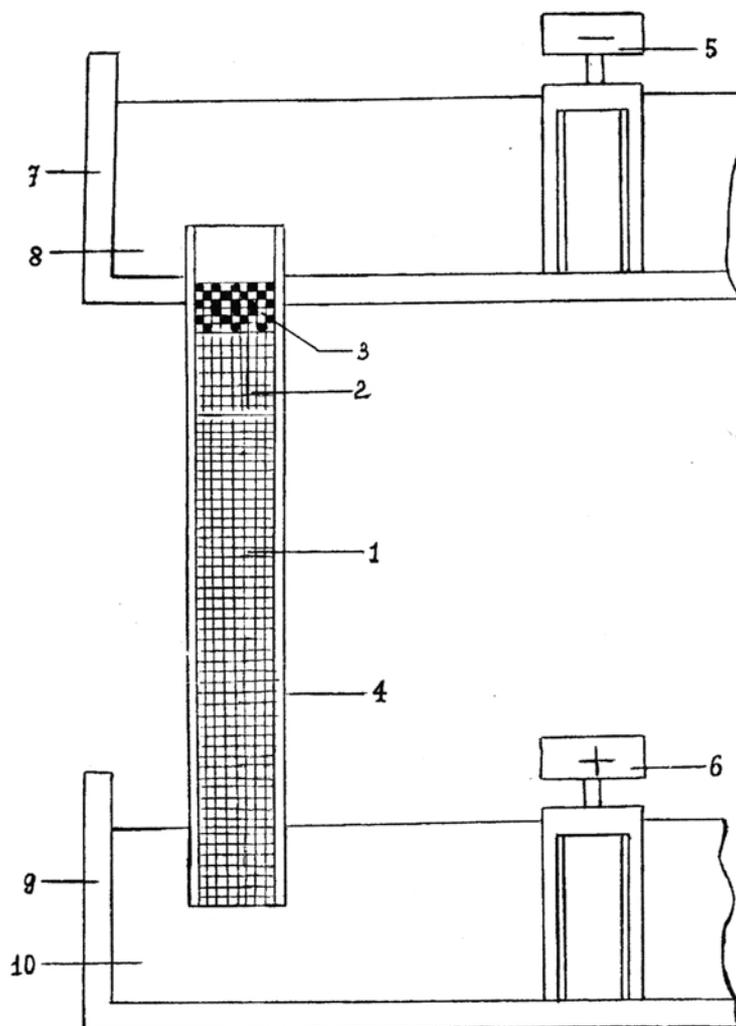
кипяченной дистиллированной воды высотой примерно 8 мм. Полимеризация нижнего геля при комнатной температуре продолжается около часа. Для ускорения процесса полимеризации трубки с гелем помещают в термостат при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Полимеризация геля в термостате длится около 30 мин. Об окончании процесса полимеризации нижнего геля можно судить по появлению четкой границы между гелем и слоем воды над ним. После окончания процесса полимеризации геля с него удаляют воду и заливают в колонку смесь для верхнего геля. Для этого смешивают 1 часть раствора Б, 2 части раствора Г, 1 часть раствора Д и 4 части раствора Е. Смесь для верхнего геля наносят высотой 0,5 см, что составляет примерно 0,2 мл. На эту смесь снова накладывают воду и ведут полимеризацию верхнего геля на солнечном свете или под УФ-лампой. Начало полимеризации определяют по переходу флуоресцирующего желто-зеленого цвета смеси в опаловый, а конец – по резкой границе между гелем и водой. Полимеризация верхнего геля длится 10-15 мин. После удаления воды колонки готовы для нанесения исследуемого раствора.

Подготовка материала для электрофоретического разделения

Оптимальное количество вносимого однородного белка на одну гелевую колонку - от 10 до 100 мкг. При выполнении данной работы следует вносить 200 мкг, так как белки сыворотки крови неоднородны. Следующий этап работы - определение содержания белка в исследуемом экстракте или сыворотке крови и разведение его до нужной концентрации. Для количественного определения содержания белка в биологическом материале чаще всего используют рефрактометрический метод или один из колориметрических методов. После определения содержания белка сыворотку крови разводят 40%-ным раствором сахарозы до концентрации 2000 мкг в мл (на одну гелевую колонку наносят по 0,1 мл раствора, содержащего 200 мкг белка). Так как в сыворотке крови содержится примерно 9% белка, то ее разводят раствором сахарозы в 45 раз. По 0,1 мл полученного раствора сыворотки крови наносят на приготовленный гель. Затем трубки доверху заполняют трис-глициновым буфером, разбавленным в 10 раз, снимают водонепроницаемые донышки и укрепляют колонки в приборе для электрофореза.

Для приготовления трис-глицинового буфера ($\text{pH} = 8,6$) берут 6 г триса и 28,8 г глицина, растворяют их в воде и доводят объем до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе. Этот же раствор, разбавленный дистиллированной водой в 10 раз, используют для заправки электродных камер прибора для электрофореза. Такой разведенный буферный раствор называют электродным буфером. Его ионная сила равна 0,075.

Монтаж прибора для электрофореза в полиакриламидном геле
Основные части прибора представлены на рис. 6.2.



*Рис. 6.2. Схема прибора для электрофореза в полиакриламидном геле:
1 - мелкопористый гель; 2 - крупнопористый гель;
3 - исследуемый раствор белка; 4 - стеклянная трубочка;
5, 6 - электроды; 7 - верхний резервуар для катодного буфера;
8, 10 - электродные буферы; 9 - нижний резервуар
для анодного буфера.*

Угольный электрод закрепляют в центре нижнего буферного резервуара и наливают в последний охлажденный электродный триглицериновый буфер ($\text{pH} = 8,6$). Затем стеклянные трубки с нанесенными образцами ввинчивают в отверстия, просверленные в дне верхнего резервуара. Устанавливают электрод верхнего резервуара и собранную верхнюю часть прибора присоединяют к нижнему резервуару так, чтобы концы трубок были погружены в буферный раствор нижнего резервуара.

Удаляют воздушные пузырьки с концов трубок. Осторожно заполняют верхний резервуар трис-глициновым буфером, разбавленным в 10 раз, следя за тем, чтобы электрод был полностью погружен в раствор. В верхний резервуар добавляют 2 мл раствора бромфенолового синего, служащего индикатором окончания электрофореза.

Проведение электрофореза

Прибор для электрофореза подключают к универсальному источнику питания марки УИП-1. В качестве источника питания можно использовать также блок питания от аппаратов электрофореза на бумаге. На каждую колонку подают первые 10 - 15 минут силу тока 2 мА, а затем 5 мА, напряжение от 300 до 600 В, длительность электрофореза 60 – 70 мин, температура не выше +4⁰С (прибор для электрофореза помещают в холодильник). Электрофорез заканчивают, когда индикаторная краска окажется на расстоянии 5 – 6 мм от нижнего края трубки. По окончании электрофореза прибор разбирают, трубки вынимают и извлекают из них гель. Отслаивание геля от стенок стеклянных трубок проводят тонкой металлической иглой. Хорошо использовать с этой целью мандрену от шприцевой иглы или шприц, наполненный водой. Колонку на время извлечения геля с помощью металлической иглы помещают в кристаллизатор с водой. После извлечения гелевую колонку помещают в пробирку и быстро дважды промывают дистиллированной водой. Затем ее заливают 7%-ным раствором уксусной кислоты на 15-20 минут для фиксации зон расположения белков и отмывают дистиллированной водой (10 – 15 минут). Замечено, что чем лучше произошла фиксация, тем быстрее и легче отмывается гель от красителя впоследствии.

Обнаружение белковых фракций

Расположение фиксированных уксусной кислотой белковых фракций на колонках полиакриламидного геля определяют, окрашивая их 1%-ным раствором амидового черного 10 В в смеси этанола, уксусной кислоты, воды (10:1:30). Для этого гелевые колонки опускают в раствор красителя на 1 мин. В результате вся колонка окрашивается в темный цвет, но только белковые фракции удерживают краситель прочно. От остальной части геля он отмывается смесью этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30, заменяемой многократно.

Электрофореграмму (схему расположения белковых фракций на гелевой колонке) нужно зарисовать в тетради. Каждая белковая фракция может быть охарактеризована по интенсивности окраски и по относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). ОЭП белковых фракций рассчитывают, деля длину пути, пройденного фракцией, на длину пути, пройденного индикаторной краской. Тот и другой путь из-

меряют с точностью до десятых долей миллиметра, а ОЭП рассчитывают с точностью до сотых долей.

При сравнении электрофореграмм на основании статистической обработки данных разницу в 0,01 значения ОЭП у двух фракций с величинами ОЭП вдоль колонки в пределах от 0 до 0,3 считают несущественной. Аналогично этому разницу значения ОЭП 0,02 считают несущественной в пределах от 0,3 до 0,6, а разницу в 0,03 - в пределах от 0,6 до 1,0.

Гелевые колонки после окрашивания можно фотографировать в проходящем свете, используя для этого ультрахемоскоп (столик для просмотра хроматограмм), на пленку КН-1 при помощи открытой диафрагмы фотоаппарата (лучше зеркальная камера "Зенит" с удлиненными кольцами) при выдержке 1/30 с.

Для количественного определения белков гели фотометрируют.

Хранение и реставрация гелей

Гелевые колонки с окрашенными белковыми фракциями хранят много месяцев в отмывающем растворе в плотно закрытых пробирках. Высохшие электрофореграммы могут быть размочены и реставрированы в этом же отмывающем растворе.

Техника безопасности при работе методом электрофореза

1. Необходимо соблюдать осторожность при работе с прибором для электрофореза, составной частью которого является источник питания УИП-1, имеющий высокое напряжение (до 600 В). Он должен быть надежно заземлен. Кроме того, и другие части прибора находятся под напряжением, поэтому при эксплуатации прибора следует быть осторожным.

2. Изоляция соединительных проводов должна быть безупречной.

3. Необходимо помнить, что акриламид обладает определенной токсичностью, что вызывает раздражение кожи. В связи с этим при работе с акриламидом надо остерегаться его попадания на кожу.

Контрольные вопросы

1. Что такое электрофорез и какие биологические макромолекулы можно изучать с помощью метода электрофореза?
2. Чем обусловлен суммарный электрический заряд белков?
3. От чего зависит подвижность белков в электрическом поле?
4. Какие разновидности электрофореза Вы знаете? В чем преимущество методов зонального электрофореза?
5. В чем состоит отличие электрофореза в гелях от других видов электрофореза? Каковы преимущества полиакриламидного геля?
6. Применение метода электрофореза в биологических и экологических исследованиях.
7. В чем заключаются основные этапы разделения белков методом электрофореза в полиакриламидном геле?

Литература

1. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975. С. 45-60.
2. Гааль Г., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 446 с.
3. Урванцева Г.А., Рязанова А.В. Биохимические методы анализа: Учеб. пособие / Ярослав. гос. ун-т. Ярославль, 1982. С. 3-22.
4. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. 364 с.
5. Маурер Г. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971. 247 с.
6. Методы практической биохимии / Под ред. С.Е. Северина, А.Д. Виноградова. М.: Мир, 1978. С. 114 - 137.
7. Королева Е.И., Мешкова Н.П. Практическое руководство к занятиям по биохимии животных. М.: Изд-во МГУ, 1972. 90 с.
8. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М.: Высш. школа, 1975. С. 103-121, 313-329.
9. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот (электрофорез и центрифугирование). М.: Наука, 1981. 279 с.
10. Гаспаров В.С., Дектярь В.С. Определение белка по связыванию с красителем кумасси бриллиантовым голубым G-250 // Биохимия. 1994. Т. 56. № 6. С. 763-767.
11. Конищева А.П., Егорова Т.А., Филиппович Ю.Б. Изучение разнообразия белков гемолимфы различных пород тутового шелкопряда методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимия насекомых. М.: Наука, 1975. С. 141-156.

6.7. Метод энзимэлектрофореза в полиакриламидном геле

Существует несколько способов обнаружения ферментов методом электрофореза в полиакриламидном геле, но основными являются два: окрашивание геля и электрофорез в гелях, содержащих субстрат.

Окрашивание геля заключается в следующем. Гель вынимают из трубки и выявляют ферментативную активность отдельных белковых фракций непосредственно на гелевых колонках с помощью химических реакций, протекающих в специально подготовленных инкубационных средах. Инкубационные среды специфичны для каждого фермента. В местах локализации фермента обнаруживают окрашенные зоны. При втором способе субстрат вводят в гель, а затем инкубируют гель при нормальных условиях с соответствующими красителями.

6.8. Практические работы

Работа 1. Обнаружение амилазы в тканях животного происхождения методом электрофореза в полиакриламидном геле

Ферменты амилазного комплекса ускоряют гидролиз полисахаридов (крахмала, гликогена) с образованием разнообразных промежуточных и конечных продуктов.

Как известно, крахмал существует в двух формах: в виде амилозы и амилопектина. Амилоза состоит из длинных неразветвленных цепей, в которых все D-глюкозные остатки соединены α -1,4 связями. Цепи эти полидисперсны. Их молекулярная масса варьирует от нескольких тысяч до 500 000. В воде амилоза не дает истинного раствора, но образует гидратированные мицеллы, которые при добавлении йода окрашиваются в синий цвет. Цепи амилопектина сильно разветвлены. Остов молекулы амилопектина имеет α -1,4 гликозидные связи, а в точках ветвления α -1,6 связи. Амилопектин образует коллоидные растворы, которые при добавлении йода окрашиваются в красно-фиолетовый цвет. Молекулярная масса амилопектина может достигать 1 млн.

Основные компоненты крахмала гидролизуются ферментативным путем разными способами. Амилоза может быть гидролизована при участии $\square\alpha$ - и $\square\beta$ -амилаз. $\alpha\square$ -амилаза или 1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, ускоряет гидролиз $\square\alpha$ -1,4 связей без какого-либо определенного порядка, в результате чего сначала возникают олигосахариды, которые также подвержены действию $\square\alpha$ -амилазы, если они содержат три и более ос-

татков Д-глюкозы. В конечном счете получается смесь α -мальтозы и Д-глюкозы. α -амилаза найдена у всех растений и животных.

Фермент β -амилаза (или α -1,4-глюканмальтогидролаза) ускоряет реакцию гидролиза амилозы по 1,4 связям, последовательно отщепляя остатки β -мальтозы с нередуцирующего конца. β -амилаза характерна только для высших растений.

В природе найдена также γ -амилаза, или α -1,4-глюканглюкогидролаза, ускоряющая гидролиз 1,4-связей в крахмале так, что последовательно отщепляются остатки глюкозы, начиная с нередуцирующего конца.

Амилопектин также гидролизуется при участии α , β , γ -амилаз, но так как все эти амилазы не способны расщеплять α -1,6-связи в точках ветвления амилопектина, то конечным продуктом при действии амилаз на амилопектин является крупная, сильно разветвленная "сердцевина" полисахарида, называемая остаточным декстрином. α -1,4-связи в нем гидролизуются при участии особых ферментов (α -1,6-глюкозидаз).

В исследуемых препаратах в основном содержится α -амилаза. Выявление ферментативной активности амилазы проводят, используя реакцию взаимодействия крахмала и продуктов его гидролиза с йодом.

Оборудование и реактивы. Приборы и реактивы для определения белка по методу Лоури, приборы и реактивы для проведения электрофореза в ПААГе, трис-глициновый буфер, разбавленный в 5 раз, 1%-ный раствор растворимого крахмала, ацетатный буфер (pH = 5,6), раствор йода, тканевые экстракты, термостат на 37°C.

Выполнение работы

Колонки полиакриламидного геля готовят в соответствии с прописью, приведенной ранее (работа 1, стр. 105-106), только вместо 1 части воды при приготовлении нижнего геля берут 1 часть раствора крахмала. В исследуемом образце определяют содержание белка по методу Лоури и разбавляют его 40%-ным раствором сахарозы до содержания белка 4 000 - 6 000 мкг/мл. На каждую колонку полиакриламидного геля наносят по 0,1 мл белкового экстракта, содержащего 400 - 600 мкг белка, и проводят электрофоретическое разделение по методу, описанному ниже. По завершении электрофореза гелевую колонку извлекают из трубки и инкубируют в ацетатном буфере (pH = 5,6) при 37°C в течение часа, затем буферный раствор сливают, гель промывают водой и заливают раствором йода.

ВНИМАНИЕ! Перед употреблением раствор йода разбавляют в 6 раз.

Окрашивание проводят в течение 1 – 3 минут. Далее раствор йода сливают и гелевые колонки заливают водой. Гелевая колонка окрашивается в синий цвет, а в отдельных зонах, где разрушен крахмал, введенный в состав геля, имеются неокрашенные участки. Эти участки показывают наличие α -амилазы.

Схему расположения форм α -амилазы на гелевой колонке нарисовать в тетради, посчитать ОЭП фракций.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит метод энзимэлектрофореза? Каковы способы обнаружения ферментов методом энзимэлектрофореза?
2. Каков принцип действия амилаз?
3. Каков принцип выявления α -амилазы методом энзимэлектрофореза в полиакриламидном геле?

