

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Владимирский государственный университет  
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых»

# ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИКО- ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДАМ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ



Владимир 2021

УДК 57.01  
ББК 28.07  
П69

**Автор-составитель Ю. Н. Курбатов**

Рецензенты:

Доктор химических наук, профессор  
зав. кафедрой химии

Владимирского государственного университета  
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевич Столетовых  
*Б. А. Кухтин*

Кандидат биологических наук  
инженер по охране окружающей среды  
ОАО «Владимирский завод “Электроприбор”»  
*А. С. Злышко*

**П69 Практикум по физико-химическим методам исследования в биологии / авт.-сост. Ю. Н. Курбатов ; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых. – Владимир : Изд-во ВлГУ, 2021. – 164 с. – ISBN 978-5-9984-1339-1.**

Подробно рассмотрены основные физико-химические методы исследования, применяемые в биологии, даны теоретические основы, практическая реализация и применение методов для анализа объектов окружающей живой природы. В конце каждой главы дано описание лабораторных работ, приведены контрольные вопросы.

Предназначен для студентов-бакалавров, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология», а также может быть полезен аспирантам, магистрантам, научным работникам, химикам, специалистам-биологам и экологам, занимающимся экологическим мониторингом и вопросами охраны окружающей среды.

Ил. 65. Табл. 11. Библиогр.: 52 назв.

УДК 57.01  
ББК 28.07

ISBN 978-5-9984-1339-1

© Курбатов Ю. Н., 2021

## ПРЕДИСЛОВИЕ

---

Рассматриваются основные физико-химические методы, применяемые в биологических исследованиях, основные типы современных приборов, предназначенных для анализа природных объектов. Даны теоретические основы методов, их реализация и прикладное значение. С целью обеспечения наглядности практикум содержит иллюстрации, рисунки и графики, поясняющие и раскрывающие теоретические основы рассматриваемых методов и объясняющие принцип действия представленных к изучению приборов. Для каждого метода предусмотрены лабораторные работы, даны контрольные вопросы для закрепления материала.

Первая глава посвящена особенностям методов разделения и определения молекулярной массы биополимеров, описаны центрифугирование, хроматографические и электрофоретические методы.

Во второй главе затрагиваются электрохимические методы анализа, такие как потенциометрия, вольтамперометрия, кулонометрия и кондуктометрия.

В последней главе рассматриваются молекулярно-абсорбционные, молекулярно-эмиссионные и рентгенофлуоресцентные виды спектроскопии, а также рефрактометрические методы анализа.

Быстрота, точность, простота операций и высокая чувствительность приведенных методов анализа обеспечивают их повсеместное применение в самых разнообразных отраслях промышленности (химической, фармацевтической, пищевой и т. д.), а также при проведении исследовательских работ в области биологии и экологии.

Автор выражает глубокую признательность научному консультанту заслуженному деятелю науки РФ, д.б.н., профессору зав. каф. биологии и экологии Т. А. Трифионовой за помощь в написании книги.

# Глава 1. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БИОПОЛИМЕРОВ

---

## 1.1. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

### Теоретические основы седиментации в гравитационном и центробежном полях

*Седиментация* – это процесс оседания частиц дисперсной фазы в жидкой или газообразной дисперсионной среде, приводящий к отделению дисперсной фазы в виде осадка.

Частицы веществ, находящиеся во взвешенном состоянии в жидкой или газообразной среде, испытывают воздействие двух противоположно направленных сил – силы тяжести  $F_g$ , стремящейся сконцентрировать частицы в нижних слоях, и выталкивающей (подъемной) силы Архимеда  $F_A$  [49, с. 224]:

$$F_g = V\rho g, \quad F_A = V\rho_0 g \quad (1),$$

где  $V$  – объем частицы,  $\rho$  – плотность вещества частицы,  $\rho_0$  – плотность среды,  $g$  – ускорение свободного падения ( $g = 9,8 \text{ м/с}^2$ ).

Равнодействующая сила, вызывающая седиментацию, равна:

$$F_{\text{сед}} = F_g - F_A = V(\rho - \rho_0)g \quad (2).$$

Седиментации противодействуют сила трения  $F_{\text{тр}}$  (для грубодисперсных систем) или силы диффузии (для высокодисперсных систем и растворов высокомолекулярных соединений). Эти силы пропорциональны скорости движения частиц:

$$F_{\text{тр}} = Bv \quad (3),$$

где  $B$  – коэффициент трения (диффузии),  $v$  – скорость движения частицы.

Вначале частица движется ускоренно, т. к. при малых скоростях сила тяжести превышает силу трения. По мере увеличения скорости движения сила трения возрастает и в некоторый момент уравнивает силу тяжести, вследствие чего частица начинает двигаться с постоянной скоростью, которую при равенстве  $F_{\text{сед}} = F_{\text{тр}}$  можно рассчитать:

$$v = \frac{V(\rho - \rho_0)g}{B} \quad (4),$$

Для сферических частиц  $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ ,  $B = 6\pi\eta r$ ,  $F_{\text{тр}} = 6\pi\eta r v$ ,

где  $r$  – радиус частицы,  $\eta$  – динамическая вязкость среды, и уравнение (4) можно записать в виде

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)g}{9\eta} \quad (5).$$

Согласно уравнению (5) скорость седиментации частицы прямо пропорциональна квадрату радиуса частицы, обратно пропорциональна вязкости среды и зависит от разности  $(\rho - \rho_0)$  так, что при  $\rho > \rho_0$  происходит оседание, а при  $\rho < \rho_0$  всплывание частиц – обратная седиментация. Средне- и грубодисперсные системы (суспензии, эмульсии, пыль) с размером частиц более 0,1 мкм являются седиментационно-неустойчивыми, а частицы высокодисперсных систем и растворов высокомолекулярных соединений (размером от  $10^{-1}$  до  $10^{-3}$  мкм или от 1 до 100 нм) в гравитационном поле оседают очень медленно. Так, частица размером 10 мкм оседает на 1 см в течение 28 с, а частице радиусом 0,01 мкм на прохождение этого расстояния потребуется 323 дня [49, с. 226]. Для осуществления седиментации высокодисперсных систем русский химик А. В. Думанский еще в 1907 г. предложил использовать центробежное поле. Этот способ реализовал в 1923 г. шведский ученый Т. Сведберг, разработавший ультрацентрифугу и с ее помощью впервые определивший молекулярную массу гемоглобина [26, с. 12–13].

*Центрифугирование* – метод разделения, основанный на различии в скорости седиментации коллоидных частиц и макромолекул в центробежном поле. Для расчетов седиментации в центробежном поле применимо уравнение, сходное с обычным седиментационным уравнением (4). Однако поскольку при центрифугировании частицы, постепенно удаляясь от оси вращения, двигаются с переменной все возрастающей скоростью, величина  $v$  заменяется на  $dx/dt$  (где  $x$  – расстояние частицы от оси вращения). В то же время из механики известно, что ускорение в поле центрифуги равно  $\omega^2 x$  (где  $\omega$  – угловая скорость). Тогда уравнение (4) в применении к ультрацентрифуге можно написать следующим образом:

$$\frac{dx}{d\tau} = \frac{V(\rho - \rho_0)\omega^2 x}{B} \quad (6).$$

Отношение скорости седиментации к центробежному ускорению называют *коэффициентом (константой) седиментации* и обозначают через  $S$ :

$$S = \frac{dx/d\tau}{\omega^2 x} = \frac{V(\rho - \rho_0)}{B} \quad (7).$$

Коэффициент седиментации измеряется в сведбергах (1 Сб =  $10^{-13}$ с) и может рассматриваться как мера «седиментируемости» системы. Коэффициент седиментации для молекулы гемоглобина составляет 4,5 Сб (а в целом для белков он изменяется в пределах от 1 до 200 Сб), для молекулы тРНК – 4 Сб, для рибосомы кишечной палочки – 70 Сб, для лизосомы – 9400 Сб [26, с. 13].

Для сферических частиц уравнения (6) и (7) принимают вид:

$$\frac{dx}{d\tau} = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)\omega^2 x}{9\eta}; \quad S = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)}{9\eta} \quad (8).$$

Отношение центробежного ускорения к ускорению свободного падения называется *относительным центробежным ускорением* (ОЦУ), или *фактором разделения*:

$$F_r = \frac{\omega^2 x}{g} \quad (9).$$

Таким образом, например, запись 20 000 g означает, что центробежное ускорение, создаваемое при вращении ротора центрифуги, превышает ускорение свободного падения в 20 000 раз.

## **Практическая реализация и применение центрифугирования**

Лабораторная центрифуга состоит из корпуса и смонтированного в нем ротора (барабана) с электродвигателем и системой управления. Ротор представляет собой устройство для размещения пробирок с центрифугируемым веществом, вращающееся с большой скоростью вокруг своей оси, благодаря чему создается центробежное поле с  $F_r$  до 350 000 и находящиеся в дисперсионной среде частицы смещаются в направлении от оси вращения к периферии при условии, что их плотность превышает плотность среды. Центрифугирование широко применяется для разделения суспензий и эмульсий, в том числе в биологических исследованиях для разделения на фракции гомогенатов тканей.

С целью исследования частиц размером менее 100 нм (макромолекул, органелл животных и растительных клеток, вирусов и др.) используют ультрацентрифуги, центробежные ускорения в которых

могут достигать  $1,2 \cdot 10^6 g$  [47, с. 36]. Методами ультрацентрифугирования можно провести *седиментационный анализ* (определение размеров частиц в высокодисперсных системах и молекулярной массы макромолекул в растворах полимеров по скорости седиментации). Принципиальная схема ультрацентрифуги показана на рис. 1. На приводимую в движение ось центрифуги 1 надет массивный ротор 2, изготовленный из высокопрочных алюминиевых или титановых сплавов и окруженный кожухом 4. В вырезы ротора вставляются прочные кюветы 3. Под нижним окошком кожуха помещен источник света 6, а над верхним окошком кожуха – фотокамера 5. Путем фотосъемки через определенные промежутки времени можно проследить за передвижением границы между слоями концентрированного золя, который появляется в кювете ближе к периферии, и слоя осветлившейся жидкости, появляющегося ближе к оси вращения. По мере центрифугирования первый слой уменьшается, а второй – увеличивается, пока не установится седиментационное равновесие или пока все частицы не осядут на дно [9, с. 77–78]. Для регистрации границ седиментации в современных аналитических ультрацентрифугах вместо обычного фотографирования могут применяться специальные оптические системы, например абсорбционная и рефрактометрическая (шлирен-система). Абсорбционная система регистрирует степень поглощения света раствором в ультрафиолетовой области в зависимости от расстояния от оси вращения. Шлирен-система заключается в том, что при прохождении света через прозрачный раствор, состоящий из зон с различной плотностью, на границе зон происходит преломление света; при этом на фотопластинке, используемой в качестве детектора, появляется пик, по скорости передвижения которого можно судить о скорости седиментации [43, с. 105–106].

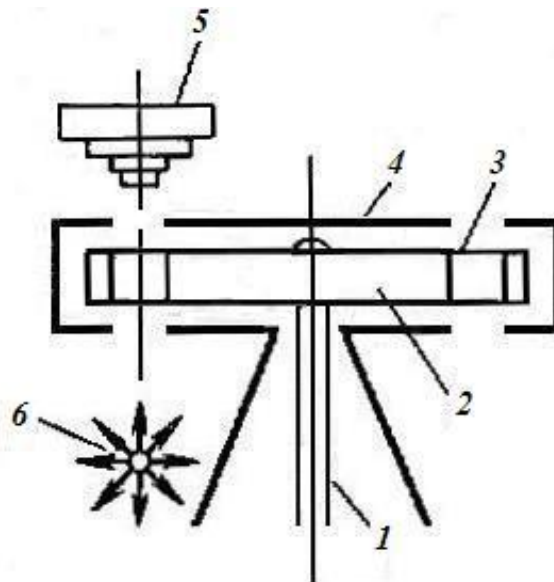


Рис. 1. Принципиальное устройство ультрацентрифуги [9, с. 78]:  
1 – ось, 2 – ротор, 3 – кюветы,  
4 – кожух, 5 – фотокамера,  
6 – источник света

Центрифугирование и ультрацентрифугирование делится на *дифференциальное, зональное и равновесное (изопикническое)*.

В методе *дифференциального центрифугирования* разделяемый материал центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения и / или времени так, чтобы на каждом этапе на дно



Рис. 2. Дифференциальное центрифугирование [43, с. 169]

пробирки осаждалась определенная фракция (рис. 2). Осадив на небольшой скорости самые крупные частицы, супернатант (надосадочную жидкость) осторожно сливают и центрифугируют на более высокой скорости для осаждения частиц меньшего размера. Таким образом, например, при фракционировании гомогенизированной ткани на первой стадии (600 g) оседают ядра и неразрушенные клетки, при 15 000 g можно выделить макросомальную фракцию (митохондрии, хлоропласты, лизосомы), а при 105 000 g – микросомальную фракцию (рибосомы, фрагменты мембран) [46, с. 8].

В методе *зонального центрифугирования* разделяемую смесь наслаивают тонким слоем поверх растворителя. В ходе центрифугирования вещества, различающиеся по константам седиментации, формируют отдельные зоны (рис. 3). По окончании процесса можно проколоть дно пробирки и разлить содержимое в ряд приемников так, чтобы образовавшиеся зоны попали в разные приемники, или отобрать содержимое пробирки через трубочку, опять-таки собирая серию фракций. Для зонального центрифугирования вместо обычных угловых роторов используют бакет-роторы (от англ. *bucket* – «ведро»), в которых пробирки подвешены на шарнирах и разворачиваются по направлению поля от вертикального в начальный момент времени до практически горизонтального при полном наборе скорости (и в обратном направлении при остановке ротора) [24, с. 243].

Чаще всего разделяемую смесь наносят на раствор сахарозы, плотность которого уже в верхнем слое выше, чем плотность вносимого образца и постепенно возрастает в направлении дна пробирки.



Наличие градиента концентрации сахарозы существенно ослабляет диффузионное размывание зон, т. к. если по ходу перемещения зоны какого-либо компонента часть его в результате диффузии опережает движение основной зоны, то она попадает в область с более высокой плотностью растворителя  $\rho_0$  и в соответствии с формулой (7) их перемещение затормаживается, а в случае их диффузии в сторону отверстия пробирки по той же причине их движение ускоряется. В обоих случаях частицы, ушедшие из «своей» зоны в результате диффузии, отбрасываются обратно.

Возможности разделения макромолекул биополимеров резко расширились в связи с применением метода *равновесного (изопикнического)* центрифугирования с использованием в качестве среды растворов хлорида цезия. В этом случае градиент концентрации заранее не создают, поскольку концентрированный (около 6 М) раствор CsCl в мощном центробежном поле сам подвержен слабой седиментации, что и приводит к появлению градиента концентрации. Разделяемые компоненты, плотность которых выше, чем плотность раствора CsCl на мениске, но ниже, чем у дна пробирки, распределяются вдоль градиента плотности на зоны, причем каждая из зон оказывается в той части пробирки, в которой плотность раствора CsCl совпадает с плотностью компонента. Поскольку разность  $(\rho - \rho_0)$  становится равной нулю, то согласно формуле (7) дальнейшая седиментация прекращается и возникает устойчивая зона нахождения компонента (изопикническая точка). Такое центрифугирование требует длительной, обычно на протяжении нескольких суток, работы ультрацентрифуг, но обладает очень высокой разрешающей способностью и особенно успешно применяется при разделении смесей нуклеиновых кислот, даже если они различаются лишь изотопным составом (например, возможно разделение молекул ДНК из микроорганизмов одного вида, выращенных на средах, которые содержали в качестве источника азота соли аммония  $^{14}\text{NH}_4^+$  и  $^{15}\text{NH}_4^+$ ). В молекулярной биологии метод

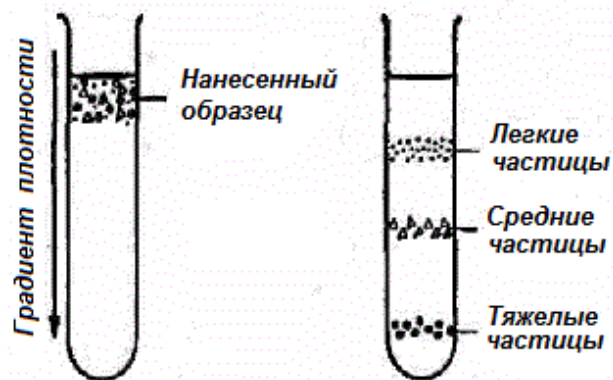


Рис. 3. Зональное и изопикническое разделение частиц в градиенте плотности [43, с. 169]

равновесного центрифугирования в градиенте плотности CsCl был применен для установления полуконсервативного характера репликации ДНК [24, с. 244].

Для определения молекулярной массы биополимеров, в частности белков, используют три варианта седиментационного метода.

В методе *скорости седиментации* измеряют скорость перемещения в ячейке ультрацентрифуги границы растворитель – белок, относя ее к величине развиваемого центробежного ускорения, т. е. находят константу седиментации. Вводя значение экспериментально найденной константы седиментации в формулу, рассчитывают молекулярную массу белка:

$$M_r = \frac{RTS}{D(1-\rho_0/\rho)} \quad (10),$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – температура,  $D$  – коэффициент диффузии,  $\rho_0$  – плотность частиц,  $\rho$  – плотность растворителя. Метод измерения скорости седиментации приводит к ошибочным результатам, если форма частиц сильно отклоняется от сферической [47, с. 36].

В методе *седиментационного равновесия* измеряют концентрацию белка  $c_1$  и  $c_2$  в двух точках ячейки на расстоянии  $x_1$  и  $x_2$  от центра ротора в тот момент, когда после определенного срока работы ультрацентрифуги в ячейке установится седиментационное равновесие, т. е. равенство между числом оседающих и диффундирующих в обратном направлении молекул белка. Расчет молекулярной массы белка ведут по формуле, вводя в нее экспериментально найденные значения  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $x_1$ ,  $x_2$ :

$$M_r = \frac{2RT \ln c_2 / c_1}{(1-\rho_0/\rho)\omega^2(x_2^2 - x_1^2)} \quad (11),$$

где  $\omega$  – угловая скорость, а остальные обозначения те же, что и в формуле (10). По сравнению с предыдущим методом, для которого необходимо гравитационное поле до 400 000 g, здесь достаточно центробежной силы, в 10–15 тыс. раз превосходящей силу земного притяжения. Полученные с помощью метода седиментационного равновесия результаты не зависят от формы частиц, однако для установления этого равновесия требуется продолжительное время [47, с. 36].

Компромиссом между двумя вышерассмотренными методами является *метод приближения к седиментационному равновесию* (ме-

тод Арчибальда), при котором скорость вращения ротора доводится до равновесной на протяжении 1–2 ч путем ряда последовательных подгонок (приближений). Каждый раз при этом измеряют концентрацию белка у дна кюветы. Из этих данных экстраполяцией определяют молекулярную массу белка [7, с. 120].

**Лабораторная работа № 1**  
**ВЫДЕЛЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ**  
**МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ**

Выделение хлоропластов в зависимости от цели дальнейшего исследования производят в неводных растворителях (петролейном эфире или смеси гексана с четыреххлористым углеродом), либо в забуференных водных средах (рН 6,9–8,0), содержащих в качестве изотонического элемента 0,3–0,35 М раствор хлорида натрия или растворы 0,3–0,5 М сахарозы. Дифференциальное центрифугирование позволяет отделить фракцию хлоропластов от других, более тяжелых и более легких компонентов клетки. Для сохранения функциональной активности хлоропластов процедуры выделения ведут при 0–4°C, не допуская прямого попадания света на растворы, содержащие хлоропласты.

**Исследуемый материал:** листья 12–15-дневных проростков шпината или гороха.

**Оборудование и материалы:** лабораторная центрифуга, световой микроскоп, весы, фарфоровые ступки и пестики, мерные цилиндры на 25–50 мл, стеклянные воронки, бумажные фильтры, ножницы, капроновая ткань или марля, центрифужные пробирки.

**Реактивы:** среда выделения – 0,3 М NaCl в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,0<sup>1</sup> (перед работой охладить до 1–2°C).

**Ход работы.** Навеску листьев в 2 г, предварительно охлажденную в течение 20 мин в полиэтиленовом пакете в холодильнике, измельчают ножницами в фарфоровую ступку, погруженную в лед, добавляют 10 мл среды выделения и растирают в течение 1–2 мин. В воронку укладывают смоченную холодной средой выделения капроновую ткань или марлю (в 2–4 слоя) и фильтруют гомогенат в ци-

---

<sup>1</sup> Для приготовления фосфатного буфера (рН 7,0) 30,5 мл 0,2 М раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> смешивают с 19,5 мл 0,2 М раствора NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и разбавляют водой до 100 мл.

линдр, находящийся в воде со льдом. Содержимое цилиндра переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 5 мин при 100 g (800 об/мин).

Супернатант (надосадочную жидкость) осторожно сливают в чистую центрифужную пробирку, а осадок, содержащий обрывки тканей, ядра, разрушенные клеточные стенки и другие фрагменты, отбрасывают. Для осаждения хлоропластов супернатант центрифугируют 15 мин при 1000 g (2500 об/мин). Полученный осадок промывают средой выделения и повторно центрифугируют 15 мин при 1000 g. Осадок хлоропластов суспензируют в 30–40 мл среды выделения.

Определение степени интактности полученных хлоропластов можно осуществить под световым микроскопом ( $\times 900$ ). Хлоропласты типа А (интактные) идентифицируют по удлинённой форме и высокому светопреломлению. Они окружены светлым ореолом, грани внутри них неразличимы. Хлоропласты типа В, частично или полностью потерявшие наружную мембрану и значительную часть матрикса, выглядят более крупными, расплывшимися. Их оптическая плотность не отличается от оптической плотности среды, и они не имеют наружного светового ореола [43, с. 166–170].

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое седиментация и седиментационное равновесие?
2. От каких факторов зависит скорость седиментации частиц в гравитационном и центробежном полях?
3. Что такое коэффициент седиментации и относительное центробежное ускорение?
4. Из каких основных узлов состоят центрифуги и ультрацентрифуги?
5. Каковы области применения центрифугирования и ультрацентрифугирования?
6. Каким образом осуществляется разделение методом дифференциального центрифугирования?
7. В чем заключается метод зонального центрифугирования?
8. В чем заключается метод равновесного центрифугирования?
9. Какие методы центрифугирования применяются для определения молекулярной массы биополимеров?

## 1.2. ХРОМАТОГРАФИЯ

### Теоретические основы хроматографии

*Хроматография* (от греч. χρῶμα – «цвет» и γράφω – «пишу») – совокупность методов разделения, анализа и физико-химического исследования веществ, основанных на использовании сорбционных процессов в динамических условиях.

Открытие метода принадлежит русскому ботанику-физиологу М. С. Цвету, который установил, что считавшийся однородным зеленый пигмент растений – хлорофилл – на самом деле состоит из нескольких веществ. При пропускании экстракта зеленого листа через колонку, заполненную порошком мела, и промывании петролейным эфиром, он получил ряд окрашенных зон, что указывало на наличие в экстракте нескольких веществ (рис. 4). Впервые термин «хроматография» и четко изложенные принципы метода появились в двух статьях Цвета, опубликованных в 1906 году в «Журнале Немецкого ботанического общества» (*Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*). Заметное развитие хроматографических методов началось лишь в 30-е годы XX века.

Сущность хроматографии состоит в многократном повторении актов сорбции и десорбции компонентов смеси при перемещении их в потоке газовой или жидкой *подвижной фазы* вдоль *неподвижной фазы* – твердого вещества (сорбента) или пленки жидкости, нанесенной на твердое вещество. В силу сродства к неподвижной фазе скорость движения выделяемых веществ меньше, чем скорость подвижной фазы. Слабо сорбирующиеся компоненты перемещаются быстрее, чем сильно сорбирующиеся, вследствие чего эти вещества можно отделить друг от друга, после того как они пройдут достаточный путь для такого разделения.

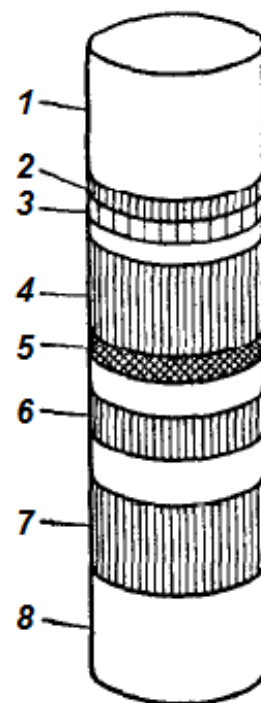


Рис. 4. Хроматограмма хлорофилла по Цвету [37, с. 10]:

1 – бесцветная зона, 2 – желтая (ксантофилл  $\beta$ ), 3 – зеленая (хлорофиллин  $\beta$ ); 4 – синяя (хлорофиллин  $\alpha$ ); 5, 6, 7 – желтые (ксантофилл  $\alpha$ ), 8 – серая (хлорофиллин)

Среди сорбционных процессов различают адсорбцию (физическую адсорбцию и хемосорбцию), распределение веществ между двумя несмешивающимися фазами (растворителем и жидкой фазой на сорбенте) и капиллярную конденсацию – образование жидкой фазы в порах и капиллярах твердого сорбента при поглощении паров вещества [38, с. 235]. В большинстве случаев эти процессы сопровождают друг друга, например, адсорбция является первой ступенью, предшествующей хемосорбции и капиллярной конденсации. Поглощающее вещество называется сорбентом, а поглощаемое – сорбтивом и – в результате процесса – сорбатом.

*Адсорбция* – это концентрирование вещества на поверхности раздела фаз. Адсорбтив стремится занять всю поверхность адсорбента, но этому препятствует противоположный процесс – *десорбция*, вызванная стремлением к равномерному распределению вещества вследствие теплового движения. Согласно теории И. Ленгмюра способностью к адсорбции обладает не вся поверхность адсорбента, а только отдельные ее точки – активные центры, которые характеризуются ненасыщенностью силового поля и вследствие этого удерживают молекулы адсорбтива. Активный центр, адсорбируя одну молекулу адсорбтива, становится неспособным к дальнейшей адсорбции. В результате на поверхности образуется мономолекулярный слой адсорбата [17, с. 68].

Если молекула адсорбата занимает в поверхностном слое площадь  $S_0$ , а число молекул адсорбата составляет  $n$ , то площадь  $\Theta$ , которая приходится на все молекулы, можно выразить в виде

$$\Theta = nS_0 \quad (12).$$

Площадь, свободная от молекул адсорбата, равна  $(1-\Theta)$ .

Для скорости процесса адсорбции  $v_a$  на основании закона действующих масс можно записать:

$$v_a = k_1c(1-\Theta) \quad (13),$$

а для скорости десорбции  $v_d$ :

$$v_d = k_2\Theta \quad (14),$$

где  $k_1$  и  $k_2$  – константы скорости адсорбции и десорбции,  $c$  – концентрация вещества.

В состоянии равновесия  $v_a = v_d$ ,  $k_1c(1-\Theta) = k_2\Theta$  (15).

Решая уравнение (15) относительно  $\Theta$ , заменяя  $k_1/k_2 = b$ , где  $b$  – константа адсорбционного равновесия, получим:

$$\Theta = \frac{bc}{1+bc} \quad (16).$$

В случае предельной адсорбции вся площадь границы раздела занята адсорбированными молекулами. По отношению к выбранной единице площади это можно выразить следующим образом:

$$n_{\infty}S_0 = 1 \quad (17),$$

где  $n_{\infty}$  – число молекул в насыщенном адсорбционном слое.

Используя уравнения (12) и (17), запишем уравнение (16) в виде

$$n = n_{\infty} \frac{bc}{1+bc} \quad (18).$$

Число молекул в ненасыщенном  $n$  и насыщенном  $n_{\infty}$  адсорбционных слоях можно выразить, используя число Авогадро  $N_A$ , через гиббсовскую адсорбцию  $\Gamma$ , которая показывает избыток адсорбата в поверхностном слое по сравнению с его первоначальным количеством в этом слое:

$$n = \Gamma N_A, \quad n_{\infty} = \Gamma_{\infty} N_A \quad (19).$$

В итоге получим уравнение Ленгмюра:

$$\Gamma = \Gamma_{\infty} \frac{bc}{1+bc} \quad (20).$$

График зависимости количества поглощенного вещества от концентрации раствора при постоянной температуре называется *изотермой адсорбции* [17, с. 71–74]. Типичная изотерма адсорбции приведена на рис. 5.

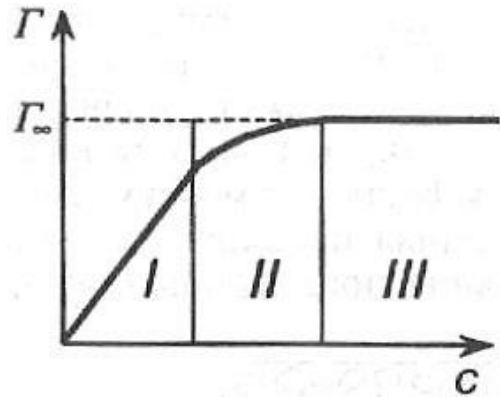


Рис. 5. Изотерма мономолекулярной адсорбции [17, с. 71]

В начале процесса адсорбции (участок I) изотерма линейна: при  $c \rightarrow 0$  и  $bc \ll 1$  уравнение (20) можно записать в виде

$$\Gamma = \Gamma_{\infty}bc \quad \text{или} \quad \Gamma = k_{\Gamma}c \quad (21),$$

где  $k_{\Gamma} = \Gamma_{\infty}b$  – константа Генри, а уравнение (21) отражает закон Генри.

При  $c \rightarrow \infty$  и  $bc \gg 1$  уравнение (20) принимает вид  $\Gamma = \Gamma_{\infty}$ , изотерма выходит практически на прямую, параллельную оси абсцисс (участок III), что характеризует предельную адсорбцию.

К средней части графика (участок II) применимо уравнение Фрейндлиха:

$$\Gamma = kc^{1/n} \quad (22),$$

где  $k$  – коэффициент, численно равный величине адсорбции, когда концентрация адсорбтива равна единице ( $c = 1, k = \Gamma$ ), а коэффициент  $n$  характеризует отличие участка изотермы адсорбции от прямой.

Теория Ленгмюра имеет некоторые ограничения, но ее применимость в теории хроматографических процессов остается широкой.

От физической адсорбции *хемосорбция* отличается необратимостью вследствие возникновения между сорбатом и поверхностью прочной химической связи, т. е. образованием нового химического соединения. К хемосорбционным процессам можно отнести и ионный обмен.

Для характеристики перераспределения вещества между подвижной и неподвижной фазами введен коэффициент распределения:

$$K = \frac{M_s}{M_m} \quad (23),$$

где  $M_s$  – количество вещества (моль или г), которое связалось с неподвижной фазой,  $M_m$  – количество вещества, которое осталось в подвижной фазе после установления равновесия.

Основополагающим в хроматографии является *закон распределения*: при данной температуре для конкретного вещества коэффициент распределения его в системе, состоящей из двух несмешивающихся фаз, есть величина постоянная.

В отличие от адсорбции, выполняемой в статических условиях, или экстракции, также основанной на распределении компонентов между фазами, хроматография является динамическим методом, обеспечивающим многократное повторение актов сорбции – десорбции разделяемых компонентов, т. к. процесс происходит в потоке подвижной фазы. Этим обусловлена более высокая эффективность хроматографических методов [38, с. 261].

## **Классификация хроматографических методов**

Многочисленные хроматографические методы классифицируют по нескольким признакам [27, с. 92–104].

По *агрегатному состоянию подвижной фазы* хроматографию разделяют на *газовую* и *жидкостную*. Газовая хроматография подразделяется на *газожидкостную* и *газотвердофазную*, жидкостная – на *жидкостно-жидкостную*, *жидкостно-твердофазную* и *жидкостно-*



гелевую (второе слово в названиях характеризует агрегатное состояние неподвижной фазы).

По механизму процесса сорбции различают адсорбционную, ионообменную, распределительную, эксклюзионную, аффинную и другие виды хроматографии. Характеристика этих методов представлена в табл. 1 и будет рассмотрена ниже.

Таблица 1

**Классификация хроматографических методов  
по механизму процесса сорбции**

<b>Вид хроматографии</b>	<b>Неподвижная фаза</b>	<b>Подвижная фаза</b>	<b>Природа сорбции</b>
Адсорбционная	Твердая (адсорбент с развитой поверхностью)	Жидкая, газообразная	Физическая адсорбция
Распределительная	Жидкая (на твердом носителе)	Жидкая, газообразная	Распределение веществ между фазами
Ионообменная	Твердая (иониты)	Жидкая	Ионообменная адсорбция
Эксклюзионная (гель-хроматография)	Жидкая (в порах геля)	Жидкая	Нет сорбции (диффузия)
Аффинная	Твердая (аффинант)	Жидкая	Физическая адсорбция за счет биоспецифического взаимодействия

Следует отметить, что классификацию по механизму используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

По технике выполнения различают колоночную и плоскостную хроматографии; плоскостная в свою очередь включает бумажную и тонкослойную хроматографию. В колоночной хроматографии процесс проводится в хроматографических колонках – трубках, наполненных адсорбентом или носителем, содержащим подвижную фазу. В бумажной хроматографии в качестве адсорбента используется специальная однородная бумага, на которую наносят раствор разделяемых компонентов, а в тонкослойной применяют тонкие слои адсорбента, нанесенные на пластинку из инертного материала.

В зависимости от *способа передвижения компонентов* смеси вдоль неподвижной фазы различают три метода хроматографии. Наиболее распространенный *проявительный метод* заключается в том, что смесь веществ сорбируют в верхнем слое неподвижной фазы, а затем через нее пропускают элюент – вещество, сорбирующееся хуже разделяемых компонентов. В ходе элюирования компоненты выделяются отдельными зонами, которые изолированы друг от друга чистым элюентом. *Вытеснительный метод* отличается от проявительного тем, что в качестве элюента применяют вытеснитель – вещество, сорбирующееся лучше разделяемых компонентов. При вытеснении разделяемые компоненты смеси выделяются примыкающими друг к другу зонами, выходящими из колонки в порядке увеличения сорбируемости компонентов. При *фронтальном методе* смесь веществ непрерывно пропускают через неподвижную фазу. Этот метод непригоден для разделения близких по свойствам компонентов и используется обычно для очистки раствора от примесей, если они сорбируются существенно лучше, чем основной компонент, или для выявления из смеси наиболее слабо сорбирующегося вещества [49, с. 213–214].

### **Практическая реализация и применение хроматографических методов**

Для разделения методами хроматографии пользуются, в зависимости от целей, как различными типами специальных приборов – хроматографов, так и простыми установками, которые могут быть собраны в любой химической лаборатории. Основными узлами хроматографической установки являются дозатор (система ввода пробы), хроматографическая колонка и детектор. Кроме того, имеются устройства для подачи газа-носителя или растворителя, для преобразования импульса детектора в соответствующий сигнал и некоторые другие.

Результаты хроматографического разделения смеси веществ регистрируются в виде хроматограммы, которая показывает последовательное расположение компонентов вдоль неподвижной фазы и на выходе из нее, а также их количества. Получение хроматограммы можно рассмотреть на примере газовой хроматографии. Принципи-

альная схема такого прибора показана на рис. 6. Проба анализируемого вещества подается в хроматографическую колонку 2 с помощью дозатора 1, через который пропускают газ-носитель (элюент); обычно пробу вводят в поток газа-носителя шприцем. В колонке 2 компоненты пробы распределяются вдоль слоя сорбента, детектор 3 фиксирует концентрации выходящих из колонки компонентов в потоке газа-носителя. Сигнал детектора регистрируется на ленте самописца 4 или, в современном варианте, – на мониторе компьютера [49, с. 214].

Детектирование может быть интегральным и дифференциальным. При интегральном детектировании фиксируется общее количество компонентов, например, их общий объем. Вследствие малой чувствительности и инерционности интегральные детекторы применяют редко. Дифференциальное детектирование (более чувствительное) позволяет фиксировать концентрацию компонентов. В качестве детекторов

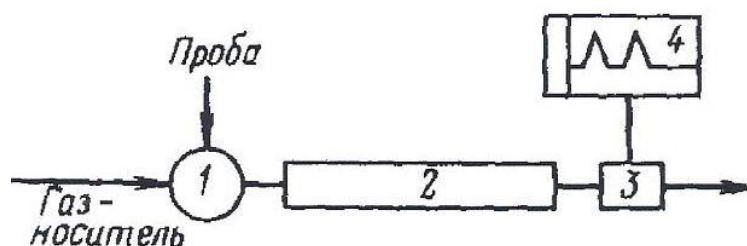


Рис. 6. Принципиальная схема газового хроматографа [11, с. 27]:

1 – дозатор, 2 – хроматографическая колонка,  
3 – детектор, 4 – регистрирующее устройство

наиболее часто используются детекторы по теплопроводности (устаревшее название – катарометры), которые регистрируют изменение теплопроводности газов по изменению электрического сопротивления проводника; пламенно-ионизационные детекторы, измеряющие ток ионизации пламени, в котором сгорает элюент; электрозахватные детекторы, измеряющие ток ионизации, возникающий при прохождении газа мимо источника  $\beta$ -частиц (электронов) и др.

Хроматограмма, регистрируемая самописцем или компьютером, отражает зависимость сигнала детектора от времени пропускания элюента или от его объема. На рис. 7 показаны зависимости сигналов дифференциального и интегрального детекторов, т. е. дифференциальная и интегральная хроматограммы. Линия 1 хроматограммы (нулевая линия) отвечает выходу из колонки чистого газа-носителя. Пик 2 указывает на присутствие в пробе слабо сорбирующейся примеси. Пики 3 и 4 соответствуют компонентам анализируемой смеси. Хроматографический пик ограничен фронтом и тылом. По линии фронта

наблюдается возрастание концентрации вещества со временем до максимального значения, а по линии тыла она со временем уменьшается.

Основными параметрами хроматографического пика являются его высота и ширина, по которым можно рассчитать содержание компонента в смеси. За высоту пика  $h$  принимают расстояние от нулевой линии до максимума пика (или до точки пересечения касательных к линиям тыла и фронта пика  $h'$ ). Ширина пика  $\mu$  определяется как расстояние между тылом и фронтом на половине его высоты. Отношение ширины к высоте пика характеризует степень его размывания. Эффективность разделения определяется отношением расстояния между

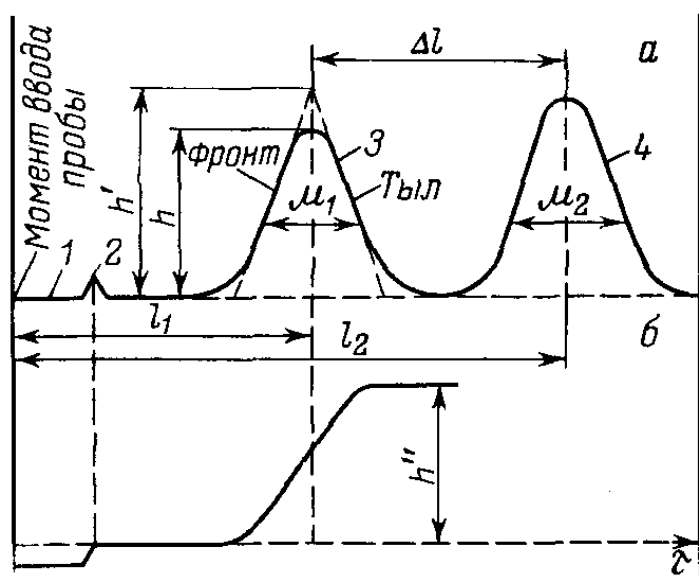


Рис. 7. Дифференциальная (а) и интегральная (б) хроматограммы [11, с. 43]

максимумами хроматографических пиков к сумме ширин пиков (рис. 7):

$$\beta = \Delta l / (\mu_1 + \mu_2) \quad (24).$$

На интегральной хроматограмме изменение нулевой линии, вызванное элюированием компонента, называют ступенью, а разность между высотами двух последовательных нулевых линий – высотой ступени  $h''$ .

Основными хроматографическими характе-

ристиками, с помощью которых можно сделать заключение о качестве разделения компонентов смеси, являются *время удерживания*  $\tau_{уд}$  и *объем удерживания*  $V_{уд}$  [49, с. 217]. Время удерживания – это время от момента ввода пробы до момента регистрации максимума пика на хроматограмме. Объем удерживания – объем элюента, прошедший через хроматографическую колонку за время удерживания. Они связаны друг с другом соотношением:

$$V_{уд} = \omega \cdot \tau_{уд} \quad (25),$$

где  $\omega$  – объемная скорость подвижной фазы (объем газа-носителя, проходящего через сечение колонки за единицу времени).

Для двух разделяемых компонентов 1 и 2 количественными характеристиками разделения могут служить отношение времен удерживания. При условии линейности изотермы адсорбции время удерживания пропорционально константе Генри:

$$\Delta\tau_{\text{уд}} = \frac{Lq}{\omega} \Delta k_{\text{Г}} \quad (26),$$

где  $L$  – длина колонки,  $q$  – количество сорбента на единицу длины колонки.

Таким образом, разность времен удерживания характеризует степень разделения с учетом многократных актов сорбции – десорбции вдоль неподвижной фазы. Важнейшими факторами, влияющими на эффективность разделения, являются длина колонки и скорость элюирования, которые необходимо взаимосвязано оптимизировать. Эффективность разделения должна возрастать с увеличением длины колонки и уменьшением скорости элюирования, однако при этом возрастает роль продольной диффузии, которая приводит к расширению и размыванию хроматографических пиков, и наоборот, короткие колонки и высокая скорость элюирования способствуют сужению и перекрыванию пиков. Если с увеличением длины колонки растет степень разделения, то увеличение ее диаметра приводит, как правило, к ухудшению разделения вследствие конвекционного перемешивания разделяемой смеси.

На эффективность разделения компонентов в хроматографическом процессе влияют и другие факторы. Сорбент должен обладать определенной селективностью, а элюент должен быть инертным по отношению к компонентам и сорбенту, обладать малой вязкостью, обеспечивать высокую чувствительность детектора. Среди адсорбентов наибольшее применение находят активированный оксид алюминия (для разделения веществ в нейтральных и основных растворах), силикагели (при хроматографировании кислых растворов), активированные угли и цеолиты. Эффективность разделения зависит от размеров частиц сорбента и качества их упаковки [49, с. 218–219].

Для количественного хроматографического анализа можно применять различные методы. В методе *простой нормировки* сумму каких-либо параметров пиков, например высот или площадей принимают за единицу (или 100%); тогда отношение высоты отдельного пика к сумме высот или отношение площади одного пика к сумме

площадей, будет характеризовать массовую долю компонента в смеси. В методе *нормировки с калибровочными коэффициентами* за 100% принимается сумма параметров пиков с учетом чувствительности детектора, что выражается поправочными коэффициентами для каждого компонента (один из преобладающих компонентов смеси считают сравнительным и поправочный коэффициент для него принимают равным единице). Наиболее точным является *метод абсолютной калибровки*, когда экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочные графики. Наконец, *метод внутреннего стандарта* основан на введении в анализируемую смесь точно известного количества стандартного вещества, близкого по физико-химическим свойствам к компонентам смеси, но не обязательно являющегося ее компонентом [8, с. 312–313].

Кроме колоночной хроматографии, широко используемой в разнообразных вариантах, получила распространение и *плоскостная хроматография*, особенно ее разновидность – *бумажная хроматография*. Хроматографическая бумага весьма гигроскопична, в ее порах и капиллярах при нормальных условиях удерживается более 20% влаги. На бумагу наносят разделяемую смесь и один край листа опускают в растворитель. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль листа и захватывает разделяемые вещества, скорость переноса которых зависит от их коэффициентов распределения между фазами. Чем больше коэффициент распределения, тем меньше скорость движения. В *восходящей* хроматографии растворитель поднимается снизу вверх, в *нисходящей* передвигается по слою вниз, в *круговой* движется в радиальном направлении от центра к периферии. Бесцветные вещества обнаруживают путем обработки бумаги различными химическими реагентами, образующими при взаимодействии с ними окрашенные пятна, либо применяют физические способы проявления, например, с использованием способности некоторых веществ флуоресцировать под действием ультрафиолетового излучения. Качественный анализ проводят по величинам  $R_f$ , которые определяются отношением расстояния  $l$ , пройденного компонентом от точки старта, к расстоянию  $L$ , пройденному растворителем (рис. 8):

$$R_f = \frac{l}{L} \quad (27).$$

Для проведения количественного анализа участки хроматограмм, содержащие интересующее вещество, вырезают, затем элюируют материал с помощью соответствующих растворителей и проводят определение фотометрическим или иным способом. Впервые хроматография на бумаге была предложена для качественного и количественного определения аминокислот и пептидов, полученных при гидролизе белка. До настоящего времени этот способ пригоден для разделения природных веществ – углеводов, липидов, нуклеотидов и др. [8, с. 330].

*Тонкослойная хроматография* отличается от хроматографии на бумаге тем, что выполняется на тонких слоях различных адсорбентов, наносимых обычно на стеклянные пластинки.

Для разделения биополимеров и низкомолекулярных биологически активных веществ наряду с адсорбционной и распределительной хроматографией широко применяются ионообменная, эксклюзионная и аффинная хроматография.

*Ионообменная хроматография* включает обратимый обмен ионов, содержащихся в разделяемой смеси, на ионы полимерных смол, называемых ионитами и используемых в качестве неподвижной фазы. Катиониты – это вещества кислотного характера, содержащие карбоксильные и сульфогруппы, протоны которых обмениваются на катионы. Аниониты содержат в своем составе группы основного характера, например аминогруппы различной степени замещения. Для ионообменной хроматографии белков и других биологических веществ часто используют иониты на целлюлозной основе, например диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ – анионит) или карбоксиметилцеллюлозу (КМ – катионит) [16, с. 21–22]. Сорбцию можно представить уравнениями:

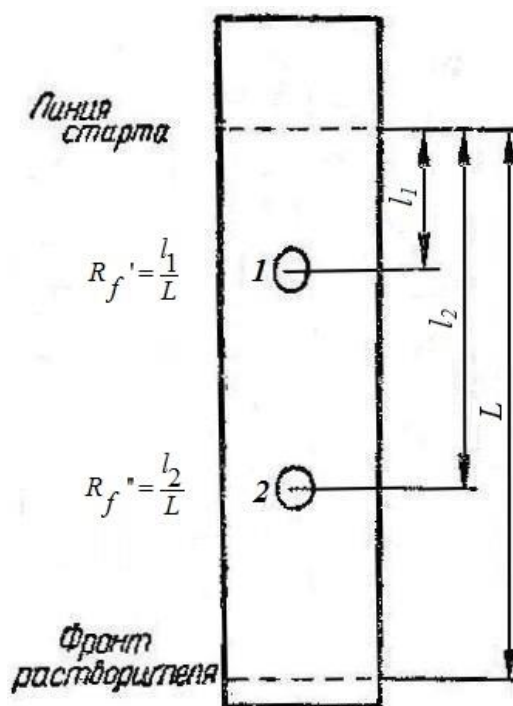
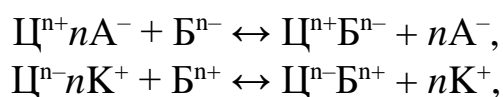


Рис. 8. Определение компонентов на бумажной хроматограмме [37, с. 79].

