

Владимирский государственный университет

Ю. Н. КУРБАТОВ

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ**

Учебное пособие

Владимир 2022

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

Ю. Н. КУРБАТОВ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ

Учебное пособие

Электронное издание



Владимир 2022

ISBN 978-5-9984-1617-0

© Курбатов Ю. Н., 2022

УДК 57.01
ББК 28.07

Рецензенты:

Доктор химических наук, профессор
профессор кафедры химии
Владимирского государственного университета
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевич Столетовых
Б. А. Кухтин

Кандидат биологических наук
инженер-эколог ООО «Ферма делает»
А. С. Злышко

Курбатов, Ю. Н.

Физико-химические методы исследования в биологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Ю. Н. Курбатов ; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых. – Владимир : Изд-во ВлГУ, 2022. – 273 с. – ISBN 978-5-9984-1617-0. – Электрон. дан. (5,99 Мб). – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Систем. требования: Intel от 1,3 ГГц; Windows XP/7/8/10; Adobe Acrobat Reader; дисковод CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.

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

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

Рекомендовано для формирования профессиональных компетенций в соответствии с ФГОС ВО.

Ил. 116. Табл. 9. Библиогр.: 60 назв.

УДК 57.01
ББК 28.07

ISBN 978-5-9984-1617-0

© Курбатов Ю. Н., 2022

ПРЕДИСЛОВИЕ

Рассматриваются основные физико-химические методы, применяемые в биологических исследованиях, основные типы современных приборов, предназначенных для анализа природных объектов. Излагаются теоретические основы методов, их реализация и прикладное значение. Для обеспечения наглядности пособие содержит иллюстрации, рисунки и графики, поясняющие и раскрывающие теоретические основы рассматриваемых методов и объясняющие принцип действия представленных к изучению приборов.

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

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

В последней главе рассматривается широкий спектр оптических методов анализа, куда входят молекулярно-абсорбционные, атомно-эмиссионные, рентгенофлуоресцентные и другие виды спектроскопии, а также рефрактометрические, нефелометрические и турбидиметрические 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.

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень научно-технического прогресса был бы недостижим без одновременного с ним развития методов изучения окружающей живой природы, позволяющих заглянуть вглубь тех или иных материальных объектов. Изучая особенности молекулярного и атомного строения, структуры и свойств химических соединений, человеку удалось создать материалы, которые никогда бы не появились в ходе естественной эволюции живой природы. Средствами физико-химических методов исследования и анализа прямо или косвенно создано все, что окружает современного человека: от наручных часов, компьютеров и лекарств до орбитальных станций, предназначенных для изучения Земли и космоса.

Сущность физико-химических исследований заключается в изучении соотношений между составом и свойствами химических равновесных систем. Эти методы исследований в целом можно разделить на две группы в зависимости от пути получения необходимой информации – на прямые или косвенные. При *прямых* анализах то или иное свойство вещества используется для непосредственного определения его концентрации в пробе. К *косвенным* методам прибегают, когда свойство вещества можно использовать для, например, установления окончания химической реакции реактива с определяемым компонентом. Такое свойство служит своеобразным чувствительным индикатором, по которому судят о величине концентрации определяемого вещества или примеси в пробе.

В зависимости от использованных свойств веществ применительно к биологическим дисциплинам можно выделить несколько основных групп физико-химических методов исследования.

1. Методы, предназначенные для разделения веществ и определения их молекулярной массы. Эти две задачи связаны между собой, так как используя особенности строения высокомолекулярных соединений, в частности биополимеров, можно добиться не только их разделения в смеси, но и вычислить таким образом молекулярную массу

и другие свойства, от которых зависит их поведение в условиях центрифугирования, хроматографических, электрофоретических или вискозиметрических методов анализа. Именно на этих методах мы и остановимся подробнее.

2. Электрохимические методы анализа объединяют в себе потенциометрические, кондуктометрические, вольтамперометрические и кулонометрические исследования веществ, способных проявлять электрохимические свойства. Аналитическим сигналом в данном случае будет служить любой электрический параметр, функционально связанный с концентрацией анализируемого вещества (потенциал электрода, сила тока в цепи, электрическая проводимость раствора электролита и т. п.)

3. Оптические методы анализа наиболее разнообразны и классифицируются они в зависимости от свойств спектра электромагнитного излучения, на использовании которых основаны. Например, гамма-спектроскопию реально произвести только на длинах волн γ -излучения (10^{-13} – 10^{-10} м), инфракрасная спектроскопия, соответственно, захватывает область ИК-излучения в пределах $7,8 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ м и т. п. В данном случае анализируют сигналы, связанные с характеристическими свойствами химических элементов, атомов, молекул, биополимеров, которые зависят от их способности поглощать или рассеивать электромагнитное излучение строго определенной длины волны, частоты или интенсивности.

Важнейшей мерой эффективности физико-химических методов являются их метрологические характеристики, к которым относят точность, воспроизводимость, чувствительность, селективность, предел обнаружения и другие показатели. Погрешность анализа физико-химическими методами составляет в среднем 2 – 5 %, что превышает погрешность классических (химических) методов. Однако, когда требуется определить очень малые концентрации веществ в пробе, классические методы становятся непригодны, при определении больших концентраций зачастую удобнее пользоваться физико-химическими методами. Существенный недостаток большинства физико-химических методов анализа – необходимость использования стандартных растворов, градуировочных графиков для обеспечения необходимой точности и воспроизводимости результатов измерений.

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 [56, с. 224]:

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

где V – объем частицы, ρ – плотность вещества частицы, ρ_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 уравновешивает 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, η – 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 [56, 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 [30, с. 12–13].

Центрифугирование – это 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 $dx/d\tau$ (где x – расстояние частицы от оси вращения). В то же время из механики известно, что ускорение в поле центрифуги равно $\omega^2 x$ (где ω – 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 ($1 \text{ Сб} = 10^{-13} \text{ с}$) 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 [30, 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 [53, 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 [12, 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 гра-

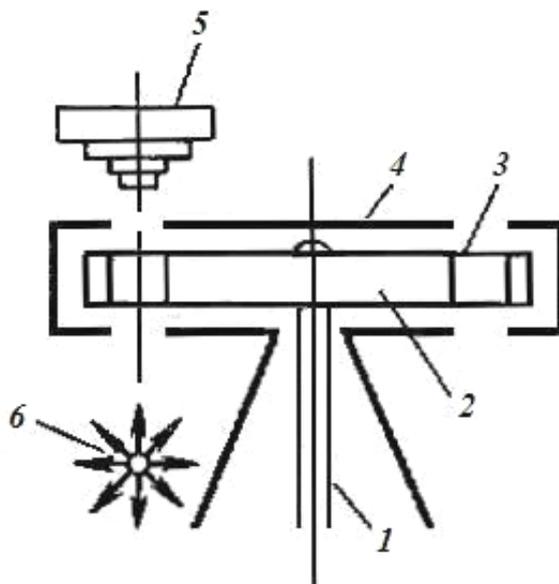


Рис. 1. Принципиальное устройство ультрацентрифуги [12, с. 78]:
 1 – ось, 2 – ротор, 3 – кюветы,
 4 – кожух, 5 – фотокамера,
 6 – источник света

нице зон происходит преломление света; при этом на фотопластинке, использующейся в качестве детектора, появляется пик, по скорости передвижения которого можно судить о скорости седиментации [47, с. 105–106].

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 [47, 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) [51, 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) [28, 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 ρ_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

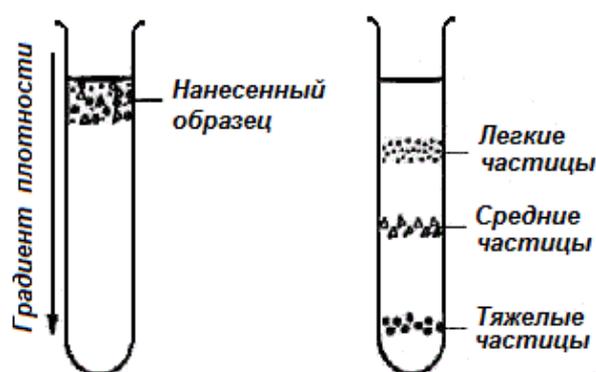


Рис. 3. Зональное и изопикническое разделение частиц в градиенте плотности [47, с. 169]

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 равновесного центрифугирования в градиенте плотности CsCl был применен для установления полуконсервативного характера репликации ДНК [28, 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, ρ – плотность частиц, ρ_0 – плотность растворителя. Метод измерения скорости седиментации приводит к ошибочным результатам, если форма частиц сильно отклоняется от сферической [53, 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 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 ω – 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 при-

тяжения. Полученные с помощью метода седиментационного равновесия результаты не зависят от формы частиц, однако для установления этого равновесия требуется продолжительное время [53, с. 36].

Компромиссом между двумя вышерассмотренными методами является *метод приближения к седиментационному равновесию* (метод 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 [9, с. 120].

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 хроматографии 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.

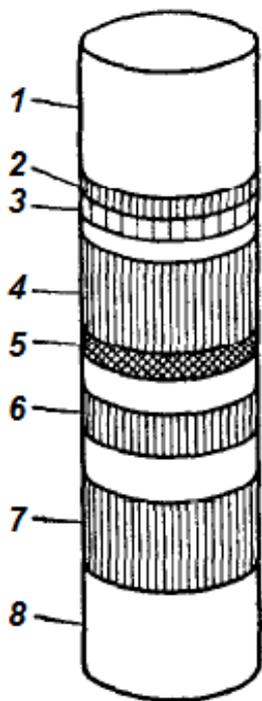


Рис. 4. Хроматограмма хлорофилла по Цвету [41, с. 10]:

- 1 – бесцветная зона,
- 2 – желтая (ксантофилл β),
- 3 – зеленая (хлорофиллин β);
- 4 – синяя (хлорофиллин α);
- 5, 6, 7 – желтые (ксантофилл α),
- 8 – серая (хлорофиллин)

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.

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 [42, 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 [20, с. 68].

Если молекула адсорбата занимает в поверхностном слое площадь S_0 , а число молекул адсорбата составляет n , то площадь Θ , 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 Θ , 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_∞ – 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_{∞} адсорбционных слоях можно выразить, используя число Авогадро N_A , через гиббсовскую адсорбцию Γ , которая показывает избыток адсорбата в поверхностном слое по сравнению с его первоначальным количеством в этом слое:

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

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* [20, с. 71–74]. Типичная изотерма адсорбции приведена на рис. 5.

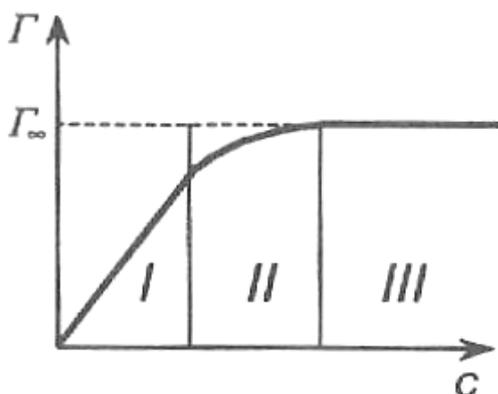


Рис. 5. Изотерма мономолекулярной адсорбции [20, с. 71]

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

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

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.

Основопологающим 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 [42, с. 261].

Классификация хроматографических методов

Многочисленные хроматографические методы классифицируют по нескольким признакам [31, 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.

**Классификация хроматографических методов
по механизму процесса сорбции**

Вид хроматографии	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Природа сорбции
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, сорбирующее 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 [56, 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 непо-

движной фазы и на выходе из нее, а также их количества. Получение хроматограммы можно рассмотреть на примере газовой хроматогра-

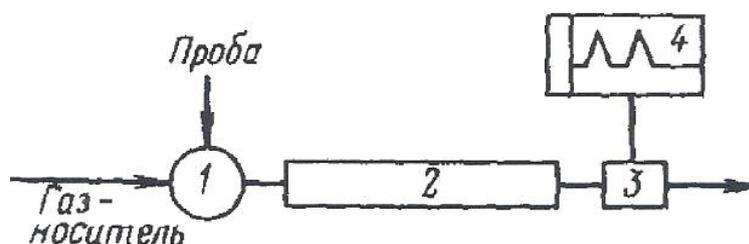


Рис. 6. Принципиальная схема газовой хроматографа [14, с. 27]:

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

фии. Принципиальная 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 [56, 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)

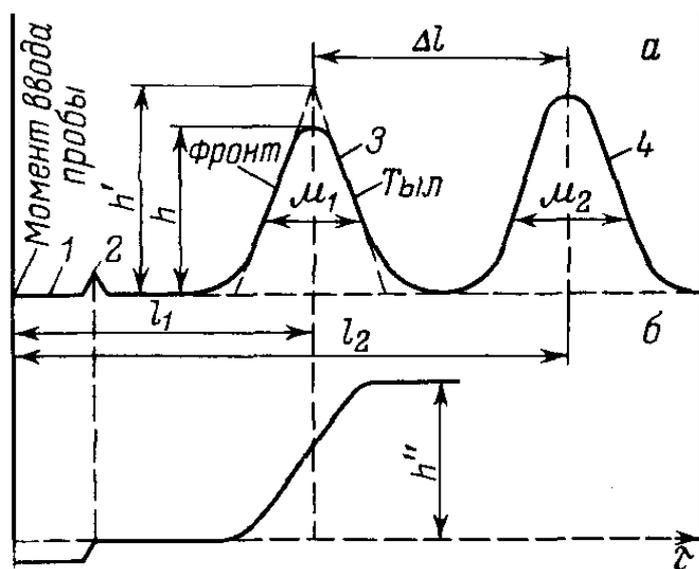


Рис. 7. Дифференциальная (а) и интегральная (б) хроматограммы [14, с. 43]

позволяет фиксировать концентрацию компонентов. В качестве детекторов 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 β -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 (ну-

левая 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 μ 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 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 характеристиками, с помощью которых можно сделать заключение о качестве разделения компонентов смеси, являются *время удерживания* $\tau_{уд}$ и *объем удерживания* $V_{уд}$ [56, 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 ω – 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:

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

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 [56, 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 [10, 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

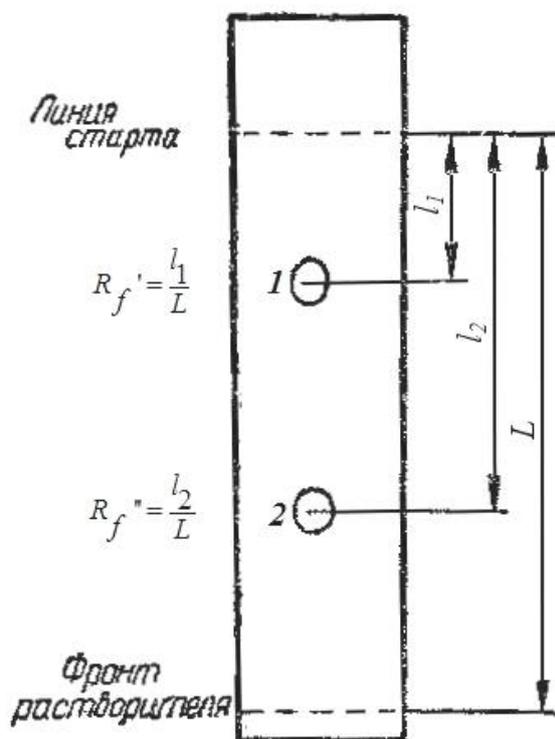


Рис. 8. Определение компонентов на бумажной хроматограмме [41, с. 79].

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

при гидролизе белка. До настоящего времени этот способ пригоден для разделения природных веществ – углеводов, липидов, нуклеотидов и др. [10, с. 330].

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

Рассмотрим более подробно методы хроматографии, различаемые по агрегатному состоянию подвижной фазы — газовую и жидкостную хроматографию.

Сущность *газовой хроматографии* состоит в использовании в качестве подвижной фазы газа или пара. В зависимости от состояния неподвижной фазы выделяют газожидкостную (пленка

жидкости на поверхности частиц твердого сорбента) и газоадсорбционную (твердый адсорбент) разновидности. Дозаторами являются в данном случае шприцы и микрошприцы. Для *газоадсорбционной хроматографии* используются твердые сорбенты нескольких видов. Это могут быть, например, активированные угли – неполярные адсорбенты, использующиеся преимущественно для анализа легких газов, вследствие большой силы взаимодействия с анализируемым веществом из-за высокой удельной поверхности. Силикагели и оксид алюминия являются полярными адсорбентами. Цеолиты и пористые стекла представляют собой молекулярные сита, размер пор в которых близок к размерам молекул, следовательно, сорбции подвергаются только те вещества, которые могут проникнуть в поры.

Газожидкостная хроматография отличается более высокой эффективностью, вследствие использования процесса растворения газа в тонком слое жидкости, нанесенном на поверхность твердого адсорбента. Различия в растворимости газов дают преимущества при анализе многокомпонентных смесей. Жидкую фазу подбирают в зависимости от свойств компонентов смеси: она должна быть инертна по отношению к анализируемым веществам и твердому сорбенту, обладать высокой селективностью (способностью разделять смеси компонентов), оставаться термически устойчивой, иметь малую вязкость и не быть летучей. Чаще всего в качестве жидкой фазы используют следующие вещества: вазелиновое и силиконовое масла, фталаты (дибутил, диоктил и др.), диметилформамид, и др. В качестве твердых носителей используют материалы, отличающиеся малой микропористостью, но с развитой поверхностью, такие как кизельгур или диатомит. Иногда применяют стеклянные микрошарики, а при исследовании реакционноспособных веществ используют тефлон.

Капиллярная хроматография обладает еще более высокой эффективностью разделения, так как выполняют ее в хроматографической колонке, представляющей собой капилляр с внутренним диаметром 0,1–0,5 мм и длиной в несколько десятков метров. Жидкая фаза в данном случае наносится на стенку капилляра (вариант с использованием кроме жидкости еще и твердого вещества, носит название *твердослойной капиллярной хроматографии*). За счет уменьшения сопротивления потоку газа повышается эффективность разделения, кроме того для этого метода характерен минимальный объем отбираемой пробы и малая длительность анализа [10, с. 303–307].

Метод *аналитической реакционной газовой хроматографии* основан на изменении химического состава пробы до хроматографирования с целью получения веществ, которые легче разделяются при хроматографировании. Установки для реализации этого метода состоят из реактора (где происходят химические превращения веществ), колонки и детектора. Продукты реакции, полученные в реакторе, потоком газа-носителя уносятся в хроматографическую колонку, после их разделения количество компонентов в смеси определяется с помощью детектора [10, с. 315].

Наиболее распространенными детекторами в газовой хроматографии являются *катарометры*. Их принцип действия заключается в

измерении сопротивления нагретой платиновой или вольфрамовой нити, которое зависит от теплопроводности омывающего газа (а теплопроводность в свою очередь определяется составом газовой смеси). *Термохимический детектор* реагирует на изменение температуры платиновой проволоки, которая зависит от температуры сгорания горючих газов, выходящих из хроматографической колонки. Этот детектор используется менее часто, несмотря на большую, по сравнению с катарометром, точность, вследствие необходимости частой калибровки и замены платиновой проволоки, кроме того, измеряемые вещества должны быть горючими. Принцип действия *пламенного детектора* заключается в измерении температуры водородного пламени горелки, которая меняется в зависимости от концентрации попадающих в него органических веществ. Наиболее чувствительная разновидность такого детектора – *пламенно-ионизационный детектор*, позволяет обнаружить до 10^{-12} г вещества в пробе за счет измерения электрической проводимости пламени. Этот детектор предназначен для определения концентрации преимущественно органических веществ. При их попадании в водород возникает ионизация пламени, причем она пропорциональна концентрации определяемого вещества и ее легко можно измерить. Имеются и другие типы детекторов, например, термоионные (исключительно фосфорселективные детекторы), аргонные, ультразвуковые, диафрагменные, микрокулометрические и т.п [10, с. 307–308].

Жидкостная адсорбционная хроматография является высокочувствительным и селективным методом анализа, предназначенным для анализа многокомпонентных смесей в растворах. Основными узлами установки для жидкостной хроматографии, как и в случае с газовой разновидностью, являются колонка, дозатор и детектор. Колонки изготавливаются из толстостенного стекла или нержавеющей стали и различаются как длиной (от 15–20 см и выше, но не более 10 м), так и диаметром (от 1 до 12 мм). Адсорбенты, помещаемые в колонки, так же могут быть различными, в зависимости от их селективности, структуры поверхности и природы анализируемых веществ. Поверхностно-пористые адсорбенты (ППА), например, обладают отличными структурными свойствами, механической прочностью и отличаются отсутствием глубоких пор (в качестве ППА используют стеклянные шарики, покрытые силикагелем, оксидом алюминия и др.). Применя-

ют так же объемно-пористые мелкозернистые адсорбенты на основе силикагеля, алюмогеля и др. веществ. В жидкостной хроматографии в качестве подвижной фазы используют растворители, которые также должны обладать рядом свойств: хорошо растворять анализируемые вещества, обладать химической инертностью по отношению к растворенным веществам, адсорбенту и кислороду воздуха, быть маловязким и химически чистым [10, с. 318–319].

Детекторы для жидкостной хроматографии отличаются от таковых в газовой. С успехом используют рефрактометрические, спектрометрические, кондуктометрические, флуориметрические и другие виды детекторов. *Рефрактометрические детекторы* достаточно универсальны, так как измерения производятся непрерывно на основании различия показателей преломления между чистым растворителем и раствором после прохождения колонки. Однако, в рефрактометрии важным условием является термостатирование и данный детектор не лишен этого недостатка. Среди спектрометрических детекторов наибольшей чувствительностью и селективностью отличаются *УФ-детекторы*. Они позволяют определить до 10^{-9} г вещества. В конструкции этих устройств в качестве источника излучения предусмотрена ртутная лампа низкого давления, испускающая свет одной длины волны – 253,7 нм. Для проведения наиболее точного анализа необходимо, чтобы молярные коэффициенты светопоглощения анализируемых компонентов были высоки, при этом растворитель не должен поглощать свет в ультрафиолетовой части спектра. *Спектрофотометрические детекторы* в отличие от УФ аналогов, могут работать в достаточно широком диапазоне длин волн – 190–650 нм. Причем спектр излучения можно снимать как в непрерывном режиме, так и в случае с остановкой потока элюента. *Флуориметрические детекторы* примерно в 100 раз чувствительнее спектрофотометрических, но при работе с ними необходимо учитывать тот факт, что кислородсодержащие растворители обладают способностью гасить флуоресценцию. Принцип их действия заключается в измерении интенсивности флуоресценции веществ, способных флуоресцировать под воздействием УФ и видимого света. Применяют их для детектирования микропримесей, ароматических полициклических углеводородов, фенолов, производных аминокислот и др. веществ [1, с. 58]. *Амперометрические детекторы* измеряют силу тока окисления органиче-

ских соединений, находящихся на поверхности твердого электрода. В качестве электрода сравнения используют хлорсеребряный или стальной электрод, а вот рабочий электрод подбирают в зависимости от условий анализа. Чаще всего это электроды из углеродных материалов (например, стеклоуглеродный) или металлические – платиновый или золотой. Детекторы, основанные на измерении силы тока, применяют при определении фенольных соединений, гидразинов, биогенных аминов и некоторых аминокислот. *Кондуктометрический детектор* используется в ионной разновидности хроматографии. Предназначен он для измерения проводимости раствора (Ом^{-1}), которая находится в прямой зависимости от количества ионов в растворе и их подвижности. Предел обнаружения веществ таким способом достигает 10^{-9} г/мл. Использование специальной концентрирующей колонки позволяет снизить предел обнаружения на 2–3 порядка [42, с. 354–356].

Очень большой разрешающей способностью отличается *высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)*, когда для ускорения процесса хроматографирования осуществляют под высоким 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 [26, с. 14].

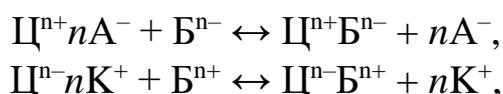
В методе *ионной хроматографии* используют поверхностно-слойные сорбенты с небольшим размером частиц (5–50 мкм) и небольшой емкостью (10^{-2} – 10^{-1} ммоль экв/л). Еще одной отличительной особенностью этого метода является наличие повышенного давления на входе в колонку (2–5 МПа). Для регистрации сигнала чаще всего используют высокочувствительные кондуктометрические детекторы, но есть возможность применения и селективных детекторов: электрохимических (полярографический, кулонометрический и т. д.) и спектрофотометрических. Ионная хроматография отличается экспрессностью, удобством работы и высокой разделительной способностью [10, с. 338–339].

Осадочная хроматография основана на разделении смеси в ходе последовательного образования малорастворимых соединений (осадков). Процесс разделения может быть произведен в колонке, на бума-

ге или тонком слое. В качестве носителей используют хорошо фильтрующиеся и светлоокрашенные вещества, например, силикагели, оксид алюминия и т. д. Осадителями выступают реагенты, образующие малорастворимые осадки анализируемых соединений. Сущность метода заключается в многократном повторении процессов образования и растворения осадка (по аналогии с сорбцией и десорбцией в адсорбционной хроматографии). Порядок расположения осадков на хроматограмме будет зависеть от концентрации исследуемых веществ в пробе, причем наблюдаемое разделение на зоны будет более четким, если разница в растворимости получаемых осадков имеет заметную величину.

Для разделения биополимеров и низкомолекулярных биологически активных веществ 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) [19, с. 21–22]. Сорбцию можно представить уравнениями:



где К^+ и А^- – обменивающиеся ионы; Ц^{n-} и Ц^{n+} – нерастворимые высокомолекулярные ионы катионита и анионита; Б^{n+} и 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 сум-

марным 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 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 [46, 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

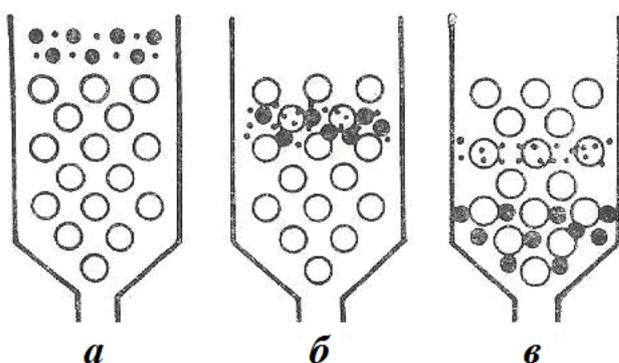


Рис. 9. Разделение двух сортов молекул при гель-хроматографии [53, с. 32]:

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

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 про-

лярного 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

никнуть 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 [27, с. 249].

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 кото-

рых получены), а нуклеиновые кислоты, такие как информационная РНК, гибридизуются с комплементарными ДНК [45, 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.

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 углеводов, в анализе пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

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. Дайте характеристику газовой хроматографии. В чем ее особенность?
14. Охарактеризуйте жидкостную хроматографию. Какие детекторы используются для регистрации анализируемых веществ в рамках данного метода?

15. Как проводится разделение методом ионообменной хроматографии?
16. Как проводится разделение методом гель-хроматографии?
17. В чем заключается гель-фильтрационный метод определения молекулярной массы биополимеров?
18. 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 [20, 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 φ формируется из потенциалобразующего 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 [20, 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 пористую 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) [55, с. 207].

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

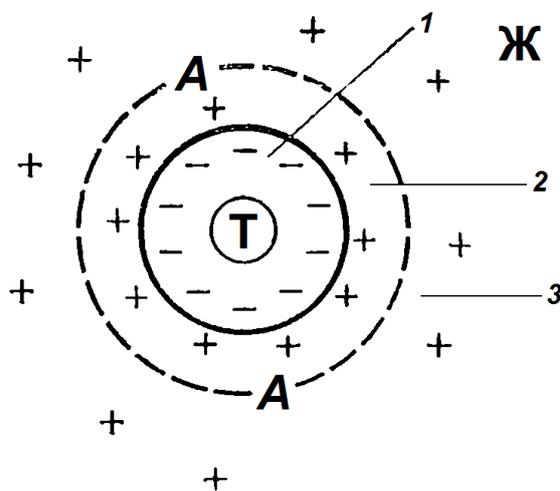


Рис. 10. Схема строения двойного электрического слоя для сферической частицы [20, с. 111]:

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

линии AA в сторону жидкости [20, с. 112]. По мере удаления от поверхности твердого тела и до границы скольжения потенциал ϕ

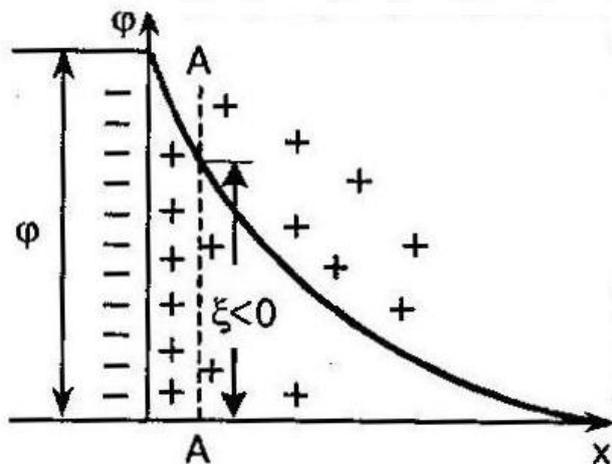


Рис. 11. Изменение потенциала ϕ при $\zeta < 0$ [20, с. 112]

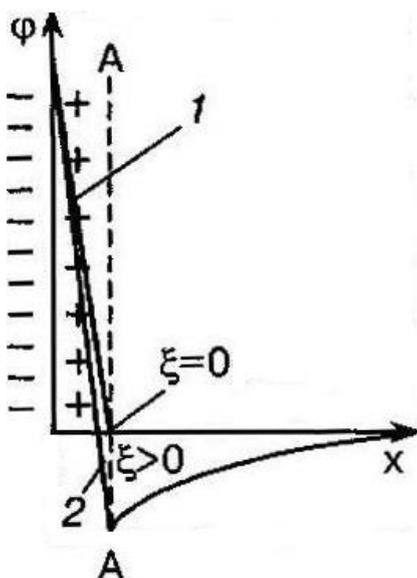


Рис. 12. Изоэлектрическая точка и перезарядка поверхности [20, с. 112]

снижается линейно, а за границей скольжения – по экспоненциальному закону. Точка перегиба на графике (рис. 11) соответствует значению электрокинетического, или дзета-потенциала (ζ -потенциала) – электрического потенциала на границе скольжения. В отличие от потенциала ϕ значение ζ -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 ζ -потенциала зависят от концентрации электролита в растворе. Добавление одновалентных противоионов приводит к сжатию диффузного слоя и снижению ζ -потенциала. Когда все противоионы будут находиться в адсорбционном слое (прямая 1 на рис. 12), происходит полная компенсация потенциалообразующего

слоя, и ζ -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 ζ -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.

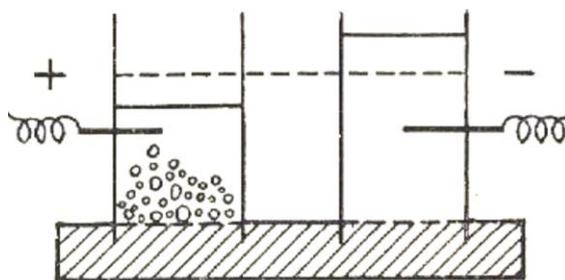


Рис. 13. Опыт Рейсса [55, с. 206]

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

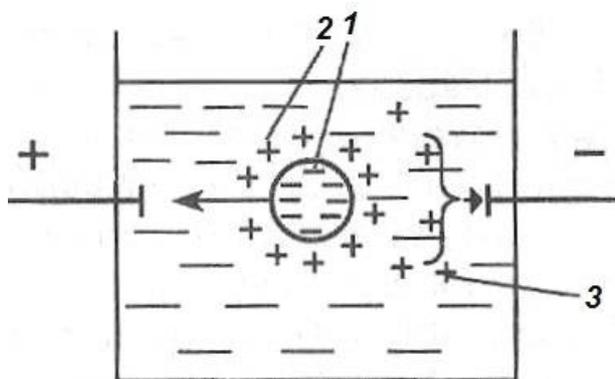


Рис. 14. Электрофорез [20, с. 115]:

1 – потенциалобразующие ионы,
2 – противоионы в адсорбционном слое,
3 – противоионы в диффузном слое, *длинная стрелка* – электрофорез, *короткая стрелка* – электрофоретическое торможение

Относительность движения дисперсной фазы и дисперсионной среды определяется двумя силами. Электростатическая сила F_1 , стре-

мящаяся сдвинуть две фазы относительно друг друга, определяется по формуле

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

где E – напряженность внешнего электрического поля, σ – плотность заряда поверхности.

Сила F_2 определяет трение жидкости при ее перемещении:

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

где η – 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 σ можно связать с ζ -потенциалом:

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

где ϵ_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, м²/с·В, ψ – коэффициент, зависящий от формы частиц; ζ – электрокинетический потенциал, В; E – напряженность внешнего электрического поля, В/м.

Коэффициент ψ учитывает форму частиц и их ориентацию в электрическом поле. Для шарообразных частиц коэффициент ψ равен 0,66, а для цилиндрических, ориентированных вдоль силовых линий электрического поля – 1 [20, с. 119]. Абсолютная диэлектрическая проницаемость среды $\epsilon_a = \epsilon \epsilon_0$, где ϵ – относительная диэлектрическая проницаемость среды (для воды она составляет 80,1 при 20°C);

ϵ_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 (η , ϵ), формы частиц (ψ), напряженности внешнего электрического поля (E) и ζ -потенциала.