Работа 2. Обнаружение арилэстеразы в тканях животного происхождения методом электрофореза в полиакриламидном геле

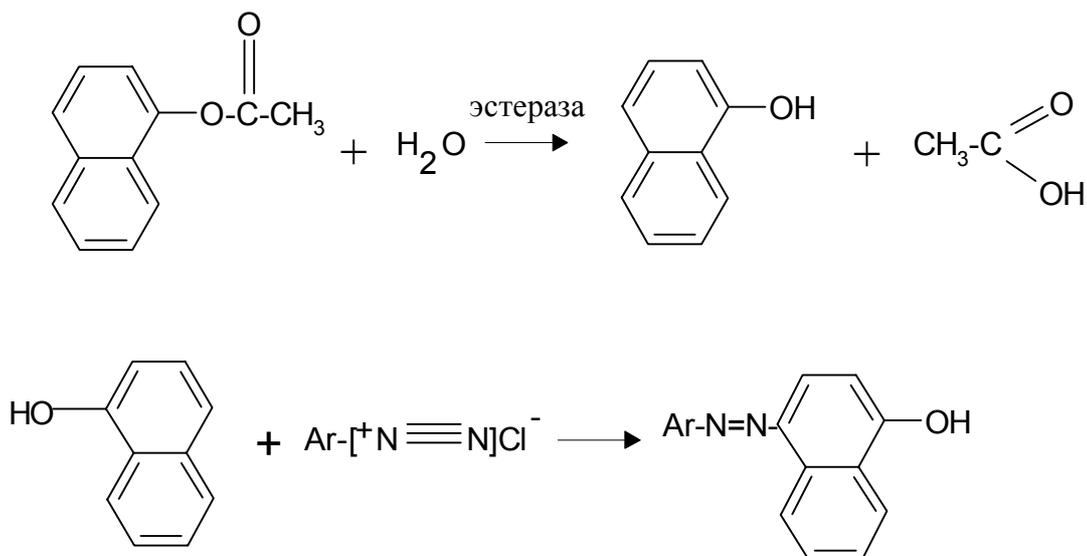
Оборудование и реактивы. Приборы и реактивы для определения белка по методу Лоури; приборы и реактивы для проведения электрофореза в ПААГе; трис-глициновый буфер, разбавленный в 5 раз; 1%-ный раствор 1-нафтилацетата в 50%-ном растворе ацетона; трис-НСl буфер: $C(\text{трис-НСl-буфера}) = 0,2$ моль/л ($pH = 7,1$); раствор прочного синего (2 мг в 1 мл); тканевые экстракты; термостат на 37°C .

Выполнение работы

Колонки полиакриламидного геля готовят в соответствии с прописью, приведенной ранее (работа 1, стр. 105-106), только вместо 1 части воды при приготовлении нижнего геля берут 1 часть раствора крахмала. В исследуемом образце определяют содержание белка по методу Лоури и разбавляют его 40%-ным раствором сахарозы до содержания белка 4000 - 6000 мкг/мл. На каждую колонку полиакриламидного геля наносят по 0,1 белкового экстракта и проводят электрофоретическое разделение белков.

По завершении электрофореза гелевую колонку, извлеченную из стеклянной трубки, промывают дистиллированной водой и помещают в заранее подготовленную в пробирке инкубационную смесь, состоящую из 9 мл трис-НСl буфера $C(\text{трис-НСl буфера}) = 0,2$ моль/л ($pH = 7,1$) и 0,5 мл 1%-ного раствора 1-нафтилацетата в 50%-ном растворе ацетона. Содержимое пробирки (вместе с гелем) тщательно перемешивают и ос-

тавляют на 10 – 15 минут в термостате при 37°C. Затем приливают 1 мл раствора прочного синего Б, перемешивают и оставляют в термостате еще на 10 – 20 минут. Белковые фракции, обладающие эстеразной активностью, выявляются на колонке в виде зон, окрашенных в коричневый цвет (от 2 до 6 фракций). Окраска развивается в результате сочетания между I-нафтолом, освобождающимся при гидролизе субстрата (I-нафтилацетата) в присутствии эстеразы, и солью диазония (прочным синим Б) с образованием нерастворимого азосоединения.



Схему расположения белковых фракций, обладающих эстеразной активностью, зарисовать в тетради. Посчитать ОЭП полученных фракций.

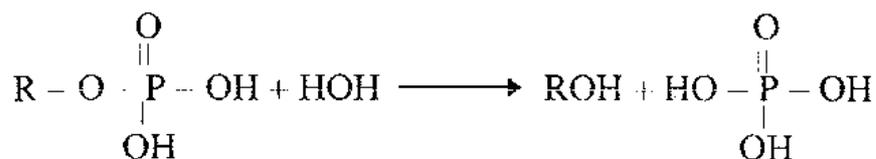
Контрольные вопросы

1. К какому классу и подклассу ферментов относится арилэстераза?
2. Каковы принципы выявления арилэстеразы методом электрофореза в полиакриламидном геле?

Работа 3. Обнаружение кислой фосфатазы методом электрофореза в полиакриламидном геле

Оборудование и реактивы. Приборы и реактивы для определения белка по методу Лоури; приборы и реактивы для проведения электрофореза в ПААГе; трис-глициновый буфер, разбавленный в 5 раз; ацетатный буфер: С(ацетатного буфера) = 0,2 моль/л (рН = 4,8); I-нафтилфосфат; прочный синий Б; тканевые экстракты; термостат на 37°C.

Кислая фосфатаза принадлежит к классу гидролаз. Фосфатазы расщепляют эфирную связь между фосфатом и остатком спирта (R):



Данный фермент имеет огромное значение в общем метаболизме клетки. Кислая фосфатаза принимает участие как в деструктивных процессах, так и в реакциях анаболизма, являясь ключевым ферментом благодаря широкой субстратной специфичности и многообразию изоформ, которыми представлен энзим в клетках большинства организмов.

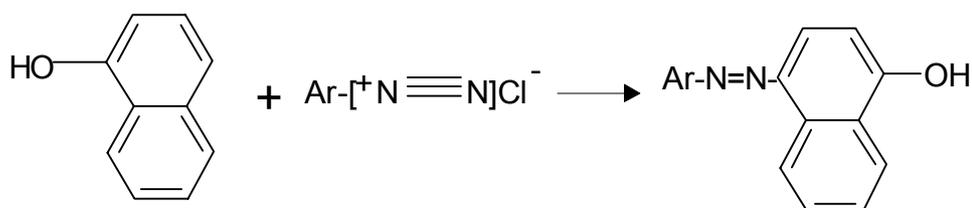
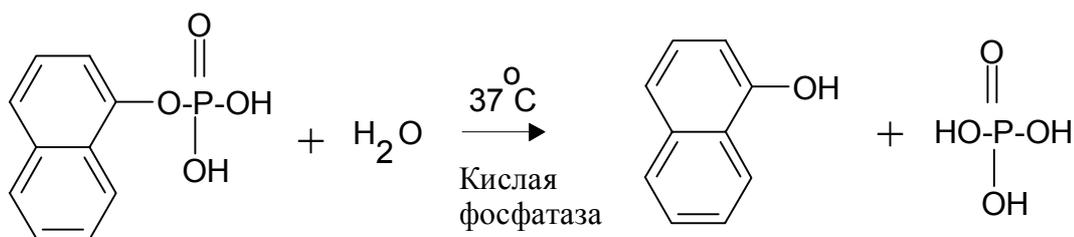
Все это вызывает давний и заслуженный интерес как теоретического, так и прикладного характера к изучению кислой фосфатазы.

Кислая фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, 3.1.3.2).

Колонки полиакриламидного геля готовят в соответствии с приведенной ранее прописью. В исследуемом образце определяют содержание белка по методу Лоури и разбавляют его 40%-ным раствором сахарозы до содержания белка 4000 - 6000 мкг/мл. На каждую колонку полиакриламидного геля наносят по 0,1 белкового экстракта и проводят электрофоретическое разделение белков.

Для обнаружения кислой фосфатазы гелевую колонку с электрофоретически фракционированными белками помещают сначала в инкубационную смесь, состоящую из 9 мл ацетатного буфера: С(ацетатного буфера) = 0,2 моль/л (рН = 4,8) и 3 мг I-нафтилфосфата на 10 минут (выдерживают в термостате при 37°C). Затем в смесь добавляют 1 мл раствора прочного синего Б (2 мг в 1 мл воды) и выдерживают в термостате еще 20 минут. Зоны локализации кислой фосфатазы окрашиваются в малиново-красный цвет.

Окраска развивается в результате взаимодействия между I-нафтолом, образующимся при гидролизе субстрата (I-нафтилфосфата) в присутствии кислой фосфатазы, и солью диазония (прочным синим Б) с образованием нерастворимого азосоединения.



Схему расположения белковых фракций, обладающих эстеразной активностью, зарисовать в тетради. Подсчитать ОЭП полученных фракций.

Контрольные вопросы

1. К какому классу и подклассу ферментов относится кислая фосфатаза?
2. Каковы принципы выявления кислой фосфатазы методом электрофореза в полиакриламидном геле?

Литература

1. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1976. С. 106-115.
2. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. Пер. с англ. М.: Мир, 1985. С. 226-267.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Глава 7. Общие принципы хроматографии

7.1. История развития хроматографических методов, определения и теоретические основы

Хроматографический метод разделения и анализа веществ открыт в 1903 году русским ботаником М.С. Цветом при пропускании сложной смеси растительных пигментов (петролейно-эфирной вытяжки из листьев растений) через трубку (колонку) с карбонатом кальция. В колонке образовался ряд окрашенных зон, что и дало название методу. Слово “хроматография” состоит из двух корней греческого происхождения, означающих “цвет” и “писать”. М.С. Цвет назвал метод хроматографией, то есть цветописью, указывая на возможность разделения и бесцветных веществ. Автор метода опубликовал ряд статей по хроматографии, однако метод не развивался вплоть до 1931 года, когда Куном, Винтерштейном и Ледераром были воспроизведены опыты М.С. Цвета. Более того, им удалось выделить в кристаллическом виде α - и β -каротины из сырого каротина и продемонстрировать препаративную ценность метода.

В 1938 году появился вариант тонкослойной хроматографии. Он был предложен отечественными учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбер. Однако широкие возможности этого метода были открыты позднее благодаря работам Ю. Кирхнера и Э. Шталя.

Началом современной хроматографии принято считать 1941 год, когда американские ученые Л. Мартин и Р. Синдж разработали метод распределительной хроматографии и дали его теоретическое обоснование. Эти же авторы указали на возможность осуществления газожидкостной хроматографии. Середина 70-х годов 20 века ознаменована рождением высокоэффективной колоночной хроматографии (ВЭКХ). В это время появились первые жидкостные хроматографы. В настоящее

время хроматография - один из самых распространенных методов в исследовательской работе, нашедший применение в биологии, экологии и на производстве.

Хроматографией называют физико-химический метод, основанный на различии скорости переноса растворенных веществ в системе двух фаз, одна из которых подвижна.

Отличительной чертой хроматографического метода является разделение смеси веществ на основе распределения между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых **неподвижная**, а другая - **подвижная**, непрерывно протекающая через неподвижную фазу. В роли подвижной фазы чаще всего выступает газ или жидкость, а в качестве неподвижной фазы - жидкость или твердое вещество. Разделение может происходить за счет установления:

а) адсорбционного равновесия между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами (адсорбционная хроматография);

б) равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами (газо-жидкостная хроматография);

в) равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной жидкой фазами (хроматография на бумаге);

г) ионообменного равновесия между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитом (подвижная фаза) (ионообменная хроматография);

д) равновесия между жидкой фазой на внутренней и внешней поверхностях пористой структуры или "молекулярного сита" (эксклюзивная или проникающая хроматография);

е) равновесного связывания макромолекулы с малой молекулой, по отношению к которой она проявляет высокую биологическую специфичность, а следовательно, и сродство (аффинная хроматография).

Во всех случаях разделение компонентов происходит вследствие разности в коэффициентах распределения между подвижной и неподвижной фазами. Закон распределения описывает динамическое равновесие, в котором молекулы непрерывно обмениваются между фазами. Равновесное распределение анализируемого вещества между несмешивающимися фазами характеризуется коэффициентом распределения K .

Коэффициент распределения определяется как отношение концентраций анализируемого вещества в подвижной и неподвижной фазе. Его можно выразить, написав вместо концентраций среднее время пребывания молекул каждого из компонентов в неподвижной и подвижной фазах:

$$K = C_m / C_s = \tau_m / \tau_s$$

где C , τ - концентрация и время пребывания молекул компонентов в неподвижной (m) и подвижной (s) фазах соответственно.

Понятие "коэффициент распределения", взятое из закона распределения Нернста, является основополагающим в хроматографии. Величина его зависит только от природы подвижной и неподвижной фаз и температуры. Относительная скорость движения анализируемого вещества обратно пропорциональна коэффициенту распределения K . При больших значениях коэффициента распределения большая часть вещества находится в неподвижной фазе и поэтому не перемещается. Напротив, если коэффициент мал, то это растворенное вещество перемещается с подвижной фазой. При отсутствии взаимодействия растворенных веществ с подвижной и неподвижной фазами в системе быстро устанавливается термодинамическое равновесие, в котором каждому компоненту соответствует определенное среднее время пребывания в подвижной фазе. Чем больше это время, тем быстрее компонент перемещается с подвижной фазой. Наибольшая скорость, равная скорости перемещения подвижной фазы, наблюдается при $K = 0$. Наименьшая скорость, равная нулю, отвечает случаю, когда компонент не растворяется в подвижной фазе. Различие молекул компонентов по скоростям движения приводит к разделению их на группы, перемещающиеся с различными скоростями.

Подбор фаз для хроматографического разделения производится так, чтобы коэффициенты распределения компонентов смеси в них были различными. Термином "эффективный коэффициент распределения" обозначают отношение общего количества вещества (в отличие от концентрации) в одной фазе к общему количеству этого вещества в другой фазе, следовательно, это есть произведение коэффициента распределения вещества и отношения объемов обеих фаз.

7.2. Классификация хроматографических методов

Многообразие вариантов хроматографического метода вызвало необходимость их систематизации. Предложено несколько классификаций хроматографических систем. Наиболее распространенной является систематизация их по 4 признакам.

1. В зависимости от агрегатного состояния фаз. Сюда отнесены два варианта хроматографии - газовая (газо-адсорбционная и газожидкостная) и жидкостная (жидкостно-жидкостная и жидкостно-адсорбционная).

Газовая хроматография. Подвижной фазой является газ (или пар). В газо-адсорбционной (точнее, газо-твердой) хроматографии неподвижной фазой является твердый адсорбент, а в газожидкостной - жидкость, нанесенная на твердый носитель.

Жидкостная хроматография. Подвижной фазой служит жидкость. В жидкостно-адсорбционной хроматографии неподвижной фазой является твердый адсорбент, в жидкостно-жидкостной хроматографии - жидкость, удерживаемая твердым носителем, в ионообменной - сорбент-ионит.

2. В зависимости от механизма, лежащего в основе равновесного распределения. Включает адсорбционную, распределительную (хроматография на бумаге), ионообменную, проникающую и аффинную хроматографии. Для каждой из них характерны свои особенности.

Адсорбционная хроматография. Разделение основано на различиях в адсорбируемости компонентов смеси на данном адсорбенте.

Распределительная хроматография. Разделение основано на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах.

Ионообменная хроматография. Разделение зависит от констант равновесия между ионообменной смолой (неподвижной фазой) и электролитом (подвижной фазой).

Проникающая хроматография (эксклюзионная, гель-хроматография). Деление веществ обусловлено тем, что молекулы разделяемой смеси отличаются по размеру и, следовательно, обладают разной способностью проникать в поры геля (неподвижную фазу).

Аффинная хроматография. Основана на уникальном свойстве макромолекул - их биологической специфичности. Широко используется для очистки высокомолекулярных биологических соединений.

3. В зависимости от формы проведения процесса. Различают колоночную и плоскостную (тонкослойную и бумажную) хроматографии.

Колоночная хроматография отличается тем, что процесс проводится в хроматографических колонках - трубках, которые наполнены адсорбентом или носителем, содержащим подвижную фазу.

Плоскостная (планарная) хроматография осуществляется в плоском слое сорбента (неподвижной фазе). Она различается на бумажную и тонкослойную хроматографию. В первой в качестве сорбента используется специальная бумага, во второй процессы разделения происходят в тонких слоях сорбента, нанесенного на инертную твердую подложку или в пленках пористого полимерного материала.

4. В зависимости от цели проведения хроматографического процесса различают аналитическую, неаналитическую, препаративную и промышленную хроматографии.

Аналитическая хроматография предназначена для определения качественного и количественного состава исследуемых смесей.

Неаналитическая хроматография - метод исследования физико-химических характеристик веществ при использовании хроматографической аппаратуры.

Препаративная хроматография применяется для выделения небольших количеств очень чистых компонентов в лабораторных условиях.

Промышленная хроматография применяется для выделения чистых веществ в значительных количествах.

В последнее время появились приборы, позволяющие проводить разделение соединений методами хроматографии под высоким давлением. В этом случае неподвижную фазу помещают в узкую стальную колонку, в которую затем под давлением нагнетают подвижную жидкую фазу. Применение высокого давления позволяет использовать значительно более длинные колонки и одновременно сокращать время разделения. Метод универсален, так как может применяться в адсорбционной, распределительной, ионообменной и проникающей хроматографиях.

7.3. Применение методов хроматографии

Наибольшей разрешающей способностью отличается интенсивно разрабатываемая в последние годы высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Этот метод хроматографии позволяет проводить микроколичественный анализ веществ в ультрамалых количествах и за короткое время с использованием высокочувствительных детекторов в микроколоночном варианте. Удобство и быстрота обработка аналитической информации, получаемой на хроматографах, обеспечивается вычислительным комплексом, укомплектованным пакетом программ широкого назначения. ВЭЖХ приходит на смену гель-проникающей хроматографии и другим хроматографическим методам. Метод широко применяется для анализа белков, производных аминокислот и других соединений.

Простота, эффективность, универсальность хроматографических методов обусловили их широкое применение в биологии, экологии, химии, физике, медицине и многих других направлениях, в лабораторных и промышленных условиях.

Хроматографические методы находят с каждым годом все большее применение в анализе и мониторинге токсикантов в окружающей среде. В литературе описано достаточно большое число методик по определению хлор-, азот-, и фосфорорганических пестицидов, полихлорированных и полибромированных бифенилов, нитроароматических соединений, полиароматических углеводородов (ПАУ) методом газовой хроматографии. С помощью тонкослойной хроматографии определяют пестициды и продукты их метаболизма в почвах, гязевых шламмах и почвенных водах, а также в питьевой воде и водах минеральных источников. Метод ВЭЖХ в последние годы считается одним из наиболее важ-

ных в определении следовых количеств пестицидов и полиароматических углеводородов, в анализе пищевых продуктов и фармацевтических препаратов. В отличие от газовой хроматографии этот метод используется для анализа термически нестойких, нелетучих или очень полярных соединений. Широко используется также сочетание тонкослойной хроматографии с ВЭЖХ. Например, такой прием применяют при анализе сточных вод.