$l_1, l_2, L$  — путь, пройденный соответственно компонентами 1, 2 и растворителем



где  $\text{К}^+$  и  $\text{А}^-$  – обменивающиеся ионы;  $\text{Ц}^{n-}$  и  $\text{Ц}^{n+}$  – нерастворимые высокомолекулярные ионы катионита и анионита;  $\text{Б}^{n+}$  и  $\text{Б}^{n-}$  – катионная и анионная формы белков.

В буферном растворе с рН 7 функциональные группы в ДЭАЭ-целлюлозе будут заряжены положительно, а у КМ-целлюлозы отрицательно. Если в колонку, наполненную набухшим порошком ДЭАЭ-целлюлозы ввести раствор белка, имеющего при данном значении рН отрицательный заряд, в результате электростатического взаимодействия белок будет удерживаться анионитом. Белки с меньшим суммарным зарядом удерживаются слабее, положительно заряженные вообще не задерживаются и выходят в первой фракции. В результате различия взаимодействий произойдет разделение белков. Для вымывания белков с ионита часто применяют метод градиентного элюирования. Он заключается в том, что в присутствии солей сорбируемость белков снижается, ионы соли вытесняют ион белка или, взаимодействуя с ним, изменяют его электрический заряд. Интервал концентрации нейтральной соли, например  $\text{NaCl}$ , в котором сорбируемость данного белка изменяется от минимальной до максимальной, называется интервалом перехода. Каждый белок имеет свой интервал перехода. Увеличивая постепенно концентрацию соли в элюирующей жидкости, можно смыть с сорбента все белки [42, с. 124–125].

В методе *гель-хроматографии* (синонимы – эксклюзионная, проникающая, ситовая хроматография или гель-фильтрация) используются различия в размерах молекул. Неподвижной фазой является растворитель, находящийся в порах геля (так называемого молекулярного сита), а подвижной – сам растворитель, т. е. и подвижную, и неподвижную фазы составляет одно и то же вещество или одна и та же смесь веществ. В процессе хроматографирования могут быть отделены крупные молекулы, которые гелем не сорбируются, т. к. их размеры превышают размеры пор, от мелких, которые проникают в поры, а затем могут быть элюированы. Для разделения биополимеров выпускаются сита на основе полисахарида декстрана, называемые сефадексами и обозначаемые литерой G и цифрой, которая указывает пределы молекулярных масс веществ, а также сита на основе агарозы (сефароза), акриламида (биогель Р), гликольметакрилата (сферон Р).



После внесения пробы, состоящей, например, из молекул белка и неорганического электролита, колонку начинают промывать очень медленным током чистой воды. Молекулы белка столь велики, что не могут проникнуть в поры геля и медленно проходят через колонку с током жидкости. Ионы, напротив, диффундируют в гель и затем постепенно вымываются из него водой. При этом движение электролита замедляется, и происходит его полное отделение от биополимера (рис. 9). Результатом будет обессоливание белков. После того как и малые молекулы оставят колонку, ее промывают водой, и она снова готова к работе [23, с. 249].

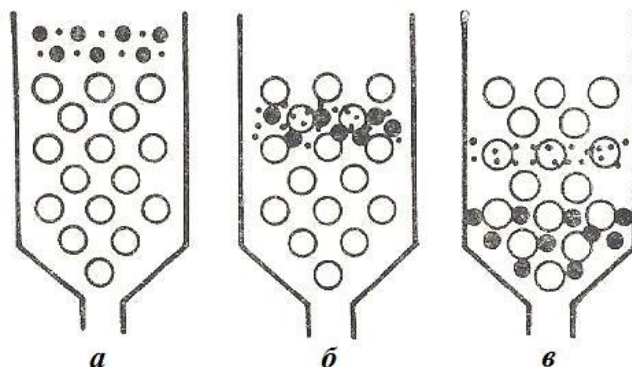


Рис. 9. Разделение двух сортов молекул при гель-хроматографии [47, с. 32]:

а) раствор, наслоенный на гель, б, в) разделение частиц по размеру (малые молекулы проникают внутрь пор геля)

Гель-хроматография является также одним из методов концентрирования растворов биополимеров и определения молекулярных масс. Для вычисления молекулярной массы белка находят объем элюента, необходимого для выноса белка из колонки с гелем сефадекса ( $V_{\text{э}}$ ), и соотносят его со свободным объемом колонки ( $V_0$ ), либо устанавливают длину пробега белка в тонком слое сефадекса на пластинке, дополнительно пропуская вещество, не проникающее в частицы геля, например декстран. Пользуясь калибровочными графиками, построенными по  $V_{\text{э}}/V_0$  или по длине пробега маркерных (т. е. с известной молекулярной массой) белков, находят молекулярную массу исследуемого белка. Молекулярная масса белка связана с отношением  $V_{\text{э}}/V_0$  зависимостью

$$\lg M_r = a - b \frac{V_{\text{э}}}{V_0} \quad (28),$$

а с длиной пробега исследуемого вещества  $l_1$  и декстрана  $l_2$  соотношением

$$\sqrt[3]{\frac{l_2 - l_1}{l_1}} = a - b \sqrt[3]{M_r} \quad (29),$$

где  $a$  и  $b$  – константы, связанные с данным типом геля. Например, для сефадекса G-75 экспериментальным путем получено следующее уравнение для расчета:  $\lg M_r = 5,624 - 0,752 \cdot (V_{\text{э}}/V_0)$  [12, с. 164].

*Аффинная хроматография* по своему существу может быть отнесена к адсорбционной. Адсорбция в данном случае осуществляется за счет биоспецифического взаимодействия между молекулами аффинных лигандов (аффинантов), ковалентно связанными с матрицей, и комплементарными к ним молекулами биологически активных веществ, находящимися в растворе, подлежащем очистке. Например, ферменты образуют комплексы с субстратами или ингибиторами, гормоны – с их рецепторами, антитела – с антигенами (против которых получены), а нуклеиновые кислоты, такие как информационная РНК, гибридизуются с комплементарными ДНК [46, с. 9]. Биоспецифическое взаимодействие отличается исключительно высокой избирательностью. Исследования методом аффинной хроматографии проводят в колонке, наполненной набухшим носителем с нанесенным аффинантом и залитой буферным раствором подходящей ионной силы. В колонку вносят разделяемую смесь; при ее впитывании происходит связывание с аффинантом. После промывания колонки соответствующим раствором для удаления незадерживаемых примесей приступают к элюированию, для чего используют буферные растворы с более высокой ионной силой, т. к. между биополимером и аффинантом имеет место слабое взаимодействие ионного типа. В случае же сильного взаимодействия, например при выделении ферментов, для элюирования применяют субстрат или, если в качестве аффинанта был использован субстрат, берут другой субстрат с более высоким сродством к ферменту.

Метод аффинной хроматографии, широко распространенный в биохимии для выделения белков – ферментов, иммуноглобулинов, рецепторных белков, имеет определенное применение и для разделения малых органических молекул. Среди таких молекул можно назвать витамины и жирные кислоты, которые специфически связываются со специальными транспортными белками, или липиды, где в качестве лиганда используют додециламин.

Очень большой разрешающей способностью отличается *высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)*, когда для ускорения процесса хроматографирования осуществляют под высо-

ким давлением. Этот метод хроматографии позволяет проводить за короткое время микроколичественный анализ веществ в колонках малого сечения на мелкодисперсных сорбентах с использованием высокочувствительных детекторов – флуориметрического, ультрафиолетового, рефрактометрического или масс-спектрометра [27, с. 14].

В настоящее время хроматография – наиболее часто используемый аналитический метод, отличающийся самой высокой степенью информативности благодаря одновременной реализации функций разделения, идентификации и определения [38, с. 260]. Важными преимуществами хроматографии являются быстрота и надежность проведения анализа, возможность работы с макроколичествами и микроколичествами веществ, легкая автоматизация и компьютеризация процесса. Эти достоинства обеспечили широкое применение хроматографии для разделения и аналитического контроля различных смесей, получения высокочистых веществ, физико-химических исследований, мониторинга токсикантов в окружающей среде. Методом газовой хроматографии определяют полихлорированные и полибромированные бифенилы, нитросоединения, полиароматические углеводороды; с помощью тонкослойной хроматографии – пестициды и продукты их метаболизма в почвах, грязевых шламах и воде; метод ВЭЖХ считается одним из наиболее важных в определении следовых количеств пестицидов и полиароматических углеводородов, в анализе пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

## **Лабораторная работа № 2**

### ***РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ЛИСТА МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ***

Хлорофилл – зеленый пигмент растений, состоящий из смеси нескольких пигментов. Для получения вытяжки этих веществ используются полярные растворители, такие как метиловый и этиловый спирты, ацетон и т. д. Но добиться разделения на хроматограмме возможно только с использованием неполярных растворителей (петролейный эфир, бензин, бензол и др.).

***Исследуемый материал:*** спиртовая вытяжка пигментов листа.

***Оборудование:*** фильтровальная бумага, высокий сосуд (мерный стакан или банка), плотно закрытый крышкой, с ниткой, приклеенной

поперек горлышка, линейка, простой карандаш, тонкий капилляр или иные приспособления для нанесения вытяжки пигментов, фарфоровая ступка, пестик, мел или очищенный кварцевый песок, ножницы.

**Реактивы:** очищенный бензин, этиловый спирт.

**Ход работы.** Для анализа берут навеску растительного материала из свежих листьев комнатных растений (5 г), разрезают их и помещают в ступку. Добавляют туда же небольшое количество кварцевого песка или измельченного мела. Листья тщательно растирают, постепенно приливая этиловый спирт (50 мл). После образования кашицы и потери интенсивности окраски остатками листьев, получившуюся смесь фильтруют через воронку в мерный стакан.

Далее берут высокий сосуд с предварительно приклеенной к горлышку ниткой так, чтобы она немного свисала вниз. Наливают в него небольшое количество бензина (1–1,5 см от дна) и закрывают крышкой. **Открывать надолго банку с растворителем нельзя!**

В качестве неподвижной фазы используют полоску фильтровальной бумаги шириной 2–3 см и длиной, соответствующей длине стакана, помещают ее на чистую поверхность и карандашом без сильного нажима чертят горизонтальную линию старта на расстоянии 2 см от края снизу.

Из ранее приготовленной спиртовой вытяжки пигментов отбирают капилляром (или другим приспособлением) небольшую порцию вытяжки и переносят ее на линию старта на фильтровальной бумаге. Далее бумага подсушивается на воздухе. Процедура нанесения пигментов на линию старта повторяется еще 5–6 раз для более полной их концентрации. В итоге этих манипуляций должна получиться тонкая полоса зеленого экстракта.

Фильтровальную бумагу с нанесенными пигментами сгибают поперек в верхней части и подвешивают на нитке в сосуд с бензином так, чтобы нижний край бумаги касался растворителя, но полоса экстракта (линия старта) оказалась выше его уровня. Затем плотно закрывают стакан крышкой, не допуская испарения паров бензина в помещение. Выдерживают смесь до полной разгонки пигментов.

После того, как окрашенные пятна перестали смещаться вдоль фильтровальной бумаги, достают ее из сосуда (который вновь закрывают крышкой). Простым карандашом отмечают линию фронта (границу, до которой поднялся растворитель), а также границы пятен

пигментов. Обозначают пигментные пятна цифрами (в порядке от фронта к старту). Линейкой измеряют расстояния, пройденные растворителем и пятнами изучаемых веществ. Для каждого из пигментов по формуле (27) рассчитывают значение  $R_f$  и заполняют табл. 2 [37, с. 28–30].

Таблица 2

Пигменты листьев исследуемого растения

№ пятна	Цвет пятна	Значение $R_f$	Название пигмента

**Лабораторная работа № 3**  
**РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ**  
**КРУГОВОЙ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**  
**НА БУМАГЕ**

Радиальную хроматографию проводят на бумаге в чашке Петри. Скорость движения аминокислот по бумаге соответствует их коэффициентам распределения между водной (неподвижной) и органической (подвижной) фазами растворителя. Аминокислоты с полярными радикалами движутся медленнее, чем аминокислоты с неполярными (гидрофобными) группами, которые выталкиваются водой и увлекаются органической частью растворителя. В результате этого смесь аминокислот по окончании хроматографического разделения оказывается на разном расстоянии от линии старта. Аминокислоты обнаруживаются после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции.

**Оборудование:** чашки Петри, хроматографическая бумага, стеклянные капилляры, пульверизатор, электроплитки или термостат, ножницы, линейка, циркуль.

**Реактивы:** растворы аминокислот<sup>1</sup>, растворитель: бутиловый спирт – уксусная кислота – вода (20:5:25)<sup>2</sup>; 0,5%-ный раствор нингидрина в 95%-ном водном растворе ацетона, сульфат никеля.

<sup>1</sup> 5 мг аминокислоты растворяют в 5 мл 10%-ного изопропилового спирта, подкисленного соляной кислотой. Для приготовления анализируемого раствора смешивают по 0,5 мл растворов аминокислот.

<sup>2</sup> В делительной воронке встряхивают 20 мл бутилового спирта, 25 мл воды и 5 мл ледяной уксусной кислоты. Когда смесь отстоится, нижний слой сливают и отбрасывают, а для работы используют верхний слой, который хранят в склянке с притертой пробкой.

**Ход работы.** Перед началом работы необходимо вымыть руки с мылом, чтобы на бумаге при опрыскивании раствором нингидрина не проявлялись пятна от рук. Надписи на бумаге делают простым карандашом.

Из хроматографической бумаги вырезают круг, диаметр которого на 1,5 см больше диаметра чашки Петри. Двумя линиями, проведенными карандашом через центр, круг делят на четыре сектора, которые по краям нумеруют цифрами 1, 2, 3 и 4. Из центра круга циркулем проводят окружность диаметром 1,5–2 см. В каждом секторе на окружности отмечают места для нанесения пробы. Быстрым прикосновением капилляра к бумаге в отмеченные точки в секторах № 1, 2 и 3 наносят капли растворов известных аминокислот («свидетелей»), а в точку в секторе № 4 – каплю исследуемой смеси. На бумаге должно оставаться пятно диаметром не более 3–4 мм. Для каждого раствора должен быть отдельный капилляр. После нанесения раствора бумагу сушат на воздухе около 10 мин и снова наносят капли всех растворов в те же точки. Эту операцию повторяют 3–4 раза.

В центре круга делают отверстие, куда вставляют фитиль (трубочку, скрученную из фильтровальной бумаги). Хроматограмму укладывают на половину чашки Петри, в которую предварительно наливают 10–15 мл растворителя, так, чтобы фитиль располагался в центре и был погружен в раствор. Для уменьшения испарения растворителя хроматограмму накрывают второй половиной чашки, добиваясь совмещения краев чашек.

После того как растворитель дойдет почти до краев бумажного круга, хроматограмму снимают, удаляют фитиль и высушивают с целью устранения растворителя и фиксации аминокислот.

Хроматограмму проявляют опрыскиванием из пульверизатора раствором нингидрина, который должен лишь смачивать хроматограмму, но не стекать с нее. После этого хроматограмму вновь высушивают – в термостате или над нагретой электроплиткой – до полного развития окраски комплексов аминокислот с нингидрином. Для за-

крепления пятен на бумаге хроматограмму можно смочить раствором сульфата никеля.

Для каждой аминокислоты рассчитывают величину  $R_f$  по формуле (27), находя отношение расстояния (мм), пройденного аминокислотой от точки старта до середины ее пятна к расстоянию от точки старта до фронта растворителя. Идентификацию аминокислот, содержащихся в смеси, проводят сравнением их позиций на хроматограмме с позицией «свидетелей», по однородности окраски пятен и по совпадению величин  $R_f$  (табл. 3) [37, с. 109–118].

Таблица 3

**Величины  $R_f$  аминокислот в растворителе  
бутиловый спирт – уксусная кислота – вода [14, с. 389]**

<b>Аминокислоты</b>	<b><math>R_f</math></b>	<b>Аминокислоты</b>	<b><math>R_f</math></b>	<b>Аминокислоты</b>	<b><math>R_f</math></b>
Цистеин	0,08	Оксипролин	0,22	Тирозин	0,45
Гистидин	0,11	Глицин	0,23	Триптофан	0,50
Лизин	0,12	Аспарагиновая	0,23	Метионин	0,50
Аспарагин	0,12	Треонин	0,26	Валин	0,51
Аргинин	0,15	Глутаминовая	0,28	Фенилаланин	0,60
Глутамин	0,17	Аланин	0,30	Изолейцин	0,67
Серин	0,22	Пролин	0,34	Лейцин	0,70

### **Контрольные вопросы**

1. В чем состоит сущность хроматографического процесса?
2. Какие виды сорбции вы знаете? Что такое адсорбция?
3. Как описываются изотермы адсорбции при помощи уравнений Генри, Фрейндлиха, Ленгмюра?
4. По каким принципам классифицируют хроматографические методы?
5. В чем состоит проявительный (элюентный) анализ? В чем преимущества элюентной хроматографии перед фронтальной и вытеснительной?
6. Из каких узлов состоит принципиальная схема хроматографической установки?

7. Какие параметры хроматографического пика используют для количественного анализа?
8. По каким характеристикам оценивают эффективность разделения в хроматографии?
9. Какие факторы влияют на эффективность хроматографического разделения?
10. Какие требования предъявляются к адсорбентам и растворителям для хроматографии?
11. В чем состоит суть основных методов количественной хроматографии?
12. На чем основано разделение веществ методом бумажной хроматографии? Что такое величина  $R_f$ ?
13. Как проводится разделение методом ионообменной хроматографии?
14. Как проводится разделение методом гель-хроматографии?
15. В чем заключается гель-фильтрационный метод определения молекулярной массы биополимеров?
16. На чем основан метод аффинной хроматографии?

### 1.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

#### Теоретические основы электрофореза

Явление *электрофореза* (от греч. φορέω – «переношу») – движения частиц под действием внешнего электрического поля – характерно главным образом для коллоидных растворов (золей) и растворов высокомолекулярных соединений, т. е. для дисперсных систем, у которых размеры частиц дисперсной фазы не превышают 0,1 мкм [17, с. 117]. Электрофорез является результатом взаимодействия внешнего электрического поля с избыточным зарядом частиц.

Избыток заряда определенного знака может возникать на любой соприкасающейся с жидкостью твердой поверхности вследствие адсорбции ионов, способных достраивать кристаллическую решетку, диссоциации поверхностных групп молекул, перехода ионов с поверхности в раствор и наоборот. На твердом теле формируется *потенциалобразующий слой* ионов, а из жидкой среды притягиваются



противоположные по знаку ионы – *противоионы*. Формируется *двойной электрический слой* (ДЭС) – своеобразный конденсатор, внутренняя обкладка которого с потенциалом  $\varphi$  формируется из потенциалообразующего слоя ионов, а внешняя – из противоионов. Часть противоионов за счет электростатического взаимодействия и специфической адсорбции находится максимально близко к поверхности в фиксированном положении, образуя *адсорбционный (плотный) слой*, а остальные противоионы вследствие теплового движения и взаимного отталкивания распределены диффузно и образуют *диффузный слой*, в пределах которого способны перемещаться (рис. 10).

Необходимо отметить, что, например, при погружении в воду глиняной пластины массой 1 кг на ее поверхности возникнет ничтожно малый электрический заряд, в то время как у частиц глины общей массой 1 кг, реализующих поверхность в миллионы раз большую, чем сплошная глиняная пластина, удельный заряд поверхности будет иметь значительную величину [17, с. 114]. Появление значительного заряда поверхности является причиной возникновения *электрокинетических явлений*, характерных только для дисперсных систем. Суть их состоит во взаимном смещении фаз при приложении к системам разности потенциалов (прямые явления), либо, наоборот, в возникновении разности потенциалов при взаимном смещении фаз (обратные явления). К прямым явлениям относятся *электрофорез* – движение частиц дисперсной фазы относительно дисперсионной среды (обычно жидкости) и *электроосмос* – перемещение дисперсионной среды относительно неподвижной дисперсной фазы. К обратным явлениям относятся *потенциал течения*, возникающий при механическом продавливании (фильтрации) дисперсионной среды через пори-

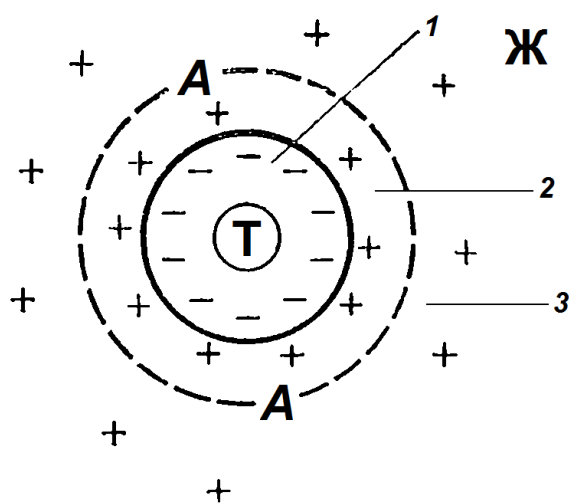


Рис. 10. Схема строения двойного электрического слоя для сферической частицы [17, с. 111]:

- 1 – потенциалообразующие ионы,
- 2 – противоионы в адсорбционном слое,
- 3 – противоионы в диффузном слое,
- АА – граница скольжения,
- Ж – жидкая дисперсионная среда,
- Т – твердая дисперсная фаза

стую перегородку (явление, обратное электроосмосу) и *потенциал оседания* (потенциал седиментации, или эффект Дорна), наблюдающийся при оседании частиц дисперсной фазы в неподвижной дисперсионной среде (явление, обратное электрофорезу) [49, с. 207].

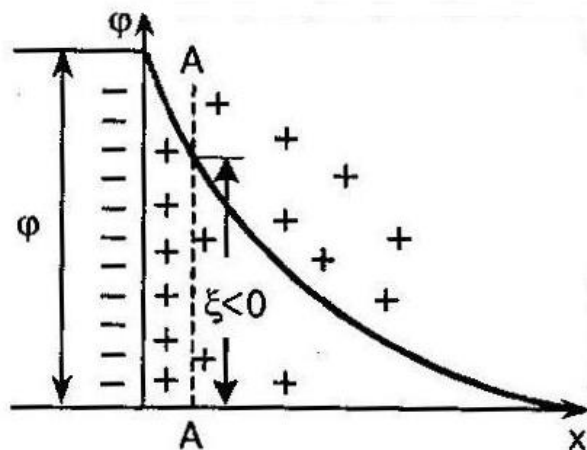


Рис. 11. Изменение потенциала  $\phi$  при  $\zeta < 0$  [17, с. 112]

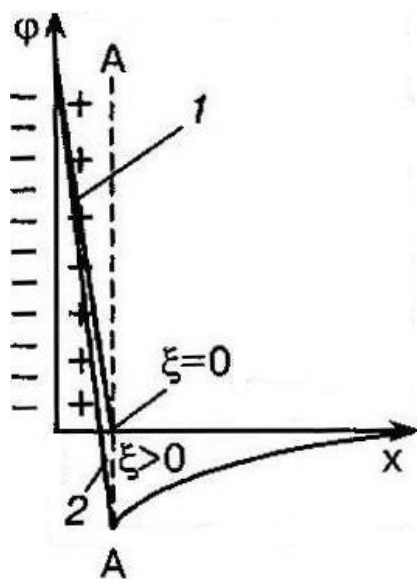


Рис. 12. Изoeлектрическая точка и перезарядка поверхности [17, с. 112]

Поверхность, по которой происходит относительное перемещение частиц и жидкости, называется *границей скольжения*. В простейшем случае граница скольжения практически совпадает с поверхностью, разделяющей адсорбционный и диффузный слои противоионов (линия *AA* на рис. 10 и 11), но, как правило, она лежит за пределами линии *AA* в сторону жидкости [17, с. 112]. По мере удаления от поверхности твердого тела и до границы скольжения потенциал  $\phi$  снижается линейно, а за границей скольжения – по экспоненциальному закону. Точка перегиба на графике (рис. 11) соответствует значению *электрокинетического*, или *дзета-потенциала* ( $\zeta$ -потенциала) – электрического потенциала на границе скольжения. В отличие от потенциала  $\phi$  значение  $\zeta$ -потенциала поддается практическому определению, а его знак определяется знаком заряда ионов потенциалообразующего слоя (на рис. 11 потенциалообразующий слой формируется из анионов

и  $\zeta < 0$ ).

Толщина ДЭС и величина  $\zeta$ -потенциала зависят от концентрации электролита в растворе. Добавление одновалентных противоионов приводит к сжатию диффузного слоя и снижению  $\zeta$ -потенциала. Когда все противоионы будут находиться в адсорбцион-

ном слое (прямая 1 на рис. 12), происходит полная компенсация потенциалобразующего слоя, и  $\zeta$ -потенциал становится равным нулю. Точку, характеризующую подобное состояние ДЭС, когда  $\zeta = 0$ , называют *изоэлектрической точкой* (рI). В этом состоянии электрокинетические явления не наблюдаются. Добавление электролитов с многовалентными ионами может изменить знак  $\zeta$ -потенциала, т. е. произвести перезарядку поверхности (линия 2 на рис. 12).

Явление электрофореза было открыто профессором Московского университета Ф. Ф. Рейсом в 1808 г. Он показал, что при наложении разности электрических потенциалов на электроды, опущенные в заполненные водой стеклянные трубки, воткнутые в кусок сырой глины, как это схематически показано на рис. 13, в трубке с положительно заряженным электродом (анодом) в результате перемещения частиц глины появляется муть, а в трубке с отрицательным электродом (катодом) уровень воды повышается, но при этом вода остается прозрачной. Таким образом, под действием электрического поля в результате разрыва ДЭС на границе скольжения отрицательно заряженные частицы глины, увлекая с собой адсорбционный слой жидкости с содержащимися в нем противоионами, движутся к аноду, а противоионы диффузного слоя перемещаются в обратном направлении.

Диффузный слой не препятствует взаимодействию разноименных зарядов, поскольку противоионы в нем распределены неравномерно и не в состоянии экранировать действие электрического поля на частицы дисперсной фазы, однако в процессе электрофореза часть противоионов диффузного слоя движется в сто-

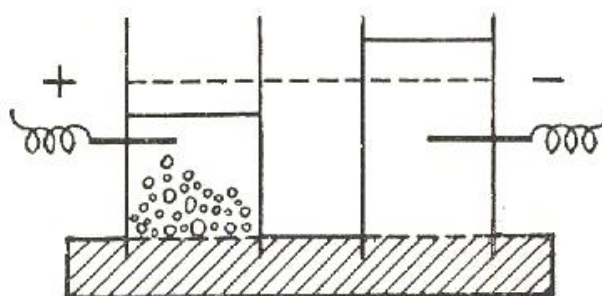


Рис. 13. Опыт Рейсса [48, с. 206]

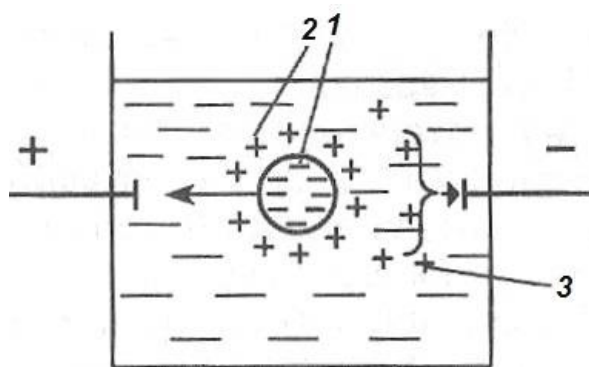


Рис. 14. Электрофорез [17, с. 115]:  
1 — потенциалобразующие ионы,  
2 — противоионы в адсорбционном слое,  
3 — противоионы в диффузном слое,  
длинная стрелка — электрофорез,  
короткая стрелка — электрофоретическое торможение

рону, противоположную движению частиц. Этот эффект называется *электрофоретическим торможением* (рис. 14).

Относительность движения дисперсной фазы и дисперсионной среды определяется двумя силами. Электростатическая сила  $F_1$ , стремящаяся сдвинуть две фазы относительно друг друга, определяется по формуле

$$F_1 = E\sigma \quad (30),$$

где  $E$  – напряженность внешнего электрического поля,  $\sigma$  – плотность заряда поверхности.

Сила  $F_2$  определяет трение жидкости при ее перемещении:

$$F_2 = \eta (v/h) \quad (31),$$

где  $\eta$  – коэффициент вязкости,  $v$  – скорость движения жидкости,  $h$  – толщина слоя жидкости, в котором меняется ее скорость.

После короткого периода установления стационарного режима электрофорез начинает идти с постоянной скоростью. Это означает, что сила  $F_2$  уравнивает силу  $F_1$ :

$$E\sigma = \eta (v/h), \text{ или } v = (\sigma h/\eta) E \quad (32).$$

Формула (32) определяет скорость взаимного перемещения дисперсной фазы и дисперсионной среды. Удельный заряд  $\sigma$  можно связать с  $\zeta$ -потенциалом:

$$\zeta = \sigma h/\epsilon_a; \quad \sigma = (\epsilon_a/h) \zeta \quad (33),$$

где  $\epsilon_a$  – абсолютная диэлектрическая проницаемость среды.

Подставляя равенство (32) в формулу (33), получим

$$v = (\epsilon_a \zeta/\eta) E \quad (34).$$

Скорость движения в расчете на единицу напряженности электрического поля называют *электрофоретической подвижностью*:

$$v_E = v/E = \epsilon_a \zeta/\eta \quad (35).$$

С учетом формы частиц дисперсной фазы уравнения (34) и (35) принимают следующий вид:

$$v = \frac{\epsilon_a \zeta}{\eta \psi} E \quad (36), \quad v_E = \frac{\epsilon_a \zeta}{\eta \psi} \quad (37),$$

где  $v$  – скорость, м/с;  $v_E$  – электрофоретическая подвижность, м<sup>2</sup>/с·В,  $\psi$  – коэффициент, зависящий от формы частиц;  $\zeta$  – электрокинетический потенциал, В;  $E$  – напряженность внешнего электрического поля, В/м. Коэффициент  $\psi$  учитывает форму частиц и их ориентацию в электрическом поле. Для шарообразных частиц коэффициент  $\psi$  равен 0,66, а для цилиндрических, ориентированных вдоль силовых линий

электрического поля – 1 [17, с. 119]. Абсолютная диэлектрическая проницаемость среды  $\epsilon_a = \epsilon\epsilon_0$ , где  $\epsilon$  – относительная диэлектрическая проницаемость среды (для воды она составляет 80,1 при 20°C);  $\epsilon_0$  – абсолютная диэлектрическая проницаемость вакуума (электрическая постоянная, равная  $8,85 \cdot 10^{-12}$  Ф/м).

С учетом значения абсолютной диэлектрической проницаемости формулу (7.15) можно представить в виде

$$v = \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta\psi} E, \text{ или } v = \frac{8,85 \cdot 10^{-12} \epsilon\zeta}{\eta\psi} E \quad (38).$$

Таким образом, согласно формуле (38), интенсивность электрофореза зависит от свойств среды ( $\eta$ ,  $\epsilon$ ), формы частиц ( $\psi$ ), напряженности внешнего электрического поля ( $E$ ) и  $\zeta$ -потенциала.

Электрофоретическую подвижность и электрокинетический потенциал можно определить по скорости перемещения дисперсной фазы;  $v_E$  обычно не превышает  $5 \cdot 10^{-8}$  м<sup>2</sup>/с·В, а  $\zeta$ -потенциал – 100 мВ [17, с. 119]. Определение электрофоретической подвижности лежит в основе электрофоретического разделения смесей.

### Электрофоретические методы

Электрофоретические методы могут быть разделены на две основные категории: *электрофорез с подвижной границей* (фронтальный, или свободный) и *электрофорез на поддерживающих средах* (зональный).

*Электрофорез с подвижной границей* проводят в приборах, существенной частью которых является U-образная трубка. Исследуемый раствор, обычно мутный или окрашенный, помещают в нижнюю часть трубки, затем с двух сторон на него наслаивают бесцветный прозрачный растворитель (так называемую «боковую» жидкость). Электроды погружают в боковые части трубки. С течением времени первоначально единственная граница разделится на несколько, и в конце концов в кювете будет наблюдаться столько границ, сколько веществ с различной электрофоретической подвижностью имеется в растворе. Приборы для свободного электрофореза снабжены устройствами автоматической регистрации перемещения каждого компонента в исследуемом объекте. Недостатками этого исторически первого метода, разработанного шведским биохимиком А. Тиселиусом,

являются низкое разрешение вследствие диффузионного и конвекционного перемешивания и большой объем пробы [23, с. 286–288].

В методе *зонального электрофореза* смесь исследуемых веществ помещают в виде узкого слоя (зоны) на поддерживающую (опорную) пористую среду – фильтровальную или хроматографическую бумагу, пленки из ацетата целлюлозы или гели (крахмальный, агаровый, полиакриламидный). После наложения разности потенциалов исходная зона разделится на столько зон, сколько в смеси находится веществ с различной подвижностью. Разделившиеся компоненты можно зафиксировать в поддерживающей среде и определить после проявления электрофореграммы подходящим реактивом.

Оборудование, необходимое для зонального электрофореза, состоит из двух частей: источника питания и электрофоретической ка-

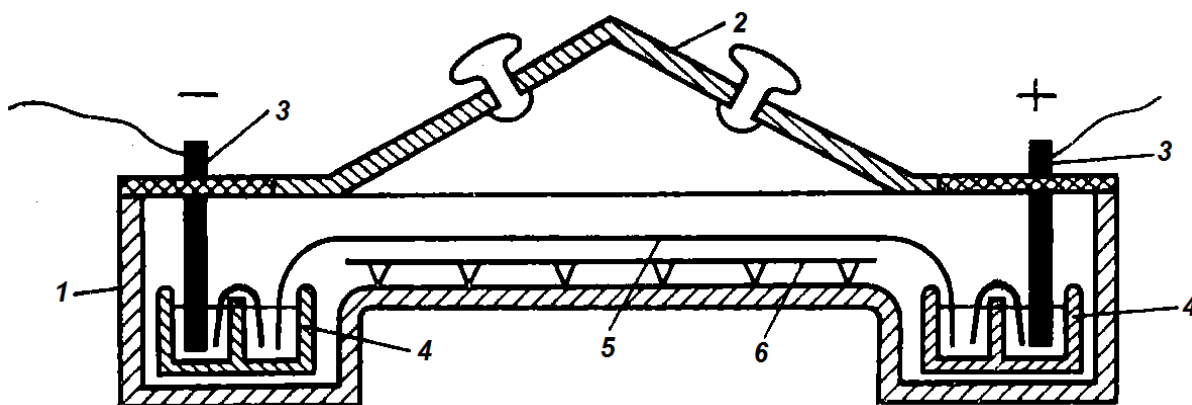


Рис. 15. Схема камеры для электрофореза на бумаге [42, с. 125]:

1 — камера из стекла, 2 — крышка камеры, 3 — электроды, 4 — кюветы для электродов, 5 — полоски хроматографической бумаги, 6 — перфорированная пластина

меры. Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе. Электрофоретическая камера (рис. 15), выполненная из стекла или твердого полимера, состоит из двух отдельных резервуаров – анодного и катодного, содержащих раствор электролита. В каждый резервуар камеры погружается графитовый или платиновый электрод, которые присоединяются изолированной схемой к соответствующему выходу источника питания и образуют анод и катод. Электрофоретическая камера снабжена воздухонепроницаемой крышкой, которая уменьшает испарение растворителя.

## Применение электрофореза для разделения и определения молекулярной массы биополимеров

Электрофорез используют для нанесения покрытий, разделения компонентов раствора, извлечения мелких частиц из раствора, не поддающегося фильтрации, в том числе для очистки воздуха. В медицине электрофорез применяют для введения лекарственных форм через кожу человека, исследования нормальных и патологических сывороток, нуклеопротеидов и их смесей. Метод применим как для разделения нуклеиновых кислот, являющихся полианионами и всегда перемещающихся в направлении катода, так и к белкам, которые при значениях рН, отличающихся от их рI, несут положительный или отрицательный заряд и в соответствии с ним перемещаются в направлении одного из электродов.

Суммарный электрический заряд белковой макромолекулы зависит от рН среды и соотношения аминокислот, содержащих в боковых радикалах полярные ионогенные функциональные группы аминокислот, которые обладают кислотными и основными свойствами. Кислотные функциональные группы – карбоксильная в глутаминовой и аспарагиновой кислотах, фенольный гидроксил тирозина, тиольная группа цистеина – способны образовывать анионы, а аминогруппа лизина, гуанидиновая группировка аргинина и пиридиновый атом азота имидазольного кольца гистидина обладают основными свойствами и способны к образованию катионов. Изменяя рН среды, можно регулировать ионизирующую способность белков, изменяя тем самым структуру ДЭС, значение  $\zeta$ -потенциала и скорость электрофореза. В кислой среде основные функциональные группы протонируются, тогда как диссоциация кислотных групп подавляется, поэтому белки оказываются заряженными положительно,  $\zeta$ -потенциал становится больше нуля ( $\zeta > 0$ ), и при электрофорезе макромолекулы будут двигаться к катоду. В щелочной среде, наоборот, катинообразующие группы не имеют заряда, а кислотные легко диссоциируют, вследствие чего белок имеет суммарный отрицательный заряд ( $\zeta < 0$ ), и при электрофорезе макромолекулы движутся к аноду.

Поскольку константы диссоциации кислотных и основных групп белков не совпадают, число диссоциированных основных и кислотных групп макромолекул белка может быть одним и тем же

только при определенном значении рН среды. Такое состояние соответствует рI, которая изменяется у белков в пределах рН от 2 (у пепсина) до 10,6 (у цитохрома С), но обычно соответствует рН<7 [17, с. 293].

Электрофорез на бумаге нашел широкое применение для разделения белковых смесей, в том числе в повседневной клинической лабораторной практике по анализу плазмы крови. После электрофореза белки фиксируют высушиванием, а затем обрабатывают красителями. При этом на бумажной электрофореграмме (рис. 16) выявляются

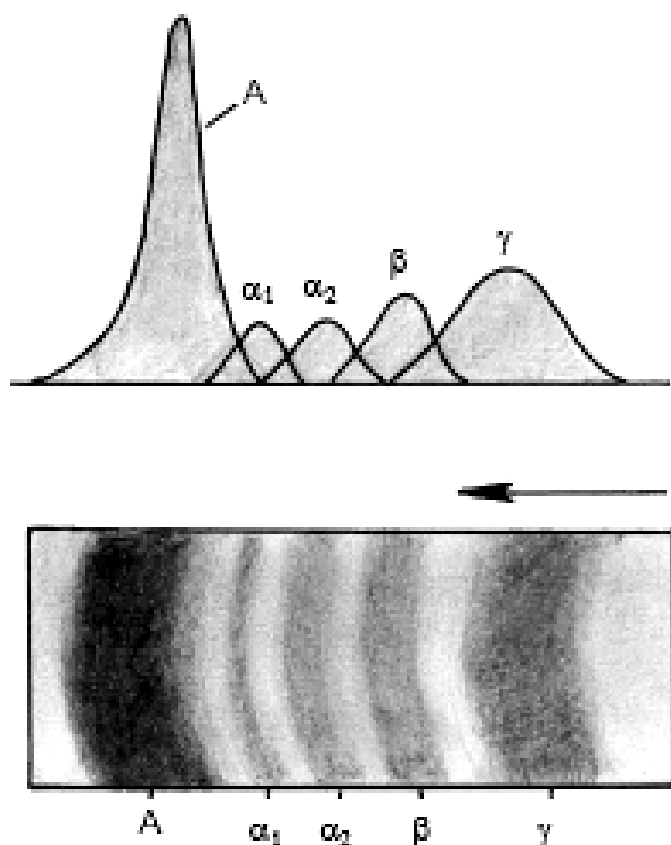


Рис. 16. Электрофореграмма и денситограмма белков нормальной сыворотки крови [16, с. 64; 48, с. 84]: А — альбумин,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  — глобулины. Стрелка указывает направление движения от старта

белковых фракций.

Бумага может адсорбировать некоторые вещества, а кроме того, при электрофорезе на бумаге в той или иной степени проявляется электроэндоосмос (возникновение заряда между молекулами буферного раствора и носителя), что снижает разрешающую способность.

окрашенные пятна. По числу пятен судят о количестве белковых фракций, а по интенсивности окраски — о количественном содержании каждой белковой фракции в исследуемой сыворотке. Окрашенные полосы белковых фракций можно хранить или, разрезав на участки, элюировать для фотометрического определения каждой фракции, либо с использованием оптических приборов с разверткой, например, денситометра, измеряющего оптическую плотность участков электрофореграммы, получить кривую с отдельными пиками и определить по ней содержание отдельных



Электроэндоосмос и адсорбция менее заметны при использовании в качестве носителя ацетата целлюлозы.

Более высокой разрешающей способностью отличается электрофорез в гелях, т. к. они являются не только поддерживающей средой, но и функционируют как молекулярные сита, через которые крупные молекулы движутся тем медленнее, чем меньше размер пор в геле. Электрофорезом в крахмальном и полиакриламидном геле удается разделить сывороточные белки на 10–16 компонентов (в то время как фронтальный и бумажный электрофорез обычно позволяет различать не более 5 компонентов) [16, с. 12–13]. Агаровый гель имеет по сравнению с другими гелями больший размер пор и потому обладает меньшей разрешающей способностью, однако прозрачность агарового геля позволяет проводить непосредственное фотометрическое измерение концентрации белков (этим же преимуществом обладает и полиакриламидный гель – ПААГ).

Вариантов проведения электрофореза в ПААГ много: вертикальный и горизонтальный, в трубках и на пластинах. Чаще других используют метод вертикального электрофореза, также называемый диск-электрофорезом. В нем сочетаются две системы полиакриламидных гелей: верхняя крупнопористая и нижняя мелкопористая. В верхнем геле происходит концентрирование анализируемого образца, а в нижнем – разделение белков [16, с. 88].

По электрофоретической подвижности белка в ПААГ также можно определить молекулярную массу белка. В этом случае его предварительно обрабатывают специальным детергентом – додецилсульфатом натрия  $C_{12}H_{25}OSO_3Na$  (ДСН) для денатурации. Комплекс белок – ДСН не переходит полностью в конформацию беспорядочного клубка, а принимает форму цилиндрического агрегата, длина которого зависит от молекулярной массы белка, при этом поверхностный заряд комплекса, отнесенный к единице площади поверхности, оказывается примерно постоянным и не зависит от заряда полипептидной цепи. Показано, что между логарифмом молекулярной массы белка и его электрофоретической подвижностью имеется линейная корреляция с отрицательным тангенсом угла наклона:

$$v_E = A - B \cdot \lg M_r \quad (39),$$

где  $v_E$  – электрофоретическая подвижность,  $M_r$  – молекулярная масса белка,  $A$  и  $B$  – коэффициенты, зависящие от пористости геля, темпе-

ратуры и других условий эксперимента (определяются экспериментально электрофоретическим разделением белков-«маркеров», молекулярные массы которых точно известны).

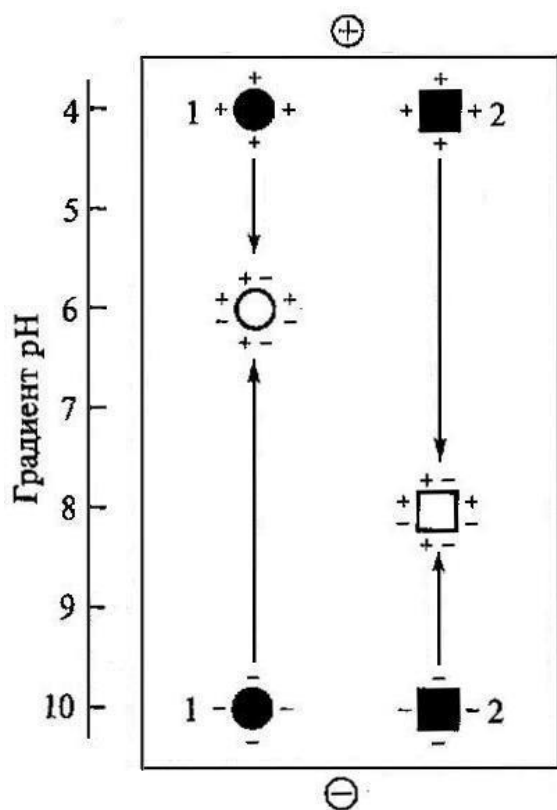


Рис. 17. Разделение белков методом изоэлектрического фокусирования [26, с. 16].

В электрическом поле молекулы белков мигрируют к противоположно заряженным полюсам и останавливаются в тех точках градиента рН, которые соответствуют их рI (для белков 1 и 2 при рН 6,0 и 8,0 соответственно)

(изотахофореза), основанном на концентрировании белка в том месте электрофоретической колонки или тонкого слоя ПААГ, где рН соответствует его изоэлектрической точке (рис. 17). Стабильный градиент рН (от 3 до 10), направленный от анода к катоду, устанавливают смешиванием специальных буферных растворов, содержащих синтетические полиаминополикарбоновые кислоты (амфолины). Если молекула белка находится в нижней части колонки, где  $pH < pI$ , то на

При электрофорезе с ДСН обычно используют также обработку белков  $\beta$ -меркаптоэтанолом, разрывающим (восстанавливающим) дисульфидные связи между субъединицами белков, что позволяет определить число и массу субъединиц в белках-мультимерах. Например, молекулярная масса глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы по данным, полученным методом ультрацентрифугирования, равна 140 000. Однако при электрофорезе с ДСН молекулярная масса оказывается равной всего лишь 36 000. Можно сделать вывод, что этот фермент содержит 4 субъединицы [50, с. 566–567].

После электрофореза белки выявляют либо красителем Кумаси, либо серебрением (минорные белки), что позволяет выявить на электрофореграммах ничтожные количества (около 10 нг) белка.