Электрофоретическую подвижность и электрокинетический потенциал можно определить по скорости перемещения дисперсной фазы; v_E обычно не превышает $5 \cdot 10^{-8}$ м²/с·В, а ζ -потенциал – 100 мВ [20, 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 [27, 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 камеры. 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.

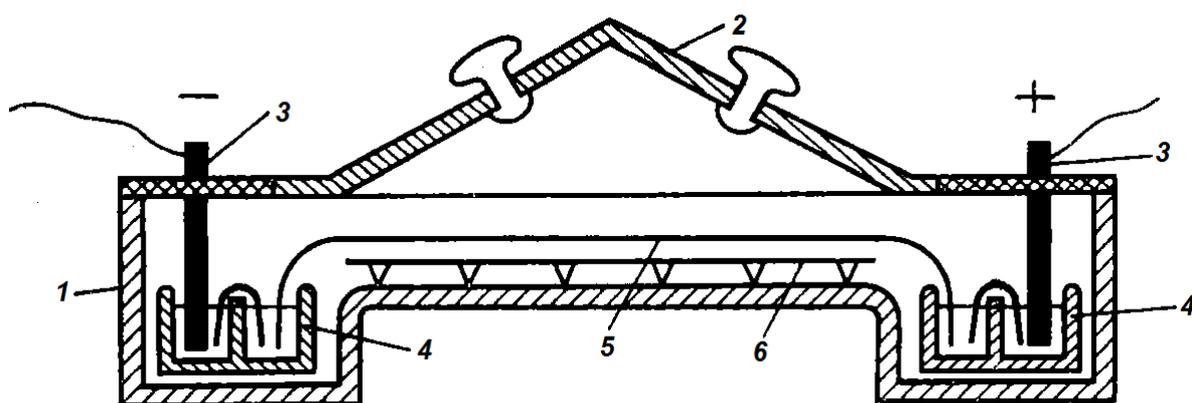


Рис. 15. Схема камеры для электрофореза на бумаге [46, с. 125]:
 1 – камера из стекла, 2 – крышка камеры, 3 – электроды, 4 – кюветы для электродов, 5 – полоски хроматографической бумаги, 6 – перфорированная пластина

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 анода, 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 ζ -потенциала и скорость электрофореза. В кислой среде основные функциональные группы протонируются, тогда как диссоциация кислотных групп подавляется, поэтому белки оказываются заряженными положительно, ζ -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 [20, 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 окрашенные пятна. По числу пятен судят о количестве белковых фракций, а по интенсивности окраски – о количестве каждой белковой фракции в исследуемой сыворотке.

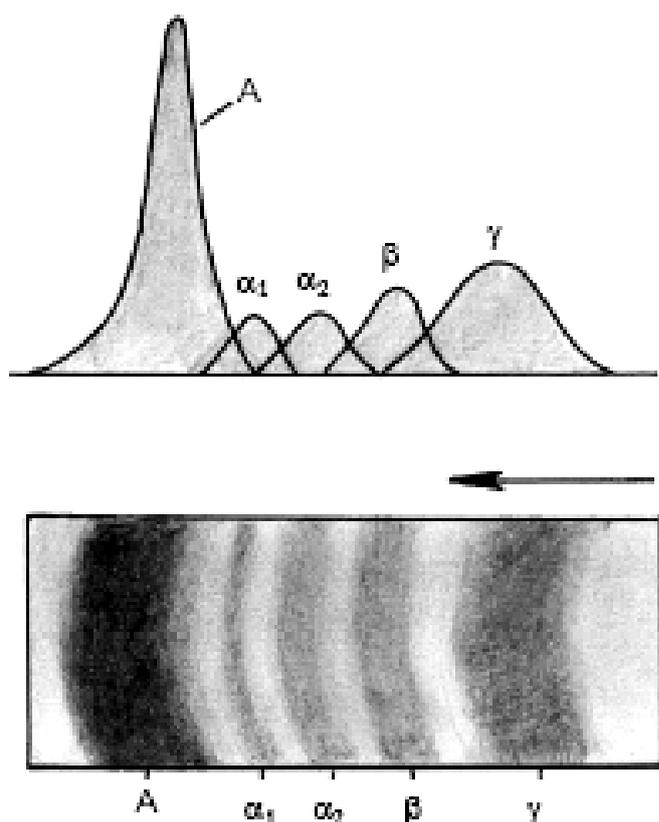


Рис. 16. Электрофореграмма и денситограмма белков нормальной сыворотки крови [19, с. 64; 55, с. 84]: А – альбумин, α_1 , α_2 , β , γ – глобулины. Стрелка указывает направление движения от старта

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 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.

белки фиксируют высушиванием, а затем обрабатывают красителями. При этом на бумажной электрофореграмме (рис. 16) выявляются окрашенные пятна. По числу пятен судят о количестве белковых фракций, а по интенсивности окраски – о количестве 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 белковых фракций.

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) [19, 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 [19, 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).

При электрофорезе с ДСН обычно используют также обработку белков β -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 [58, с. 566–567].

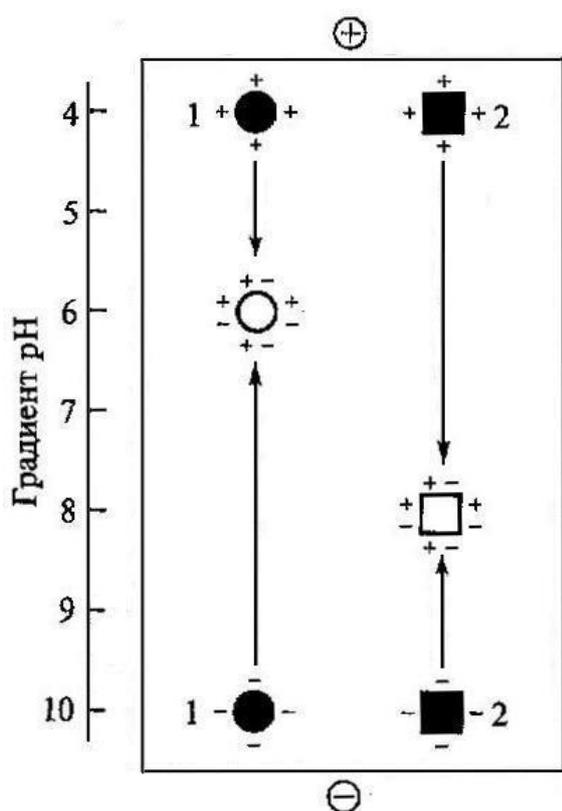


Рис. 17. Разделение белков методом изоэлектрического фокусирования [30, с. 16].

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)

аминополикарбоновые кислоты (амфолины). Если молекула белка находится в нижней части колонки, где $pH < pI$, то на 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 [27, 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 [30, с. 16–17].

С точки зрения биологических исследований представляет интерес *капиллярный зонный электрофорез*, принцип действия которого основан на электромиграционном разделении компонентов смеси в капилляре. В качестве капилляра выступает кварцевая трубка с внутренним диаметром 50–75 мкм и общей длиной до 1 метра, окруженная снаружи полиимидным покрытием. Концы капилляра опускаются в сосуды с раствором электролита и заполняются им, в те же сосуды помещаются электроды. Установка для такого электрофореза оборудована мощным источником напряжения (до 30 кВ), устройством для ввода пробы и термостатирующим устройством, необходимым для поддержания температуры в диапазоне 10–50 °С. В качестве детектора чаще всего используют фотометрический анализатор, который работает в УФ-диапазоне и регистрирует изменения спектра, происходя-

щие внутри капилляра, в том его месте, где удалено полиимидное покрытие. Есть установки, в которых используются кондуктометрические, люминесцентные и другие виды детекторов. Если рассматривать в качестве детектора – фотометрический, то принцип его действия основан на регистрации спектра введенного в фоновый электролит окрашенного соединения. Если стоит задача проанализировать положительно заряженные частицы, то для этого вводят катионы ароматических аминов (протонированный бензимидазол), для детектирования анионов, выбирают соответственно, хромат-ионы. Для каждого вида анализа подбирают подходящий электролит (буферный раствор), после ввода в капилляр пробы и подачи напряжения происходит разделение анализируемых веществ в капилляре на зоны вследствие разной скорости их передвижения, зависящей от заряда и массы ионов. При концентрировании анализируемых веществ в некоторые скопления (зоны), они проходят через область детектирования, в результате чего наблюдается провал в поглощении УФ-света, таким образом и обнаруживаются анализируемые ионы. Итогом анализа становится электрофореграмма с пиками появления веществ в зоне детектирования. Качественной характеристикой здесь является время миграции (время появления в зоне регистрации), а количественной – высота и площадь пика. К преимуществам данного метода можно отнести большую эффективность, малый расход реактивов, экспрессность и схему прибора, которая достаточно проста в реализации [42, с. 368–370].

Области применения капиллярного зонного электрофореза постоянно расширяются. С помощью этого метода определяют неорганические катионы, анионы, низкомолекулярные карбоновые кислоты и др. В экологии широкое распространение получили методики определения содержания гербицидов, пестицидов, фенолов в различных объектах окружающей живой природы. Фармацевтическая промышленность активно развивает потенциал метода в области оценки чистоты лекарственных средств и других задачах. В биологии все активнее развиваются методы детектирования аминокислот, белков, углеводов, нуклеиновых кислот посредством капиллярного электрофореза [42, с. 373].

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?
13. Охарактеризуйте капиллярный зонный электрофорез. В чем его особенности? Каковы области применения?

1.4. ВИСКОЗИМЕТРИЯ

Теоретические основы вискозиметрии

Вискозиметрия – физико-химический метод анализа, основанный на определении таких свойств вещества, как объем, размеры, форма и жесткость молекул, на основании вязкости его растворов.

Вискозиметрия считается относительно простым в реализации методом, вследствие доступности и легкой интерпретации результатов измерений. Она занимает важное место в исследованиях молекулярной массы биополимеров, например, белков или нуклеиновых кислот.

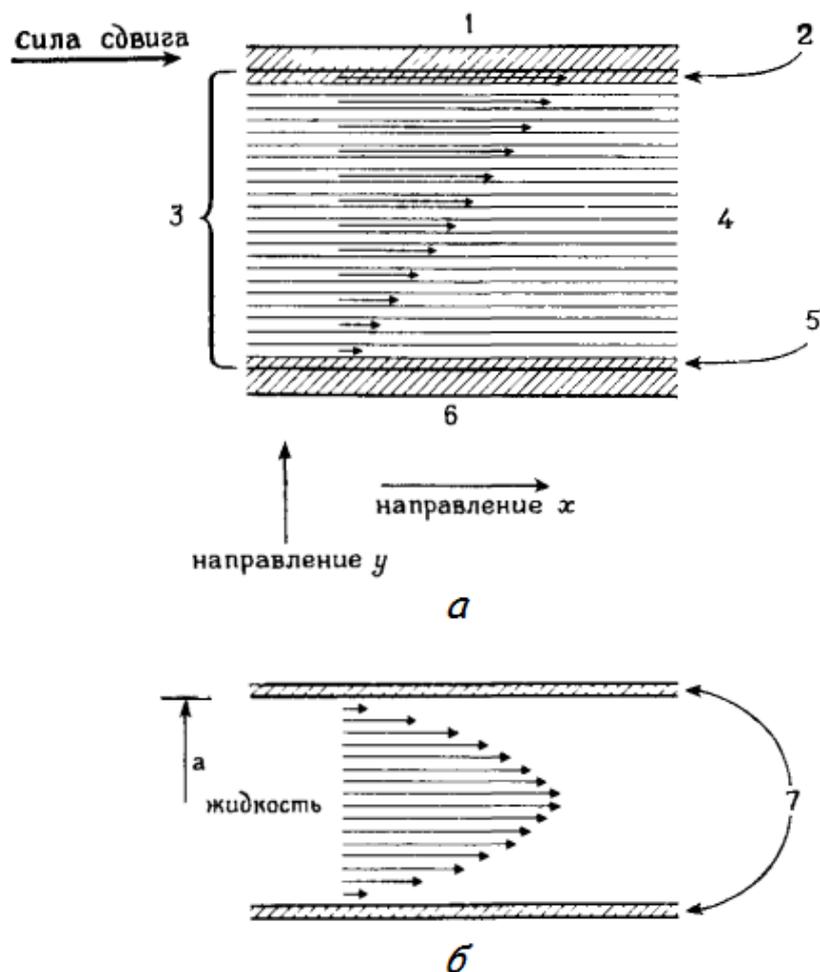


Рис. 18. *а* – деформация сдвига жидкости между двумя параллельными пластинами. Направления стрелок показывают градиент скорости;

б – профиль скорости движения жидкости по цилиндру с радиусом «а»

[54, с. 361]:

1 – пластина, движущаяся со скоростью v ; 2 – слой жидкости, движущийся со скоростью, примерно равной v ; 3 – жидкость, состоящая из бесконечно тонких слоев; 4 – длины стрелок отражают скорости движения слоя;

5 – почти неподвижный слой; 6 – неподвижная пластина; 7 – стенки трубки

Для того чтобы понять принцип действия вискозиметрических измерений, рассмотрим характер движения жидкости между двумя параллельными пластинами, одна из которых неподвижна, а другая движется в направлении x со скоростью v (рис. 18, *а*). Движению бесконечно тонкого слоя жидкости, прилегающего к каждой пластине, препятствует сила трения. Движущаяся пластина заставляет жидкость двигаться в направлении x со скоростью, приблизительно равной v , тогда как слой, прилегающий к неподвижной пластине, движется

очень медленно. Если представить, что жидкость состоит из множества бесконечно малых слоев, которые скользят друг относительно друга, то за счет силы трения возникнет разница в скоростях движения этих слоев, что говорит о возникновении градиента скорости. Скорость v движения жидкости в слое в таком случае можно найти через выражение:

$$v = gy \quad (40),$$

где $g = dv/dy$ – *градиент скорости*, а y – это расстояние, на котором находится этот слой жидкости от плоскости пластинки. В таком случае наблюдается явление *сдвига* – особый вид деформации жидкости. Силу сопротивления f между слоями жидкости, отнесенную к единице площади, находят следующим образом:

$$f = \eta \left(\frac{dv}{dy} \right) = \eta g \quad (41),$$

где μ – *коэффициент вязкости*, являющийся индивидуальной характеристикой данной жидкости. Через соотношение $F = f/A$ находят величину F – *напряжение сдвига* [54, с. 361].

Рассмотрим рис. 18, б. В данном случае жидкость движется по цилиндрической трубке, соответственно трение возникает вдоль ее стенок. Получается, что скорость жидкости у стенок уменьшается, зато вдоль оси она принимает максимальные значения. Градиент скорости здесь становится параболическим, а не линейным, как в случае с рис. 18, а.

На использовании параллельных пластин или трубок основана работа вискозиметров – устройств, предназначенных для определения вязкости растворов [54, с. 362].

Чтобы оценить влияние макромолекул на вязкость раствора, рассмотрим случай добавления к чистому растворителю с вязкостью η_0 макромолекул некоего вещества, вязкость которых будет равна η . По величине различия между этими двумя величинами мы сможем найти $\eta_{уд}$ – *удельную вязкость раствора*:

$$\eta_{уд} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \quad (42).$$

Эта величина характеризует вклад вязкости растворенного вещества в общую вязкость раствора. $\eta_{уд}$ напрямую зависит от концентрации c растворенных веществ в анализируемой жидкости, таким образом справедливым оказывается соотношение:

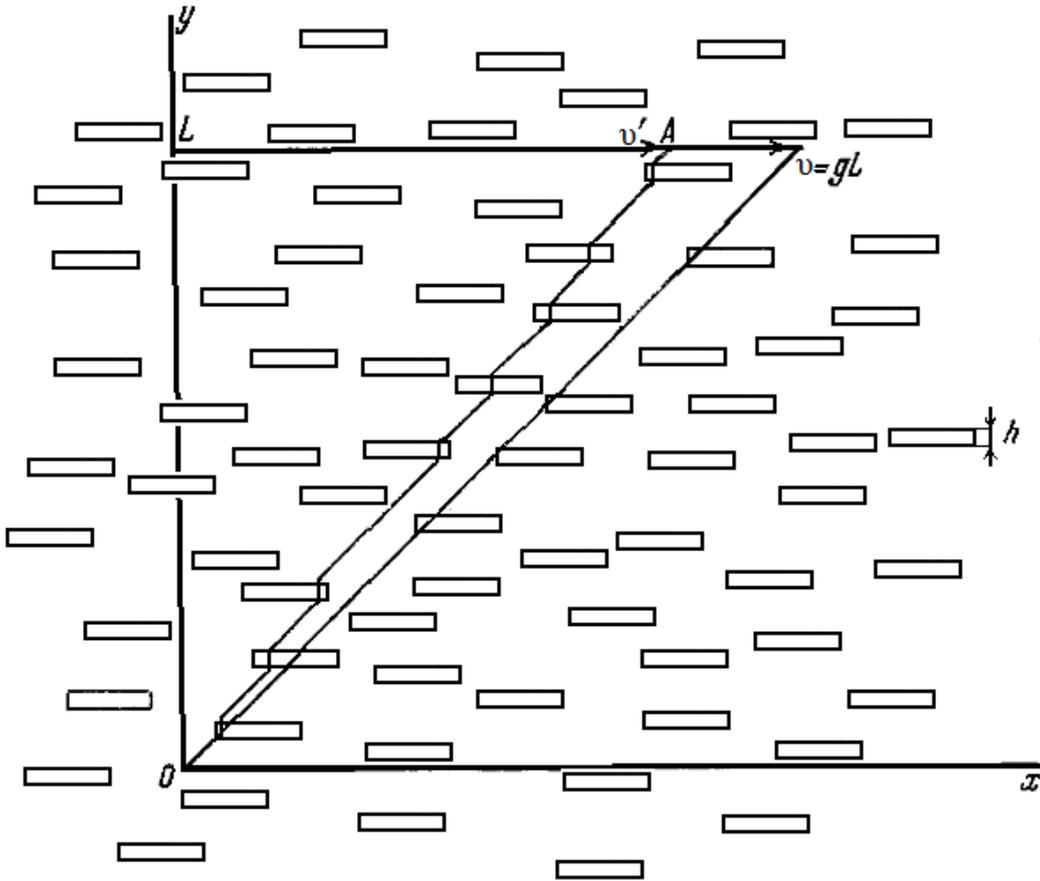


Рис. 19. Градиент скорости потока в суспензии жестких частиц [52, с. 226]

$$[\eta] = \frac{\eta_{\text{уд}}}{c} \quad (43),$$

где $[\eta]$ – *характеристическая вязкость* растворенного вещества, $\text{см}^3/\text{г}$ или $\text{дл}^3/\text{г} = 100 \text{ см}^3/\text{г}$ [52, с. 224].

Уравнение (43) справедливо исключительно в том случае, если в растворе находятся жесткие, не взаимодействующие между собой, частицы. Применительно к полимерным молекулам, межмолекулярными взаимодействиями между которыми пренебрегать нельзя, справедливым будет выражение:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{\text{уд}}}{c} \right) \quad (44).$$

Чтобы понять характер взаимодействия жестких частиц в растворе, удобно представить эти частицы в виде прямоугольных пластинок, движущихся в одном направлении, куда течет растворитель (рис. 19). Каждая такая пластинка характеризуется своей площадью S и толщиной h . Если допустить, что скорость потока жидкости изменяется линейно с координатой y , а градиент скорости принять за g , то присутствие частиц в растворителе будет уменьшать это изменение скорости. Уменьшение скорости потока в суспензии по сравнению со

скоростью в чистой жидкости легко рассчитать по среднему числу пересечений диаграммы скорости OA с частицами в плоскости xu , параллельной направлению потока и перпендикулярной движущимся слоям жидкости. Как легко убедиться, число частиц, пересекаемых ломаной линией OA , равно произведению NSL , где N – число частиц в единице объема [52, с. 225]. Скорость уменьшается, следовательно, на величину $gNSLh$, т. е.

$$v_1 = gL - gNSLh = g(1 - NV)L = g_1L \quad (45),$$

где $V=Sh$ – объем частицы. Величина g_1 – средний фактический градиент скорости течения суспензии.

Поскольку сила, вызывающая течение жидкости остается прежней, то согласно уравнению (41) получаем:

$$g\eta_0 = g_1\eta = g(1 - NV)\eta \quad (46),$$

откуда, выразив η через η_0 , находим

$$\eta_{уд} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{NV}{1 - NV} \quad (47).$$

Произведением NV в уравнении (47) можно пренебречь, ввиду его малой величины (малая концентрация частиц) по сравнению с единицей. Таким образом, получаем:

$$\eta_{уд} \approx NV \quad (48).$$

Выражение (48) справедливо для частиц любой формы и ориентации и основное его значение в пропорциональности удельной вязкости доле объема, занимаемой суспендированными частицами.

Эйнштейн показал, что для сферических жестких частиц будет справедливо соотношение:

$$\eta_{уд} = 2,5NV \quad (49).$$

Поскольку $N = \frac{cN_A}{M}$, где M – молекулярный вес, c – концентрация растворенных частиц в $г/см^3$, а N_A – число Авогадро, получаем:

$$[\eta] = 2,5N_A \frac{V}{M} \quad (50).$$

Аналогичная формула предложена Симха для эллипсоидальных частиц:

$$[\eta] = b \left(\frac{a_1}{a_2} \right) N_A \frac{V}{M} \quad (51),$$

где V – объем частицы, $b(a_1/a_2)$ – некоторая возрастающая функция отношения длин a_1 и a_2 главных осей эллипсоидальной частицы.

Таким образом, с помощью выражения (51) можно найти характеристическую вязкость жестких частиц любой формы [52, с. 226–227].

С помощью вискозиметрии можно изучать не только растворы с жесткими частицами, но и растворенные полимерные молекулы, имеющие разнообразные конформации. Характеристики некоторых белков, полученные вискозиметрическим методом, указаны в табл. 2.

Таблица 2

Молекулярная масса, удельный объем и характеристическая вязкость некоторых белков [27, с. 270]

Белок	M_r	$V, \text{ см}^3/\text{г}$	$[\eta], \text{ см}^3/\text{г}$
Рибонуклеаза	13 683	0,728	3,30
Альбумин бычьей сыворотки	65 000	0,734	3,7
Гемоглобин	68 000	0,749	3,6
Каталаза	250 000	0,730	3,9
Фибриноген	330 000	0,710	27
Коллаген	345 000	0,695	1150
Миозин	463 000	0,728	217

В соответствии с формулой (48) полимерная молекула может принимать в растворе форму ассиметричного свернувшегося клубка, обусловленную межмолекулярными, межатомными и другими типами взаимодействий. При вращении такой клубкообразной молекулы в растворе, часть жидкости как бы захватывается этой молекулой и составляет с ней единое целое. Таким образом, частица «пропитывается» жидкостью и становится условно непротекаемой. Если принять такое допущение, то свойства этого клубка можно приравнять к свойствам твердой частицы и с помощью формулы (51) найти ее характеристическую вязкость, подставив в уравнение $V = \frac{\pi}{24} (\bar{H})^3$ – объем

эллипсоида, аппроксимирующего макромолекулу, \bar{H} – длина главной оси эллипсоида:

$$b\left(\frac{a_1}{a_2}\right) = b(2) = 2,91 \quad (52).$$

Итак, характеристическая вязкость рассматриваемой полимерной молекулы будет равняться:

$$[\eta] = 0,38N_A \frac{(\bar{H})^3}{M} \quad (53).$$

Величина \bar{H} связана с молекулярной массой M полимера зависимостью $\bar{H} \sim M^{1/2}$. Подставив это соотношение в уравнение (53) получим:

$$[\eta] = K \frac{M^{3/2}}{M} = KM^{1/2} \quad (54),$$

где K – некоторый постоянный коэффициент. Мы пришли к выводу, что характеристическая вязкость полимерной молекулы напрямую зависит от ее молекулярной массы.

В общем виде уравнение (54) можно записать:

$$[\eta] = KM^a \quad (55).$$

Также характеристическую вязкость можно представить графически с помощью функции:

$$\ln[\eta] = \ln K + \ln M \quad (56),$$

где a – показатель, принимающий различные значения (как правило, от 0 до 1,8) в зависимости от формы и протеканности молекулы полимера, от степени ее набухания.

Уравнение (56) дает возможность построения прямой в координатах $\ln M - \ln [\eta]$. Если использовать стандартные растворы с известной характеристической вязкостью и молекулярными массами, подставить эти значения в функцию (56), можно построить градуировочный график, по которому мы с легкостью можем найти неизвестную молекулярную массу полимера, измерив его характеристическую вязкость [52, с. 227–229].

Практическая реализация и применение вискозиметрии

Вязкость веществ, имеющих сложное молекулярное строение, измеряют посредством *вискозиметров*. В зависимости от принципа действия эти устройства разделяют на два типа: капиллярные и ротационные.

Капиллярные вискозиметры относительно просто устроены и работают они на законе Пуазейля, согласно которому можно найти объем жидкости $V_{\text{ж}}$, прошедший через капилляр в единицу времени:

$$V_{\text{ж}} = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8 \eta l} \quad (57),$$

где r – радиус капилляра, Δp – разность давлений в жидкости на концах капилляра, l – его длина.

На таком принципе построен вискозиметр Оствальда, схематично отображенный на рис. 20. Жидкость в нем протекает по капилляру 1 из резервуара-шарика 2 в приемный резервуар 3. Разность давлений создается слоем жидкости находящимся в капилляре. В ходе исследования измеряют время τ истечения жидкости из шарика, объем V_0 которого известен. Выходит простое соотношение:

$$\tau = \frac{V_0}{V_{\text{ж}}} = \frac{8V_0}{\pi r^4 g_0 \rho} \eta \quad (58),$$

так как $\Delta p = \rho l g_0$, где ρ – плотность жидкости, g_0 – ускорение силы тяжести. Плотность исследуемого раствора при малых концентрациях практически не отличается от плотности растворителя, поэтому отношение времени истечения раствора к времени истечения растворителя равно относительной вязкости, которая и измеряется на капиллярном приборе [52, с. 231–232].

Вискозиметр Оствальда и другие аналоги капиллярных устройств (например, вискозиметры Эйтнера, Уббелюде и др.) не лишены недостатков, которые связаны со многими погрешностями, ве-

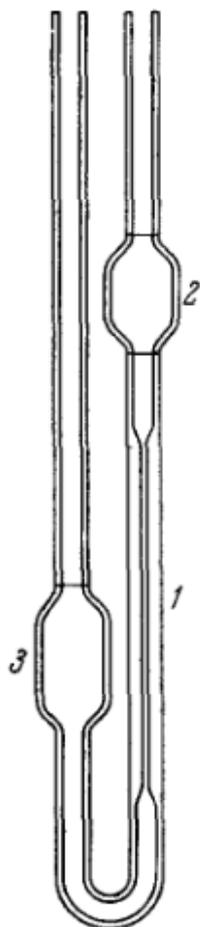


Рис. 20. Вискозиметр Оствальда [52, с. 232]

роятность допущения которых достаточно велика. Часто возникают ошибки при отсчете времени начала измерений и конца истечения раствора. Наличие частиц пыли в растворе, нестрого вертикальное расположение вискозиметра в ходе исследований и другие факторы также могут влиять на точность измерений. Минимальный градиент скорости, получаемый при помощи капиллярных вискозиметров – единицы с^{-1} . Зачастую, этого недостаточно для изучения строения многих полимеров, в частности ДНК.

Этих недостатков частично или полностью лишены *ротационные* вискозиметры. Чаще всего они представляют собой цилиндры или конусы, в зазор между которыми помещается исследуемая жидкость. Один из цилиндров постоянно вращается, а другой, увлекаемый в движение током жидкости, поворачивается на несколько градусов, либо закручивая упругую нить подвеса (вискозиметр Куэтта), либо сдвигая пластины электростатической системы (Эйзенберга). Таким образом, измеряется противодействующий момент при данной скорости ведущего цилиндра, который пропорционален вязкости исследуемой жидкости. На рисунке 21 изображен ротационный вискозиметр Зимма, построенный как раз на принципе, рассматриваемом выше. В основе прибора лежат 2 цилиндра, один из которых приводится в движение посредством встроенного в него железного диска и внешнего вращающегося магнита. Второй цилиндр свободно плавает в исследуемой жидкости, заполня-

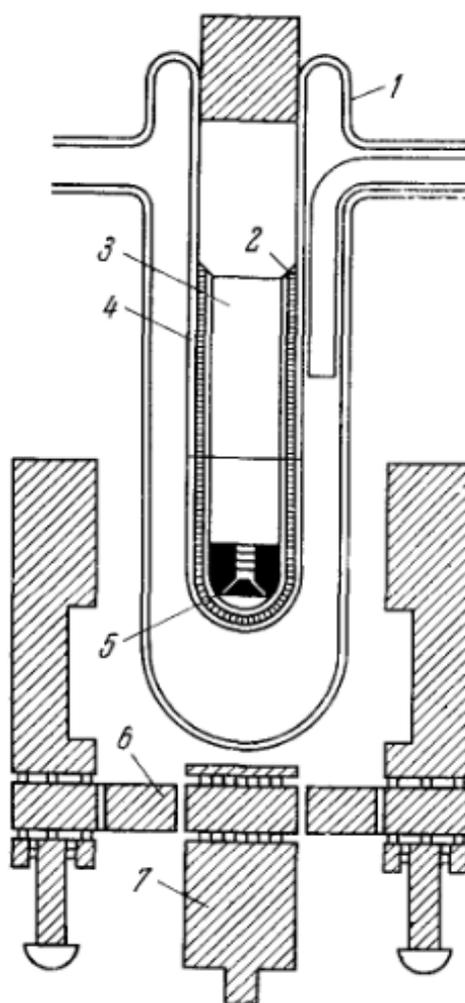


Рис. 21. Вискозиметр Зимма [52, с. 234]:

- 1 – термостатируемая рубашка;
- 2 – мениск; 3 – подвижный цилиндр; 4 – неподвижный цилиндр;
- 5 – железный диск в наполнителе;
- 6 – магнит; 7 – ось двигателя магнитной мешалки

ющей зазор между цилиндрами. При этом верхний край подвижного цилиндра отшлифован и совпадает с мениском, чем обеспечивается автоматическое центрирование цилиндра при вращении. Скорость вращения внутреннего цилиндра при данной скорости ведущего магнита обратно пропорциональна вязкости жидкости, помещенной в зазор между цилиндрами. С помощью ротационных вискозиметров можно получать очень малые постоянные градиенты скорости, вплоть до $0,01 \text{ с}^{-1}$, что делает их незаменимыми при исследовании структур полимерных молекул, например, белков или нуклеиновых кислот.

И ротационные и капиллярные вискозиметры позволяют непосредственно измерять только относительную вязкость по величине отношения времени истечения, угла поворота или скорости вращения для исследуемого раствора к таковым для растворителя. Для абсолютных измерений вязкости каждый вискозиметр обычно градуируется при помощи набора жидкостей с известными абсолютными значениями вязкости, охватывающими необходимый диапазон. Таким набором могут служить, например, чистая вода при различных температурах или водные растворы глицерина.

Однако очень важным условием вискозиметрических исследований является необходимость термостатирования как вискозиметра, так и исследуемых растворов. Несоблюдение данного условия приведет к появлению погрешностей в измерениях, вследствие того, что вязкость большинства жидкостей зависит от их температуры [52, с. 231–234].

Как упоминалось ранее, вискозиметрия хорошо себя зарекомендовала в биологических исследованиях, а именно в вопросах изучения формы, размеров, жесткости, структурных и конформационных характеристик сложных полимерных молекул, главным образом биологического происхождения. Этот метод может применяться для решения следующих прикладных задач: определение общей формы белков, обнаружение внутрицепочечных дисульфидных мостиков в белках, определение соотношения кольцевой и линейной форм в молекулах ДНК и др. [54, с. 373–375]. Кроме того, эти устройства нашли свое применение в медицине (исследование вязкости крови), в фармацевтике, в металлургии, в нефтяной и химической промышленности и др. отраслях производства и науки.

Контрольные вопросы

1. Какие характеристики вещества определяют вискозиметрическими методами анализа?
2. Как находят удельную вязкость раствора?
3. Как найти характеристическую вязкость раствора? В чем особенность формул, предложенных Эйнштейном и Симха?
4. От чего зависит характеристическая вязкость полимерной молекулы?
5. Каким образом строится градуировочный график для графического определения молекулярной массы сложных полимерных веществ?
6. Дайте характеристику капиллярным вискозиметрам. Назовите их достоинства и недостатки.
7. В чем преимущества ротационных вискозиметров? Как они устроены?
8. В каких областях науки и производства наиболее широко применяются вискозиметрические методы?

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 таблице 3 приведена классификация электрохимических методов анализа по природе измеряемого параметра.