В настоящем учебном пособии описаны основные и наиболее доступные для использования методы хроматографического анализа, применяемые в студенческих практикумах и при выполнении курсовых и дипломных работ.

Контрольные вопросы

1. В чем состоят теоретические основы методов хроматографии?
2. Каковы принципы классификации хроматографических методов?
3. Проанализируйте основные виды хроматографии и их применение в биологии и экологии.

Литература

1. Айвазов Б.В. Практическое руководство по хроматографии. М.: Высшая школа, 1968. 183 с.
2. Безвершенко И.А. Аффинная хроматография. Киев: Наукова думка, 1973.
3. Жидкостная колоночная хроматография: В 3 т. / Под ред. В.Г. Березина. М.: Мир, 1978. Т. 2. С. 388-417.
4. Методы практической биохимии / Под ред. С.Е. Северина. М.: Мир, 1978. С. 65-112.
5. Практикум по физико-химическим методам в биологии. М.: Изд-во МГУ, 1981. С. 154-206.
6. Яворовская С.Ф. Газовая хроматография - метод определения вредных веществ в воздухе. М.: Медицина, 1972. С. 5-32.
7. Яшин Я.И. Физико-химические основы хроматографического разделения. М.: Химия, 1976. 214 с.
8. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г. Капиллярная жидкостная хроматография. Л.: Наука, 1983. С. 5-45, 168-189.
9. Евгеньева И.И. Планарная хроматография и анализ органических веществ // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 11. С. 50-56.
10. Карцова А.А. Жидкостная хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 11. С. 35-41.
11. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981.
12. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя. М.: Мир, 1965. 508 с.

Глава 8.

Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография, в свою очередь, разделяется на жидкостно-адсорбционную, жидкостно-жидкостную и ионообменную хроматографию.

8.1. Жидкостно-адсорбционная хроматография

В жидкостно-адсорбционной хроматографии неподвижной фазой служит твердый адсорбент, а подвижной - жидкость. Она основана на различии степени сорбции-десорбции разделяемых компонентов на неподвижной фазе.

Адсорбент в общепринятом смысле представляет собой твердое вещество, способное удерживать на своей поверхности молекулы. Эта способность особенно ярко выражена в тех случаях, когда поверхность адсорбента содержит большое количество мелких пор.

Адсорбенты подразделяются на неполярные (гидрофобные) - активированный уголь - и полярные (гидрофильные) - силикагель, оксид алюминия, искусственные и природные силикаты. Адсорбционное сродство полярных веществ с полярными адсорбентами значительно выше неполярных. Это различие используется при выборе адсорбентов. Сорбция может быть специфической, что позволяет избирательно адсорбировать одно вещество из смеси.

8.1.1. Хроматография на колонке

Колонка для адсорбционной хроматографии представляет собой стеклянную трубку, заполненную адсорбентом. На адсорбент в колонке наносят смесь веществ. Затем через них пропускают растворитель или смесь растворителей, служащих подвижной фазой, т.е., как правило, применяют проявительный способ хроматографии. Разделение основано на том, что вещества с более высоким эффективным коэффициентом распределения продвигаются на колонке с большей скоростью, отделяясь таким образом от веществ более низким коэффициентом.

Если исследуемые вещества окрашены, то при разделении можно видеть движение по колонке окрашенных зон. Образующиеся в результате разделения зоны извлекают одним из двух способов. В первом случае столбик сорбента выталкивают из колонки, зоны разделяют шпате-

лем. Затем элюируют из зон разделенный материал. Другой способ состоит в том, что растворитель (элюент) пропускают через колонку до тех пор, пока не соберут все фракции по мере их выхода. Этот способ применяется чаще.

Если разделяемые с помощью хроматографии на колонке вещества не окрашены, то весь выходящий из колонки раствор (элюент) собирают в виде фракций, а потом анализируют их. При этом часто элюат контролируют, освещая, например, ультрафиолетовыми лучами. При выходе чистого растворителя флуоресценция отсутствует, а возникает во время появления примесей компонентов.

Для получения адсорбционных хроматограмм применяют растворители, обладающие слабой адсорбируемостью на применяемых адсорбентах. При выборе растворителя руководствуются правилом, согласно которому неполярные адсорбенты адсорбируют из полярных растворителей, особенно из воды и спирта, значительно хуже, чем из полярных; полярные же адсорбенты слабее адсорбируют из полярных растворителей. В большинстве случаев вымывание осуществляется за счет увеличения полярности растворителя (градиентная элюция).

Эффективность разделения зависит от правильного заполнения колонки адсорбентом. Если плотность заполнения колонки неодинакова, особенно у стенок, то при анализе окрашенных веществ можно обнаружить затекание, т.е. проникновение вещества из одной зоны в другие. Затекание может привести к сильному снижению эффективности разделения, оно особенно опасно при разделении неокрашенных веществ, так как в этом случае его трудно обнаружить в ходе хроматографии.

В настоящее время жидкостно-адсорбционная хроматография на колонке применяется при разделении и изучении состава углеводов, фенолов, углеводородов, липидов, стероидов, производных аминокислот, компонентов нуклеиновых кислот, алкалоидов, пестицидов, витаминов и других веществ.

8.1.2. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Тонкослойная хроматография занимает особое место среди других хроматографических методов благодаря простоте методики и доступности оборудования, широкой области применения, высокой экономичности, достаточно высокой селективности и чувствительности.

Данный метод успешно применяется для разделения очень малых количеств веществ (до 0,1 - 0,005 мкг). Впервые на тонком слое были разделены алкалоиды лекарственных растений. В отличие от колоночной хроматографии при ТСХ слой сорбента наносят на горизонтальную стеклянную, металлическую или пластмассовую пластинки (ТСХ с неза-

крепленным слоем) или применяют закрепление слоя крахмалом, сульфатом кальция и другими связывающими агентами. Кроме того, можно использовать выпускаемые промышленностью ЧССР (фирма Кавалиер) готовые пластинки для ТСХ с закрепленным слоем силикагеля на алюминиевой фольге (силуфоловые пластинки) или подобные им пластины для тонкослойной хроматографии “Sorbfil” отечественного производства.

Для приготовления незакрепленного слоя можно применять различные сорбенты, но чаще всего используют оксид алюминия и силикагель. На пластинку насыпают слой сорбента и раскатывают его валиком, снимая им избыточное количество вещества. Валиком может служить стеклянная палочка диаметром 10 мм и длиной несколько больше, чем ширина пластинки. На концы палочки надевают кольца из резиновой трубки, толщина которых определяет толщину слоя сорбента, т.е. трубку подбирают такой, чтобы при накатывании образовался слой в 1 мм. Кольца надевают на палочку на таком расстоянии, чтобы по обеим сторонам пластинки оставались свободные от сорбента полосы. Для приготовления закрепленных слоев в качестве сорбентов чаще всего используют силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, полиамид, кизельгур. В этом случае на стеклянную пластинку (9x12 см или 13x18 см) наносят смесь сорбента со связующими веществами и водой в виде кашицы. Смесь распределяют равномерно по всей поверхности пластинки слоем 100 – 300 мкм. Нанесенный слой оставляют на строго горизонтальной поверхности (20 – 25 ч.). Для получения более активного слоя пластинку выдерживают при 110 - 120°C в течение 30 мин. При использовании готовых пластинок полосу материала нужного размера отрезают ножницами.

Процедура анализа смеси веществ методом ТСХ такова. На расстоянии 1,5-2 см от короткого края пластинки проводят поперечную линию, являющуюся линией старта, и на нее капиллярами, микропипетками или микрошприцами в виде точки или полоски наносят анализируемую смесь и стандартные вещества (“свидетели”). В одну точку можно наносить 50 мкг 1 мг вещества. После нанесения образцов на сорбент пластинку переносят в герметичную камеру для хроматографического анализа и погружают в растворитель, который выполняет роль подвижной фазы. Растворитель (или смесь растворителей) заливают заранее в хроматографическую камеру, чтобы в ней установилась равновесная упругость паров. В противном случае растворитель, поднимаясь вверх по пластинке, будет интенсивно испаряться, что отразится на качестве разделения. При погружении пластинки в растворитель нужно следить за тем, чтобы стартовая линия была выше уровня растворителя. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента и с

разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению. Принцип разделения такой же, как в других видах хроматографии, - неодинаковое сродство разделяемых веществ к подвижной жидкой фазе и стационарному сорбенту. После достижения растворителем линии фронта пластинку высушивают и проводят идентификацию компонентов смеси. Многие вещества не обнаруживаются в видимой области, и для их определения невидимые зоны (пятна) проявляют опрыскиванием пластины ТСХ специальными реагентами. Неокрашенные вещества иногда выявляют также с помощью выдерживания пластинки в течение нескольких минут в парах йода, или ее облучают УФ-лучами или проводят термическую деструкцию разделяемых веществ.

Важной характеристикой степени разделения определяемых соединений является величина R_f – отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (x) к расстоянию (y), пройденному растворителем от линии старта до линии фронта. Величина R_f является характеристикой природы определяемого соединения.

Поскольку величина R_f зависит от свойств сорбента и растворителя, используемых для разделения, необходимо сравнение величин R_f исследуемого вещества со стандартным веществом-“свидетелем”, наносимым на ту же пластинку. “Свидетелем” служит предполагаемое чистое вещество. Идентификацию веществ (качественный анализ) можно проводить по равенству значений R_f анализируемого вещества и стандарта (“свидетеля”) как это показано на рис. 8.1.

Количественный анализ осуществляют или непосредственно на хроматограмме, или анализируемое вещество вымывают из слоя сорбента и полученный раствор анализируют с помощью спектральных и радиометрических методов. Для количественных определений в ТСХ широко используются денситометры, которые измеряют интенсивность поглощения электромагнитного излучения при сканировании хроматографической пластинки.

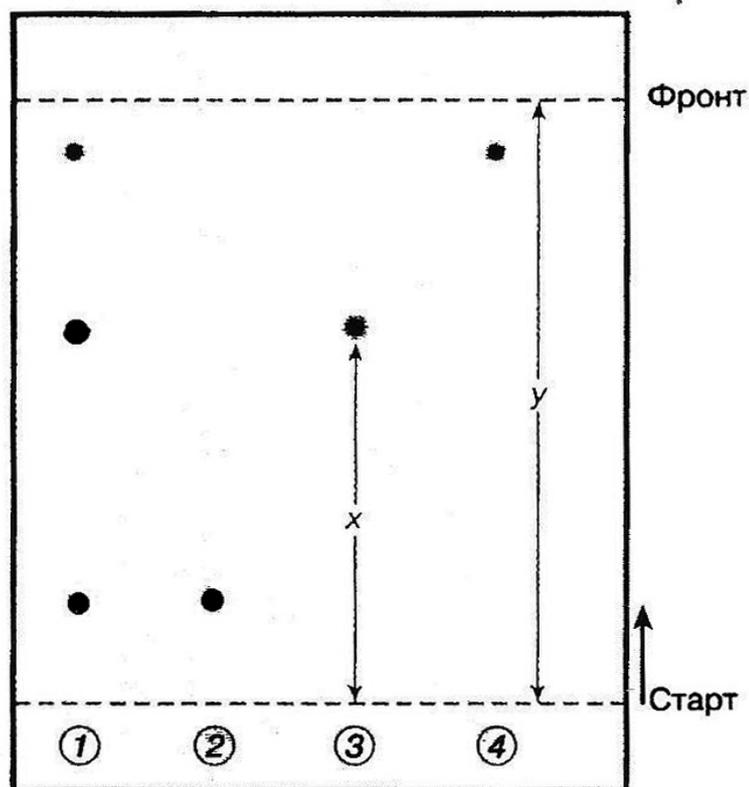


Рис. 8.1. Схема анализа методом ТСХ: 1-анализируемая смесь, 2-4 - стандартные вещества ("свидетели")

В последние годы метод ТСХ получил новый импульс для развития и наблюдается возрастание его роли в хроматографических методах. Это связано с меньшей стоимостью оборудования для ТСХ, разработкой двумерного и радиального вариантов разделения, внедрением пластин для высокоэффективной хроматографии, появлением систем автоматизированного многократного хроматографического проявления (АМХП). В двумерной хроматографии пробу наносят в виде отдельного пятна в нижний угол пластинки и проводят разделение в одном направлении. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают и проводят разделение в другой системе растворителей в направлении, перпендикулярном первому. В радиальной хроматографии растворитель с регулируемой скоростью подают в центр пластинки, заставляя зоны перемещаться от центра к периферии. Это позволяет существенно ускорить процесс разделения.

Особенно перспективной является методика АМХП. Она удобна для определения пестицидов и продуктов их метаболизма в почвах, грязевых шламах, а также в питьевой воде и водах минеральных источников. Хроматографическое разделение проводят в АМХП-системе, работа которой управляется и контролируется при помощи компьютера. Про-

водят многократное хроматографическое проявление (прогон растворителя). При таких многоступенчатых проявлениях (до 25 шагов) возможно разделение до 40 веществ на разделительной полосе длиной 8 см.

Большое значение имеет развитие высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). За счет создания принудительного движения подвижной фазы с регулируемой скоростью, уменьшения размера частиц сорбента (до 5 - 7 мкм) и насыщения пространства над пластиной парами растворителя удается существенно ускорить процесс и повысить четкость разделения.

Как отмечалось, в настоящее время широко используется сочетание ТСХ с высокоэффективной жидкостной хроматографией. При этом первоначально анализируемый образец разделяют на колонках ВЭЖХ. После этого отдельные фракции наносят на пластинки ТСХ и проводят разделение с использованием методики АМХП. Таким образом, в анализируемой смеси разделяется до 30 отдельных фракций. В каждой из этих фракций, в свою очередь, на пластинке ТСХ определяется до 10 соединений. В отдельных случаях в образцах сточных вод обнаруживали до 300 веществ. Такой прием продемонстрировал эффективность совместного использования двух методов при определении веществ в диапазоне концентраций от нанограммов до пикограммов.

Использование пластинок с более толстым слоем адсорбента (до 5 мм) позволяет хроматографировать гораздо большее количество материала (препаративная ТСХ). При этом удается проводить не только анализ, но и получать достаточные для микрометодов количества чистых веществ. В этом случае пробу наносят не в виде пятен, а полосой вдоль одной из сторон пластинки. После хроматографирования соединения располагаются на пластинке в виде отдельных полос.

На практике в тонком слое сорбента адсорбционная хроматография часто сопровождается распределительной. Это происходит в тех случаях, когда разделение проводят на слабо активных сорбентах в системах, содержащих воду (например, на Al_2O_3).

Ниже приведены некоторые примеры использования метода ТСХ.

8.1.3. Практические работы

Работа 1. Определение состава смеси аминокислот методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое

Объекты исследования: спиртовые растворы аминокислот - лейцина и глицина.

Оборудование и реактивы. Стеклянные пластинки размером 9×12 см; силиконовые пластинки; фарфоровая ступка с пестиком; термостат на 110°C; пульверизатор для опрыскивания нингидрином хроматографических пластинок; цилиндры на 10, 50 мл; эксикаторы; электроплитка; асбестовая сетка; капиллярные пипетки; карандаш; лецин и глицин: С(лейцина и глицина) = 0,1 моль/л в 20%-ном этиловом спирте; 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне; бутанол; уксусная кислота; силикагель; гипс.

Выполнение работы

1. Приготовление закрепленного слоя силикагеля. В фарфоровой ступке растирают 2 г силикагеля, 100 мг гипса (можно использовать силикагель, содержащий 13% гипса). Добавляют затем 5 мл воды и быстро смешивают. Образовавшуюся суспензию наливают на пластинку размером 9×12 см, которую держат при этом в горизонтальном положении большим и указательным пальцами левой руки. Нанесенный слой разравнивают сначала пестиком, затем осторожным покачиванием пластинки в поперечном и продольном направлениях, после чего пластинку оставляют на строго горизонтальной поверхности до полного закрепления нанесенного слоя (20 - 25ч). Для приготовления более активного слоя сразу же после его получения пластинку нагревают в термостате при 80°C в течение часа или при 110°C в течение 30 мин. До употребления пластинки хранят в эксикаторах.

2. Хроматография аминокислот. В эксикаторы, служащие хроматографическими камерами, за 1 час до разделения наливают по 40 мл смеси бутанола, уксусной кислоты, воды в соотношении 4:1:1.

Для проведения анализа берут пластинки с закрепленным слоем силикагеля, силиконовую пластинку или пластину для тонкослойной хроматографии "Sorbfil". Смесь аминокислот и стандартные растворы лейцина и глицина наносят на стартовую линию хроматографических пластинок, осторожно проведенную мягким простым карандашом на расстоянии 1,5 см от короткого края пластинок. Точки нанесения также отмечают карандашом так, чтобы между ними было расстояние не менее 1

см. Растворы аминокислот наносят специальными капиллярными пипетками с хорошо отшлифованными концами, стараясь не повредить слоя сорбента и не допуская расплывания нанесенного раствора до пятна диаметром более 0,2 см. В точки 1 и 2 наносят растворы отдельных аминокислот, а в точку 3 - их смесь (рис. 8.2.).