Фракционирование белков можно также осуществить *методом изоэлектрического фокусирования*

ней преобладает положительный заряд, и в результате этого она перемещается вверх по направлению к катоду и к возрастающим значениям рН. В рI ее заряд равен нулю, она останавливается, и здесь ее зона становится резко ограниченной. Если, напротив, молекула находится в пространстве с более высоким рН, на ней преобладает отрицательный заряд, поэтому она перемещается вниз, к аноду, до тех пор, пока не достигнет изоэлектрической точки. Даже если в растворе находятся белки, рI которых различаются ничтожно (до 0,005 рН), каждый из них проявится в виде отдельной зоны, поэтому методом изоэлектрофокусирования можно добиться максимально эффективного фракционирования белковых смесей, вплоть до выделения индивидуальных белков [23, с. 289–290].

Сочетание методов изоэлектрического фокусирования и электрофореза в ПААГ с ДСН получило название *двумерного электрофореза*. В этой процедуре белки вначале обрабатывают мочевиной и β-меркаптоэтанолом, что приводит к их полному растворению, денатурации и диссоциации полипептидных цепей без изменения заряда. Далее проводят изоэлектрическое фокусирование в ПААГ, разделяя белки по заряду, а затем (в перпендикулярном направлении) ведут их электрофорез в блоке ПААГ с ДСН, при котором белки разделяются по молекулярной массе. Таким образом, сочетая тонкое разделение вначале по заряду, а затем по размеру (массе), удастся за один раз разделить до 2000 полипептидных цепей, т. е. проанализировать большинство всех белков бактериальной клетки [26, с. 16–17].

#### **Лабораторная работа № 4**

##### ***РАЗДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ***

Индивидуальные белки, присутствующие в сыворотке крови, разделяются на четыре основные группы: альбумины, α-, β- и γ-глобулины. Группы делятся, в свою очередь, на фракции: α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub>-глобулины и др. Электрофорез сывороточных белков обычно проводят в буферном растворе при рН 8,6–8,9. При данном значении рН макромолекулы заряжены отрицательно и движутся к аноду. Так как рI альбумина находится при рН~5, а γ-глобулина при рН~7, то при рН~8,6 наибольшей подвижностью обладает альбумин, а наименьшей

$\gamma$ -глобулин (рис. 16). Содержание белка в каждой фракции можно ориентировочно определить по интенсивности окраски связанного красителя, а количественно – по площадям окрашенных участков на электрофореграмме.

**Исследуемый материал:** сыворотка крови.

**Оборудование:** электрофоретическая камера, сушильный шкаф, микропипетки, лоток (кюветы) для красителя, предметные стекла, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, весы, ножницы, деревянные рамки для сушки электрофореграмм.

**Реактивы:** фосфатно-глициновый буферный раствор (рН 8,7)<sup>1</sup>, бромфеноловый синий<sup>2</sup>, 2%-ный раствор уксусной кислоты, 0,01 М раствор гидроксида натрия.

**Ход работы.** Для подготовки прибора к работе его устанавливают горизонтально и в электродные кюветы наливают заранее приготовленный буферный раствор. На полоске бумаги длиной 27 см и шириной 4 см на расстоянии 9 см от края проводят карандашом поперечную полосу – линию старта. Полоску бумаги смачивают буферным раствором, кладут на лист фильтровальной бумаги и через 2–3 мин наносят исследуемый раствор белка.

Испытуемую жидкость – сыворотку набирают в микропипетку, конец которой вытирают фильтровальной бумагой, и осторожно наносят 0,01–0,015 мл ровным слоем на малое ребро предметного стекла. Затем стекло с нанесенной жидкостью прикладывают к стартовой линии. Ребро стекла должно сразу коснуться бумаги по всей своей длине. Держат стекло в таком положении несколько секунд, пока жидкость впитывается в бумагу. Полоску бумаги кладут на рамку в камеру так, чтобы край с испытуемой жидкостью был у катода. В одну камеру кладут 5–6 полосок бумаги. Камеру закрывают и включают ток. Сила тока должна составлять 6–8 мА напряжение – 150–160 В. Прибор оставляют включенным на 16–18 ч<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> 15 г глицина, 2,5 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют в небольшом объеме воды и доводят до 1 л 30%-ным раствором  $\text{NaOH}$ .

<sup>2</sup> К 0,1 г красителя добавляют 50 г  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и растворяют в 50 мл концентрированной уксусной кислоты и 900 мл воды.

<sup>3</sup> Так как данную работу нельзя выполнить в течение одного практического занятия, студенты в свое учебное занятие наносят испытуемую смесь белков на электрофореграмму и включают прибор, а снимают и проявляют те электрофореграммы, которые были поставлены накануне их товарищами. Таким образом, создается возможность познакомиться с техникой всего процесса электрофореза.

По окончании электрофореза выключают ток, вынимают полоски бумаги и сушат их 10 мин в сушильном шкафу при 110–120°C. Высушенную бумагу опускают на 5 мин в кювету с красителем бромфеноловым синим, который взаимодействует с белками. Затем краситель сливают в бутылку и в кювету наливают 2%-ный раствор уксусной кислоты для отмывания участков бумаги, свободных от белков. Промывание повторяют несколько раз, после чего электрофореграммы сушат несколько минут в сушильном шкафу, после чего зарисовывают или фотографируют [42, с. 125–126].

Содержание белковых фракций сыворотки крови, полученное при помощи электрофореза на бумаге, у взрослого человека колеблется в следующих пределах: альбумины – 55,4–65,9%,  $\alpha_1$ -глобулины – 3,4–4,7%,  $\alpha_2$ -глобулины – 5,5–9,5%,  $\beta$ -глобулины – 8,9–12,6%,  $\gamma$ -глобулины – 13,0–22,2% [31, с. 191].

### **Лабораторная работа № 5**

#### *ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА АГАРЕ*

Электрофорез проводится на стеклянных пластинках с нанесенным тонким слоем агарового геля, приготовленного на буферном растворе при рН 8,6.

**Исследуемый материал:** сыворотка крови.

**Оборудование:** электрофоретическая камера, штамп для прорезания щели на агаровой пластинке, пипетки, фильтровальная бумага.

**Реактивы:** 1%-ный раствор агара, барбиталовый буфер (рН 8,6)<sup>1</sup>, раствор метиленового синего в 5%-ном растворе уксусной кислоты.

**Ход работы.** В геле ближе к одному краю пластинки по одной линии высекают гнездо и очень аккуратно вносят в него 0,1 мл раствора исследуемой сыворотки. После нанесения исследуемого раствора на оба края пластинки параллельно стартовой линии кладут фильтровальные бумажки, покрытые агаром. Эти бумажки служат соединительными мостиками, соединяющими агар на пластинке с буфером, где находятся электроды. Пластинку помещают на края двух

---

<sup>1</sup> В 300 мл воды растворяют 10,32 г барбитал-натрия, добавляют 1,84 г барбитала и, помешивая, нагревают на водяной бане до растворения барбитала, затем объем раствора доводят водой до 1 л.

параллельных кювет, поставленных на некотором расстоянии друг от друга, при этом нанесенный белок должен быть ближе к положительному полюсу. Концы соединительных мостиков погружают в кюветы, в которые наливается барбиталовый буфер с рН 8,6, и вставляют электроды. Электрофорез ведут в течение 60 мин при напряжении 250 В и силе тока 50 мА.

По окончании электрофореза пластинку погружают на 30 мин в раствор метиленового синего в 5%-ном растворе уксусной кислоты. Окрашенные полосы отвечают белковым фракциям. Электрофореграммы зарисовывают или фотографируют [42, с. 126–127].

### Контрольные вопросы

1. Каковы причины и механизм возникновения двойного электрического слоя на границе раздела «твердое тело – жидкость»?
2. Какова структура двойного электрического слоя?
3. Что такое граница скольжения и электрокинетический потенциал двойного электрического слоя?
4. Что такое изоэлектрическая точка?
5. Чем обусловлены электрокинетические явления?
6. Что такое электрофорез и какое применение находят электрофоретические методы в биологии?
7. Что такое электрофоретическая подвижность? От каких факторов зависит интенсивность электрофореза?
8. Каким образом проводится разделение по методу электрофореза с подвижной границей?
9. Что такое зональный электрофорез? В чем преимущество методов зонального электрофореза?
10. В чем состоит отличие электрофореза в гелях от других видов электрофореза? Каковы преимущества различных видов гелей?
11. Какой электрофоретический метод можно использовать для определения относительной молекулярной массы белка?
12. В чем заключается метод изоэлектрического фокусирования?

## Глава 2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Электрохимические методы анализа и исследования основаны на изучении и использовании процессов, протекающих на поверхности электрода или в приэлектродном слое. Аналитическим сигналом, т. е. измеряемой величиной, функционально связанной с концентрацией определяемого вещества, может служить любой электрический параметр (потенциал электрода, сила тока в цепи, электрическая проводимость раствора электролита и др.).

Различают прямые и косвенные электрохимические методы. В прямых методах используют зависимость электрического параметра от концентрации определяемого компонента. В косвенных методах аналитический сигнал измеряют с целью нахождения точки эквивалентности (конечной точки титрования) определяемого компонента соответствующим титрантом. Для любого рода электрохимических измерений необходимы гальванический элемент или электролитическая ячейка, составной частью которых является анализируемый раствор.

В табл. 4 приведена классификация электрохимических методов анализа по природе измеряемого параметра.

Таблица 4

### Классификация электрохимических методов анализа [39, с. 134]

Аналитический сигнал	Условия измерения	Метод
ЭДС гальванического элемента $E$ (потенциал электрода $\varphi$ ), В	$I = 0$	Потенциометрия
Сила тока $I$ , А	$I = f(\varphi)$	Вольтамперометрия
Количество электричества $Q$ , Кл	$I = \text{const}$ или $\varphi = \text{const}$	Кулонометрия
Масса $m$ , г	$I = \text{const}$ или $\varphi = \text{const}$	Электрогравиметрия
Удельная электрическая проводимость $\kappa$ , См/см	$I \sim (1000 \text{ Гц})$	Кондуктометрия

Электрохимические методы анализа характеризуются высокой чувствительностью, точностью, селективностью, возможностью ав-

томатизации и дистанционной записи результатов, универсальностью, позволяющей определять неорганические и органические компоненты в разнообразных природных и технологических объектах зачастую без трудоемкой пробоподготовки. Это обуславливает широкое применение электрохимических методов в химии, биологии, медицине и в мониторинге объектов окружающей среды.

## 2.1. ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ

### Теоретические основы потенциометрии

*Потенциометрия* (от лат. *potentia* – «сила» и греч.  $\mu\epsilon\tau\rho\epsilon\omega$  – «измеряю») – совокупность методов исследования и анализа, основанных на определении зависимости равновесного электродного потенциала от активности (концентрации) анализируемого иона. Поскольку измерить потенциал отдельно взятого электрода невозможно, измеряют электродвижущую силу (ЭДС) гальванического элемента, составленного из *индикаторного электрода*, обратимо реагирующего на состав анализируемого раствора, и *электрода сравнения*, обладающего постоянным значением электродного потенциала. Потенциометрические методы известны с конца XIX века: в 1883 г. немецкий химик Р. Беренд провел первое потенциометрическое титрование ионов ртути раствором хлорида калия, а в 1889 г. его соотечественник В. Нерст вывел уравнение, выражающее зависимость равновесного электродного потенциала от различных факторов [8, с. 181].

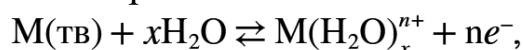
*Равновесным электродным потенциалом* называется скачок потенциала, возникающий при образовании двойного электрического слоя (ДЭС) в результате обмена заряженными частицами (электронами, ионами) на границе раздела между электронным проводником (металлической пластиной – электродом) и ионным проводником (раствором электролита, в который погружена металлическая пластина)<sup>1</sup>. В зависимости от природы металла перенос ионов может проис-

---

<sup>1</sup> *Электродом* часто называют лишь саму электронно-проводящую фазу, например, металлическую пластину, помещенную в раствор электролита. Более строго под электродом понимается электрохимическая система, включающая в себя как минимум две контактирующие проводящие фазы, одна из которых является электронным проводником (проводником 1-го рода), а другая — ионным проводником (проводником 2-го рода) [34, с. 17].



ходить преимущественно в одном из направлений: из металла в раствор или, наоборот, из раствора в металл. В первом случае металлическая фаза приобретает отрицательный заряд за счет появления некомпенсированных электронов и к ее поверхности притягиваются перешедшие в раствор катионы; во втором случае, характерном для малоактивных металлов, при переходе катионов металла из раствора на поверхность она приобретает положительный заряд и притягивает анионы из раствора. По мере увеличения разности потенциалов скорости перехода ионов в обоих направлениях выравниваются и устанавливается динамическое равновесие:



или сокращенно без учета гидратации ионов:  $M \rightleftharpoons M^{n+} + ne^-$ .

От положения этого равновесия зависят знак и величина электродного потенциала [10, с. 277].

Другой причиной появления скачка потенциала на границе металл – раствор является избирательная адсорбция ионов на поверхности раздела фаз, вызванная силами неэлектростатического происхождения. Эффект избирательной адсорбции наблюдается и на незаряженной поверхности (в условиях, когда ионный обмен между металлом и раствором отсутствует). Специфически адсорбированные ионы и соответствующее им количество противоионов образуют ДЭС, локализованный внутри жидкой фазы (твердая фаза для ионов непроницаема) в непосредственной близости от границы раздела металл – раствор [33, с. 47–49]. ДЭС имеет диффузное строение, о котором подробно рассказано в разделе «Электрофорез».

В общем случае, любому электродному процессу  $\text{red} \rightleftharpoons \text{ox} + ne^-$  соответствует электродный потенциал  $\varphi$ . Символами  $\text{red}$  и  $\text{ox}$  (от лат. *reductio* – «восстановление» и *oxidatio* – «окисление») обозначают соответственно восстановленную и окисленную формы элемента.

Электродный потенциал зависит от трех факторов: природы металла, активности (концентрации) ионов металла в растворе и температуры. Эта зависимость выражается *уравнением Нернста*:

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}]\gamma_{\text{ox}}}{[\text{red}]\gamma_{\text{red}}} \quad (40).$$

где  $\varphi^0$  – стандартный электродный потенциал, В;  $R$  – универсальная газовая постоянная, равная 8,312 Дж/(моль·К);  $T$  – абсолютная темпе-

ратура, К;  $F$  – постоянная Фарадея<sup>1</sup>, равная 96485 Кл/моль,  $n$  – число электронов, принимающих участие в электродной реакции,  $a_{\text{ox}}$ ,  $a_{\text{red}}$  – активности окисленной и восстановленной форм, моль/л;  $[\text{ox}]$ ,  $[\text{red}]$  – их равновесные молярные концентрации, моль/л;  $\gamma_{\text{ox}}$ ,  $\gamma_{\text{red}}$  – коэффициенты активности.

Если в уравнение (40) подставить значения постоянных  $R$  и  $F$ , принять температуру равной 298 К, перейти от натуральных логарифмов к десятичным и принять во внимание, что  $a_{\text{ox}} = a_{\text{M}^{n+}}$ , и  $a_{\text{red}} = \text{const}$  (концентрация атомов (ионов) в металле при постоянной температуре – величина постоянная), то получим:

$$\varphi = \varphi^{\circ} + \frac{0,059}{n} \lg a^{\text{M}^{n+}} = \varphi^{\circ} + \frac{0,059}{n} \lg [\text{M}^{n+}] \gamma^{\text{M}^{n+}} \quad (41).$$

Для разбавленных растворов коэффициенты активности  $\gamma$  близки к единице, и вместо активности можно пользоваться молярной концентрацией ионов.

Физический смысл величины  $\varphi^{\circ}$  становится ясным при рассмотрении случая, когда концентрации (активности) веществ, участвующих в электродном процессе, равны 1 моль/л. При этом условии второе слагаемое правой части уравнения обращается в нуль ( $\lg 1 = 0$ ) и уравнение (41) принимает вид:  $\varphi = \varphi^{\circ}$ . Итак, *стандартный электродный потенциал* – это потенциал электродного процесса при концентрациях (активностях) участвующих в нем веществ, равных 1 моль/л.

Для получения численных значений потенциалов различных электродов составляют гальванический элемент, соединяя электроды внешним проводником, а растворы – пористой перегородкой (диафрагмой) или солевым мостиком (обычно насыщенным раствором хлорида калия) и измеряют ЭДС. Она представляет собой разность потенциалов электродов гальванического элемента: из потенциала более положительного электрода (катода) вычитают потенциал менее положительного электрода (анода):

$$E = (\varphi_1 - \varphi_2) + \Delta\varphi_{\text{диф}} \quad (42).$$

Величина  $\Delta\varphi_{\text{диф}}$  обозначает *диффузионный потенциал*, возникающий на границе между различающимися по составу растворами

---

<sup>1</sup> Постоянная Фарадея  $F$  равна произведению элементарного заряда на постоянную Авогадро, т. е. это электрический заряд 1 моля электронов (или однозарядных ионов).

электролитов вследствие различий в скоростях диффузии ионов через границу раздела жидких фаз. Данный скачок потенциала не является равновесным, а представляет собой некоторую стационарную величину, обычно не превышающую нескольких десятков мВ, но препятствующую точному измерению ЭДС. При использовании солевых мостиков величина диффузионного потенциала резко снижается, поскольку в этом случае он заменяется двумя другими диффузионными скачками потенциала (на границах раствора солевого мостика с растворами электролитов) существенно меньшей величины, при этом возникающие скачки потенциала направлены противоположно и, таким образом, компенсируют друг друга [33, с. 141].

При измерении ЭДС разность потенциалов электродов должна быть скомпенсирована противоположной по знаку, но равной по величине разностью потенциалов от внешнего источника, так, чтобы сила тока в цепи была равна нулю (иначе от гальванического элемента будет отводиться заметный ток и полученное значение потенциала нельзя будет приравнять к значению равновесного потенциала). На практике нулевой ток недостижим, но можно создать условия, чтобы величина тока имела ничтожно малое значение и не нарушала локальные равновесия на электродах. Для этого используют милливольтметры (рН-метры, ионометры), внутреннее сопротивление которых составляет  $10^{11}$ – $10^{12}$  Ом, что на 3–4 порядка больше внутреннего сопротивления гальванического элемента [39, с. 146]. Для более точных измерений применяют потенциометры, в которых реализуется *компенсационная схема* (рис. 18). К концам проволоки *AB*, изготовленной из металла с большим сопротивлением, присоединяют аккумулятор *1*. Навстречу ему через гальванометр *Г* присоединяют гальванический элемент *2*, ЭДС которого необходимо измерить. Скользящий контакт

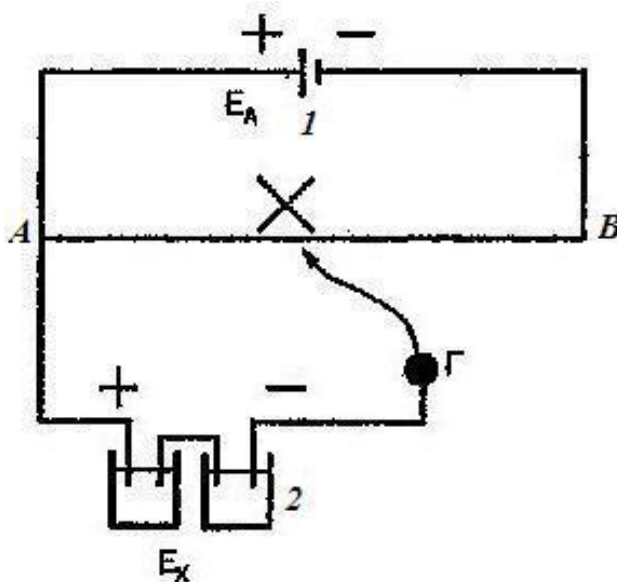


Рис. 18. Компенсационная схема измерения ЭДС [10, с. 288]

$X$  перемещают по проволоке  $AB$ , пока стрелка гальванометра не укажет на отсутствие тока в цепи. Если  $E_A$  – известная ЭДС аккумулятора, а измеряемая ЭДС равна  $E_x$ , то при отсутствии тока

$$E_x = E_A \cdot AX/AB \quad (43).$$

Измеряя ЭДС гальванического элемента, потенциал исследуемого электрода можно вычислить относительно электрода с постоянным значением потенциала. В качестве эталона был выбран стандартный (нормальный) водородный электрод.

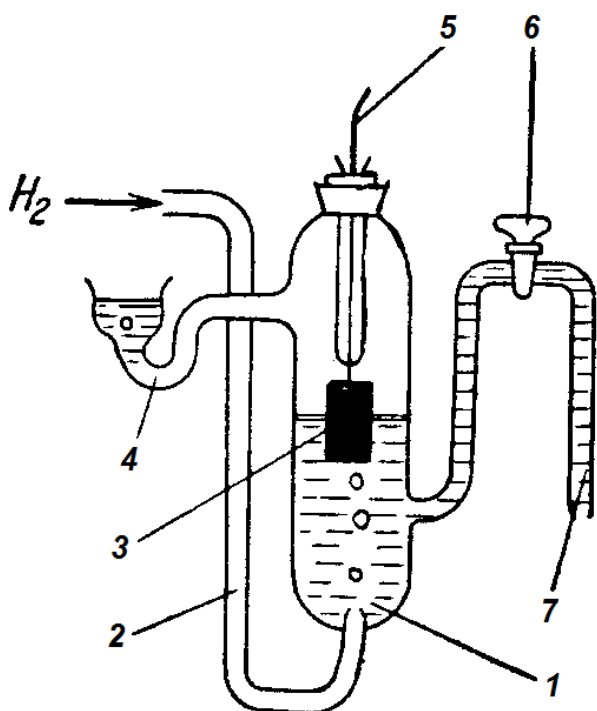


Рис. 19. Стандартный водородный электрод [4, с. 188]:

- 1 – 0,1 М раствор  $H_2SO_4$ , 2 – трубка для подачи  $H_2$ , 3 – платинированный платиновый электрод, 4 – трубка для отвода  $H_2$  с жидкостным затвором,
- 5 – внешний провод, 6 – кран,
- 7 – сифон

Конструктивно стандартный водородный электрод (рис. 19) представляет собой сосуд с электролитом (обычно серной кислотой), содержащим ионы  $H^+$  концентрацией 1 моль/л, через который под постоянным давлением продувается водород. В электролит частично погружена платиновая пластинка, покрытая платиновой чернью (тонким порошком платины), активно адсорбирующая водород и катализирующая частичный распад его молекул на

атомы. Между адсорбированным водородом и его ионами устанавливается равновесие:



Нетрудно заметить, что это равновесие аналогично рассмотренному для металлического электрода. Вследствие установления равновесия на границе платина – раствор возникает электродный потенциал, величину которого можно рассчитать по уравнению Нернста:

$$\varphi_{2H^+/H_2} = \varphi^{\circ}_{2H^+/H_2} + 0,059 \lg[H^+] \quad (44).$$

Стандартный потенциал водородного электрода  $\varphi^{\circ}_{2H^+/H_2}$  при давлении  $1,013 \cdot 10^5$  Па (1 атм) и любых температурах принят равным нулю. Тогда потенциал водородного электрода:

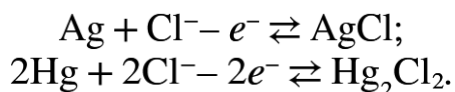
$$\varphi_{2\text{H}^+/\text{H}_2} = 0,0591 \lg[\text{H}^+] = -0,059 \text{pH} \quad (45).$$

По отношению к стандартному водородному электроду выражают потенциалы всех других электродов. Их можно разделить на несколько типов.

К *электродам первого рода* относятся металлические электроды  $\text{M}^{n+}/\text{M}$ , часто к ним относят и водородный электрод  $2\text{H}^+/\text{H}_2$  (черта символизирует поверхность раздела фаз). Общим для них является то, что в равновесии на электроде участвуют нейтральные атомы (или молекулы) и один вид катионов. Такие электроды являются обратимыми относительно катионов.

*Электроды второго рода* состоят из трех фаз: металла, покрытого слоем труднорастворимого соединения этого металла (соли, оксида или гидроксида), и раствора, содержащего те же анионы, которые входят в состав труднорастворимого соединения.

Примерами могут служить *хлорсеребряный электрод* – серебряная проволока, покрытая слоем хлорида серебра  $\text{AgCl}$  и опущенная в насыщенный раствор хлорида калия  $\text{KCl}$ , и *каломельный электрод*, в котором паста из металлической ртути и каломели  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  контактирует с раствором  $\text{KCl}$  (рис. 20). Между твердой фазой и раствором возникают равновесия:



В отличие от электродов первого рода здесь в равновесиях участвуют анионы, т. е. электроды второго рода обратимы относи-

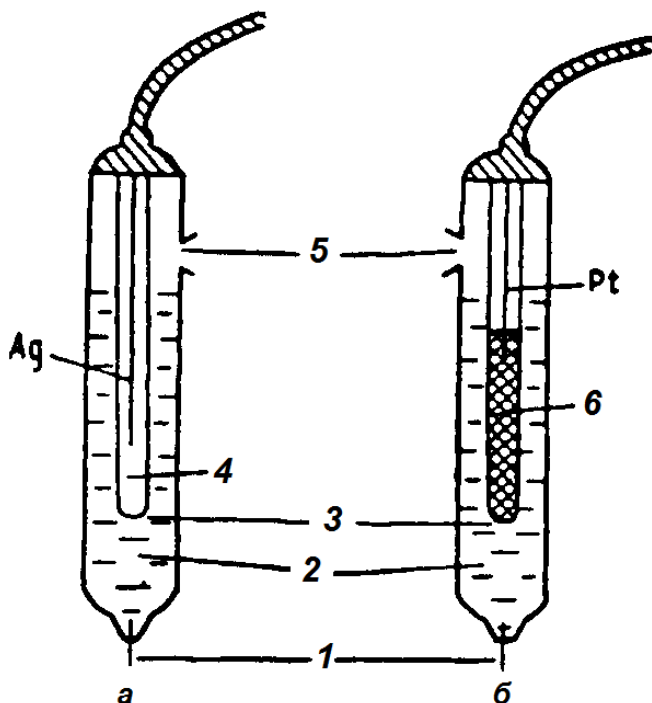
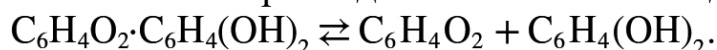


Рис. 20. Хлорсеребряный (а) и каломельный (б) электроды с двойным солевым мостиком [39, с. 126]:  
1 – асбестовое волокно, обеспечивающее контакт с анализируемым раствором,  
2 – внешний раствор  $\text{KCl}$ , 3 – отверстие для контакта,  
4 – внутренний раствор  $\text{KCl}$ ,  
5 – отверстие для ввода раствора  $\text{KCl}$ ,  
6 – паста из смеси  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Hg}$  и  $\text{KCl}$

тельно анионов. Величина потенциала этих электродов зависит от концентрации анионов. В лабораторной практике их обычно используют в качестве *электродов сравнения* вместо водородного электрода, который довольно сложен в эксплуатации. Серийно выпускают хлорсеребряные электроды с потенциалом  $0,222 \pm 0,002$  В и каломельные электроды с потенциалом  $0,247 \pm 0,001$  В (при  $25^\circ\text{C}$  относительно стандартного водородного электрода). Современные конструкции электродов сравнения включают два раствора KCl, один из которых (внешний) служит солевым мостиком и одновременно предотвращает загрязнение внутреннего раствора, исключая его контакт с анализируемым раствором. Такие электроды называют электродами с двойным солевым мостиком [39, с. 126].

Особую группу составляют *окислительно-восстановительные* электроды, которые состоят из инертного металла, погруженного в раствор, содержащий окисленную и восстановленную формы одного и того же вещества. Инертный металл выступает в роли переносчика электронов. В качестве примера можно привести *хингидронный электрод* – платиновую пластинку, погруженную в насыщенный хингидроном раствор. Хингидрон (зеленовато-коричневый, малорастворимый в воде кристаллический порошок) представляет собой молекулярный комплекс хинона и гидрохинона (1:1), который в водной среде в незначительной степени распадается на хинон и гидрохинон:



На электроде протекает реакция:



Потенциал хингидронного электрода при  $25^\circ\text{C}$  выражается уравнением

$$\varphi = \varphi_{\text{хг}}^0 + \frac{0,059}{2} \lg \frac{[\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2][\text{H}^+]^2}{[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2]} \quad (46).$$

В кислых растворах степень диссоциации гидрохинона очень мала, поэтому практически концентрации хинона и гидрохинона можно считать равными и потенциал хингидронного электрода можно представить:

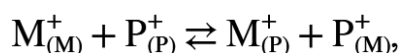
$$\varphi = \varphi_{\text{хг}}^0 + \frac{0,059}{2} \lg [\text{H}^+]^2 = \varphi_{\text{хг}}^0 - 0,059\text{pH} \quad (47).$$

Стандартный потенциал хингидронного электрода  $\varphi_{\text{хг}}^0$  при  $25^\circ\text{C}$  равен  $0,699$  В. Электрод нельзя применять при  $\text{pH} > 9$ , а также в при-

сутствии окислителей и восстановителей, реагирующих с хиноном и гидрохиноном [42, с. 54–55].

В качестве индикаторных электродов в потенциометрии наряду с металлическими и окислительно-восстановительными электродами широко применяют *мембранные (ионоселективные) электроды*, которые имеют в своем составе полупроницаемую мембрану, отделяющую внутреннюю часть электрода (внутренний раствор) от анализируемого и обладающую способностью пропускать ионы только одного вида (катионы или анионы). Возникновение потенциала на мембранных электродах не связано с окислительно-восстановительными процессами на поверхности раздела фаз, а происходит в результате перераспределения ионов между мембраной и раствором электролита. Величина потенциала зависит от концентрации соответствующих ионов в растворе.

Равновесный ионообменный процесс на мембране можно представить выражением



где индекс (М) указывает на то, что соответствующий ион находится в мембране, а (Р) указывает на его содержание в растворе.

Основными характеристиками, на основании которых проводят оценку эффективности ионоселективных электродов, служат *предел обнаружения* вещества, *коэффициент электродной селективности* и *время отклика* [33, с. 109–110].

*Предел обнаружения* – это минимальное количество вещества (иона), которое аналитически определяется при использовании ионоселективного электрода. Для большинства электродов эта величина лежит в пределах  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  моль/л.

*Коэффициент электродной селективности*  $K'_{A/B}$  характеризует «отклик» электрода на определяемый ион ( $A^{n_i}$ ) в присутствии мешающего иона ( $B^{m_i}$ ): чем меньше величина коэффициента  $K'_{A/B}$ , тем выше селективность электрода к определяемому иону. Хорошие ионоселективные электроды характеризуются коэффициентом селективности порядка  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ .

*Время отклика* – промежуток времени (от долей секунды до нескольких минут) между моментом погружения электрода в раствор и моментом, когда потенциал электрода достигает равновесного значения. В связи с тем, что время установления равновесного значения

потенциала является функцией многих параметров, на практике за время отклика часто принимают время, в течение которого потенциал

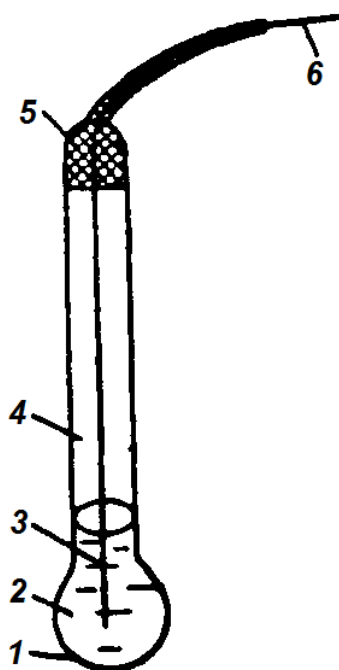


Рис. 21. Стекло́нный электрод [39, с. 139]:  
 1 – стеклянная рН-чувствительная мембрана, 2 – 0,1 М раствор HCl, насыщенный AgCl, 3 – серебряная проволо́чка, 4 – стеклянная трубка, 5 – изоляция, 6 – токоотвод

изменяется на 90% от величины максимального изменения при переносе электрода из раствора, в котором он содержится, в исследуемый раствор.

Различают первичные ионоселективные электроды, электроды с подвижными носителями и сенсibilизированные электроды.

Важнейшим среди *первичных ионоселективных электродов* является *стеклянный электрод* (рис. 21). Он представляет собой стеклянную трубку, заканчивающуюся с одной стороны шарообразной мембраной, изготовленной из специального стекла. Внутри трубка заполнена насыщенным раствором хлорида серебра в 0,1 М растворе соляной кислоты. Рабочим электродом выступает серебряная проволо́чка. При длительном вымачивании электрода в воде обе стороны стеклянной мембраны покрываются тонким (около  $10^{-4}$  мм) слоем гидратированного геля, образовавшегося в результате гидролиза стекла и вымывания ионов  $\text{Na}^+$  с его поверхности. Образовавшиеся пустоты в Si–O каркасе на поверхности заняты ионами  $\text{H}^+$ . При движе-

нии внутрь мембраны число пустот, заполненных ионами  $\text{H}^+$ , уменьшается, а число пустот, заполненных ионами  $\text{Na}^+$ , увеличивается. В объеме сухого стекла заряд переносится ионами  $\text{Na}^+$  [39, с. 139]. В результате описанного процесса обратимой адсорбции водородных ионов поверхностью стекла между внутренним и внешним раствором образуется мембранный потенциал, значение которого является функцией активности ионов  $\text{H}^+$  во внутреннем и внешнем растворе. Потенциал стеклянного электрода можно описать уравнением

$$\varphi = \varphi^{\circ}_{\text{стекл}} - 0,059\text{pH} \quad (48).$$

Стандартный потенциал стеклянного электрода  $\varphi^{\circ}_{\text{стекл}}$  обычно не определяют. Эта операция заменяется настройкой приборов по стан-



дартным буферным растворам, т. к. шкала рН-метров проградуирована непосредственно в единицах рН.

Широко распространены первичные ионообменные электроды с мембраной, изготовленной из малорастворимых твердых веществ (чаще всего из сульфида серебра или фторида лантана). Перенос заряда в твердой мембране происходит за счет дефектов ее кристаллической решетки. Вакансии могут заниматься только ионом определенного размера, формы и заряда, что обуславливает высокую селективность кристаллических мембран.

*Электроды с подвижными носителями* (рис. 22) имеют жидкие мембраны – удерживаемый на пористом полимере раствор ионита или незаряженного носителя ионов в органическом растворителе, который не смешивается с водой и обладает высокой диэлектрической проницаемостью, способствующей ассоциации ионов в фазе мембраны. Электроды с жидкими мембранами ионообменного типа находят применение главным образом для исследования различных катионов. В качестве примера можно назвать широко используемый в биологии кальциевый электрод, в котором ионообменной группой является анион диалкилфосфорной кислоты  $RO_2PO_2^-$ , где R представляет собой  $C_8H_{17}$  или  $C_{16}H_{33}$ , а органическим растворителем – диоктилфенилфосфонат  $C_6H_5PO(O_8H_{17})_2$ . Жидкостные мембраны с нейтральными носителями содержат растворимые макроциклические соединения, образующие с ионами щелочных металлов комплексы, устойчивые в неполярных растворителях. Одну из групп таких соединений образуют циклические депсипептиды (в цикле чередуются α-аминокислоты и α-оксикислоты), к которым относится наиболее известное соединение ионообменного характера – валиномицин [23, с. 221]. Он дает комплексы с ионами щелочных металлов и поэтому был выбран для калийселективных электродов. Размер внутренней поло-

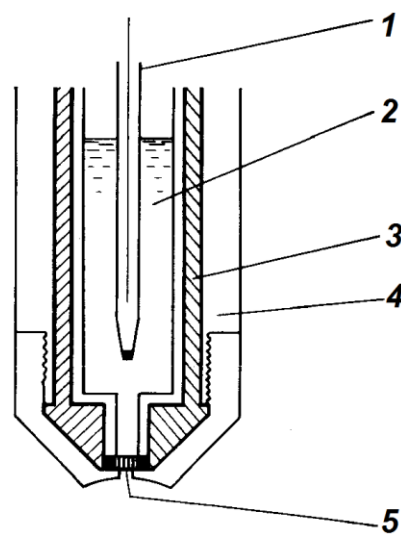


Рис. 22. Ионоселективный электрод с жидкой мембраной [33, с. 112]:

1 – внутренний электрод сравнения, 2 – внутренний раствор, 3 – резервуар с ионообменным раствором, 4 – корпус электрода, 5 – мембрана из пористого полимера, пропитанная ионообменным раствором

сти циклической молекулы валиномицина (2,7–3,3 А) соответствует диаметру иона калия (~2,7 А), что обуславливает очень высокую селективность электрода, позволяющего обнаружить ионы калия в присутствии  $10^4$ -кратного количества натрия [39, с. 143].

Среди *сенсibilизированных электродов* представляют интерес обладающие очень высокой селективностью *ферментные электроды*.

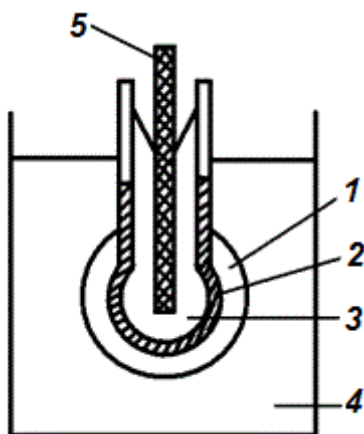
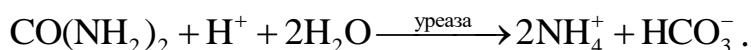


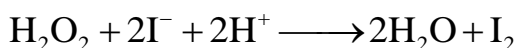
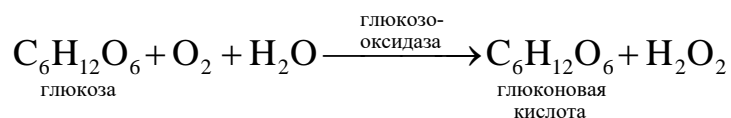
Рис. 23. Электрод для определения мочевины [39, с. 145]:

1 – гель, содержащий уреазу, 2 – стеклянная мембрана, селективная к ионам  $\text{NH}_4^+$ , 3 – стандартный раствор  $\text{NH}_4^+$ , 4 – субстрат, 5 – внутренний электрод сравнения

На их ионочувствительную мембрану нанесен фермент, катализирующий определенную реакцию, продукты которой вызывают отклик стеклянного электрода. На рис. 23 показана схема электрода для определения мочевины по реакции:



Посредством ионов аммония можно также определять аминокислоты, пользуясь оксидазой L-аминокислот. Определение ряда веществ основывается на измерении снижения концентрации иодид-иона, проводимом с помощью иодидного электрода. Примером служит определение глюкозы по уравнению



По понижению концентрации иодид-иона можно также определять сложные эфиры холестерина, свободный холестерин и т. п. [23, с. 222].

### Практическая реализация и применение потенциометрических методов

Потенциометрические методы анализа подразделяют на *прямую потенциометрию (ионометрию)* и *потенциометрическое титрование*.

Наибольшее распространение среди *прямых потенциометрических методов* получил метод определения рН (со стеклянным или хингидронным электродами), хотя создание надежно работающих

ионоселективных электродов значительно расширило возможности прямых методов.

В прямой потенциометрии обычно используют построение градуировочного графика или метод добавок. Поскольку, говоря строго, электродный потенциал является функцией не концентрации, а активности ионов, и ионная сила анализируемого раствора, от которой зависят коэффициенты активности, обычно неизвестна, определение концентраций с помощью потенциометрии сопряжено с некоторыми трудностями. При определении рН эти трудности были преодолены путем разработки шкалы рН на основе буферных растворов. Для других ионов делают различные допущения о коэффициентах активности, либо во все стандартные и анализируемые растворы добавляют фоновый (индифферентный) электролит, обеспечивающий постоянную ионную силу раствора и, соответственно, постоянство коэффициентов активности в условиях потенциометрических измерений.

По *методу градуировочного графика* измеряют ЭДС элемента при нескольких концентрациях определяемого иона в стандартных и в анализируемом растворе, строят график в координатах  $E - \lg c$  и по нему находят концентрацию иона в анализируемом растворе.

Оптимальным, особенно в случае анализа растворов сложного состава, является *метод добавок*, в котором концентрацию определяемого вещества находят путем добавления в анализируемый раствор известного объема стандартного раствора, содержащего определяемый компонент. Измеряя ЭДС в анализируемом растворе ( $E_1$ ) и после добавки ( $E_2$ ), концентрацию ионов рассчитывают по формуле

$$c_x = c_{ст} \frac{V_{ст}}{V_x + V_{ст}} \left( 10^{\frac{E_2 - E_1}{0,059}} - \frac{V_x}{V_x + V_{ст}} \right)^{-1} \quad (49).$$

где  $V_{ст}$  – объем стандартного раствора,  $V_x$  – объем анализируемого раствора,  $c_{ст}$  – концентрация стандартного раствора,  $c_x$  – концентрация анализируемого раствора.

Число молей определяемого вещества в добавке должно быть близко к числу молей этого вещества в анализируемом растворе, чтобы повысить его концентрацию приблизительно вдвое.

Погрешность метода прямой потенциометрии составляет обычно 1–2%. Главной причиной искажения результатов является наличие диффузионного потенциала, который можно свести к небольшой и

воспроизводимой величине, однако полностью пренебречь им в прямой потенциометрии нельзя [39, с. 125].

Важными преимуществами потенциометрического метода являются экспрессность, простота проведения измерений, возможность проводить определения в мутных, окрашенных, вязких растворах без операций фильтрации и перегонки, т. е. без нарушения целостности объекта исследования. Ионметрия успешно применяется в анализе объектов окружающей среды, лекарственных препаратов, продуктов питания. Без ионоселективных электродов трудно представить современную биологию и медицину. Примерами могут служить упоминавшиеся выше калийселективный электрод с мембраной на основе валиномицина для определения калия в крови при операциях на сердце или кальциевый электрод для определения ионов кальция, влияющих на нервную деятельность, функции ферментов и другие физиологические процессы. Известны микроэлектроды, которые позволяют проводить измерения на клеточном уровне [39, с. 121].

*Потенциометрическое титрование* основано на определении точки эквивалентности (конечной точки титрования) по резкому изменению (скачку) потенциала индикаторного электрода. Метод применяют для реакций нейтрализации, осаждения, комплексообразования и окислительно-восстановительных реакций. Во всех случаях индикаторный электрод должен быть обратимым либо по отношению к ионам водорода в растворе, либо по отношению к ионам, образующим комплексное или труднорастворимое соединение.

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 раствор взаимодействующего с ним реагента известной концентрации (стандартный раствор, или титрант) и каждый раз измеряют ЭДС элемента. Для нахождения точки эквивалентности строят кривую титрования.

На рис. 24, а представлена кривая титрования соляной кислоты гидроксидом натрия. Она почти точно воспроизводит теоретическую кривую титрования сильной кислоты сильным основанием. В области до точки эквивалентности (примерно до приливания 90% теоретически необходимого количества титранта) происходит медленное моно-

тонное изменение потенциала. На среднем участке кривой даже незначительное добавление титранта вызывает резкое изменение потенциала электрода. По этому скачку потенциала на кривой титрования определяют точку эквивалентности, в которой количество добавленного титранта строго эквивалентно количеству определяемого вещества (что аналогично изменению окраски раствора при обычном титровании). При дальнейшем добавлении титранта темп изменения потенциала вновь существенно замедляется.

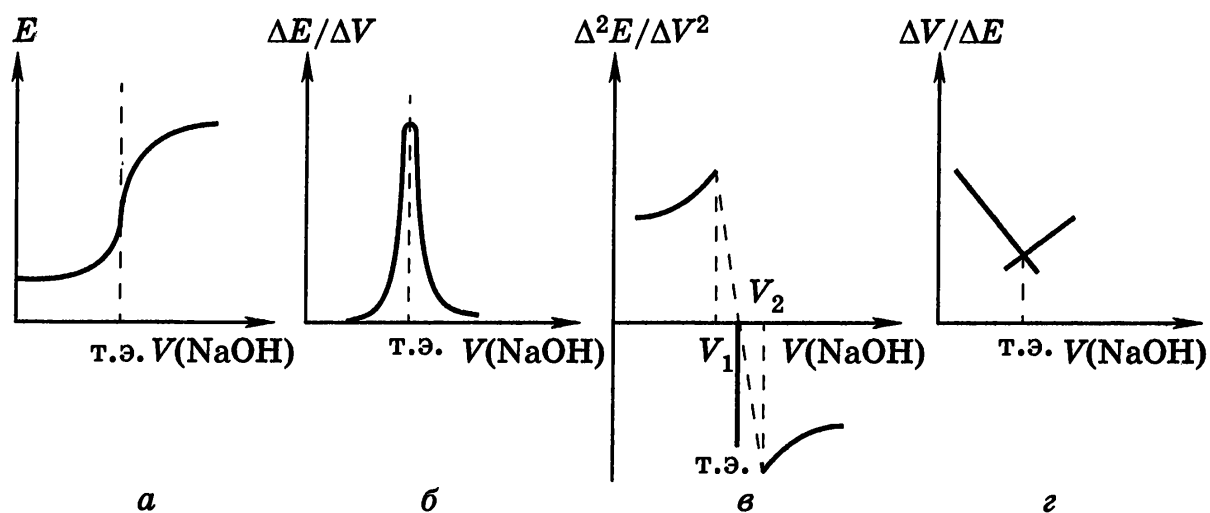


Рис. 24. Кривые потенциметрического титрования [8, с. 202]:  
*a* – обычная кривая, *б* – дифференциальная кривая, *в* – кривая титрования по второй производной, *г* – кривая Грана

Для более точно нахождения точки эквивалентности можно построить дифференциальную кривую (рис. 24, б) и определить объем титранта по максимуму на полученной кривой. Поскольку производная функции, имеющей максимум, в точке максимума равна нулю, вторая производная потенциала по объему в точке эквивалентности будет равна нулю. Это свойство также используется для нахождения точки эквивалентности (рис. 24, в). В методе Грана точка эквивалентности определяется по графику в координатах  $\Delta V/\Delta E - V$ . Перед точкой эквивалентности и после нее кривая Грана линейна, а сама точка эквивалентности находится на пересечении этих прямых (рис. 24, г) [8, с. 203].