Таблица 3

Классификация электрохимических методов анализа [43, с. 134]

Аналитический сигнал	Условия измерения	Метод
ЭДС гальванического элемента E (потенциал электрода φ), 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 κ , 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

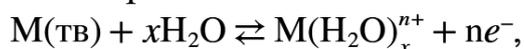
Теоретические основы потенциометрии

Потенциометрия (от лат. *potentia* – «сила» и греч. μέτρον – «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 [10, 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)¹. В зависимости от природы металла перенос ионов может проис-

¹ *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) [32, 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 [13, 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 [36, 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 φ . Символами red и 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:

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}] \gamma_{\text{ox}}}{[\text{red}] \gamma_{\text{red}}} \quad (59),$$

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

ратура, К; F – постоянная Фарадея¹, равная 96485 Кл/моль, n – число электронов, принимающих участие в электродной реакции, a_{ox} , a_{red} – активности окисленной и восстановленной форм, моль/л; $[\text{ox}]$, $[\text{red}]$ – их равновесные молярные концентрации, моль/л; γ_{ox} , γ_{red} – коэффициенты активности.

Если в уравнение (59) 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:

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{0,059}{n} \lg a^{\text{M}^{n+}} = \varphi^0 + \frac{0,059}{n} \lg [\text{M}^{n+}] \gamma^{\text{M}^{n+}} \quad (60).$$

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

Физический смысл величины φ^0 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 (60) принимает вид: $\varphi = \varphi^0$. 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):

$$E = (\varphi_1 - \varphi_2) + \Delta\varphi_{\text{диф}} \quad (61).$$

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

¹ 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 [36, 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

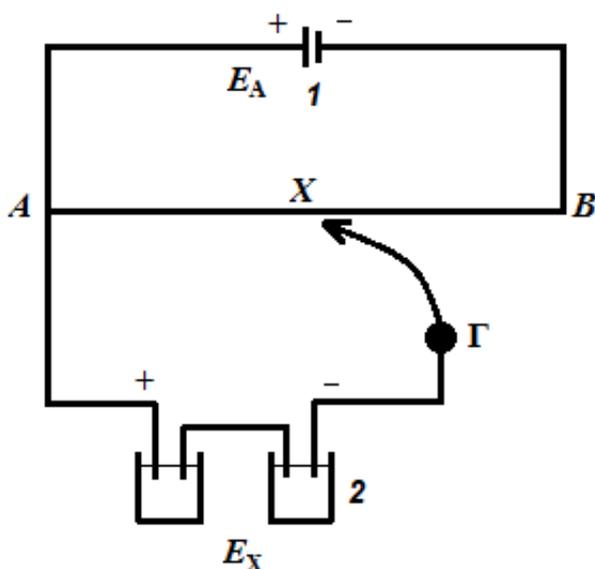


Рис. 18. Компенсационная схема измерения ЭДС [13, с. 288]

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 [43, 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 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

$$E_X = E_A \cdot AX/AB \quad (62).$$

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

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:

$$\varphi_{2H^+/H_2} = \varphi^{\circ}_{2H^+/H_2} + 0,059 \lg[H^+] \quad (63).$$

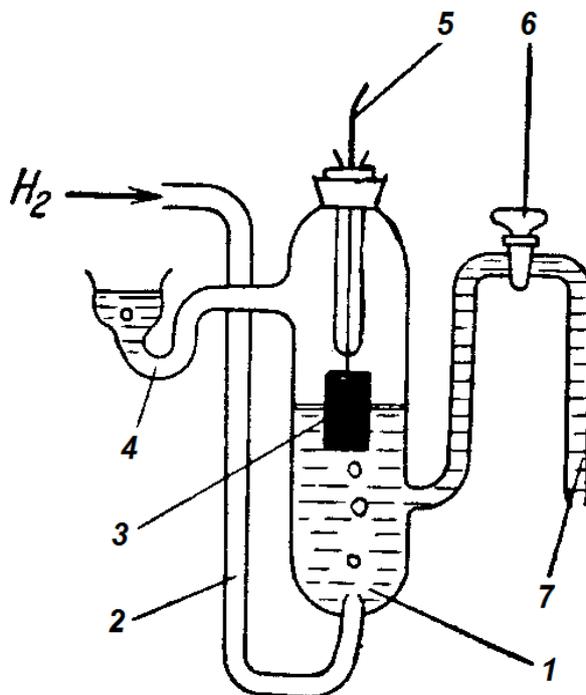


Рис. 19. Стандартный водородный электрод [6, с. 188]:

- 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

Стандартный потенциал водородного электрода $\varphi^{\circ}_{2\text{H}^+/\text{H}_2}$ при давлении $1,013 \cdot 10^5$ Па (1 атм) и любых температурах принят равным нулю. Тогда потенциал водородного электрода:

$$\varphi_{2\text{H}^+/\text{H}_2} = 0,0591 \lg[\text{H}^+] = -0,059 \text{pH} \quad (64).$$

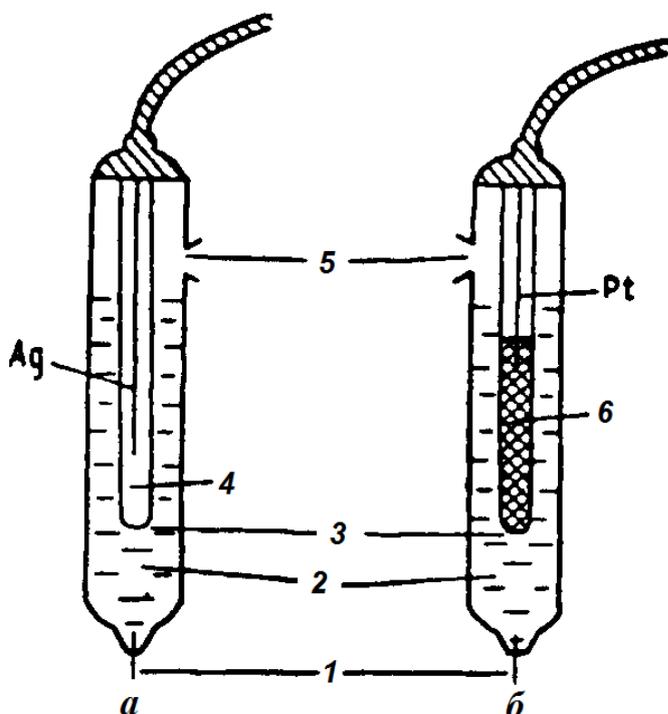


Рис. 20. Хлорсеребряный (а) и каломельный (б) электроды с двойным солевым мостиком [43, с. 126]:

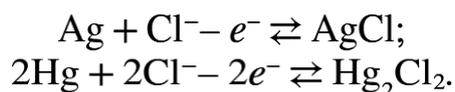
- 1 – асбестовое волокно, обеспечивающее контакт с анализируемым раствором,
- 2 – внешний раствор КСl, 3 – отверстие для контакта, 4 – внутренний раствор КСl,
- 5 – отверстие для ввода раствора КСl,
- 6 – паста из смеси Hg_2Cl_2 , Hg и КСl

единения 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 AgCl и опущенная в насыщенный раствор хлорида калия КСl, и *каломельный электрод*, в котором паста из металлической ртути и каломели Hg_2Cl_2 контактирует с раствором КСl (рис. 20). Между твердой фазой и раствором возникают равновесия:

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

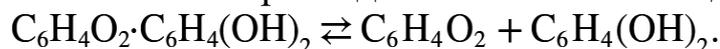
К *электродам первого рода* относятся металлические электроды M^{n+}/M , часто к ним относят и водородный электрод $2\text{H}^+/\text{H}_2$ (черта символизирует поверхность раздела фаз). Общим для них является то, что в равновесии на электроде участвуют нейтральные атомы (или молекулы) и один вид катионов.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

Электроды второго рода состоят из трех фаз: металла, покрытого слоем труднорастворимого со-

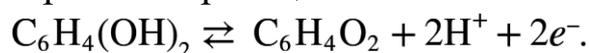


В отличие от электродов первого рода здесь в равновесиях участвуют анионы, т. е. электроды второго рода обратимы относительно анионов. Величина потенциала этих электродов зависит от концентрации анионов. В лабораторной практике их обычно используют в качестве *электродов сравнения* вместо водородного 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°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 [43, 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°C выражается уравнением

$$\varphi = \varphi_{\text{хг}}^0 + \frac{0,059}{2} \lg \frac{[\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2][\text{H}^+]^2}{[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2]} \quad (65).$$

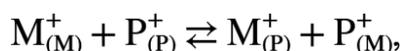
В кислых растворах степень диссоциации гидрохинона очень мала, поэтому практически концентрации хинона и гидрохинона можно считать равными и потенциал хингидронного электрода можно представить:

$$\varphi = \varphi_{\text{хг}}^0 + \frac{0,059}{2} \lg[\text{H}^+]^2 = \varphi_{\text{хг}}^0 - 0,059\text{pH} \quad (66).$$

Стандартный потенциал хингидронного электрода $\varphi_{\text{хг}}^0$ при 25°C равен 0,699 В. Электрод нельзя применять при $\text{pH} > 9$, а также в присутствии окислителей и восстановителей, реагирующих с хиноном и гидрохиноном [46, 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* [36, 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 $K'_{\text{A/B}}$ характеризует «отклик» электрода на определяемый ион ($\text{A}^{n\text{i}}$) в присутствии мешающего иона ($\text{B}^{m\text{i}}$): чем меньше величина коэффициента $K'_{\text{A/B}}$, 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 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 сенсбилизированные 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 проволоочка. 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 Na^+ с его поверхности. Образовавшиеся пустоты в Si–O каркасе на поверхности заняты ионами H^+ . При движении внутрь мембраны число пустот, заполненных ионами H^+ , уменьшается, а число пустот, заполненных ионами Na^+ , увеличивается. В объеме сухого стекла заряд переносится ионами Na^+ [43, 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

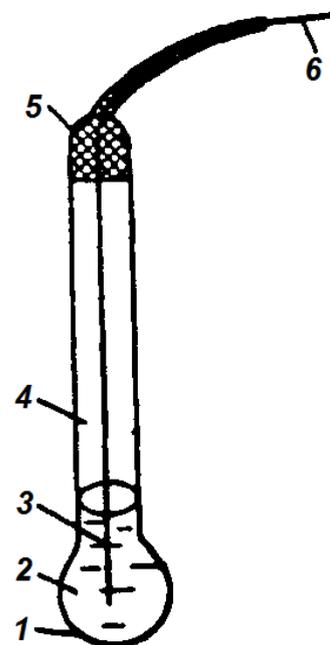


Рис. 21. Стеклянный электрод [43, с. 139]:

- 1 – стеклянная рН-чувствительная мембрана, 2 – 0,1 М раствор HCl, насыщенный AgCl,
- 3 – серебряная проволоочка, 4 – стеклянная трубка, 5 – изоляция,
- 6 – токоотвод

ионов H^+ во внутреннем и внешнем растворе. Потенциал стеклянного электрода можно описать уравнением

$$\varphi = \varphi^{\circ}_{\text{стекл}} - 0,059pH \quad (67).$$

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

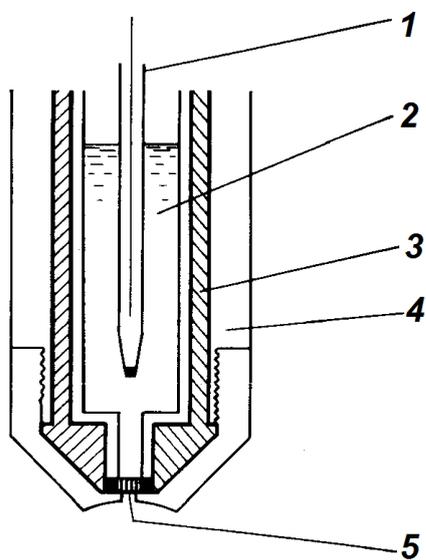


Рис. 22. Ионоселективный электрод с жидкой мембраной [36, с. 112]:

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

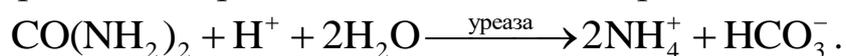
Электроды с подвижными носителями (рис. 22) имеют жидкие мембраны – удерживаемый на пористом полимере раствор ионита или незаряженного носителя ионов в органическом растворителе, который не смешивается с водой и обладает высокой диэлектрической проницаемостью, способствующей ассоциации ионов в фазе мембраны. 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

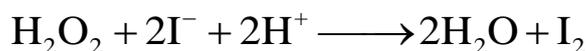
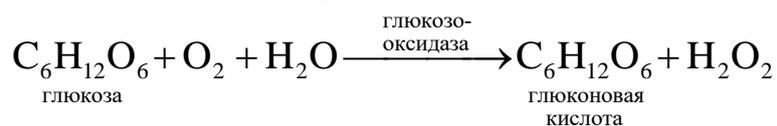
$C_6H_5PO(O_8H_{17})_2$. Жидкостные мембраны с нейтральными носителями содержат растворимые макроциклические соединения, образующие с

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 [27, с. 221]. Он дает комплексы с ионами щелочных металлов и поэтому был выбран для калийселективных электродов. Размер внутренней полости циклической молекулы валиномицина (2,7–3,3 Å) соответствует диаметру иона калия (~2,7 Å), что обуславливает очень высокую селективность электрода, позволяющего обнаружить ионы калия в присутствии 10^4 -кратного количества натрия [43, с. 143].

Среди *сенситивизированных электродов* представляют интерес обладающие очень высокой селективностью *ферментные электроды*. 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. [27, с. 222].

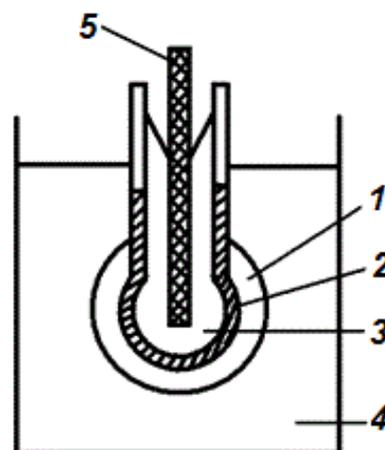


Рис. 23. Электрод для определения мочевины [43, с. 145]:

- 1 – гель, содержащий уреазу, 2 – стеклянная мембрана, селективная к ионам NH_4^+ , 3 – стандартный раствор NH_4^+ , 4 – субстрат, 5 – внутренний электрод сравнения

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

$$c_x = c_{ст} \frac{V_{ст}}{V_x + V_{ст}} \left(10^{\frac{E_2 - E_1}{0,059}} - \frac{V_x}{V_x + V_{ст}} \right)^{-1} \quad (68).$$

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 [43, 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 [43, 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 не-

большими 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 монотонное 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.

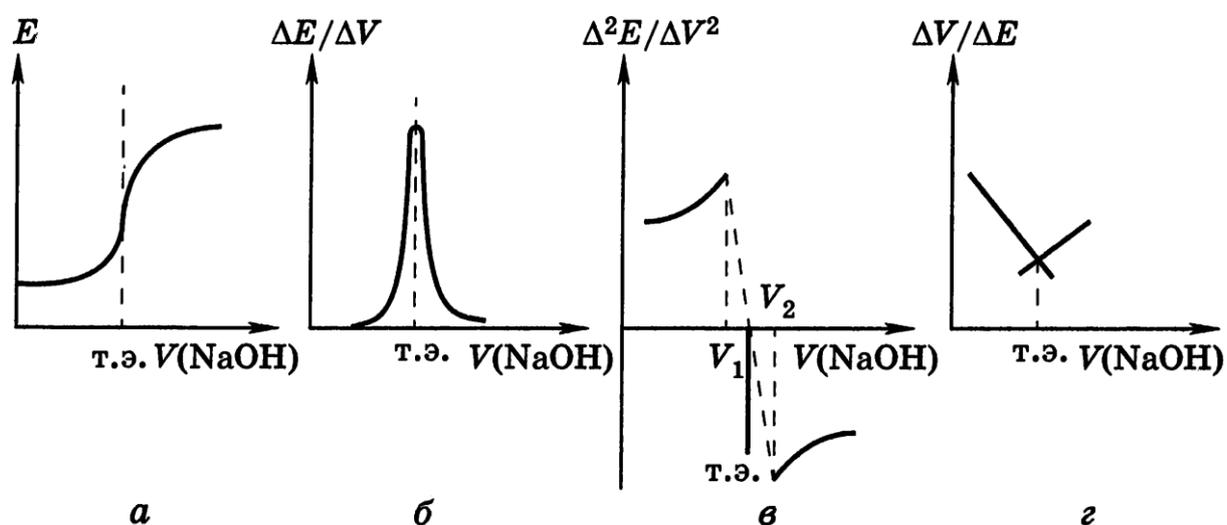


Рис. 24. Кривые потенциометрического титрования [10, с. 202]:
а – обычная кривая, *б* – дифференциальная кривая, *в* – кривая титрования по второй производной, *г* – кривая Грана

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) [10, с. 203].

Преимущества потенциометрического 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 [10, с. 210–211].

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 рН 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.

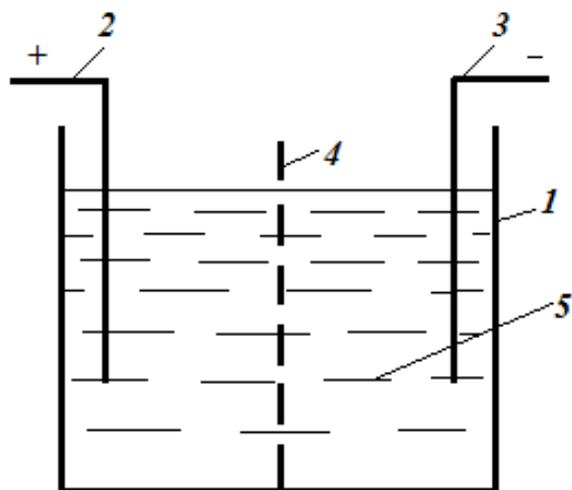


Рис. 26. Электролизер [6, с. 169]:
1 – корпус, 2 – анод, 3 – катод,
4 – диафрагма, 5 – электролит

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 элект-

тродах, 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. 4.

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 (59) $\varphi_{2H^+/H_2} = -0,059 \cdot 7 = -0,413$ В, т. е. на катоде могут выделяться такие

Ряд стандартных электродных потенциалов металлов [6, с. 183–184]

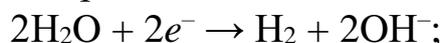
Металл	Катион	$\varphi^0, \text{В}$	Процесс на катоде	
Li	Li ⁺	-3,04	выделение водорода	
Cs	Cs ⁺	-3,03		
Rb	Rb ⁺	-2,98		
K	K ⁺	-2,93		
Ba	Ba ²⁺	-2,91		
Sr	Sr ²⁺	-2,90		
Ca	Ca ²⁺	-2,87		
Na	Na ⁺	-2,71		
Mg	Mg ²⁺	-2,37		
Be	Be ²⁺	-1,85		
U	U ³⁺	-1,80		
Al	Al ³⁺	-1,70		
Ti	Ti ²⁺	-1,63		конкурирующие реакции выделения водорода и металла
Zr	Zr ⁴⁺	-1,53		
Mn	Mn ²⁺	-1,18		
Zn	Zn ²⁺	-0,76		
Cr	Cr ³⁺	-0,74		
Fe	Fe ²⁺	-0,44		
Cd	Cd ²⁺	-0,40		
Co	Co ²⁺	-0,28		
Ni	Ni ²⁺	-0,23		
Mo	Mo ³⁺	-0,20		
Sn	Sn ²⁺	-0,14		
Pb	Pb ²⁺	-0,13		
H₂	H⁺	0,00		
Ge	Ge ⁴⁺	+0,12	выделение металла	
Bi	Bi ³⁺	+0,32		
Cu	Cu ²⁺	+0,34		
Ag	Ag ⁺	+0,80		
Hg	Hg ²⁺	+0,85		
Pt	Pt ²⁺	+0,96		
Pd	Pd ²⁺	+0,98		
Au	Au ⁺	+1,69		

металлы, как свинец, олово, никель. Во-вторых, выделение водорода на катоде, как правило, происходит при 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^{+} до Al^{3+} 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;

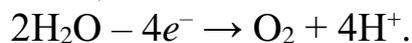
4) при электролизе растворов сильных кислот возможно восстановление катионов водорода:



Если в системе присутствуют катионы нескольких металлов, то порядок их восстановления таков: чем положительнее потенциал $\varphi_{M^{n+}/M}$, т. е. чем менее активен металл, тем он легче восстанавливается. Таким образом, если одновременно в системе находятся ионы Cu^{2+} и Ag^{+} , то вначале на катоде будет выделяться серебро, а затем – медь [13, 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 HF и фторидов)

анионы Γ^- ($\varphi^0 = +0,54 \text{ В}$), Br^- ($\varphi^0 = +1,07 \text{ В}$), Cl^- ($\varphi^0 = +1,36 \text{ В}$) сравнительно легко окисляются и выделяются в виде I_2 , Br_2 , Cl_2 , а легче всех окисляется ион Γ^- . В случае, если растворы содержат анионы кислотосодержащих кислот (SO_4^{2-} , NO_3^-), то на аноде будут окисляться молекулы воды ($\varphi^0 = +1,23 \text{ В}$):



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

$$Q = It \quad (69),$$

где I – сила тока, А; t – 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:

$$F = \frac{QM}{mn} \quad (70),$$

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 Ag^+ и получится 1 моль атомов серебра. При электролизе раствора хлорида меди (II) для вос-

становления 1 моль ионов 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 Br_2 [13, 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* η – отношение массы практически выделившегося вещества $m_{\text{пр}}$ к массе, рассчитанной по закону Фарадея, $m_{\text{теор}}$:

$$\eta = \frac{m_{\text{пр}}}{m_{\text{теор}}} \cdot 100\% \quad (71).$$

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 [43, 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 разветки внешнего напряжения микроэлектрод легко поляризуется, а

потенциал электрода сравнения остается практически постоянным [43, 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 [6, 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. 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 восстанав-

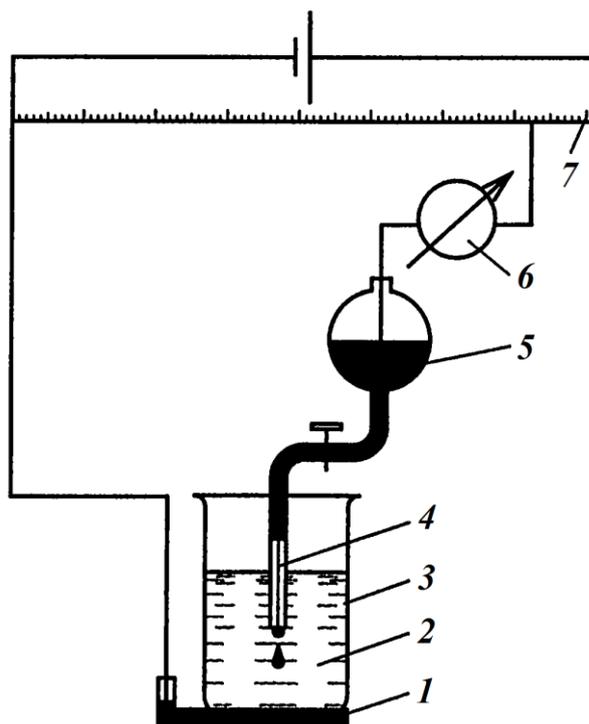


Рис. 27. Схема полярографической установки [10, с. 217]:
1 – донная ртуть (ртутный анод),
2 – анализируемый раствор,
3 – электролизер, 4 – ртутный капающий электрод, 5 – резервуар ртути,
6 – гальванометр, 7 – реохорд или делитель напряжения

ливаться 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)*.

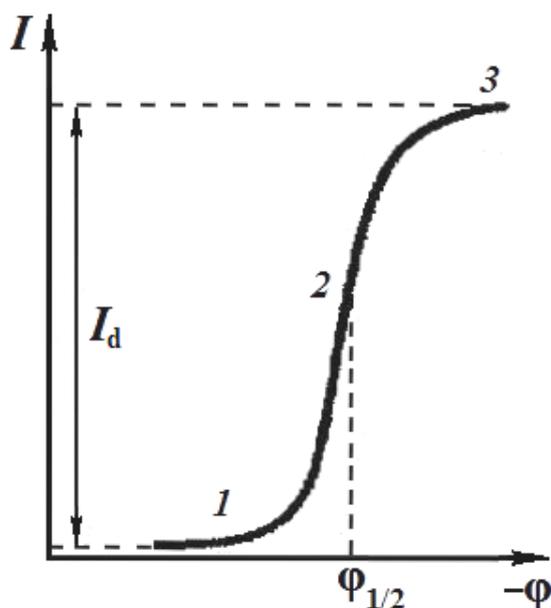


Рис. 28. Полярограмма [13, с. 319]:

1 – остаточный ток, 2 – полярографическая волна (фарадеевский ток), 3 – предельный ток,

I_d – диффузионный ток (разность между предельным и остаточным токами),

$\phi_{1/2}$ – потенциал полуволны

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 каплюющем 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 [13, 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*:

$$I_d = 607nD^{1/2}m^{2/3}\tau^{1/6}c \quad (72),$$

где I_d – сила диффузионного тока, мкА; n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции; D – коэффициент диффузии, см²/с; m – масса ртути, мг, вытекающей из капилляра за 1 с; τ – время жизни капли (период капания), с; c – концентрация иона, моль/л.

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

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{M^{n+}} \gamma_{M^{n+}}}{c_a \gamma_a} \quad (73),$$

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

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

$$I = k_M (c_{M^{n+}}^0 - c_{M^{n+}}) \quad (74),$$

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

$$I_d = k_M c_{M^{n+}}^0 \quad (75).$$

При сочетании уравнений (74) и (75) получим

$$I = I_d - k_M c_{M^{n+}} \quad \text{или} \quad c_{M^{n+}} = \frac{I_d - I}{k_M} \quad (76).$$

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

$$c_a = \frac{I}{k_a} \quad (77),$$

Соотношения (76) и (77) подставляем в уравнение (73):

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(I_d - I) \gamma_{M^{n+}} k_a}{k_M I \gamma_a} \quad (78).$$

Выделим величины и коэффициенты, которые остаются постоянными или зависят только от температуры (φ^0 , k_M , k_a , γ_a , $\gamma_{M^{n+}}$) и запишем уравнение (78) в виде

$$\varphi = \varphi^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{M^{n+}} k_a}{k_M \gamma_a} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I} \quad (79),$$

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

$$\varphi = \varphi_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I} \quad (80).$$

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 по-

лярограмме, 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 каплюющем электроде на хлоридном фоне равны:

$$\varphi_{1/2}(\text{Pb}^{2+}) = -0,41 \text{ В},$$

$$\varphi_{1/2}(\text{Cd}^{2+}) = -0,60 \text{ В},$$

$$\varphi_{1/2}(\text{Zn}^{2+}) = -1,02 \text{ В}.$$

В тот момент, когда потенциал катода приблизится к $-0,4 \text{ В}$, на полярограмме появится первая волна, отвечающая восстановлению ионов Pb^{2+} . Высота этой волны будет пропорциональна концентрации ионов 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 Cd^{2+} . Наконец, при потенциале $-1,0 \text{ В}$ будет наблюдаться третья волна, обусловленная восстановлением ионов Zn^{2+} [13, 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 пропорциональна 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 $0,06 \text{ В}$. На интегральной кривой оба иона обра-

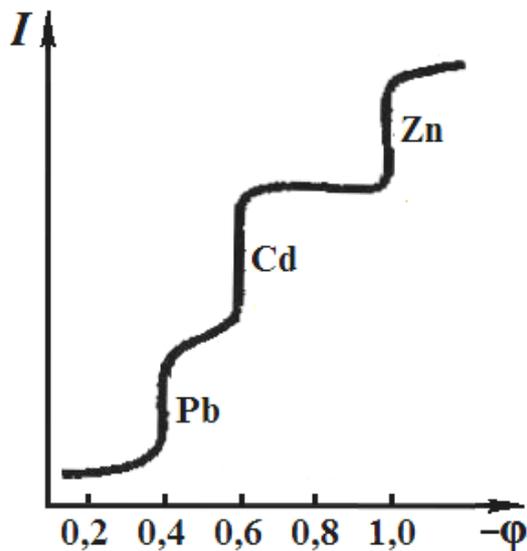


Рис. 29. Полярограмма при наличии в растворе ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} [13, с. 319]

зуют одну общую волну (рис. 30, а), а на дифференциальной четко видны два максимума (рис. 30, б).

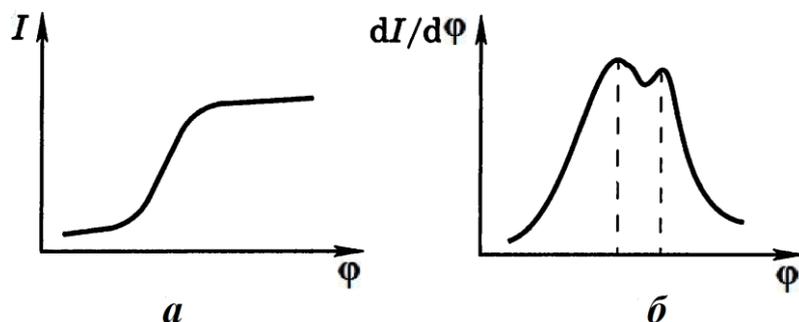


Рис. 30. Полярограммы раствора, содержащего $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Tl}(\text{NO}_3)_2$ [10, с. 222]

нальной ей высоте 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:

$$\frac{c_{\text{ст}}}{c_x} = \frac{h_{\text{ст}}}{h_x}, \text{ откуда } c_x = c_{\text{ст}} \frac{h_x}{h_{\text{ст}}} \quad (81),$$

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

$$c_x = c_{\text{ст}} \frac{I_x}{I_{x+\text{ст}} - I_x} \quad (82).$$

Ртутный капающий электрод характеризуется почти идеальной поляризуемостью в широком интервале потенциалов, обусловленной высоким перенапряжением выделения водорода на поверхности ртутной капли, и строгим чередованием зарождения, роста и отрыва капель, что обеспечивает хорошую воспроизводимость полярограмм.

Таким образом, полярографический метод позволяет производить качественный (по величинам потенциалов полуволны $\phi_{1/2}$) и количественный (по величине $I_{\text{пр}}$ или пропорциональной ей высоте полярографической волны h) анализ большой группы растворенных веществ, которые восстанавливаются в рабочей области потенциала ртутного капающего электрода.

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 [43, 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 [5, 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.

Переменнотоковая 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 [5, 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 [5, 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. [27, 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 данно-

му 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 вольтамперметрия, 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

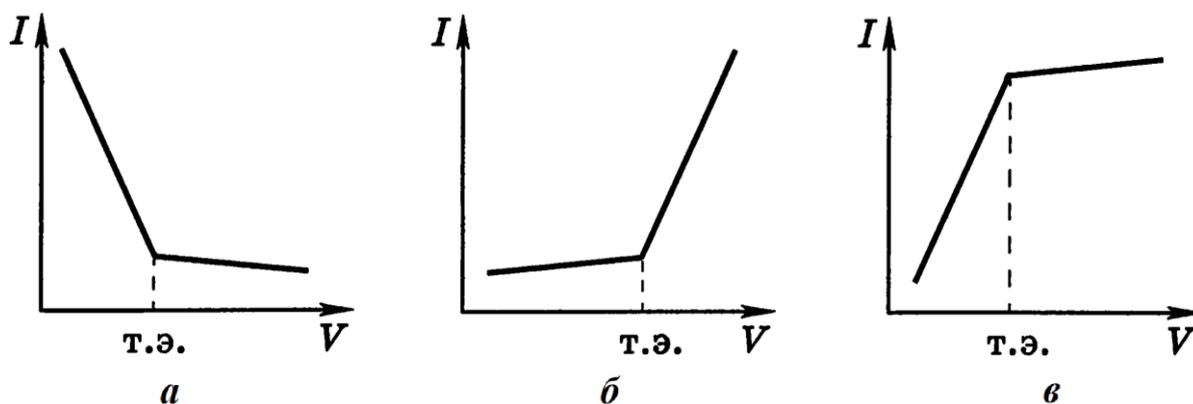


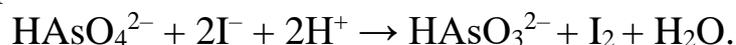
Рис. 31. Кривые амперометрического титрования для случаев, когда электроактивно определяемое вещество (*а*), титрант (*б*) и продукт реакции (*в*) [10, с. 225]

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 Ag^+ в растворе перед титрованием максимальна. По мере титрования ионы 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 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 Cl^- и сила тока резко возрастет (рис. 31, б).

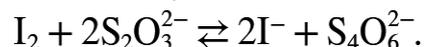
Рис. 31, в, соответствует случаю, когда в качестве электроактивного вещества выступает продукт реакции. В качестве примера можно привести титрование мышьяковой кислоты иодидом калия:



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

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 $2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} - 2e^- \rightleftharpoons \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ устанавливается медленно и эту систему можно считать необратимой [32,

с. 431–432]. До точки эквивалентности протекает ток, отвечающий окислению восстановленной формы на аноде ($2\Gamma - 2e^- \rightarrow I_2$) и одновременному 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.

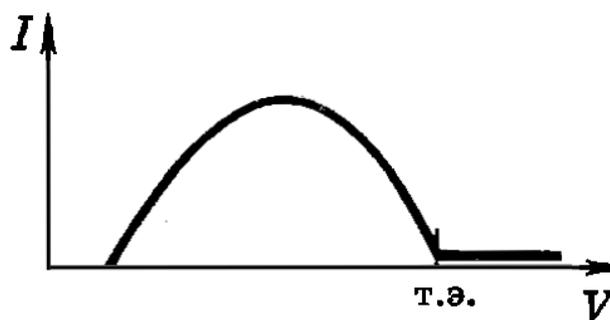


Рис. 32. Кривая амперометрического титрования с двумя индикаторными электродами для случая титрования обратимой системы необратимой [10, с. 228]

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) [10, 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 [6, 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 постоянном 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 по-

верхностной 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 целевого типа с близким (десятки микрометров) расположением электродов [5, с. 388].