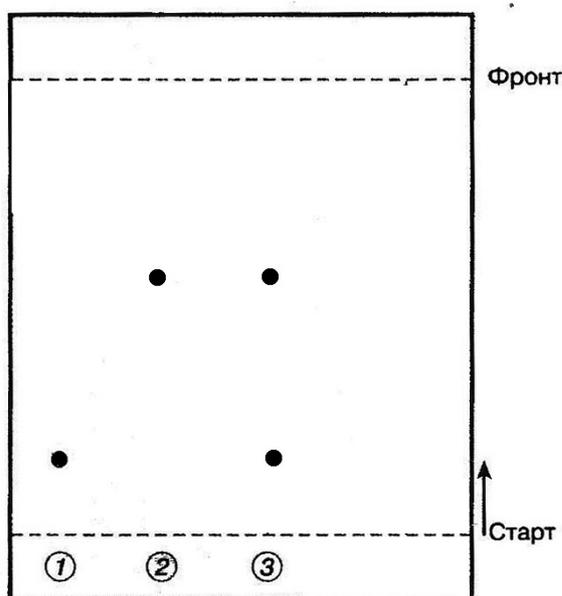


Рис. 8.2. Схема разделения веществ на пластинке с тонким слоем сорбента

Хроматографическую пластинку с нанесенными растворами аминокислот помещают в эксикатор с растворителями и закрывают его крышкой (нужно следить за тем, чтобы растворитель был ниже линии старта). Процесс хроматографирования длится около часа. По истечении указанного срока пластинку высушивают в сушильном шкафу или на электроплитке, покрытой асбестом. Высушенную пластинку опрыскивают с помощью пульверизатора 1%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Затем пластинку нагревают в течение 8 – 10 мин на электроплитке или выдерживают ее в термостате при температуре 110 - 130°C до появления пятен аминокислот. На основании полученных данных вычисляют для аминокислот значения R_f -индексов и сравнивают их между собой; сопоставляют положение пятен аминокислот на закрепленном слое силикагеля с гипсом и на готовых пластинках. Необходимо сделать рисунки хроматограмм и выводы по результатам опыта.

Работа 2. Определение углеводов методом тонкослойной хроматографии

Объекты исследования. Культуральная среда, вода или водный экстракт из клеточной массы.

Оборудование и реактивы. Стеклопластинки размером 13×18 см; стеклянная камера для хроматографирования; сушильный шкаф; эксикатор; силикагель марки КСК; медицинский гипс; борная кислота: $C(\text{борной кислоты}) = 0,1$ моль/л; 20%-ный раствор серной кислоты; 0,2%-ный раствор нафторезорцина в этаноле; метилэтилкетон; атанол; уксусная кислота; пульверизатор.

Выполнение работы

Пластинки для получения тонкослойных хроматограмм получают быстрым нанесением на поверхность стекла смеси толщиной 0,1 - 0,2 мм, состоящей из 6,11 г силикагеля, 0,32 г медицинского гипса и 18 мл борной кислоты: $C(\text{борной кислоты}) = 0,1$ моль/л. Этот набор реактивов используется для приготовления одной пластинки размером 13×18 см. Пластинки с нанесенной массой высушивают на воздухе, а затем нагревают 30 мин в сушильном шкафу для активирования (температура 110°C). До употребления пластинки хранят в эксикаторах, чтобы они не сорбировали влагу.

Культуральную среду или водный экстракт из клеточной массы наносят на хроматограмму в виде тонкой полоски на стартовой линии с последующим высушиванием. Объем исследуемой вытяжки зависит от концентрации углеводов и находится в пределах 1 – 5 мл.

Хроматографирование проводят в системе растворителей метилэтилкетон-этанол-уксусная кислота в соотношении 3:1:1 методом восходящей хроматографии. После подъема растворителей до края хроматограмм пластинки высушивают.

Обнаружение углеводов проводят опрыскиванием пластинки из пульверизатора смесью 20%-ной серной кислоты и 0,2%-ного раствора нафторезорцина в этаноле в соотношении 1:1. Обработанные проявителем хроматограммы высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C до появления пятен. При этом мальтоза окрашивается в красно-коричневый цвет ($R_f - 0,29$), глюкоза - в фиолетовый ($R_f - 0,42$).

Необходимо сравнить состав углеводов у различных объектов исследования, обосновать причины их разного состава, сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. На чем основано разделение веществ методом адсорбционной хроматографии?
2. Каковы методы приготовления закрепленного и незакрепленного слоев сорбентов для тонкослойной хроматографии?
3. Каковы основные этапы анализа смеси веществ методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое?
4. Что такое R_f -индекс, от чего он зависит и как рассчитать величину R_f на хроматограммах?
5. Каковы методы количественного определения веществ с помощью тонкослойной хроматографии?
6. Какова роль тонкослойной хроматографии и каковы сферы ее применения в биологических и экологических исследованиях?

Литература

1. Ахрем А.А., Кузнецова Л.И. Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1965. 110 с.
2. Лейте В. Определение органических загрязнений питьевых, природных и сточных вод. М.: Химия, 1975. С. 95-98, 124, 150-152, 163.
3. Сиренко Л.А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев, 1975. 241 с.
4. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Штала. М.: Мир, 1965. 506 с.
5. Шеллард Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. М.: Мир, 1971. 138 с.
6. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981.
7. Ольшанова К.М. Практикум по хроматографическому анализу. М.: Высшая школа, 1970. С. 73-137.
8. Евгеньева И.И. Планарная хроматография и анализ органических веществ // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 11. С. 50-55.

8.2. Жидкостно-жидкостная (распределительная) хроматография

8.2.1. Теоретические основы метода

В жидкостно-жидкостной хроматографии разделение веществ осуществляется за счет их различной растворимости в подвижной фазе - элюенте и неподвижной фазе, физически сорбированной или химически

привитой к поверхности твердого адсорбента. Следовательно, она основана на распределении веществ между двумя жидкими фазами, одна из которых неподвижна. По форме проведения процесса выделяются два вида распределительной хроматографии - на бумаге и на колонке. Иногда к распределительной хроматографии относят и метод тонкослойной хроматографии. Однако преобладание адсорбции при разделении веществ делает предпочтительным отнесение ее к адсорбционной хроматографии, как это и сделано в настоящем пособии.

Распределительная хроматография стала использоваться с 1941 года, когда А. Мартин и Р. Синдж впервые показали возможность использования для разделения смеси веществ различий в их коэффициентах распределения между двумя несмешивающимися жидкостями и разработали совместно с Р. Консденом и А. Гордоном метод бумажной хроматографии. За разработку распределительной хроматографии А. Мартин и Р. Синдж в 1952 году были удостоены Нобелевской премии.

8.2.2. Хроматография на бумаге

В хроматографии на бумаге используют свойство хроматографической бумаги поглощать воду из атмосферы и задерживать ее между целлюлозными волокнами. Воду можно рассматривать поэтому как один из растворителей, она представляет собой неподвижную фазу. При движении по бумаге под действием капиллярных сил неводного растворителя (подвижная фаза) молекулы вещества распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения. Чем выше растворимость вещества в подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по бумаге вслед за растворителем, и наоборот.

Часто подвижная фаза представляет собой смешивающийся с водой растворитель (например, бутанол). Казалось бы, что в таких случаях разделения не должно происходить, так как имеется только одна фаза. Однако комплекс воды с целлюлозой хроматографической бумаги по свойствам напоминает концентрированные водные растворы полисахаридов. Они не смешиваются с органическими растворителями, в том числе и с теми, которые смешиваются с водой.

Скорость движения веществ определяется величиной коэффициента скорости движения R_f , величина которого зависит от свойств бумаги, температуры, степени чистоты растворителей, однотипности процедур и аппаратуры.

Для проведения хроматографического разделения используют полоски хроматографической бумаги. Существует три сорта этой бумаги, отличающиеся различной толщиной и впитывающей способностью -

медленная, средняя, быстрая. Одномерную хроматографию следует проводить по направлению волокон.

Принцип нанесения веществ на бумажные хроматограммы тот же, что и в ТСХ. Для разделения обычно применяют растворы с концентрацией 0,5 – 1 мг вещества в 1 мл. После подсушивания хроматограммы помещают в камеру с подвижной фазой так, чтобы бумага не касалась стенок камеры и растворитель не доходил до стартовой линии. Хроматографическая камера должна хорошо закрываться, чтобы исключить возможность испарения компонентов подвижной фазы. Хроматограмму вынимают, когда фронт растворителя приблизится к верхней кромке бумаги. После высушивания и соответствующего проявления определяют компоненты. В зависимости от направления распространения элюента на хроматограмме различают восходящую и нисходящую хроматографии.

При восходящей хроматографии бумажную полоску погружают нижним концом в растворитель. По мере продвижения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение веществ. При нисходящей хроматографии верхний конец бумаги с образцом закрепляют в "лодочке" с растворителем, находящейся в верхней части камеры, а нижний конец бумаги опускают вниз так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно растворителем. Роль налитого на дно камеры растворителя заключается в поддержании равновесной упругости паров растворителя в камере. Под действием капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает двигаться вниз по бумажной полосе, в ходе чего и происходит разделение. Восходящая хроматография более проста в работе и применяется чаще, но скорость движения растворителя при нисходящей хроматографии гораздо выше, чем при восходящей.

Для лучшего разделения веществ используют повторное хроматографирование в той или другой системе растворителей. Хорошее разделение сложных смесей веществ достигается при двухмерной хроматографии. В этом случае повторное разделение проводят в направлении, перпендикулярном первоначальному, и в другом растворителе или при сочетании электрофореза с хроматографией во взаимно перпендикулярном направлении (метод "пептидных карт" или "отпечатка пальцев"). Метод пептидных карт применяют чаще всего при сравнительном изучении близких по химическому строению белков.

Для определения местоположения пятен хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают специальными растворами. Использование бумажной хроматографии в препаративных целях ограничено. В тех случаях, когда такое разделение все же производится, участки хроматограмм, содержащие интересное вещество, вы-

резают, а затем элюируют материал с помощью соответствующих растворителей.

Метод хроматографии на бумаге широко используется в биологии для разделения аминокислот, пептидов, углеводов, пигментов, органических кислот и других веществ. Бумажная хроматография применяется и в качестве аналитического метода определения смесей.

8.2.3. Практические работы

Работа 1. Количественное определение аминокислот методом хроматографии на бумаге

Оборудование и реактивы. Хроматографическая бумага марки "Ленинградская медленная"; хроматографическая камера; фотоэлектродетектор; ножницы; пластинки стеклянные (3×32 см) – 3 шт.; держатель для хроматограмм; сушильный шкаф; микропипетки; пробирки с притертыми пробками; бюретка на 25 мл; стандартная смесь аминокислот; испытуемая смесь аминокислот; бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 15:3:7, 1%-ный раствор нингидрина в 95%-ном ацетоне; этиловый спирт (75%-ный), насыщенный медным купоросом.

Выполнение работы

Берут лист хроматографической бумаги размером 18×28 см и на расстоянии 3 см от его короткого края проводят простым карандашом горизонтальную линию. Затем ее делят на неравные отрезки в соответствии с прилагаемой схемой и выделяют стрелками границы нанесения стандартной и испытуемой смесей и делают соответствующие надписи простым карандашом (рис. 8.3.):

Бумагу укрепляют над поверхностью стола и на линию старта, ограниченную стрелками, наносят сначала стандартную смесь при помощи специальной микропипетки тонкой линией, пока весь раствор из микропипетки не будет перенесен на стартовую линию (микропипетку заполняют на 2-3 см). Измеряют массу нанесенного раствора, для чего взвешивают пипетку, заполненную стандартной смесью (до нанесения раствора), и пустую (после нанесения раствора). На бумагу обычно наносят 0,02 - 0,03 г стандартного раствора. Затем заполняют чистую пипетку испытуемой смесью аминокислот (выданной преподавателем для исследования), взвешивают ее и наносят смесь на линию старта с соответствующей пометкой.

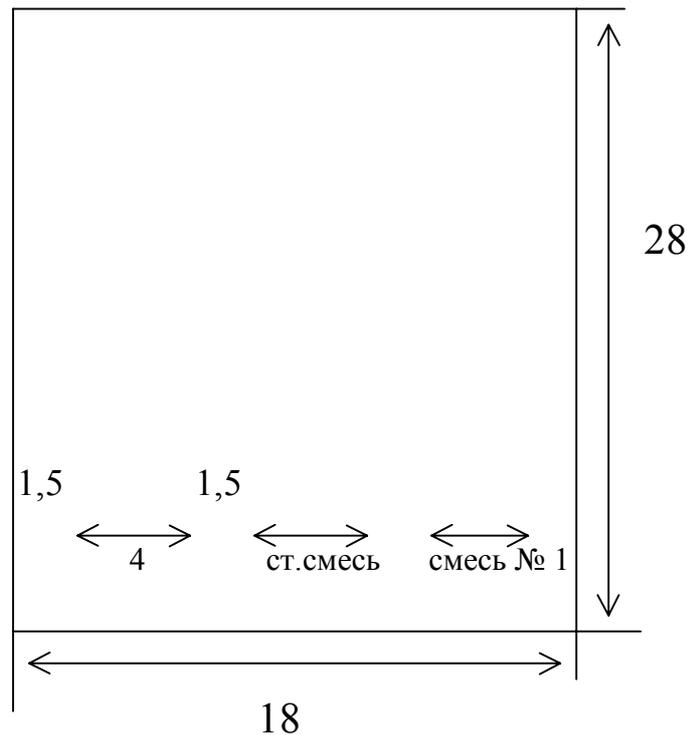


Рис. 8.3.

Схема разметки бумажной хроматограммы

Приготовленную хроматограмму помещают в хроматографическую камеру с предварительно налитой в нее системой растворителей для разделения смеси аминокислот, например, смеси бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 15:3:7. Разделение ведут методом восходящей хроматографии в течение 4 – 5 ч., пока линия фронта не дойдет на 2 – 3 см до верхнего края хроматографической бумаги. После этого хроматограмму вынимают из камеры и верхний конец бумаги немедленно вставляют в держатель, сделанный из трех скрепленных резиновым кольцом стеклянных палочек, и помещают на 20 мин в вытяжной шкаф для удаления из бумаги растворителей.

Высушенную хроматограмму обмакивают в 1%-ном растворе нингидрина в ацетоне для обнаружения на ней положения пятен аминокислот. Затем хроматограмму помещают на 10 мин в вытяжной шкаф для удаления ацетона и переносят в сушильный шкаф, где оставляют ее на 15 мин при 70°C. Аминокислоты стандартной и испытуемой смесей обнаруживают в виде сине-фиолетовых пятен, расположенных цепочкой по направлению движения системы растворителей от линии старта к верхнему краю хроматограммы.

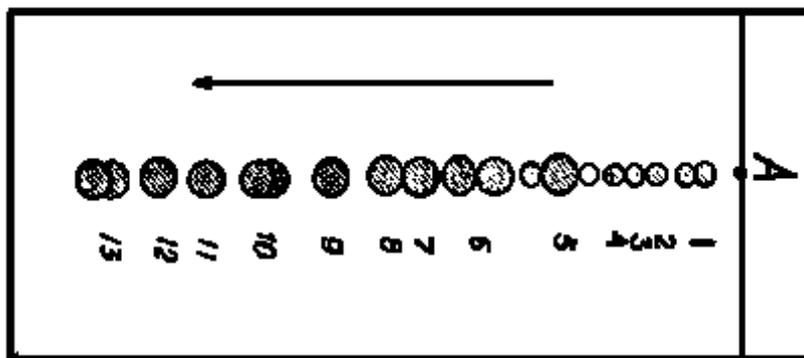


Рис. 8.4. Схема расположения аминокислот на хроматограмме:
 А - точка нанесения смеси аминокислот; 1 - цистин и цистеин;
 2 - лизин; 3 - гистидин; 4 - аргинин; 5 - аспарагиновая кислота, серин и
 глицин; 6 - глутаминовая кислота и треонин; 7 - аланин;
 8 - пролин; 9 - тирозин; 10 - валин и метионин; 11 - триптофан; 12 -
 фенилаланин; 13 - лейцин и изолейцин

Идентификацию аминокислот, содержащихся в испытуемой смеси, ведут по совпадению на хроматограмме позиций, занимаемых аминокислотами стандартной и испытуемой смесей (рис. 8.4.).

Для определения количественного содержания аминокислот в испытуемых смесях хроматограмму расчерчивают простым карандашом так, чтобы лежащие на одном уровне окрашенные зоны, соответствующие одной и той же аминокислоте, оказались заключенными внутри примерно одинаковых прямоугольников (рис. 8.5.).

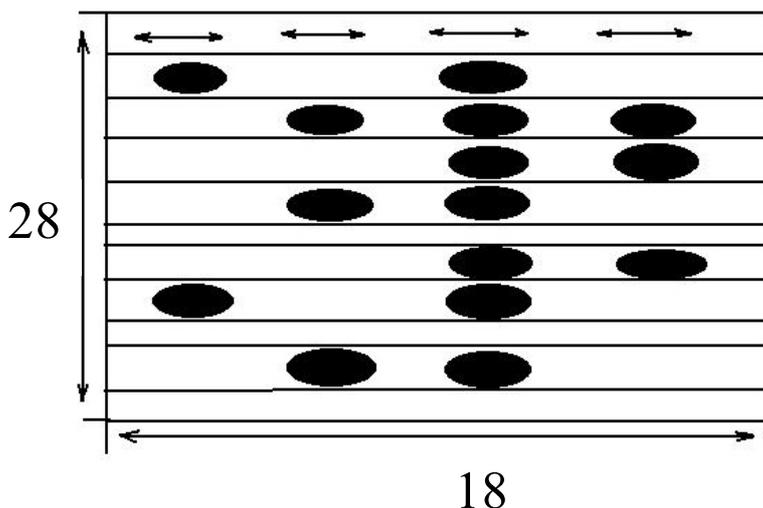


Рис. 8.5. Схема расположения аминокислот на хроматограмме:
 I - смесь № 1; II - смесь № 2; IV - смесь № 3;
 III – стандартная смесь аминокислот

Очерченные участки бумаги вырезают и помещают в пробирки, номера которых должны соответствовать номерам пятен на хроматограммах. В каждую пробирку наливают из бюретки по 10 мл 75%-ного раствора этилового спирта, насыщенного сульфатом меда (к 500 мл этилового спирта добавляют 0,2 мл насыщенного раствора сульфата меди). Пробирку закрывают пробкой и, периодически перемешивая, добиваются полного перехода кирпично-красной окраски (медной соли синефиолетового Руэмана) с бумаги в раствор. На это уходит 15 – 20 мин. Оптическую плотность стандартного и испытуемого растворов измеряют на фотоэлектрокалориметре с зеленым светофильтром (540 нм). В поток сравнения устанавливают кювету с 75%-ным раствором этилового спирта с сульфатом меди.