Преимущества потенциметрического титрования перед обычным титрованием заключаются в более высокой точности и чувствительности, возможности титрования мутных и окрашенных растворов

и других веществ, для которых не применимы или отсутствуют цветные индикаторы, возможности использования неводных растворителей для титрования веществ, нерастворимых или разлагающихся в воде. К недостаткам потенциометрического титрования можно отнести не всегда быстрое установление потенциала после добавления титранта и необходимость во многих случаях делать при титровании большое число отсчетов. В физико-химических и биологических исследованиях метод применяют не только для измерения концентрации ионов, но и для определения констант диссоциации кислот и констант нестойкости комплексных соединений. Погрешность определения составляет 0,5–1,0%. В отличие от прямой потенциометрии здесь не существует искажения результатов за счет диффузионного потенциала и нет необходимости знать коэффициенты активностей определяемых ионов [8, с. 210–211].

## Лабораторная работа № 6

### *ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ ГЛИЦИНА*

Соотношение различных форм аминокислот при разных значениях рН можно определить методом потенциометрического титрования. На рис. 25 представлена кривая потенциометрического титрования глицина. Если исходный раствор глицина, находящийся в изоэлектрической точке рI (при этом значении рН в растворе присутствуют только биполярные ионы – цвиттер-ионы), титруют кислотой, то по мере добавления кислоты с уменьшением рН (точка *C*) в растворе будут появляться катионы глицина, согласно уравнению



Если глицин на 50% нейтрализован кислотой, то  $\text{pH} = \text{pK}_1$  и в растворе будет находиться 50% цвиттер-ионов и 50% катионов.

При добавлении щелочи и увеличении рН (точка *D*) в растворе наряду с цвиттер-ионами будут появляться анионы аминокислоты согласно уравнению



Небольшое изменение рН в области  $\text{pH} = \text{pK}_1$  и  $\text{pH} = \text{pK}_2$  при добавлении HCl и NaOH связано с максимальным буферным действием систем: слабая кислота – глицин и ее соль с сильным основанием и слабое основание – глицин и его соль с сильной кислотой.

У макромолекул белков много диссоциирующих кислотных и основных групп с различными значениями рК. В отличие от кривой титрования глицина, на которой имеются два перегиба в области рН = рК<sub>1</sub> и рН = рК<sub>2</sub>, кривые титрования белков имеют множество перегибов, что свидетельствует о том, что буферные свойства белков проявляются в широком диапазоне рН.

Одним из белков с сильным буферным действием является гемоглобин. Его значение объясняется влиянием оксигенации на способность связывать или освобождать ионы водорода. Восстановленный гемоглобин является более слабой кислотой или соответственно более сильным сопряженным основанием, чем оксигемоглобин (константа кислотной диссоциации гемоглобина Нв равна  $6,6 \cdot 10^{-9}$ , а оксигемоглобина НвО<sub>2</sub>  $2,4 \cdot 10^{-7}$ ).

Проходя через ткани, кровь отдает кислород и поглощает СО<sub>2</sub>; при этом НвО<sub>2</sub> превращается в Нв. Насыщение крови СО<sub>2</sub> должно было бы повысить ее кислотность, однако этого не происходит, т. к. появившиеся ионы водорода полностью связываются сильным основанием – анионом восстановленного гемоглобина [42, с. 32–35].

**Оборудование:** рН-метр, стаканы на 50 мл, бюретки.

**Реактивы:** 0,01 М раствор глицина, 0,1 М раствор соляной кислоты, 0,1 М раствор гидроксида натрия.

**Ход работы.** В два стакана вместимостью 50 мл наливают по 20 мл 0,01 М раствора глицина. С помощью рН-метра измеряют рН до введения титрующего реагента и после прибавления его. Титруют 0,1 М раствором НСl, добавляя из бюретки отдельными порциями по 0,1 мл, затем 2–3 раза по 0,3 мл, 2 раза по 0,5 мл и 3 раза по 1,0 мл. Таким же образом титруют другую порцию глицина 0,1 М раствором NaOH [42, с. 64].

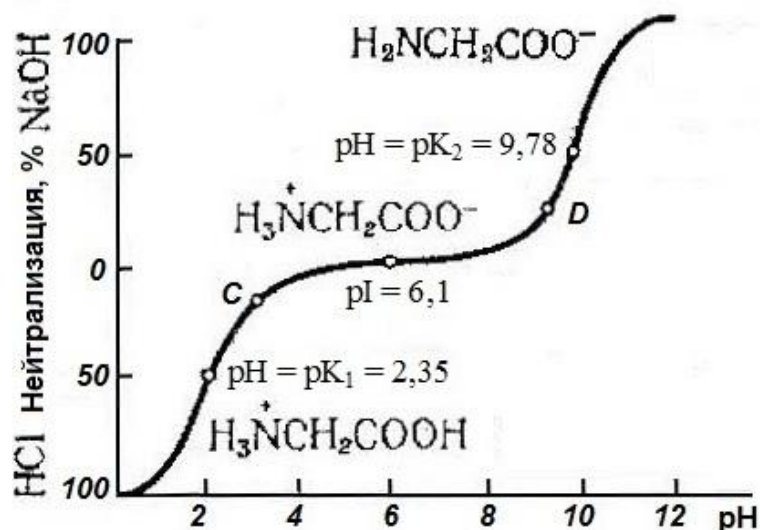


Рис. 25. Кривая потенциометрического титрования глицина [42, с. 34]

На основании полученных результатов строят кривую титрования и для одной из точек кривой рассчитывают количественное соотношение форм глицина, исходя из уравнений

$$\text{pH} = \text{pK}_1 + \lg \frac{[{}^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-]}{[{}^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COOH}]},$$

$$\text{pH} = \text{pK}_2 + \lg \frac{[\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-]}{[{}^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-]}.$$

### Контрольные вопросы

1. На чем основаны потенциометрические методы анализа?
2. Какая зависимость выражается уравнением Нернста?
3. Что такое гальванический элемент? Как измеряют ЭДС?
4. Как устроен стандартный водородный электрод?
5. Какие функции выполняют электроды сравнения? Как устроены каломельный и хлорсеребряный электроды?
6. Как устроен стеклянный электрод? Как с его помощью определяют pH раствора?
7. Как устроены основные типы ионоселективных электродов?
8. В чем сущность методов прямой потенциометрии?
9. В каких координатах строят кривые потенциометрического титрования?
10. Каково значение потенциометрических методов в биологических исследованиях?

## 2.2. ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ И КУЛОНОМЕТРИЯ

### Теоретические основы электролиза

Рассматриваемые в этом разделе методы основаны на применении *электролиза* – окислительно-восстановительного процесса, протекающего на электродах при прохождении постоянного электрического тока через раствор или расплав электролита.

Процессы, протекающие при электролизе, по существу обратны процессам, имеющим место в гальванических элементах, которые рассматривались в предыдущем разделе. При работе гальванического



элемента реакции идут самопроизвольно, и их энергия превращается в электрическую, а при электролизе не протекающие самопроизвольно химические реакции осуществляются за счет электрической энергии внешнего источника. В отличие от гальванического элемента, при электролизе анод заряжен положительно, а катод – отрицательно, но в обоих случаях на катоде идет восстановление, а на аноде – окисление. Вещество, восстанавливающееся на катоде или окисляющееся на аноде, называется *электрохимически активным (электроактивным)*.

Электролиз проводится в специальных аппаратах – электролитических ячейках, или электролизерах. Простейшая схема электролизера представлена на рис. 26. В тех случаях, когда необходимо исключить взаимодействие продуктов, образующихся на электродах, в электролизер вводится пористая перегородка – диафрагма, разделяющая его на анодное и катодное пространства.

Из возможных процессов на электродах будет протекать те, для которых минимальна затрата энергии. На катоде восстанавливаются прежде всего электрохимические системы, имеющие наибольший электродный потенциал, а на аноде окисляются системы с наименьшим электродным потенциалом. Значения электродных потенциалов для водорода и металлов приведены в табл. 5.

При электролизе водных растворов в процессе возможно участие воды, при этом на *катоде* могут быть выделены не только малоактивные металлы, имеющие потенциал, больший, чем у водорода, но и ряд металлов средней активности. Это обусловлено двумя обстоятельствами. Во-первых, положение водорода в ряду стандартных потенциалов (ряду напряжений) обусловлено величиной его стандартного потенциала, равной нулю. В нейтральных растворах согласно уравнению Нернста (45)  $\varphi_{2H^+/H_2} = -0,059 \cdot 7 = -0,413$  В, т. е. на катоде могут выделяться такие металлы, как свинец, олово, никель. Во-вторых, выделение водорода на катоде, как правило, происходит при

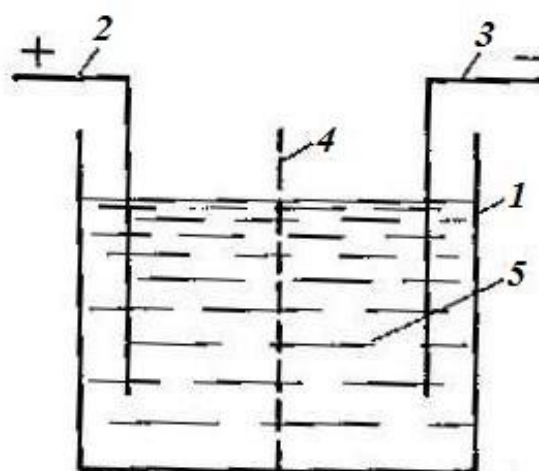


Рис. 26. Электролизер [4, с. 169]:  
1 – корпус, 2 – анод, 3 – катод,  
4 – диафрагма, 5 – электролит

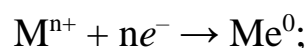
Таблица 5

Ряд стандартных электродных потенциалов металлов [4, с. 183–184]

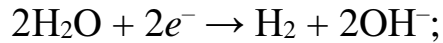
Металл	Катион	$\varphi^0$ , В	Процесс на катоде
Li	Li <sup>+</sup>	-3,04	выделение водорода
Cs	Cs <sup>+</sup>	-3,03	
Rb	Rb <sup>+</sup>	-2,98	
K	K <sup>+</sup>	-2,93	
Ba	Ba <sup>2+</sup>	-2,91	
Sr	Sr <sup>2+</sup>	-2,90	
Ca	Ca <sup>2+</sup>	-2,87	
Na	Na <sup>+</sup>	-2,71	
Mg	Mg <sup>2+</sup>	-2,37	
Be	Be <sup>2+</sup>	-1,85	
U	U <sup>3+</sup>	-1,80	
Al	Al <sup>3+</sup>	-1,70	
Ti	Ti <sup>2+</sup>	-1,63	
Zr	Zr <sup>4+</sup>	-1,53	
Mn	Mn <sup>2+</sup>	-1,18	
Zn	Zn <sup>2+</sup>	-0,76	
Cr	Cr <sup>3+</sup>	-0,74	
Fe	Fe <sup>2+</sup>	-0,44	
Cd	Cd <sup>2+</sup>	-0,40	
Co	Co <sup>2+</sup>	-0,28	
Ni	Ni <sup>2+</sup>	-0,23	
Mo	Mo <sup>3+</sup>	-0,20	
Sn	Sn <sup>2+</sup>	-0,14	
Pb	Pb <sup>2+</sup>	-0,13	
<b>H<sub>2</sub></b>	<b>H<sup>+</sup></b>	<b>0,00</b>	
Ge	Ge <sup>4+</sup>	+0,12	выделение металла
Bi	Bi <sup>3+</sup>	+0,32	
Cu	Cu <sup>2+</sup>	+0,34	
Ag	Ag <sup>+</sup>	+0,80	
Hg	Hg <sup>2+</sup>	+0,85	
Pt	Pt <sup>2+</sup>	+0,96	
Pd	Pd <sup>2+</sup>	+0,98	
Au	Au <sup>+</sup>	+1,69	

потенциалах более отрицательных по сравнению с его равновесным потенциалом (вычисленным по уравнению Нернста). Отклонение потенциала электрода от равновесного значения при протекании тока называется *перенапряжением*. Так, перенапряжение водорода на медном катоде составляет 0,23 В, на свинцовом – 0,64 В, а на ртутном – 0,78 В. Электроды, на которых велико перенапряжение, называют поляризуемыми. Поляризация связана как с медленной диффузией реагирующего вещества к электродам (перенапряжение диффузии), так и с медленным разрядом ионов на электродах (перенапряжение замедленного разряда, которое зависит от электродной реакции и материала, из которого сделан электрод). Таким образом, на катоде возможны следующие варианты восстановления:

1) катионы металлов, стоящие в ряду напряжений после водорода, восстанавливаются:

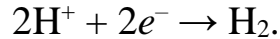


2) катионы металлов, имеющие малые величины стандартных электродных потенциалов (от Li<sup>+</sup> до Al<sup>3+</sup> включительно), не восстанавливаются на катоде, а происходит восстановление молекул воды:



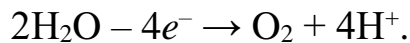
3) катионы металлов, расположенные в ряду напряжений между алюминием и водородом, восстанавливаются одновременно с молекулами воды;

4) при электролизе растворов сильных кислот возможно восстановление катионов водорода:

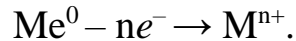


Если в системе присутствуют катионы нескольких металлов, то порядок их восстановления таков: чем положительнее потенциал  $\varphi_{\text{M}^{n+}/\text{M}}$ , т. е. чем менее активен металл, тем он легче восстанавливается. Таким образом, если одновременно в системе находятся ионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ag}^+$ , то вначале на катоде будет выделяться серебро, а затем – медь [10, с. 299].

На инертном *аноде* (изготовленном из графита, угля, нержавеющей стали, благородных металлов или других трудно окисляемых материалов) при электролизе водных растворов бескислородных кислот и их солей (за исключением плавиковой кислоты  $\text{HF}$  и фторидов) анионы  $\text{I}^-$  ( $\varphi^0 = +0,54$  В),  $\text{Br}^-$  ( $\varphi^0 = +1,07$  В),  $\text{Cl}^-$  ( $\varphi^0 = +1,36$  В) сравнительно легко окисляются и выделяются в виде  $\text{I}_2$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ , а легче всех окисляется ион  $\text{I}^-$ . В случае, если растворы содержат анионы кислородсодержащих кислот ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), то на аноде будут окисляться молекулы воды ( $\varphi^0 = +1,23$  В):



Если анод изготовлен из металла, ионы которого присутствуют в растворе, то при электролизе происходит процесс окисления анода с образованием соответствующих ионов металла (такой вариант электролиза применяется в-основном для очистки металлов):



Основные законы электролиза были открыты М. Фарадеем в 1832–1836 г. Они определяют соотношение между массой вещества, образующегося на электроде, и количеством электричества, прошедшего через раствор.

*Первый закон Фарадея:* масса вещества, образующегося на электроде, пропорциональна количеству электричества, пропущенного через раствор.

Количество электричества  $Q$  можно рассчитать по формуле

$$Q = It \quad (50).$$

где  $I$  – сила тока, А;  $\tau$  – продолжительность пропускания тока, с. Количество электричества выражают в кулонах ( $1 \text{ Кл} = 1 \text{ А} \cdot \text{с}$ ), ампер-часах ( $1 \text{ А} \cdot \text{ч} = 3600 \text{ Кл}$ ) или фарадеях ( $1 F = 96485 \text{ Кл} = 26,8 \text{ А} \cdot \text{ч}$ ). Фарадей, или постоянная Фарадея  $F$  – это заряд, который несет на себе 1 моль электронов или 1 моль однозарядных ионов.

*Второй закон Фарадея:* для разряда одного моля ионов на электроде через раствор необходимо пропустить столько фарадеев электричества, сколько элементарных зарядов имеет данный ион.

Математически суть законов Фарадея можно выразить так:

$$F = \frac{QM}{mn} \quad (51),$$

где  $m$  – масса вещества, выделившегося при электролизе, г;  $M$  – молярная масса вещества, г/моль;  $n$  – число элементарных зарядов иона или число электронов, участвующих в электродной реакции.

Таким образом, при пропускании через раствор нитрата серебра 96485 Кл на катоде разрядится 1 моль ионов  $\text{Ag}^+$  и получится 1 моль атомов серебра. При электролизе раствора хлорида меди (II) для восстановления 1 моль ионов  $\text{Cu}^{2+}$  через раствор должно пройти  $2 \cdot 96485$  Кл электричества. Точно так же при пропускании через раствор бромида калия 1  $F$  электричества на аноде окисляется 1 моль бромид-ионов и образуется 0,5 моль  $\text{Br}_2$  [10, с. 302–303].

В реальных условиях только часть пропущенного электричества расходуется на выделение нужного вещества, что связано с наличием конкурирующих реакций и расходом энергии на нагревание электролита и электродов (так называемыми омическими потерями энергии). Количественной характеристикой полноты использования тока является *выход по току*  $\eta$  – отношение массы практически выделившегося вещества  $m_{\text{пр}}$  к массе, рассчитанной по закону Фарадея,  $m_{\text{теор}}$ :

$$\eta = \frac{m_{\text{пр}}}{m_{\text{теор}}} \cdot 100\% \quad (52).$$

Старейшим методом анализа, основанным на применении законов Фарадея, является *электрогравиметрия* (известна с 1864 г.). Она заключается в измерении массы вещества, выделившегося в процессе электролиза на предварительно взвешенном электроде. В настоящее время метод применяется только для определения меди и анализа медных сплавов [39, с. 196]. Ниже будут рассмотрены более универсальные вольтамперометрические и кулонометрические методы.

## Методы анализа и исследования, основанные на применении электролиза

### Вольтамперометрия

*Вольтамперометрия* – совокупность методов анализа и исследования, основанных на определении зависимости силы тока в цепи электролитической ячейки от потенциала индикаторного электрода, на котором реагирует исследуемое электрохимически активное вещество.

Особенностью электролитической ячейки в вольтамперометрии является очень большое различие площадей поверхности электродов. Индикаторный электрод (микроэлектрод) имеет значительно меньшую площадь поверхности, и соответственно во много раз большую плотность тока, чем электрод сравнения, поэтому при включении развертки внешнего напряжения микроэлектрод легко поляризуется, а потенциал электрода сравнения остается практически постоянным [39, с. 161].

В качестве индикаторного электрода используют стационарные и вращающиеся микроэлектроды из ртути, платины или токопроводящих углеродных материалов (графита, сероуглерода). Поскольку ртуть является жидким металлом, электродом может служить либо неподвижно закрепленная капля, либо капли, вытекающие под давлением столба ртути из тонкого капилляра. Такой электрод называется *ртутным капающим электродом*. В качестве электрода сравнения могут использоваться хлорсеребряный, каломельный электроды, а в простейшем случае – слой металлической ртути на дне сосуда (донная ртуть).

Классический вариант вольтамперометрии с использованием в качестве катода ртутного капающего электрода (рабочая область потенциала от 0,3 до –2,0 В) называется *полярографией*. Метод был разработан в 1922 г. чешским химиком Я. Гейровским [4, с. 210]. Принципиальная схема полярографической установки показана на рис. 27. Исследуемый раствор подвергают электролизу, подавая на электроды постоянно возрастающее напряжение (его меняют с помощью реохорда или делителя напряжения со скоростью 2–5 мВ/с) и фиксируя гальванометром изменение силы тока, проходящего через раствор.

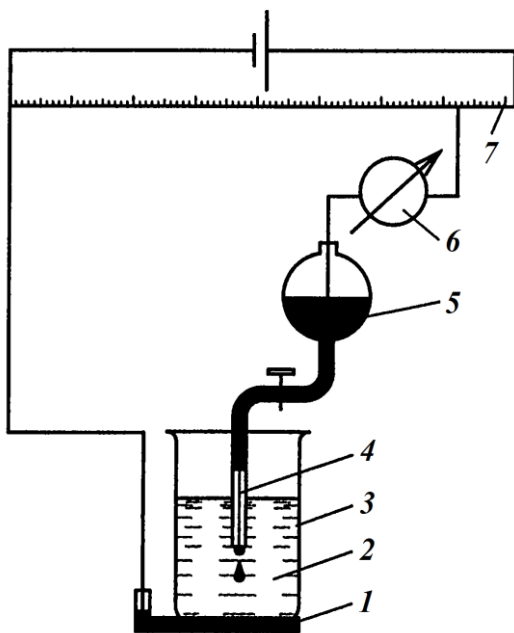


Рис. 27. Схема полярографической установки [8, с. 217]:

- 1 – донная ртуть (ртутный анод),
- 2 – анализируемый раствор,
- 3 – электролизер, 4 – ртутный капаящий электрод, 5 – резервуар ртути, 6 – гальванометр, 7 – реохорд или делитель напряжения

Для уменьшения сопротивления раствора в ячейку вносят большой избыток фонового электролита (например, хлорида натрия, калия или аммония), ионы которого переносят электрический ток, но сами не могут восстанавливаться в области подаваемых на катод потенциалов. Напряжение, которое подается на электроды, будет практически целиком определять потенциал катода. Прибор, позволяющий равномерно увеличивать подаваемое напряжение и регистрировать силу проходящего тока, называется *полярографом*, а получаемый график зависимости силы тока от потенциала, наложенного на полярографическую ячейку, – *вольтамперограммой (полярограммой)*.

Типичная полярограмма представлена на рис. 28. При небольших напряжениях, до тех пор, пока приложенный к катоду потенциал меньше потенциала, необходимого для восстановления определяемых ионов, сила тока, проходящего через раствор очень мала (участок 1). Это *остаточный ток*, протекающий на начальном пологом участке полярограммы, связан с возникновением двойного электрического слоя на границе раздела электрод – раствор (так называемый ток заряжения, или емкостной ток) и восстановлением микропримесей, например растворенного кислорода, который принято удалять до начала электролиза путем насыщения раствора азотом или другим инертным газом.

При достижении необходимой величины катодного потенциала на катоде начинается восстановление ионов металла и сила тока резко возрастает (участок 2 – *полярографическая волна*). В результате электрохимической реакции на ртутном капаящем электроде обычно образуются амальгамы:



На участке 2 рост тока как бы опережает рост потенциала электрода – электрод деполаризуется, поэтому вещество, участвующее в электрохимической реакции, часто называют *деполаризатором*. Затем на кривой появляется практически горизонтальный участок 3. Такой ток называется *предельным током*  $I_{пр}$ .

Рассмотрим природу предельного тока. Сила тока, проходящего через раствор, пропорциональна количеству ионов, восстанавливающихся в единицу времени на катоде. С увеличением подаваемого потенциала скорость восстановления увеличивается и возрастает сила тока. При этом слой раствора, прилегающий к катоду, обедняется восстанавливающимися ионами. Образующийся вблизи катода дефицит ионов пополняется за счет их диффузии из удаленной от катода части раствора. Скорость диффузии ионов пропорциональна разности концентраций в объеме раствора и вблизи катода. При некотором потенциале концентрация вблизи катода становится практически равной нулю. Тогда количество ионов, которые могут восстанавливаться на катоде в единицу времени, становится равным количеству ионов, поступающих к катоду за счет диффузии. С этого момента сила тока оказывается постоянной [10, с. 319–320].

Предельный ток может также включать в себя нежелательный миграционный ток, но его минимизируют, добавляя фоновые электролиты. При строгом соблюдении условий эксперимента величина предельного тока определяется скоростью диффузии деполаризатора. Предельный ток, контролируемый диффузией, называют *диффузионным током*  $I_d$ . Количество ионов, диффундирующих в единицу времени к катоду, а значит и  $I_d$ , пропорциональны концентрации ионов в растворе. Эта зависимость передается *уравнением Ильковича*:

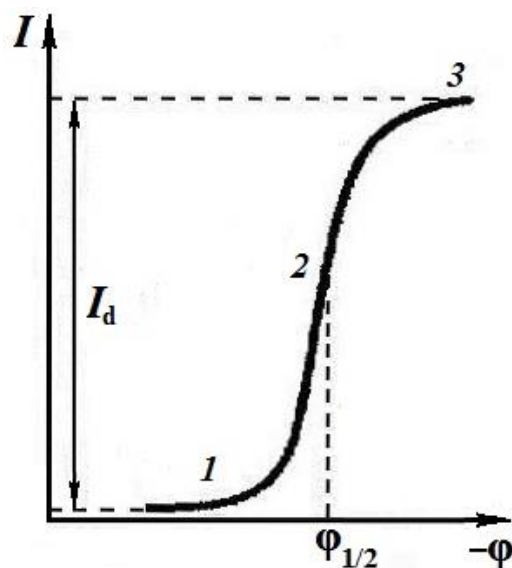


Рис. 28. Полярограмма [10, с. 319]:

- 1 – остаточный ток, 2 – полярографическая волна (фарадеевский ток), 3 – предельный ток,
- $I_d$  – диффузионный ток (разность между предельным и остаточными токами),
- $\Phi_{1/2}$  – потенциал полуволны

$$I_d = 607nD^{1/2}m^{2/3}\tau^{1/6}c \quad (53),$$

где  $I_d$  – сила диффузионного тока, мкА;  $n$  – число электронов, участвующих в электрохимической реакции;  $D$  – коэффициент диффузии, см<sup>2</sup>/с;  $m$  – масса ртути, мг, вытекающей из капилляра за 1 с;  $\tau$  – время жизни капли (период капания), с;  $c$  – концентрация иона, моль/л.

Потенциал ртутного электрода, на котором протекает электрохимическая реакция, можно выразить уравнением Нернста:

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{M^{n+}} \gamma_{M^{n+}}}{c_a \gamma_a} \quad (54),$$

где  $c^a$  – концентрация амальгамы,  $\gamma_a$  – коэффициент активности амальгамы,  $c_{M^{n+}}$  – концентрация ионов  $M^{n+}$  в приэлектродном слое,  $\gamma_{M^{n+}}$  – коэффициент активности ионов,  $\varphi^0$  – стандартный потенциал электрода.

Сила тока в цепи  $I$  пропорциональна разности концентраций в массе раствора ( $c_{M^{n+}}^0$ ) и в приэлектродном слое ( $c_{M^{n+}}$ ):

$$I = k_M (c_{M^{n+}}^0 - c_{M^{n+}}) \quad (55),$$

где  $k_M$  – коэффициент диффузии атома металла в ртути.

При увеличении потенциала электрода  $c_{M^{n+}} \rightarrow 0$ , и для силы предельного тока можно записать выражение

$$I_d = k_M c_{M^{n+}}^0 \quad (56).$$

При сочетании уравнений (55) и (56) получим

$$I = I_d - k_M c_{M^{n+}} \quad \text{или} \quad c_{M^{n+}} = \frac{I_d - I}{k_M} \quad (57).$$

Концентрация амальгамы, образовавшейся в результате процесса, пропорциональна силе тока:

$$c_a = \frac{I}{k_a} \quad (58),$$

Соотношения (57) и (58) подставляем в уравнение (54):

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(I_d - I) \gamma_{M^{n+}} k_a}{k_M I \gamma_a} \quad (59).$$

Выделим величины и коэффициенты, которые остаются постоянными или зависят только от температуры ( $\varphi^0$ ,  $k_M$ ,  $k_a$ ,  $\gamma_a$ ,  $\gamma_{M^{n+}}$ ) и запишем уравнение (59) в виде



$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{M^{n+}} k_a}{k_M \gamma_a} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I} \quad (60),$$

или, обозначив первое и второе слагаемое через  $\varphi_{1/2}$ :

$$\varphi = \varphi_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I} \quad (61).$$

Величина  $\varphi_{1/2}$  называется *потенциалом полуволны* и является характерной для данного вещества величиной, значение которой определяется только природой вещества. Чтобы найти величину  $\varphi_{1/2}$  на полярограмме, необходимо разделить  $I_{пр}$  пополам и опустить перпендикуляр на ось абсцисс (рис. 28).

Предположим, что в растворе присутствуют одновременно ионы трех металлов: цинка (II), кадмия (II) и свинца (II). В этом случае вольтамперограмма будет иметь вид, представленный на рис. 29. Потенциалы полуволны восстановления указанных ионов на ртутном капельном электроде на хлоридном фоне равны:

$$\begin{aligned} \varphi_{1/2} (\text{Pb}^{2+}) &= -0,41 \text{ В}, \\ \varphi_{1/2} (\text{Cd}^{2+}) &= -0,60 \text{ В}, \\ \varphi_{1/2} (\text{Zn}^{2+}) &= -1,02 \text{ В}. \end{aligned}$$

В тот момент, когда потенциал катода приблизится к  $-0,4 \text{ В}$ , на полярограмме появится первая волна, отвечающая восстановлению ионов  $\text{Pb}^{2+}$ . Высота этой волны будет пропорциональна концентрации ионов  $\text{Pb}^{2+}$  в растворе. При дальнейшем увеличении напряжения сила тока будет оставаться постоянной, пока потенциал катода не приблизится к величине  $-0,6 \text{ В}$  – в этот момент на кривой появится волна восстановления  $\text{Cd}^{2+}$ . Наконец, при потенциале  $-1,0 \text{ В}$  будет наблюдаться третья волна, обусловленная восстановлением ионов  $\text{Zn}^{2+}$  [10, с. 320].

В тех случаях, когда в растворе содержатся ионы с близкими значениями  $\varphi_{1/2}$ , селективность и точность метода можно повысить, если регистрировать зависимость от потенциала не тока, а производной тока от потенциала. В этом случае вместо полярографических волн получаются кривые с максимумами, потенциал которых соответствует  $\varphi_{1/2}$  обычной полярографической кривой, а высота пропор-

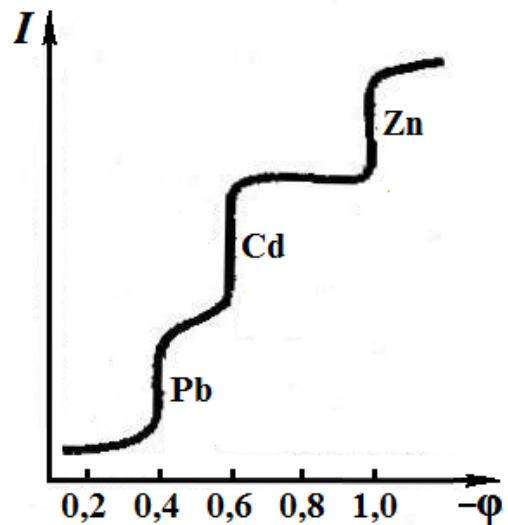


Рис. 29. Полярограмма при наличии в растворе ионов  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  [10, с. 319]

циональна концентрации исследуемого вещества. На рис. 30 показаны результаты определения ионов свинца и таллия,  $\varphi_{1/2}$  которых на фоне 2 М раствора нитрата калия различаются лишь на 0,06 В. На интегральной кривой оба иона образуют одну общую волну (рис. 30, а), а на дифференциальной четко видны два максимума (рис. 30, б).

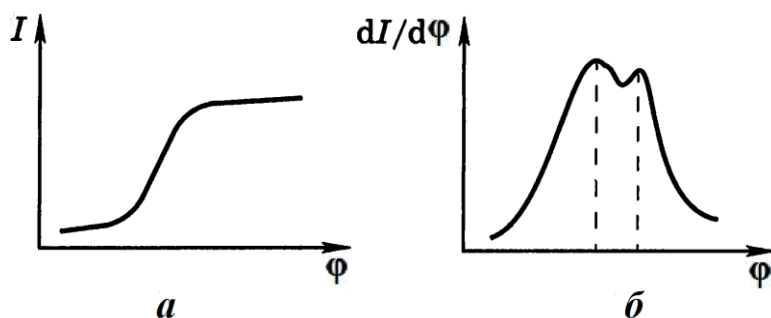


Рис. 30. Полярограммы раствора, содержащего  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  и  $\text{Tl}(\text{NO}_3)_2$  [8, с. 222]

полярографической волны  $h$ ) анализ большой группы растворенных веществ, которые восстанавливаются в рабочей области потенциала ртутного капающего электрода.

В количественном полярографическом анализе наиболее часто применяется *метод градуировочного графика*, который строят в координатах  $h - c$  по данным полярографирования серии растворов с известной концентрацией вещества. При строгой стандартизации условий полярографирования можно воспользоваться *методом стандартных растворов*. Если снять полярограммы стандартного и исследуемого раствора, то измерив  $h$ , можно составить пропорцию:

$$\frac{c_{\text{ст}}}{c_x} = \frac{h_{\text{ст}}}{h_x}, \text{ откуда } c_x = c_{\text{ст}} \frac{h_x}{h_{\text{ст}}} \quad (62),$$

где  $h_x$  и  $h_{\text{ст}}$  – высота волны при полярографировании анализируемого и стандартного растворов,  $c_x$  и  $c_{\text{ст}}$  – концентрации анализируемого и стандартного растворов.

По *методу добавок* концентрация анализируемого компонента определяется по формуле

$$c_x = c_{\text{ст}} \frac{I_x}{I_{x+\text{ст}} - I_x} \quad (63).$$

Ртутный капающий электрод характеризуется почти идеальной поляризуемостью в широком интервале потенциалов, обусловленной высоким перенапряжением выделения водорода на поверхности ртут-

Таким образом, полярографический метод позволяет производить качественный (по величинам потенциалов полу-волны  $\varphi_{1/2}$ ) и количественный (по величине  $I_{\text{пр}}$  или пропорциональной ей высоте

ной капли, и строгим чередованием зарождения, роста и отрыва капель, что обеспечивает хорошую воспроизводимость полярограмм.

Основными достоинствами твердых индикаторных микроэлектродов, изготовленных из платины и других благородных металлов, являются возможность работы в более положительной области потенциалов (до 1,3 В) и нетоксичность, однако они характеризуются медленным установлением предельного тока и невысокой чувствительностью из-за обновления поверхности электродов. Этих недостатков лишены вращающиеся платиновые микроэлектроды, при работе которых ионы к поверхности электрода доставляются не только за счет диффузии, но и за счет механического перемешивания.

Классическая полярография позволяет анализировать растворы с концентрацией исследуемых веществ до  $10^{-5}$  моль/л, используя небольшой объем пробы (до 1 мл и менее), но требует достаточно большого времени измерения (от 3 до 10 мин для одной пробы раствора). Погрешность анализа лежит в пределах 2%. В то же время при концентрации деполяризатора порядка  $10^{-5}$  моль/л регистрируемая величина фарадеевского тока становится сопоставимой с величиной помехи – емкостного тока [39, с. 173]. Разнообразные варианты усовершенствования полярографии развивались в поисках путей устранения этой помехи.

В методе *таст-полярографии* (от нем. *tasten* – «зондировать») измерение тока проводят не за весь период капания с регистрацией усредненного тока, а только в течение короткого времени перед отрывом ртутной капли (5–20 мс), поскольку, как было установлено, именно в момент отрыва капли отношение фарадеевского тока к емкостному максимально и условия измерения наиболее благоприятны. Чувствительность таст-полярографии примерно на порядок выше чувствительности классической полярографии, т. е. нижний предел обнаружения составляет около  $10^{-6}$  моль/л [3, с. 390–391].

В методе *вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала* (осциллографической вольтамперометрии), имеющем чувствительность  $\sim 10^{-6}$  моль/л, поляризующее постоянное напряжение подают с очень высокой скоростью (0,1–1 В/с), которая позволяет зарегистрировать всю полярограмму за время жизни одной капли. Для измерения быстро протекающих процессов изменения тока вместо гальванометра используют безынерционный осциллограф, а в настоящее

время также более совершенные записывающие устройства или компьютеры.

*Переменноточковая вольтамперометрия* объединяют группу методов, в которых на медленную линейную развертку потенциала накладывают периодические переменные импульсы потенциала с амплитудой 10–20 мВ. Измеряют не общий ток, проходящий через электрод, а только его переменную составляющую. Чувствительность метода составляет  $\sim 10^{-7}$  моль/л [3, с. 394].

Наиболее широко используется метод *инверсионной вольтамперометрии* (вольтамперометрии с накоплением), в котором исследуемое вещество электрохимическим путем осаждают (накапливают) на подложку – инертный ртутный или платиновый электрод, а затем электрод с тонким слоем осажденного вещества подвергают анодной поляризации с линейно изменяющимся потенциалом. Поскольку концентрация определяемого компонента, осажденного на подложке, на несколько порядков выше, чем в растворе, то величина регистрируемого тока тоже возрастает. Данный метод чрезвычайно чувствителен и позволяет обнаружить примеси металлов с концентрацией  $10^{-9}$  моль/л или даже ниже [3, с. 394].

Таким образом, вольтамперометрия позволяет определять тяжелые металлы и другие токсичные вещества в объектах окружающей среды на уровне ПДК и ниже. Из органических веществ на ртутном капельном электроде восстанавливаются альдегиды, кетоны, хиноны, галогенопроизводные, нитро- и нитрозосоединения, дисульфиды; окисляются такие вещества, как аскорбиновая кислота, гидрохиноны и др. [23, с. 227]. Микроэлектроды также нередко составляют часть устройств для измерения концентрации кислорода в биологически важных жидкостях, для исследования биохимических процессов, связанных с потреблением кислорода. С этой целью электрод погружают в подходящий электролит, отделенный от исследуемой жидкости полупроницаемой перегородкой, которая хорошо пропускает кислород, но не проницаема для биополимеров.

### **Амперометрическое титрование**

Амперометрическое титрование – метод количественного анализа, в котором точку эквивалентности (конечную точку титрования)

находят по зависимости предельного тока, соответствующего данному электрохимически активному веществу, от объема прибавленного титранта.

При выборе титранта необходимо иметь в виду, что в качестве электроактивного вещества может выступать не только определяемое вещество, но и сам титрант, либо продукт проходящей при титровании реакции. Таким образом, метод амперометрического титрования является более универсальным, чем прямая вольтамперометрия, поскольку определяемое вещество не обязательно должно быть электроактивным.

Раствор вещества, которое должно быть электроактивным, помещают в полярографическую ячейку, в него вводят фоновый электролит, помещают индикаторный электрод (вращающийся платиновый или графитовый), электрод сравнения и снимают вольтамперограмму. Затем в полярографическую ячейку наливают определенный объем анализируемого раствора и фоновый электролит, погружают соответствующие электроды и проводят электролиз при постоянном напряжении, величина которого была найдена из вольтамперограммы. К анализируемому раствору из бюретки небольшими порциями прибавляют титрант, измеряя величину предельного тока. На основании полученных экспериментальных данных строят кривую амперометрического титрования в координатах  $I_{пр} - V(\text{титранта})$ . Форма кривой титрования может быть различной в зависимости от характера реакции и природы электроактивного вещества.

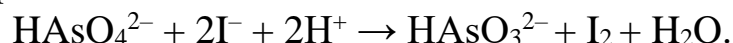
На рис. 31, а, изображена кривая титрования в случае, когда электроактивно определяемое вещество, например, при определении ионов серебра путем амперометрического титрования раствором хлорида калия на платиновом электроде. Ионы определяемого вещества и титранта взаимодействуют по реакции  $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl}\downarrow$ .

Концентрация ионов  $\text{Ag}^+$  в растворе перед титрованием максимальна. По мере титрования ионы  $\text{Ag}^+$  будут осаждаться на катоде в виде хлорида серебра, их концентрация в растворе будет уменьшаться, и, следовательно, величина предельного тока также будет уменьшаться, а после достижения точки эквивалентности останется практически неизменной.

Исходя из условий эксперимента, для нахождения точки эквивалентности по данной реакции может быть удобнее использовать

анодное окисление титранта – хлорид-ионов. В этом случае вводимые в раствор ионы  $\text{Cl}^-$  в ходе титрования будут окисляться на аноде, поэтому их концентрация, а значит и величина  $I_{\text{пр}}$  останется ничтожно малой, но после достижения точки эквивалентности в растворе появится избыток ионов  $\text{Cl}^-$  и сила тока резко возрастет (рис. 31, б).

Рис. 31, в, соответствует случаю, когда в качестве электроактивного вещества выступает продукт реакции. В качестве примера можно привести титрование мышьяковой кислоты иодидом калия:



В ходе титрования концентрация выделяющегося иода будет возрастать до точки эквивалентности, после чего останется постоянной.

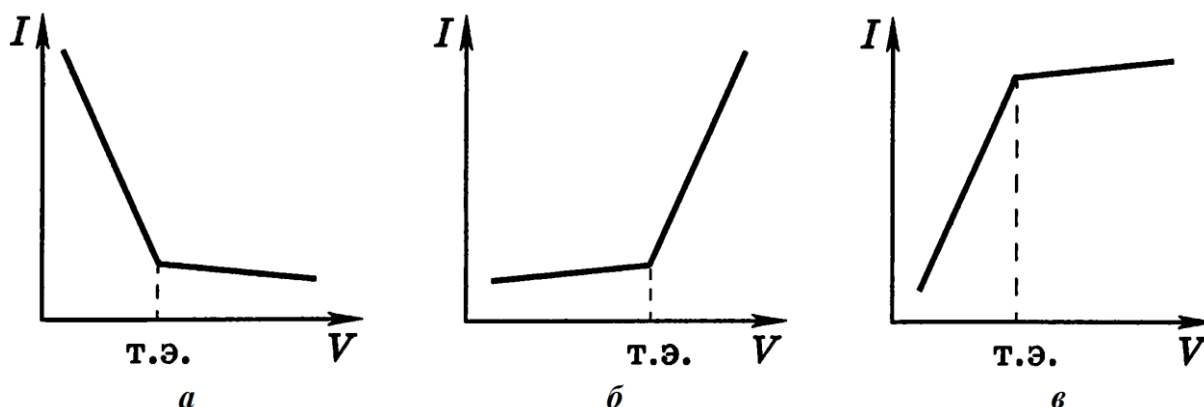
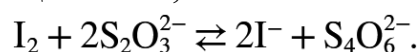


Рис. 31. Кривые амперометрического титрования для случаев, когда электроактивно определяемое вещество (а), титрант (б) и продукт реакции (в) [8, с. 225]

Ход титрования можно контролировать также по току, проходящему через два поляризуемых электрода, что реализуется в методе *биамперометрического титрования* (титрования до мертвой точки). По ходу реакции измеряют ток, возникающий между двумя одинаковыми (обычно платиновыми) электродами, на которые налагают небольшое напряжение. При исчезновении одного компонента обратимой окислительно-восстановительной пары из системы (или при появлении окислительно-восстановительной пары) в точке эквивалентности ток резко прерывается (или мгновенно появляется).

В качестве примера рассмотрим титрование иода тиосульфатом натрия при разности потенциалов 0,04 В:



Определяемое вещество образует на электроде обратимую систему  $\text{I}_2 + 2e^- \rightleftharpoons 2\text{I}^-$ , а равновесие в системе  $2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} - 2e^- \rightleftharpoons \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  уста-

навливается медленно и эту систему можно считать необратимой [28, с. 431–432]. До точки эквивалентности протекает ток, отвечающий окислению восстановленной формы на аноде ( $2\Gamma - 2e^- \rightarrow I_2$ ) и одновременно восстановлению продуктов реакции окисления на катоде ( $I_2 + 2e^- \rightarrow 2\Gamma$ ). Величина тока через ячейку определяется концентрацией  $I_2$ . По мере титрования свободный иод расходуется на реакцию с тиосульфатом. Увеличение скорости процесса и, следовательно, увеличение тока будет наблюдаться до тех пор, пока не будет оттитрована половина  $I_2$  и оба компонента пары  $I_2/2\Gamma$  не будут находиться в равных концентрациях. Затем ток начнет убывать и в точке эквивалентности при концентрации  $I_2$ , равной нулю, ток прекратится и при новом добавлении титранта не будет изменяться, т. к. при  $E = 0,04$  В ион  $S_2O_3^{2-}$  на катоде не восстанавливается. Кривая титрования имеет форму, изображенную на рис. 32. В целом же в биамперометрическом титровании часто отпадает необходимость в построении кривой титрования, т. к. точка эквивалентности может быть определена по резкому прекращению или появлению тока.

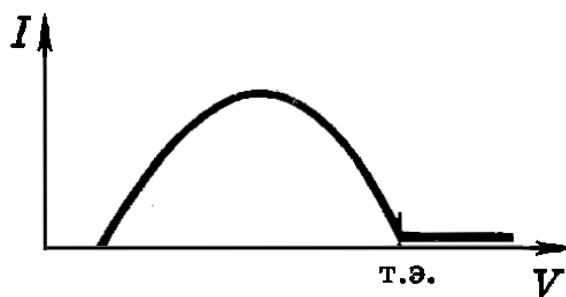


Рис. 32. Кривая амперометрического титрования с двумя индикаторными электродами для случая титрования обратимой системы необратимой [8, с. 228]

Метод применим при любых окислительно-восстановительных титрованиях, а также во многих титрованиях, построенных на реакциях осаждения, нейтрализации и комплексообразования, что позволяет подбирать условия для определения большинства элементов периодической системы и многих органических веществ.

Амперометрическое титрование и биамперометрическое титрование характеризуются экспрессностью, несложным аппаратным оформлением, возможностью анализа мутных и окрашенных растворов, высокой чувствительностью ( $10^{-5}$  моль/л и менее) [8, с. 230].

## Кулонометрия

*Кулонометрия* – метод исследования и анализа, основанный на измерении количества электричества, прошедшего через электролизер

при электрохимическом окислении или восстановлении вещества на рабочем электроде. Метод основан на законах Фарадея и его целесообразно использовать, когда определение массы анализируемого вещества электрогравиметрией, т. е. путем непосредственного взвешивания электрода, не может быть произведено достаточно точно или когда для анализа используется электрохимический процесс, не сопровождающийся образованием осадка на электродах.

Различают *прямую кулонометрию* и *кулонометрическое титрование*. Оба варианта кулонометрии можно проводить либо при постоянном потенциале рабочего электрода (потенциостатический режим), либо при постоянной величине тока (гальваностатический режим). Наиболее часто используются прямая кулонометрия при постоянном потенциале и кулонометрическое титрование при постоянной силе тока. Для кулонометрического анализа необходимо, чтобы электрохимическое превращение вещества протекало со 100%-ным выходом по току, т. е. при полном отсутствии побочных реакций [4, с. 215].