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

$$I_{\tau} = I_0 \cdot e^{-k\tau} = I_0 \cdot 10^{-k'\tau}, \quad k = 2,303k' \quad (83),$$

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

Уравнение (83) может быть использовано для определения общего количества электричества Q , необходимого для электрохимического превращения исследуемого вещества, поскольку

$$Q = \int_0^{\infty} I_{\tau} d\tau \quad (84).$$

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.

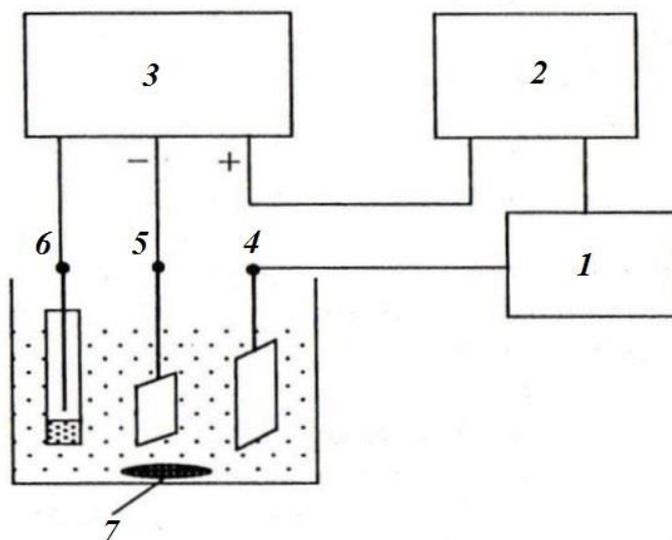


Рис. 33. Установка для потенциостатической кулонометрии [10, с. 239]:

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

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.

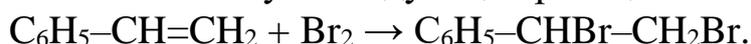
Кулонометрическое титрование основано на электролитическом генерировании титранта, реагирующего с определяемым веществом. Для этого в исследуемый раствор вносят вспомогательный реагент, продукт электролиза которого (промежуточный реагент) должен быстро и количественно взаимодействовать с определяемым 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 (69), 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 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, миллиамперметр 3 для измерения тока, электролизер 4, состоящий из катодной и анодной камер, в которые помещаются генераторный 5 и вспомогательный 6 электроды. В индикационный блок входят индикаторные электроды 8.

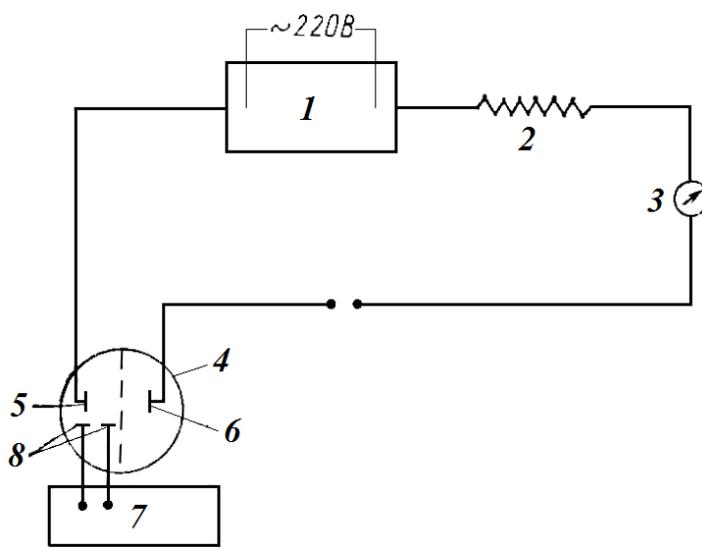


Рис. 34. Установка кулонометрического титрования при постоянной силе тока [10, с. 242]:

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

ный 6 электроды. Вспомогательный электрод погружен в стеклянную трубку, заполненную раствором индифферентного электролита, т. к. продукт реакций на вспомогательном электроде может помешать 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 Ag(III), 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 [43, 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 вольтамперометрических 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 действием 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:

$$E = IR = I \frac{\rho l}{S} \quad (85),$$

где E – разность потенциалов между электродами, В; I – сила тока, А; R – сопротивление, Ом; ρ – удельное сопротивление, Ом·см; l – расстояние между электродами (длина проводника второго рода – электролита), см; S – сечение (площадь поверхности), см².

Электрическая проводимость – величина, обратная сопротивлению, ее единицей измерения является сименс (1 См = 1 Ом⁻¹):

$$L = \frac{1}{R} \quad (86),$$

Величина, обратная удельному сопротивлению, называется *удельной электрической проводимостью*. Она обозначается через κ , ее размерность соответственно Ом⁻¹·см⁻¹ или См·см⁻¹:

$$\kappa = \frac{1}{R} \quad (87).$$

Впервые измерение электропроводности ряда растворов 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 [27, с. 193–194].

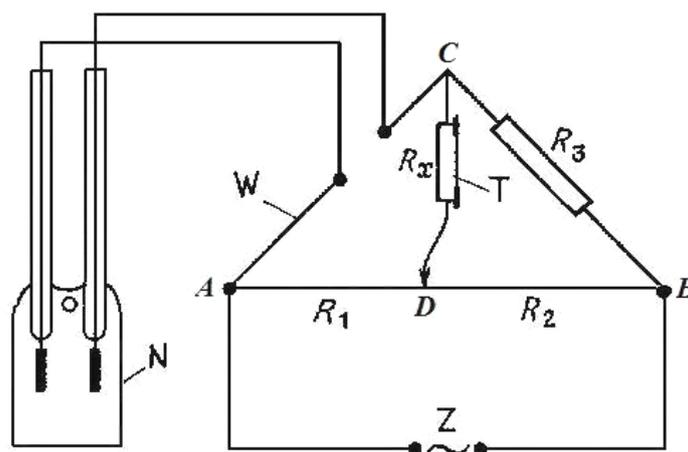


Рис. 35. Устройство для измерения электропроводности электролитов [27, с. 193]: *N* – кондуктометрическая ячейка, *W* – мостик Уитстона с соответствующими сопротивлениями R_x , R_3 , R_2 и R_1 , *T* – телефонная трубка, *Z* – источник переменного напряжения

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

$$R_x = R_3 \frac{R_1}{R_2} \quad (88).$$

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 исследу-

емый раствор. Если расстояние между электродами обозначить через l , а площадь поверхности электрода через S , то

$$L = \kappa \frac{S}{l}; \kappa = L \frac{l}{S} \quad (89).$$

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

$$\kappa = L \cdot K \quad (90).$$

Для экспериментального определения величины K необходимо измерить электрическую проводимость раствора с известной κ (обычно используют растворы хлорида калия). Из уравнения (89) следует, что *удельная электрическая проводимость* – это проводимость раствора, находящегося между параллельными электродами площадью 1 см^2 при расстоянии между ними 1 см .

Удельная электрическая проводимость раствора зависит от природы растворителя и растворенного вещества, концентрации и температуры. Как видно из рис. 36, удельная электрическая проводимость

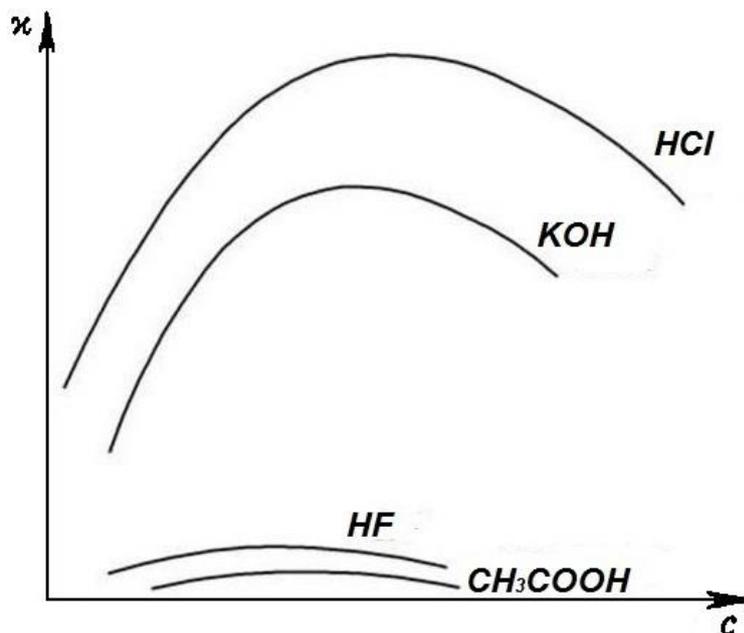


Рис. 36. Зависимость удельной электрической проводимости от концентрации [13, с. 270]

сильных электролитов значительно выше соответствующей величины 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):

$$\kappa_2 = \kappa_1 [1 + a (T_2 - T_1)] \quad (91),$$

где κ_2 и κ_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 [5, 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 λ , 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

$$\lambda = \kappa \frac{1000}{c} \quad (92),$$

где c – молярная концентрация электролита, деленная на сумму зарядов его катионов или анионов (например, 1 для NaCl , 2 для CaCl_2).

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

В растворах *сильных электролитов* концентрационная зависимость

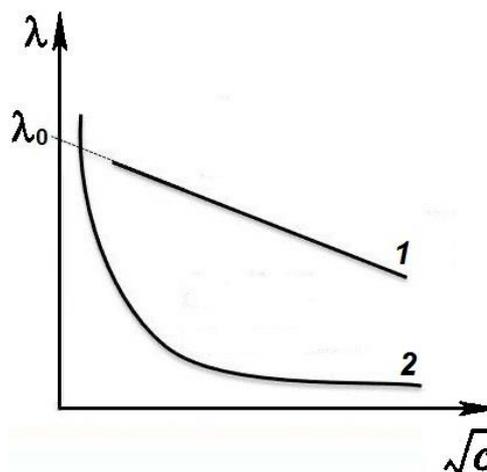


Рис. 37. Зависимость молярной электрической проводимости от концентрации для сильного (1) и слабого (2) электролитов [13, с. 272]

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 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:

$$\lambda = \lambda_0 + (A\lambda_0 + B)\sqrt{c} \quad (93),$$

где A – коэффициент, характеризующий электрофоретический эффект, а B – релаксационный (эти величины зависят от температуры, вязкости и диэлектрической проницаемости растворителя и вычисляются теоретически), λ_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 λ_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

$$\alpha = \frac{\lambda}{\lambda_0} \quad (94).$$

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

$$K = \frac{\alpha^2 c}{1 - \alpha} = \frac{\lambda^2 c}{\lambda_0(\lambda_0 - \lambda)} \quad (95).$$

По формулам (94) и (95) можно рассчитать степень и константу диссоциации слабого электролита, если известна его предельная молярная проводимость λ_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 λ_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:

$$\lambda_0 = \lambda_{0(+)} + \lambda_{0(-)} \quad (96),$$

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

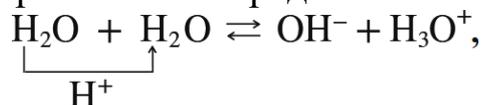
Подвижности катиона и аниона пропорциональны абсолютным скоростям их движения:

$$\lambda_{0(+)} = F \cdot v_+; \quad \lambda_{0(-)} = F \cdot v_- \quad (97),$$

где F – постоянная Фарадея.

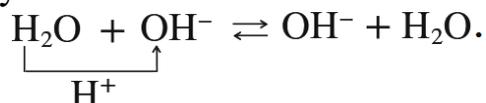
Подвижность каждого вида иона во всех растворах при бесконечном разбавлении в одном и том же растворителе при одной и той же температуре постоянна, поэтому по уравнению (96) можно рассчитать λ_0 для любого вещества.

Значения подвижностей ионов в водном растворе при 25°C находятся в пределах 30–70 См·см²/моль и лишь у ионов Н⁺ и ОН⁻ они существенно выше и составляют соответственно 349,8 и 197,6 См·см²/моль, что объясняют особым эстафетным механизмом их движения, сущность которого можно представить так:



т. е. процесс диссоциации воды сводится к переходу протона (Н⁺) от одной молекулы воды к другой. Образующиеся ионы гидроксония (Н₃О⁺) 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 [10, с. 163].

Аналогичным образом объясняется высокая подвижность ионов OH^- с той лишь разницей, что здесь протон перескакивает от молекулы воды к гидроксилу:



В органических растворителях, не содержащих ионов OH^- , подвижность H^+ примерно такая же, как и у других однозарядных ионов. Существенное влияние на электрическую проводимость неводных растворов оказывает диэлектрическая проницаемость растворителя.

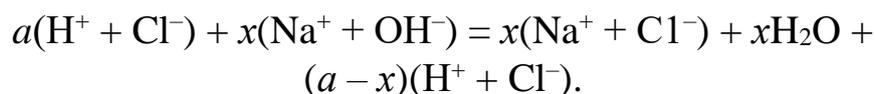
Практическая реализация и применение кондуктометрии

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 [5, 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 $x - V$ (титранта). Изменение электрической проводимости

сти 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 H^+ и OH^- значительно превышают подвижности других ионов, поэтому кондуктометрическое титрование наиболее целесообразно применять для кислотно-основного титрования, но также метод может 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 HCl . Его электропроводность определяется подвижностями ионов H^+ и Cl^- , равными при 25°C соответственно 349,8 и 76,3 $\text{Cm}\cdot\text{cm}^2/\text{моль}$. К этому раствору прибавляют порцию титранта, содержащего x моль/л NaOH . Если $x < a$, то произойдет частичная нейтрализация кислоты щелочью:



Неполная нейтрализация приведет к тому, что в титруемом растворе останется $(a - x)$ моль/л HCl и появится x моль/л NaCl в виде ионов $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$. Таким образом, часть водородных ионов заменится на менее подвижные ионы натрия ($\lambda_0 = 50,1 \text{ Cm}\cdot\text{cm}^2/\text{моль}$) 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 все ионы H^+ кислоты будут заменены ионами 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 OH^- с высокой подвижностью, равной 197,6 $\text{Cm}\cdot\text{cm}^2/\text{моль}$. 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 [4, с. 129–130].

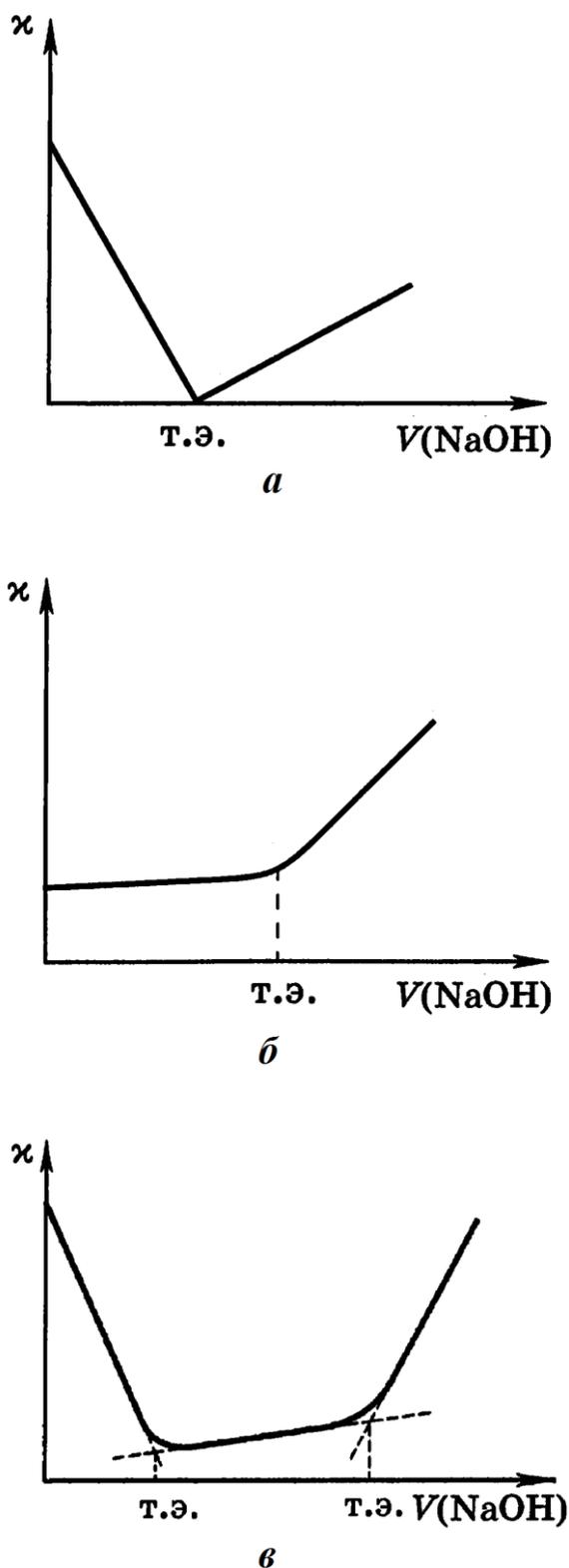


Рис. 38. Кривые кондуктометрического титрования [10, с. 170–172]:
a – сильной кислоты,
б – слабой кислоты,
в – смеси сильной и слабой кислот

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 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 образу-

щихся 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% [43, 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, помещает-

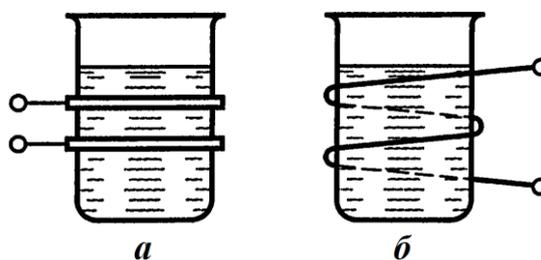


Рис. 39. Ячейки для высокочастотного кондуктометрического титрования [10, с. 175]:
a — конденсаторная,
б — индуктивная

ся 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 индуктивности, что фиксируется микроамперметром. В конденсаторных ячейках при титровании раствора вследствие изменения диэлектрической проницаемости происходит сдвиг рабочей частоты генератора, что устанавливается с помощью измерительного конденсатора [10, 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 [27, 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.

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.

Оптические методы анализа можно классифицировать в соответствии с областью электромагнитного излучения, используемого в ходе исследования. В табл. 5 указаны область спектра, диапазоны длин волн и методы, работающие в рамках данных конкретных характеристик электромагнитного излучения.

Таблица 5

Классификация оптических методов анализа в зависимости от спектральных характеристик электромагнитного излучения [2, с. 4–5]

Область спектра	Интервалы длин волн, м	Процессы, происходящие при поглощении или излучении	Методы
γ-излучение	$10^{-13} - 10^{-10}$	Ядерные реакции	Резонансная γ-спектроскопия (мёссбауэровская)
Рентгеновский диапазон волн	$10^{-10} - 10^{-8}$	Переходы внутренних электронов	Рентгеновская спектроскопия
УФ-диапазон	$1,8 - 4 \cdot 10^{-7}$	Переходы валентных электронов	Оптическая спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях
Видимый диапазон	$4 - 7,8 \cdot 10^{-7}$		
ИК-область	Ближняя: $7,8 \cdot 10^{-7} - 2,5 \cdot 10^{-6}$	Колебательные переходы молекул	Колебательная спектроскопия (инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния)
	Дальняя: $2,5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$		
Микроволновый диапазон	$5 \cdot 10^{-5} - 10^{-2}$	Вращательные переходы молекул	Микроволновая спектроскопия
Радиоволновой диапазон	$\sim 3 \cdot 10^{-2}$	Спиновые переходы ядер и электронов	Электронный парамагнитный резонанс
	0,6 – 10		Ядерный магнитный резонанс

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. МОЛЕКУЛЯРНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Теоретические основы фотометрии и спектрофотометрии

Фотометрия (от греч. φωτός – «свет» и μετρέω – «измеряю») – оптический метод анализа, основанный на поглощении электромагнитного излучения (света) молекулами анализируемого вещества 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 $I < I_0$.

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

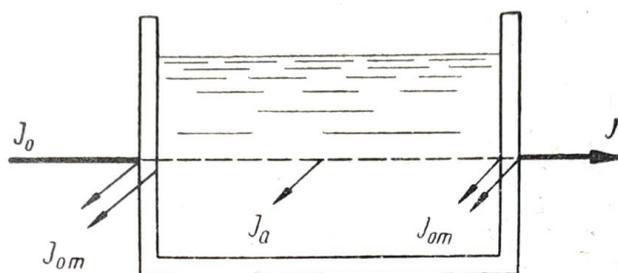


Рис. 40. Прохождение света через раствор, заключенный в стеклянный сосуд [7, с. 10]

$$I_0 = I_a + I_{от} + I_p + I \quad (98).$$

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 (98) можно записать в более простом виде:

$$I_0 = I + I_a \quad (99).$$

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. 6.

Таблица 6

Цвет раствора в зависимости от поглощенной части спектра [7, 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 [7, 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 :

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (100).$$

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

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (101).$$

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

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = l \cdot \lg n \quad (102),$$

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 (102) 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:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (103),$$

где ε – величина постоянная, характерная для растворов вещества (для света определенной длины волны), носящая название коэффици-

ента 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 [7, 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

$$A = \varepsilon \frac{n}{(n^2 + 2)^2} lc \quad (104),$$

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:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_k \quad (105),$$

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 (103) концентрация c выражается числом молей в 1 литре, а толщина слоя l – в сантиметрах, величину ε принято называть молярным коэффициентом поглощения.

Из уравнения (103) 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 [7, 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 приводит к переходу их в *возбужденное состояние* (изображается *) (рис. 42).

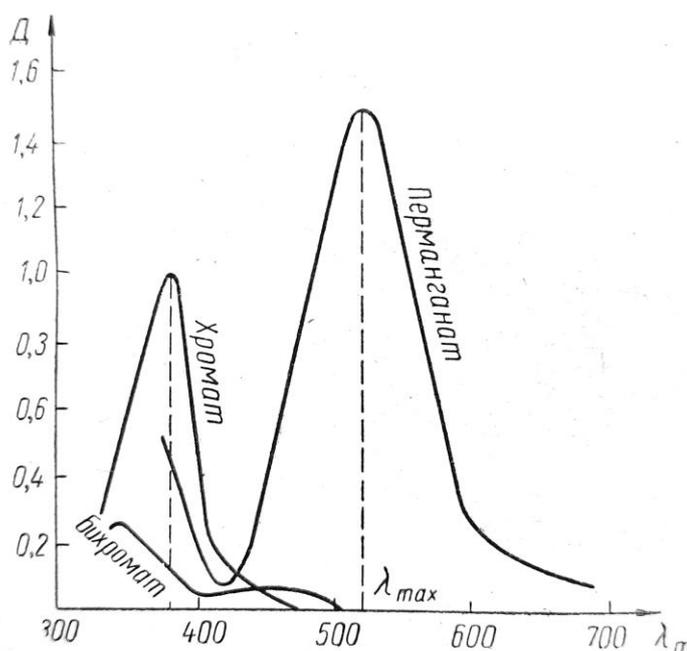


Рис. 41. Спектры поглощения водных растворов хромата, бихромата и перманганата калия [7, с. 17]

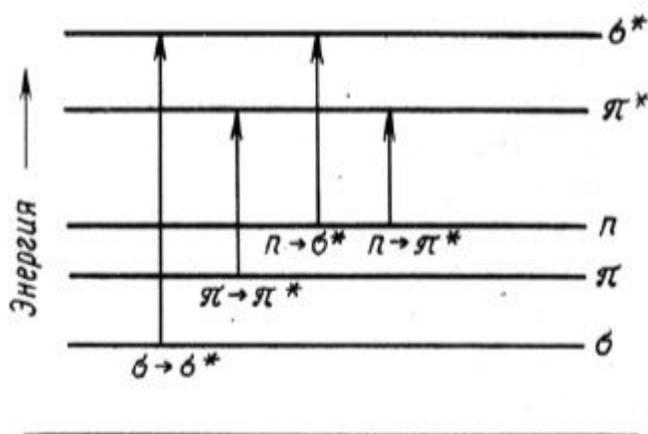


Рис. 42. Схема электронных уровней и энергия возможных электронных переходов [26, с. 13]

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 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:

$$\mu = \frac{I_0}{I} \quad (106).$$

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 [26, с. 14].

Практическая реализация и применение фотометрических методов

Реализация фотометрических методов измерения возможна с помощью *фотометров* (устаревшее название – *фотоколориметры*) 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) *монокроматизатор* – 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*.

Принципиальная схема прибора для фотометрических измерений представлена на рис. 43. 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.

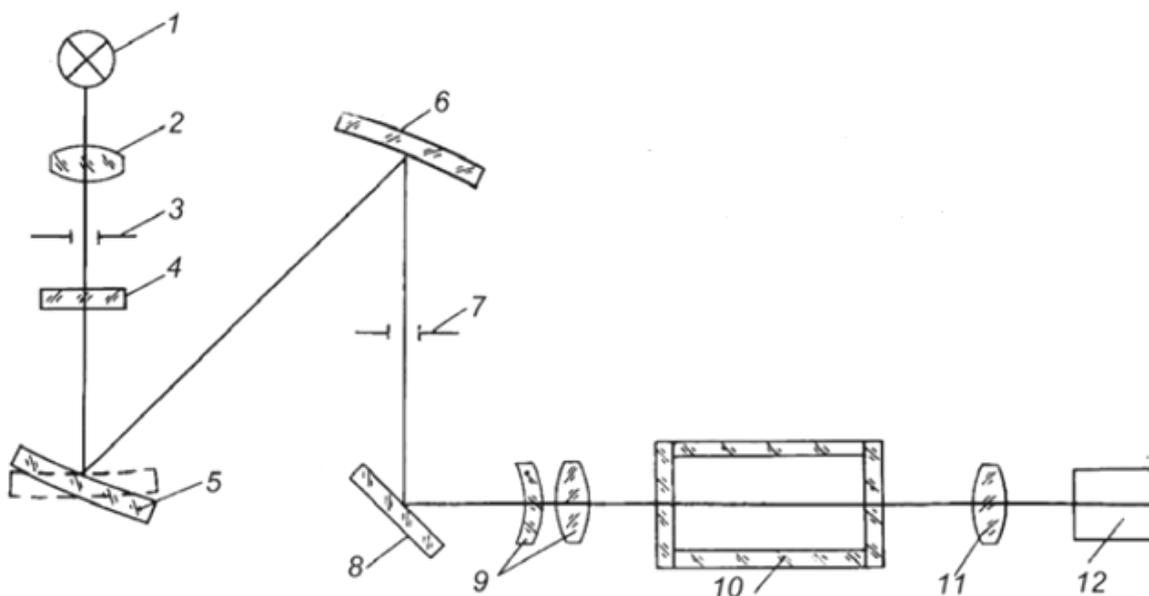


Рис. 43. Принципиальная схема фотометра:

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

Внешний вид фотометра КФК-3-01 представлен на рис. 44.

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.

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 стандартных раствора, определяют их оптическую плотность в одинаковых условиях (длина волны, идентичные характеристические свойства кювет). Рассматриваемые показатели этих растворов должны иметь



Рис. 44. 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

близкие значения, тогда погрешность измерения будет меньше. Для этого вначале фотометрируют исследуемый раствор, а затем подбирают нужную концентрацию стандартного раствора. Согласно уравнению (103), оптические плотности исследуемого и стандартного раствора будут равны:

$$A_x = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_x \quad (107),$$

$$A_{ст} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_{ст} \quad (108).$$

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

$$\frac{A_x}{A_{ст}} = \frac{c_x}{c_{ст}} \quad (109),$$

затем высчитывают концентрацию исследуемого вещества:

$$c_x = c_{ст} \cdot \frac{A_x}{A_{ст}} \quad (110).$$

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.

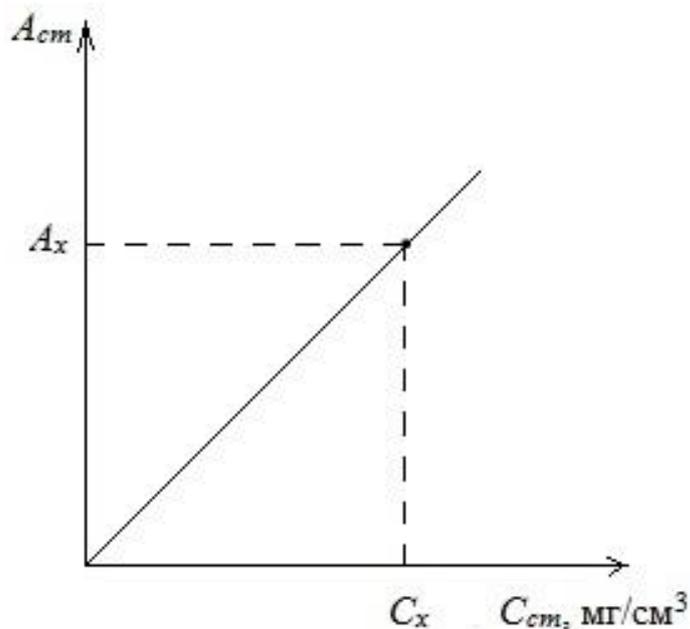


Рис. 45. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации [18, с. 40]

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 возни-

кают 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 полученных 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).

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:

$$A_x = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_x \quad (111),$$

$$A_{x+n} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_{x+n} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot (c_x + c_n) \quad (112),$$

где c_n – концентрация добавки в анализируемом растворе.

Решая эти уравнения относительно c_x , получаем:

$$c_x = c_n \cdot \frac{A_x}{A_{x+n} - A_x} \quad (113).$$

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

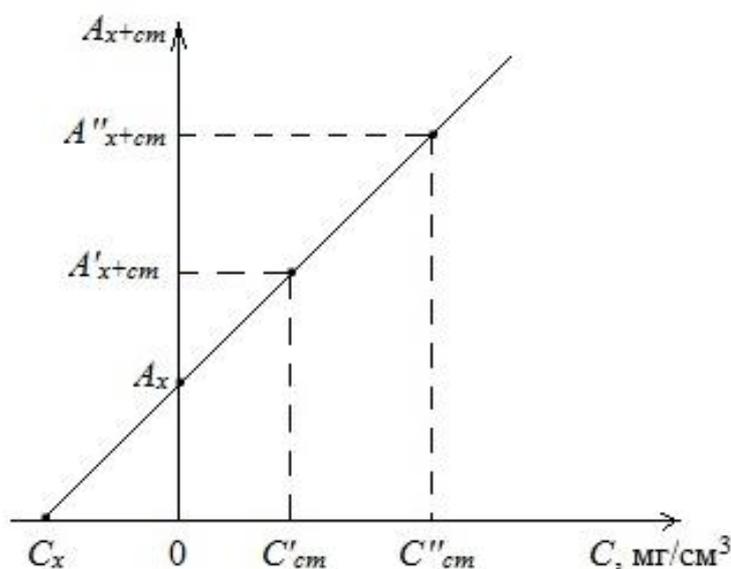


Рис. 46. Градуировочный график для определения концентрации вещества по методу стандартных добавок [18, с. 41]

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:

$$A'_x = A_x - A_0 = \varepsilon \cdot l \cdot (c_x - c_0) \quad (114),$$

$$A'_{ст} = A_{ст} - A_0 = \varepsilon \cdot l \cdot (c_{ст} - c_0) \quad (115).$$

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:

$$\frac{A'_x}{A'_{ст}} = \frac{(c_x - c_0)}{(c_{ст} - c_0)} \quad (116),$$

откуда находим c_x :

$$c_x = c_0 + A'_x \cdot \frac{(c_{ст} - c_0)}{A'_{ст}} \quad (117),$$

или

$$c_x = c_0 + F \cdot A'_x \quad (118),$$

где

$$F = \frac{(c_{ст} - c_0)}{A'_{ст}} \quad (119).$$

F в уравнении (119) 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 оп-

тическая плотность A' равна разности оптических плотностей исследуемого или стандартного раствора и раствора сравнения:

$$A'_x = A_0 - A_x \quad (120), \quad A'_{ст} = A_0 - A_{ст} \quad (121).$$

Концентрацию c_x рассчитывают по следующей формуле:

$$c_x = c_0 - F \cdot A'_x \quad (122),$$

где фактор пересчета будет равен:

$$F = \frac{(c_0 - c_{ст})}{A'_{ст}} \quad (123).$$

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 значения относительных оптических плотностей берут со знаком минус.