Количественное содержание аминокислот в исследуемом растворе рассчитывают по соотношению экстинкций исследуемой и стандартной проб.

Пример расчета. Допустим, что в стандартной смеси содержится 1,8 мг глицина в 1 мл, на стартовую полосу нанесено 0,02 г этого стандартного раствора. Следовательно, на хроматограмму поступило $(1,8 \times 0,02) = 0,036$ мг глицина. Условимся далее, что оптическая плотность окрашенных растворов составила 0,288 для стандарта и 0,336 для неизвестной смеси. Тогда содержание глицина в исследуемой смеси, нанесенной на хроматограмму, составит $(36 \times 0,336) : 0,288 = 42$ мкг. Если далее принять, что исследуемая смесь нанесена на хроматограмму и количестве, например 0,0250 г, то содержание глицина в 1 мл исследуемого раствора составит $(42 : 0,0250) = 1680$ мкг, или 1,68 мг/мл.

Оформите результаты собственного эксперимента, сделайте по ним выводы.

Контрольные вопросы

1. На чем основано разделение веществ методом хроматографии на бумаге?
2. Какие существуют виды бумажной хроматографии?
3. Каковы этапы качественного анализа аминокислот методом хроматографии на бумаге?
4. Какова методика количественного определения аминокислот с помощью хроматографии на бумаге?

Литература

1. Королева Е.И., Мешкова В.П. Практическое руководство к занятиям по биохимии животных. М.: Изд-во МГУ, 1972. 90 с.
2. Пасхина Т.О. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге // Современные методы в биохимии. М., 1964. Т. 1. С. 162.
3. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.Л., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975. С. 28-31.
4. Хроматография на бумаге / Под ред. И.М. Хейса и К. Мацека. М., 1962.
5. Шеллард Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. М.: Мир, 1971. 188 с.

8.3. Ионообменная хроматография

8.3.1. Теоретические основы метода

Ионообменная хроматография основана на обратимом стехиометрическом обмене ионов, находящихся в растворе, на ионы, входящие в состав ионообменника. Разделение достигается за счет обратимого взаимодействия анализируемых ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента-ионита. Широкое применение ионообменных процессов в практике началось после создания синтетических ионообменников - так называемых ионообменных смол или ионитов. Используемые ранее естественные ионообменники (различные алюмосиликаты и другие соединения) не обладали достаточной воспроизводимостью свойств, не были химически устойчивыми и поэтому существенного практического значения не имели. Применяемые в настоящее время син-

тетические ионообменники имеют высокую **обменную емкость** и воспроизводимые ионообменные и другие свойства, устойчивы к действию кислот и оснований, не разрушаются в присутствии многих окислителей и восстановителей и т.д. Обычно синтетический ионообменник представляет собой высокомолекулярный полимер, например, поперечно-сшитый полистирол, содержащий различные функциональные группы, которые и определяют наиболее характерные свойства смол. Известны также синтетические неорганические иониты, например, активированный оксид алюминия, гели на основе соединений железа или циркония. Однако, органические ионообменные смолы имеют намного большее применение.

В зависимости от знака заряда функциональных групп ионообменные смолы являются катионитами или анионитами. Катиониты содержат кислотные функциональные группы ($-\text{SO}_3^-$; $-\text{COO}^-$; $-\text{PO}_3^-$), поэтому каркас катионита, несущий фиксированные отрицательные заряды, заряжен отрицательно. Отрицательные заряды каркаса компенсируются положительными зарядами противоионов, так что в целом катионит остается электронейтральным. Однако, противоионы, в данном случае катионы, в отличие от функциональных групп каркаса, обладают подвижностью и могут переходить в раствор в обмен на эквивалентное количество ионов из раствора. Этот обмен приводит к установлению подвижного равновесия между ионами, находящимися в фазе смолы, и ионами в растворителе. Наиболее распространенными катионитами являются сульфокислоты, образованные сульфированными продуктами сополимеризации стирола и дивинилбензола. Это отечественные смолы КУ-2, СДВ-3 и др., иностранные дауэкс-50, амберлит IR-120 и др. Сульфокатиониты характеризуются высокой химической стойкостью и механической прочностью, большой скоростью установления ионообменного равновесия.

Функциональными группами каркаса анионитов являются четвертичные $-\text{NR}_3^+$, третичные $-\text{NR}_2\text{H}^+$ или первичные $-\text{NH}_3^+$ аммониевые, пиридиновые или другие основания, а в качестве подвижных противоионов выступают анионы. Анионообменные смолы получают также путем проведения реакций полимеризации или поликонденсации с использованием различных аминосоединений. Так были получены аниониты АН-1, АН-2Ф, амберлит. Широкое распространение получил полифункциональный анионит ЭДЭ-10П, содержащий амины различной степени замещения, включая четвертичные. Амфотерные иониты или амфолиты способны осуществлять одновременный обмен катионов и анионов.

Взаимодействие ионообменной смолы с раствором электролита включает несколько сложных процессов, наиболее важными из которых

являются собственно ионный обмен, физическая абсорбция ионов и молекул на смоле и набухание смолы за счет поглощения растворителя и проникновения электролита внутрь смолы.

К настоящему времени установлено несколько эмпирических закономерностей, связывающих константы ионного обмена со свойствами ионов. Так, в частности, найдено, что с ростом заряда сродство ионов к смоле увеличивается. С повышением температуры избирательность поглощения несколько уменьшается, хотя этот эффект не очень велик.

Введение в раствор веществ, способных образовывать комплексные соединения с присутствующими ионами, сдвигает равновесие ионного обмена, так как в результате комплексообразования уменьшается равновесная концентрация иона в растворе.

Ионообменная хроматография используется преимущественно для разделения ионов. Количественные определения компонентов после разделения могут быть выполнены любым подходящим методом.

Простейшая методика ионообменного разделения состоит в поглощении компонентов смеси ионитом и последовательном элюировании каждого компонента подходящим растворителем. Например, катионы щелочных металлов легко элюируются разбавленным раствором соляной кислоты (0,1 М HCl).

Известны ионообменные методики для разделения изотопов. Большое практическое значение имеет основанный на ионном обмене процесс деминерализации воды.

Одним из вариантов разделения на ионитах является ионная хроматография. В этом методе используются поверхностно-слойные сорбенты с небольшой емкостью, небольшим размером частиц, повышенное давление на входе в колонку и высокочувствительные детекторы с автоматической записью сигнала. Для ионной хроматографии характерны экспрессность, удобство работы и высокая разделительная способность.

Детекторы ионообменных разделений должны регистрировать концентрацию анализируемых ионов в элюате в присутствии ионов элюента. Особенно широко в ионной хроматографии используют кондуктометрический детектор, являющийся универсальным, так как он реагирует на все ионы в растворе. Применяют также селективные детекторы: электрохимические (полярографический, кулонометрический) и спектрофотометрический.

Методом ионной хроматографии определяют очень многие анионы в питьевой и технической воде, в продуктах технологической переработки, в пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности. Описаны методики определения свыше 70 анионов неорганических и органических кислот, в том числе галогенидов, нитрита, нитрата, сульфата, ацетата. Число определяемых катионов значительно меньше.

Этим методом определяют главным образом катионы щелочных и щелочно-земельных металлов, а также органические катионы замещенных солей аммония. Определение многих других катионов оказывается ненадежным, так как они выпадают в осадок в компенсационной колонке с сильно основной смолой.

Ионная хроматография успешно применяется в анализе объектов окружающей среды (атмосферы, воды и т.д.), в клинических исследованиях и многих отраслях промышленности.

В основу одной из разновидностей жидкостной хроматографии - ион-парной хроматографии положены принципы классической экстракции ионных веществ из водной в органическую фазу в виде ионных пар. Для этого в подвижную фазу добавляется противоион, способный вступать в селективное комплексообразование с анализируемыми компонентами с образованием ионной пары. Основные преимущества такого варианта заключаются в том, что одновременно могут быть проанализированы вещества кислотного, основного и нейтрального характера.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит сущность ионообменной хроматографии?
2. Каковы области применения ионообменной и ионной хроматографии?

Литература

1. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2 ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 357-359.
2. Карцова А.А. Жидкостная хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 11. С. 35-40.

8.4. Проникающая или эксклюзионная хроматография

8.4.1. Теоретические основы метода

Подвижной фазой в проникающей хроматографии является растворитель (жидкость), а неподвижной - та же жидкость, заполнившая поры сорбента (геля), т.е. и подвижную, и неподвижную фазы составляет одно и то же вещество или одна и та же смесь веществ. Гель готовят на основе декстрана, полиакриламида или других природных и синтетических соединений.

Способность молекул анализируемого вещества проникать в растворитель, поглощенный частицами набухшего геля, зависит от степени пористости частиц геля и от размера молекул соединения. Распределение веществ на колонке, заполненной набухшим гелем, зависит от общего объема растворителя внутри и снаружи частиц геля.

Для данного вида геля распределение анализируемого вещества в растворителе внутри и снаружи геля определяется коэффициентом распределения K_d , который зависит от размера молекул вещества. Если молекулы крупные, в растворителе внутри частиц геля их будет мало, величина K_d в этом случае практически равна 0. Если молекулы вещества достаточно малы и могут беспрепятственно проникать внутрь частиц геля, то $K_d = 1$. Поскольку размеры пор варьируют, молекулы среднего размера будут проникать в растворитель, находящийся в порах, лишь частично; следовательно, величина K_d в этом случае будет находиться между 0 и 1. Это позволяет разделять на данном геле вещества, молекулярные массы которых различаются лишь весьма незначительно.

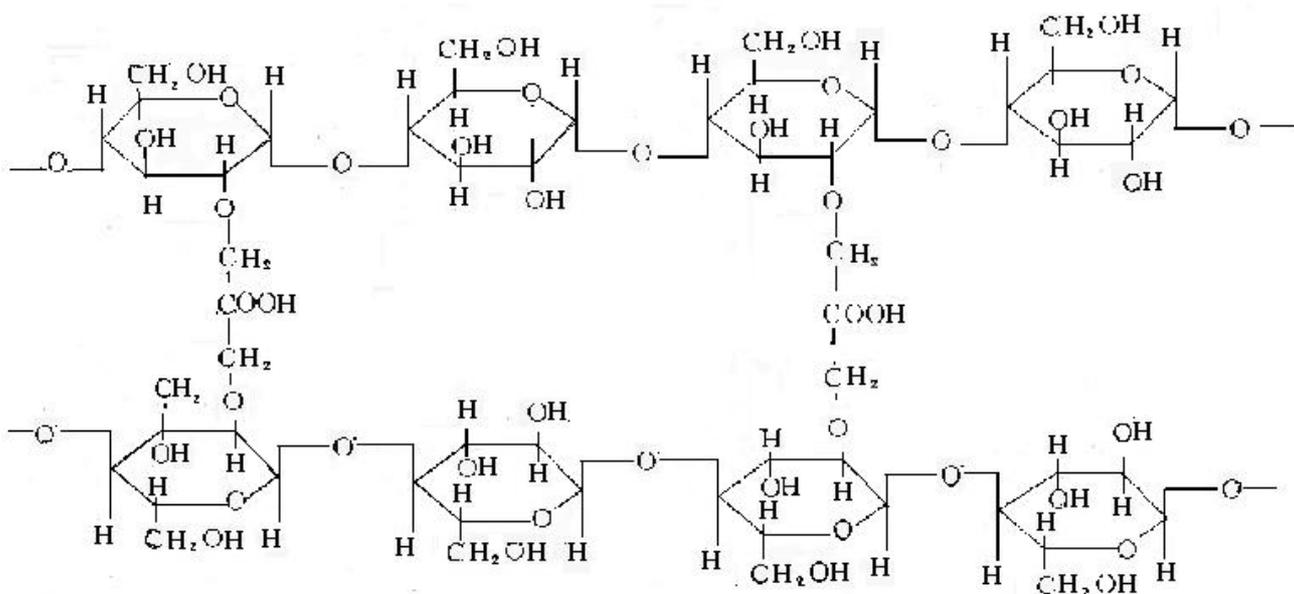
Проникающая (эксклюзионная) хроматография используется для очистки высокомолекулярных биологических соединений. Так проводят очистку и разделение вирусов, белков, ферментов, гормонов, антител, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Этим методом можно отделять аминокислоты от пептидов, фракционировать пептиды, образующиеся в результате гидролиза белков, а также олигонуклеотиды из гидролизатов нуклеиновых кислот. Метод проникающей хроматографии позволяет определять молекулярные массы неизвестных белков, проводить обессоливание белков и концентрирование их растворов, а также удалять фенол из растворов нуклеиновых кислот, моносахариды отделять от полисахаридов и аминокислоты от белков. С помощью этого вида хроматографии в Институте вирусологии в Москве в 1990 году был выделен вирус СПИДа.

8.4.2. Практические работы

Работа 1. Разделение высоко- и низкомолекулярных веществ методом проникающей хроматографии

Наиболее часто в проникающей хроматографии применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой, придающей им свойства гелей. К числу таких соединений относятся декстраны с поперечными сшивками (сефадексы). Сефадексы - это полимер в виде гранул, построенных из молекул бактериального полисахарида декстрана (1,6-глюкана), "сшитых" через определенные промежутки поперечными связками за счет взаимодействия с эпихлоргидрином.

Примерная структура ячейки сефадекса:



Чем больше число поперечных сшивок, тем меньше размеры отверстий молекулярного сита. Сефадексы очень хорошо набухают в воде, растворах солей. Получается гель-сефадекс. В зависимости от степени сшивки молекул декстрана друг с другом различные сефадексы отличаются набуханием гранул сефадекса и пределами эксклюзии (выражаемой значениями молекулярной массы веществ, еще способных входить внутрь гранул сефадекса), в связи с чем и построена классификация сефадексов.

Объекты исследования. Голубой декстран, хромат калия.

Оборудование и реактивы. Трубка с краном размером 20×1,2 см, сефадекс G-25, голубой декстран (или гемоглобин кристаллический), хромат калия.

Выполнение работы

Сефадекс G-25 (4 г) помещают в химический стакан, заливают водой и оставляют набухать при комнатной температуре в течение 3 ч. Колонку укрепляют вертикально в штативе. Ее нижнее отверстие закрывают пробкой из стекловаты (или пористым диском из полиуретана) и наполняют на 1/3 дистиллированной водой. Из стакана с набухшим гелем сливают избыток воды, хорошо перемешивают оставшуюся в нем суспензию (объем около 50 мл) стеклянной палочкой и переносят суспензию в колонку. Нужно следить за тем, чтобы в суспензии не было пузырьков воздуха. Избыток воды из суспензии можно осторожно слить. Следующую порцию суспензии добавляют, не дожидаясь полной усадки слоя сорбента. Когда весь гель окажется в колонке, высота его должна быть около 15 см. Полностью открывают кран колонки и в течение примерно 30 мин промывают (стабилизируют) слой дистиллированной водой. При вводе в колонку растворителя нельзя обнажать поверхность слоя.

Пробу готовят, растворив 5 мг голубого декстрана и 5 мг хромата калия в 1 мл дистиллированной воды (голубой декстран растворяется медленно, лучше его растирать). В колонку добавляют небольшое количество воды, закрывают кран, пипеткой осторожно вводят в нее зеленый раствор пробы (лучше всего по стенкам трубки колонки). Затем открывают кран и после того, как проба впитается в слой геля, промывают остаток одной или двумя порциями по 1 мл воды и заливают колонку доверху водой. Больше воды в процессе данного эксперимента не добавляют. Разделенные фракции собирают в калибровочные пробирки объемом 3 мл. Однородность (чистота) зон разделенных компонентов свидетельствует о том, что колонка приготовлена правильно. Объем воды, требующийся для элюирования голубого декстрана, равен свободному объему колонки.

Работа 2. Разделение белков методом гель-фильтрации через сефадекс

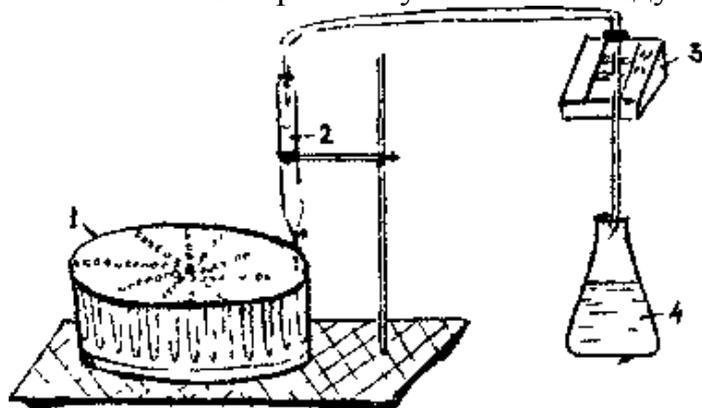
Оборудование и реактивы. Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр; коллектор фракций; колонка для гель-фильтрации; пробирки химические (150 – 200 штук); склянка на 5 л; трубки каучуковые (диаметр 0,5 - 0,7 см); зажим винтовой; насос, сефадекс G-75; хлорид натрия: $C(\text{хлорида натрия}) = 0,09$ моль/л; реактивы для определения белка по

Лоури; яичный альбумин с $M = 45000$, трипсин с $M = 22680$; рибонуклеаза с $M = 13700$.

Выполнение работы

Готовят гель сефадекса. Для этого 25 г сефадекса G-75 предварительно заливают в двухлитровом стакане 1,5 л раствора хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л, хорошо перемешивают и оставляют на 24 ч. Через сутки набухший сефадекс промывают 5 раз раствором хлорида натрия $C(\text{NaCl}) = 0,02$ моль/л путем декантации. Полученным гелем сефадекса заполняют колонку. Заполнение колонки ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно по стенке колонки, что предохраняет от захвата им пузырьков воздуха.