*Прямая кулонометрия при постоянном потенциале* (потенциостатическая, или амперометрическая кулонометрия) основана на измерении количества электричества, затраченного на электрохимическое окисление или восстановление анализируемого вещества при по-

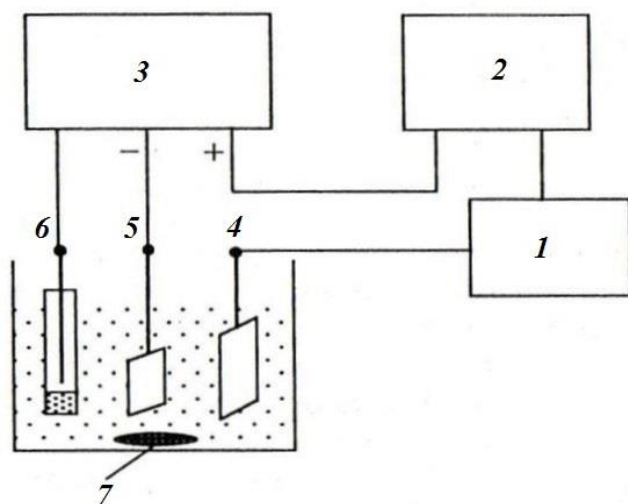


Рис. 33. Установка для потенциостатической кулонометрии [8, с. 239]:

1 – кулонометр, 2 – регистратор, 3 – потенциостат, 4 – вспомогательный электрод, 5 – рабочий электрод, 6 – электрод сравнения, 7 – мешалка

стоянном потенциале рабочего электрода, который устанавливается с помощью вольтамперограммы в области, где достигается предельный ток  $I_{пр}$  определяемого вещества. В прямой кулонометрии используются электрохимические ячейки, состоящие из рабочего электрода, потенциал которого поддерживается потенциостатом, вспомогательного электрода, составляющего вместе с рабочим электродом цепь электролиза, и электрода сравнения, относительно которого измеряется



потенциал рабочего электрода (рис. 33). Обычно используют платиновые или ртутные рабочие и вспомогательные электроды, реже применяют золотые, графитовые или серебряные электроды. В качестве электрода сравнения выбирают каломельные или хлорсеребряные полуэлементы, их контакт с анализируемым раствором осуществляется через солевой мостик. Момент завершения реакции обычно находят по прекращению изменения силы тока в течение некоторого времени, когда сила тока уменьшается почти до нуля (до значения остаточного тока). Уменьшение тока может быть связано с уменьшением не только объемной концентрации анализируемого вещества, но и его поверхностной концентрации из-за возникновения концентрационных градиентов. Для исключения подобных искажающих явлений применяют небольшие значения плотности тока и усиленное перемешивание раствора. С целью уменьшения длительности опыта часто используют ячейки щелевого типа с близким (десятки микрометров) расположением электродов [3, с. 388].

В процессе электролиза ток, протекающий через ячейку, уменьшается по экспоненциальному закону. Сила тока в любой момент времени определяется уравнением

$$I_{\tau} = I_0 \cdot e^{-k\tau} = I_0 \cdot 10^{-k'\tau}, \quad k = 2,303k' \quad (64),$$

где  $I_{\tau}$  – сила тока в момент времени  $\tau$ ,  $I_0$  – сила тока в момент начала электролиза,  $k$  и  $k'$  – константы, зависящие от условий электролиза.

Уравнение (64) может быть использовано для определения общего количества электричества  $Q$ , необходимого для электрохимического превращения исследуемого вещества, поскольку

$$Q = \int_0^{\infty} I_{\tau} d\tau \quad (65).$$

Количество электричества определяют с помощью механических или электронных интеграторов тока. Иногда пользуются менее точными приборами – кулонометрами различного типа, а также расчетными методами. Принцип действия кулонометров основан на том, что через последовательно включенный прибор в цепи протекает такой же ток, какой проходит через анализируемый раствор, и, следовательно, за некоторый промежуток времени через анализируемый раствор и через прибор пройдет одно и то же количество электричества. В последовательно включенном кулонометре со 100%-ным выходом протекает хорошо известная электрохимическая реакция, и измерение

количества электричества сводится, таким образом, к определению количества вещества, полученного в результате этого процесса.

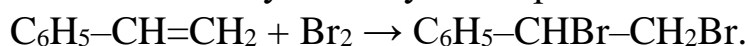
*Кулонометрическое титрование* основано на электролитическом генерировании титранта, реагирующего с определяемым веществом. Для этого в исследуемый раствор вносят вспомогательный реагент, продукт электролиза которого (промежуточный реагент) должен быстро и количественно взаимодействовать с определяемым веществом, т. е. играть роль титранта. Само определяемое вещество обычно бывает электрохимически неактивным. Кулонометрическое титрование проводят, поддерживая постоянное значение силы тока, и при этом задача эксперимента сводится, согласно соотношению (50), к измерению времени, в течение которого достигается точка эквивалентности.

Для кулонометрического титрования может быть использована любая реакция, применяемая в титриметрии: кислотно-основного взаимодействия, комплексообразования, осаждения, окислительно-восстановительная. Точку эквивалентности определяют визуально (с помощью индикаторов), либо с помощью инструментальных методов: амперометрических (по прохождению тока через дополнительный индикаторный электрод), потенциометрических (по резкому изменению потенциала индикаторного электрода), фотометрических (по изменению оптической плотности пробы с помощью фотометров, в соответствующем отделении которых устанавливают кулонометрическую ячейку) и др.

В качестве примера можно рассмотреть кулонометрическое определение стирола, в котором титрантом выступает бром. Он образуется на генераторном электроде (платиновом или золотом аноде) из бромида калия:



Титрование соответствует следующей реакции:



После окончания титрования (полного бромирования стирола) в растворе начинает накапливаться свободный бром, который можно обнаружить амперометрически. В этих случаях удобно использовать систему из двух платиновых индикаторных электродов, помещаемых непосредственно в анализируемый раствор на очень близких расстояниях друг друга. Восстановление молекулярного брома на индикаторном электроде происходит по следующей реакции:

торном катоде и окисление иона брома на индикаторном аноде даст ток в цепи, который будет расти по мере увеличения избытка брома в электролите.

Для сокращения продолжительности анализа титрование проводят при силе тока, обычно превышающей величину предельного тока определяемого вещества, но меньшей, чем предельный ток вспомогательного реагента, т. к. иначе будут протекать побочные электрохимические реакции (например, окисление или восстановление воды). Чтобы обеспечить 100%-ный выход по току, вспомогательный реагент берут, как правило, в 1000-кратном избытке по отношению к определяемому веществу. Вспомогательный реагент служит своего рода окислительно-восстановительным буфером, препятствующим смещению электродного потенциала до таких значений, при которых возможны нежелательные побочные электрохимические процессы.

Принципиальная схема установки для кулонометрического титрования (рис. 34) включает два блока: генерационный и индикационный (если индикация точки эквивалентности визуальная, то индикационный блок отсутствует). В генерационный блок входят внешний источник постоянного тока *1*, высокоомные сопротивления *2* для получения стабильного требуемого тока электролиза,

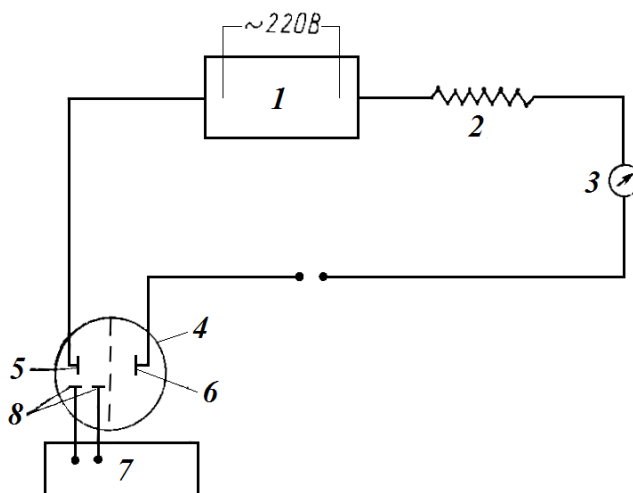


Рис. 34. Установка кулонометрического титрования при постоянной силе тока [8, с. 242]:

*1* – источник постоянного тока, *2* – высокоомное сопротивление, *3* – миллиамперметр, *4* – электролизер, *5* – генераторный электрод, *6* – вспомогательный электрод, *7* – индикационный блок, *8* – индикаторные электроды

миллиамперметр *3* для измерения тока, электролизер *4*, состоящий из катодной и анодной камер, в которые помещаются генераторный *5* и вспомогательный *6* электроды. Вспомогательный электрод погружен в стеклянную трубку, заполненную раствором индифферентного электролита, т. к. продукт реакций на вспомогательном электроде может мешать кулонометрическому определению. Раствор в ячейке

перемешивается магнитной мешалкой. Индикационный блок в зависимости от используемого инструментального метода индикации точки эквивалентности включает соответствующую установку 7. В случае применения потенциометрии или амперометрии индикаторные электроды 8 вставляют в генерационную камеру.

Современные кулонометрические приборы включают все необходимые узлы, позволяющие проводить анализ как кулонометрическим титрованием, так и методом потенциостатической кулонометрии. Эти методы легко поддаются автоматизации.

Кулонометрия наряду с электрогравиметрией является единственным физико-химическим абсолютным (безэталонным) методом анализа, не требующим приготовления стандартных растворов и построения градуировочных графиков. При электрогенерации можно получать титранты, которые обычным способом получить достаточно сложно или практически невозможно (например, стандартные растворы  $\text{Ag(III)}$ ,  $\text{Fe(II)}$ ). В рассмотренном примере определения стирола исключены неудобства, связанные с приготовлением стандартных растворов брома и необходимостью в титровании из бюретки этими нестойкими растворами. Контролируя силу тока при генерации титранта, можно «прибавлять» титрант сколь угодно малыми порциями. Качество современных приборов для измерения силы тока и времени позволяет достигать высокой точности определения (с погрешностью не более 0,01–0,05%). Чувствительность кулонометрических методов составляет  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  моль/л. Кулонометрия также характеризуется высокой селективностью, позволяя определять многие вещества в растворе без предварительного разделения [39, с. 157–159].

Кулонометрия может применяться для анализа практически любых металлов, галогенов и ряда органических веществ (ароматических аминов, нитро- и нитрозосоединений, фенолов, азокрасителей, амидов и др.), а также для исследования кинетики и механизма химических реакций (в том числе каталитических), определения констант равновесия реакций, изучения комплексообразования, коррозии и др.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое электролиз и электролитическая ячейка?
2. Как формулируются законы Фарадея для электролиза?

3. Какие процессы происходят на катоде при электролизе водных растворов?
4. Какие процессы происходят на инертном и растворимом аноде при электролизе водных растворов?
5. В чем состоит сущность вольтамперометрических методов?
6. Как устроена установка для полярографии?
7. Какие участки выделяют на полярограмме?
8. Какая зависимость передается уравнением Ильковича?
9. Какие приемы используются для проведения количественного полярографического анализа?
10. Что такое потенциал полуволны? Как проводится качественный полярографический анализ?
11. В чем заключаются преимущества и недостатки ртутного капяющего электрода?
12. Что представляет собой инверсионная вольтамперометрия?
13. Каково значение потенциометрических методов в биологических исследованиях?
14. В чем сущность амперометрического титрования?
15. Какой вид имеют кривые амперометрического титрования?
16. В чем заключается биамперометрическое титрование?
17. Что такое кулонометрия и каковы области ее применения?
18. Чем различаются установки для прямой кулонометрии и кулонометрического титрования?
19. Как проводится определение методом кулонометрического титрования?
20. Какова область применения кулонометрических методов?

## 2.3. КОНДУКТОМЕТРИЯ

### Теоретические основы кондуктометрии

*Кондуктометрия* (от англ. *conductivity* – «электропроводность» и греч. *μετρέω* – «измеряю») – совокупность методов исследования и анализа вещества, основанных на измерении электрической проводимости электролитов.

*Электрической проводимостью* (*электропроводностью*) называют способность вещества проводить электрический ток под дей-

ствием внешнего электрического поля. В растворах электролитов перенос электрического тока осуществляется ионами. Доли тока, переносимые ионами, определяются их зарядами и скоростью, с которой они передвигаются.

Для растворов электролитов, как и для электронных проводников, справедливы закон Ома и выражение зависимости сопротивления проводника от его длины и площади поперечного сечения:

$$E = IR = I \frac{\rho l}{S} \quad (66),$$

где  $E$  – разность потенциалов между электродами, В;  $I$  – сила тока, А;  $R$  – сопротивление, Ом;  $\rho$  – удельное сопротивление, Ом·см;  $l$  – расстояние между электродами (длина проводника второго рода – электролита), см;  $S$  – сечение (площадь поверхности), см<sup>2</sup>.

Электрическая проводимость – величина, обратная сопротивлению, ее единицей измерения является сименс (1 См = 1 Ом<sup>-1</sup>):

$$L = \frac{1}{R} \quad (67),$$

Величина, обратная удельному сопротивлению, называется *удельной электрической проводимостью*. Она обозначается через  $\kappa$ , ее размерность соответственно Ом<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> или См·см<sup>-1</sup>:

$$\kappa = \frac{1}{R} \quad (68).$$

Впервые измерение электропроводности ряда рас-

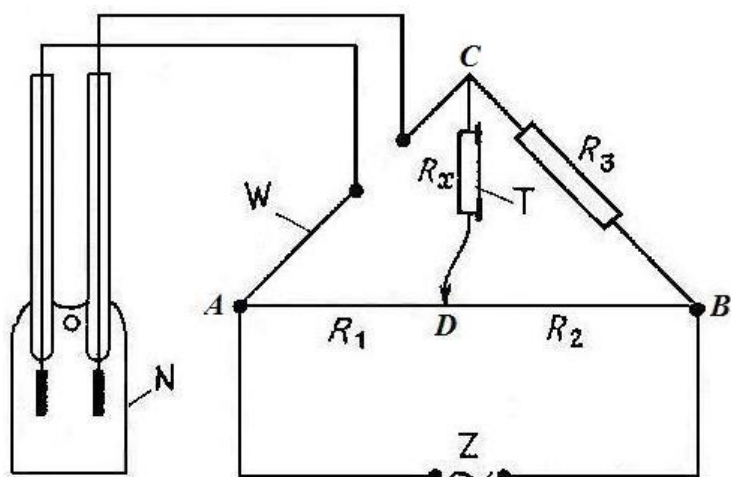


Рис. 35. Устройство для измерения электропроводности электролитов [23, с. 193]:  $N$  – кондуктометрическая ячейка,  $W$  – мостик Уитстона с соответствующими сопротивлениями  $R_x$ ,  $R_3$ ,  $R_2$  и  $R_1$ ,  $T$  – телефонная трубка,  $Z$  – источник переменного напряжения

творов осуществил в 1879 г. немецкий физик Ф. Кольрауш, предложивший использовать для этой цели мостик Уитстона и электролитическую ячейку с плоскопараллельными электродами (рис. 35). Мостик Уитстона состоит из четырех сопротивлений:  $R_x$  – измеряемое сопротивление кондуктометрической ячейки,  $R_3$  – известное сопротивление (декадный набор сопротивлений), остальные сопротивления

представляют собой участки проволоки между ее началом  $A$  и скользящим контактом  $D$  ( $R_1$ ) и между контактом  $D$  и концом проволоки  $B$  ( $R_2$ ). Мостик питается от источника переменного тока низкого напряжения с частотой порядка 1000 Гц. Если использовать постоянный ток, то на электродах будут происходить химические реакции (электролиз) и вблизи них – изменения концентрации электролита, что приведет к ошибочным значениям проводимости. При переменном токе эти искажения не наблюдаются, т. к. направление тока периодически меняется [23, с. 193–194].

Сопротивление измеряют, перемещая скользящий контакт  $D$  вдоль измерительной проволоки  $AB$ , пока индикатор  $T$  не покажет отсутствие тока. В качестве индикатора – указателя компенсации в простейшем случае служит телефонная трубка (компенсация наблюдается при минимальной силе звука), могут также использоваться гальванометр или осциллограф. При компенсации разность потенциалов в диагонали моста  $CD$  нулевая; по закону Кирхгофа

$$R_x = R_3 \frac{R_1}{R_2} \quad (69).$$

В более сложных мостиковых устройствах к сопротивлению  $R_3$  параллельно присоединяют конденсатор переменной емкости, служащий для компенсации малой электрической емкости между контактами и электродами электролитической ячейки. Компенсируя емкостную составляющую, получают более точное значение проводимости (резче наблюдаемый минимум звука). Наряду с компенсационными устройствами распространены приборы с цифровым отсчетом показаний в единицах удельной электрической проводимости – мосты переменного тока и кондуктометры.

Кондуктометрическая ячейка  $N$  представляет собой сосуд, в который вставлены два платиновых электрода, помещаемые в исследуемый раствор. Если расстояние между электродами обозначить через  $l$ , а площадь поверхности электрода через  $S$ , то

$$L = \kappa \frac{S}{l}; \quad \kappa = L \frac{l}{S} \quad (70).$$

Отношение  $l/S$  называется постоянной ячейки. Измерив величину проводимости  $L$  данного электролита, можно рассчитать его удельную электрическую проводимость:

$$\kappa = L \cdot K \quad (71).$$

Для экспериментального определения величины  $K$  необходимо измерить электрическую проводимость раствора с известной  $\kappa$  (обычно используют растворы хлорида калия). Из уравнения (70) следует, что *удельная электрическая проводимость* – это проводимость раствора, находящегося между параллельными электродами площадью  $1 \text{ см}^2$  при расстоянии между ними  $1 \text{ см}$ .

Удельная электрическая проводимость раствора зависит от природы растворителя и растворенного вещества, концентрации и температуры. Как видно из рис. 36, удельная электрическая проводимость сильных электролитов значительно выше соответствующей величины

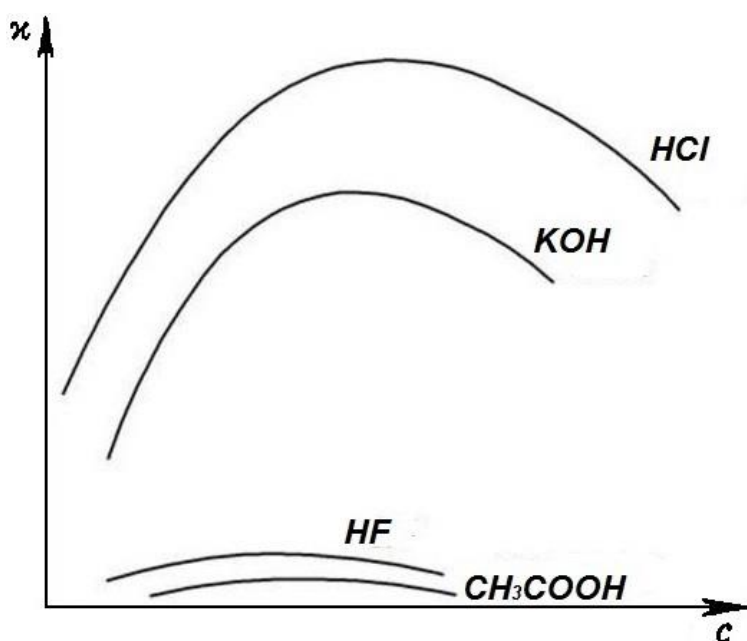


Рис. 36. Зависимость удельной электрической проводимости от концентрации [10, с. 270]

для слабых электролитов (для дистиллированной воды она равна  $5-10 \cdot 10^{-6} \text{ См/см}$ ). Удельная проводимость раствора с ростом концентрации возрастает в связи с увеличением числа ионов в единице объема. Однако с увеличением концентрации возрастает взаимодействие между ионами, вызывающее их торможение, и, кроме того, для слабых электролитов уменьшается степень диссоциации. Поэтому во многих случаях кривые зависимости удельной проводимости от концентрации проходят через максимум. Для аналитических измерений обычно используется участок кривой с возрастающей удельной электрической проводимостью, т. е. область разбавленных и умеренно концентрированных растворов.

При повышении температуры удельная проводимость электролитов увеличивается в связи с уменьшением степени гидратации и вязкости растворов (в отличие от металлов, для которых наблюдается обратная зависимость проводимости от температуры):

$$\kappa_2 = \kappa_1 [1 + a (T_2 - T_1)] \quad (72),$$



где  $\kappa_2$  и  $\kappa_1$  – удельная проводимость при температурах  $T_2$  и  $T_1$ ,  $a$  – температурный коэффициент проводимости. Например, для солей  $a \sim 0,02$ . Это означает, что повышение температуры на один градус приводит к увеличению проводимости приблизительно на 2%. В связи с довольно большим температурным коэффициентом электрической проводимости важную роль для повышения точности измерений играет термостатирование растворов [3, с. 168].

Кроме удельной проводимости, удобно также ввести понятие о *молярной (эквивалентной) электрической проводимости*, представляющей собой проводимость раствора электролита, содержащего 1 моль вещества и находящегося между двумя параллельными электродами, расстояние между которыми составляет 1 см. Она обозначается буквой  $\lambda$ , ее единица измерения  $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$  или  $\text{См} \cdot \text{см}^2 / \text{моль}$ .

Удельная и молярная проводимости связаны соотношением

$$\lambda = \frac{1000\kappa}{c} \quad (73),$$

где  $c$  – молярная концентрация электролита, деленная на сумму зарядов его катионов или анионов (например, 1 для  $\text{NaCl}$ , 2 для  $\text{CaCl}_2$ ).

Молярная электрическая проводимость как сильных, так и слабых электролитов с увеличением концентрации понижается (рис. 37). Характер зависимости  $\lambda$  от  $c$  для сильных и слабых электролитов различен.

В растворах *сильных электролитов* концентрационная зависимость молярной проводимости определяется главным образом эффектами электрофоретического и релаксационного торможения ионов, которые растут с концентрацией вследствие уменьшения среднего расстояния между ионами и увеличения вязкости раствора.

Оба эффекта связаны с существованием вокруг ионов ионной атмосферы из противоположно заряженных частиц. Электрофоретический эффект вызван тем, что центральный ион под действием электрического поля движется в одном направлении, а ионная атмосфера – в

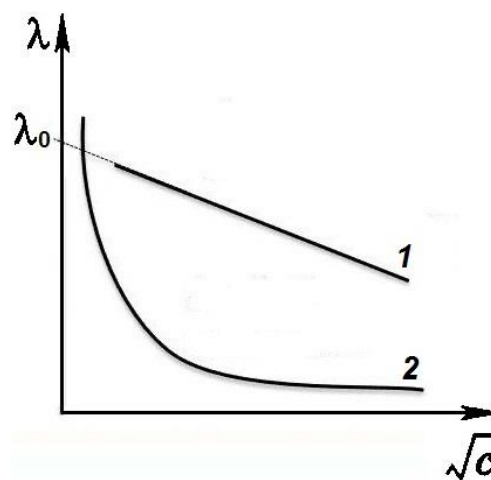


Рис. 37. Зависимость молярной электрической проводимости от концентрации для сильного (1) и слабого (2) электролитов [10, с. 272]

противоположном и тормозит движение иона. Релаксационное торможение обусловлено процессами разрушения и формирования ионной атмосферы при движении иона. В области низких концентраций (до  $10^{-3}$  моль/л) концентрационная зависимость эквивалентной проводимости описывается уравнением Онзагера:

$$\lambda = \lambda_0 + (A\lambda_0 + B)\sqrt{c} \quad (74),$$

где  $A$  – коэффициент, характеризующий электрофоретический эффект, а  $B$  – релаксационный (эти величины зависят от температуры, вязкости и диэлектрической проницаемости растворителя и вычисляются теоретически),  $\lambda_0$  – *предельная молярная электрическая проводимость* (или молярная электрическая проводимость при бесконечном разбавлении), соответствующая гипотетическому предельно разбавленному раствору, в котором все молекулы диссоциированы на ионы. Для сильных электролитов  $\lambda_0$  обычно определяют графически, экстраполируя прямую зависимости молярной проводимости от квадратного корня из концентрации (прямая 1 на рис. 37) на ось ординат.

Повышение молярной проводимости *слабых электролитов* при разбавлении растворов связано с увеличением степени диссоциации. Аррениус высказал предположение, что молярная проводимость слабого электролита связана с его степенью диссоциации выражением

$$\alpha = \frac{\lambda}{\lambda_0} \quad (75).$$

Согласно закону разбавления Оствальда, если электролит диссоциирует на два иона, то константа диссоциации выражается следующим образом:

$$K = \frac{\alpha^2 c}{1 - \alpha} = \frac{\lambda^2 c}{\lambda_0(\lambda_0 - \lambda)} \quad (76).$$

По формулам (75) и (76) можно рассчитать степень и константу диссоциации слабого электролита, если известна его предельная молярная проводимость  $\lambda_0$ , однако определить ее графически невозможно, т. к. кривая зависимости (линия 2 на рис. 37) при уменьшении концентрации асимптотически приближается к оси ординат.

Для определения величины  $\lambda_0$  пользуются *законом независимости движения ионов Кольрауша* (справедливым и для сильных электролитов): при бесконечном разбавлении раствора ионы движутся независимо друг от друга, и молярная электрическая проводимость

электролита равна сумме предельных электрических проводимостей (предельных подвижностей) катионов и анионов:

$$\lambda_0 = \lambda_{0(+)} + \lambda_{0(-)} \quad (77),$$

где  $\lambda_{0(+)}$  и  $\lambda_{0(-)}$  – предельная молярная электрическая проводимость, или предельная подвижность соответственно катиона и аниона.

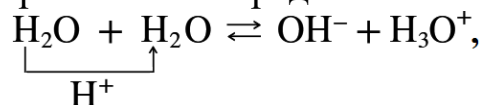
Подвижности катиона и аниона пропорциональны абсолютным скоростям их движения:

$$\lambda_{0(+)} = F \cdot v_+; \quad \lambda_{0(-)} = F \cdot v_- \quad (78),$$

где  $F$  – постоянная Фарадея.

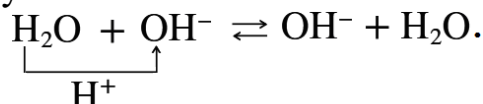
Подвижность каждого вида иона во всех растворах при бесконечном разбавлении в одном и том же растворителе при одной и той же температуре постоянна, поэтому по уравнению (77) можно рассчитать  $\lambda_0$  для любого вещества.

Значения подвижностей ионов в водном растворе при 25°C находятся в пределах 30–70 См·см<sup>2</sup>/моль и лишь у ионов Н<sup>+</sup> и ОН<sup>-</sup> они существенно выше и составляют соответственно 349,8 и 197,6 См·см<sup>2</sup>/моль, что объясняют особым эстафетным механизмом их движения, сущность которого можно представить так:



т. е. процесс диссоциации воды сводится к переходу протона (Н<sup>+</sup>) от одной молекулы воды к другой. Образующиеся ионы гидроксония (Н<sub>3</sub>О<sup>+</sup>) непрерывно обмениваются протонами с окружающими молекулами воды. При наложении напряжения перенос электричества осуществляется в основном не ионами гидроксония, а протонами, перескакивающими от одной молекулы к другой по силовым линиям поля. Благодаря такому эстафетному (цепному) движению протонов увеличивается и электрическая проводимость раствора [8, с. 163].

Аналогичным образом объясняется высокая подвижность ионов ОН<sup>-</sup> с той лишь разницей, что здесь протон перескакивает от молекулы воды к гидроксилу:



В органических растворителях, не содержащих ионов ОН<sup>-</sup>, подвижность Н<sup>+</sup> примерно такая же, как и у других однозарядных ионов. Существенное влияние на электрическую проводимость

неводных растворов оказывает диэлектрическая проницаемость растворителя.

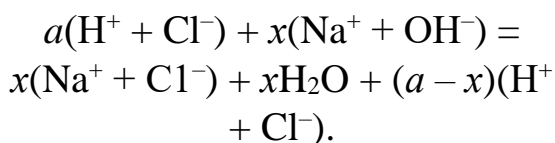
### **Практическая реализация и применение кондуктометрии**

*Прямая кондуктометрия* находит ограниченное применение, поскольку регистрируемый аналитический сигнал неселективен: электрическая проводимость является величиной аддитивной и определяется присутствием всех ионов в растворе. В многокомпонентных растворах кондуктометрию применяют в тех случаях, когда качественный состав раствора известен и не изменяется, например, при непрерывном или периодическом анализе в производственных процессах. Прямые измерения электрической проводимости можно использовать для определения общего ионного состава (степени минерализации) природных вод; кондуктометрия является наиболее эффективным методом контроля качества воды в лабораториях и на производстве [3, с. 386]. В научных исследованиях с помощью кондуктометрии можно определять константы диссоциации электролитов, константы нестойкости комплексных соединений, произведения растворимости труднорастворимых веществ. Прямые кондуктометрические измерения имеют погрешность 1–2%, а при соблюдении специальных условий, прежде всего, термостатирования, она снижается до 0,2%.

Более широко применяется измерение электрической проводимости для определения конечной точки титрования – *кондуктометрическое титрование*. В данном методе измеряют электропроводность титруемого раствора после прибавления каждой новой порции титранта. Точка эквивалентности совпадает с перегибом на кривой в координатах  $\kappa - V(\text{титранта})$ . Изменение электрической проводимости при кондуктометрическом титровании связано с заменой в растворе по мере протекания реакции одних ионов на другие, отличающиеся по подвижностям. Чем больше различия в подвижностях связываемых и появляющихся в процессе титрования ионов, тем выше чувствительность метода. Как уже было отмечено, подвижности ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  значительно превышают подвижности других ионов, поэтому кондуктометрическое титрование наиболее целесообразно применять для кислотно-основного титрования, но также метод мо-

жет использоваться для реакций осаждения, комплексообразования и реже – для окислительно-восстановительных реакций.

Пусть имеется раствор кислоты, который необходимо оттитровать щелочью. Предположим, что взят раствор, содержащий  $a$  моль/л  $\text{HCl}$ . Его электропроводность определяется подвижностями ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , равными при  $25^\circ\text{C}$  соответственно  $349,8$  и  $76,3$   $\text{См}\cdot\text{см}^2/\text{моль}$ . К этому раствору прибавляют порцию титранта, содержащего  $x$  моль/л  $\text{NaOH}$ . Если  $x < a$ , то произойдет частичная нейтрализация кислоты щелочью:



Неполная нейтрализация приведет к тому, что в титруемом растворе останется  $(a - x)$  моль/л  $\text{HCl}$  и появится  $x$  моль/л  $\text{NaCl}$  в виде ионов  $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$ . Таким образом, часть водородных ионов заменится на менее подвижные ионы натрия ( $\lambda_0 = 50,1$   $\text{См}\cdot\text{см}^2/\text{моль}$ ) и электропроводность раствора упадет. Так будет происходить при добавлении каждой новой порции раствора гидроксида натрия до тех пор, пока не наступит точка эквивалентности (рис. 38, *a*), в которой

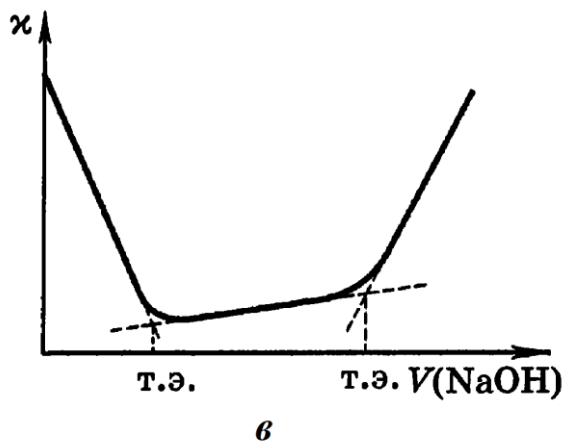
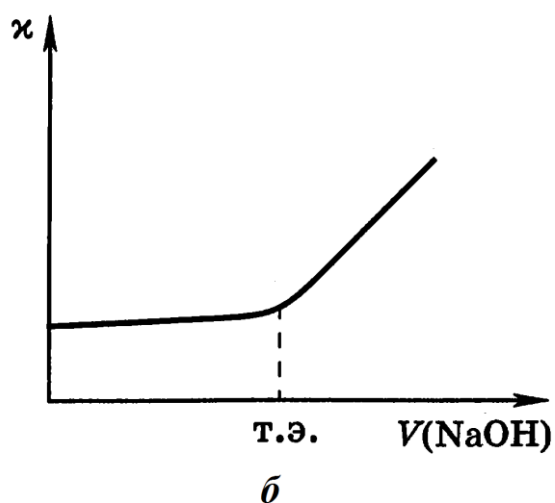
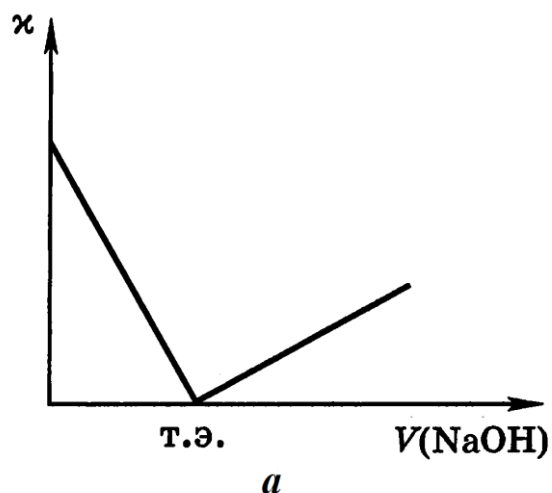


Рис. 38. Кривые кондуктометрического титрования [8, с. 170–172]:  
*a* – сильной кислоты,  
*б* – слабой кислоты,  
*в* – смеси сильной и слабой кислот

все ионы  $\text{H}^+$  кислоты будут заменены ионами  $\text{Na}^+$ . При дальнейшем прибавлении титранта (после достижения точки эквивалентности) щелочь уже не будет связываться кислотой. Вся кислота окажется полностью нейтрализованной, а в титруемом растворе появятся (наряду с ионами хлора) также свободные ионы  $\text{OH}^-$  с высокой подвижностью, равной  $197,6 \text{ См}\cdot\text{см}^2/\text{моль}$ . Это приведет к резкому подъему электропроводности. Точка минимума на кондуктометрической кривой является точкой эквивалентности и отвечает электропроводности хлорида натрия. Из объема щелочи, израсходованной до достижения точки минимума, легко вычислить содержание кислоты в титруемом растворе [2, с. 129–130].

Иной вид имеет кривая титрования раствора слабой кислоты слабым основанием (рис. 38, б). Вначале электрическая проводимость растет вследствие замещения слабодиссоциированной кислоты ее сильнодиссоциированной солью. После эквивалентной точки электропроводность раствора возрастает еще больше, поскольку в растворе появляется избыток ионов  $\text{OH}^-$  с большой подвижностью. При титровании щелочью смеси сильной и слабой кислот (рис. 38, в) в первую очередь в реакцию с основанием вступает сильная кислота, и вследствие этого электрическая проводимость уменьшается. После того, как вся сильная кислота будет нейтрализована, происходит нейтрализация слабой кислоты и проводимость начинает медленно увеличиваться. После окончания реакции в растворе появляется избыток щелочи, и проводимость быстро возрастает. Соответственно на кривой титрования будут четко видны две точки перегиба.

На основе кривой кондуктометрического титрования также можно составить представление о ходе реакции и некоторых свойствах образующихся веществ. Например, резкий минимум или явный перегиб на кривой говорит об устойчивости или малой растворимости продуктов реакции. Размытость области перехода от одного участка кривой к другому может указывать (в зависимости от природы основной реакции) на гидролиз образовавшейся соли, повышенную растворимость осадка или недостаточную стойкость нового соединения.

Кондуктометрическое титрование может быть проведено в окрашенных, мутных, а также в очень разбавленных растворах. В термостатированной ячейке погрешность в измерении проводимости для растворов с концентрацией вещества  $10^{-4}$  моль/л не превышает

2% [39, с. 196]. Кондуктометрическое титрование смесей кислот, различающихся по силе, возможно в тех случаях, когда потенциометрическое титрование не дает удовлетворительных результатов. В частности, хорошо оттитровываются в смеси кислоты: уксусная и серная, молочная и соляная, уксусная и соляная, серная и борная [1, с. 195]. Методами кондуктометрического титрования успешно определяют концентрации аминокислот, алкалоидов, стероидов и других органических веществ, кислотность желудочного сока. Широко применяется кондуктометрическое титрование раствором ЭДТА для определения катионов.

Большое распространение получило *высокочастотное кондуктометрическое титрование*. В этом методе применяются переменные токи с частотами порядка нескольких миллионов герц. При таких высоких частотах электроды можно вывести из раствора за пределы ячейки, в которой проводятся измерения, что позволяет избежать нежелательных эффектов, характерных для обычных низкочастотных методов (каталитического действия электродов на реакции в растворах, изменения поверхности электродов в ходе измерений) и дает возможность анализа любых агрессивных сред. При высокочастотной кондуктометрии измерительная ячейка (рис. 39), изготовленная из стекла или пластмассы и содержащая анализируемый раствор, помещается или между двумя металлическими пластинами, плотно примыкающими к стенкам ячейки (ячейка конденсаторного, или емкостного типа), или внутрь индукционной катушки (ячейка индуктивного типа). При высокочастотной кондуктометрии измеряется не электропроводность раствора, а совокупность многих свойств раствора и ячейки. Изменения в ячейке, происходящие в результате реакций титрования, вызывают изменения в режиме работы высокочастотного генератора. Индуктивная ячейка с анализируемым раствором включается в цепь колебательного контура, и изменение состава раствора при титровании в такой ячейке вызывает изменение индук-

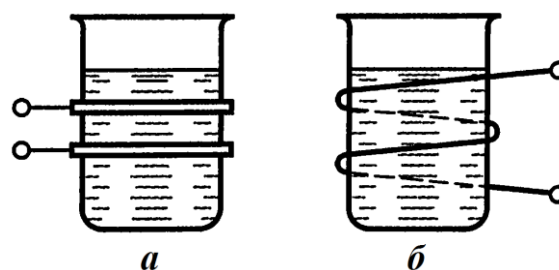


Рис. 39. Ячейки для высокочастотного кондуктометрического титрования [8, с. 175]:  
*а* — конденсаторная,  
*б* — индуктивная

тивности. Изменения в ячейке, происходящие в результате реакций титрования, вызывают изменения в режиме работы высокочастотного генератора. Индуктивная ячейка с анализируемым раствором включается в цепь колебательного контура, и изменение состава раствора при титровании в такой ячейке вызывает изменение индук-

тивности, что фиксируется микроамперметром. В конденсаторных ячейках при титровании раствора вследствие изменения диэлектрической проницаемости происходит сдвиг рабочей частоты генератора, что устанавливается с помощью измерительного конденсатора [8, с. 175].

При высоких частотах (от  $10^3$  до  $10^6$  Гц) удобно проводить исследование проводимости биологических систем (тканей, клеточных суспензий и т. п.), поскольку при повышении частоты импеданс (полное сопротивление) биологических систем возрастает [23, с. 196]. Измерение электрической проводимости используют для получения информации о функциональном состоянии тканей с целью выявления воспалительных процессов, развития опухолей, изменения проницаемости клеточных мембран, оценки кровенаполнения сосудов органов и тканей (реографии). В связи с развитием трансплантационной хирургии электрическая проводимость используется как один из тестов на жизнеспособность консервированной кожи, кости, роговицы и т. д.

### **Лабораторная работа № 7**

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ В ЦИТРУСОВЫХ МЕТОДОМ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ**

Лимонная кислота  $\text{HOOC-CH}_2\text{-C(OH)(COOH)-CH}_2\text{-COOH}$  в свободном виде и почти без примесей других кислот находится в значительном количестве в соке citrusовых, в бруснике и клюкве, а в смеси с яблочной и винной кислотами – в крыжовнике, смородине, чернике, малине, рябине и др. (табл. 6).

*Таблица 6*

#### **Содержание лимонной кислоты во фруктово-ягодном сырье [29, с. 38]**

<b>Наименование сырья</b>	<b>Содержание лимонной кислоты, г/100 г</b>	<b>Наименование сырья</b>	<b>Содержание лимонной кислоты, г/100 г</b>
Лимон	5,7	Вишня, слива	0,1
Смородина черная	2,0	Яблоко	0,08
Клюква	1,1	Малина	0,04
Мандарин	1,0	Виноград	0,03



Лимонная кислота и ее соли (цитраты кальция, калия и натрия) применяются в качестве вкусовых добавок, регуляторов кислотности и консервантов (Е330–Е333). Лимонная кислота обладает наиболее мягким и приятным вкусом по сравнению с другими пищевыми кислотами. Главными ее потребителями являются производители напитков и кондитерских изделий. Помимо приятного привкуса, лимонная кислота действует как антиокислитель и защищает продукты от разрушающего действия следов тяжелых металлов.

**Исследуемый материал:** плоды цитрусовых.

**Оборудование и материалы:** кондуктометр, мерные колбы на 50 мл, пипетки на 5 мл, химические стаканы на 100 мл, бюретки, химические воронки, магнитная мешалка.

**Реактивы:** 0,1 М раствор КОН.

Ход работы. В мерную колбу на 50 мл помещают 5 мл сока цитруса и доводят объем до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы переливают в химический стакан, устанавливают его на магнитную мешалку и титруют раствором щелочи с шагом 0,5 мл. После добавления каждой порции титранта регистрируют значение электрической проводимости. Титрование заканчивают после резкого изменения значения проводимости.

По полученным данным строят график в координатах  $\kappa - V$ . По графику находят точку эквивалентности объем щелочи, израсходованный на титрование. Массовую долю лимонной кислоты в анализируемом сырье (%) рассчитывают по формуле:

$$\omega = \frac{V \cdot V_1 \cdot 0,064 \cdot 100}{V_2 \cdot m},$$

где  $V$  – исходный объем анализируемого раствора, мл;  $V_1$  – объем раствора гидроксида натрия, израсходованный на титрование, мл; 0,0064 – титр раствора КОН по лимонной кислоте, г/мл; 100 – коэффициент пересчета в проценты;  $V_2$  – объем фильтрата, взятый для титрования, мл;  $m$  – масса пробы анализируемого сырья, г [29, с. 38–40].

### Контрольные вопросы

1. В чем сущность кондуктометрических методов анализа?
2. Как измеряют электрическую проводимость растворов электролитов?

3. Что представляет собой кондуктометрическая ячейка?
4. Какая величина называется удельной электрической проводимостью и от каких факторов она зависит?
5. Что такое молярная электрическая проводимость и как она связана с удельной проводимостью?
6. Какие величины можно рассчитать, сравнивая значения молярной и предельной молярной проводимостей электролита?
7. В чем заключается закон Кольрауша?
8. В чем заключается «эстафетный» механизм переноса заряда? Какие ионы его используют?
9. В каких областях применяют методы прямой кондуктометрии?
10. Как будет изменяться электрическая проводимость раствора в процессе титрования соляной кислотой гидроксида калия и смеси гидроксида калия с аммиаком?
11. В чем сущность высокочастотного кондуктометрического титрования и каковы особенности этого метода анализа?
12. Каково значение кондуктометрических методов в биологических исследованиях?

## Глава 3. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

---

Оптические методы анализа основаны на изучении взаимодействия электромагнитного излучения с атомами и молекулами исследуемого вещества. В результате этого взаимодействия возникает сигнал, который может быть зарегистрирован специализированными узлами приборов (детекторами). Аналитические сигналы содержат информацию о свойствах анализируемых веществ, частота сигнала зависит от специфических свойств соединения, а интенсивность излучения пропорциональна количеству вещества.

Применительно к биологии, в этой группе методов можно выделить следующие виды анализа:

А) молекулярная абсорбционная спектроскопия (анализ по поглощению излучения):

- спектрофотометрический метод основан на измерении в монохроматическом потоке света (света определенной длины волны);
- фотометрический метод основан на измерениях в не строго монохроматическом пучке света;

Б) молекулярная эмиссионная спектроскопия (люминесцентный метод);

В) рентгенофлуоресцентная спектроскопия;

Г) рефрактометрический анализ, основанный на зависимости показателя преломления света от природы и концентрации исследуемого вещества.

Оптические методы анализа нашли широкое применение в биологии, медицине, экологии, сельском хозяйстве и других областях. Популярность этих методов обусловлена высокой чувствительностью, точностью, легкостью и быстротой проведения анализа.

### 3.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

#### **Теоретические основы фотометрии и спектрофотометрии**

*Фотометрия* (от греч. φῶς – «свет» и μέτρον – «измеряю») – оптический метод анализа, основанный на поглощении электромагнитного излучения (света) анализируемым веществом или его соединения с подходящим реагентом.

Молекулярную абсорбционную спектроскопию в ближней ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–750 нм) и ближней инфракрасной (750–2500 нм) областях спектра традиционно называют *спектрофотометрией*.

Принцип действия фотометрического измерения основан на законах светопоглощения. При прохождении пучка белого света с интенсивностью  $I_0$  через стеклянный сосуд, заполненный раствором (рис. 40), происходит ослабление этого первоначального потока света, и выходящий из сосуда поток света будет иметь интенсивность  $I < I_0$ .

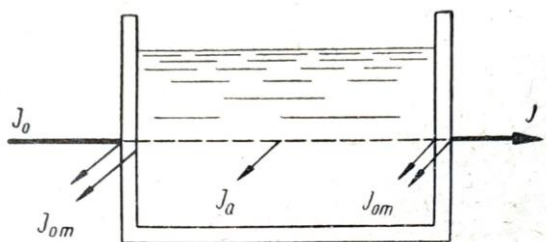


Рис. 40. Прохождение света через раствор, заключенный в стеклянный сосуд [5, с. 10]

Ослабление светового потока связано отчасти с отражением на границах стекло – воздух и стекло – раствор  $I_{от}$ , отчасти с рассеянием света  $I_p$ , вызываемым присутствующими в растворе взвешенными частицами; главным же образом ослабление света происходит за счет поглощения (абсорбции) световой энергии  $I_a$  раствором. Таким

образом, для описания прохождения света через раствор справедливым будет уравнение

$$I_0 = I_a + I_{от} + I_p + I \quad (79).$$

При сравнительном изучении поглощения света различными растворами пользуются одинаковыми кюветами, для которых интенсивность отраженной части светового потока постоянна и мала и ею можно пренебречь; при работе с истинными растворами достаточно чистых исходных веществ; потеря света за счет рассеяния становится также незначительной. Поэтому уравнение (79) можно записать в более простом виде:

$$I_0 = I + I_a \quad (80).$$

Интенсивности падающего светового потока  $I_0$  и прошедшего через раствор  $I$  можно непосредственно измерить. Степень поглощения светового потока жидкостью не одинакова для световых потоков различных длин волн, составляющих белый свет. В результате этого выходящий свет часто бывает окрашен. Цвет раствора, который воспринимается глазом, обусловлен светом той части падающего пучка света, которая прошла через раствор непоглощенной. Кажущийся

цвет раствора принято считать дополнительным к цвету поглощенного излучения. Например, раствор, который поглощает желто-зеленую часть спектра (560–570 нм) будет для наблюдателя окрашен в фиолетовый цвет .

Зависимость окраски раствора от поглощенной части светового спектра приведена в табл. 7.

Таблица 7

Цвет раствора в зависимости от поглощенной части спектра [5, с. 11]

Спектральный диапазон поглощенной части, нм	Центр поглощенной части света	Кажущийся цвет раствора (дополнительный цвет)
400–450	Фиолетовый	Желто-зеленый
450–480	Синий	Желтый
480–490	Зелено-синий	Оранжевый
490–500	Сине-зеленый	Красный
500–560	Зеленый	Пурпурный
560–575	Желто-зеленый	Фиолетовый
575–590	Желтый	Синий
590–625	Оранжевый	Зелено-синий
625–750	Красный	Сине-зеленый

Таким образом, основными оптическими характеристиками растворов окрашенных соединений в фотометрии являются интенсивность окраски и цвет раствора [5, с. 9–11].