Градуировочный график при этом не проходит через начало координат, а пересекает ось абсцисс в точке, соответствующей концентрации раствора сравнения c_0 . Концентрацию исследуемого раствора можно определить и расчетным путем:

$$c_x = c_0 + F \cdot A_x \quad (124).$$

Дифференциальными методами анализа пользуются в тех случаях, когда методы прямой фотометрии применять затруднительно: при определении больших

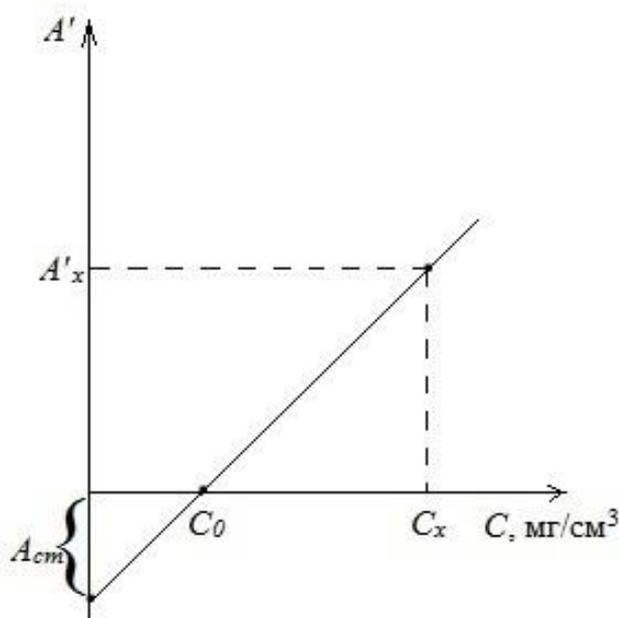


Рис. 47. Градуировочный график в методе двусторонней дифференциальной фотометрии [18, с. 44]

количеств веществ, в случаях нарушения закона Бугера – Ламберта – Бера из-за большой концентрации вещества, либо же при выходе значений оптической плотности за пределы шкалы прибора (при невозможности дальнейшего разбавления растворов). Точность данного метода также дает ему преимущество перед прямыми способами фотометрии [18, с. 38–44].

Спектрофотометрические методы широко применяют при *детектировании 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 детектирования выделяемых биополимеров, тем более что концентрация вспомогательных примесей зачастую превышает концентрацию анализируемых веществ [24, с. 248].

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

$$n = \frac{AV}{\epsilon l} \quad (125),$$

где A – измеренная оптическая плотность, V – объем измеряемой пробы, ϵ – 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 [24, с. 250].

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 обогатительных 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 [39, с. 54].

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 конеч-

ной 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 [25, 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;

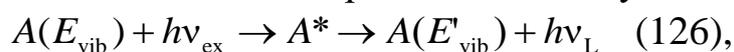
7) *радиолюминесценция (сцинтиляция)* – излучение вызывается воздействием ионизирующего излучения и др. [25, с. 4–5].

Все люминесцирующие вещества имеют общее название – *люминофоры*. По своей химической природе они могут быть неорганическими (которые чаще всего и называют люминофорами) и органическими (*органолюминофорами*). 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)* [7, 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 соответ-

ственно; E_{vib} – колебательная энергия основного состояния до поглощения излучения и E'_{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).

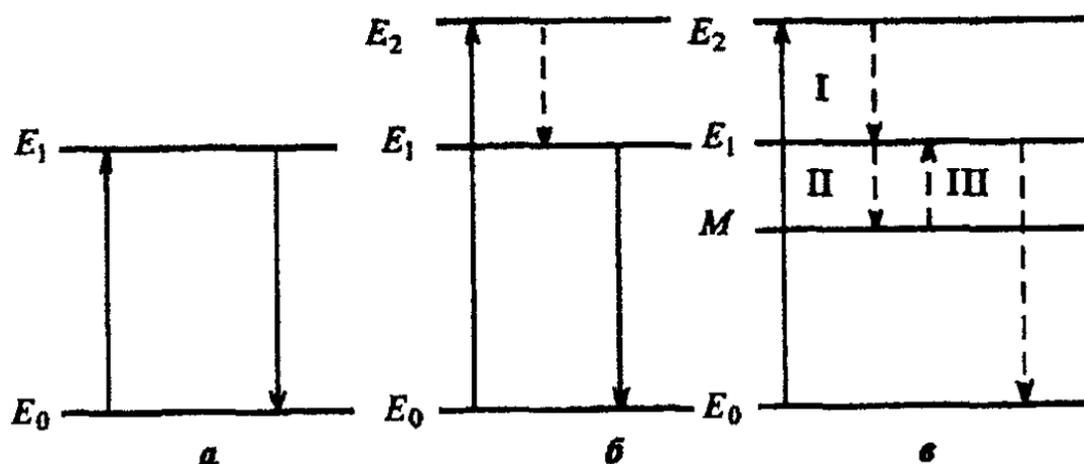


Рис. 48. Схема возникновения резонансной спонтанной (а), нерезонансной спонтанной (б) и вынужденной люминесценции (в) [25, с. 7]:

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 (126).

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 наблюда-

ются для паров металлов и ряда сложных органических молекул, находящихся в растворах [25, 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, выделившихся 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 [21, с. 33].

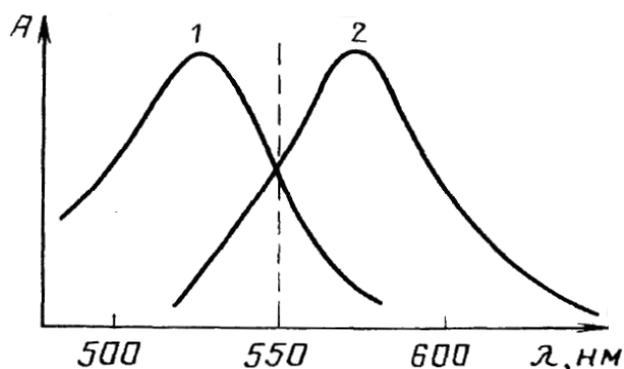


Рис. 49. Спектры возбуждения (1) и люминесценции (2) [35, с. 33]

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* ($\varphi_{э}$):

$$\varphi_{э} = \frac{E_{л}}{E_{п}} \quad (127).$$

Квантовый выход люминесценции (ϕ_k) представляет собой отношение числа квантов люминесценции, излученных веществом (N_l), к числу поглощенных квантов возбуждающего света (N_{II}):

$$\phi_k = \frac{N_l}{N_{II}} \quad (128).$$

Учитывая, что энергия кванта света равна $h\nu$, энергия N квантов света $E = N h\nu$. Тогда связь между ϕ_{Σ} и ϕ_k следующая:

$$\phi_{\Sigma} = \frac{N_l h\nu_l}{N_{II} h\nu_{II}} = \frac{\nu_l}{\nu_{II}} \phi_k \quad (129).$$

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 [21, 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 сформулировал *правило зеркальной симметрии*: длинноволновая часть спектра испускания и коротковолновая часть спектра поглощения в частотных координатах являются взаимным зеркальным отображением, если соответствующие спектры нормированы [25, с. 21–22].

Нормированными называют спектры, приведенные к одному максимуму. Спектры необходимо нормировать, т. к. 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 Лёвшина соблюдается не для всех веществ. При выполнении правила справедливо соотношение

$$\nu_{\text{abs}} + \nu_{\text{fl}} = 2\nu_0 \quad (130),$$

и, следовательно,

$$\nu_{\text{abs}} - \nu_{\text{fl}} = 2(\nu_{\text{abs}} - \nu_0) \quad (131),$$

где ν_{abs} и ν_{fl} – частоты поглощения и флуоресценции; ν_0 – частота в точке пересечения спектров.

График зависимости ($v_{\text{abs}} - v_{\text{fl}}$) от v_{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 [39, с. 65].

Для количественного анализа наибольший интерес представляет зависимость выхода люминесценции от концентрации люминесцирующего 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

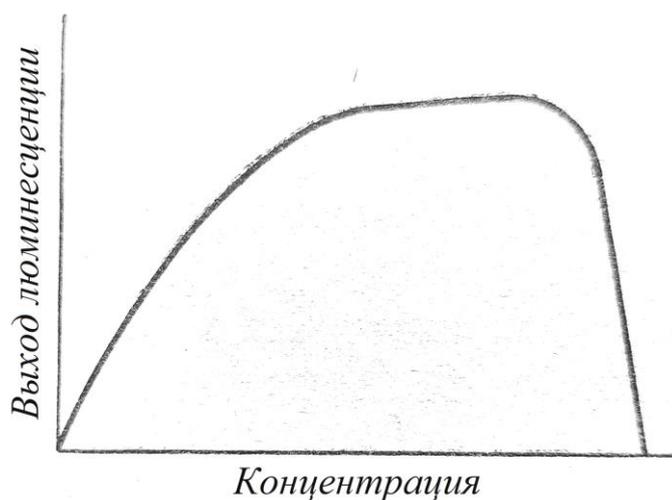


Рис. 50. Зависимость выхода люминесценции от концентрации люминесцирующего вещества [35, с. 152]

интерес для количественного анализа. Для большинства веществ она охватывает концентрации порядка 10^{-7} – 10^{-4} моль/л, то есть с помощью люминесцентного метода анализа можно определять очень незначительные количества веществ в растворах. 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* [35, 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 са-

мо явление называется *тушение примесями*. В качестве таких веществ могут выступать примеси кислорода, ионов переходных элементов (Fe^{3+} , Cu^{2+} и др.), тяжелых атомов (I , 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 [21, с. 35].

Практическая реализация и применение люминесцентных методов

Для измерения флуоресценции используют *спектрофлуориметры* и *флуориметры*. Для измерения фосфоресценции используют *фосфориметры*.

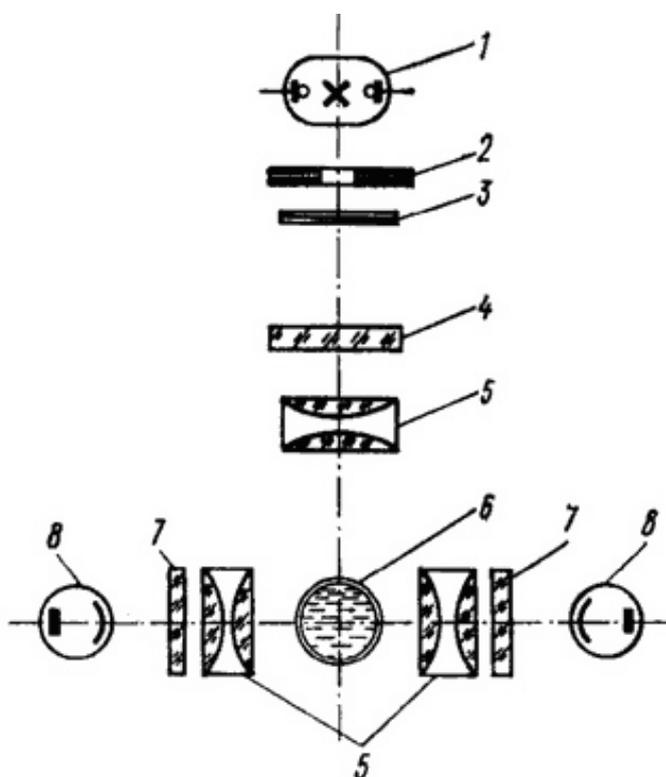


Рис. 51. Принципиальная оптическая схема флуориметра [23, с. 17]:

- 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

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 [39, с. 63].

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 [23, 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 переведения анализируемых проб в раствор. Область применения анализатора – аналитический



Рис. 52. Внешний вид люминесцентно-фотометрического анализатора жидкости Флюорат-02-4М

контроль и мониторинг экологического состояния объектов окружающей среды, санитарный контроль, контроль производственных процессов.

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 возбуждающего 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 интенсивность флуоресценции I_{lm} 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):

$$I_s = kc_s \quad (132),$$

$$I_x = kc_x \quad (133),$$

где k – коэффициент пропорциональности.

Далее по формуле (134) находят концентрацию исследуемого вещества:

$$c_x = \frac{I_x}{I_s} \cdot c_s \quad (134).$$

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 Δc_1 и Δc_2 – изменение содержания определяемого вещества, вызванное процедурой добавки.

После измерения интенсивности люминесценции всех трех образцов строят график в координатах $\lg I - \Delta c$. Содержание определяе-

мого вещества в пробе c_x находят путем экстраполяции графика на значение $\lg I = 0$ [23, с. 30–31].

Фосфоресцентный анализ – метод люминесцентного анализа, основанный на изучении спектров фосфоресценции. Он 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 необходимость *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 фосфоресценции;
- 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 фосфоресценции.

Существуют и другие способы иммобилизации. Например, фосфоресценцию 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 исказить результаты измерений.

Некоторые вещества можно иммобилизовать при комнатной температуре посредством использования поверхностно-активных веществ (ПАВ), например, лаурилсульфата натрия. Минус этого спосо-

ба в том, что точность измерений снижается на один – два порядка по сравнению с иммобилизацией при низких температурах.

Метод фосфориметрии используется для определения полиароматических углеводов, витаминов, антибиотиков и других органических веществ [40, 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, люменолола, 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 [25, 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 – *сортовой анализ* – используется в сельском хозяйстве (например, при облучении УФ-лучами жизнеспособные семена дают желтое свече-

ние, 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. [21, 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 б, покрытие которого отражает свет с длиной волны, соответствующей пропускаемому через «возбуждающий» фильтр. Дихроичное зеркало б расположено под углом 45° к плоскости тыльной линзы объектива 5 и под таким же углом к плоскости линз конденсора, таким образом «возбуждающий свет» от-

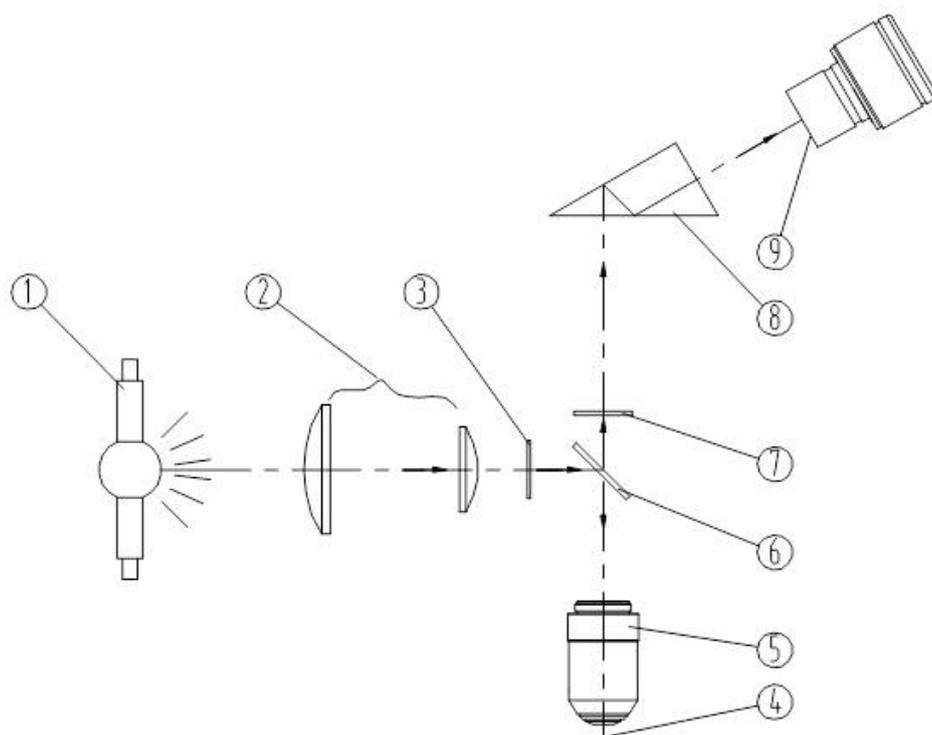


Рис. 53. Оптическая схема люминесцентного микроскопа:

1 – источник излучения, 2 – конденсор, 3 – возбуждающий фильтр, 4 – исследуемый образец, 5 – объектив, 6 – дихроичное зеркало, 7 – барьерный фильтр, 8 – линза, 9 – окуляр

ражаясь 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 светло-голубым цветом дает желто-зеленую флуоресценцию) и родамин, который после облучения желто-зеленым цветом люминесцирует в темно-красном спектре.

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. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Теоретические основы инфракрасной спектроскопии

Сущность *инфракрасной спектроскопии* заключается в изучении спектров поглощения, полученных в инфракрасной области электромагнитного излучения, то есть в диапазоне длин волн от $7,8 \cdot 10^{-7}$ до

$5 \cdot 10^{-5}$ м. ИК-спектры, в отличие от УФ области, дают богатый набор полос поглощения, по которым можно охарактеризовать большинство функциональных групп органических соединений. Это объясняется особенностью энергетических переходов между колебательными и вращательными уровнями в их молекулах, которые происходят преимущественно в ИК области спектра.

Подобное поведение веществ можно объяснить на примере двухатомных молекул. Химическую связь между атомами в такой молекуле можно схематически представить в виде упругой пружины. Ее растяжение и сжатие будет соответствовать колебаниям атомов. Получается своеобразный осциллятор – система, в которой ее составные части совершают повторяющиеся во времени колебания. Для такого гармонического осциллятора возвращающая сила пропорциональна величине смещения ядер из положения равновесия (r_0) и направлена она в сторону, противоположную смещению ($r - r_0$):

$$F = -K(r - r_0) \quad (135),$$

где K – силовая постоянная, характеризующая упругость связи.

Частоту валентных колебаний находят через соотношение силовой постоянной с массами атомов, входящих в состав молекулы:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (136),$$

где μ – приведенная масса, высчитываемая по формуле:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (137).$$

Проанализировав выражение (136), становится понятно, что частота колебаний возрастает с увеличением прочности связи и уменьшением массы атомов. Благодаря этому соотношению можно примерно подсчитать частоту изменения колебаний различных функциональных групп. Например, для $C \equiv N$ частота колебаний составит $\sim 2250 \text{ см}^{-1}$, для $C=N$ около 1650 см^{-1} , а для одинарной связи $C-N$ примерно 1050 см^{-1} .

Если считать колебания атомов в двухатомной молекуле гармоническими, тогда полная энергия колебаний, подобно гармоническому осциллятору, будет подчиняться основному квантовому условию:

$$E_v^{\text{кол}} = (v + \frac{1}{2})h\nu_0 \quad (138),$$

где ν – колебательное квантовое число, принимающее значение целых чисел: 0, 1, 2, 3 и т.д., а ν_0 – частота основного колебания, определяемая уравнением (136) [44, с. 59–61].

Если воздействовать на молекулы источником ИК излучения, то поглощая кванты света $h\nu$, они будут переходить на более высокие энергетические уровни. Энергию поглощенного кванта света можно найти, посчитав разность энергий двух состояний:

$$h\nu = E_{\nu+1} - E_{\nu} \quad (139).$$

Согласно уравнению (2) разность энергий для двух энергетических уровней составляет:

$$E_{\nu+1} - E_{\nu} = h\nu_0 \quad (140).$$

Исходя из уравнений (139) и (140), получается, что частота поглощенного излучения (ν) равна основной колебательной частоте (ν_0). Таким образом, спектр гармонического осциллятора состоит из одной линии на частоте ν_0 , являющейся собственной частотой осциллятора (рис. 54, 1).

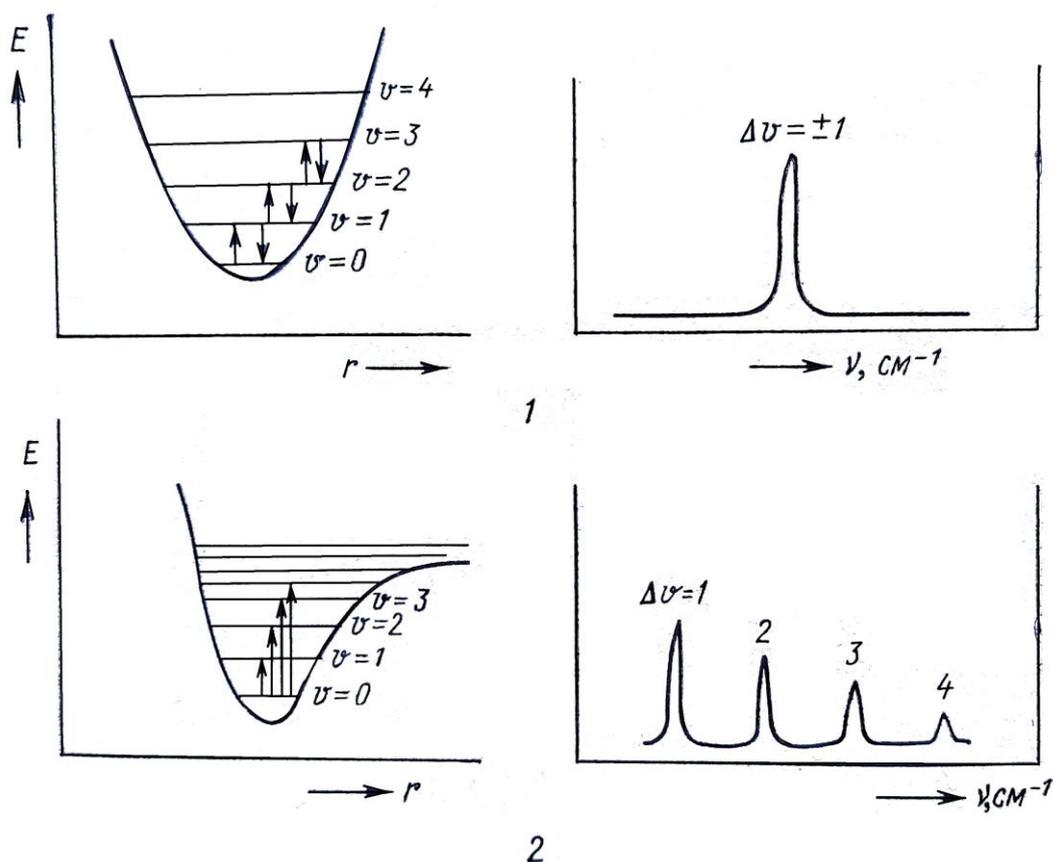


Рис. 54. Потенциальные кривые, уровни энергии и схематические спектры гармонического (1) и ангармонического (2) осцилляторов [44, с. 60]

Обычно при комнатной температуре молекулы веществ находятся в основном состоянии ($\nu=0$) и переходят в возбужденное ($\nu=1$) при поглощении энергии, привнесенной извне. Для гармонического осциллятора возможны переходы с изменением квантового числа на единицу, то есть переходы на соседние уровни ($\Delta\nu = \pm 1$).

Рассмотрим схему колебательных и вращательных уровней, присущих молекулам при поглощении ими электромагнитной энергии (рис. 55). Поглощая излучение, соединения переходят на следующий колебательный уровень, и соответствующие ему вращательные подуровни, причем вращательное квантовое число ΔI может принимать как положительные, так и отрицательные значения (+1 и -1). Если $\Delta I = +1$, то в спектре наблюдается так называемая R-ветвь, расположенная в более высокочастотной части спектра, в менее вы-

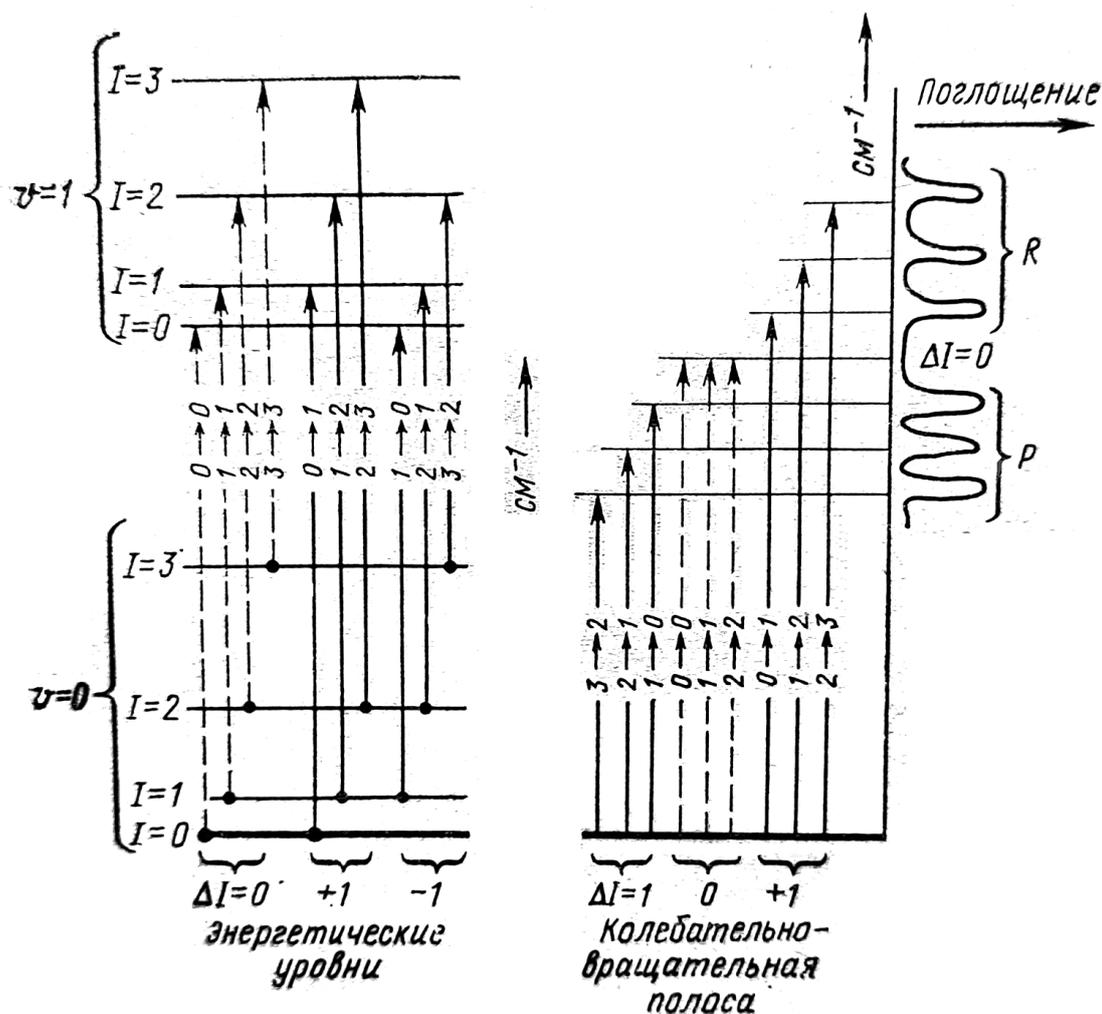


Рис. 55. Схема уровней, объясняющая возникновение вращательно-колебательного спектра [44, с. 62]

сокочастотной области располагается P -ветвь колебательно-вращательной полосы.

Все рассмотренные выше особенности были характерны для гармонического осциллятора – идеальной двухатомной молекулярной системы. При экспериментальном наблюдении за колебаниями реальных веществ, обнаруживается, что в большинстве своем они имеют *ангармонический* характер. Разницу в спектрах можно представить благодаря рис. 54, 2. Чаще всего для таких веществ наблюдаются переходы не только между соседними уровнями (± 1), возможными становятся и другие переходы: $\Delta\nu = \pm 2, \pm 3$ и т.д. Соответствующие им частоты ($2\nu, 3\nu$ и т.д.), интенсивность которых ослабевает, носят название *частот колебаний-обертонов*. Как правило, интенсивность обертонов значительно меньше интенсивности основного тона ($\Delta\nu = 1$), до такой степени, что редко удается зарегистрировать 3 и 4-й обертоны многих молекул [44, с. 60–63].

Колебания многоатомных молекул, по сравнению с двухатомными, усложняются по мере увеличения количества атомов, входящих в их структуру. Все атомы вносят свой вклад в общий колебательный спектр, поэтому на практике наблюдается целый набор линий и полос, частоты и интенсивности которых отражают все особенности сложного колебательно-вращательного движения рассматриваемого соединения.

Каждый атом в сложной молекуле имеет несколько степеней свободы, причем в линейной молекуле (где все атомы располагаются вдоль одной линии) число степеней меньше, нежели в нелинейной. Атомы при движении в пространстве имеют 3 степени свободы. Если принять число атомов в молекуле за N , тогда получится, что они будут иметь $3N$ степеней свободы. Далее необходимо учесть число степеней свободы, характерные для молекулы в целом. Некоторые сочетания степеней свободы отдельных атомов соответствуют поступательному движению молекулы как целого, что прибавляет еще 3 степени свободы. Что касается нелинейной молекулы, то она имеет возможность осуществлять вращение относительно составляющих ее частей, что прибавляет еще 3 степени свободы. В линейных молекулах только 2 главные вращательные оси, соответственно в данном случае прибавляются только 2 степени свободы [2, с. 49].

Итак, общее число колебаний N_v , характерных для молекулы, имеющей нелинейное строение, можно представить следующим образом [2, с. 49]:

$$N_v = 3N - 3 \text{ (вращение)} - 3 \text{ (поступательное движение)} = 3N - 6.$$

Для линейной молекулы соответственно:

$$N_v = 3N - 2 \text{ (вращение)} - 3 \text{ (поступательное движение)} = 3N - 5.$$

Таким образом, в молекулах может осуществляться $3N - 6$ и $3N - 5$ независимых колебаний. Нетрудно посчитать, что для двухатомной молекулы ($N=2$) характерен один тип основного колебания ($3 \cdot 2 - 5 = 1$), для трехатомной – четыре колебания ($3 \cdot 3 - 5 = 4$) и т.п. Для атома бензола (C_6H_6), например, характерны 30 колебаний ($3 \cdot 12 - 6 = 30$), что усложняет задачу интерпретации ИК-спектров [44, с. 63].

Многоатомную молекулу можно представить в виде совокупности осцилляторов, каждый из которых вносит свой вклад в колебание системы. Энергия колебания одного осциллятора перераспределяется по межатомным связям между другими осцилляторами, в итоге все атомы вовлекаются в колебание. Несмотря на огромное количество колебаний, которые могут происходить в сложных молекулярных системах, из этой совокупности всегда можно выделить некоторое количество *нормальных колебаний*. Так называют колебания молекулы, в которой все ядра колеблются с одинаковой частотой и фазой. Для каждого колебания характерна своя частота ν или волновое число $\bar{\nu}$, которое в ИК-спектрии принято выражать в обратных сантиметрах (cm^{-1}) [2, с. 50].

Колебательные движения в молекуле принято делить на два типа: валентные и деформационные (рис. 56). Если в ходе нормального колебания происходит изменение длин связей, а углы между связями

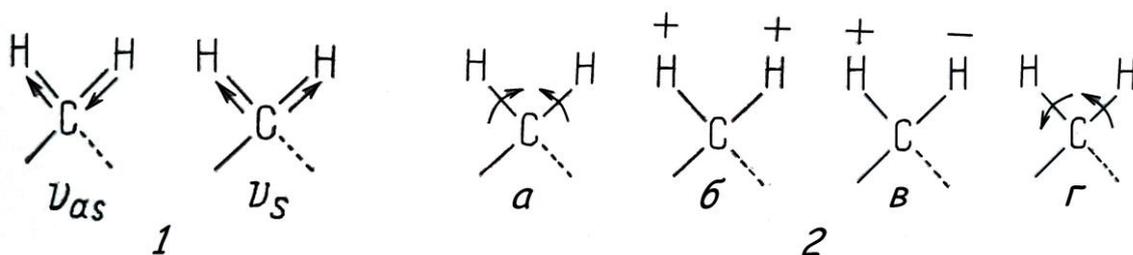


Рис. 56. Колебания метиленовой группы [44, с. 65]:

- 1 – валентные: ν_{as} – антисимметричные, ν_s – симметричные;
 2 – деформационные: a – ножничное, b – веерное, v – крутильное,
 g – маятниковое

почти не меняются, то такое колебание относят к *валентным* (ν). *Деформационное* (δ , γ) колебание напротив, затрагивает только углы между связями, но практически не влияет на длины связей.

Деформационные колебания требуют меньше энергии, нежели валентные, поэтому им соответствуют полосы поглощения при более низких частотах. Валентные колебания принято делить на следующие группы: симметричные (ν_s) и антисимметричные (ν_{as}) (рис. 56, 1). Деформационные колебания в свою очередь делятся на веерные, крутильные, ножничные и маятниковые (рис. 56, 2) [44, с. 63–65].

При изучении структуры молекул экспериментальным образом определяют частоту их нормальных колебаний. При общем совпадении частот и фаз колебаний, зачастую отмечают отличия в амплитудах колебательных движений некоторых связей в молекуле. Например, колебания одной какой-то конкретной связи значительно превосходят все остальные, что дает основания приписать частоту нормального колебания именно данной определенной связи. В таком случае нормальное колебание называют *характеристичным* для данной связи.

При воздействии инфракрасного излучения на анализируемое вещество происходит взаимодействие осциллирующей компоненты электрического поля с осциллирующим при колебаниях *дипольным моментом молекулы*. Дипольный момент μ можно найти через следующее соотношение [2, с. 50]:

$$\mu = qR \quad (141),$$

где q – заряд молекулы, R – вектор от положительного до отрицательного заряда в молекуле.

Таким образом, способностью к поглощению излучения в ИК-спектре обладают только те молекулы, в которых в процессе колебания происходят изменения электрического дипольного момента, то есть должно выполняться соотношение:

$$\frac{d\mu}{dQ_i} \neq 0 \quad (142),$$

где Q_i – координата нормального колебания, не равная нулю.

Исходя из соотношения (142), можно сделать вывод, что в инфракрасной области будут проявляться колебания таких молекул, как хлороводород, бензол, метан (при условии, что колебания не симметричные) и других. Однако колебания двухатомных гомоядерных мо-

лекул (вроде водорода, кислорода, азота) или симметричные колебания, например, в молекуле CO_2 (рис.57) не будут отображаться в ИК-спектре, так как колебательная координата в данном случае будет равна нулю [2, с. 51]. Таким образом, если колебание в молекуле не приводит к изменению ее дипольного момента, то она не будет поглощать ИК-излучение, а значит и число полос поглощения в спектре уменьшится [44, с. 64].