Сразу после внесения сефадекса в колонку создают рабочее давление, подключая к колонке пятилитровую склянку с элюирующим раствором (раствором хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л). Этим раствором немедленно начинают промывку колонки и ведут ее около 12 ч.



*Рис. 8.6. Установка для колоночной хроматографии:
1 - коллектор фракций; 2 - колонка с сефадексом; 3 - насос;
4 - склянка с элюирующим раствором*

Содержание белка в растворе, подлежащем гель-фильтрации, должно быть около 10 мг/мл. Поэтому готовят смесь белков в соотношении: яичный альбумин – 5 мг, трипсин – 3 мг, рибонуклеаза – 2 мг и растворяют ее в 1 мл раствора хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л.

Перед нанесением образца, предназначенного для фракционирования, отключают склянку с элюирующим раствором от колонки. Слегка ослабляют кран колонки и устанавливают уровень элюирующего раствора вровень с поверхностью сефадекса. Осторожно, стараясь ни в коем случае не взмутить верхний слой сефадекса, пипеткой наслаивают 1 мл смеси белков. Ослабляя зажим в нижней части колонки, нанесенный образец вводят в сефадекс и очень осторожно, наслаив по каплям или по стенке при помощи пипетки элюент, подключают к колонке склянку с

раствором хлорида натрия: $C(\text{NaCl}) = 0,09$ моль/л и начинают элюцию (рис. 8.6.).

Собирают фракции по 5 мл при помощи коллектора фракций со скоростью 1 мл в минуту. Элюцию завершают после сбора 30 фракций. Содержание белка по всех исследуемых фракциях можно определять спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность каждой пробы на спектрофотометре СФ-16 при 280 нм или на фотоэлектроколориметре, предварительно проведя цветные реакции по методу Лоури. Строят выходную кривую (рис. 8.7.).

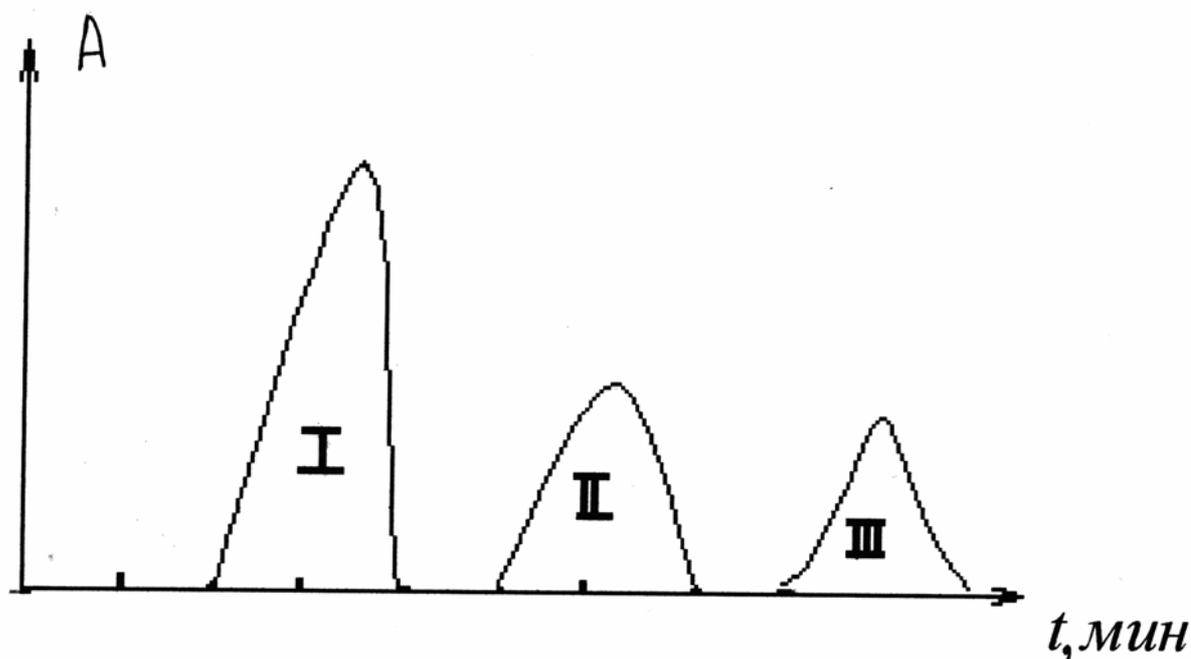


Рис. 8.7. Выходная кривая: A - абсорбция вещества во фракциях, t - время их выхода; I, II, III - белковые фракции

Отчет по работе. Он должен содержать схему прибора, рисунок выходной кривой, построенной по результатам определения количества белков во фракциях на фотоэлектроколориметре.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность метода гель-проникающей хроматографии?
2. Какова структура ячейки сефадекса и чем отличаются различные марки сефадекса?
3. Каков принцип разделения смеси белков с различной молекулярной массой на геле сефадекса?
4. Каковы методы количественной оценки белков во фракциях?

Литература

1. Детерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир, 1970. 253 с.
2. Жидкостная колоночная хроматография: В 3 т. / Под ред. В.Г. Березина. М.: Мир, 1978. Т. 2. 471 с.
3. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по биохимии. М.; Просвещение, 1975. С. 42-45, 75-76.
4. Карцова А.А. Жидкостная хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 11. С. 35-40.

8.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

8.5.1. Теоретические основы метода

Жидкостная хроматография в ее классическом варианте (при атмосферном давлении) и высокоэффективная жидкостная хроматография (при повышенном давлении) используются для определения химически и термически нестойких, нелетучих или очень полярных веществ, но в то же время могут быть применены для анализа веществ, которые обычно определяются с помощью высокоэффективной газовой хроматографии. Начав развиваться с середины 70-х годов, метод ВЭЖХ в первое время существенно проигрывал из-за отсутствия подходящих сорбентов для заполнения колонок. Однако с появлением привитых фаз насадочные колонки стали обеспечивать воспроизводимые результаты, что сделало ВЭЖХ идеальным инструментом для определения большинства пестицидов, включая хлор- и фосфорорганические производные, полиароматических углеводородов, относительно нелетучих высокомолекулярных загрязнителей. С помощью жидкостной хроматографии можно разделять

также белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, красители, полисахариды, взрывчатые вещества, лекарственные препараты, метаболиты растений и животных.

Блок-схема прибора для жидкостной хроматографии представлена на рис. 8.8.

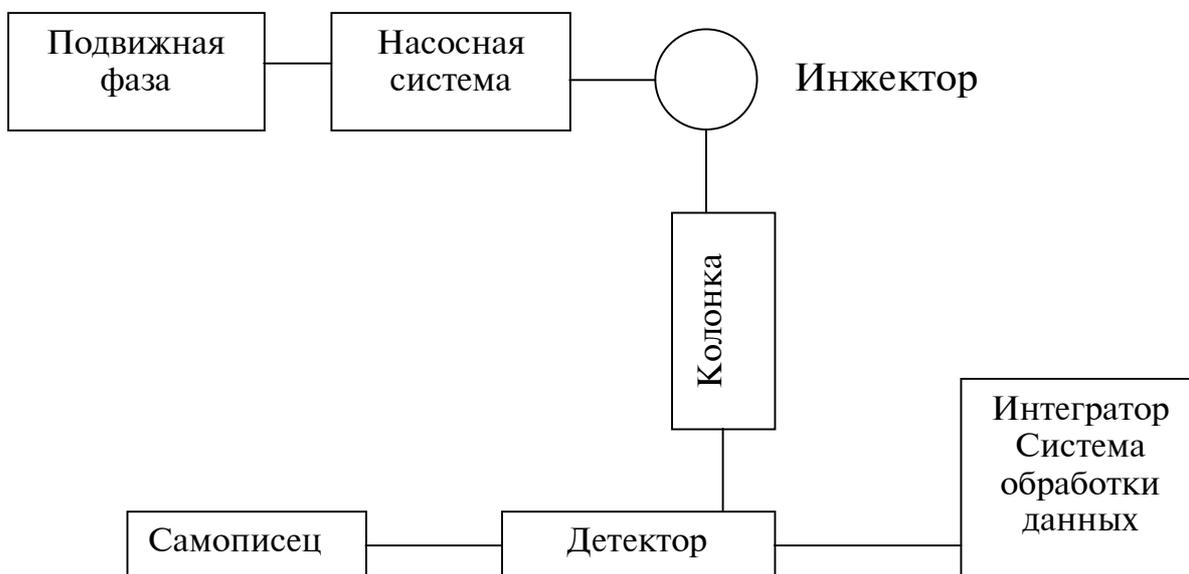


Рис. 8.8. Блок-схема жидкостного хроматографа

Для эффективного хроматографического разделения определяемых компонентов чаще всего применяют колонки длиной до 25 см и внутренним диаметром 4 – 5 мм, заполненные сферическими частицами силикагеля размером от 5 до 10 мкм с привитыми октадецильными группами. Появление в последние годы колонок меньшего диаметра, заполненных более мелкими частицами силикагеля, привело к уменьшению расхода растворителей и продолжительности анализа, увеличению эффективности разделения.

Следует отметить, что колонки для ВЭЖХ довольно дорогие. Поэтому их защищают от загрязнения предохранительным картриджем (предколонкой). Очень сложные смеси лучше предварительно разделять другими методами, а при переходе от одного растворителя к другому следует избегать резких скачков их полярности. Растворы проб и растворители перед вводом в колонку необходимо фильтровать.

Для обнаружения анализируемых веществ в ВЭЖХ широко применяются устройства, работа которых основана на измерении поглощения в ультрафиолетовой области, флуоресценции или электрохимических характеристик. Возможно также сочетание жидкостного хроматографа с масс-спектрометром. Чаще всего применяется УФ-детектор. Он представляет собой высокочувствительный СФ-спектрометр с проточной

микроячейкой, который регистрирует оптическую плотность раствора при определенной длине волны.

На практике часто бывает необходимо проводить измерение на различных длинах волн одновременно, когда определяемые соединения плохо разделяются хроматографически. Высокочувствительная запись спектров стала реальностью с помощью детекторов на диодной матрице, так как это обеспечивает получение аналитических данных с гораздо большей степенью достоверности.

В частности, с появлением УФ-В-детектора на диодной матрице ВЭЖХ стала стандартным методом контроля качества природной и питьевой воды на содержание пестицидов. Известно, что многие из них термически нестабильны, например, производные феноксиуксусной кислоты. Анализируемые вещества извлекают из воды с помощью жидкостной или твердофазной экстракции.

8.5.2. Практические работы

Работа 1. Определение пестицидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Данная методика позволяет определять в воде одновременно 9 гербицидов на основе феноксикислот с пределом обнаружения 20 нг/л при стандартном отклонении 6-10%. Диапазон определяемых концентраций составляет 20-1000 нг/л.

Оборудование и реактивы. Жидкостной хроматограф, колба объемом 1 л, испаритель, воронка, фильтровальная бумага, универсальная индикаторная бумага. Фосфорная кислота, хлорид натрия, этилацетат, безводный сульфат натрия, ацетонитрил, вода, метанол.

Выполнение работы

Пробу воды объемом 1 л подкисляют фосфорной кислотой до $\text{pH} = 2,0$, добавляют 30 г хлорида натрия и экстрагируют последовательно тремя порциями по 100 мл этилацетата. Объединенные экстракты фильтруют через 20 г безводного сульфата натрия, промывают осадок на фильтре двумя порциями по 10 мл этилацетата и удаляют растворитель сначала упариванием до объема 4 – 5 мл в ротационном испарителе, а затем испарением в токе азота. Сухой остаток растворяют в смеси ацетонитрил:вода = 15:85 и вводят 25 мкл пробы в жидкостной хроматограф. Разделение пестицидов осуществляют на колонке 100×4,6 мм Hypersil ODS с градиентом концентрации подвижной фазы (В) от 15 до 55% в течение 22 мин при температуре 45⁰С. В качестве подвижных фаз применяют растворы KH_2PO_4 с $\text{C}(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,005$ моль/л с 0,01% CH_3COOH в во-

де (фаза А) и 0,01% CH_3COOH в смеси ацетонитрил:метанол = 1:1 (фаза В). Параметры детектирования: длина волны 230 нм, ширина полосы 12 нм, длина волны сравнения – 180 нм, ширина полосы сравнения – 80 нм. Идентификацию веществ проводят по временам удерживания и по библиотечным спектрам исследуемых соединений для УФ-диапазона.

В случае твердофазной экстракции пробу воды объемом 2 л подкисляют фосфорной кислотой до $\text{pH} = 2,0$, добавляют 200 г хлорида натрия и пропускают через картридж С со скоростью 1 000 мл/ч. Затем картридж высушивают током азота в течение 20 мин и элюируют определяемые вещества 4 мл ацетона. Элюент испаряют в токе азота до сухого остатка, растворяют в 0,5 мл смеси ацетонитрил-вода в соотношении 15:85 и подвергают хроматографированию. Картридж перед употреблением промывают последовательно 5 мл метанола и 6 мл воды, подкисленной до $\text{pH} = 2$.

Контрольные вопросы

1. На чем основано разделение веществ методом ВЭЖХ?
2. Как построена блок-схема жидкостного хроматографа?
3. Каковы области применения ВЭЖХ?

Литература

1. Карцова А.А. Жидкостная хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 11. С. 35 –40.
2. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. М.: Химия, 1996. С. 270-277.

8.6. Понятие об аффинной или биоспецифической хроматографии

Особое место в жидкостной хроматографии занимает так называемая аффинная, или биоспецифическая, хроматография (от англ. affinity-сродство). Аффинная хроматография основана на исключительной способности биологически активных веществ связывать специфически и обратимо другие вещества. Научные основы метода заложены в 1951 году в США, хотя первые экспериментальные указания на большие потенциальные возможности аффинной хроматографии были получены еще в 1910 году Штаркенштейном, использовавшим крахмал для выделения амилазы. В основе аффинной хроматографии лежит уникальное

свойство биологически активных соединений узнавать строго определенные вещества, в процессе которого реализуется так называемый принцип молекулярного распознавания. Фермент узнает свой субстрат, антиген-антитело, гормон-рецептор.

Процесс разделения веществ с использованием аффинной хроматографии включает несколько самостоятельных этапов. Хроматографическую колонку заполняют носителем, ковалентно связанным с каким-либо биологически активным веществом (лигандом). Лигандами могут служить самые различные соединения: белки, пептиды, аминокислоты, витамины, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, углеводы и многие другие вещества. В качестве носителей в аффинной хроматографии получили широкое распространение гранулированные гели агарозы и полиакриламида (биогель Р), полистирольные смолы с химически активными группами, целлюлоза и ее производные и т.д. Затем через колонку пропускают анализируемую смесь веществ, к одному из которых иммобилизованный лиганд обладает биологическим сродством. Выбирая из смеси требуемое соединение, лиганд образует с ним комплекс. Остальные компоненты пройдут через колонку, не задерживаясь. Специфически адсорбированный компонент может быть освобожден из комплекса изменением природы элюента, рН или ионной силы.

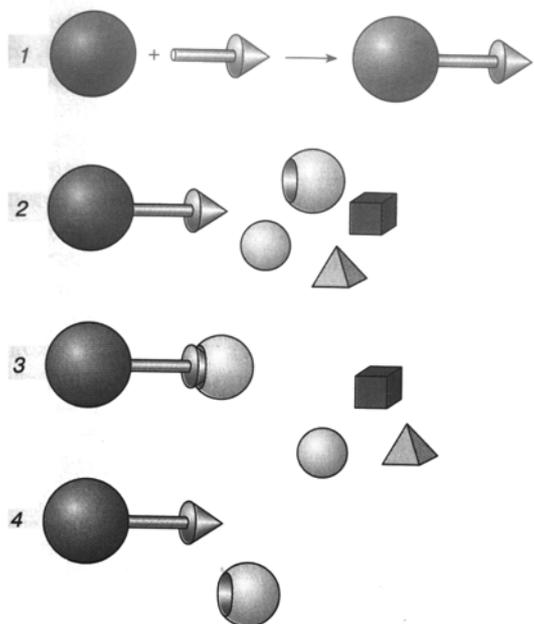


Рис. 8.9. Основные этапы аффинной хроматографии: 1 - подготовка сорбента для аффинной хроматографии: иммобилизация лиганда на поверхности носителя; 2 - адсорбирование в хроматографическую колонку анализируемой смеси; 3 - включение (подача подвешенной смеси), в процессе которого происходит специфическое связывание анализируемого компонента с лигандом; 4 - замена подвешенной смеси для разделения комплекса, выделение связанного компонента, выделение веществ в

Контрольные вопросы

1. На чем основан метод аффинной хроматографии?
2. Каковы основные этапы аффинной хроматографии?

Литература

1. Безвершенко А.И. Аффинная хроматография. Киев: Наукова думка, 1973.
2. Карцова А.А. Жидкостная хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 11. С. 35-40.

Глава 9.

Газовая хроматография

Газовая хроматография - универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся без разложения. Этот метод впервые был реализован в 1952 году Джеймсом и Мартином для разделения летучих жирных кислот.

9.1. Теоретические основы метода

Подвижной фазой в газовой хроматографии является газ или пар. В зависимости от состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на газо-адсорбционную, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент, и газо-жидкостную, когда неподвижной фазой является жидкость, а точнее пленка жидкости на поверхности частиц твердого сорбента. Принцип разделения - неодинаковое сродство органических веществ к летучей подвижной фазе и стационарной фазе в колонке.

В первом случае происходит непрерывное распределение компонентов смеси между движущейся газовой фазой, называемой газом-носителем, и твердым адсорбентом, обусловленное чередованием процессов сорбции и десорбции. Чем хуже вещество сорбируется, тем раньше оно выходит из колонки.

Во втором случае происходит чередование растворения компонента в пленке жидкой фазы, нанесенной на твердый носитель, с обратным выделением в газовую фазу, т.е. в поток газа-носителя.

Твердый носитель, применяемый в газовой хроматографии, должен иметь большую площадь поверхности и однородный размер частиц. Обычно используются частицы размером 0,25 - 0,35 мм.