Интенсивность окраски в фотометрии выражают величиной *оптической плотности*  $A$ . Оптическая плотность является десятичным логарифмом отношения интенсивности падающего на раствор светового потока  $I_0$  к интенсивности выходящего из раствора светового, потока  $I$ :

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (81).$$

Отношение интенсивности света, прошедшего через раствор ( $I$ ), к интенсивности падающего света ( $I_0$ ) называется *пропусканием раствора*:

$$\frac{I}{I_0} = T \quad (82).$$

Ослабление светового потока зависит от длины пути, проходимого световым потоком внутри тела. Количественная зависимость оптической плотности от толщины поглощающего слоя описывается уравнением

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = l \cdot \lg n \quad (83),$$

где  $l$  – толщина поглощающего слоя,  $n$  – степень ослабления светового потока при прохождении единицы светового пути внутри тела. Эта величина является постоянной для данного вещества при прохождении света определенной длины волны.

Уравнение (70) отражает закон Бугера – Ламберта: слои данного вещества одинаковой толщины, при прочих равных условиях, всегда поглощают одну и ту же часть падающего на них светового потока, или оптическая плотность вещества прямо пропорциональна толщине поглощающего слоя.

Позднее Бером было установлено, что при прохождении света через газы и растворы веществ степень поглощения света зависит от числа частиц в единице объема, встречающихся на пути светового потока, т. е. поглощение света зависит от концентрации вещества:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (84),$$

где  $\varepsilon$  – величина постоянная, характерная для растворов вещества (для света определенной длины волны), носящая название коэффициента поглощения;  $l$  – толщина слоя, см;  $c$  – концентрация вещества, моль/л.

Эта зависимость оптической плотности от концентрации вещества в растворе и толщины поглощающего слоя известна под названием закона Бугера – Ламберта – Бера (основного закона светопоглощения): оптическая плотность растворов, при прочих равных условиях, прямо пропорциональна концентрации вещества [5, с. 12–14].

У данного закона имеются некоторые ограничения. Зависимость  $A = f(c)$  может несколько отличаться от линейной по следующим причинам:

- немонохроматичность света;
- непостоянство температуры;
- химическое взаимодействие компонентов раствора;
- рассеяние света.

Более точное уравнение Бугера – Ламберта – Бера с учетом последних факторов имеет вид

$$A = \varepsilon \frac{n}{(n^2 + 2)^2} lc \quad (85),$$

где  $n$  – показатель преломления.

Оптическая плотность раствора, содержащего несколько окрашенных веществ, обладает свойством *аддитивности*, т. е. поглощение света каким-либо веществом не зависит от присутствия в растворе других веществ, а каждое из них будет давать свой вклад в экспериментально определяемую оптическую плотность:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_k \quad (86),$$

где  $A_1, A_2$  и т. д. – оптические плотности веществ 1, 2 и т. д.

*Молярный коэффициент поглощения (экстинкции)*. При условии, что в уравнении (84) концентрация  $c$  выражается числом молей в 1 литре, а толщина слоя  $l$  – в сантиметрах, величину  $\varepsilon$  принято называть молярным коэффициентом поглощения.

Из уравнения (84) следует, что численное значение молярного коэффициента поглощения равно оптической плотности такого раствора, концентрация которого равна 1 моль/л, при толщине поглощающего слоя в 1 см. Молярный коэффициент поглощения не зависит от концентрации вещества при прохождении света данной длины волн. Величины молярного коэффициента поглощения различны для растворов разных соединений и колеблются в широких пределах – от единиц до сотен тысяч. Молярный коэффициент поглощения поэтому является мерой чувствительности фотометрических реакций. Чем больше величина молярного коэффициента поглощения, тем выше чувствительность фотометрического определения [5, с. 15–16].

Свет поглощается раствором избирательно: при некоторых длинах волн светопоглощение происходит интенсивно, а при некоторых свет не поглощается. Распределение по частотам (или по длинам волн) значений молярного коэффициента поглощения называется *спектром поглощения* (рис. 41).

Абсорбция веществом дополнительной энергии света приводит к изменению энергетического состояния электронных оболочек атомов, что обусловлено переходом электронов с высшей заполненной на низшую вакантную орбиталь. Таким образом, происходит увеличение энергии частиц вещества (атомов, ионов, молекул), что приво-

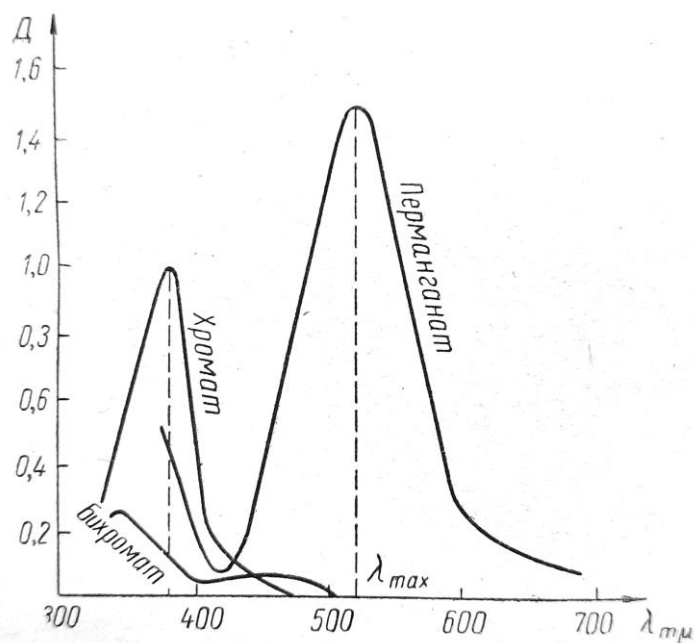


Рис. 41. Спектры поглощения водных растворов хромата, бихромата и перманганата калия [5, с. 17]

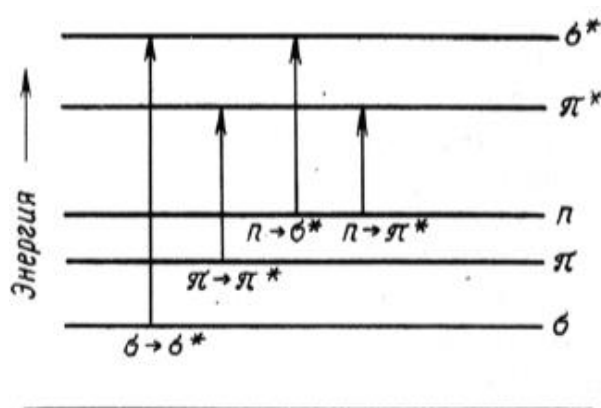


Рис. 42. Схема электронных уровней и энергии возможных электронных переходов [22, с. 13]

соединений чаще всего используют реакции образования (иногда — разрушения) комплексных соединений; значительно реже применяются реакции окисления-восстановления. В таком случае используют реагенты — соединения, взаимодействующие с анализируемым веществом и образующие продукты, обладающие высоким коэффициентом ослабления. Коэффициент ослабления определяется как отношение интенсивности потока света до ( $I_0$ ) и после ( $I$ ) его прохождения через раствор:

дит к переходу их в возбужденное состояние (изображается \*) (рис. 42).

Полученную дополнительную энергию частицы вещества теряют вследствие какого-либо релаксационного процесса. Чаще всего происходит превращение энергии возбуждения в тепло. Причем, в ходе реакции вещество может распадаться с образованием новых веществ, тогда говорят о фотохимической реакции. Если происходит выделение фотона, сопровождающееся переходом молекулы в невозбужденное состояние — это явления фосфоресценции или флуоресценции (которые объединяют под общим названием люминесценция).

Для фотометрического определения неорганических компонентов для получения окрашенных



$$\mu = \frac{I_0}{I} \quad (87).$$

В настоящее время число реагентов исчисляется тысячами. Их применяют в тех случаях, когда необходимо расширить круг веществ, которые можно проанализировать в видимой области. Кроме того, использование этих соединений позволяет избирательно определять концентрацию конкретных веществ, входящих в состав смеси.

Для определения органических компонентов чаще всего используют реакции синтеза окрашенных соединений, содержащих так называемые *хромофоры* (сопряженные двойные связи, ароматические кольца, карбонильную или нитрогруппу). Дело в том, что сопряженные двойные связи обладают способностью поглощать свет большей длины волны (200–800 нм), чем изолированные двойные связи. Для изолированных кратных связей применяются реакции с переходом 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 [22, с. 14].

### **Практическая реализация и применение фотометрических методов**

Реализация фотометрических методов измерения возможна с помощью *фотометров* (устаревшее название – *фотокolorиметры*) и *спектрофотометров*. Независимо от области спектра, в котором происходит изучение светопоглощения веществом, приборы для регистрации этого явления состоят из пяти основных узлов:

1) *Источник излучения* (для работы в видимой части спектра применяются лампы накаливания с вольфрамовой нитью, для работы в УФ-диапазоне – газонаполненные лампы);

2) *Монохроматизатор* – устройство, обеспечивающее разложение света, поступающего от источника излучения, на участки с определенным диапазоном длин волн (светофильтры в фотометрах, призмы и дифракционные решетки в спектрофотометрах);

3) *Кюветы для проб* (кварцевые или стеклянные, выбор зависит от требуемой точности и величины измеряемой разности показателей преломления);

- 4) *Детектор*, превращающий энергию излучения в измеряемый сигнал, обычно электрический (фотоэлементы и фотоумножители);  
5) *Регистратор сигнала*.

Внешний вид фотометра КФК-3-01 представлен на рис. 43.



Рис. 43. Внешний вид фотометра КФК-3:

1 – кожух, 2 – ручка для поворота дифракционной решетки, 3 – металлическое основание, 4 – рукоятка для перемещения кювет относительно потока света, 5 – крышка кюветного отделения, 6 – ЖК-дисплей, 7 – клавиатура

На металлическом основании 3 закреплены узлы фотометра, которые закрываются кожухом 1. Кюветное отделение закрывается крышкой 5. Ручка 2 служит для поворота дифракционной решетки и установки требуемой длины волны в нанометрах. Ввод в световой пучок той или иной кюветы осуществляется перемещением рукоятки 4 вперед-назад, в кюветном отделении данного прибора предусмотрено 3 гнезда. В дальнее гнездо обычно устанавливают кювету с растворителем, в ближние – изучаемые растворы.

Принципиальная схема прибора для фотометрических измерений представлена на рис. 44. Принцип действия фотометра КФК-3 следующий: свет от нити лампы накаливания 1 проходит через конденсор 2, щель диафрагмы 3, попадает на вогнутую дифракционную

решетку 5, а затем – на вогнутое зеркало 6. Дифракционная решетка и зеркало создают в плоскости диафрагмы 7 растянутую картину спектра. Поворачивая дифракционную решетку 5 вокруг оси, параллельной штрихам решетки, выделяют щелью диафрагмы 7 излучение длины волны от 315 до 990 нм. Зеркало 8 создает в кюветном отделении слабо сходящийся пучок света и с помощью линз 9 формирует увеличенное изображение щели диафрагмы 7 перед линзой 11. Линза 11 сводит пучок света на приемнике 12 в виде равномерно освещенного светового кружка. Для уменьшения влияния рассеянного света в УФ-области спектра за диафрагмой 3 установлен светофильтр 4, который работает при длинах волн до 400 нм, а затем автоматически выводится.

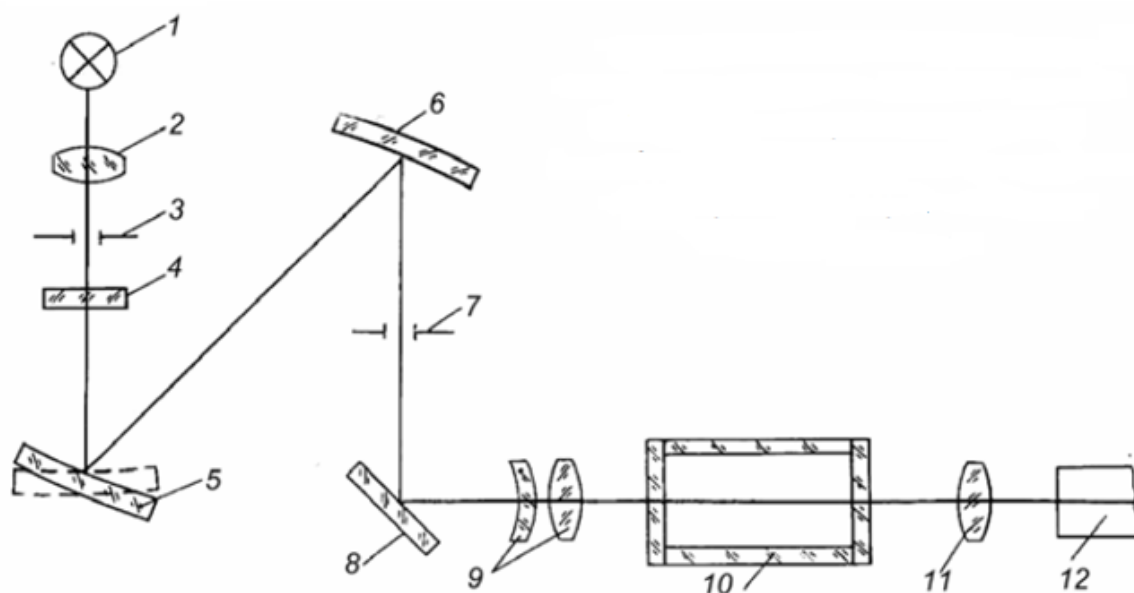


Рис. 44. Принципиальная схема фотометра:

1 – лампа накаливания; 2, 9, 11 – линзы; 3, 7 – диафрагмы; 4 – светофильтр; 5 – дифракционная решетка; 6 – вогнутое зеркало; 8 – зеркало; 10 – кювета; 12 – фотоприемник

Существуют несколько способов определения концентрации химических веществ фотометрическими методами.

*Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого растворов.* Данный метод подходит для единичных анализов и требует обязательного соблюдения законов Бера. Суть его в следующем: готовят раствор исследуемого вещества и 2–3 стандарт-

ных раствора, определяют их оптическую плотность в одинаковых условиях (длина волны, идентичные характеристические свойства кювет). Рассматриваемые показатели этих растворов должны иметь близкие значения, тогда погрешность измерения будет меньше. Для этого вначале фотометрируют исследуемый раствор, а затем подбирают нужную концентрацию стандартного раствора. Согласно уравнению (84), оптические плотности исследуемого и стандартного раствора будут равны:

$$A_x = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_x \quad (88),$$

$$A_{ст} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_{ст} \quad (89).$$

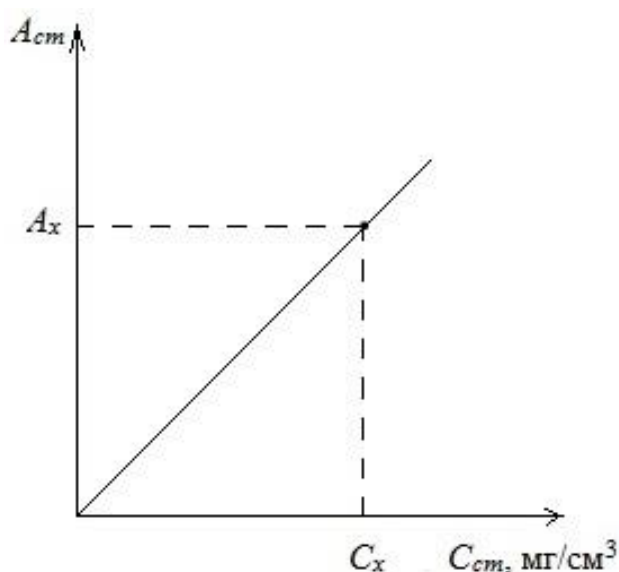


Рис. 45. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации [15, с. 40]

Разделив  $A_x$  на  $A_{ст}$  (при условии, что показатели  $\lambda$ ,  $\varepsilon$  и  $l$  одинаковы и неизменны), получим:

$$\frac{A_x}{A_{ст}} = \frac{c_x}{c_{ст}} \quad (90),$$

затем высчитывают концентрацию исследуемого вещества:

$$c_x = c_{ст} \cdot \frac{A_x}{A_{ст}} \quad (91).$$

*Метод калибровочного графика.* В данном случае готовится серия стандартных растворов с точно известной концентрацией и

всеми реагентами, необходимыми для получения окрашенных соединений. Калибровочный график строят по методу наименьших квадратов. Прямая зависимости строится в координатах: оптическая плотность ( $A$ ) – концентрация ( $c$ , мг в объеме мерной колбы). Для достижения минимальной погрешности при построении калибровочного графика, необходимо приготовить 5–7 стандартных растворов с различной концентрацией и провести не менее 5 параллельных измерений показателя оптической плотности при каждой концентрации.

Параллельно со стандартными растворами готовят пробу исследуемого раствора, измеряют его оптическую плотность и определяют

концентрацию вещества в изучаемой пробе по построенному градуировочному графику (рис. 45).

Данный метод является наиболее распространенным в фотометрии. Основные сложности с его применением возникают в связи с необходимостью приготовления серии стандартных растворов, что довольно трудоемко. Кроме того, нужно учитывать влияние посторонних компонентов в исследуемом растворе. Чаще всего метод применяется при проведении серийных анализов.

*Метод стандартных добавок* применяют в случае необходимости проанализировать многокомпонентный раствор. Для этого в мерные колбы помещают одинаковые объемы исследуемого раствора, после чего добавляют все необходимые реагенты для образования окрашенных соединений и различные объемы стандартного раствора во все колбы (кроме первой). Затем доводят объем до метки растворителем и фотометрируют, определяя оптическую плотность получившихся растворов. График зависимости строится в координатах: оптическая плотность исследуемого раствора и растворов с добавками ( $A_x$ ,  $A_{x+1}$ ,  $A_{x+2}$ ,  $A_{x+3}$  и т. д.) – концентрация добавленного стандартного раствора ( $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$  и т. д.). Отрезок  $0c_x$  выражает искомую концентрацию определяемого вещества в объеме раствора (рис. 46).

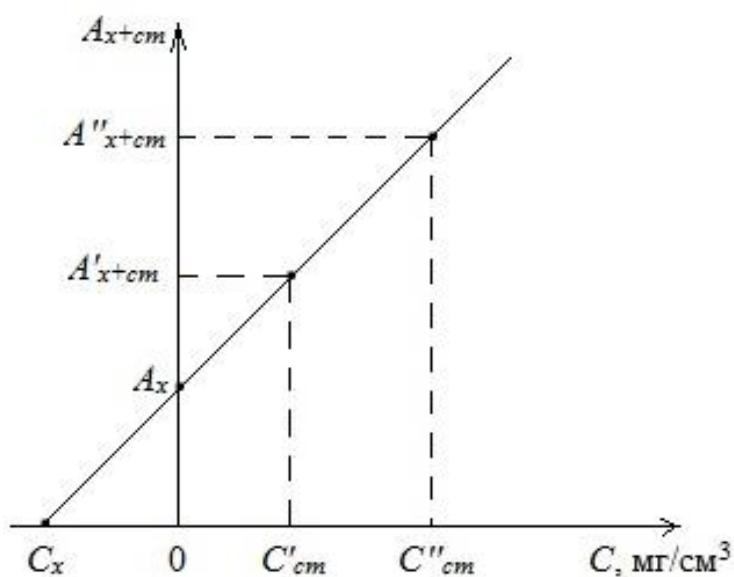


Рис. 46. Градуировочный график для определения концентрации вещества по методу стандартных добавок [15, с. 41]

Концентрацию исследуемого вещества в растворе можно определить еще и расчетным методом. Для этого сравнивают оптическую плотность этого раствора и раствора с наименьшей добавкой. На основании закона Бугера – Ламберта – Бера получаем два уравнения:

$$A_x = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_x \quad (92),$$

$$A_{x+n} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_{x+n} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot (c_x + c_n) \quad (93),$$

где  $c_n$  – концентрация добавки в анализируемом растворе.

Решая эти уравнения относительно  $c_x$ , получаем:

$$c_x = c_n \cdot \frac{A_x}{A_{x+n} - A_x} \quad (94).$$

Метод добавок исключает систематическую погрешность, вносимую в определение концентрации влиянием примесей, т. к. создает одинаковые условия для фотометрирования исследуемого раствора и растворов со стандартной добавкой. В связи с его точностью, данный метод используется для определения следов веществ в присутствии большого количества посторонних компонентов в пробах.

*Методом дифференциальной фотометрии* оптическую плотность исследуемого и стандартных растворов измеряют по отношению к раствору с известной концентрацией измеряемого вещества  $c_0$  (в отличие от ранее перечисленных прямых спектрофотометрических методов). В данном методе различают несколько вариантов:

*Метод высокого поглощения* рекомендуется использовать, когда оптическая плотность растворов превышает единицу. В ходе работы подбирается концентрация раствора сравнения меньшая по отношению к концентрации исследуемого раствора ( $c_0 < c_x$ ). В таком случае готовят серию стандартных растворов с концентрациями  $c_1, c_2, c_3 \dots c_n$  и фотометрируют стандартные и исследуемый растворы по отношению к раствору сравнения с известной концентрацией  $c_0$ . Значения оптической плотности  $A'$  определяются как разность оптических плотностей исследуемого или стандартных растворов и раствора сравнения:

$$A'_x = A_x - A_0 = \varepsilon \cdot l \cdot (c_x - c_0) \quad (95),$$

$$A'_{ст} = A_{ст} - A_0 = \varepsilon \cdot l \cdot (c_{ст} - c_0) \quad (96).$$

Концентрацию исследуемого раствора в данном случае можно найти двумя способами: по градуировочному графику (в таком случае за начало отсчета принимают концентрацию раствора сравнения  $c_0$ ) или же расчетным методом. Здесь учитывается, что отношение оптических плотностей исследуемого и стандартного растворов соответствует отношению разности между концентрациями этих растворов и раствора сравнения:

$$\frac{A'_x}{A'_{ст}} = \frac{(c_x - c_0)}{(c_{ст} - c_0)} \quad (97),$$

откуда находим  $c_x$ :

$$c_x = c_0 + A'_x \cdot \frac{(c_{ст} - c_0)}{A'_{ст}} \quad (98),$$

или

$$c_x = c_0 + F \cdot A'_x \quad (99),$$

где

$$F = \frac{(c_{ст} - c_0)}{A'_{ст}} \quad (100).$$

$F$  в уравнении (100) называют *фактором пересчета*. В одной серии измерений  $F$  является постоянной величиной.

*Метод низкого поглощения.* Если подбирают раствор сравнения с концентрацией большей нежели концентрация исследуемого раствора ( $c_0 > c_x$ ), то говорят о методе низкого поглощения. В таком случае применяют обратный порядок измерения: анализируемый и стандартные растворы условно принимают за растворы сравнения и по отношению к ним измеряют оптическую плотность изначального раствора сравнения. При обратном порядке измерения относительная оптическая плотность  $A'$  равна разности оптических плотностей исследуемого или стандартного раствора и раствора сравнения:

$$A'_x = A_0 - A_x \quad (101),$$

$$A'_{ст} = A_0 - A_{ст} \quad (102).$$

Концентрацию  $c_x$  рассчитывают по следующей формуле:

$$c_x = c_0 - F \cdot A'_x \quad (103),$$

где фактор пересчета будет равен:

$$F = \frac{(c_0 - c_{ст})}{A'_{ст}} \quad (104).$$

Чаще всего метод низкого поглощения применяют к растворам с оптической плотностью меньше 0,1.

*Метод двустороннего дифференцирования* сочетает в себе два вышеописанных метода, поэтому его еще называют *метод предельной точности*.

При работе в рамках этого метода готовят серии стандартных растворов с концентрациями как меньшими, чем в растворе сравнения, так и большими. Построенный в таком случае градуировочный график показан на рис. 47. Если  $c > c_0$ , используют прямой порядок измерения, если  $c < c_0$ , применяют обратный порядок измерения, и зна-

чения относительных оптических плотностей берут со знаком минус. Градуировочный график при этом не проходит через начало координат, а пересекает ось абсцисс в точке, соответствующей концентрации

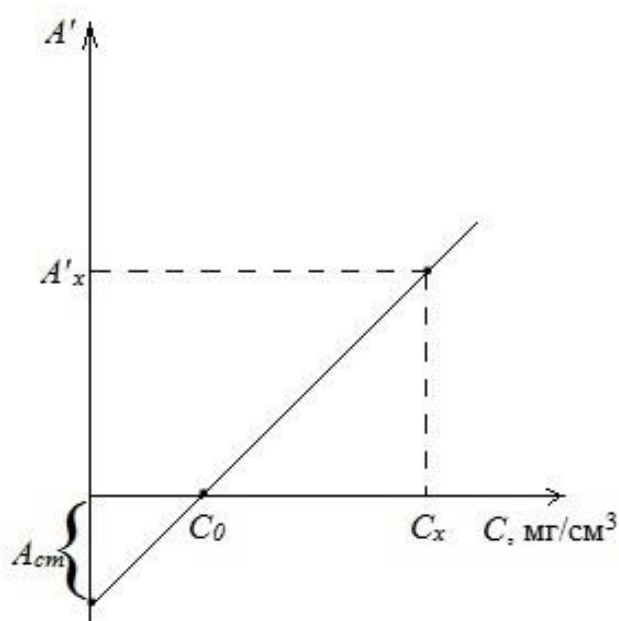


Рис. 47. Градуировочный график в методе двусторонней дифференциальной фотометрии [15, с. 44]

оптической плотности за пределы шкалы прибора (при невозможности дальнейшего разбавления растворов). Точность данного метода также дает ему преимущество перед прямыми способами фотометрирования [15, с. 38–44].

Спектрофотометрические методы широко применяют при *детекции биополимеров*. Использование фотометрии для этих целей имеет ряд нюансов. При идентификации биополимеров необходимо учитывать, что в используемых водных растворах всегда будут находиться низкомолекулярные соединения, в первую очередь вспомогательные электролиты, вводимые для достижения оптимальных показателей рН и ионной силы. Этот факт нужно иметь в виду, потому что мешающие соединения должны быть прозрачны в области поглощения, используемой для детекции выделяемых биополимеров, тем более что концентрация вспомогательных примесей зачастую превышает концентрацию анализируемых веществ [26, с. 248].

При условии, что поглощение растворителя на используемой длине волны отсутствует, то количество вещества в таком случае высчитывают по формуле

раствора сравнения  $c_0$ . Концентрацию исследуемого раствора можно определить и расчетным путем:

$$c_x = c_0 + F \cdot A_x \quad (105).$$

Дифференциальными методами анализа пользуются в тех случаях, когда методы прямой фотометрии применять затруднительно: при определении больших количеств веществ, в случаях нарушения закона Бугера – Ламберта – Бера из-за большой концентрации вещества, либо же при выходе значений



$$n = \frac{AV}{\varepsilon l} \quad (106),$$

где  $A$  – измеренная оптическая плотность,  $V$  – объем измеряемой пробы,  $\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения (экстинкции),  $l$  – длина пути светового пучка через кювету.

В тех случаях, когда анализируемые вещества не обладают поглощением в удобном для измерений спектральном диапазоне, иницируют специальные химические превращения, сопровождающиеся окрашиванием соединений. Например, для детекции аминокислот при анализе аминокислотного состава белков часто применяют нингидрин. При этом происходит превращение этих биополимеров (или мономеров, входящих в их состав) в синий краситель, концентрацию которого и регистрируют на спектрофотометре [26, с. 250].

*Применение фотометрических и спектрофотометрических методов.* Фотометрические и спектрофотометрические методы анализа нашли очень широкое применение во многих отраслях науки и промышленности благодаря высокой чувствительности (нижний предел обнаружения – до  $10^{-7}$  моль/л), избирательности и точности. Этими методами можно определить содержание в исследуемых объектах более 50 элементов периодической системы, главным образом металлов. Методами абсорбционной спектроскопии анализируются руды, минералы и иные природные объекты, продукты переработки обогачительных и гидрометаллургических предприятий. Эффективно используются эти методы в металлургической, электронной, химической и других отраслях промышленности, в медицине, биологии, в мониторинге и аналитическом контроле загрязнений окружающей среды и решении экологических проблем [35, с. 54].

### **Лабораторная работа № 8**

#### ***КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ЛИСТЬЕВ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ***

Количественный анализ пигментов листьев фотометрическим методом можно производить без их предварительного разделения. Для этого готовится вытяжка пигментов и определяется оптическая плотность полученного раствора на фотометре (спектрофотометре) при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения

определяемых компонентов. Затем, посредством математического расчета, находится концентрация изучаемых соединений в пробе.

**Исследуемый материал:** ацетоновая вытяжка пигментов листа.

**Оборудование:** весы, фарфоровая ступка, пестик, промытый кварцевый песок, CaCO<sub>3</sub> (мел), мерные стаканы, воронки, фильтровальная бумага, мерные колбы (25 мл), фотометр КФК-3, кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

**Реактивы:** 85%-ный раствор ацетона.

**Ход работы.** Навеску листьев (0,2 г) помещают в фарфоровую ступку, добавляют на кончике скальпеля немного карбоната кальция, промытого кварцевого песка и растирают с 2–3 мл 85%-го раствора ацетона. К растертой массе добавляют 4–5 мл ацетона и снова растирают несколько минут. Полученную вытяжку пропускают через фильтр в мерный стаканчик. Ступку несколько раз ополаскивают небольшим количеством ацетона и также фильтруют, пока капающий из воронки фильтрат не станет бесцветным. Затем подготовленную вытяжку переливают через сухую стеклянную воронку в мерную колбочку на 25 мл, стаканчик также ополаскивается ацетоном. Далее содержимое колбы доводят растворителем до метки, закрывают пробкой и тщательно взбалтывают. Полученная ацетоновая вытяжка содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

Концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяют на фотометре КФК-3 в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм относительно чистого растворителя (ацетона). Измерения оптической плотности проводят при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b* в 85%-м растворе ацетона – 663 и 644 нм. Для определения содержания каротиноидов определяют оптическую плотность *A* вытяжки при  $\lambda = 452,5$  нм.

Концентрацию пигментов рассчитывают по формулам

$$\begin{aligned}c_{хл.а} &= 10,3A_{663} - 0,918A_{644}, & c_{хл.б} &= 19,7A_{644} - 3,87A_{663}, \\c_{хл.а+б} &= 6,4A_{663} - 18,8A_{644}, & c_{кар.} &= 4,75A_{452,5} - 0,226c_{хл.а+б},\end{aligned}$$

Где  $c_{хл.а}$ ,  $c_{хл.б}$ ,  $c_{хл.а+б}$  и  $c_{кар.}$  – соответственно концентрации хлорофиллов *a*, *b*, их суммы и каротиноидов, мг/л; *A* – значения оптической плотности при соответствующих длинах волн. Результаты записывают в табл. 8.

Определив концентрацию пигмента, находят его содержание (в %) в сырой массе исследуемого материала по формуле

$$X = \frac{cV}{10m},$$

где  $c$  – концентрация пигментов, мг/л,  $V$  – объем вытяжки, л;  $m$  – навеска растительного материала, г.

Таблица 8

### Концентрация пигментов листа в ацетоновой вытяжке

Навеска листьев, г	Объем вытяжки, л	Оптическая плотность			Концентрация пигментов, мг/л			
		$A_{663}$	$A_{644}$	$A_{452,5}$	хл. $a$	хл. $b$	хл. $a+b$	кар.

Содержание хлорофилла в листьях растений составляет в среднем около 0,3% сырой массы (0,1–0,7%). При расчете на 1 дм<sup>2</sup> листовой поверхности количество хлорофилла варьирует в пределах 0,7–0,8 мг. Каротиноидов в листьях примерно в 3–8 раз меньше, чем хлорофилла [41, с. 86–94].

### Лабораторная работа № 9

#### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Глюкоза при нагревании с о-толуидином в растворе уксусной кислоты дает сине-зеленое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию глюкозы. Другие редуцирующие вещества крови (глутатион, глюкуроновая и аскорбиновая кислоты) с о-толуидином окрашенных продуктов не образуют. Содержание глюкозы определяют в жидкости, из которой заранее удаляют белок.

**Исследуемый материал:** биологическая жидкость (кровь, моча).

**Оборудование:** центрифуга, центрифужные пробирки, пробирки (10 мл), водяная баня, фотометр КФК-3, кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

**Реактивы:** 3%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), о-толуидиновый реактив, стандартный раствор глюкозы (100 мг/100 мл), 0,9%-ный раствор NaCl.

**Ход работы. Опытная проба.** В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл 3%-го раствора ТХУ и наливают по стенке 0,5 мл исследуемой биологической жидкости. Содержимое перемешивают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. В стеклянную пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и 4,5 мл о-толуидинового реактива.

**Стандартная проба.** В пробирку вносят 0,5 мл стандартного (100 мг/100 мл) раствора глюкозы и 0,5 мл ТХУ, перемешивают. Затем отбирают 0,5 мл смеси и наливают в другую стеклянную пробирку. Добавляют 4,5 мл о-толуидинового реактива.

**Контрольная проба.** В пробирку вместо биологической жидкости вносят 0,5 мл раствора NaCl и 0,5 мл ТХУ. Перемешивают и отбирают в стеклянную пробирку 0,5 мл смеси. Добавляют 4,5 мл о-толуидинового реактива.

Все три пробирки помещают в кипящую водяную баню на 8 мин, затем вынимают и сразу охлаждают их до комнатной температуры. Содержимое пробирок (опытная и стандартная пробы) фотометрируют с контрольной пробой при  $\lambda = 620$  нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Если опытная проба после нагревания помутнела, ее следует повторно отцентрифугировать.

Расчет концентрации глюкозы (в мг на 100 мл) в исследуемой жидкости проводят по формуле

$$c_{\text{оп}} = \frac{c_{\text{ст}} \cdot A_{\text{оп}}}{A_{\text{ст}}},$$

где  $c_{\text{оп}}$  – концентрация глюкозы в исследуемой жидкости;  $c_{\text{ст}}$  – концентрация глюкозы в стандартной пробе (100 мг/100 мл);  $A_{\text{оп}}$  и  $A_{\text{ст}}$  – оптическая плотность опытной и стандартной пробы соответственно.

Для пересчета концентрации глюкозы в ммоль/л используют коэффициент 0,0555. Нормальное содержание глюкозы в сыворотке крови человека, определяемое о-толуидиновым методом, колеблется в пределах 3,33–4,99 ммоль/л [32, с. 133–134].

## **Лабораторная работа № 10** **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ** **БИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ**

Метод основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди в

щелочной среде. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации белка в сыворотке и определяется фотометрически.

**Исследуемый материал:** сыворотка крови.

**Оборудование:** фотометр КФК-3, пипетки, кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

**Реактивы:** стандартный раствор альбумина в NaCl (100 г/л), биуретовый реактив<sup>1</sup>, 0,9%-ный раствор хлорида натрия.

**Ход работы.** В первую пробирку наливают 0,1 мл исследуемой сыворотки, во вторую (контрольную) – 0,1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия. В обе пробирки приливают по 5 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок осторожно перемешивают, избегая образования пены, и через 30 мин фотометрируют в кюветах на 10 мм при 540 нм против контрольного раствора. Определив оптическую плотность исследуемого раствора, находят по графику, какой концентрации белка (в г/л) она соответствует.

Для построения градуировочного графика готовят из стандартного раствора белка рабочие растворы альбумина: 20, 40, 60, 80 г/л. Для этого к 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 мл основного раствора добавляют 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0 мл 0,9 %-ного раствора NaCl. Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и вносят в пробирки, содержащие 5 мл биуретового реактива; через 30 мин измеряют оптическую плотность стандартных проб на фотометре против контроля.

Нормальное содержание общего белка в сыворотке крови взрослого человека 65–85 г/л [32, с. 178–179].

## Лабораторная работа № 11

### СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО МЕТОДУ СПИРИНА

Метод основан на измерении разности показателей оптической плотности в ультрафиолетовой области спектра, характеризующей содержание фосфора в нуклеиновых кислотах.

---

<sup>1</sup> К 100 мл 0,2 М раствора NaOH добавляют 2,25 г калия-натрия виннокислого (сегнетовой соли), после растворения добавляют 1,25 г иодистого калия и объем доводят до 250 мл 0,2 М раствором NaOH. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стекла не более месяца.

**Исследуемый материал:** сыворотка крови.

**Оборудование:** спектрофотометр, кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм, водяная баня, воронки, фильтровальная бумага.

**Реактивы:** 0,5 М раствор хлорной кислоты.

**Ход работы.** К 1 мл сыворотки крови прибавляют 5 мл 0,5 М раствора хлорной кислоты и перемешивают. Смесь кипятят в течение 20 мин, гидролизат отфильтровывают или центрифугируют.

Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости в кювете с толщиной слоя 10 мм при 270 и 290 нм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 1 мл воды и 5 мл 0,5 М раствора хлорной кислоты.

Содержание нуклеиновых кислот в мкг/мл вычисляют по формуле

$$c = \frac{A_{270} - A_{290}}{0,19} \cdot 10,3 \cdot 6,$$

где  $A_{270}$  и  $A_{290}$  – значения оптической плотности, измеренные при соответствующих длинах волн; 0,19 – коэффициент удельной экстинкции нуклеиновых кислот (среднее значение разницы показаний оптической плотности, соответствующее содержанию 1 мкг фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл испытуемого раствора); 10,3 – коэффициент пересчета количества фосфора на нуклеиновые кислоты, мкг/мл; 6 – разведение испытуемого образца.

В норме содержание общих нуклеиновых кислот в сыворотке крови составляет 80–100 мкг/мл. Увеличение концентрации нуклеиновых кислот в сыворотке крови свидетельствует об усилении процессов катаболизма в клетках.

Метод применим для определения нуклеиновых кислот в иммунобиологических лекарственных препаратах. Содержание нуклеиновых кислот в них должно составлять 15–35 мкг/мл [40, с. 28–29].

## **Лабораторная работа № 12** **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЛИНА В РАСТЕНИЯХ**

Пролин –  $\alpha$ -аминокислота, содержание которой в растениях многократно увеличивается при стрессовых воздействиях. Накопление пролина помогает растениям адаптироваться к неблагоприятным

условиям, защищая от инактивации белки, ДНК, ряд ферментов и другие важнейшие клеточные компоненты.

Метод основан на определении оптической плотности окрашенного раствора после взаимодействия пролина с нингидрином в присутствии сульфосалициловой кислоты.

**Исследуемый материал:** сухие листья растений.

**Оборудование:** фотометр КФК-3, водяная баня, сушильный шкаф, ступки, воронки, пипетки, чашки Петри, шприцы, кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм, фильтровальная бумага.

**Реактивы:** 3%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, 18%-ный раствор сахарозы, ледяная уксусная кислота, 6 М фосфорная кислота, толуол, пролин, кислотный нингидрин<sup>1</sup>.

**Ход работы.** В чашках Петри на фильтровальной бумаге в воде выращивают 7–10-дневные проростки овса, пшеницы, гороха или фасоли. Затем воду сливают и заливают в чашки 18%-ный раствор сахарозы. Через 48 или 72 ч определяют содержание пролина в срезанных листьях после осмотического стресса, предварительно определив его исходное содержание. Пробы листьев высушивают при 105°C и находят сухую массу.

Навеску 0,5 г сухого растительного материала растирают с 10 мл 3%-ной сульфосалициловой кислоты. Гомогенат фильтруют. 2 мл фильтрата смешивают с 2 мл кислотного нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты и выдерживают в течение 1 ч на кипящей водяной бане, после этого пробирки с раствором охлаждают под струей холодной воды. К полученной смеси добавляют 4 мл толуола и энергично встряхивают в течение 15–20 с. Смеси дают отстояться несколько минут. Для дальнейшего определения осторожно, не допуская смешивания, шприцом извлекают верхнюю фазу. Спектральную поглонительную способность определяют на фотометре при 520 нм против толуола. Концентрацию пролина определяют по стандартному градуировочному графику и пересчитывают на 100 г сухой массы.

Для построения графика навеску пролина 10 мг помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки сульфосалициловой кислотой. В 10 мл такого раствора содержится 1 мг пролина. Из этого ис-

---

<sup>1</sup> 1,25 г нингидрина нагревают в 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 6 М фосфорной кислоты до полного растворения. При хранении в холодильнике реактив остается устойчивым в течение 24 часов.

ходного раствора готовят растворы, содержащие 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 мг в 10 мл. Разбавление проводят сульфосалициловой кислотой. Далее берут по 2 мл каждого из приготовленных растворов и поступают с ними также как с гомогенатом из растительного материала по описанной выше схеме [31, с. 74–75].

### Контрольные вопросы

1. Какие виды оптических методов анализа существуют?
2. На чем основаны фотометрические методы анализа?
3. Назовите основные законы светопоглощения. В чем их сущность?
4. В чем заключаются ограничения закона Бугера – Ламберта – Бера?
5. Что называют молярным коэффициентом светопоглощения?
6. Объясните механизм перехода молекул веществ в возбужденное состояние. Что такое спектр поглощения?
7. Для чего используют реагенты и что такое хромофоры?
8. Перечислите основные узлы фотометрических приборов.
9. Назовите особенности основных методов, используемых в фотометрии.
10. В чем заключаются особенности применения спектрофотометрических методов при детекции биополимеров?
11. Каково практическое применение фотометрических методов анализа?

## 3.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

### Теоретические основы люминесцентного анализа

*Люминесценция* (от лат. *luminis* – «свет» и *escent* – суффикс, означающий слабое действие) – избыток излучения тела над температурным в том случае, если это избыточное излучение обладает конечной длительностью примерно  $10^{-10}$  с и больше (определение С. И. Вавилова). Другими словами, люминесценцией называют явление свечения вещества, возникающее в результате перехода молекул, атомов или других частиц из возбужденного состояния в основное.



Впервые явление люминесценции как специфического свечения раствора было описано испанским врачом и ботаником Н. Монарде-сом в 1577 г. В 1852 г. Д. Стокс сформулировал так называемое *правило Стокса* – длина волны фотолюминесценции больше длины волны возбуждающего света. В 1864 г. он предложил использовать явление люминесценции для качественного анализа органических веществ. Дальнейшее развитие люминесцентные методы получили в 1930-е годы благодаря работам советского ученого С. И. Вавилова и его учеников.

По длительности процесса излучения различают:

– кратковременную люминесценцию, называемую *флуоресценцией* (время излучения от  $10^{-13}$  с = 100 фемтосекунд до  $10^{-7}$  = 100 наносекунд). Это явление возникает непосредственно за возбуждением и прекращается сразу же после удаления источника возбуждения.

– медленную люминесценцию, называемую *фосфоресценцией* (время излучения до нескольких минут). Испускание света в таком случае следует только спустя значительное время после произведенного возбуждения и продолжается более или менее длительное время после удаления источника возбуждения [21, с. 4].

В зависимости от способа возбуждения частиц различают следующие виды люминесценции:

1) *фотолюминесценция* – возбуждение вещества электромагнитным излучением (квантами света);

2) *хемилюминесценция* – явление свечения вещества в результате химической реакции;

3) *биолюминесценция* – свечение, возникающее в различных растительных и животных организмах, обусловленное специфическими биохимическими реакциями их метаболизма;

4) *катодолюминесценция* – вещество возбуждается посредством воздействия потока электронов определенной энергии (длины волны);

5) *рентгенолюминесценция* – свечение под действием рентгеновских лучей;

б) *электролюминесценция* – возникает в результате воздействия электрического поля на исследуемое вещество;

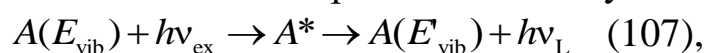
7) *радиолюминесценция (сцинтиляция)* – излучение вызывается воздействием ионизирующего излучения и др [21, с. 4–5].

Все люминесцирующие вещества имеют общее название – *люминофоры*. По своей химической природе они могут быть неорганическими (которые чаще всего и называют люминофорами) и органическими (*органоллюминофорами*). Органические и неорганические люминофоры различаются по природе свечения. В органических люминофорах процесс поглощения возбуждающего света и процесс излучения протекают в пределах каждой способной люминесцировать молекулы. Далеко не все органические соединения обладают свойством флуоресцировать, эта способность зависит от специфических особенностей их химической структуры. Например, при облучении различных клеток некоторых видов животных, растений и микроорганизмов коротковолновым ультрафиолетовым излучением ( $\lambda = 250\text{--}280$  нм), можно зарегистрировать их флуоресцентное свечение, которое обусловлено содержанием в изучаемых клетках специфических белков, витаминов, нуклеиновых кислот, коферментов и др. веществ. Это явление носит название *собственной люминесценции биомолекул*.

В неорганических люминофорах, вследствие их кристаллического строения, в акте люминесценции участвуют не отдельные атомы и молекулы, а их кристаллы. Поэтому их еще называют *кристаллофосфорами*. Дефекты кристаллической решетки (катионные и анионные вакансии, междоузельные атомы и ионы), обуславливающие свечение люминофора называют *центрами люминесценции (центры свечения)* [5, с.151–152].

Многие неорганические вещества в твердом агрегатном состоянии могут проявлять флуоресцентные и фосфоресцентные свойства, в растворенном же состоянии флуоресцируют лишь соли редкоземельных металлов, урановые соли и некоторые комплексные соли тяжелых металлов.

Процесс возбуждения вещества и последующий выход люминесценции схематически можно представить следующим образом:



где  $A(E_{\text{vib}})$  и  $A(E'_{\text{vib}})$  – основное состояние центра люминесценции  $A$  до и после поглощения и испускания кванта люминесценции соответственно;  $E_{\text{vib}}$  – колебательная энергия основного состояния до поглощения излучения и  $E'_{\text{vib}}$  – после люминесценции;  $A^*$  – возбужденное состояние;  $h\nu_{\text{ex}}$  – энергия кванта возбуждения;  $h\nu_{\text{L}}$  – энергия кванта люминесценции.

Различают *вынужденную* и *спонтанную* люминесценцию возбужденного состояния  $A^*$ . Вынужденная люминесценция обычно наблюдается в сложных органических молекулах при низких температурах, а также она характерна для соединений, которые имеются в составе полимерных пленок, стекла и т. п. Когда прямой переход из возбужденного электронного состояния в основное маловероятен вследствие правил отбора, то такому переходу может поспособствовать вынужденная люминесценция – путем повышения температуры можно достичь спонтанного перехода в основное состояние, разрешенного правилами отбора (рис. 48).