Кроме частоты колебаний важной характеристикой ИК-спектров является интегральная интенсивность полос поглощения A :

$$A = 2,3 \int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon d\nu \quad (143),$$

где ϵ – коэффициент поглощения, ν_1 и ν_2 – предел интегрирования.

Между этой величиной, относящейся к i -тому нормальному колебанию, и электронными свойствами молекул существует следующая зависимость:

$$A_i = \frac{N\pi}{3c} \left(\frac{d\mu}{dq_i} \right)_{q_i=q_{i0}} \quad (144),$$

где N – число Авогадро, μ – дипольный момент молекулы, c – скорость света, q_i – нормальная координата i -го нормального колебания, q_{i0} – нормальная координата в положении равновесия [44, с. 65].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что интенсивность поглощения ИК излучения веществом тем больше, чем сильнее изменяется дипольный момент связи в процессе колебаний. При смещении центров тяжести отрицательного и положительного зарядов в молекуле можно влиять на интенсивность поглощения этими веществами инфракрасного излучения. Например, факторы, способствующие увеличению электронной плотности на таких связях как $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{N}=\text{O}$, $\text{P}=\text{O}$ и др., должны увеличить интегральную интенсивность их полос

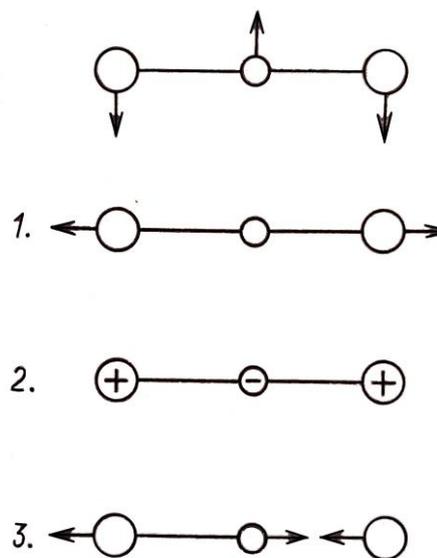


Рис. 57. Типы колебания молекулы CO_2 [44, с. 148]:

- 1 – симметричное валентное колебание $\text{C}=\text{O}$;
- 2 – деформационное колебание $\text{O}=\text{C}=\text{O}$;
- 3 – антисимметричное валентное колебание $\text{C}=\text{O}$

поглощения, а факторы, уменьшающие электронную плотность – понижать величину A [44, с. 66].

Так же имеются данные о том, что понижение частоты валентных колебаний приводит к увеличению интегральной интенсивности полос поглощения ИК излучения веществом. Это связано с тем, что частота колебания является функцией силовой постоянной связи (136), а увеличение электронной плотности связи (а, следовательно, и интенсивности поглощения) влечет за собой уменьшение ее кратности (увеличение длины связи) [44, с. 66].

Таким образом, колебательные спектры, являясь характеристичной величиной для различных веществ, широко используют для решения задач идентификации химических соединений и примесей, содержащихся в растворах. Кроме того, метод является очень удобным для исследования механизмов химических реакций. Каждое вещество имеет свой спектр инфракрасного поглощения, отличный от спектров других соединений. Даже изомеры соединений, чрезвычайно мало отличающиеся друг от друга по свойствам, имеют различные, инструментально регистрируемые спектры [2, с. 51]. ИК-спектр, относящийся

Таблица 7

Характеристические частоты поглощения различных групп атомов в ИК области

Группа атомов	Частота, см ⁻¹
C=C, C=N	~1650
C≡C	~2200
C=O	~1725
NO ₂	~1550 (<i>v_{as}</i>) ~1340 (<i>v_s</i>)
SO ₂	~1300 (<i>v_{as}</i>) ~1100 (<i>v_s</i>)
P=O	~1200
O-H	~3600
N-H	~3400
C-I	~450
C-Cl	~700

к т.н. области «отпечатков пальцев» (1300–700 см⁻¹), особенно информативен в плане характеристики веществ, именно здесь характер спектра существенно меняется даже при небольших изменениях в структуре соединения. На рис. 58 отображена спектрограмма с областями основных колебаний в ИК-спектре, на которой видно, что значительное количество основных полос в спектрах различных молекул находится в одних и тех же спектральных интервалах. Эти характеристики можно связать с частотами колебаний, которые характерны для определенных группировок атомов, входящих в состав той или иной молекулы. Причем, эти колебания мало зависят от влияния соседних атомов и связей. В таблице 7 приведены основные характеристичные частоты

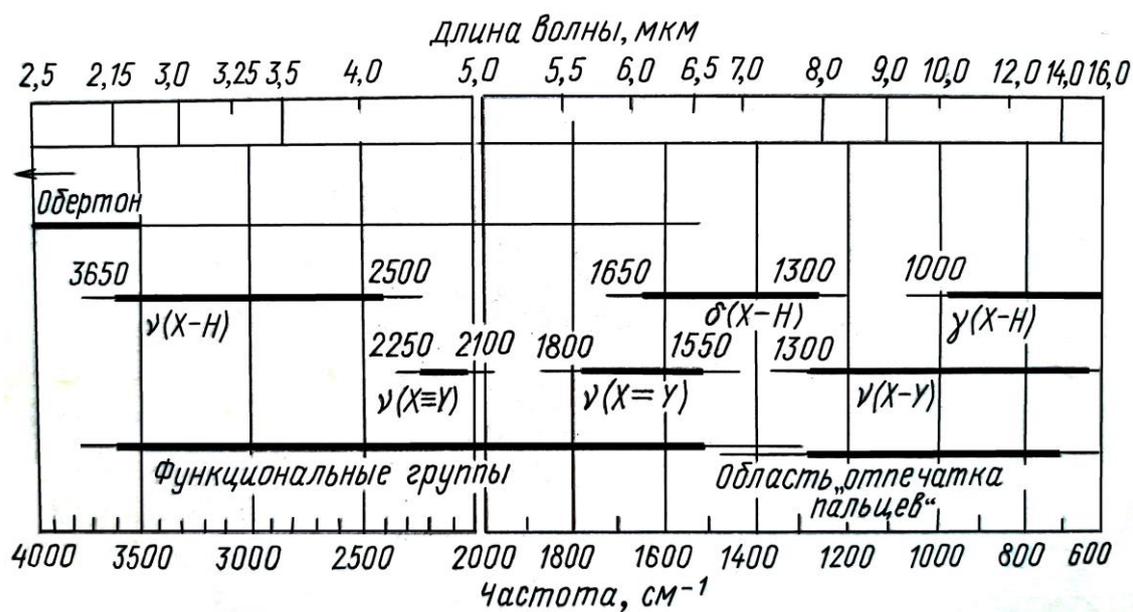


Рис. 58. Область основных колебаний в ИК-спектре [44, с. 68]:
 ν – валентные; δ – деформационные (плоскостные); γ – деформационные (внеплоскостные) колебания

ты некоторых групп атомов, характерных для молекул органических соединений.

Рассмотрим задачу определения структуры соединения по имеющимся данным элементного анализа и другим химическим характеристикам. Для этого нужно исследовать ИК-спектр поглощения и соотнести полосы поглощения к определенным атомным группировкам, составляющим остов молекулы.

К примеру, на рис. 59 отображен ИК-спектр соединения $C_2H_3NO_2$. Исходя из приведенной формулы, можно предположить, что это соединение может иметь в своем составе либо нитритную

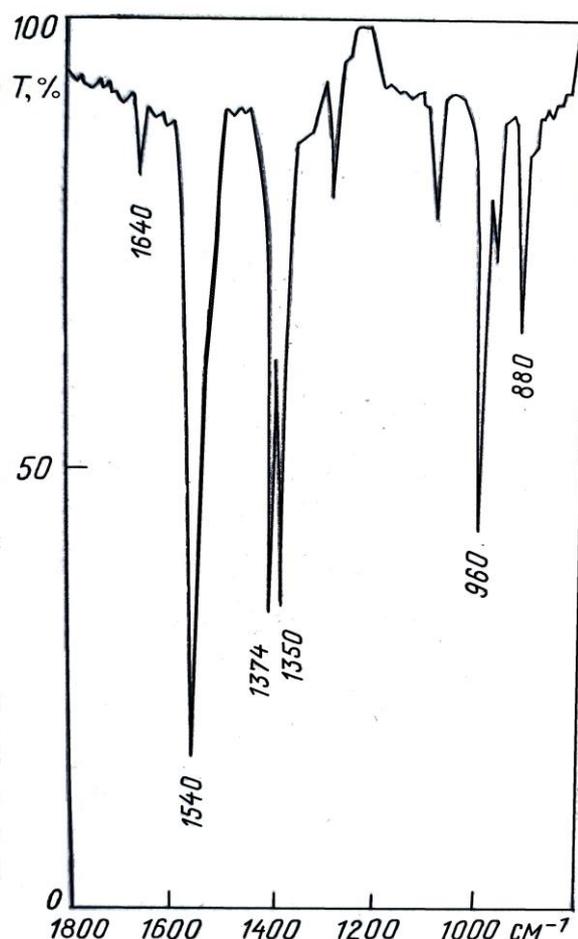


Рис. 59. ИК-спектр соединения $C_2H_3NO_2$ [44, с. 69]

группу, либо нитрогруппу. Допустим, это нитрит ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{O}-\text{N}=\text{O}$), тогда в спектре должны наблюдаться полосы высокой интенсивности, характерные для связи $\text{N}=\text{O}$ при $\nu = 1680\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ (*транс*-форма) или $\nu = 1640\text{--}1625\text{ см}^{-1}$ (*цис*-форма). В случае если в соединении имеет место нитрогруппа, то на спектре должны отобразиться полосы, обусловленные антисимметричными и симметричными валентными колебаниями атомов, входящих в эту группу. Рассмотрев рис. 59, можно обнаружить, что на спектре присутствует полоса поглощения двойной связи $\nu_{\text{C}=\text{C}} = 1640\text{ см}^{-1}$. Кроме того, наблюдаются характеристичные полосы нитрогруппы с частотами 1540 см^{-1} и 1350 см^{-1} соответственно. Другие полосы можно объяснить наличием деформационных колебаний: $1374\text{ см}^{-1} - \delta_{\text{CCH}}$, $960\text{ см}^{-1} - \delta_{\text{HCH}}$, $880\text{ см}^{-1} - \gamma_{\text{C-N}}$. Проанализировав таким образом ИК-спектр, делаем вывод, что этому соединению можно приписать структуру нитроэтена $\text{CH}_2=\text{CHNO}_2$. Следует отметить, что при интерпретации спектров необходимо обращать внимание не только на положение, но и на интенсивность полос поглощения. Дело в том, что полосы поглощения, характеризующие наличие двойной связи, как правило, имеют значительно меньшую интенсивность по сравнению с полосами, характерными для полярных групп. Как раз такой случай и наблюдался нами при интерпретации спектра нитроэтена [44, с. 69].

Практическая реализация и применение инфракрасной спектроскопии

Инфракрасные спектры веществ регистрируют с помощью *ИК-спектрометров*. По принципу устройства эти приборы можно разделить на два типа: *диспергирующие* (т.н. сканирующие спектрометры, снабженные анализаторами спектра диспергирующего типа) и *недиспергирующие* (фурье-спектрометры с анализатором модуляционного типа). В основе принципа действия сканирующих спектрометров лежит использование монохроматора. В фурье-спектрометрах основным узлом является *интерферометр Майкельсона*, изобретенный в 1880 году американским ученым Альбертом Майкельсоном [43, с. 160–161].

Сканирующая разновидность спектрометров по многим параметрам уступает спектрометрам с фурье-преобразователем. В первом

случае для регистрации спектра необходимо несколько минут, фурье-спектрометр справляется с этой задачей за несколько секунд. Кроме того, фурье-спектрометры обладают гораздо большей разрешающей способностью, что позволяет работать с разбавленными растворами и сорбированными монослоями веществ. В настоящее время далекую инфракрасную область спектра ($400\text{--}10\text{ см}^{-1}$) исследуют только с помощью фурье-спектрометров, сканирующие аналоги не способны работать в этом диапазоне [43, с. 161].

Рассмотрим подробнее устройство фурье-спектрометра, принципиальная схема которого представлена на рис. 60.

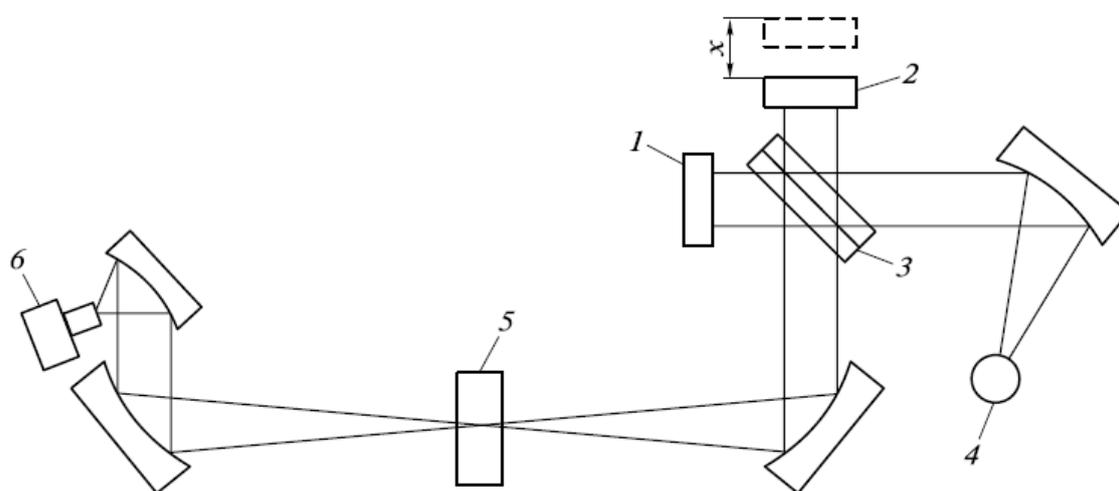


Рис. 60. Оптическая схема фурье-спектрометра [2, с. 55]:
 1 – неподвижное зеркало интерферометра; 2 – подвижное зеркало;
 3 – светоотделительная пластина; 4 – источник излучения;
 5 – исследуемый образец; 6 – детектор излучения

Исследования, произведенные посредством данного прибора, строятся на двух стадиях: сначала снимают интерферограмму изучаемого излучения, а затем с помощью фурье-преобразования вычисляют искомый спектр. Рассмотрим основной узел спектрометра данной конфигурации – интерферометр Майкельсона. Состоит он из двух зеркал, расположенных во взаимно перпендикулярных плоскостях – неподвижного 1 и подвижного 2. Между ними располагается полупрозрачная светоотделительная пластина 3, на которую попадают пучки света, отраженные от зеркал, а также пучки излучения от источника 4. Луч света, испускаемый источником излучения, попадая на пластину 3, разделяется на два пучка, один из которых направляется

на неподвижное зеркало, а другой – на подвижное. Отразившись от зеркал, лучи вновь проходят через светоделитель и выходят из интерферометра в одном и том же направлении. Это излучение фокусируется на исследуемом образце 5 и далее следует в направлении детектора излучения. Рассматриваемые два пучка отличаются друг от друга оптической разностью хода, которая регулируется с помощью подвижного зеркала интерферометра. В результате меняется (модулируется) интенсивность результирующего потока $I(x)$. Частота модуляции зависит от частоты ν падающего излучения и смещения x подвижного зеркала. В результате на интерферограмме наблюдается т.н. *точка нулевой разности хода*, или *точка белого света*. От этой точки ведут отсчет смещения подвижного зеркала, так как она отражает максимальные значения для всех зарегистрированных частот. Таким образом, интерферограмма строится на основе функции распределения энергии излучения по частотам и зависит она от оптической разности хода двух лучей, распространяющихся в оптической системе спектрометра [2, с. 55].

Образец облучается светом, характеризующимся определенной частотой, и если в пробе имеются группы атомов, способные поглощать свет именно этой частоты, то на интерферограмме отразится уменьшение интенсивности излучения в этой области. О наличии такого поглощения можно будет судить после фурье-преобразования (осуществляемого компьютером), которое переводит интенсивность результирующего потока $I(x)$ в интенсивность сигнала $I(\nu)$ [2, с. 55]:

$$I(\nu) = \int I(x) \cos(2\pi x\nu) dx \quad (145).$$

С помощью ИК-спектрометров можно исследовать пробы, находящиеся в различных агрегатных состояниях. Так, разработаны методики, позволяющие изучать состав проб газа с помощью специальных газовых кювет. Они представляют собой цилиндры длиной около 10 см, сделанные из бромида калия или фторида кальция, которые пропускают ИК-излучение. В кювету вмонтирован вакуумный кран для подачи газовой пробы и ее откачки по завершении анализа. Жидкие пробы исследуют с помощью своеобразных кювет, представленных двумя тонкими пластинками, изготовленными из галогенидов щелочных и щелочноземельных металлов (например, LiF, KBr, CaF₂). Анализируемые вещества находятся в растворенном состоянии в концентрации 0,01–1 моль/дм³, в качестве растворителей используют жидко-

сти, прозрачные в анализируемой области инфракрасного спектра. Чаще всего используют бензол, ацетонитрил, трихлорметан, тетра-хлорметан, тетрахлорэтилен и др. Пробоподготовку твердых образцов можно осуществлять двумя способами: в первом случае мелкодисперсную суспензию смешивают с вазелиновым маслом, или другими иммерсионными жидкостями, во втором – посредством лабораторного пресса с помощью специальных пресс-форм готовят таблетки из бромида калия, содержащие тонкодисперсный образец [43, с. 161–162].

Методом ИК-спектromетрии осуществляют преимущественно *качественный анализ* веществ. Как говорилось выше, каждому соединению присущ свой, строго специфичный набор полос поглощения излучения в ИК-области, не существует двух веществ, которые бы имели одинаковые колебательные спектры [43, с. 162–163].

Для идентификации веществ обычно используют метод сравнения с эталоном. При этом важно, чтобы условия анализа были максимально приближены к эталонным с точки зрения характеристик прибора, с помощью которого снимали эталонный спектр, температуры и агрегатного состояния анализируемых веществ, используемого растворителя, его чистоты и др. Расхождение в условиях анализа может привести к возникновению систематической ошибки, в таком случае определить природу исследуемого соединения будет затруднительно. Только полное совпадение всех спектральных характеристик (частота, интенсивность и форма спектральных полос) исследуемых соединений с эталонными, дают основания полагать, что идентифицировано конкретное вещество. В настоящий момент, несмотря на успехи в развитии метода инфракрасной спектроскопии, не существует единой базы данных о спектральных характеристиках всего многообразия изученных наукой веществ. На практике создаются специальные информационно-поисковые системы, заточенные под решение задач в определенных областях химии, например в геохимии, биохимии и т.д. [2, с. 157].

Метод ИК-спектromетрии пригоден для *количественного анализа* преимущественно органических веществ, так как низкие коэффициенты молярного поглощения ($\epsilon \leq 10^3$) дают достаточный для исследований диапазон предела обнаружения – около 10^{-1} – 10^1 мас. %. Анализ смесей веществ этим методом построен на основном законе све-

топоглощения и свойстве аддитивности оптических плотностей. Для успешной реализации количественного определения веществ строят т.н. *базовую линию* чтобы найти соотношения I_0 и I (рис. 61). Эта операция необходима для устранения влияния частичного светорассеяния ИК-излучения и предотвращения возможного наложения и перекрывания соседних полос поглощения посторонних веществ [43, с. 165–166].

ИК-спектрометрия прекрасно подходит для идентификации веществ, загрязняющих атмосферу. Дело в том, что простые двухатомные молекулы (O_2 , N_2), из которых преимущественно состоит атмосферный воздух, не обладают способностью поглощать излучение в ИК-спектре, вследствие того, что их дипольный момент равен нулю.

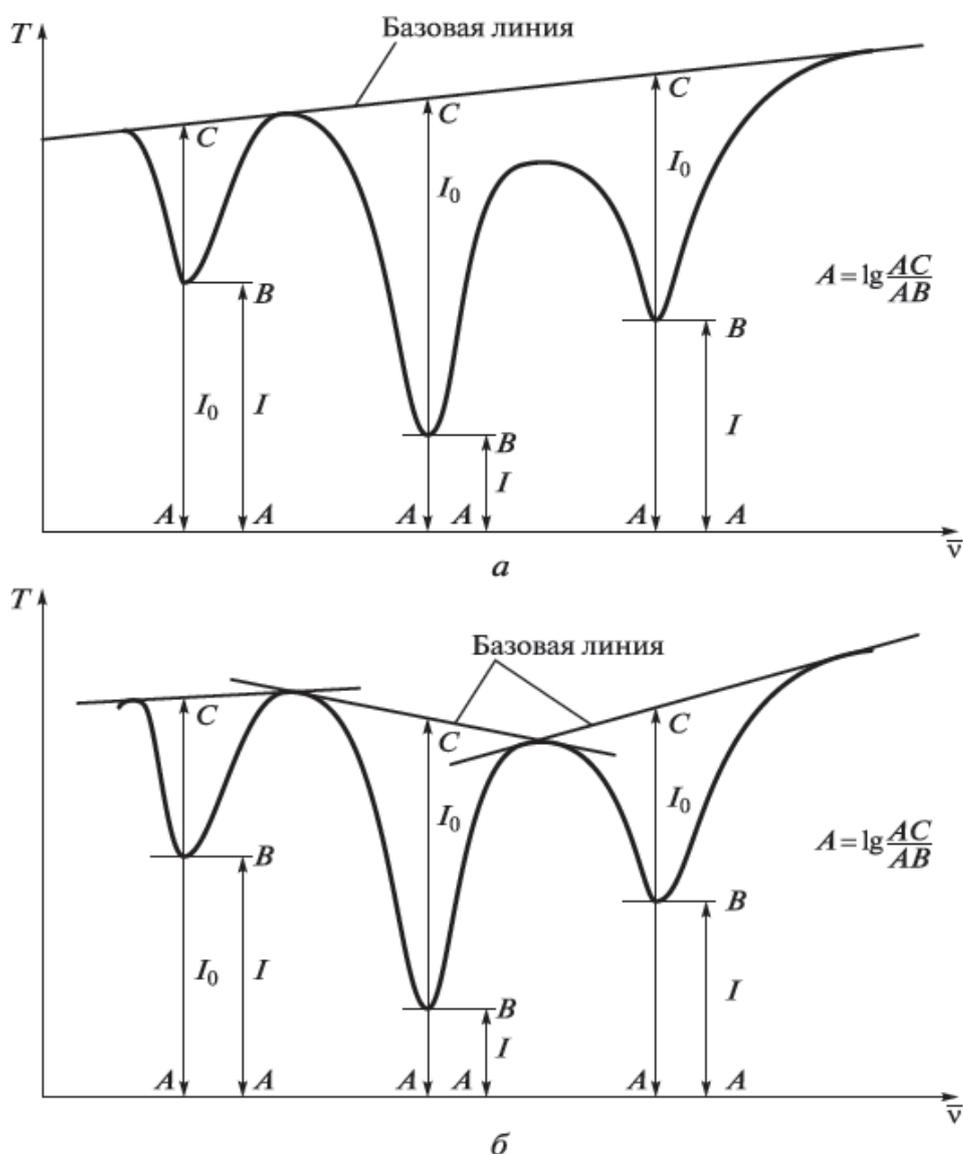


Рис. 61. Два способа построения (а, б) базовой линии [43, с. 165]

Поэтому становится возможным производить дистанционный анализ и идентификацию распространенных загрязнителей атмосферы, таких как SO_2 , CO , или определять наличие в воздухе паров ядовитых веществ наподобие хлороформа, метанола, ацетона и др. [2, с. 59].

В настоящий момент существуют усовершенствованные ИК-фурье-спектрометры, позволяющие производить измерения с разрешающей способностью вплоть до $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$, при этом достигается точность определения волнового числа до 10^{-4} см^{-1} . Фурье-спектрометры выигрывают по многим параметрам сканирующие аналоги: у них на несколько порядков меньше погрешность измерений, производительность выше в сотни раз, превосходство по чувствительности анализа в 100–1000 раз. Пределы обнаружения некоторых веществ достигают 10^{-10} – 10^{-9} г, посредством этих приборов можно изучать кинетику реакций, длящихся около 1 мс [2, с. 56].

ИК-спектрометрия нашла широчайшее применение, причем к ней прибегают в тех ситуациях, когда другие методы или малоэффективны, либо совсем неприменимы. Например, с помощью фурье-спектроскопии за несколько часов были получены спектры планет в ближайшей ИК области. Без ИК-спектрометрии немислимы исследования, направленные на изучение строения и конформации различных органических соединений. Велик потенциал данного метода в химических и биологических исследованиях, в научно-производственной сфере и в мониторинге состояния объектов окружающей среды [2, с. 56–57].

Контрольные вопросы

1. Что понимают под инфракрасной спектроскопией?
2. Почему двухатомные молекулы оказались удобными для объяснения взаимодействия веществ с ИК-излучением?
3. В чем заключается сложность интерпретации ИК-спектров многоатомных молекул, полученных на основании изучения взаимодействия этих веществ с инфракрасным излучением?
4. Что называют нормальными колебаниями?
5. В чем особенности деформационных и валентных колебаний в молекуле? На какие группы их принято делить?
6. Какое колебание называют характеристичным?

7. Что такое дипольный момент молекулы и как он связан с явлением поглощения веществами излучения в ИК-спектре?
8. Чем примечательна область «отпечатков пальцев»?
9. На какие особенности нужно обращать внимание при интерпретации ИК-спектра вещества с целью определения его структурной формулы?
10. Назовите основные отличия диспергирующих и недиспергирующих спектрометров. Какие приборы обладают наилучшими характеристиками?
11. Объясните, каким образом функционирует оптическая схема фурье-спектрометра.
12. Как осуществляется пробоподготовка в ИК-спектроскопии?
13. Дайте характеристику количественного и качественного определения веществ методом инфракрасной спектроскопии.
14. Назовите области применения, в которых наиболее широко используется метод ИК-спектроскопии.

3.4. АТОМНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Теоретические основы атомно-абсорбционного спектрального анализа

Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) – метод физико-химического анализа, основанный на способности атомов в невозбужденном состоянии поглощать излучение оптического диапазона.

Свободные атомы A , при поглощении кванта света $h\nu$, переходят в возбужденное состояние A^* :



где h – постоянная Планка, ν – частота, определяемая условием частот Бора:

$$\nu = \frac{E_{A^*} - E_A}{h} \quad (147),$$

E_{A^*} и E_A – энергия атома в возбужденном и основном состояниях соответственно.

Направляя на свободные атомы излучение с определенной частотой, можно вызвать резонансный переход атома из основного состояния в возбужденное. На этой особенности и строится метод атом-

но-абсорбционной спектроскопии, которая отличается от АЭС тем, что аналитическим сигналом в данном случае служит активность невозбужденных атомов, то есть их способность поглощать излучение (в методе АЭС, напротив – используется способность возбужденных атомов это излучение вызывать).

Количество атомов, находящихся в основном энергетическом состоянии, во много раз превышает число возбужденных атомов, из чего следует, что величина аналитического сигнала, получаемого ААС-анализатором, оказывается связанной с большим числом атомов, чем в эмиссионной спектроскопии. В связи с этим, метод ААС принято считать более стабильным (по сравнению с той же АЭС) и менее подверженным влиянию случайных колебаний в режиме работы различных узлов атомно-абсорбционного спектрометра [10, с. 92-93].

Принцип ААС основан на определении оптической плотности (A) атомного пара в соответствии с основным законом светопоглощения (103). Величина A оказывается в прямо пропорциональной зависимости от концентрации поглощающих частиц ($c_{ат}$), применительно к ААС можно записать выражение:

$$A = k_{ат} l c_{ат} \quad (148),$$

где $k_{ат}$ – коэффициент поглощения света свободными атомами; l – длина оптического пути (толщина слоя атомного пара).

При задании всех необходимых параметров в атомизаторе для анализа конкретного вещества, получается, что концентрация атомов $c_{ат}$ будет прямо пропорциональна концентрации определяемого компонента c в пробе, то есть $c_{ат} = \alpha c$. Таким образом, становится справедливым выражение:

$$A = k_{ат} \alpha l c_{ат} = k l c \quad (149),$$

где $k = k_{ат} \alpha$.

Коэффициент k (по аналогии с коэффициентом b в методе АЭС) является сугубо эмпирической величиной, которую находят исходя из условий анализа и режима прибора, а также опытным путем – с помощью градуировочного графика [43, с. 113-114].

Данный метод так же не обходится без спектральных помех, влияющих на результаты анализа. Однако, здесь их наблюдается меньше, на интенсивность аналитического сигнала влияют лишь излучение и поглощение фона.

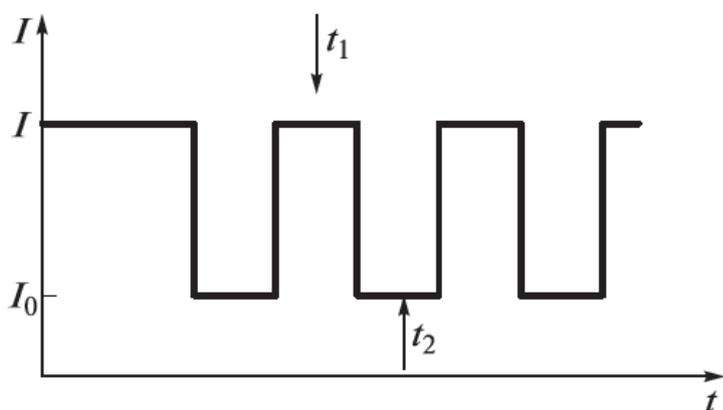


Рис. 62. Схема модуляции светового потока в атомно-абсорбционной спектроскопии [43, с. 118]

С фоновым излучением справляются с помощью специального устройства — *модулятора*, который позволяет направлять поток излучения на пробу не в непрерывном режиме, а импульсами (таким способом осуществляется модуляция — периодическое изменение интенсивности светового

потока). Рис. 62 отображает временную зависимость интенсивности света на выходе из атомизатора. В момент времени t_1 регистрируется суммарная интенсивность излучения ($I + I_0$). В момент времени t_2 происходит регистрация только фонового излучения (I_0). Для того, чтобы нивелировать влияние фона на ход анализа, производят вычитание этой величины из суммарной интенсивности зарегистрированного светового потока.

Поглощение фона является не менее сложной проблемой, но и ее влияние можно скорректировать. Находящиеся в атомизаторе молекулы имеют более широкополосные спектры поглощения по сравнению с анализируемыми атомами, поэтому наблюдаются эффекты наложения этих примесей на изучаемые более узкие спектры компонентов пробы. Кроме того, возможное присутствие микроскопических частиц в условиях анализа могут приводить к значительному светорассеянию излучения от источника. Различия в ширине спектральных полос анализируемого вещества и фона используют с целью устранения влияния фонового поглощения. Для этого проводят дополнительное освещение пробы источником непрерывного излучения — как правило, дейтериевой лампой, отчего данный способ получил название *дейтериевой коррекции фона*. Излучение дейтериевой лампы является не монохроматичным, поглощается оно преимущественно молекулами веществ, атомы же практически его не поглощают. Поэтому имеется возможность измерить эту разницу в сигналах от

обоих источников света и таким образом скомпенсировать влияние фонового излучения на ход анализа.

В современной практике для компенсации фона также пользуются способом, основанном на *обратном эффекте Зеемана*. Для этого в конструкцию спектрофотометра встраивается сильный электромагнит, между полюсами которого помещают атомизатор или источник излучения. Под действием магнитного поля вследствие эффекта Зеемана происходит расщепление атомной линии поглощения на компоненты с различной поляризацией. Полосы, вызванные молекулярной абсорбцией не обладают способностью к поляризации в магнитном поле (т.е. не подвергаются эффекту Зеемана), таким образом и осуществляется компенсация погрешности, создаваемой фоновым излучением.

Эффекты, связанные с наложением атомных спектральных линий, практически исключены в ААС, так как в условиях атомно-абсорбционного анализа число линий в спектре поглощения значительно меньше, чем количество спектральных линий испускания в методе эмиссионной спектроскопии.

Из физико-химических помех наиболее распространенными в методе ААС являются неполнота атомизации и ионизация. Приемы борьбы с ними примерно те же, что и в АЭС – это регулирование температуры атомизации и применение модификаторов матрицы или спектроскопических буферов. Особенно эффективную борьбу с физико-химическими помехами можно проводить в спектрометрах с термоэлектрическим атомизатором, осуществляя термическую подготовку пробы. Измерения на нем проходят в несколько этапов, согласно температурной программе (рис. 63): 1 этап – высушивание, 2 – озоление, 3 – атомизация и 4 – отжиг. На каждом этапе подбираются условия, оптимальные для прохождения преимущественно одного

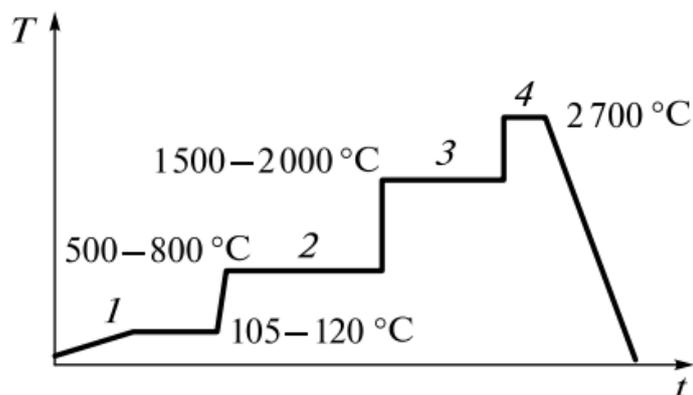


Рис. 63. Температурная программа электротермического атомизатора [43, с. 120]

процесса. Стадия *высушивания* необходима для испарения растворителя. *Озоление* аналогично обесквиванию в АЭС, служит оно для удаления из пробы более летучих по сравнению с определяемым элементом компонентов. Непосредственно измерение аналитического сигнала производят на стадии *атомизации*. Последний этап (*отжиг*) предназначен для регенерации поверхностей атомизатора, очистки его от наиболее труднолетучих компонентов, поэтому его проводят при максимально возможной температуре [43, с. 118-120].