В то время, как в газо-адсорбционной хроматографии сорбентами служат активные адсорбенты (активированный уголь, силикагель, молекулярные сита), в газо-жидкостной хроматографии применяются твердые инертные носители типа диатомита, используется также фарфор, стекло, пластмассы. Имеются различные типы твердых носителей промышленного изготовления.

Количество твердых фаз все же ограничено, поэтому поверхность твердого носителя часто покрывают тонким слоем жидкости (неподвижная фаза). Обычно применяются жидкости с низкой упругостью паров, химически инертные по отношению ко всем компонентам смеси. Число

жидких фаз, пригодных для хроматографии, во много раз превышает число адсорбентов, что позволяет в каждом отдельном случае подобрать наиболее эффективную жидкость. Последняя может быть твердой при низкой температуре, но обязательно должна быть жидкой и практически нелетучей при температурах, обеспечивающих разделение компонентов смеси.

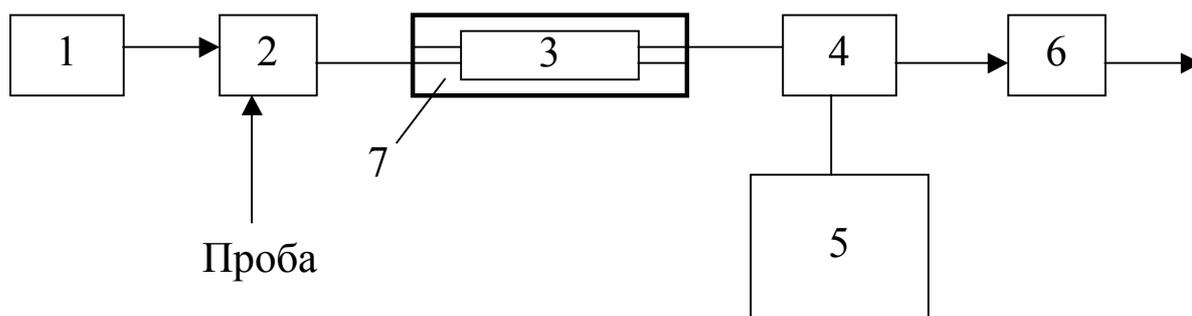
Основной характеристикой жидкой фазы является степень ее полярности. При прочих одинаковых условиях более полярные фазы дают лучшее разделение. Неполярные фазы, как правило, имеют больший молекулярный вес и устойчивы при высоких температурах. Полярные фазы обладают высокой избирательностью, однако они менее устойчивы при повышенных температурах, разлагаясь, могут нарушать процесс разделения. Количество жидкой фазы в процентах к твердому носителю варьирует в широких пределах от 1 до 30 - 50%, что зачастую позволяет влиять на быстроту и качество разделения смесей. Примером неполярной жидкой фазы служит, например, вазелиновое масло. К полярным жидким фазам относятся полигликоли, полиэферы. Обычно для анализа биологических объектов используют силиконовые производные.

При выборе жидкой фазы полезным оказалось старое правило - "подобное растворяется в подобном". В соответствии с этим правилом для разделения смеси двух веществ выбирают жидкую фазу, близкую по химической природе одному из компонентов. Ограниченность такого подхода для веществ с близкими свойствами или смесями сложного состава очевидна. Эффективным оказалось применение колонок, содержащих несколько неподвижных фаз или сложные сорбенты.

Компоненты смеси селективно удерживаются неподвижной фазой, а затем выходят из колонки и регистрируются детектором. Сигналы детектора записываются в виде хроматограммы автоматическим потенциометром (самописцем) или же регистрируются на экране компьютера.

9.2. Аппаратурное оформление газовой хроматографии

Основными узлами газового хроматографа являются источник газаносителя и блок подготовки газов, испаритель, термостат колонок и сами хроматографические колонки, детектор, система регистрации и обработки данных (рис. 9.1.).



*Рис. 9.1. Принципиальная схема газового хроматографа:
1 - газ-носитель, 2 - испаритель, 3 - хроматографическая колонка, 4 -
детектор, 5 - самопишущий регистратор,
6 - измеритель скорости потока, 7 – термостат*

Для точного количественного отбора пробы и введения ее в хроматографическую колонку используют дозатор. Одним из основных требований к дозатору является воспроизводимость размера пробы и постоянство условий ее введения в колонку. Кроме того, введение пробы не должно вызывать резкого изменения условий работы колонки и других узлов хроматографической установки, а внутренняя поверхность дозатора не должна обладать каталитической или адсорбционной активностью по отношению к пробе.

Газообразные и жидкие пробы обычно вводят с помощью специальных шприцев, прокалывая в месте ввода пробы каучуковую мембрану. Применяются газовые шприцы для газообразных проб и микрошприцы для жидких. Микрошприцы позволяют вводить в хроматограф пробы объемом от долей до десятков микролитров. Нередко в лабораторной практике в качестве дозатора применяется медицинский шприц.

Твердые пробы вводятся в хроматограф или после перевода их в раствор или непосредственным испарением пробы в нагретом дозаторе, куда она вводится с помощью игольного ушка. Известны и другие устройства.

Испаритель служит для перевода жидкой пробы в паровую фазу.

Сердце газового хроматографа - хроматографическая колонка. Существует два основных типа колонок: насадочные и капиллярные. Насадочные колонки представляют собой стеклянные или металлические трубки длиной от 1 до 5 м с внутренним диаметром от 1,5 до 5 мм. Они заполнены "насадкой" - твердой основой с нанесенной на нее неподвижной фазой. В качестве твердой основы используются различные пористые вещества, на поверхности которых должна образоваться тончайшая пленка неподвижной фазы.

Можно использовать саму стенку колонки как твердую основу. Тогда речь идет о капиллярной колонке. Технология изготовления капил-

лярной колонки - это нанесение на стенку длинного капилляра из кварцевого стекла (как правило, до 30 м) тончайшего слоя неподвижной фазы. Эта технология позволила существенно улучшить параметры разделения смесей. У капиллярных колонок предпочтение отдают малым диаметрам (0,25 мм). Для выполнения хроматографического анализа необходимо подобрать характеристики колонки. Наиболее важный этап - выбор стационарной фазы. Неподвижная фаза должна соответствовать следующим критериям: химическая стойкость, низкое давление пара в диапазоне рабочих температур колонки, достаточные коэффициенты распределения и селективность по отношению к исследуемым веществам, низкая вязкость.

Использование легких газов-носителей (гелий) ускоряет анализ, а относительно тяжелых (азот) улучшит качество разделения в ущерб скорости. Скорость газа выбирают экспериментально для достижения хорошего разделения компонентов смеси и максимального ускорения времени анализа. Так как характер разделения находится в зависимости от температуры, хроматографическая колонка размещается в программируемом термостате. Разделение смеси веществ с широким диапазоном температур кипения начинают при низкой температуре термостата, а затем программируют постоянное повышение температуры для элюирования высококипящих компонентов. Казалось бы, с увеличением длины колонки и уменьшением скорости передвижения эффективность разделения должна возрастать. Но при этом вещества размываются из-за диффузии. Поэтому существует оптимальный компромисс между эффективностью работы колонки, диффузией и временем анализа.

Эволюция газовой хроматографии во многом - история совершенствования систем детектирования. Детектор фиксирует изменение какого-либо свойства газа-носителя при попадании в поток исследуемого вещества. В настоящее время в газовой хроматографии применяются следующие основные виды детекторов: детектор по теплопроводности (катарометр), пламенно-ионизационный детектор, термоионный детектор, детектор электронного захвата, масс-спектрометр. Кроме того, достаточно широко применяются фотоионизационный детектор, детектор хемилюминесценции, атомно-эмиссионный детектор, спектрофотометрические детекторы.

Одним из наиболее распространенных дифференциальных детекторов является катарометр. Принцип его работы основан на измерении сопротивления нагретой платиновой или вольфрамовой нити, которое зависит от теплопроводности омывающего газа. Количество теплоты, отводимое от нагретой нити при постоянных условиях, зависит от состава газа. Чем больше теплопроводность определяемых компонентов смеси будет отличаться от теплопроводности газа-носителя, тем большей чув-

ствительностью будет обладать катарометр. Наиболее подходящим газом-носителем с этой точки зрения является водород, теплопроводность которого значительно превышает соответствующую характеристику большинства других газов. Однако в целях техники безопасности чаще применяется гелий (азот), теплопроводность которого также достаточно высока. В последнее время металлические нити в катарометре успешно заменяются термисторами, имеющими более высокий, чем у металлов, температурный коэффициент электрической проводимости. Достоинствами катарометра являются простота, достаточная точность и надежность в работе. Однако из-за сравнительно невысокой чувствительности он не применяется для определения микропримесей.

Принцип действия пламенного детектора основан на том, что температура водородного пламени горелки изменяется при попадании в него органических веществ. Наибольшей чувствительностью обладают ионизационные детекторы, например, пламенно-ионизационный (ПИД), позволяющий обнаруживать до 10^{-12} г. В этих детекторах измеряют электрическую проводимость пламени водородной горелки. Чисто водородное пламя обладает очень низкой электрической проводимостью. При появлении в водороде примесей органических соединений происходит ионизация пламени, пропорциональная концентрации примеси, что легко может быть измерено. Высокая чувствительность детекторов этого типа к органическим соединениям обусловила их широкое применение.

Выбор детектора принципиально важен для анализа проб. Критериями выбора являются чувствительность и диапазон применения. Катарометр позволяет определить вещество, содержание которого в пробе составляет $10^{-3}\%$. Чувствительность ионизационных детекторов к органическим веществам значительно выше ($10^{-8}\%$). Для термоионного детектора чувствительность по отношению к фосфорорганическим соединениям возрастает еще на 3 – 4 порядка. Электрозахватный детектор практически нечувствителен к соединениям без атомов галогенов, зато по отношению к полигалогенпроизводным он на 2-3 порядка чувствительнее, чем ионизационно-пламенный детектор. Таким образом, при правильном выборе колонки, детектора и с учетом малого объема пробы предел обнаружения веществ методом газовой хроматографии составляет 10^{-12} - 10^{-13} г, что превосходит многие другие методы анализа.

Применение масс-спектрометра в качестве детектора газового хроматографа явилось событием такого масштаба, что потребовало самостоятельного наименования. Эта разновидность метода называется хромато-масс-спектрометрия. Масс-спектрометр обладает способностью не только зарегистрировать появление в нем разделяемого компонента, но и установить его структуру. Широкое применение хромато-масс-

спектрометров вызвало необходимость создания гигантских библиотек - баз данных масс-спектрометров всевозможных соединений.

Итак, в методе газожидкостной хроматографии широко варьируются температура, скорость газа-носителя, параметры хроматографической колонки, жидкая фаза, тип детектора. Это создает совершенно уникальные условия для решения различных аналитических задач.

9.3. Качественный и количественный анализ

Что такое хроматограмма? Каждому компоненту смеси на хроматограмме соответствует отдельный пик (рис. 9.2.). Время от начала хроматограммы до появления вершины пика называется временем удерживания. При строгом воспроизведении всех условий время удерживания является такой же физико-химической характеристикой вещества, как его плотность, показатель преломления и т.д.

Определение качественного состава смеси проводится путем сопоставления времени удерживания данного компонента и эталона-вещества известной структуры. Совпадение времени удерживания эталона и определяемого компонента может указывать на их идентичность. Эталон чаще всего добавляется в исследуемую смесь (метод метки). При этом число пиков на хроматограмме не должно изменяться, а интенсивность пика одного из компонентов должна увеличиваться.

Определение количественного состава смеси основано на допущении того, что интенсивность пика каждого компонента пропорциональна его содержанию в смеси. В качестве меры интенсивности принимается площадь пиков S . Обычно для этого умножают его высоту (h) на ширину (w), измеренную на полувысоте пика: $S=h \cdot w$. Анализ данных в современных хроматографах автоматизирован. Как правило, полученные данные обрабатываются ЭВМ, сопоставляются с базами данных, подвергаются статистической обработке.

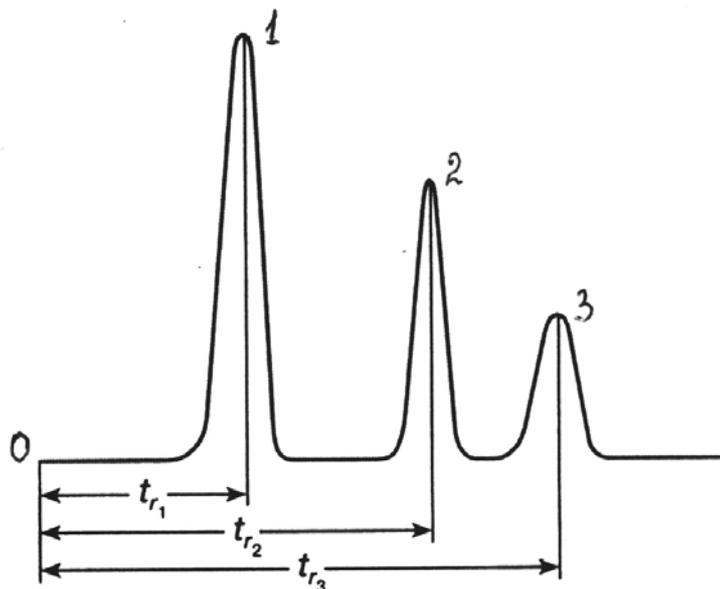


Рис. 9.2. Хроматограмма трехкомпонентной смеси: 0 - момент введения пробы в прибор; 1, 2, 3 - хроматографические пики компонентов смеси; t_{r1} , t_{r2} , t_{r3} – время удерживания компонентов

Основными в количественной хроматографии являются методы: нормировки, нормировки с калибровочными коэффициентами, внутренней стандартизации и абсолютной калибровки.

При использовании **метода нормировки** принимают сумму высот всех пиков или сумму их площадей за 100%. Тогда отношение высоты отдельного пика к сумме высот или отношение площади одного пика к сумме площадей, умноженное на 100, будет характеризовать массовую долю (%) компонента в смеси. Вполне понятно, что такой метод предполагает существование одинаковой зависимости величины измеряемого параметра от концентрации для всех компонентов смеси.

В методе нормировки с калибровочными коэффициентами за 100% принимается сумма параметров пиков с учетом чувствительности детектора. Различие в чувствительности детектора учитывается с помощью поправочных коэффициентов для каждого компонента. Один из преобладающих компонентов смеси считают сравнительным и поправочный коэффициент для него принимают равным единице. Калибровочные коэффициенты (K) рассчитывают по формуле:

$$K_i = S_{ст} / S_i,$$

где $S_{ст}$ - площадь пика стандартного вещества; S_i - площадь пика определяемого вещества.

Концентрация компонентов в анализируемой смеси рассчитывается по формуле:

$$\% = (S_i \cdot K_i / \sum S_i \cdot K) \cdot 100$$

Наиболее точным является **метод абсолютной калибровки**. В этом методе экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочные графики. Далее определяют те же характеристики пиков в анализируемой смеси и по градуировочному графику находят концентрацию анализируемого вещества. Этот простой и точный метод является основным методом определения микропримесей. Кроме того, метод не требует разделения всех компонентов смеси, а ограничивается лишь теми, определение которых необходимо в данном конкретном случае.

Метод внутреннего стандарта основан на введении в анализируемую смесь точно известного количества стандартного вещества. В качестве стандартного выбирают вещество, близкое по физико-химическим свойствам к компонентам смеси. После хроматографирования измеряют параметры пиков анализируемого компонента и стандартного вещества. Если стандартное вещество не входит в состав анализируемой смеси, массовую долю компонента (%) рассчитывают по формуле

$$\omega_i = (S_i / S_{ст}) \cdot r \cdot 100,$$

где S_i и $S_{ст}$ - площади пиков анализируемого компонента и стандарта соответственно; r - отношение массы внутреннего стандарта к массе пробы

9.4. Применение газовой хроматографии

Газовая хроматография находит применение в нефтяной, металлургической, химической, фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности. С повышением экологических требований к среде обитания, продуктам, лекарствам резко возросла роль газовой хроматографии как аналитического метода анализа. Так, этот метод широко используется в настоящее время в анализе органических суперэкоксикантов. Как отмечалось выше, с помощью метода газовой хроматографии определяют хлор-, азот- и фосфорорганические пестициды, полихлорированные и полибромированные бифенилы, нитроароматические соединения и многие другие вещества.

Метод хромато-масс-спектрометрии позволяет определять полихлорированные дибензо-*p*-диоксины, полихлорированные дибензофураны, полихлорированные бифенилы и многие другие высокотоксичные ксенобиотики в природных объектах и биопробах. Кроме того, газовая хроматография используется во многих областях медицины, в гигиене и экологии для определения содержания вредных примесей в воздухе, воде и пищевых продуктах. Этот метод используют также в токсикологии и судебной медицине для диагностики отравлений техническими жидкостями (хлорпроизводными углеводородами, алкоголем и его суррогата-

ми), в фармакологии и фармации для контроля качества препаратов, исследования метаболизма лекарственных средств.

Применение газовой хроматографии в биохимических целях сравнительно долго не получало должной оценки. Считалось, что биологические объекты недостаточно летучи и мало устойчивы к различным физико-химическим воздействиям, применяемым в газохроматографическом анализе. Успехи в разработке методов расщепления липидов, углеводов и белков до более простых компонентов и превращение их в летучие соединения открыли широкую дорогу для применения метода в биохимическом анализе. Особенно велики успехи в исследовании липидов, в особенности жирных кислот. Возможность определения индивидуального состава жирных кислот тех или иных липидов является мощным инструментом в познании структуры и функции биологических мембран, процессов внутриклеточного метаболизма. Газохроматографическое определение спектра карбоновых кислот цикла Кребса внесло большой вклад в понимание процессов метаболизма при различных патологических состояниях. Газовая хроматография используется в медицинской микробиологии и диагностике врожденных нарушений метаболизма. Перспективой применения данного метода является концепция метаболических профилей - систем интегральной оценки метаболизма. С унификацией основных техник газовой хроматографии, ростом чувствительности детекторов станет возможно повседневное использование метаболических профилей в целях практической диагностики.