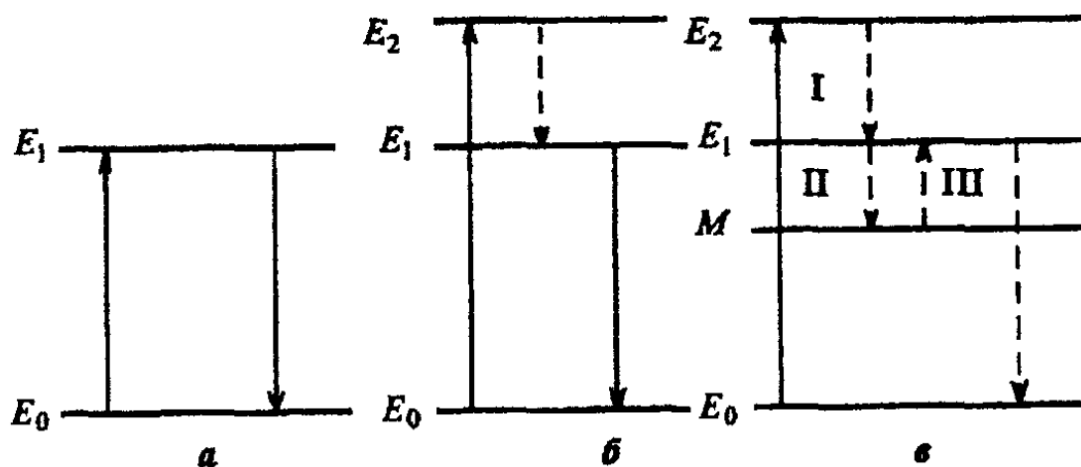


Рис. 48. Схема возникновения резонансной спонтанной (а), нерезонансной спонтанной (б) и вынужденной люминесценции (в) [21, с. 7]:

$E_0$  — основное состояние;  $E_1, E_2$  — возбужденные состояния;

$M$  — метастабильное состояние люминесцентного центра.

Пунктирные стрелки обозначают переходы, не сопровождающиеся излучением

Спонтанная фотолюминесценция сопровождает электронный переход возбужденного центра люминесценции,  $A^* \rightarrow A$  в уравнении (107).

Если энергия кванта возбуждения  $h\nu_{\text{ex}}$  равна энергии электронного перехода, сопровождающего последующий процесс флуоресценции, тогда наблюдается *резонансная флуоресценция*. Она не зависит от температуры и определяется только правилами отбора электронных переходов. Спектры спонтанной люминесценции наблюдаются для паров металлов и ряда сложных органических молекул, находящихся в растворах [21, с. 6–7].

К спектральным характеристикам относятся спектр люминесценции и спектр возбуждения люминесценции. *Спектр возбуждения*

люминесценции – зависимость интенсивности люминесценции (флуоресценции, фосфоресценции) от длины волны возбуждающего света. *Спектр люминесценции* – зависимость интенсивности излучения (флуоресценции, фосфоресценции) от ее длины волны.

На рис. 49 представлены спектральная характеристика лучей, возбуждающих люминесценцию (1), и спектральная характеристика самой люминесценции (2). Как видно, энергия квантов света, выдел-

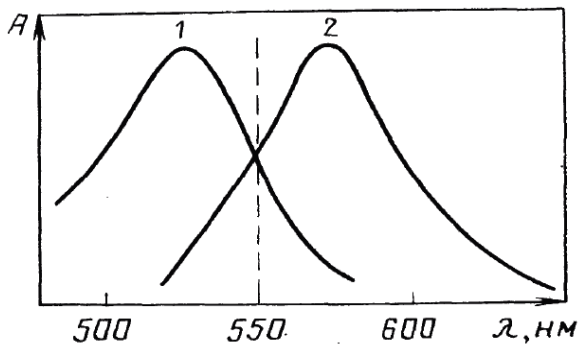


Рис. 49. Спектры возбуждения (1) и люминесценции (2) [19, с. 33]

лившихся при люминесценции, меньше, чем энергия квантов возбуждающего света. Эта закономерность была установлена на основе простых наблюдений и известна как *закон Стокса – Ломмеля*: спектр излучения в целом и его максимум сдвинуты по сравнению со спектром возбуждения и его максимумом в сторону длинных волн [18, с. 33].

Характер спектров определяется природой люминесцентного центра, энергиями его возбужденных состояний, вероятностями излучательных переходов между различными состояниями. Кроме этого, на характер спектра оказывает сильное влияние окружающая среда. Не все поглощенные кванты света преобразуются в люминесценцию – часть энергии тратится на безызлучательные переходы. Эффективность преобразования поглощенной энергии в энергию люминесценции характеризуется энергетическим и квантовым выходами.

Отношение излучаемой веществом энергии люминесценции ( $E_{л}$ ) к энергии поглощенного света ( $E_{п}$ ) представляет собой *энергетический выход люминесценции* ( $\varphi_{э}$ ):

$$\varphi_{э} = \frac{E_{л}}{E_{п}} \quad (108).$$

*Квантовый выход люминесценции* ( $\varphi_{к}$ ) представляет собой отношение числа квантов люминесценции, излученных веществом ( $N_{л}$ ), к числу поглощенных квантов возбуждающего света ( $N_{п}$ ):

$$\varphi_{к} = \frac{N_{л}}{N_{п}} \quad (109).$$

Учитывая, что энергия кванта света равна  $h\nu$ , энергия  $N$  квантов света  $E = N h\nu$ . Тогда связь между  $\varphi_{\text{э}}$  и  $\varphi_{\text{к}}$  следующая:

$$\varphi_{\text{э}} = \frac{N_{\text{л}} h\nu_{\text{л}}}{N_{\text{н}} h\nu_{\text{н}}} = \frac{\nu_{\text{л}}}{\nu_{\text{н}}} \varphi_{\text{к}} \quad (110).$$

Зависимость энергетического выхода люминесценции от длины волны возбуждающего света подчиняется *закону Вавилова*: при увеличении длины волны возбуждающего света выход люминесценции возрастает до известного предела, затем, на некотором интервале волн остается постоянным, после чего при дальнейшем увеличении длины волны резко падает [18, с. 32].

Спектры люминесценции и поглощения сложных органических молекул имеют слабо разрешенную, «размытую» колебательную структуру, либо вообще не имеют колебательной структуры. Для таких веществ В. Л. Лёвшин (1896–1969) сформулировал *правило зеркальной симметрии Лёвшина*: длинноволновая часть спектра испускания и коротковолновая часть спектра поглощения в частотных координатах являются взаимным зеркальным отображением, если соответствующие спектры нормированы [21, с. 21–22].

*Нормированными* называют спектры, приведенные к одному максимуму. Спектры необходимо нормировать, так как интенсивность поглощения и излучения они получают в разных единицах. Для сравнения спектры предварительно преобразуют так, чтобы амплитуды их были одинаковы в максимумах.

Правило зеркальной симметрии соблюдается не для всех веществ. При выполнении правила справедливо соотношение

$$\nu_{\text{abs}} - \nu_{\text{fl}} = 2(\nu_{\text{abs}} - \nu_0) \quad (111),$$

и, следовательно,

$$\nu_{\text{abs}} - \nu_{\text{fl}} = 2(\nu_{\text{abs}} - \nu_0) \quad (112),$$

где  $\nu_{\text{abs}}$  и  $\nu_{\text{fl}}$  – частоты поглощения и флуоресценции;  $\nu_0$  – частота в точке пересечения спектров.

График зависимости  $(\nu_{\text{abs}} - \nu_{\text{fl}})$  от  $\nu_{\text{abs}}$  должен представлять собой прямую линию с тангенсом угла наклона равным 2. Соблюдение правила зеркальной симметрии позволяет построить спектр флуоресценции или поглощения, имея только один из них [35, с. 65].

Для количественного анализа наибольший интерес представляет зависимость выхода люминесценции от концентрации люминесциру-

ющего вещества. Кривая зависимости, характерная для данного явления представлена на рис. 50. Исходя из рис. 50 понятно, что между этими двумя величинами существует прямая пропорциональность. Именно эта область и представляет интерес для количественного анализа. Для большинства веществ эта область охватывает концентрации порядка  $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л, то есть с помощью люминесцентного метода анализа можно определять очень незначительные количества веществ в растворах.

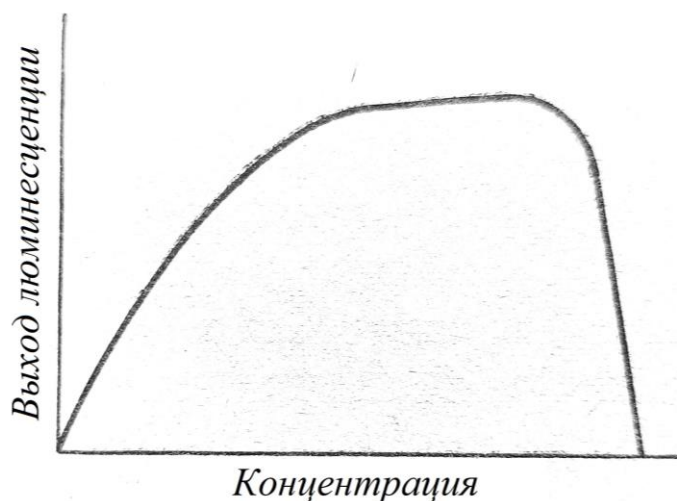


Рис. 50. Зависимость выхода люминесценции от концентрации люминесцирующего вещества [33, с. 152]

На графике видно, что с повышением концентрации, величина выхода становится почти постоянной, а затем резко падает. Это явление уменьшения выхода люминесценции с увеличением концентрации называется *концентрационным тушением (гашением) люминесценции* [32, с. 152].

С повышением температуры обычно также наблюдается ослабление

свечения. Это явление носит название *температурного тушения люминесценции*. Суть его в том, что при повышении температуры увеличивается колебательная энергия молекул и таким образом возрастает вероятность безызлучательных переходов, а также существует возможность диссоциации возбужденных частиц, проходящая без излучения квантов света.

Также на интенсивность выхода люминесценции могут влиять некоторые мешающие вещества, присутствующие в растворе. Эти соединения называют *тушителями (гасителями) люминесценции*, а само явление называется *тушением примесями*. В качестве таких веществ могут выступать примеси кислорода, ионов переходных элементов ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и др.), тяжелых атомов ( $\text{I}$ ,  $\text{Br}^-$ ). Это обусловлено тем, что производные этих веществ могут поглощать часть энергии падающих лучей света (или выделяемой энергии люминесценции), за счет чего и снижается выход люминесценции определяемого вещества [18, с. 35].

## Практическая реализация и применение люминесцентных методов

Для измерения флуоресценции используют *спектрофлуориметры* и *флуориметры*. Для измерения фосфоресценции используют *фосфориметры*.

Для приборов, используемых при измерении люминесценции, обязательны следующие узлы:

1) *Источники возбуждения*. Для возбуждения люминесцентного излучения используют ртутно-кварцевые, ксеноновые, вольфрамгалогенидные лампы, дающие излучение в УФ и видимой областях.

2) *Устройства для выделения спектрального диапазона*. Для работы приборов для измерения люминесценции необходимо два таких устройства. Первое служит для выделения полосы излучения, возбуждающего вещество, второе – для выделения нужной длины волны (или интервала длин волн) из спектра люминесценции. Для этих целей используют

призмные и дифракционные монохроматоры (в спектрофлуориметрах) и светофильтры (в флуориметрах).

3) *Детекторы*. Для регистрации люминесцентного излучения используют счетчики фотонов и фотоумножители, которые преобразуют световой сигнал в электрический [35, с. 63].

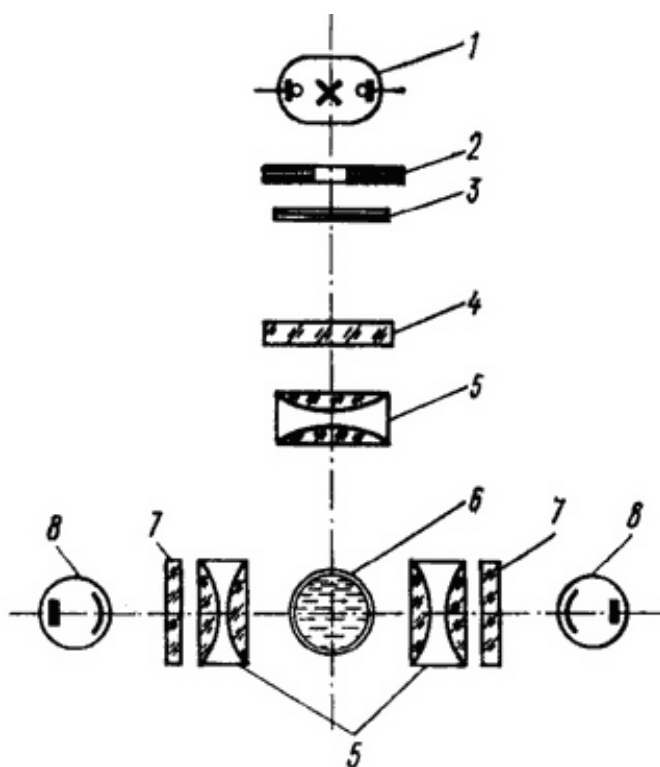


Рис. 51. Принципиальная оптическая схема флуориметра [19, с. 17]:

- 1 – источник излучения (кварцевая лампа),
- 2 – диафрагма, 3 – шторка, 4 – первичный светофильтр, 5 – конденсор (кварцевая линза),
- 6 – кювета с исследуемым раствором,
- 7 – вторичные светофильтры,
- 8 – фотоэлементы

Принципиальная схема флуориметра представлена на рис. 51. Свет от кварцевой лампы 1, пройдя через диафрагму 2, светофильтр 4, конденсор 5, попадает на кювету с исследуемым раствором 6. Образующееся свечение флуоресценции, пройдя кварцевую оптику и вторичные светофильтры 7, попадает на фотоэлементы 8, преобразующие световую энергию в электрический сигнал. Он усиливается и регистрируется микроамперметром. Показания пропорциональны интенсивности флуоресценции. В интервале между исследованиями шторка 3 закрывается. Светофильтры подбираются определенным образом: первичный светофильтр должен пропускать поглощаемое образцом излучение и не пропускать излучение флуоресценции. Вторичный светофильтр напротив, должен пропускать излучение флуоресценции, но возбуждающее излучение должно им полностью поглощаться. Таким образом добиваются минимальных искажений и высокой степени точности измерений [19, с. 18–19].

Одним из приборов, широко используемых на практике при проведении исследований, основанных на люминесцентном методе, является «Флюорат». Внешний вид прибора представлен на рис. 52.

Анализаторы типа «Флюорат-02» предназначены для измерения содержания различных веществ в жидких средах фотометрическими и люминесцентными методами. Также возможен анализ воздушных сред, почв, технических материалов, продуктов питания после проведения анализируемых проб в раствор. Область применения анализатора – аналитический контроль и мониторинг экологического состояния объектов окружающей среды, санитарный контроль, контроль производственных процессов.



Рис. 52. Внешний вид люминесцентно-фотометрического анализатора жидкости Флюорат-02-4М

Данный прибор позволяет использовать довольно широкий спектр методов:

1) Метод «Люминесценция». В этом режиме происходит измерение флуоресценции (быстрой люминесценции) изучаемой пробы в направлении, перпендикулярном направлению распространения воз-



буждающего излучения. Для начала измерений необходимо подобрать комплект светофильтров, выделяющих нужные спектральные области и поместить их в специальные гнезда кюветного отделения. Затем выбирают чувствительность фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), тип градуировки и далее следуют методике работы по определению того или иного анализируемого вещества.

2) Метод «Фотометрия». Согласно данной программе, прибор измеряет отношение интенсивности светового потока, прошедшего через определяемый образец к интенсивности светового потока, прошедшего через образец сравнения (фоновый раствор), на основе чего определяется концентрация изучаемого вещества. Для измерений выбирают светофильтр, выделяющий необходимую спектральную область, и помещают его в соответствующее гнездо. В зависимости от природы определяемого вещества и требуемой точности измерений используются кюветы с длиной оптического пути 10, 20 и 40 мм. Остальные требования по определению конкретных веществ, как правило, прописаны в методике.

3) Метод «Фосфоресценция». При использовании данного метода происходит измерение фосфоресценции и замедленной флуоресценции, т. е. свечения со временем затухания более 100 микросекунд, длящегося после отключения источника света.

4) Метод «Хемилюминесценция». Данный метод подходит для измерения концентрации веществ, вступающих в химическую реакцию, вследствие которой и возникает излучение люминесценции, регистрируемое прибором.

5) Режим «Хроматография». Анализатор в данном режиме используется как флуориметрический детектор. При этом он должен быть состыкован с любым жидкостным хроматографом или подключен к компьютеру со специальным программным обеспечением (тогда зависимость сигнала флуоресценции от времени, т. е. хроматограмма, будет преобразовываться и расшифровываться компьютером).

Существует ряд методов количественного люминесцентного анализа.

*Метод градуировочного графика.* Для использования этого метода необходимо приготовить серию стандартных растворов с концентрациями ( $c_1, c_2, c_3 \dots$ ), охватывающими весь диапазон ожидаемых содержаний определяемого вещества в пробе. Затем измеряют интен-

сивность флуоресценции  $I_m$  каждого раствора и по полученным данным строят градуировочный график зависимости интенсивности флуоресценции ( $I_f$ ) от концентрации вещества ( $c$ ). Далее анализируют интенсивность флуоресценции исследуемой пробы, приготовленной по той же методике, что и стандартные растворы. По графику в точке пересечения с градуировочной прямой находят массовую долю определяемого вещества.

*Метод одного стандарта.* Для применения этого метода важно соблюдение закона Вавилова. В таком случае готовят стандартный раствор с точно известной концентрацией вещества, близкой к исследуемой пробе. Измеряют интенсивность флуоресценции обоих растворов ( $I_s$  и  $I_x$ ):

$$I_s = kc_s \quad (113),$$

$$I_x = kc_x \quad (114),$$

где  $k$  – коэффициент пропорциональности.

Далее по формуле (115) находят концентрацию исследуемого вещества:

$$c_x = \frac{I_x}{I_s} \cdot c_s \quad (115).$$

*Метод добавок* применяют, когда состав пробы неизвестен, или меняется от пробы к пробе. В таком случае берут три одинаковых образца пробы и в два последних добавляют точное количество определяемого вещества. Причем размеры добавок определяемого вещества ко всем пробам должны соответствовать пропорции:  $c_x(c_x + \Delta c_1) : (c_x + \Delta c_2) = 1:2:3$ , где  $\Delta c_1$  и  $\Delta c_2$  – изменение содержания определяемого вещества, вызванное процедурой добавки.

После измерения интенсивности люминесценции всех трех образцов строят график в координатах  $\lg I - \Delta c$ . Содержание определяемого вещества в пробе  $c_x$  находят путем экстраполяции графика на значение  $\lg I = 0$  [19, с. 30–31].

*Фосфоресцентный анализ* – метод люминесцентного анализа, основанный на изучении спектров фосфоресценции. Метод очень точный, позволяет производить обнаружение вещества в пределах  $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л.

Явление фосфоресценции органических молекул основано на дезактивации возбужденных триплетных состояний. Так как время жизни этих состояний составляет до 100 с, то возникает необходи-

мость *иммобилизации* молекул – помещения их в жесткую матрицу для уменьшения вероятности безызлучательной дезактивации триплетных состояний посредством соударений и внутренней конверсии. В таких случаях при идентификации органических веществ используют растворители, увеличивающие вязкость при охлаждении растворов анализируемых образцов до температуры их кристаллизации.

Такие растворители должны соответствовать следующим параметрам:

- химическая инертность;
- неспособность поглощать возбуждающий свет и свет флуоресценции;
- способность к растворению изучаемых соединений в пробах;
- устойчивость к воздействию мощных световых потоков.

В качестве таких растворителей чаще всего используют смеси: этиловый спирт – диметилформамид (в соотношении от 2:1 до 4:1) и этиловый спирт – изопентан – диэтиловый эфир (1:2:2 или 2:5:5). Данные смеси кристаллизуются при температуре плавления жидкого азота (77 К) в однородную массу, лишенную трещин и практически не обладающую светорассеиванием. Предварительно из смеси удаляют кислород, чтобы избежать тушения флуоресценции.

Существуют и другие способы иммобилизации. Например, флуоресценцию при комнатной температуре можно наблюдать на фильтровальной бумаге или на других поверхностях (подложках), после адсорбции пробы. Этот метод является более доступным, но имеет и недостатки: подложка создает значительный фоновый сигнал, который может искажать результаты измерений.

Некоторые вещества можно иммобилизовать при комнатной температуре посредством использования поверхностно-активных веществ (ПАВ), например, лаурилсульфата натрия. Минус этого способа в том, что точность измерений снижается на один – два порядка по сравнению с иммобилизацией при низких температурах.

Метод фосфориметрии используется для определения полиароматических углеводородов, витаминов, антибиотиков и других органических веществ [36, с. 516].

*Хемилюминесцентный анализ* используется в случае необходимости измерить концентрацию неорганических веществ по интенсивности свечения, которое возникает в результате окислительно-

восстановительных реакций органических веществ (например, люминола, люцигенина и др. с катионами переходных металлов, таких как Fe(III), Co(II), Cu(II), Ni(II), Mn(II) и др.). Предел обнаружения составляет  $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л [21, с. 32].

*Качественный люминесцентный анализ* проводится для идентификации веществ, способных люминесцировать при определенных условиях, или, реже, гасить люминесценцию. В данном случае анализируют спектр люминесценции и по расположению максимумов на графике делают выводы о присутствии того или иного люминофора.

Визуально наблюдаемое возникновение или исчезновение люминесценции используется при идентификации некоторых алкалоидов (в т. ч. наркотических веществ): кокаин флуоресцирует светлосиним, кодеин – слабо-желтым, наркотин – темно-фиолетовым.

При идентификации неорганических веществ часто используют органические реагенты, которые дают очень чувствительные люминесцентные качественные реакции, хорошо регистрируемые приборами. Например, для идентификации бериллия, циркония и других элементов используют морин, для обнаружения алюминия – 8-оксихинолин, соли цинка в растворе можно обнаружить при добавлении салициловой кислоты. С помощью введения небольших количеств ионов металлов-активаторов (серебра, меди, марганца, лантаноидов) можно добиться образования кристаллофосфоров – кристаллических неорганических веществ, способных люминесцировать под действием активаторов. Метод обладает низким пределом обнаружения и высокой селективностью, поэтому он нашел свое применение в разных сферах научной и производственной деятельности.

Разновидность качественного люминесцентного анализа – т. н. *сортной анализ* – используется в сельском хозяйстве (например, при облучении УФ-лучами жизнеспособные семена дают желтое свечение, а нежизнеспособные – коричневое), пищевой промышленности, криминалистике, медицинской экспертизе, при выявлении подделок документов и контроле качества лекарственных препаратов и т. д. Кроме того, с его помощью можно обнаружить невидимые при обычном освещении дефекты и различия в исследуемых объектах, таких как стекло, минералы, ископаемые породы и т. п. [18, с. 35–36].

*Люминесцентная микроскопия* широко применяется в биологических исследованиях при изучении клеток, тканей, органов, или

структур, входящих в их состав. Для успешной работы в рамках данного метода используют специальные флуоресцирующие красители, которые поглощают свет одной длины волны, а излучают световые волны уже более длинные. Если такое вещество облучить светом с длиной волны идентичной максимуму поглощения этого вещества, а на выходе светового потока использовать фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей свету, излучаемому красителем, флуоресцирующую молекулу можно идентифицировать по свечению на темном поле. Характерной чертой таких молекул является высокая интенсивность излучаемого света, которая без труда обнаруживается исследователем.

Люминесцентные микроскопы, используемые в исследованиях такого плана, имеют некоторые конструктивные особенности по сравнению с обычными микроскопами – световыми. Свет от установленного мощного осветительного устройства проходит через специальные фильтры – один фильтр находится перед образцом и служит для задержания света, а второй необходим для фильтрации света, излучаемого от образца.

Оптическая схема люминесцентного микроскопа представлена на рис. 53. Источником «возбуждающего света» может служить ртутная лампа, УФ-лампа и др. Свет от лампы 1 проходит через конденсор 2, в котором он собирается в плотный интенсивный пучок. Затем он проходит через «возбуждающий фильтр» 3, покрытие которого пропускает свет с определенной длиной волны. Затем уже «обрезанный» свет попадает на дихроичное зеркало 6, покрытие которого отражает свет с длиной волны, соответствующей пропускаемому через «возбуждающий» фильтр. Дихроичное зеркало 6 расположено под углом  $45^\circ$  к плоскости тыльной линзы объектива 5 и под таким же углом к плоскости линз конденсора, таким образом «возбуждающий свет» отражаясь от поверхности зеркала, попадает на тыльную линзу объектива 5 и, пройдя сквозь всю систему линз последнего, воздействует на исследуемый образец 4, связанный с флуоресцентным красителем.

В биологических исследованиях люминесцентную микроскопию часто используют для идентификации специфических белков или других макромолекул, которые образуют флуоресцирующие вещества при реакции со специальными красителями. Например, флуоресцирующие агенты могут связываться с молекулами антител, что делает

их удобными красящими реагентами, которые способны селективно связываться со специфическими макромолекулами на поверхности либо внутри фиксированной клетки, что делает эти структуры удобными для рассмотрения. В качестве таких красителей обычно используют флуоресцеин (при возбуждении светом голубого цвета дает желто-зеленую флуоресценцию) и родамин, который после облучения желто-зеленым светом люминесцирует в темно-красном спектре.

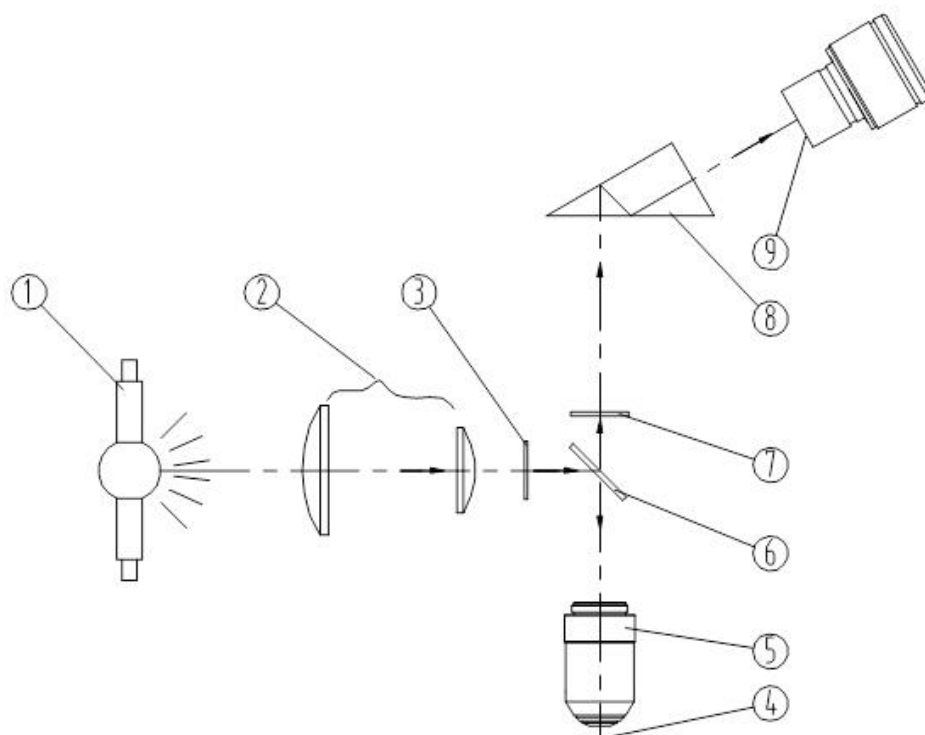


Рис. 53. Оптическая схема люминесцентного микроскопа:

1 – источник излучения, 2 – конденсор, 3 – возбуждающий фильтр, 4 – исследуемый образец, 5 – объектив, 6 – дихроичное зеркало, 7 – барьерный фильтр, 8 – линза, 9 – окуляр

### **Лабораторная работа № 13** **ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ** **РИБОФЛАВИНА**

Спектр флуоресценции рибофлавина находится в желто-зеленой области (515–615 нм) с максимумом около 530 нм. Флуоресценция наиболее интенсивна при рН 6–8. В щелочной среде рибофлавин быстро разрушается (при комнатной температуре в 0,1 М растворе NaOH полное разрушение – за 24 ч). Под действием прямого солнечного света или ультрафиолета, разбавленные растворы рибофлавина

подвергаются фотолизу с образованием люмифлавина, люмихрома и ряда других изоаллоксазинов с укороченной боковой цепью.

**Исследуемый материал:** раствор рибофлавина.

**Оборудование:** флуориметр «Флюорат-02», мерные колбы на 50 мл, фарфоровые ступки с пестиками, кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

**Реактивы:** рибофлавин (сухой порошок), коммерческие препараты, содержащие рибофлавин.

**Ход работы.** Работа выполняется в несколько стадий (этапов):

1. Приготовление эталонного раствора рибофлавина ( $10^{-4}$  г/мл).
2. Получение растворов рибофлавина концентраций  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-8}$ ;  $10^{-9}$  г/мл путем кратного разведения эталонного раствора.
3. Построение калибровочной кривой для флуориметрического определения содержания рибофлавина в растворе.
4. Подготовка проб промышленных препаратов рибофлавина для анализа.
5. Флуориметрическое определение содержания рибофлавина в растворе-«задаче» и промышленных препаратах.

**Стадия 1.** Рассчитывают количество рибофлавина, необходимое для приготовления 50 мл эталонного раствора концентрации  $10^{-4}$  г/мл. Навеску помещают в мерную колбу на 50 мл и растворяют в небольшом количестве воды. Объем реактива доводят водой до риски.

**Стадия 2.** Нумеруют 5 мерных колб. В колбу № 1 помещают 5 мл эталонного раствора рибофлавина, объем доводят до риски водой и получают раствор с концентрацией  $10^{-5}$  г/мл. Из колбы № 1 раствор (5 мл) переносят в колбу № 2, доводят объем и получают раствор с концентрацией рибофлавина  $10^{-6}$  г/мл. Операцию повторяют еще 3 раза.

**Стадия 3.** Для всех калибровочных растворов определяют величину флуоресценции (возбуждающий свет  $\lambda = 360$  нм, максимум флуоресценции при 530 нм). По полученным данным строят калибровочный график зависимости величины флуоресценции от концентрации рибофлавина в растворе ( $F - c$ , г/мл).

**Стадия 4.** Для подготовки пробы промышленного препарата рассчитывают навеску или объем препарата, необходимые для получения раствора с конечной концентрацией рибофлавина в пределах  $10^{-6} - 10^{-8}$  г/мл.

Навеску твердого препарата рибофлавина помещают в фарфоровую ступку и растирают в небольшом количестве воды (5–10 мл) до гомогенного состояния. Гомогенат (или рассчитанный объем жидкого препарата) количественно переносят в мерную колбу, объем доводят водой до риски.

**Стадия 5.** Для всех растворов с неизвестной концентрацией рибофлавина (раствор-«задача» и пробы промышленных препаратов) определяют величину флуоресценции (возбуждающий свет  $\lambda = 360$  нм, максимум флуоресценции – 530 нм). По калибровочному графику определяют концентрации рибофлавина [44, с. 13–15].

### **Лабораторная работа № 14**

#### ***ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИЖИЗНЕННОГО СВЕЧЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МИКРОСКОПА***

Естественным люминофором растений является зеленый пигмент хлорофилл. Хлорофилл имеет темно-красную люминесценцию, что объясняется сопряженной структурой входящего в его состав порфиринового цикла.

**Исследуемый материал:** листья растений (элодея, сирень, вишня, комнатные растения), одноклеточные водоросли (хлорелла).

**Оборудование:** флуоресцентный микроскоп, иглы, скальпель для препарирования, предметные и покровные стекла.

**Реактивы:** раствор медного купороса.

**Ход работы.** Каплю взвеси одноклеточных водорослей, листок многоклеточного растения (предварительно отпрепарированный) помещают на предметное стекло, накрывают покровным и помещают на предметный столик. Наблюдение проводят сначала на малом увеличении (объектив  $\times 10$ ). Затем при большом увеличении рассматривают структуру хлоропластов и отмечают особенности свечения различных объектов. Увиденное необходимо зарисовать.

Листок многоклеточного растения помещают на предметное стекло, наносят 1–2 капли красителя и через 5 мин промывают водой. Наблюдение проводят сначала на малом увеличении (объектив  $\times 10$ ). Затем, при большом увеличении рассматривают структуру клеток и отмечают особенности свечения различных объектов. Наблюдаемое зарисовывают [52, с. 34].



## Контрольные вопросы

1. Дайте понятие «люминесценция» и кратко охарактеризуйте историю развития метода.
2. Какие виды излучения выделяют, исходя из его длительности? Назовите их особенности.
3. Дайте классификацию видов люминесценции в зависимости от способа возбуждения частиц вещества.
4. Что такое люминофоры? На какие группы делятся эти вещества исходя из особенностей их химической структуры и природы происхождения?
5. Чем различаются спонтанная и вынужденная люминесценции?
6. Что называют спектром люминесценции и спектром возбуждения люминесценции? В чем заключается закон Стокса – Ломмеля?
7. Каким образом рассчитываются энергетический и квантовый выходы люминесценции?
8. Поясните, в чем сущность закона Вавилова и правила зеркальной симметрии Лёвшина.
9. Какие виды тушения люминесценции вы знаете?
10. Назовите основные узлы приборов, предназначенных для измерения интенсивности люминесценции.
11. Опишите принципиальную схему флуориметра.
12. Перечислите основные виды качественного и количественного люминесцентного анализа. В каких областях научной или производственной деятельности их применяют?
13. Каковы особенности люминесцентной микроскопии? Опишите принципиальную схему оптической системы люминесцентного микроскопа.

### 3.3. РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

#### Теоретические основы рентгенофлуоресцентного анализа

*Рентгенофлуоресцентный анализ (РФА)* – один из методов рентгеноспектрального анализа (РСА), основанных на взаимодействии рентгеновского излучения с анализируемым веществом.

*Рентгеновским излучением* называют открытое В. Рентгеном в 1895 г. электромагнитное излучение с длиной волны 0–100 нм (между ультрафиолетовым и гамма-излучением) с энергией 0–150 кэВ. Для РСА чаще всего используют излучение с энергией 10–70 кэВ.

Рентгеноспектральный анализ основан на характеристичности рентгеновских спектров испускания и поглощения свободных или связанных в химические соединения атомов.

*Происхождение характеристических спектров.* Соударения с быстро движущимися частицами, столкновение электронов с какой-либо твердой поверхностью или взаимодействие с мощным электромагнитным излучением при определенных условиях могут вызвать возбуждение или ионизацию атомов. Как правило, эти состояния не устойчивы и не могут продолжаться длительное время. Атом, потерявший валентный (оптический) электрон, сталкиваясь со свободным электроном, захватывает его, т. е. «рекомбинирует», и вновь становится нейтральным. Если из атома выбит внутренний электрон, то его место самопроизвольно занимает электрон с более удаленной от ядра внутренней оболочки. Валентный электрон возбужденного атома при определенных условиях может самопроизвольно перейти на более низкую орбиту или же перейти на нее в результате соударения со свободным электроном или другой частицей. При рекомбинации и самопроизвольных переходах внутриатомных электронов на более низкую орбиту атом отдает избыточную энергию в виде электромагнитного излучения – оптического или рентгеновского. В случае перехода внутренних электронов наблюдается *характеристическое рентгеновское излучение*, а в случае переходов валентных электронов – более длинноволновое *характеристическое оптическое излучение*.

При каждом переходе в более низкое энергетическое состояние атом теряет энергию *квантами*. При самопроизвольных переходах излучается порция *световой электромагнитной энергии* определенной частоты, а стало быть и длины волны. Энергия кванта при самопроизвольных переходах оптического электрона в атоме равна разности энергий атома на верхнем и нижнем уровнях  $E_n - E_k$  и связана с частотой излученного света  $\nu_{nk}$  соотношением

$$E_n - E_k = h\nu_{nk} \quad (116),$$

а длина волны  $\lambda$  излученного света связана с величиной кванта соотношением

$$E_n - E_k = h \frac{c}{\nu} \quad (117),$$

где  $c$  – скорость света в вакууме ( $3,00 \cdot 10^8$  м/с),  $h$  – постоянная Планка ( $6,6254 \cdot 10^{-34}$  Дж·с).

Излучение какой-либо одной длины волны (монохроматическое излучение), соответствующее определенному энергетическому переходу в атоме, называют *спектральной линией*.

Поскольку атомы каждого элемента имеют свою специфическую систему энергетических уровней, то они способны излучать характеристические для данного элемента спектральные линии. Измерив заранее длины волн этих линий, можно в дальнейшем различать элементы по виду излучаемых ими спектров [32, с. 166–168].

*Рентгеновские характеристические спектры.* Линии спектров возникают при переходах внутренних электронов с оболочки на оболочку. Такие переходы возможны, когда один из электронов предварительно был удален из атома. Если удален электрон оболочки  $K$  (рис. 54), то освободившееся место может занять либо один из электронов оболочек  $L$  или  $M$  или же еще более удаленных оболочек. Когда нижним уровнем является оболочка  $K$ , а верхним любая другая, то излучаются линии, образующие  $K$  серию рентгеновского спектра. Если нижней оказывается оболочка  $L$ , то возникает  $L$  серия спектра и т. д. Каждая серия состоит из ряда линий, которые обозначаются соответственно:  $K_\alpha, K_\beta, K_\gamma, \dots L_\alpha, L_\beta, L_\gamma$  и т. д.

Возникновение рентгеновского спектра можно изобразить схематически так же, как и возникновение оптического спектра (см. рис. 54). Расстояние между уровнями зависит от строения атома (заряда ядра). Поэтому длина волны линий каждой серии зависит от положения элемента в периодической системе Менделеева. Каждому элемен-

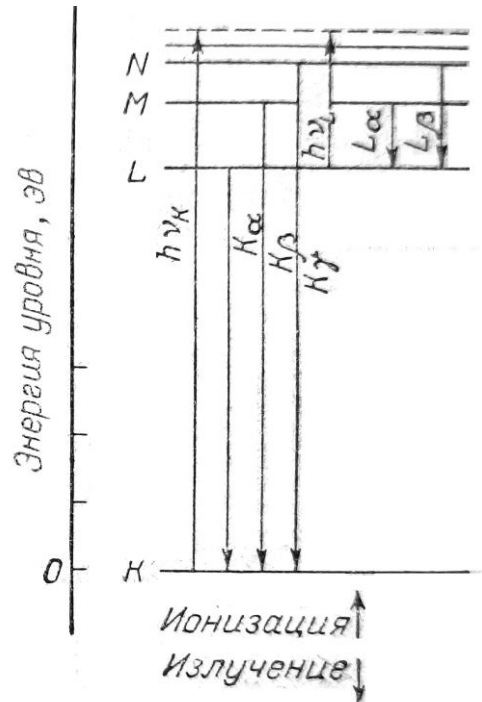


Рис. 54. Рентгеновский спектр: схема энергетических уровней в атоме [32, с. 167]

ту соответствуют свои характеристические рентгеновские частоты (длины волн).

В отличие от оптических спектров между частотами определенных линий ( $K_{\alpha}$ ,  $L_{\alpha}$ ,  $K_{\beta}$ ,  $L_{\beta}$  и т. д.) рентгеновских спектров различных элементов и их порядковым номером существует простая зависимость. Чем больше атомный номер, тем больше частота, а следовательно, меньше длина волны линии  $K_{\alpha}$ ,  $L_{\alpha}$  и т. п. По частотам (длинам волн) линий рентгеновского спектра вещества можно определить его элементарный состав. В рентгеновском спектре элемента значительно меньше линий, чем в его оптическом спектре.

Для возбуждения рентгеновского спектра вещество либо бомбардируют быстрыми электронами (с кинетической энергией, измеряемой киловольтами и десятками киловольт), либо рентгеновскими квантами высоких энергий.

В первом случае получают так называемый *первичный рентгеновский спектр*, во втором случае наблюдают *спектры флуоресценции*, называемые также *вторичными спектрами* [32, с. 170–171].

*Метод РФА* основан на анализе характеристического спектра флуоресцентного (вторичного) излучения пробы. Система энергетических уровней внутренних оболочек не претерпевает изменений, когда атомы вступают в химические соединения друг с другом, поэтому для наблюдения характеристических рентгеновских спектров не нужно изменять физическую и химическую природу исследуемого вещества. Рентгеноспектральный анализ, так же как анализ по оптическим спектрам, характеризует атомный состав вещества [25, с. 4].

Таким образом, пользуясь характеристичностью оптических и рентгеновских линейчатых спектров, можно определять элементарный состав вещества. Принадлежность отдельных линий спектра пробы к спектру того или иного элемента устанавливают путем измерения длин их волн.

Мерой концентрации элемента в пробе при анализе по линейчатым спектрам служит *интенсивность спектральных линий*. Интенсивность линий спектра излучения исследуемого компонента при определенных условиях опыта увеличивается с повышением его концентрации в пробе. Мерой концентрации при исследований спектров поглощения служит величина поглощения характеристических линий. При прохождении через исследуемое вещество интенсивность этих

линий уменьшается с увеличением концентрации определяемого элемента [32, с. 172].

## Практическая реализация и применение рентгенофлуоресцентных методов

Существуют два вида волнодисперсионных рентгенофлуоресцентных спектрометров, действие которых основано на выделении характеристического излучения с помощью кристаллов-анализаторов. Это *спектрометры последовательного действия* («со сканирующим каналом») и *квантометры* (спектрометры «с фиксированными каналами»).

Основными узлами рентгенофлуоресцентного спектрометра являются:

- 1) Источник возбуждения (рентгеновская трубка);
- 2) Образец (проба);
- 3) Детектор излучения (газонаполненные, сцинтилляционные, полупроводниковые твердотельные, их действие основано на преобразовании энергии рентгеновских лучей в импульсы напряжения определенной амплитуды);

4) Спектрометрическое устройство обработки сигналов (амплитудный анализатор).

Принципиальная рентгенооптическая схема спектрометра отображена на рис. 55. Рентгеновская трубка 2 облучает образец 1, вызывая флуоресцентное излучение, которое через входную щель 3 попадает на фокусирующий кристалл-анализатор 4. Здесь происходит выделение из спектра образца характеристической линии в результате дифракции на узлах кристаллической решетки по закону, описываемому формулой Вульфа – Брэгга:

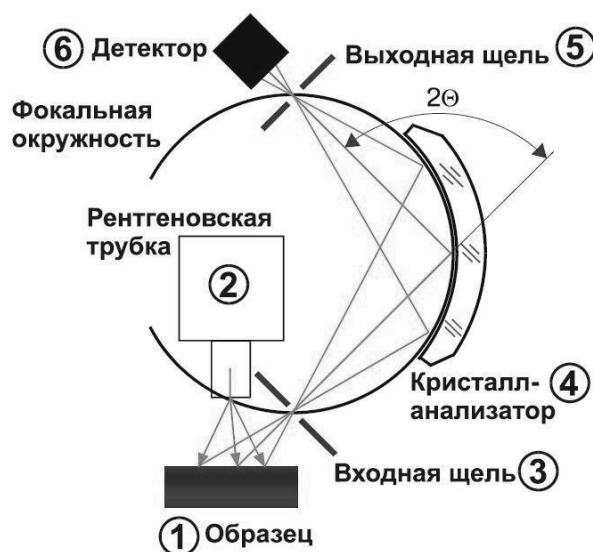


Рис. 55. Рентгенооптическая схема [51, с. 7]:  
1 – исследуемый образец,  
2 – рентгеновская трубка, 3 – входная щель,  
4 – кристалл-анализатор,  
5 – приемная (выходная) щель,  
6 – блок детектирования

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (118),$$

где  $\lambda$  – длина волны излучения, отраженного от кристалла,  $n$  – целое число, характеризует порядок отражения, т.е. определенный тип отражения, повторяющийся при значениях  $\sin\theta$ , соответствующих значениям множителя  $n = 1, 2, 3, \dots$ ,  $2d$  – расстояние между узлами кристаллической решетки,  $\theta$  – угол падения излучения на кристалл.

Далее выделенное излучение кристалл-анализатор фокусирует в приемную щель 5 блока детектирования 6, сигнал с которого поступает на вход усилителя-дискриминатора, затем на вход счетного устройства [51, с. 6–7].



Рис. 56. Внешний вид прибора «СПЕКТРОСКАН-МАКС-G»

На таком принципе построена работа волнодисперсионного рентгенофлуоресцентного спектрометра «СПЕКТРОСКАН-МАКС-G», внешний вид которого представлен на рис. 56.

Этот аппарат предназначен для измерения интенсивности характеристических линий химических элементов. Результаты этих измерений могут быть использованы для качественного и количественного анализа образцов материалов различной природы.

*Качественный анализ* необходим для определения наличия или отсутствия в пробе исследуемых химических элементов без цели определить их количественное содержание. Качественный анализ, опираясь на предварительно измеренные спектры, позволяет определить элементный состав образца в диапазоне от кальция ( $^{20}\text{Ca}$ ) до урана ( $^{92}\text{U}$ ). Этот вид анализа проводится путем сравнения наиболее характеристичных пиков, полученных из спектра флуоресценции изучаемого образца с табулированными значениями этих величин в соответствующем атласе спектральных линий ряда известных элементов. Достигается это при дискретном сканировании спектра по длинам волн с записью интенсивности излучения в каждый момент сканирования и с одновременным графическим отображением. В результате исследования программным обес-

печением формируется график с отображенным на нем спектром, где по одной оси отложена шкала длин волн ( $\lambda$ , мА), а по другой – интенсивность излучения ( $I$ , имп./с) (рис. 57) [51, с. 12–13].