Для обеспечения максимальной чувствительности метода и высокой селективности анализа А. Уолшем (изобретателем ламп с полым катодом) были введены два правила атомно-абсорбционного анализа:

1) длина волны от источника излучения должна в точности соответствовать длине волны аналитической линии определяемого элемента;

2) ширина волны линии испускания должна быть не менее чем в два раза меньше ширины линии поглощения анализируемого элемента.

Несоблюдение первого правила приведет к тому, что определяемый элемент не будет найден (аналитический сигнал будет нулевой). Второе правило так же важно, если ему не следовать, то только часть энергии испускания будет поглощена анализируемыми частицами, оставшаяся значительная доля излучения дойдет до детектора, что приведет к уменьшению оптической плотности и снижению точности определения.

Практическая реализация и применение атомно-абсорбционной спектроскопии

Для реализации метода атомно-абсорбционной спектрометрии используют специальные анализаторы, представляющие собой спектрометры со следующими основными узлами в составе установки (рис. 64):

- 1) *источник излучения;*
- 2) *атомизатор (или пламя);*
- 3) *монохроматизатор;*
- 4) *приемник света;*
- 5) *анализируемая проба.*

Источник излучения в ААС должен излучать практически монохроматический свет, так как определение интенсивности спектральных линий свободных атомов возможно производить лишь в достаточно узком диапазоне – порядка 10^{-3} – 10^{-2} нм. В настоящее время в качестве источников излучения наиболее широко используются два типа разрядных ламп – лампы с полым катодом и безэлектродные разрядные лампы.

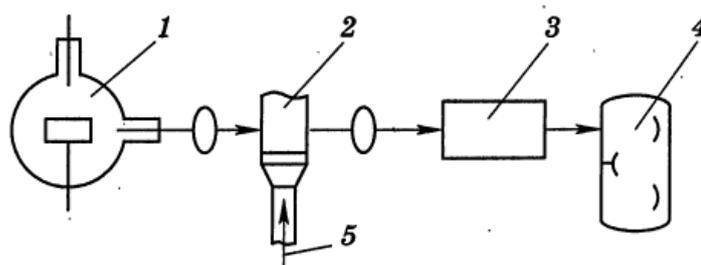


Рис. 64. Схема атомно-абсорбционного спектрометра с пламенным атомизатором [10, с. 93]:
1 – источник излучения; 2 – пламя; 3 – монохроматизатор; 4 – приемник света; 5 – анализируемая проба

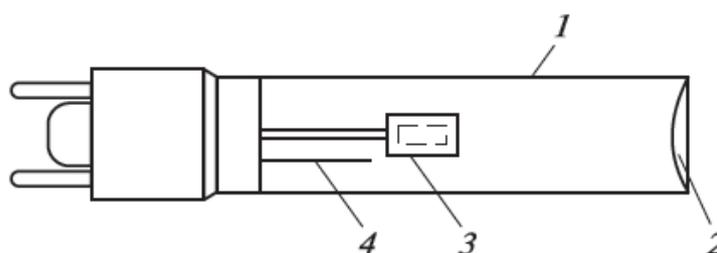


Рис. 65. Лампа с полым катодом [10, с. 93]:
1 – корпус; 2 – оптическое окошко; 3 – катод;
4 – анод

В основе лампы с полым катодом лежит кварцевый или стеклянный полый баллон, внутри которого располагаются два электрода (катод и анод) в среде инертного газа под низким давлением (рис. 65). Катод изготавливается из чистого металла (концентрация которого, собственно, и анализируется в пробе) и имеет форму чаши. При подаче напряжения на электроды возникает тлеющий заряд, инициирующий образование положительно заряженных ионов газа-наполнителя. Эти ионы, в свою очередь, бомбардируют катод, выбивая атомы металла, из которого тот сделан, в газовую фазу. Оказавшись выбитыми, они возбуждаются и испускают излучение, характерное для свободных атомов определяемого элемента. Таким образом, лампы с полым катодом обеспечивают очень узкие линии источника излучения, а с помощью монохроматизатора можно выделить одну, самую интенсивную и использовать ее для определения соответствующего элемента.

Безэлектродные разрядные лампы применяют преимущественно для анализа неметаллов, таких как мышьяк, селен, фосфор и летучих

металлов (ртуть, рубидий, цезий). В их основе лежит возбуждение воздействием микроволнового поля чистого элемента (который содержится в лампе в небольших количествах), переведенного в состояние атомного пара.

У разрядных ламп обеих конфигураций имеется один существенный недостаток – определять с помощью такой лампы можно только один элемент. «Многофункциональные» лампы с катодом из сплава нескольких элементов имеют худшие эксплуатационные характеристики, нежели их одноэлементные аналоги. В настоящий момент активно идут разработки по усовершенствованию источников излучения, например, есть успехи в создании особо мощных ксеноновых ламп, дающих непрерывный спектр в сочетании с монохроматограмами с высокой разрешающей способностью. Разрабатываются лазеры с перестраиваемой частотой с использованием красителей и полупроводниковых диодов. Такие лазеры способны выдавать чрезвычайно монохроматичное излучение, с помощью которого можно определять даже изотопы элементов, ничтожно различающихся между собой положениями спектральных линий. Однако, при всех возможных вариантах наиболее широко используемыми источниками возбуждения все же остаются лампы с полым катодом и безэлектродные разрядные лампы [43, с. 116–117].

Следующим узлом, без которого не мыслим атомно-абсорбционный анализ, является атомизатор. Для атомизации в рамках ААС не требуются высокие температуры, так как отпадает необходимость в возбуждении атомов, достаточно перевести их в атомарное состояние. Поэтому температуры в них достигаются небольшие, относительно АЭС, порядка 800–3000°С. Для атомизации проб в методе атомно-абсорбционной спектроскопии используют в основном два источника – это пламя и термоэлектрические атомизаторы.

Пламенный атомизатор так же представляет собой горелку, только устроена она иначе, чем в методе АЭС. Для атомизации используется пламя в виде вытянутой узкой щели и обеспечивается оно с помощью щелевых горелок (рис. 6б). Таким образом, достигаются оптимальные параметры пламени – увеличивается длина оптического пути и, следовательно, увеличивается интенсивность аналитического сигнала.

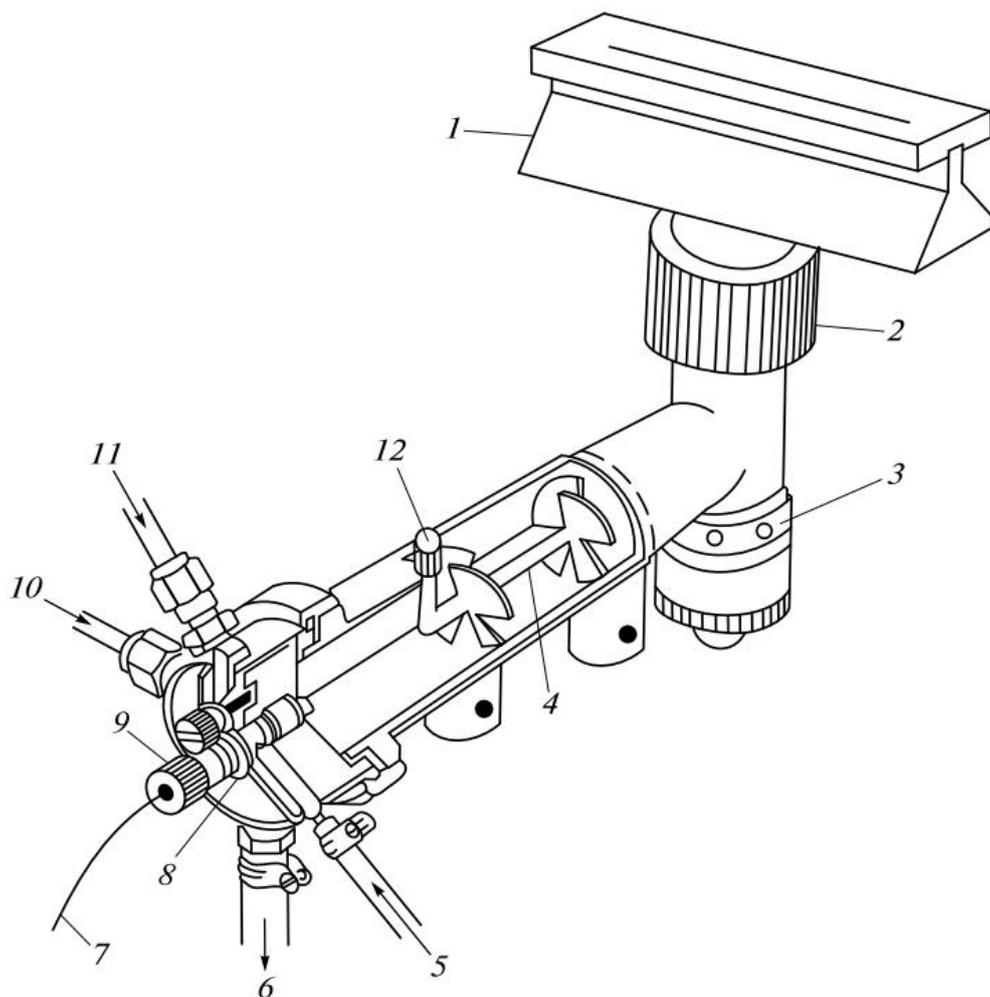


Рис. 66. Горелка каменного типа с щелевой насадкой [43, с. 115]:

1 – насадка горелки; 2 – запорное кольцо насадки горелки; 3 – отверстие для уравнивания давления; 4 – крыльчатка; 5 – окислитель (распыляющий газ); 6 – сток; 7 – капилляр для ввода пробы; 8 – распылитель; 9 – регулировка распылителя; 10 – топливо; 11 – дополнительный окислитель; 12 – стопорный винт клетчатки

Достоинства и недостатки у пламенной ААС те же, что и у эмиссионной разновидности спектрального анализа – высокая стабильность режима работы сочетается с низкой эффективностью атомизации вследствие быстрой скорости прохождения раствора пробы через атомизатор и малого времени нахождения ее в условиях высокой температуры.

Электротермические атомизаторы представляют собой небольшую трубку, сделанную из графита (рис. 67). Диаметр ее не превышает 1 см, длина – нескольких сантиметров. В центре располагается отверстие для ввода жидких (с помощью микродозатора) или твердых проб. Такая графитовая кювета нагревается до высоких темпера-

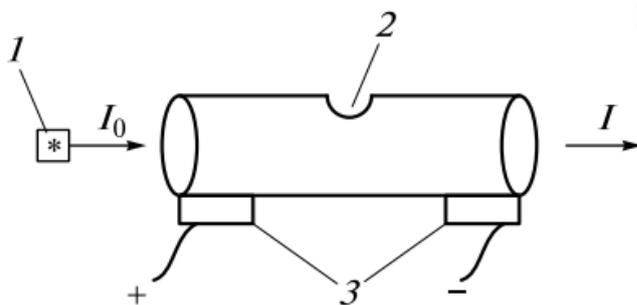


Рис. 67. Схема электротермического атомизатора для атомно-абсорбционной спектроскопии [43, с. 115]:

1 – источник излучения; 2 – отверстие для ввода пробы; 3 – электрические контакты

тур посредством пропускания через нее электрического тока большой силы. Атомизатор помещают в атмосферу инертного газа (как правило, аргона) для предотвращения быстрого выгорания графита.

Электротермическая атомизация по сравнению с пламенной обладает более высокими эксплуатационными характеристиками.

Графит, из которого состоит атомизатор, проявляет восстановительные свойства, благодаря чему способствует более полной диссоциации устойчивых оксидов многих элементов. Кроме того, атомы определяемого элемента находятся в атомизаторе более продолжительное время, нежели в случае с пламенной ААС. Повышенная эффективность атомизации привела к значительному увеличению чувствительности метода. Также положительной чертой использования графитовых печей является незначительный объем пробы – 5-50 мкл (а для пламенной разновидности ААС требуется несколько миллилитров). С помощью модификаторов матрицы устраняют потери определяемого элемента на различных стадиях температурной программы атомизации, да и температура на каждом этапе устанавливается и контролируется с высокой точностью [43, с. 114-116].

Таким образом, оба метода атомизации довольно сильно отличаются друг от друга характеристиками. Использование пламенного атомизатора позволяет определять концентрацию элементов вплоть до 10^{-6} – 10^{-4} мас. %, в электротермическом варианте чувствительность на несколько порядков выше – 10^{-9} – 10^{-7} мас. %. Воспроизводимость результатов в разы больше, чем в эмиссионной спектроскопии, обеспечивается это тем, что температура атомизации практически не влияет на невозбужденные атомы, следовательно, и аналитический сигнал оказывается более стабильным. В АЭС аналитический сигнал формируется возбужденными атомами, на которые огромное влияние оказывает температура, поэтому имеют место многочисленные физи-

ко-химические и спектральные помехи, мешающие определению. Метод ААС обладает высокой селективностью, по сравнению АЭС, так как определению практически не мешают спектральные помехи (наложение спектральных линий наблюдается крайне редко), а физико-химические помехи успешно устраняются рассмотренными выше приемами.

В качестве монохроматизаторов используют призмы или дифракционные решетки. Приемниками света выступают фотоэлементы и фотоумножители [10, с. 94].

Метод атомно-абсорбционной спектрометрии очень удобен для *количественного анализа* большинства металлов. В ходе количественных определений выполняют следующие операции:

1. Приготовление растворов пробы и стандартного раствора, их введение в пламя горелки в виде аэрозоля или испарение в электротермическом атомизаторе с целью создания светопоглощающего атомарного пара.

2. Подача излучения от источника света на образовавшийся атомарный пар.

3. Разложение света посредством монохроматизатора с целью идентификации линии поглощения.

4. Измерение степени поглощения (оптической плотности) выделенной спектральной линии для опытных и стандартных растворов.

5. Построение градуировочного графика и расчет концентрации определяемого компонента.

В рамках количественных определений с помощью атомно-абсорбционного анализа принято руководствоваться двумя методами. *Метод градуировочного графика* (или метод внешних стандартов) осуществляется с помощью приготовления стандартных растворов с различными концентрациями (C) определяемых веществ, с последующим измерением их оптической плотности (A) и построением графика зависимости $A - C$. Затем производят определение оптической плотности анализируемых растворов и по графику находят концентрацию в них определяемых компонентов.

Методом добавок удобно пользоваться, так как ААС преимущественно используется для анализа растворов. Вначале измеряют оптическую плотность исследуемого раствора, затем добавляют туда

строго определенный объем стандартного раствора и снова измеряют величину A . Затем подсчетами или с помощью построения градуировочного графика определяют концентрацию определяемого компонента в первоначальном растворе.

Атомно-абсорбционная спектрометрия непригодна для осуществления качественного анализа, так как для определения каждого элемента необходим свой источник излучения, следовательно, многоэлементный анализ осуществить в рамках данного метода невозможно [10, с. 96].

Атомно-абсорбционная спектрометрия используется для исследования множества объектов как природного, так и техногенного происхождения. Он пригоден для анализа металлов, сплавов, металлических руд и т.д. Метод чувствителен и позволяет определить концентрацию серебра, свинца, меди и некоторых других металлов вплоть до 10^{-4} мас. %. Широко используется ААС в исследованиях экологической направленности – при анализе концентрации металлических элементов в почвах, удобрениях, растениях, таким способом удается определить содержание порядка 10^{-4} и даже 10^{-5} мас. %. Биологические и клинические анализы также возможно производить посредством метода атомно-абсорбционной спектроскопии, например, в крови или в сыворотке (и др. биологических жидкостях) устанавливают таким образом наличие ртути, висмута, свинца и др. элементов [10, с. 97].

Контрольные вопросы

1. Что понимают под методом атомно-абсорбционной спектрометрии?
2. На каких физико-химических законах основан данный метод?
3. Каким образом избавляются от спектральных помех, возникающих в ходе измерений?
4. Чем примечателен способ коррекции фона, основанный на обратном эффекте Зеемана?
5. Какие физико-химические помехи характерны для измерений посредством ААС?
6. На какие этапы рассчитана температурная программа, задаваемая при электротермической атомизации?

7. Как формулируются правила Уолша для абсорбционной спектрометрии?

8. Назовите основные узлы атомно-абсорбционного спектрометра.

9. Какие устройства используются в качестве источника излучения? Назовите их особенности.

10. Как устроен электротермический атомизатор? В чем его достоинства и недостатки в сравнении с пламенным способом атомизации?

11. Каким образом осуществляются количественные определения методом ААС? Есть ли возможность его использования для качественного анализа?

3.5. АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Теоретические основы атомно-эмиссионного спектрального анализа

Метод *атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС)* основан на термическом возбуждении свободных атомов или одноатомных ионов и последующей регистрации оптического спектра испускания возбужденных атомов.

В основе метода лежит процесс испарения и диссоциации исследуемых веществ на атомы и ионы, которые возбуждаются и дают спектр испускания (эмиссионный спектр). Процесс перехода атомов из основного состояния в возбужденное подробно описан в главе 3.2. Осуществляется он за счет изменения энергии атомов в результате воздействия на них специальными приборами – атомизаторами. Свет, излучаемый возбужденными атомами, при помощи спектрального прибора разлагается в эмиссионный спектр, состоящий из набора отдельных спектральных линий (т.н. линейчатый спектр). Анализируя характеристические линии в спектре, можно идентифицировать элементы, находящиеся в пробе (качественный спектральный анализ), а по интенсивностям этих линий – определять концентрацию элемента в исследуемом образце (количественный спектральный анализ) [57, с. 3].

В ходе анализа определяют величину I – интенсивность испускаемого излучения (измерение интенсивности испускания производят для каждого элемента отдельно). Возбужденные и невозбужденные атомы находятся в термодинамическом равновесии, которое описывается *законом распределения Больцмана*:

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^*}{g_0} e^{-\frac{E}{kT}} \quad (150),$$

где N^* – число возбужденных атомов; N_0 – число невозбужденных атомов; g^* , g_0 – статистический вес соответственно возбужденного и невозбужденного состояния; E – энергия возбуждения; k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура.

Согласно формуле (150) число возбужденных частиц (N^*) должно быть пропорционально числу невозбужденных частиц (N_0), однако в реальных условиях N^* пропорционально общему числу N данных атомов в атомизаторе, вследствие того, что в условиях атомно-эмиссионного анализа доля возбужденных частиц очень мала $N^* \ll N_0$. При заданных условиях атомизации, предусмотренных конструкцией прибора и прочими факторами, число атомов N будет прямо пропорционально концентрации анализируемого вещества C в пробе. Таким образом, логично предположить, что концентрация C вещества в пробе будет находиться в прямо пропорциональной зависимости от интенсивности испускаемого излучения I . Однако, на практике эта зависимость устанавливается далеко не всегда.

Поэтому было выведено основное количественное уравнение атомно-эмиссионного анализа, определяющее нелинейную зависимость интенсивности излучения от концентрации анализируемого вещества, *т.н. уравнение Ломакина-Шайбе*:

$$I = aC^b \quad (151),$$

где a – сугубо эмпирическая величина, зависящая от условий процесса атомизации; b – коэффициент самопоглощения [43, с. 99-100].

Нелинейность зависимости между интенсивностью испускания и концентрацией элемента в пробе объясняется несколькими причинами. Во-первых, это спектральные помехи, связанные с взаимодействием вещества с излучением. Во-вторых, это физико-химические помехи, куда входят характер взаимодействия веществ между собой,

неполное испарение пробы, низкая эффективность распыления и другие факторы.

К *спектральным помехам* можно отнести явление светопоглощения, излучение и поглощение фона, а также явление наложения атомных спектральных линий.

Коэффициент самопоглощения необходим для характеристики интенсивности излучения, которое при постоянной температуре меняется линейно в зависимости от концентрации вещества, а далее, при переходе к большим концентрациям, наблюдается замедление роста интенсивности по сравнению с ростом концентрации. Это связано с явлением *самопоглощения света*.

Фотон, излучаемый атомом в ходе релаксационного процесса, прежде чем покинуть источник света, может быть поглощен атомом того же вещества, который в результате перейдет на более высокий энергетический уровень. Таким образом, чем больше концентрация вещества в пробе, тем чаще может происходить такое поглощение. Поэтому на графике спектра испускания может наблюдаться замедление роста интенсивности спектральной линии при увеличении концентрации вещества. В уравнении (151) коэффициент b будет равен 1, если концентрация вещества в пробе мала, с ростом же концентрации величина b будет уменьшаться ($b < 1$) [57, с. 4].

В связи с тем, что в атомизаторе помимо атомов и ионов находятся также и молекулы, то при высоких температурах и они могут испускать излучение в оптическом диапазоне. Такое излучение, по сути, мешающее измерению, называют *фоновым*. При возникновении интенсивных фоновых помех, дальнейшее использование и интерпретация спектра испускания становятся затруднительными. Однако, при малой интенсивности фонового излучения существует способ его скомпенсировать. Для этого производят измерение фонового излучения в диапазоне, максимально приближенном к изучаемой спектральной линии, а затем вычитают его из интенсивности этой спектральной линии.

Так как каждый элемент имеет свой спектр испускания, характеризующийся огромным количеством линий, отвечающих различным переходам из возбужденного состояния в основное, то при использовании метода атомно-эмиссионной спектроскопии может наблюдаться *явление наложения атомных спектральных линий*. Ве-

роятность наложения характеристических спектральных линий различных элементов достаточно высока, поэтому при работе в рамках данного метода рекомендуют использовать линии спектра, свободные от наложений. Кроме того, спектральные помехи такого рода имеют аддитивный характер, это означает, что аналитический сигнал, регистрируемый прибором, состоит из суммы сигналов как определяемых в пробе компонентов, так и нежелательных примесей. Поэтому при выборе способа градуировки для количественных измерений рекомендуется учитывать и эту особенность атомно-эмиссионного анализа.

Физико-химические помехи являются важными факторами, которые необходимо учитывать при использовании метода АЭС. Связаны они с процессами, происходящими с веществом в атомизаторе при высоких температурах. Сама *температура* атомизации непосредственно влияет на аналитический сигнал, так как от нее зависит количество возбужденных частиц в соответствии с уравнением Больцмана (150). Увеличение температуры благоприятствует атомизации и возбуждению атомов, но в то же время увеличивает и их ионизацию, которая в свою очередь мешает нормальному определению спектральных характеристик веществ. Для каждого компонента пробы характерна своя температура атомизации и чем легче он атомизируется, возбуждается и ионизируется, тем ниже должна быть температура, создаваемая атомизатором.

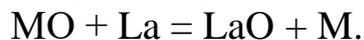
Следующее условие, от которого зависит эффективность использования метода – это *полнота испарения и атомизации пробы*. Неполное прохождение этих процессов непосредственно влияют на результат измерений, например, при использовании пламенных атомизаторов. Объясняется это тем, что температура в них относительно невысока, раствор пробы подается с большой скоростью, следовательно, сама проба находится в атомизаторе непродолжительное время. Конструкция спектрометра, его режим работы оказывают значительное влияние на полноту атомизации. Чтобы скомпенсировать эти недостатки в пробу вводят различные добавки, например, поверхностно-активные вещества, которые способствуют уменьшению вязкости раствора и увеличению его способности к диспергированию.

Ионизация, являясь эндотермическим процессом (с увеличением температуры увеличивается и ионизация), конкурирует с процессом

возбуждения и тем самым снижает интенсивность аналитического сигнала. Особенно заметен этот процесс в отношении легкоионизирующихся элементов, таких как натрий, калий, кальций и др. Существует несколько приемов подавления излишней ионизации для нормализации условий измерения. Часто прибегают к изменению температуры атомизатора, а также к использованию специальных спектроскопических буферов. В случае с изучением твердых образцов (например, с использованием электроразрядных атомизаторов) применяют приемы, связанные с предварительным удалением мешающих примесей, т. е. осуществляют обжиг или обыскривание.

Для устранения перечисленных выше мешающих факторов при некоторых измерениях прибегают к использованию *модификаторов матрицы*. Это вещества, специально добавляемые к пробе для стабилизации ее параметров, изменения физических свойств образца или модификации среды атомизатора, с целью увеличения концентрации свободных атомов и соответственно усиления аналитического сигнала.

Например, для атомизации особо труднодиссоциирующих оксидов кремния, алюминия, бария и др. к пробе добавляют соединения лантана, которые в газовой среде образуют устойчивые оксиды:



Таким образом, обеспечивают более полную атомизацию элемента М.

Вещества, которые применяют для стабилизации среды атомизатора (оптимизация температуры, вязкости и др.) носят название *спектроскопических буферов*. К примеру, соли щелочных металлов применяют для поддержания на постоянном уровне температуры дугового или искрового разряда, тем самым энергия, подводимая к анализатору, тратится не на повышение его температуры, а на испарение, диссоциацию и ионизацию вещества-буфера.

Еще один метод, к которому прибегают при работе с АЭС на принципах электроразрядных атомизаторов – это *обжиг* (для дугового разряда) и *обыскривание* (для искрового). Сущность данных приемов – предварительное (до регистрации спектра) кратковременное пропускание через анализируемые образцы электрического разряда соответствующей природы. В результате происходит устранение более летучих по сравнению с анализируемым веществом мешающих компонентов. Например, при анализе сталей таким образом удаляют-

ся углерод, сера, фосфор и др. примеси, в результате чего происходит уменьшение матричных эффектов, а точность результатов и величина аналитического сигнала, соответственно, увеличиваются.

Таким образом, точность, воспроизводимость и чувствительность методов АЭС зависит от способа и условий атомизации, а также от природы пробы и валового содержания в ней определяемых веществ. Наиболее свободным от физико-химических помех принято считать метод ИСП, вследствие создаваемых им высоких температур, способствующих наиболее полной атомизации даже самых трудно-диссоциируемых соединений. Важнейшей особенностью этого метода также является возможность изоляции пробы от окружающей среды посредством инертного газа – аргона. Для характеристики вклада различных помех физико-химической природы в аналитический сигнал служит коэффициент a в уравнении (151). Эти помехи носят мультипликативный характер, то есть они не вносят собственного вклада в аналитический сигнал, но их наличие так или иначе приводит к пропорциональному изменению величины I (как правило, к ее уменьшению). С этой погрешностью успешно справляются, используя метод добавок [43, с.104-110].

Практическая реализация и применение атомно-эмиссионной спектроскопии

Для реализации атомно-эмиссионного метода анализа используют специальные приборы – спектрометры. В их конструкции предусмотрено наличие следующих узлов:

- 1) источник возбуждения;
- 2) диспергирующий элемент;
- 3) регистрирующее устройство (фотопластинки, фотоэлементы и фотоумножители).

Возбуждение анализируемого вещества происходит в *атомизаторах*. Важнейшей их характеристикой является температура. От температуры атомизации зависят физико-химические параметры анализируемого вещества, что в свою очередь влияет на точность определения и интенсивность аналитического сигнала. На настоящий момент в качестве источников возбуждения используют пламя, электри-

ческую дугу и искру, индуктивно связанную плазму и т.н. тлеющий разряд Гримма.

Атомно-эмиссионная спектроскопия, основанная на использовании пламени получила название *метода эмиссионной фотометрии пламени*.

Конструктивно пламенный атолизатор представляет собой горелку (рис. 68). Анализируемую пробу (раствор) подают в пламя, распыляя с помощью форсунки.

В пламени различают восстановительную и окислительную зоны (рис. 69). *Восстановительную* зону для аналитических целей не используют, так как здесь протекают первичные реакции термической диссоциации и сгорания компонентов горючей смеси. Содержащиеся в этой зоне многочисленные возбужденные молекулы и свободные радикалы, интенсивно излучают свет практически во всем УФ и видимом диапазонах. Это излучение накладывается на линии испускания анализируемых атомов, что усложняет анализ.

В *окислительной* зоне происходит полное сгорание компонентов смеси с образованием H_2O и CO_2 . Именно эту зону используют для аналитических целей,

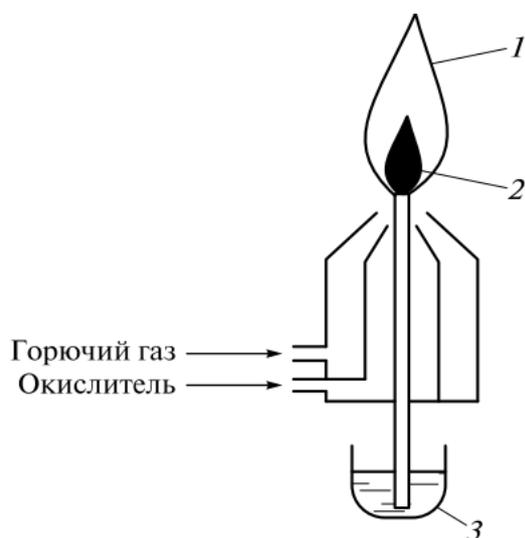


Рис. 68. Схема пламенного атолизатора для атомно-эмиссионной спектроскопии [43, с. 101]:

- 1 – пламя;
- 2 – распыленная проба;
- 3 – проба

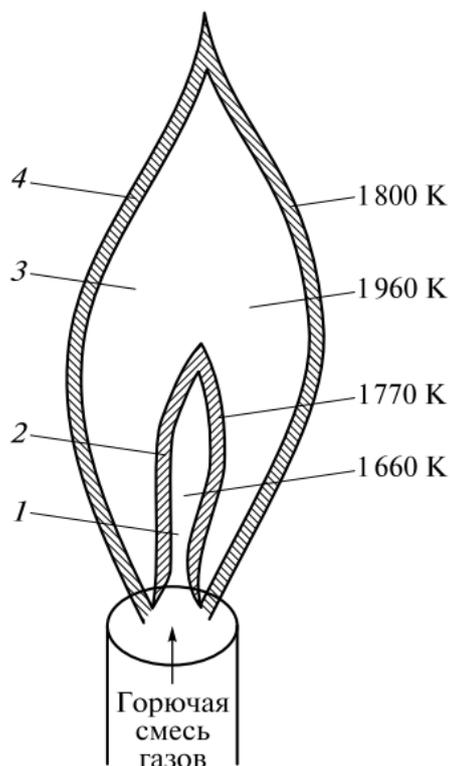


Рис. 69. Распределение температуры по зонам пламени смеси светильного газа с воздухом [43, с. 101]:

- 1 – восстановительная зона;
- 2 – внутренний корпус;
- 3 – окислительная зона;
- 4 – внешний конус

так как она практически не излучает свет в видимом и УФ диапазонах. Температуру горения, состав и окислительно-восстановительные свойства пламени можно в некоторой степени регулировать подачей в разных соотношениях горючего газа и окислителя в смеси. Это обстоятельство способствует выбору оптимальных условий атомизации и устранению возможных погрешностей.

Пламя является одним из самых стабильных и предсказуемых источников атомизации, дает хорошую воспроизводимость результатов измерений. В зависимости от состава горючей смеси температура пламени может составлять от 1500 до 3000°C, таким образом пламя является самым низкотемпературным источником атомизации, используемым в АЭС. Однако, концентрацию не всех элементов можно определять используя пламенные атомизаторы, а только наиболее легко атомизируемых и возбудимых, каковыми являются преимущественно щелочные и щелочноземельные металлы (такие как кальций, стронций, барий). Предел обнаружения именно для этих элементов составляет до 10^{-7} мас. %. Для большинства других веществ предел обнаружения обычно на несколько порядков выше [43, с. 101–102].

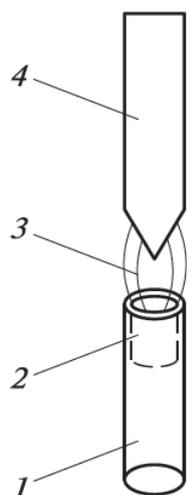


Рис. 70. Схема дугового (искрового) атомизатора для атомно-эмиссионной спектроскопии [43, с. 102]:

- 1 – нижний электрод;
- 2 – углубление для пробы;
- 3 – зона электрического разряда;
- 4 – верхний электрод

В АЭС также используют менее точную и воспроизводимую (по сравнению с пламенем) *электрическую дугу*. Дуговой атомизатор представлен двумя электродами, между которыми пропускают электрический разряд (рис. 70). В нижнем электроде предусмотрено углубление, предназначенное для размещения пробы. Твердую пробу помещают непосредственно в это углубление, растворы же предварительно испаряют в присутствии инертного порошкообразного материала (коллектора), а затем помещают в пробоприемник. Таким образом, дуговой разряд оказывается наиболее удобным для анализа твердых образцов.