9.5. Практические работы

Работа 1. Анализ многокомпонентной смеси углеводов методом газо-жидкостной хроматографии

Оборудование и реактивы: Хроматограф; медицинские шприцы на 1 см³; колбы с притертыми пробками объемом 10 мл; толуол; ксилол; ацетон; изопропилбензол; циклогексан; этилацетат.

Задание 1. Анализ смеси компонентов методом нормировки с калибровочными коэффициентами

Выполнение работы

Из компонентов, входящих в состав анализируемой пробы, готовят искусственные (калибровочные) смеси известного процентного содержания (например, смешивают толуол, ксилол, этилацетат и изопропилбензол в объемных соотношениях 1:1:1:1 и т.д.). Смеси составляют в колбочках с притертыми пробками с помощью пипеток, набирая жидкости грушей. Для каждой жидкости необходимо иметь специальную пипетку. Нельзя загрязнять чистые вещества, используя одну пипетку для нескольких жидкостей без тщательной просушки. Анализируемую смесь получают у лаборанта.

Для определения времени удерживания компонентов, входящих в состав смеси, необходимо сначала записать хроматограммы чистых компонентов. Чистые компоненты, искусственные смеси и анализируемую пробу вводят в испаритель хроматографа последовательно в количестве 0,05 мл. Перед каждым отбором проб шприц следует просушить для удаления следов предыдущей пробы. Следующую пробу вводят в испаритель только после записи всех пиков предыдущей пробы. Если проба введена неудачно (когда проба мала, пики получаются низкими, велика - тумблер зашкаливает), анализ пробы следует повторить после выхода всех компонентов. На хроматограммах нужно сделать соответствующие пометки.

Качественный анализ основан на сравнении времени удерживания известных чистых компонентов с временем удерживания веществ, входящих в состав анализируемой пробы.

Количественный анализ. Содержание отдельных компонентов рассчитывают по площадям полученных пиков. Замер площади отдельного пика осуществляется следующим образом: измеряют высоту h от базовой (нулевой) линии до вершины пика, делят ее пополам и на расстоянии, равном половине высоты, замеряют отрезок α - отрезок прямой, параллельный нулевой линии на высоте $1/2 h$. Отрезок замеряют

или по середине ширины линии, вычерченной пером самописца или от внешней стороны одной линии до внутренней стороны другой. Площадь хроматографического пика вычисляют как площадь треугольника: $S=(h/2) \cdot \alpha$ (рис.9.3.).

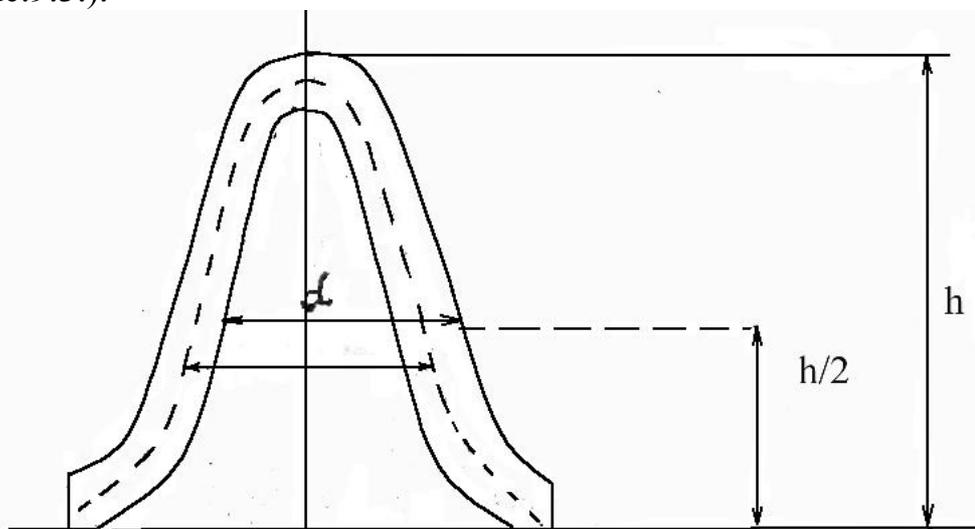


Рис. 9.3. Параметры хроматографического пика

Концентрация компонентов в анализируемой смеси рассчитывается методом нормирования с калибровочными коэффициентами по формуле:

$$\% = (S_i \cdot K_i / \sum S_i \cdot K_i) \cdot 100.$$

Примечание: данный метод расчета процентного содержания компонентов в смеси может быть использован только в том случае, если все компоненты смеси дают хорошо записанные хроматографические пики и имеют различные времена удерживания.

Задание 2. Анализ смеси методом внутреннего стандарта

Преимущество метода внутреннего стандарта заключается в том, что в отличие от предыдущего метода нет необходимости идентифицировать все пики хроматограмм: достаточно определить необходимые пики. Метод основан на добавлении в анализируемую смесь известного количества определенного вещества, называемого внутренним стандартом. При этом стандарт не должен реагировать с компонентами смеси. Например, при анализе смеси гомологов стандарт должен быть членом этого гомологического ряда. Время удерживания стандарта должно быть равно среднему времени удерживания компонентов смеси.

Выполнение работы

После хроматографирования искусственных смесей измеряют параметры пиков анализируемых компонентов и стандартного вещества и строят калибровочные кривые. По оси ординат откладывают отношение площадей пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта, а по

оси абсцисс - отношение объемных или весовых процентных содержаний обоих веществ (рис. 9.4.).

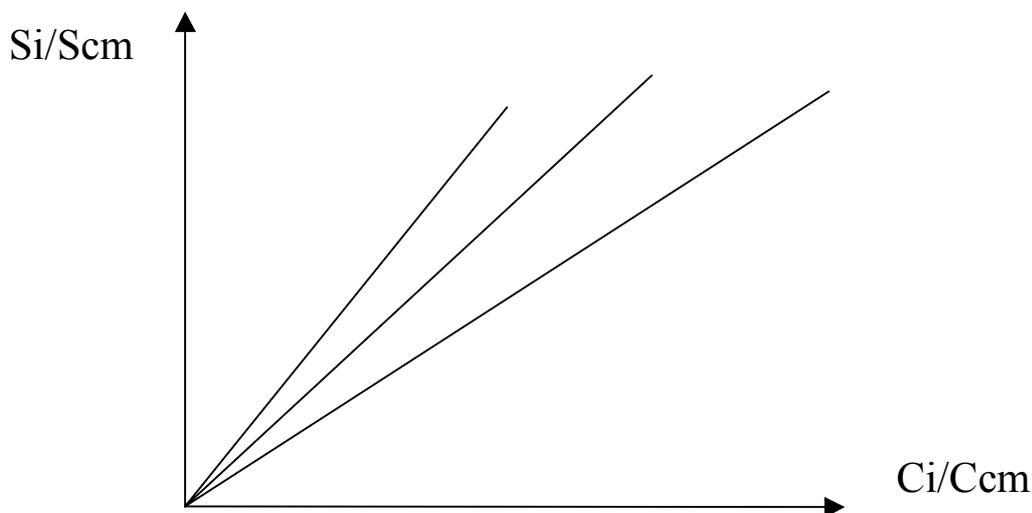


Рис. 9.4. Калибровочные кривые для определения состава смеси

Затем получают у лаборанта анализируемую смесь, содержащую компоненты, для которых были построены калибровочные кривые. Добавляют к этой пробе определенное количество внутреннего стандарта (например, толуола) в таком количестве, чтобы концентрация стандарта соответствовала среднему ее значению в искусственных смесях. Хроматографируют анализируемую смесь и определяют отношение площадей компонентов $S_i/S_{ст}$ для всех компонентов.

Пользуясь калибровочными кривыми (рис. 9.4.), находят отношение ($c_i/c_{ст}$) для всех компонентов и рассчитывают их концентрацию. Если идентифицируются и определяются все компоненты смеси, то можно проверить полученный результат: сумма всех концентраций должна составлять 100 %.

Контрольные вопросы

1. В чем состоят теоретические основы газо-жидкостной хроматографии?
2. Принцип выбора газа-носителя, жидкой фазы, твердого носителя.
3. Неполярные и полярные жидкие фазы.
4. Качественный анализ.
5. Способы количественного обсчета хроматограмм.
6. Зависимость времени удерживания от различных факторов.
7. Принципиальная схема хроматографической установки.
8. Каков принцип работы дифференциальных детекторов?
9. В чем сущность капиллярной газо-жидкостной хроматографии?
10. Каковы области применения газовой хроматографии?

Литература

1. Аранович Г.А., Коршунов Ю.Н., Ляликов Ю.С. Справочник по физико-химическим методам исследования окружающей среды. Л., 1979. 647 с.
2. Яворовская С.Ф. Газовая хроматография - метод определения вредных веществ в воздухе и в биологических средах. М.: Медицина, 1972. С. 5-32.
3. Гольберт К.А., Вигдергауз М.С. Курс газовой хроматографии. М.: Химия, 1974. С. 160-202.
4. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М.: Медицина, 1978. С. 15-85.
5. Зеленин К.Н. Газовая хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 11. С. 20-25.
6. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г. Карцова А.А. Практическая газовая и жидкостная хроматография. СПб.: Изд-во СПбГУ, 1998. 610 с.
7. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. 384 с.
8. Васильев В.П. Аналитическая химия: В 2 ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. С. 327-328.
9. Практикум по физико-химическим методам анализа / Под ред. О.М. Петрухина. М.: Химия, 1987. 248 с.
10. Вольтамперометрия органических и неорганических соединений / Под ред. П.К. Аганесяна, С.И. Жданова. М.: Наука, 1985. 248 с.
11. Кнорре Д.Г., Крылова Л.Ф., Музыкантов В.С. Физическая химия. М.: Высш. шк., 1990. 416 с.
12. Алесковский В.Б., Бардин В.В., Булатов М.И. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство. Л.: Химия, 1988. 376 с.
13. Ольшанова К.М. Практикум по хроматографическому методу анализа. М.: Высш. шк., 1970. 312 с.
7. Галюс З. Теоретические основы электро-химического анализа. М.: Мир, 1974.
14. Каплан Б.Я., Пац Р.Г., Салихджанова Р.М.-Ф. Вольтамперометрия переменного тока. М.: Химия, 1985.
15. Жарский И.М., Новиков Г.И. Физические методы исследования в неорганической химии: Учеб. пособие для вузов. М.: Высш. шк., 1988.

Содержание

<u>ВВЕДЕНИЕ</u>	4
СПЕКТРАЛЬНЫЕ (ОПТИЧЕСКИЕ) МЕТОДЫ АНАЛИЗА	6
ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	7
ГЛАВА 1. АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	9
1.1. ЗАКОНЫ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА	9
1.2. ЭЛЕКТРОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (УЛЬТРАФИОЛЕТОВАЯ И ВИДИМАЯ ОБЛАСТИ).....	12
1.2.1. Механизм поглощения видимых и ультрафиолетовых лучей...	12
1.2.2. Спектры поглощения	14
1.2.3. Устройство приборов.....	17
1.2.4. Практическое применение.....	19
1.2.5. Практические работы	26
Работа 1. Определение хрома дифенилкарбазидным методом	26
Работа 2. Определение концентрации аминокислот спектрофотометрическим методом	27
Контрольные вопросы	28
Литература.....	28
1.3. ИНФРАКРАСНАЯ (КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ) СПЕКТРОСКОПИЯ	29
1.3.1. Элементарная теория колебательных спектров.....	29
1.3.2. Спектры поглощения	30
1.3.3. Возможности метода и практические рекомендации	33
1.3.4. Устройство приборов.....	36
1.3.5. Практические работы	37
Работа 1. Определение строения ароматических соединений по инфракрасным спектрам.....	37
Работа 2. Определение концентрации циклогексанона в циклогексане	38
Контрольные вопросы	38

<i>Литература</i>	39
ГЛАВА 2. ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	40
2.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ и ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА.....	40
2.2. ФОТОМЕТРИЯ ПЛАМЕНИ (ПЛАМЕННАЯ ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ).....	43
2.3. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	44
Работа 1: Определение щелочных и щелочноземельных металлов методом пламенной фотометрии.....	44
<i>Контрольные вопросы</i>	47
<i>Литература</i>	47
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	48
ГЛАВА 3. КОНДУКТОМЕТРИЯ	49
3.1. ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ РАСТВОРОВ ЭЛЕКТРОЛИТОВ	49
3.1.1. Удельная электропроводность	51
3.1.2. Эквивалентная электропроводность	53
3.2. ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ ПРИРОДНЫХ ВОД	55
3.3. КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ	56
3.4. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	58
Работа 1. Анализ кислот и отдельных компонентов их смеси методом кондуктометрического титрования	60
Работа 2. Определение удельной электропроводности воды.....	61
<i>Контрольные вопросы</i>	62
<i>Литература</i>	62
ГЛАВА 4. ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ	63
4.1. ЭЛЕКТРОДНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ	63
4.2. ЭЛЕКТРОДЫ СРАВНЕНИЯ.....	64
4.3. ДИФФУЗИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ	66
4.4. ПРЯМАЯ ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ	67
4.4.1. Водородный показатель и потенциометрический метод определения pH	67
4.4.2. Ионоселективные электроды	70
4.5. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ.....	71
4.6. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА.....	74
4.7. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	75

Работа 1. Анализ кислот и отдельных компонентов их смеси методом потенциометрического титрования	75
Работа 2. Определение нитрат-ионов в техническом образце (фторид-ионов и хлорид-ионов)	77
<i>Контрольные вопросы</i>	79
<i>Литература</i>	79
ГЛАВА 5. ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ.....	80
5.1. КРИВАЯ ТОК-ПОТЕНЦИАЛ	80
5.2. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ ФОН	82
5.3. ДИФФУЗИОННЫЙ ТОК	83
5.4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.....	83
5.5. КАЧЕСТВЕННЫЙ ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	84
5.6. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКАЯ УСТАНОВКА.....	86
5.7. ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЯ С ЛИНЕЙНОЙ РАЗВЕРТКОЙ ПОТЕНЦИАЛА.....	88
5.8. ИНВЕРСИОННАЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ	89
5.9. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ	90
5.10. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	90
Работа 1. Обнаружение ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}	91
Работа 2. Обнаружение ионов Pb^{2+} и Tl^{+}	92
<i>Контрольные вопросы</i>	93
<i>Литература</i>	93
ГЛАВА 6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ.....	94
6.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.....	94
6.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА БУМАГЕ И АЦЕТАТЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ	98
6.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ГЕЛЯХ	99
6.4. ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ.....	102
6.5. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.....	104
6.6. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	104
Работа 1. Фракционирование белков методом электрофореза в полиакриламидном геле	104
<i>Контрольные вопросы</i>	110
<i>Литература</i>	110
6.7. МЕТОД ЭНЗИМЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ	111
6.8. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	111

Работа 1. Обнаружение амилазы в тканях животного происхождения методом электрофореза в полиакриламидном геле	111
<i>Контрольные вопросы</i>	113
Работа 2. Обнаружение арилэстеразы в тканях животного происхождения методом электрофореза в полиакриламидном геле	113
<i>Контрольные вопросы</i>	114
Работа 3. Обнаружение кислой фосфатазы методом электрофореза в полиакриламидном геле	114
<i>Контрольные вопросы</i>	116
<i>Литература</i>	116
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА.....	117
Глава 7. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ХРОМАТОГРАФИИ	117
7.1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ.....	117
7.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	119
7.3. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ХРОМАТОГРАФИИ.....	121
<i>Контрольные вопросы</i>	123
<i>Литература</i>	123
Глава 8. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	124
8.1. ЖИДКОСТНО-АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	124
8.1.1. <i>Хроматография на колонке</i>	124
8.1.2. <i>Тонкослойная хроматография (ТСХ)</i>	125
8.1.3. <i>Практические работы</i>	130
Работа 1. Определение состава смеси аминокислот методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое	130
Работа 2. Определение углеводов методом тонкослойной хроматографии	132
<i>Контрольные вопросы</i>	133
<i>Литература</i>	133
8.2. ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНАЯ (РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ) ХРОМАТОГРАФИЯ	133
8.2.1. <i>Теоретические основы метода</i>	133
8.2.2. <i>Хроматография на бумаге</i>	134

8.2.3. <i>Практические работы</i>	136
Работа 1. Количественное определение аминокислот методом хроматографии на бумаге.....	136
<i>Контрольные вопросы</i>	140
<i>Литература</i>	140
8.3. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ	140
8.3.1. <i>Теоретические основы метода</i>	140
<i>Контрольные вопросы</i>	143
<i>Литература</i>	143
8.4. ПРОНИКАЮЩАЯ ИЛИ ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ.....	144
8.4.1. <i>Теоретические основы метода</i>	144
8.4.2. <i>Практические работы</i>	145
Работа 1. Разделение высоко- и низкомолекулярных веществ методом проникающей хроматографии	145
Работа 2. Разделение белков методом гель-фильтрации через сефадекс.....	146
<i>Контрольные вопросы</i>	149
<i>Литература</i>	149
8.5. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЭЖХ)	149
8.5.1. <i>Теоретические основы метода</i>	149
8.5.2. <i>Практические работы</i>	151
Работа 1. Определение пестицидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	151
<i>Контрольные вопросы</i>	152
<i>Литература</i>	152
8.6. ПОНЯТИЕ ОБ АФФИННОЙ ИЛИ БИОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	152
<i>Контрольные вопросы</i>	154
<i>Литература</i>	154
ГЛАВА 9. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ.....	155
9.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА	155
9.2. АППАРАТУРНОЕ ОФОРМЛЕНИЕ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	156
9.3. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ	160
9.4. ПРИМЕНЕНИЕ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	162
9.5. ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	164
Работа 1. Анализ многокомпонентной смеси углеводов методом газо-жидкостной хроматографии	164

<i>Контрольные вопросы</i>	<i>166</i>
<i>Литература</i>	<i>167</i>