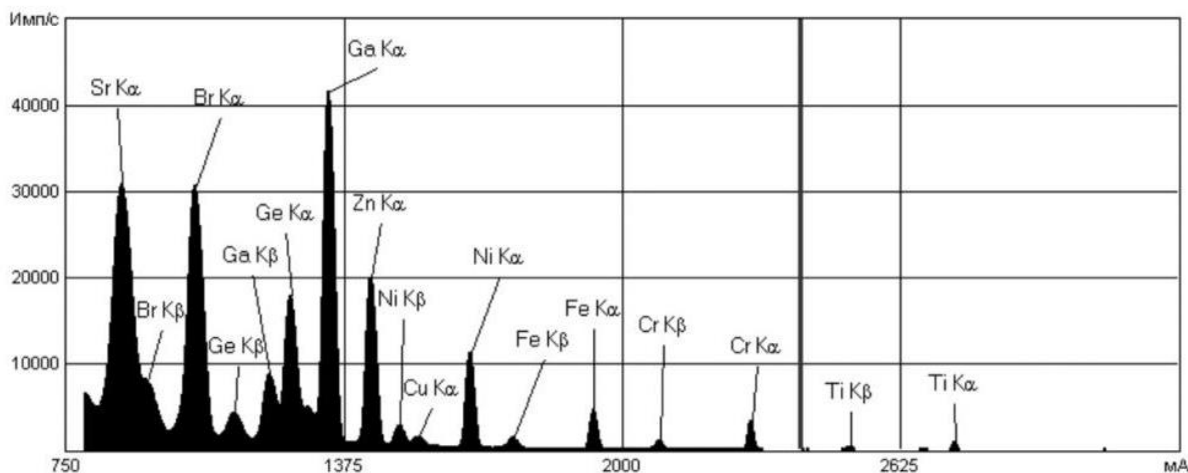


Рис. 57. Расшифрованный рентгенофлуоресцентный спектр [51, с. 14]

В зависимости от поставленной задачи, сканируется либо спектр вторичного излучения в максимально широком для данного прибора диапазоне длин волн, с выделением характеристических линий элементов, содержащихся в пробе, либо с целью обнаружения конкретного вещества в пробе проводится дискретное сканирование, ограниченное областью длин волн вторичного излучения искомого элемента [25, с. 8].

*Количественный анализ* необходим для определения точного количества содержащихся в пробе элементов. Принцип действия основан на зависимости между интенсивностью аналитической линии и концентрацией изучаемого вещества в образце. Чем выше количество атомов определяемого элемента в пробе, тем большее количество квантов, имеющих соответствующую энергию, будет излучаться из пробы и тем большая интенсивность характеристической линии будет зарегистрирована прибором. Для каждого анализируемого элемента можно найти функциональную зависимость (градуировочную характеристику), если измерить несколько эталонных (градуировочных) образцов с известной концентрацией. Эта зависимость может быть выражена в виде *градуировочного уравнения* или *градуировочного графика* (рис. 58) [51, с. 17].

Градуировочное уравнение в общем виде выглядит следующим образом:

$$C_{(x)} = A_0 + A_1 \cdot T_{(x)} \quad (119),$$

где  $A_0$  – коэффициент, характеризующий величину фоновой «подстановки» под аналитической линией. При нулевой концентрации элемента  $X$  она равна нулю;  $A_1$  – концентрационная чувствительность (определяется углом наклона калибровочного графика и показывает удельное изменение величины аналитического сигнала при изменении концентрации элемента в пробе);  $T_{(x)}$  – интенсивность аналитической линии [25, с. 8–9].

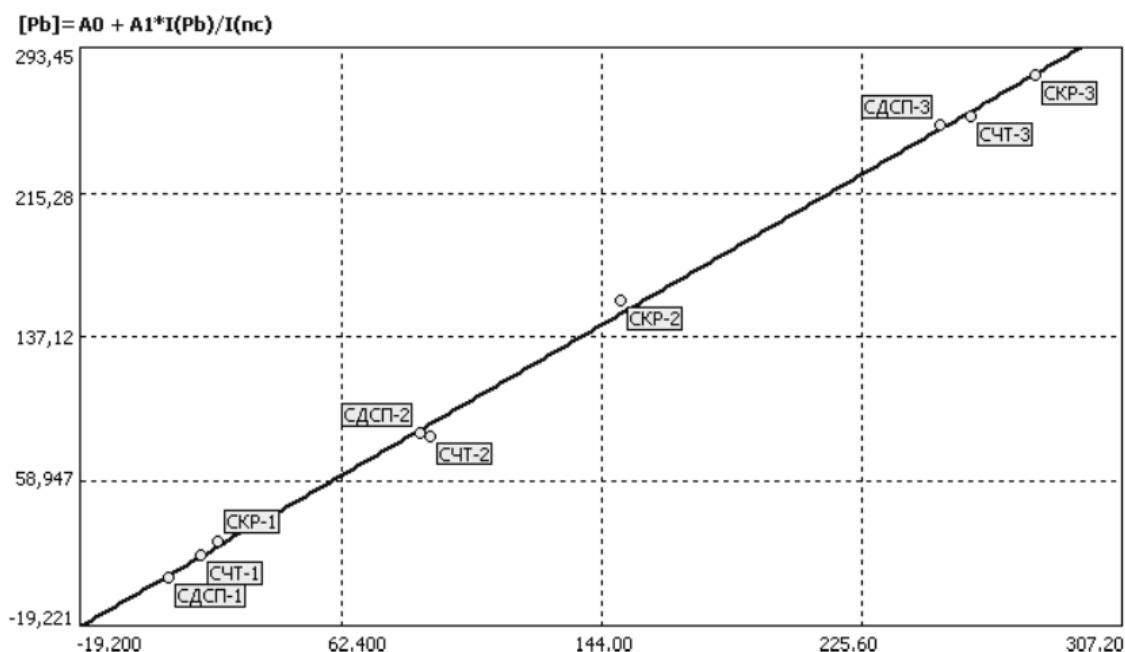


Рис. 58. Градуировочный график, построенный для Pb по стандартным образцам различных типов почв [51, с. 25]:

СДПС – дерновоподзолистые, СЧТ – черноземы, СКР – красноземы

Диапазон определяемых при количественном анализе содержаний химических элементов составляет от 0,00001–0,1 до 100%. В случае применения специальных методик концентрирования проб нижний предел для некоторых элементов может составлять  $10^{-7}$ – $10^{-6}\%$ .

*Применение рентгенофлуоресцентных методов анализа.* Рентгенофлуоресцентный анализ нашел широкое применение во многих производственных процессах, требующих анализа продукции на содержание тяжелых металлов и других нежелательных элементов. Потенциал применения этого вида анализа очень высок.

Различные модификации рентгенофлуоресцентных спектрометров позволяют использовать этот метод в следующих отраслях:



- при проведении судебно-медицинских, искусствоведческих, таможенных экспертиз;
- в экологии (анализ почвы, природных, питьевых и сточных вод, воздуха рабочей зоны, вентиляционных выбросов, анализ растительных материалов и продуктов питания и т. д.);
- в геологии (поиск и разведка полезных ископаемых, геохимические исследования);
- в горнорудной промышленности (при анализе стекла, цемента, огнеупорных материалов и керамики, шлаков и отвалов, продуктов переработки руды и т. д.);
- в нефтехимии (определение содержания серы, металлов, хлороорганических соединений, азота и др. в нефти и нефтепродуктах);
- в металлургии, газовой промышленности, научных исследованиях, при диагностике и контроле различных производственных процессов и т. д.

### **Лабораторная работа № 15**

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ПРОБАХ ПОЧВ И РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ**

Рентгенофлуоресцентный метод анализа нашел широкое применение в биологических и экологических исследованиях: с его помощью можно проводить экологический мониторинг и оценивать состояние объектов окружающей среды (например, анализировать степень накопления растениями соединений тяжелых металлов).

**Исследуемый материал:** пробы почв, растительное сырье (в воздушно-сухом состоянии).

**Оборудование:** спектрометр «СПЕКТРОСКАН-МАКС-G», фарфоровые ступки с пестиками, пресс лабораторный гидравлический, оборудование для пробоподготовки твердых веществ (поставляется вместе с прибором), почвенное сито с диаметром ячеек 0,5 мм.

**Реактивы:** борная кислота (порошок).

**Ход работы.** *Внимание! Все работы на спектрометре должны выполняться только при наличии контроля и руководства со стороны преподавателя или квалифицированного обслуживающего персонала. Самостоятельная работа студентов с прибором запрещена!*

### *I. Подготовка спектрометра к работе.*

1. Включите компьютер.
2. Включите спектрометр в сеть 220 В, 50 Гц и нажмите кнопку включения на задней стороне спектрометра.
3. Нажмите кнопку «X-RAY» на лицевой панели анализатора. При этом должен засветиться красный индикатор «X-RAY», свидетельствующий о подаче высокого напряжения на рентгеновскую трубку.

Далее в течение 40 мин будет проходить прогрев рентгеновской трубки анализатора, в течение этого времени нельзя начинать работу с аппаратом.

*II. Пробоподготовка* анализируемой почвы начинается с удаления крупных камней, мелкого мусора и растительных остатков. Растительный материал предварительно высушивается до воздушно-сухого состояния.

1. Очищенная почва (примерно 10 г) или высушенные остатки анализируемых растений помещаются в ступку и тщательно размалывается. После этого пробу пропускают через почвенное сито с целью отсеять крупные почвенные частицы и оставшийся мусор.

2. Далее переходят к прессованию таблетки. Для этого из набора пресс-форм берут матрицу и закрывают ее пробкой. Аккуратно с открытой стороны в матрицу засыпают примерно 2–3 г борной кислоты. Затем в отверстие вставляется пуасон с фигурным торцом. Конструкция помещается на столик пресса пробкой вниз и прессуется с нагнетанием давления в 70–100 Бар (2,8–4 т). После снятия давления вынимают фигурный пуасон из матрицы и в образованную после пресса «тарелочку» из борной кислоты насыпают пробу почвы таким образом, чтобы она полностью заполнила чашечку и образовала горку (количество пробы должно быть таким, чтобы после прессования поверхность излучателя была вровень с бортиками чашечки из борной кислоты). Далее в матрицу вставляют пуасон с плоским торцом и запрессовывают форму с нагнетанием давления 100–180 Бар (4–7,2 т). После этого пресс-форма извлекается из пресса, переворачивается пуасоном вниз, а пробка снимается. На ее место устанавливается кольцо для извлечения образца. Конструкция помещается под пресс и с помощью прижимного винта таблетка аккуратно выдавливается внутрь кольца.

3. Получившуюся таблетку необходимо поместить в обойму. Для этого необходимо зафиксировать ее в специальном углублении обоймы двумя поролоновыми дисками, затем с помощью устройства для установки образцов в обоймы необходимо поместить крышку таким образом, чтобы пазы обоймы совмещались с выступами крышки. Крышка фиксируется посредством поворота обоймы.

### III. Анализ пробы.

1. После прогрева прибор готов к измерению. Для продолжения работы следует открыть программу «SPG-6086» и выбрать во вкладке «Исследования» программу «Градуирование продукта».

2. Для начала измерений необходимо задать название для изучаемого образца с помощью команды «Новый образец». Затем в перечне «Аналит» отмечаются галочками анализируемые тяжелые металлы.

3. Далее командой «Измерить» запускается программа «Измерения», с помощью которой производится пробозагрузка и анализ образцов.

Пробозагрузка осуществляется с помощью специальной клавиатуры в правой части окна программы. В первое гнездо всегда устанавливается контрольный образец S19, имеющий постоянный и неизменный состав, его необходимо измерять вместе с анализируемыми пробами для получения стабильных результатов анализа. В остальные гнезда помещаются анализируемые образцы. Одновременно в пробозагрузку допускается помещать до 4 проб. Также необходимо следить, чтобы один сеанс анализа занимал не более двух часов. После установки всех проб для инициализации измерений требуется нажать на флажок. После того, как анализ завершился, следует извлечь анализируемые образцы из аппарата и закрыть пробозагрузку с помощью клавиатуры в программе.

4. По завершении анализа результаты измерений можно найти на вкладке «Анализируемые образцы» и в рабочем архиве. Таблицу результатов анализа можно копировать в любую программу для редактирования таблиц, например, в Microsoft Excel, чтобы продолжить дальнейшую работу с данными измерений.

5. Сделать вывод о содержании тяжелых металлов в подготовленных образцах, используя данные о ПДК ТМ в почвах (табл. 9).

**Предельно допустимые концентрации (ПДК) тяжелых металлов в почвах  
(по ГН 2.1.7.2041-06)**

№ п/п	Наименование вещества	Символ	Величина ПДК (мг/кг)	Лимитирующий показатель вредности
1.	Ванадий	V	150,0	Общесанитарный
2.	Марганец	Mn	1500	Общесанитарный
3.	Мышьяк	As	2,0	Транслокационный
4.	Ртуть	Hg	2,1	Транслокационный
5.	Свинец	Pb	32,0	Общесанитарный
6.	Кобальт	Co	5,0	Общесанитарный
7.	Медь	Cu	3,0	Общесанитарный
8.	Никель	Ni	4,0	Общесанитарный
9.	Хром трехвалентный	Cr (III)	6,0	Общесанитарный
10.	Цинк	Zn	23,0	Транслокационный

### Контрольные вопросы

1. Что называют рентгенофлуоресцентным анализом? Дайте определение рентгеновского излучения.
2. Каким образом образуются характеристические рентгеновские и оптические виды излучения?
3. Что такое спектральная линия? Что характеризует интенсивность спектральных линий?
4. Как образуются рентгеновские характеристические спектры?
5. Какие узлы входят в принципиальную рентгенооптическую схему спектрометра?
6. В чем состоит сущность качественного РФА?
7. Назовите особенности количественного РФА.
8. Какое применение нашел метод рентгенофлуоресцентного анализа в различных отраслях производства и промышленности?

### 3.4. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

#### Теоретические основы рефрактометрии

*Рефракцией* (от лат. *refractus* – «преломленный») называют явление преломления световых лучей на границе раздела двух различ-

ных по своей природе оптических сред. *Рефрактометрия* – совокупность методов анализа и исследования вещества, основанных на измерении его показателя преломления (коэффициента рефракции)  $n$  в зависимости от состава системы. Эта зависимость устанавливается экспериментально путем определения показателя преломления для ряда систем известного состава и построения градуировочного графика в координатах состав смеси – показатель преломления (рис. 59) [5, с. 101].

*Закон преломления (закон Снеллиуса):* отношение синуса угла падения  $\alpha_1$  к синусу угла преломления  $\alpha_2$  есть величина постоянная (рис. 60):

$$n_{2(\text{отн})} = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} \quad (120).$$

Величину  $n_{2(\text{отн})}$  называют *относительным показателем (коэффициентом) преломления* второй среды по отношению к первой.

*Абсолютным показателем преломления* называют показатель преломления по отношению к вакууму:

$$n_{2(\text{абс})} = \frac{\sin \alpha_{\text{вакуум}}}{\sin \alpha_2} \quad (121).$$

Аналогично для первой среды:

$$n_{1(\text{абс})} = \frac{\sin \alpha_{\text{вакуум}}}{\sin \alpha_1} \quad (122).$$

Отсюда относительный показатель преломления будет равен отношению абсолютных показателей преломления:

$$n_{2(\text{отн})} = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{\sin \alpha_{\text{вакуум}} n_{2(\text{абс})}}{\sin \alpha_{\text{вакуум}} n_{1(\text{абс})}} = \frac{n_{2(\text{абс})}}{n_{1(\text{абс})}} \quad (123),$$

$$n_{1(\text{абс})} \sin \alpha_1 = n_{2(\text{абс})} \sin \alpha_2 \quad (124).$$

Относительный показатель преломления  $n_{2(\text{отн})}$  по отношению к воздуху назы-

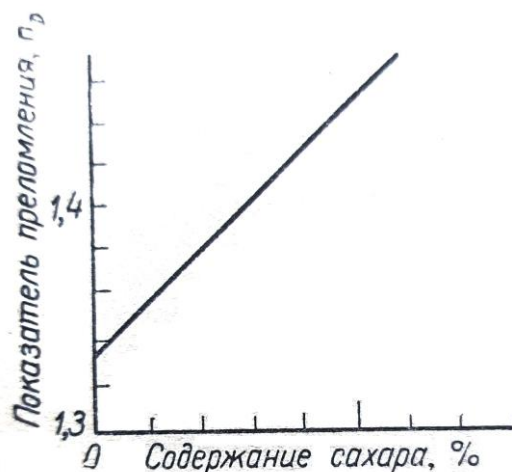


Рис. 59. График зависимости показателя преломления водного раствора сахара от концентрации [5, с. 102]

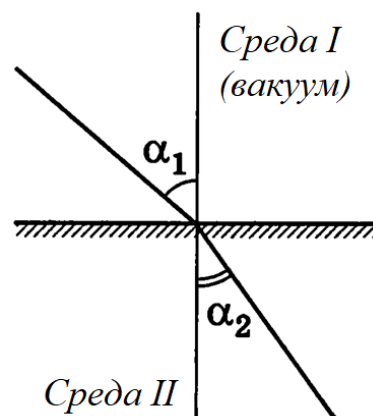


Рис. 60. Преломление светового луча на границе вакуума с более плотной средой [5, с. 144]

вают просто *показателем преломления  $n$* , т. е. если  $n_{1(\text{абс})} = n_{\text{абс(воздух)}}$ ,  $n_{2(\text{отн})} = n$ , то выражение (123) можно записать в виде

$$n_{\text{абс}} = n_{\text{абс(воздух)}} n \quad (125).$$

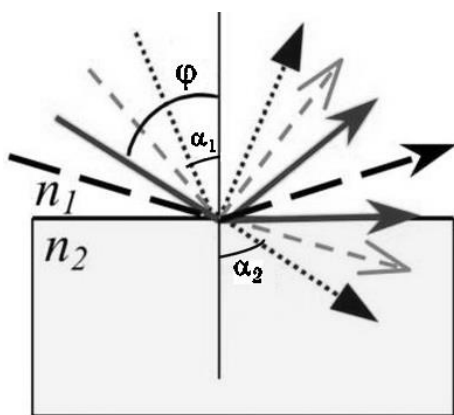
При нормальном атмосферном давлении и комнатной температуре  $n_{\text{абс(воздух)}} = 1,00027$ , поэтому

$$n_{\text{абс}} = 1,00027n \quad (126).$$

Показатель преломления зависит от температуры среды, длины волны падающего света, атмосферного давления и концентрации (для растворов). Обычно  $n$  дается для спектральной линии желтого натриевого пламени  $D$  ( $\lambda = 589,3$  нм). Температуру, при которой проводились измерения, и длину волны записывают соответственно верхним и нижним индексом:  $n_D^{20}$  (по ГОСТ  $n$  определяют при  $20^\circ\text{C}$ ).

Если свет из среды  $I$  с большим показателем преломления падает на границу со средой  $II$  с меньшим показателем ( $n_1 > n_2$ ), то угол  $\alpha_2 > \alpha_1$  и  $n_{2(\text{отн})} < 1$ . Существует предельное значение  $\alpha_1 = \varphi$ , при котором  $\alpha_2 = 90^\circ$ . В этом случае преломления не происходит, а луч света, дойдя до поверхности раздела, далее пойдет вдоль этой поверхности, и поскольку  $\sin 90^\circ = 1$ , формула (120) приобретает вид

$$n_{2(\text{отн})} = \sin \varphi \quad (127).$$



Если направить луч в среде  $I$  под углом  $\alpha_1 > \varphi$ , то он вообще не попадет в среду  $II$ , а отразится от поверхности раздела. Угол  $\varphi$  называют *углом полного внутреннего отражения*, а также *предельным или критическим углом* (рис. 61). Его величина на границе двух веществ зависит только от их показателей преломления:

$$n_{2(\text{отн})} = \frac{n_1}{n_2} \sin \varphi \quad (128).$$

Рис. 61. Полное внутреннее отражение [32, с. 116]

Следовательно, если известен показатель преломления одного вещества, то показатель преломления другого вещества можно определить, измерив предельный угол  $\varphi$ . На этом основан метод рефрактометрии [35, с. 68–69].

## Практическая реализация и применение рефрактометрии

Основным прибором для определения коэффициента преломления является *рефрактометр*. Важнейшей деталью рефрактометров является *измерительная призма* из оптического стекла с точно известным показателем преломления. Одна из граней измерительной призмы (так называемая *входная грань*) приводится в оптический контакт с измеряемым телом и служит границей раздела, на которой происходит преломление и полное внутреннее отражение. Преломление или отражение света на этой грани наблюдается в зрительную трубу через вторую (*выходную*) грань призмы. Угол  $\alpha$  между входной и выходной гранями называется *преломляющим углом* призмы. Луч, соответствующий предельному углу  $\varphi$  и называемый *предельным лучом*, после преломления на границе стекло-призма – воздух составляет с нормалью к выходной грани некоторый угол  $\beta$ . При рассмотрении вышедших из призмы лучей, близких к предельному, поле зрения трубы оказывается разделенным на освещенную и темную части, граница между которыми соответствует предельному лучу. Таким образом обычно измеряется не непосредственно угол  $\varphi$ , а угол  $\beta$  между предельным лучом и нормалью к выходной грани (см. рис. 63, 64) [20, с. 29].



Рис. 62. Рефрактометр ИРФ-454-Б2М (типа Аббе)

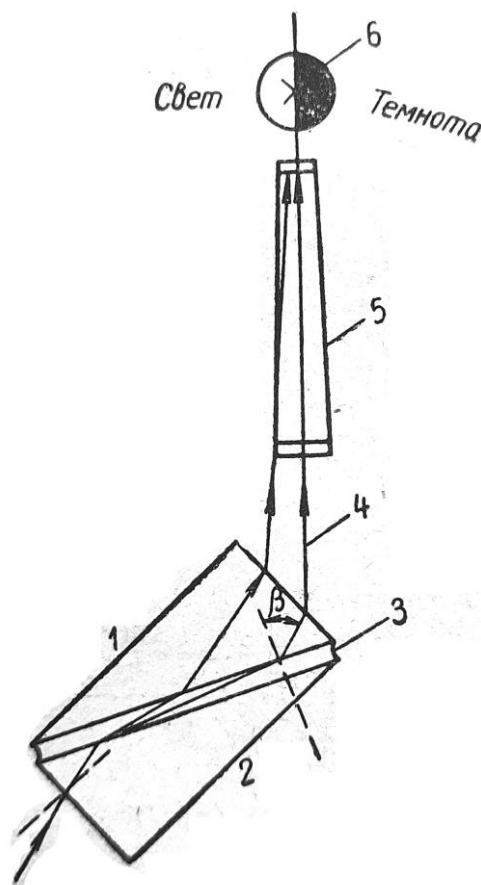


Рис. 63. Принципиальная схема рефрактометра Аббе [5, с. 112]

Существуют 2 основных типа рефрактометров, имеющих свои конструктивные особенности.

*Рефрактометр типа Аббе* (рис. 62). Рефрактометры этого типа отличаются простотой и удобством в эксплуатации, благодаря чему они нашли широкое применение как в исследовательской деятельности, так и для технических измерений. Прибор имеет стационарную измерительную призму с преломляющим углом в  $60^\circ$ . Диапазон измерений показателей преломления 1,2–1,7 [20, с. 156].

Главным и характерным узлом для рефрактометров этого типа является так называемый призмный блок, состоящий из измерительной 1 и осветительной 2 призм (рис. 63). Тонкий слой жидкости 3 находится при работе прибора между плотно прижатыми друг к другу гипотенузными гранями обеих призм. Предельным лучом 4 видимое в зрительную трубу 5 поле делится на светлую и темную части, граница между которыми при измерениях совмещается с перекрестьем б.

В рефрактометре Аббе освещение производится белым (немонохроматичным) светом, однако благодаря расположенным в компенсаторе прибора *призмам Амичи*, пропускающим желтые лучи без изменения, показатель преломления в этих приборах относится к D-линии натрия [5, с. 111–113].

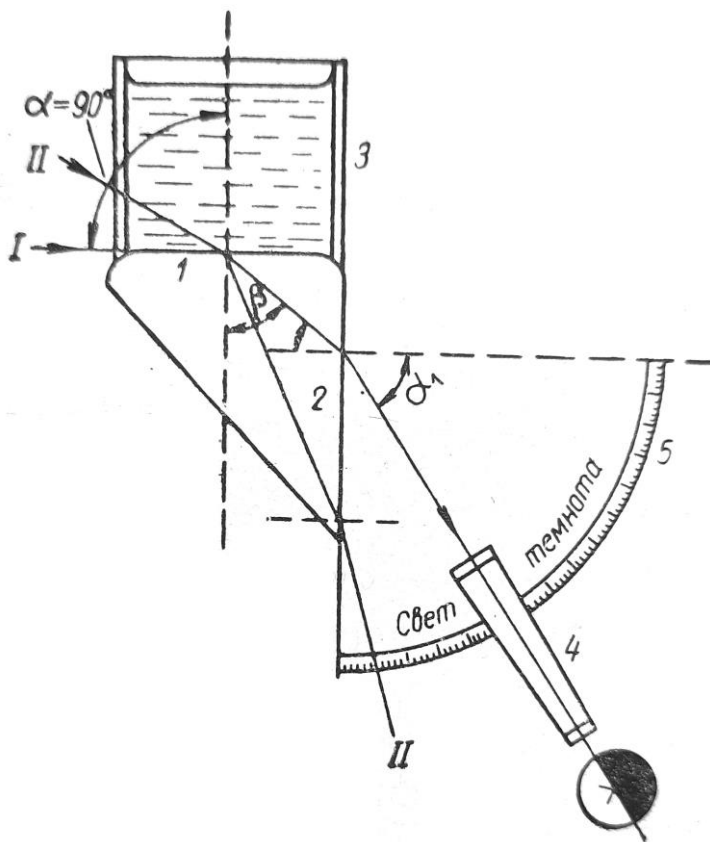


Рис. 64. Принципиальная схема рефрактометра Пульфриха [5, с. 121]

саторе прибора *призмам Амичи*, пропускающим желтые лучи без изменения, показатель преломления в этих приборах относится к D-линии натрия [5, с. 111–113].

Точность измерения на данном приборе  $\pm 0,0001$  [20, с. 156]. Для того чтобы добиться такой точности, во время измерений необходимо с помощью термостата поддерживать постоянную температуру с точностью  $\pm 0,2^\circ\text{C}$ . Обычно при повышении температуры на  $1^\circ$  показатель преломления уменьшает-



ся на 0,0005, соответственно понижение температуры на  $1^\circ$  увеличивает показатель преломления на 0,0005.

*Рефрактометр типа Пульфриха.* Принципиальная схема рефрактометра Пульфриха представлена на рис. 64. Особенностью приборов этого типа является то, что угол между входной 1 и выходной 2 гранями оптической призмы равен  $90^\circ$ . Края входной грани закруглены таким образом, что плоскость ее имеет форму круга. На эту грань призмы насаживается и приклеивается цилиндрический стаканчик 3, куда наливается исследуемая жидкость. Закругление краев входной грани позволяет расположить место приклейки стаканчика ниже ее рабочей плоскости. Поэтому луч  $I$ , направленный вдоль поверхности раздела жидкости и призмы, не встречает слоя клея и, следовательно, не искажается. Так как угол падения этого луча равен точно  $90^\circ$ , то величина угла  $\beta$  точно соответствует полному внутреннему отражению. Это определяет большую точность приборов этого типа ( $1-2 \cdot 10^{-5}$ ) и применение их при осуществлении специальных исследовательских работ. Зрительную трубу 4, перемещающуюся вдоль шкалы 5, устанавливают так, что поле зрения оказывается разделенным на светлую и темную половины.

Рефрактометр Пульфриха имеет в комплекте набор призм, каждая из которых предназначена для измерения показателей преломления в определенном интервале. К рефрактометру также прилагается таблица, позволяющая находить показатель преломления по значению отсчитанного по шкале угла  $\alpha_1$ . Для измерений применяется источник монохроматического света (натриевая лампа). Внешний вид рефрактометра типа Пульфриха ИРФ-23 представлен на рис. 65 [5, с. 119–121].

В современных лабораториях широко применяются *рефрактометры предельного угла с неподвижно соединенными призмой и трубой*, не имеющие механических угломерных устройств. С устранением подвижных деталей отпадают источники механических ошибок, что повышает точность приборов и уменьшает



Рис. 65. Рефрактометр ИРФ-23 (типа Пульфриха)

их себестоимость. В то же время значительно ограничиваются пределы измеряемых показателей преломления и, следовательно, такие рефрактометры могут применяться только для однородных объектов определенной природы [20, с. 174]. Наиболее универсальным и точным из приборов данного типа является *погружной рефрактометр*, измерительная призма которого укрепляется непосредственно на нижнем конце зрительной трубы и во время работы погружается в стакан с исследуемой жидкостью. Положение предельного луча определяется при помощи стеклянной шкалы, расположенной в фокальной поверхности объектива трубы и наблюдаемой в окуляр одновременно с граничной линией. Погружные рефрактометры комплектуются 6–12 призмами, каждая из которых охватывает интервал показателя преломления 0,03–0,04.

*Применение рефрактометрических методов.* Рефрактометрия характеризуется невысокой чувствительностью (метод достаточно эффективен для целей количественного анализа, если концентрация определяемого компонента в растворе не ниже 1%) и селективностью (показатели преломления для разных веществ могут иметь очень близкие и даже совпадающие значения). Тем не менее, благодаря точности и скорости проведения анализов, возможности работы с очень небольшими количествами веществ, а также неприхотливости в эксплуатации рефрактометрические методы нашли широкое применение:

- в клинических, физиологических, биохимических лабораториях – для определения белка в сыворотке крови, гемоглобина в эритроцитах, измерения плотности биологических жидкостей;
- в фармацевтике – для определения чистоты лекарственных препаратов, анализа растворов для инъекций, порошков лекарственных смесей, определения концентрации спирта в настойках;
- в офтальмологии – при определении рефракции глаза;
- в пищевой промышленности – для определения влажности пищевых продуктов, концентрации сахара, белка, жиров, солей в продуктах питания;
- в химии, экологии – для идентификации химических соединений, определения концентрации растворенных веществ.

**Лабораторная работа № 16**  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ САХАРОЗЫ В РАСТВОРЕ**  
**РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

Метод основан на зависимости показателя преломления раствора от содержания в нем сахарозы.

**Исследуемый материал:** раствор сахарозы.

**Оборудование:** рефрактометр ИРФ-454-Б2М, пипетки (глазные), кусочки фильтровальной бумаги, мерные пробирки вместимостью 5 мл, штатив с пробирками, миллиметровая бумага.

**Реактивы:** вода дистиллированная, 40%-ный водный раствор сахарозы, набор растворов сахарозы для исследования,  $\omega \approx 15\text{--}30\%$ .

**Ход работы.**

1. Ознакомьтесь с устройством рефрактометра (на примере определения показателя преломления дистиллированной воды,  $n_D^{20} = 1,333$ ).

2. Приготовить серию стандартных растворов, используя в качестве исходного 40%-ный раствор сахарозы и руководствуясь данными табл. 10.

Таблица 10

**Показатели преломления растворов**

Показатели	Нумерация растворов					
	1	2	3	4	5	6
Объем исходного раствора сахарозы ( $\omega = 40\%$ ), мл	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Объем дистиллированной воды, мл	4,5	4,0	3,0	2,0	1,0	0,0
Общий объем раствора после разбавления водой	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Концентрация раствора, % масс.	4,0	8,0	16,0	24,0	32,0	40,0
Показатель преломления, $n_D^{20}$						

3. Измерить на рефрактометре показатели преломления всех растворов (начиная с самого разбавленного). Каждый раствор наносят на призму прибора пипеткой (нельзя прикасаться к линзе рефрактометра руками). После каждой пробы призму (линзу) очищают дистиллированной водой и фильтровальной бумагой.

4. Показатель преломления определяют с точностью до 0,0005. Каждый замер повторить 2–3 раза, всякий раз, заново нанося исследуемую жидкость на призму рефрактометра. Усреднить данные параллельных измерений и внести в таблицу.

5. На миллиметровой бумаге построить градуировочный график в координатах «показатель преломления ( $n_D^{20}$ ) – концентрация сахарозы (%)».

Рекомендуемый масштаб: по оси ординат – 1 мм = 0,001, по оси абсцисс – 20 мм = 10% масс.

*Определение концентрации сахарозы в исследуемом растворе.* В контрольном растворе, выданном преподавателем, определить показатель преломления на рефрактометре и с помощью градуировочного графика определить концентрацию сахара в исследуемом растворе [5, с. 121–122].

### **Лабораторная работа № 17** **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА СЫВОРОТКИ КРОВИ** **РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

В сыворотке крови величина показателя преломления зависит в первую очередь от содержания белков; меньшую роль играют другие вещества – электролиты (соли), небелковые органические соединения, поскольку их концентрации невелики и достаточно стабильны. Однако при некоторых патологиях их содержание увеличивается, что приводит к значительным ошибкам в определении. Это касается исследования желтушных сывороток, а также сывороток больных сахарным диабетом и уремией.

**Исследуемый материал:** сыворотка крови.

**Оборудование:** рефрактометр ИРФ-454-Б2М, пипетки (глазные), центрифуга, небольшие центрифужные пробирки, штатив с пробирками, марлевые тампоны.

**Реактивы:** вода дистиллированная, спирт-эфирная смесь.

**Ход работы.** 2–3 мл крови помещают в небольшие пробирки и центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об./мин. В случае отсутствия центрифуги отстаивают кровь в холодильнике в течение 30–45 мин. Перед началом работы с полученной сывороткой устанавливают прибор на нуль по дистиллированной воде при 20°C ( $n = 1,3330$ ).

Сыворотку отбирают чистой глазной пипеткой и 2–3 ее капли помещают на призму рефрактометра. Регистрируют показатель пре-

ломления по шкале прибора. По таблице Рейсса, приведенной ниже (табл. 11), определяют содержание белка в сыворотке. После каждого исследования обе поверхности призм протирают марлевым тампоном, смоченным в спирт-эфирной смеси, а затем насухо чистым тампоном.

Нормальное содержание белка в сыворотке крови составляет 65–85 г/л [31, с. 179–181].

Таблица 11

**Концентрации белка  
при различных показателях преломления (по Рейссу) [31, с. 181]**

Показатель преломления	Белок в сыворотке крови, г/л	Показатель преломления	Белок в сыворотке крови, г/л	Показатель преломления	Белок в сыворотке крови, г/л	Показатель преломления	Белок в сыворотке крови, г/л
1,33705	6,3	1,34162	32,8	1,34612	59,0	1,35021	82,8
1,33743	8,6	1,34199	35,0	1,34650	61,2	1,35058	84,9
1,33781	10,8	1,34237	37,2	1,34687	63,4	1,35095	87,1
1,33820	13,0	1,34275	39,4	1,34724	65,5	1,35132	89,2
1,33858	15,2	1,34313	41,6	1,34761	67,7	1,35169	91,4
1,33896	17,4	1,34350	43,8	1,34798	69,8	1,35205	93,5
1,33934	19,6	1,34388	46,0	1,34836	72,0	1,35242	95,7
1,33972	21,8	1,34426	48,1	1,34873	74,2	1,35279	97,8
1,34000	24,0	1,34463	50,3	1,34910	76,3	1,35316	99,9
1,34048	26,2	1,34500	52,5	1,34947	78,5	1,35352	102,0
1,34086	28,4	1,34537	54,7	1,34984	80,6	1,35388	104,1
1,34124	30,6	1,34575	56,8				

**Контрольные вопросы**

1. Дайте определение рефракции. Что такое рефрактометрия?
2. В чем заключается закон преломления (закон Снелиуса)? Что называют показателем (коэффициентом) преломления?
3. Что такое угол полного внутреннего отражения? От чего он зависит?
4. Назовите основные особенности рефрактометров типа Аббе. Объясните принципиальную схему этого прибора.
5. В чем заключаются особенности рефрактометров типа Пульфриха?
6. В каких областях применяются рефрактометрические методы анализа? Приведите примеры.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

Работа современных биологических лабораторий немыслима без применения физико-химических методов исследования и анализа. В издании автор постарался найти наиболее доступные формы изложения достаточно сложного материала, познакомить с теорией и практикой самых актуальных физико-химических методов, применяемых в биохимии, биотехнологии, физиологии, экологии и других биологических и смежных научных дисциплинах.

Объем издания не позволяет рассмотреть все достаточно важные современные физико-химические методы, используемые в биологических исследованиях. При дальнейшем изучении и освоении навыков работы с приборами и аппаратурой в рамках этой дисциплины студентам следует помнить, что существуют и другие не менее значимые физико-химические методы анализа объектов окружающей живой природы. В направлении повышения точности, воспроизводимости, избирательности, экспрессности, экономичности эксперимента, физико-химические и другие инструментальные методы постоянно совершенствуются на основе современных научных представлений и прогресса в приборостроении. Автор надеется, что книга вызвала у студентов научный интерес и способствовала пробуждению у них творческого подхода к самостоятельному освоению новых биологических знаний. Уверенное владение научной базой, умение применять наиболее подходящие методы исследования и усовершенствовать методики являются важнейшими качествами будущих специалистов.

Автор будет благодарен читателям за замечания и предложения как по улучшению содержания издания, так и по форме изложения материала.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

---

1. Андреев, В. С. Кондуктометрические методы и приборы в биологии и медицине / В. С. Андреев. – М.: Медицина, 1973. – 336 с.
2. Антропов, Л. И. Теоретическая электрохимия: учеб. для хим.-технолог. спец. вузов / Л. И. Антропов. – 4-е изд., перераб. – М.: Высшая школа, 1984. – 519 с.
3. Багоцкий, В. С. Основы электрохимии / В. С. Багоцкий. – М.: Химия, 1988. – 400 с.
4. Балезин, С. А. Физическая и коллоидная химия: учеб. пособие для студ. хим.-биол. фак. пед. ин-тов / С. А. Балезин. – 5-е изд., перераб. – М.: Просвещение, 1980. – 271 с.
5. Барковский, В. Ф. Практикум по физико-химическим методам анализа / В. Ф. Барковский, С. М. Горелик, Т. Б. Городенцева. – М.: Высшая школа, 1963. – 350 с.
6. Биохимия. Лабораторный практикум: учеб. пособие / Сост. В. В. Сенчук, С. И. Мохорева, Н. М. Орел и др. – Минск: БГУ, 2004. – 77 с.
7. Боуэн, Т. Введение в ультрацентрифугирование / Т. Боуэн. – М.: Мир, 1973. – 248 с.
8. Васильев, В. П. Аналитическая химия: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец.: в 2 кн. / В. П. Васильев. – 6-е изд., стер. – Кн. 2: Физико-химические методы анализа. – М.: Дрофа, 2007. – 383 с.
9. Воюцкий, С. С. Курс коллоидной химии: учеб. для химико-технол. спец. вузов / С. С. Воюцкий. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1975. – 512 с.
10. Гельфман, М. И. Химия: учеб. для вузов / М. И. Гельфман, В. П. Юстратов. – СПб.: Лань, 2000. – 480 с.
11. Гольберт, К. А. Курс газовой хроматографии / К. А. Гольберт, М. С. Вигдергауз. – М.: Химия, 1967. – 400 с.
12. Детерман, Г. Гель-хроматография / Г. Детерман. – М.: Мир, 1970. – 252 с.
13. Дмитриевич, И. Н. Физико-химические методы анализа. Ч. II. Оптические методы анализа: учеб. пособие для студ. заочной формы обучения / И. Н. Дмитриевич. – СПб.: СПбГТУРП, 2014. – 39 с.

14. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
15. Дубова, Н. М. Физико-химические методы анализа: учеб. пособие / Н. М. Дубова [и др.]. – Томск: Изд. ТПУ, 1999. – 123 с.
16. Дэвени, Т. Аминокислоты, пептиды и белки / Т. Дэвени, Я. Гергей. – М.: Мир, 1976. – 364 с.
17. Зимон, А. Д. Коллоидная химия: учеб. для вузов / А. Д. Зимон, Н. Ф. Лещенко. – 2-е изд., доп. и исправл. – М.: ВЛАДМО, 1999. – 320 с.
18. Иванкин, А. Н. Физико-химические методы анализа. Спектрометрия: учеб. пособие / А. Н. Иванкин, Г. Л. Олиференко, В. А. Беляков, Н. Л. Вострикова. – М.: МГУЛ, 2016. – 127 с.
19. Илларионова, Е. А. Метод флуориметрии. Применение в фармацевтическом анализе: учеб. пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский. – Иркутск: ИГМУ, 2017. – 41 с.
20. Иоффе, Б. В. Рефрактометрические методы химии / Б. В. Иоффе. – 3-е изд., перераб. – Л.: Химия, 1983. – 352 с.
21. Ищенко, А. А. Люминесцентный анализ: учеб. пособие / А. А. Ищенко, М. А. Гольдштрах. – М.: МИТХТ им. М. В. Ломоносова, 2009. – 36 с.
22. Казин, В. Н. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. – Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 2002. – 172 с.
23. Калоус, В. Биофизическая химия / В. Калоус, З. Павличек. – М.: Мир, 1985. – 446 с.
24. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия: учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2003. – 479 с.
25. Комиссаренков, А. А. Рентгенофлуоресцентный метод анализа: методические указания к лабораторным работам / А. А. Комиссаренков, С. Б. Андреев. – СПб: СПб ГТУ РП, 2008. – 36 с.
26. Коничев, А. С. Молекулярная биология: учеб. для студ. пед. вузов / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – М.: Академия, 2003. – 400 с.
27. Коренман, И. М. Методы количественного химического анализа / И. М. Коренман. – М.: Химия, 1989. – 128 с.
28. Корыта, И. Электрохимия / И. Корыта, И. Дворжак, В. Богачкова. – М.: Мир, 1977. – 472 с.



29. Кропачева, Т. Н. Электрохимические методы анализа: учеб.-метод. пособие / Т. Н. Кропачева. – Ижевск: Издательский центр «Удмуртский университет», 2016. – 41 с.

30. Кусакина, М. Г. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. пособие / М. Г. Кусакина, В. И. Суворов, Л. А. Чудинова. – Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2012. – 148 с.

31. Кушманова, О. Д. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / О. Д. Кушманова, Г. М. Ивченко. – М.: Медицина, 1983. – 272 с.

32. Ляликов, Ю. С. Физико-химические методы анализа / Ю. С. Ляликов. – М.–Л.: Химия, 1964. – 560 с.

33. Мерецкий, А. М. Основы электрохимической термодинамики: учеб. пособие / А. М. Мерецкий, В. В. Белик. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2011. – 180 с.

34. Невмержицкая, Ю. Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): учеб.-метод. пособие / Ю. Ю. Невмержицкая, О. А. Тимофеева. – Казань: Казанский университет, 2012. – 36 с.

35. Новоселова, Н. В. Физико-химические методы анализа: курс лекций / Н. В. Новоселова. – Красноярск: Краснояр. гос. аграр. ун-т., 2009. – 163 с.

36. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. Ч. III. – СПб.: АНО НПО «Мир и Семья», АНО НПО «Профессионал», 2004. – 692 с.

37. Ольшанова, К. М. Практикум по хроматографическому анализу: учеб. пособие для студ. нехим. спец. вузов / К. М. Ольшанова, М. А. Потапова, Н. М. Морозова; под ред. К. М. Ольшановой. – М.: Высшая школа, 1970. – 312 с.

38. Основы аналитической химии: учеб. для вузов: в 2 кн. / Ю. А. Золотов [и др.]; под ред. Ю. А. Золотова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Кн. 1: Общие вопросы. Методы разделения. – М.: Высшая школа, 2004. – 361 с.

39. Основы аналитической химии: учеб. для вузов: в 2 кн. / Ю. А. Золотов [и др.]; под ред. Ю. А. Золотова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Кн. 2: Методы химического анализа. – М.: Высшая школа, 2004. – 503 с.

40. Практикум по биохимии обмена веществ и его регуляции / Сост. Е. В. Касатикова. – Владимир: ВГПУ, 2001. – 35 с.
41. Практикум по физиологии растений / Н. Н. Третьяков, Т. В. Карнаухова, Л. А. Паничкин; под ред. Н. Н. Третьякова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1990. – 271 с.
42. Рубина, Х. М. Практикум по физической и коллоидной химии: учеб. для мед. вузов / Х. М. Рубина, М. А. Добринская, Л. А. Романчук. – М.: Высшая школа, 1972. – 152 с.
43. Рыбальченко, В. К. Структура и функции мембран: практикум / В. К. Рыбальченко, М. М. Коганов. – К.: Выща школа, 1988. – 312 с.
44. Стручкова, И. В., Кальясова, Е. А., Сеницына, Ю. В. Рибофлавин и аскорбиновая кислота: физиологическая роль, качественный и количественный анализ: учебно-методическое пособие / И. В. Стручкова и др. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2017. – 25с.
45. Туркова, Я. Аффинная хроматография / Я. Туркова. – М.: Мир, 1980. – 472 с.
46. Урванцева, Г. А. Методы анализа живых систем: учеб. пособие / Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева. – Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 2013. – 104 с.
47. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии: учеб. для хим. и биол. спец. пед. ун-тов и ин-тов / Ю. Б. Филиппович. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Агар, 1999. – 512 с.
48. Фридрихсберг, Д. А. Курс коллоидной химии: учеб. для вузов / Д. А. Фридрихсберг. – Л.: Химия, 1974. – 352 с.
49. Фролов, Ю. Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы: учеб. для вузов / Ю. Г. Фролов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1988. – 464 с.
50. Чанг, Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам / Р. Чанг. – М.: Мир, 1980. – 664 с.
51. Ширкин, Л. А. Рентгенофлуоресцентный анализ объектов окружающей среды: учеб. пособие / Л. А. Ширкин. – Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. – 60 с.
52. Яковлева, О. В. Практикум по физико-химическим методам в физиологии: учеб.-метод. пособие / О. В. Яковлева, Г. Ф. Ситдикова, А. В. Яковлев. – Казань: КГУ, 2007. – 64 с.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

---

ПРЕДИСЛОВИЕ .....	3
Глава 1. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БИОПОЛИМЕРОВ .....	4
1.1. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ .....	4
Лабораторная работа № 1 .....	11
1.2. ХРОМАТОГРАФИЯ .....	13
Лабораторная работа № 2 .....	27
Лабораторная работа № 3 .....	29
1.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ .....	32
Лабораторная работа № 4 .....	43
Лабораторная работа № 5 .....	45
Глава 2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА .....	47
2.1. ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ .....	48
Лабораторная работа № 6 .....	62
2.2. ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ И КУЛОНОМЕТРИЯ .....	64
2.3. КОНДУКТОМЕТРИЯ .....	85
Лабораторная работа № 7 .....	96
Глава 3. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА .....	99
3.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ .....	99
Лабораторная работа № 8 .....	113
Лабораторная работа № 9 .....	115
Лабораторная работа № 10 .....	116
Лабораторная работа № 11 .....	117
Лабораторная работа № 12 .....	118
3.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ .....	120
Лабораторная работа № 13 .....	134
Лабораторная работа № 14 .....	136
3.3. РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ .....	137
Лабораторная работа № 15 .....	145
3.4. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА .....	148
Лабораторная работа № 16 .....	155
Лабораторная работа № 17 .....	156
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	158
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	159

*Учебное издание*

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДАМ  
ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ

Автор-составитель КУРБАТОВ Юрий Николаевич

*Издается в авторской редакции*

Подписано в печать 24.05.21.

Формат 60×84/16. Усл. печ. л. 9,53. Тираж 50 экз.

Заказ

Издательство

Владимирского государственного университета  
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых.  
600000, Владимир, ул. Горького, 87.