Температуры атомизации дуговым разрядом (порядка 3000–7000 °С) вполне хватает для эффективного возбуждения большинства химических элементов (кроме галогенов, т.к. они являются одними из наиболее трудновозбудимых частиц). Однако, предел обнаружения при таком способе атомизации ниже, чем в пламени, и составляет примерно 10^{-4} – 10^{-2} мас. %. Это наиболее удачный выбор для качественного анализа элементов на основе обзорного спектра. Для реализации других задач дуговая атомизация обладает меньшей эффективностью [43, с. 102].

Атомизация с помощью *электрической искры* реализована в искровых атомизаторах (рис. 70). В целом, они ничем не отличаются от дуговых атомизаторов, поэтому дуговые и искровые разряды могут осуществляться в рамках одного и того же устройства. С помощью переключения электрической схемы исследователь может поменять характер разряда. Искровой разряд гораздо стабильнее дугового, что повышает соответственно и воспроизводимость результатов измерений. Данный способ возбуждения также более подходит для анализа твердых проб. Эффективная температура искрового разряда очень велика – порядка 10 000 °С, что позволяет производить возбуждение даже особо устойчивых к такому воздействию галогенов.

Наиболее современным, универсальным и достаточно точным методом атомизации в настоящий момент является использование *индуктивно связанной плазмы (ИСП)*. Наряду с достоинствами он имеет и существенный недостаток – высокая стоимость оборудования и расходных материалов (особо чистый аргон) сдерживает широкое использование этого метода в аналитической практике. Атомизатор, построенный на данном принципе, представляет собой горелку особой конструкции, состоящей из нескольких концентрических кварцевых трубок. Через них с большой скоростью подают потоки особо чистого аргона. На рис. 71 обозначением Ar(пр.) отмечен внутренний поток, который служит для впрыскивания раствора пробы, Ar(пл.) – т.н. плазмообразующий поток, а Ar(охл.) – это самый мощный поток, предназначенный для охлаждения ИСП-горелки (расход аргона здесь составляет до 10–20 л/мин). В последнее время стали популярными ИСП-атомизаторы с водяным охлаждением, позволяющим более экономно расходовать аргон (рис. 71, б). В горелках обеих конфигураций искровой разряд инициирует в плазмообразующем контуре первые

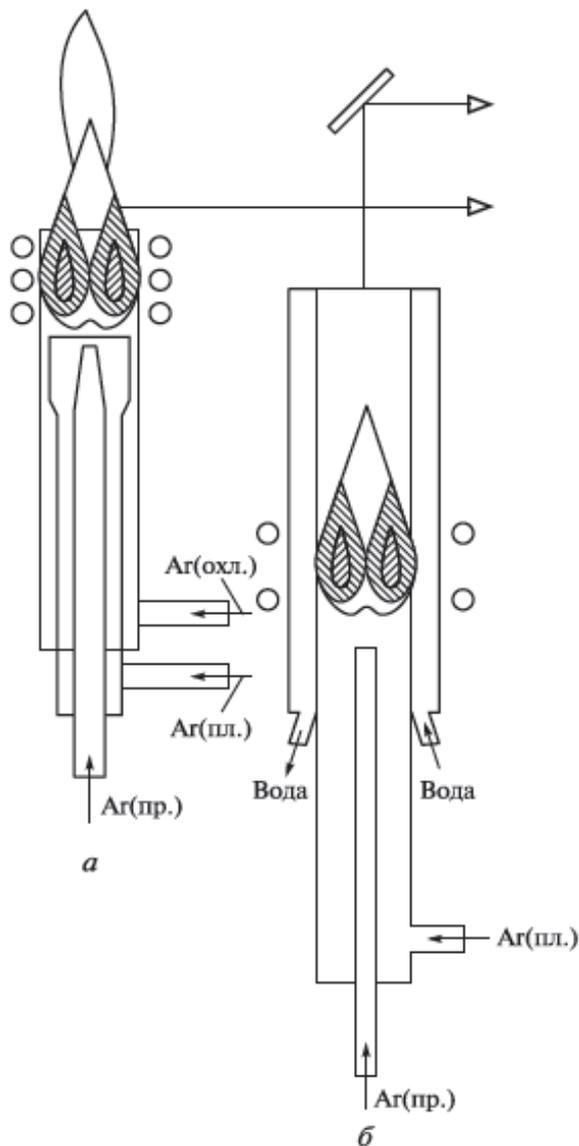


Рис. 71. Схема атомизатора с индуктивно связанной плазмой [43, с. 103]:

а – горелка, охлаждаемая потоком газа;
б – водоохлаждаемая горелка

ионизируется. В результате ионизации образуются катионы аргона и свободные электроны. Ионы аргона выбивают атомы из изучаемой пробы (катода) в газовую фазу. В прикатодном пространстве выбитые атомы начинают возбуждаться вследствие бомбардировки электронами высокой кинетической энергии. С этого момента начинает наблюдаться свечение, получившее название *свечения отрицательного промежутка*. Оно и дает информацию о спектральных линиях элементов, находящихся в пробе. Данный метод отличается неплохой

положительные ионы аргона и электроны. Сильный кольцевой ток в аргоне, возникающий благодаря магнитному полю, создаваемому высокочастотной индуктивной катушкой, приводит к нагреву до 5000–12 000°C. Высокая чувствительность (10^{-8} – 10^{-2} мас. %), воспроизводимость, широкий диапазон определяемых концентраций делает метод ИСП-атомизации наиболее приоритетным и в то же время дорогостоящим в аналитической практике.

В атомизаторах, основанных на принципе *тлеющего разряда*, используется свечение, возникающее при низком давлении газа и малых токах в прикатодном пространстве тлеющего газового разряда. В данном случае катодом служит изучаемый образец. Атомизатор заполняется инертным газом (обычно аргоном), который в условиях электронного удара

воспроизводимостью, сравнимой с характеристиками искрового разряда, небольшой температурой порядка 1000–2000 °С и чувствительностью около 10^{-4} – 10^{-3} мас. %, однако, он не столь универсален, так как изучаемая проба должна иметь достаточную проводимость, чтобы ее можно было использовать в качестве катода. Поэтому атомизацию тлеющим разрядом используют преимущественно при анализе металлических материалов [43, с. 102–104].

Второй принципиальной особенностью приборов, предназначенных для атомно-эмиссионной спектроскопии, является наличие *диспергирующего элемента*. Предназначен он для разложения эмиссионного излучения в спектр. Диспергирующий элемент имеет важнейшие особенности, от которых зависит точность и основные характеристики АЭС-спектрометра – это линейная дисперсия и разрешающая способность. Кроме того, диспергирующий элемент обладает *угловой дисперсией*, которая определяется как угловое расстояние $\Delta\varphi$ между двумя лучами с близкими длинами волн λ_1 и λ_2 , отнесенное к интервалу $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$, т.е.

$$D_\varphi = \frac{\Delta\varphi}{\Delta\lambda} = \frac{d\varphi}{d\lambda} \quad (152).$$

Линейная дисперсия, в свою очередь, зависит от угловой дисперсии:

$$D_l = \frac{\Delta l}{\Delta\lambda} = \frac{dl}{d\lambda} \quad (153),$$

где Δl – линейное расстояние в фокальной плоскости прибора между двумя лучами с близкими длинами волн λ_1 и λ_2 , отнесенное к разности $s = \lambda_1 - \lambda_2$.

Другая характеристика диспергирующего элемента – это его *разрешающая способность*. Определяется она как способность спектрального прибора давать раздельное изображение двух спектральных линий с близкими длинами волн. Находят ее через соотношение:

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} \quad (154),$$

где $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ – интервал, в котором линии λ_1 и λ_2 наблюдаются раздельно, а $\lambda = (\lambda_1 + \lambda_2)/2$ – средняя длина волны.

В качестве диспергирующих элементов чаще всего выступают призмы, дифракционные решетки, и интерференционные устройства [10, с. 25–26].

Среди методов анализа, доступных для реализации посредством атомно-эмиссионной спектроскопии, следует выделить три наиболее значимых: количественный, качественный и полуколичественный.

Количественный анализ позволяет определить концентрацию элемента в пробе на основании измерения *аналитических линий*. Обычно учитывают характеристики не только аналитической линии измеряемого компонента, но и интенсивность так называемой *линии сравнения*, характерной для специально вводимого в пробу элемента, выступающего *внутренним стандартом*. Таким образом, в качестве свойства, связанного с концентрацией элемента, используется отношение интенсивности линии определяемого элемента к интенсивности линии другого элемента в этом же спектре. Связь между концентрацией вещества в пробе и интенсивностью его спектральной линии устанавливается уравнением Ломкина – Шайбе (117) [10, с. 36].

Качественный анализ осуществляется по характеристическим линейчатым спектрам элементов, принадлежность которых к тому или иному компоненту устанавливается на основании анализа длины волны и интенсивности линии. Для каждого элемента характерны т.н. *последние линии*, которые проявляются при уменьшении концентрации вещества до такой степени, когда от большого количества линий (например, для урана характерен спектр из 5000 линий, а для тория - 2500) останутся всего несколько – это и есть последние линии. Они хорошо изучены и их можно найти в специальных атласах и таблицах. Для расшифровки спектров и определения их длины волны используют *спектры сравнения*, обладающие хорошо известными характеристиками (в этом качестве часто пользуются спектром железа, обладающим характерными группами линий в разных областях длин волн) [10, с. 33].

К методу *полуколичественного анализа* прибегают, когда важна не точность анализа, а его простота и экспрессность. Погрешность этого метода составляет 10% и более, ведь спектральные линии анализируют визуально, наблюдая спектр в окуляре спектрального прибора или на фотопластинке.

Можно отметить три разновидности полуколичественного анализа. Во-первых, это – *метод гомологических пар* (или *метод однородных дуплетов*). Для его реализации подбирают пару линий (гомологическую пару или однородный дуплет) и устанавливают, при ка-

кой концентрации определяемого элемента их интенсивности одинаковы. Для этого используют специальные таблицы, содержащие известные характеристики тех или иных элементов и сравнивают их со спектрами искомым элементов.

Второй метод, используемый в полуколичественном спектральном анализе – *метод спектров сравнения*. Он осуществляется с помощью фотопластинки, на которой сфотографированы спектры нескольких эталонов и пробы и на основании визуального анализа степени почернения линий определяемого элемента делается вывод о пределах его концентрации в пробе.

Метод появления, или исчезновения чувствительных линий – третья разновидность полуколичественного анализа. Ее суть заключается в определении с помощью эталонов, при каких концентрациях появляются или исчезают те или иные аналитические линии элемента, а затем, используя эти данные, находят ориентировочную концентрацию компонента в пробе [10, с. 39–40].

Атомно-эмиссионный спектральный анализ нашел широкое применение в промышленности, народном хозяйстве, науке и технике. В металлургической промышленности этот метод активно используется при анализе металлов и сплавов, в геологии, на горнообогатительных предприятиях метод применяется при анализе руд на предмет содержания полезных и мешающих компонентов, спектральный анализ широко используется в космических исследованиях. Изучение природных и сточных вод, почвы, воздуха и других объектов окружающей среды зачастую осуществляются посредством АЭС, существенную роль она играет в биологических и медицинских исследованиях. Такое распространение обусловлено низким пределом обнаружения, универсальностью, экспрессностью и точностью измерений, возможностью определения большого числа элементов в широком диапазоне концентраций при анализе малых масс жидких, твердых или газообразных проб [39, с. 44].

Контрольные вопросы

1. Дайте определение метода атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС). На каких процессах он основан?

2. Поясните, что представляет собой закон распределения Больцмана?
3. Чем примечательно уравнение Ломакина-Шайбе?
4. Охарактеризуйте основные спектральные помехи, возникающие в ходе реализации метода АЭС.
5. С чем связано возникновение физико-химических помех в ходе АЭС-измерений? Дайте краткую характеристику этим явлениям.
6. Какие приемы целесообразно применять для уменьшения влияния помех физико-химической природы?
7. Назовите основные узлы АЭС-спектрометра.
8. Какие способы атомизации и возбуждения пробы вы знаете?
9. Перечислите достоинства и недостатки атомизаторов, построенных на различных принципах.
10. В чем особенность диспергирующих элементов, используемых в АЭС-спектрометрах?
11. На каких принципах основаны количественные и качественные спектральные анализы?
12. В чем особенность полуколичественного анализа? К каким методам прибегают в рамках данных измерений?

3.6. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

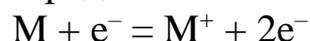
Теоретические основы масс-спектрометрического анализа

Масс-спектрометрия – физико-химический метод анализа, основанный на процессе ионизации атомов и молекул с последующим разделением образовавшихся ионов в пространстве или времени на основании различий в отношении их массы (m) к заряду (e), что в итоге дает возможность определить массы обнаруженных ионов.

Ионизация молекул происходит под действием потока электронов и процесс этот достаточно сложный и практически непредсказуемый, так как в результате может образовываться большое разнообразие заряженных частиц: положительно и отрицательно заряженные ионы, одно- и многозарядные, атомарные, молекулярные и кластерные ионы и т.п. Обусловлено это многообразием химическим и изотопным составом образца. Зато информация, полученная методом

масс-спектрометрии чрезвычайно информативна. Она дает основания для оценки не только изотопного и элементного состава вещества, но и возможность определять энергию ионизации, энергию связи внешних электронов и структуру орбиталей, структурные особенности молекул и др. Теоретическое обоснование метода лежит на стыке множества наук – это ядерная, атомная и молекулярная физика, физика твердого тела и жидкостей, физика плазмы и радиоактивных процессов и другие смежные разделы этой дисциплины [43, с. 218].

В упрощенном виде процесс ионизации можно представить на примере образования однозарядных положительных ионов:



В результате бомбардировки пробы потоком электронов, образовавшиеся положительно заряженные ионы приобретают энергию eV , а их скорость возрастает до v . Энергия eV ионов в данном случае будет равняться кинетической энергии ионов $mv^2/2$, так что справедливым будет выражение:

$$eV = \frac{mv^2}{2} \quad (155).$$

В условиях анализа предусмотрено направление потока ускоренных таким образом ионов сквозь магнитное поле напряженностью H , где они подвергаются действию силы Hev , направленной перпендикулярно движению иона. Это обстоятельство заставляет ионы менять траекторию движения на окружность радиуса r и описывать таким образом дугу.

Находим скорость ионов, приравняв силы $Hev = mv^2/r$:

$$v = r \frac{He}{m} \quad (156).$$

Подставив выражение (156) в уравнение (155), получаем:

$$eV = \frac{mr^2 H^2 e^2}{2m^2} \quad (157).$$

Отсюда выражаем радиус окружности:

$$r = \frac{1}{H} \sqrt{2V \frac{m}{e}} \quad (158).$$

Перепишем уравнение (158) в виде

$$m/e = \frac{r^2 H^2}{2V} \quad (159).$$

Таким образом, мы нашли искомое отношение массы к заряду. Радиус r окружности, по которой движутся ионы в условиях анализа – постоянен, а вот величины H и V можно менять. При манипулировании этими характеристиками можно направлять в зону детектирования ионы с различной величиной m/e . Результатом анализа является *масс-спектр*, представляющий собой спектрограмму, построенную в координатах m/e – интенсивность аналитического сигнала. Величину V определяют экспериментально, а ее соотношение с m/e находят путем градуировки по веществу с известным масс-спектром [10, с. 260–262].

Практическая реализация и применение масс-спектрометрических методов

Масс-спектрометрический анализ осуществляют посредством *масс-спектрометров*. В принципиальную схему этого анализатора входят следующие узлы:

- 1) *система подготовки и ввода пробы;*
- 2) *блок ионизации;*
- 3) *масс-анализатор* (предназначен для разделения ионов в зависимости от соотношения m/e);
- 4) *детектор ионов.*

Рассмотреть принцип работы прибора лучше всего с помощью схемы, изображенной на рисунке 72. В камере происходит перевод

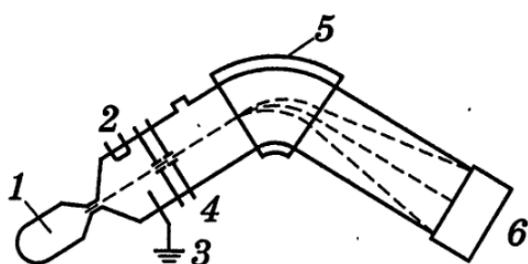


Рис. 72. Схема масс-спектрометра с магнитным масс-анализатором [10, с. 261]:

- 1 – газобразная проба;
- 2 – катод; 3 – анод;
- 4 – ускоряющие пластинки;
- 5 – магнитное поле;
- 6 – детектор

пробы в газообразное состояние 1 при давлении 10^{-2} – 10^{-3} Па. Если в образце имеются труднолетучие вещества, то в этот процесс включается стадия испарения, которую можно игнорировать, соответственно, если анализируемые вещества легко летучи. Далее газообразная проба попадает в блок ионизации (например, состоящий из катода 2 и анода 3 , как на рис. 72), принцип действия которого мо-

жет быть построен на разных процессах: это ионизация посредством электронного удара или воздействия электрического поля, с помощью бомбардировки фотонами, ионами, и т.п.

Далее ионы, полученные на предыдущей стадии, подвергаются разгону с помощью специальных ускоряющих пластин 4. Этот процесс происходит благодаря тому, что разность потенциалов между ними достигает высоких значений – вплоть до нескольких тысяч вольт. Последним этапом становится попадание разогнанных ионов в мощное магнитное поле, заставляющее их двигаться по дуге в сторону детектора, принцип действия которого может быть основан на фотографическом, электрическом (электрометр, электронный умножитель) и других видах регистрации сигнала [10, с. 261].

Рассмотрим подробнее каждый блок, входящий в состав масс-спектрометра. На настоящий момент известны несколько способов, с помощью которых можно осуществлять *ввод образца* в анализатор. Вследствие того, что некоторые блоки прибора (масс-анализатор и детектор ионов) работают в условиях высокого вакуума (около 10^{-4} – 10^{-5} Па), необходимо поддерживать эти условия при введении проб в спектрометр. Для этого газообразные пробы, например, закачивают в специальный баллон до давления примерно 1 Па и только затем осуществляют ввод газа в ионизатор, посредством открытия специального вентиля или диафрагмы.

Твердые образцы помещают в тигель, изготовленный из термостойких материалов: кварца, керамики, металла и т.п., который затем через специальную шлюзовую камеру отправляют в ионизатор, где проба испаряется при температуре, задаваемой условиями ионизации (обычно 400–500 °С).

Известен так называемый мембранный ввод, основанный на использовании мембран из органического материала. Соответственно, образцы, обладающие способностью диффундировать в порах этого материала, проходят через него и попадают таким образом в область ионизации [2, с. 98].

Следующий блок, без которого не мыслима масс-спектрометрия – *блок ионизации*. Как было сказано выше, принцип действия этого узла может быть построен на разных процессах. Например, *электронная ионизация* осуществляется с помощью раскаленного катода, изготовленного из вольфрама или другого тугоплавкого металла, и анода, представляющего собой ионизационную камеру (масс-спектр, полученный с помощью данного метода, представлен на рисунке 73, а).

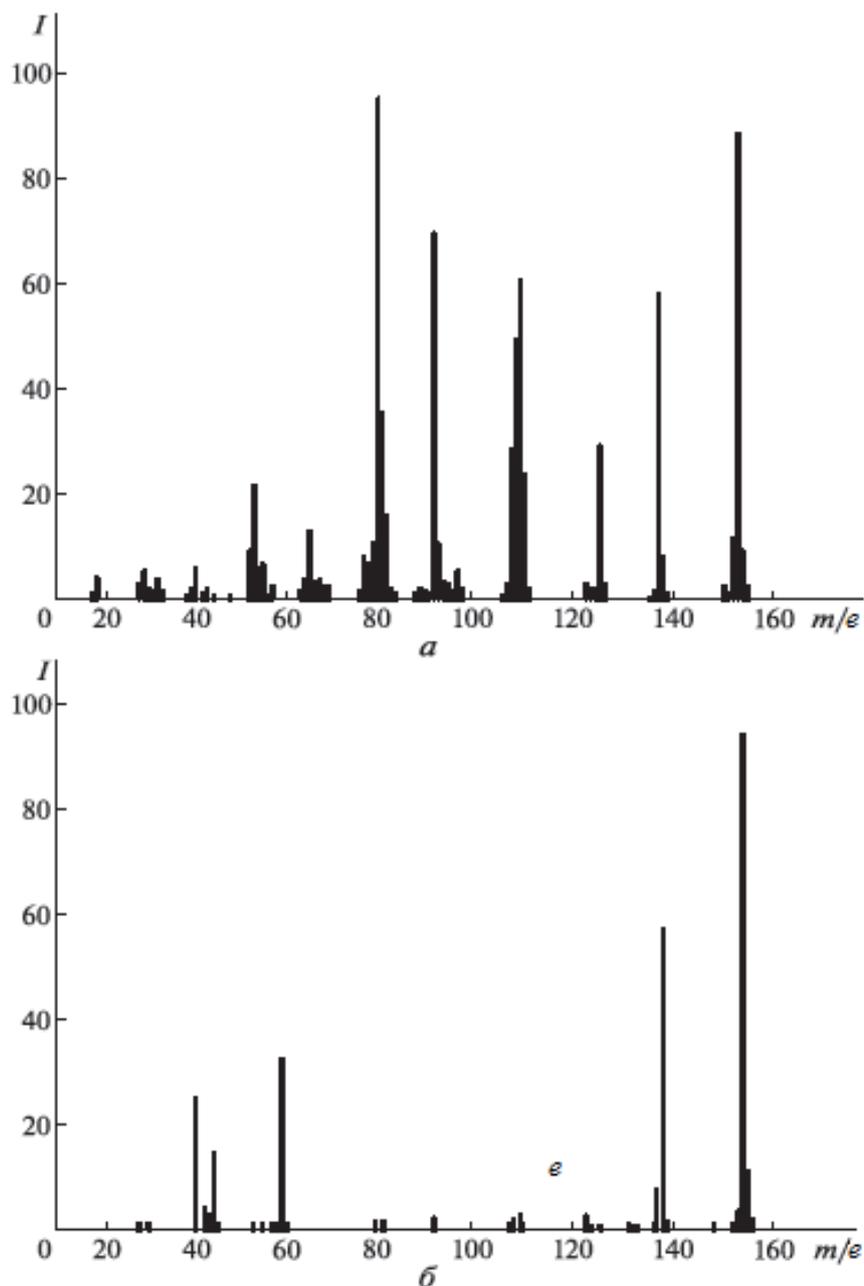


Рис. 73. Масс-спектр 3-нитробензилового спирта, полученный при электронной (а) и химической (б) ионизации [43, с. 221]

Катод продуцирует пучок электронов, который подвергаются разгону в направлении анода под действием высокой разности потенциалов 10–100 В. Зачастую эффективность ионизации повышают, включая в схему источники магнитного поля, которые заставляют ионы двигаться по дуговой траектории, тем самым сталкиваясь между собой, они могут превращаться в одно- и многозарядные разновидности.

Фотоионизация используется в тех случаях, когда необходимо определить некоторые энергетические характеристики молекул, ради-

калов или ионов, например, энергию ионизации. Монохроматический пучок света получают с помощью газоразрядных ламп, содержащих инертные газы.

Химическая ионизация осуществляется путем ионно-молекулярных реакций (масс-спектр изображен на рис. 73, б). Для их инициации в ионизационной камере создают высокое давление до 100 Па за счет введения туда газа-реагента (метана, аммиака и др.). Под действием пучка электронов образуются ионы газа-реагента и ионы-реагенты, взаимодействие которых с молекулами анализируемого вещества приводит к возникновению катион- и анион-радикалов, которые и подвергаются дальнейшему детектированию.

Методы *полевой ионизации* и *полевой десорбции* наиболее всего подходят для анализа углеводов, пептидов, нуклеотидов, солей, кислот и т.п. Сущность первого метода заключается в использовании специального эмиттера, изготовленного из вольфрамовой проволоки диаметром 5–10 мкм. Проба предварительно переводится в газовое состояние. Подача на эмиттер напряжения 8–10 кВ приводит к увеличению напряженности электрического поля до 10^8 В/см, в результате чего молекулы образца ионизируются. Образовавшиеся в результате такого воздействия ионы имеют более низкую энергию возбуждения, чем при химической ионизации, и не распадаются. Затем они вытаскиваются в область детектирования. *Полевая десорбция* отличается от предыдущего метода тем, что образец раствора наносят прямо на эмиттер. После подачи напряжения происходит конденсация ионов, а затем и их переход в газовую фазу, в результате нагрева эмиттера. Далее газообразные ионы вытягиваются в блок-детектор.

Бомбардировкой быстрыми атомами ионизируется проба, нанесенная на металлическую подложку и вводимую на конце штока в ионизатор. В результате такого воздействия, молекулы отрываются с поверхности образца и концентрируются в виде плотного газа, состоящего из ионов обоих знаков, а также нейтральных частиц, которые затем так же могут ионизироваться. Выход ионов анализируемого образца напрямую зависит от массы бомбардирующих их ускоренных атомов.

Принцип *метода вторично-ионной масс-спектрометрии* в целом схож с методом бомбардировки быстрыми атомами, за исключением того, что в данном случае для этой цели используют ионы (преимущественно катионы цезия).

Искровая ионизация осуществляется посредством электрического пробоя, осуществляемого между электродами, одним из которых служит анализируемая проба (метод схож с аналогичным, используемым в АЭС).

Ионизация электрораспылением на сегодняшний момент один из самых эффективных методов перевода молекулярной пробы в состояние заряженных частиц. Он позволяет исследовать как органические так и биоорганические соединения с высочайшей чувствительностью качественного анализа вплоть до содержания в пробе всего 10^{-18} моля вещества. Смысл процесса в следующем: поток пробы направляют в трубку, диаметром 0,1 мм, которая находится под высоким (около 6 кВ) потенциалом по отношению к заземленному противоэлектроду. На выходе из трубки образуется аэрозоль из капель, имеющих высокий поверхностный заряд. Эти капли, по мере испарения растворителя, начинают уменьшаться в размере и постепенно дробиться до тех пор, пока не образуется микрокапля, содержащая всего одну заряженную частицу. Они то и подвергаются анализу масс-анализатором.

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) лучше всего подходит для анализа сложнейших биополимеров, таких как полипептиды, полисахариды, нуклеотиды, белки и других веществ биологического происхождения. Здесь главным ионизирующим агентом выступает лазер, облучающий пробу короткими импульсами. Само вещество пробы помещается в органическую матрицу, молекулы которой поглощают излучение лазера. В результате взаимодействия лазерного луча с образцом возникает высокотемпературная плазма, в которой кроме ионов и молекул матрицы, присутствуют молекулы анализируемого соединения. Они подвергаются ионизации, образуя положительные и отрицательные ионы, которые затем поступают во времяпролетный анализатор [2, с. 99–104].

Далее следует рассмотреть подробнее устройство *масс-анализаторов*, которые предназначены для пространственного или временного разделения ионов с различными отношениями массы к заряду (m/e). Различают два вида анализаторов: статические и динамические. В *статических* разновидностях для разделения ионов пробы используют магнитные и электрические поля. *Динамические анализаторы* примечательны тем, что разделение ионов здесь основано

на использовании переменных полей. Важно отметить такие метрологические характеристики масс-анализаторов, как их абсолютная и относительная чувствительность. Под *абсолютной чувствительностью* понимают способность прибора регистрировать масс-спектр пробы с минимальным количеством анализируемого вещества. *Относительная чувствительность* характеризует возможности прибора в определении данного компонента в смеси. На сегодняшний день существуют масс-спектрометры, имеющие очень низкие пределы абсолютной чувствительности – всего 10^{-14} – 10^{-12} г. Если использовать наиболее современные методы ионизации, например, такие как электрораспыление, то можно добиться регистрации на масс-спектре и вовсе фантастически малых величин молей вещества – до 10^{-18} . Относительная чувствительность современных масс-анализаторов находится в пределах 10^{-14} – 10^{-9} [2, с. 107].

Магнитный масс-анализатор является типичным анализатором статического типа, ведь именно на нем впервые было получено разделение ионов, основное на отношении их массы к заряду. Принцип действия такого анализатора основан на использовании магнитного поля, а именно на его способности менять траекторию ионов, выходящих из ионного источника. Каждый ион в магнитном поле имеет свой угол отклонения от прямолинейной траектории, благодаря чему имеется возможность рассчитать величину m/e , используя следующие величины: магнитная индукция (B), радиус траектории иона (r) и ускоряющее напряжение (U):

$$m/e = \frac{B^2 r^2}{2U} \quad (160).$$

Квадрупольные масс-анализаторы представлены четырьмя параллельно расположенными электродами, причем в ходе анализа на них попарно подается одно и то же напряжение, но с разным знаком частотой и амплитудой. Подробнее со схемой устройства можно ознакомиться на рис. 74. На каждую пару электродов подают напряжение U , которое можно рассчитать исходя из следующего выражения:

$$U = U_0 + u \cos \omega t \quad (161),$$

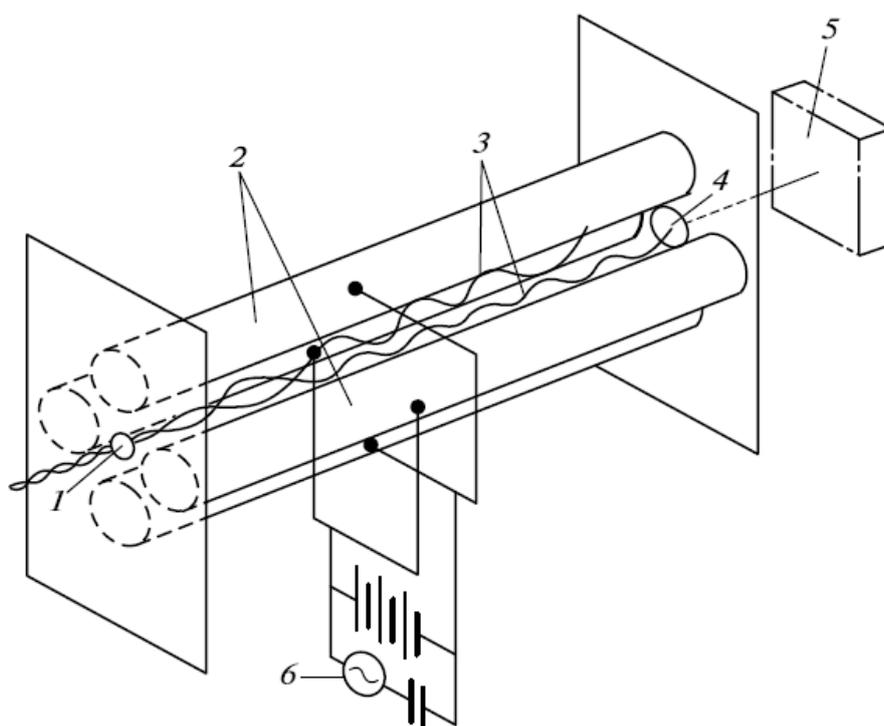


Рис. 74. Схема квадрупольного масс-анализатора [2, с. 107]:
 1 – входное отверстие анализатора; 2 – квадруполь; 3 – траектория ионов;
 4 – выходное отверстие анализатора; 5 – коллектор ионов;
 6 – генератор высокочастотного напряжения

где U_0 – постоянное напряжение, u – амплитуда и ω – частота переменного напряжения.

В результате работы такого масс-анализатора образуется переменное электрическое поле, в которое и направляются анализируемые ионы. Это поле приводит их в колебательное движение в направлении осей x и y . Принцип работы такого анализатора строится на способности каждого вида ионов проходить через анализатор при конкретных частотах, амплитуде и напряжении тока. Если в определенных соотношениях изменять эти величины, можно добиться разделения ионов, так как одни ионы в данном случае будут иметь постоянно возрастающую амплитуду колебаний (в конечном итоге, они попадут на поверхность электродов и нейтрализуются), а другие – напротив, в каком-то узком диапазоне величин U_0 , U_1 и ω будут иметь ограниченную амплитуду, благодаря чему беспрепятственно минуют анализатор и попадут в область детектирования.

Времяпролетный анализатор считается очень перспективным в решении различных аналитических задач, так как он имеет отличные

характеристики с точки зрения удобства и быстроты анализа, а также информативности получаемых масс-спектров. Он позволяет работать в очень широком, практически неограниченном диапазоне масс исследуемых ионов, регистрация самих масс-спектров занимает всего лишь несколько десятков микросекунд, что касается удобства анализа, то имеется возможность работы как с отдельными узкими участками, так и с панорамной разверткой всего спектра.

Разделяются ионы во времяпролетном анализаторе по принципу различия скоростей, а, следовательно, и времени пролета в полой дрейфовой трубе в зависимости от их массы. Характер этой зависимости можно выразить следующим образом:

$$t = d \sqrt{\frac{m}{2eU}} \quad (162),$$

где t – время пролета, U – ускоряющее напряжение, d – определенное (фиксированное) расстояние в дрейфовой трубе. Выразив отсюда отношение m/e , получим:

$$\frac{m}{e} = \frac{2Ut^2}{d^2} \quad (163).$$

Есть у времяпролетных анализаторов и слабые стороны – низкая разрешающая способность, возникающая вследствие разброса ионов по кинетической энергии на входе в анализатор. Однако, с помощью конструктивных изменений в таких устройствах – применением ионных зеркал, удалось скомпенсировать этот недостаток и повысить разрешающую способность. Разновидность таких усовершенствованных времяпролетных анализаторов известна под названием *масс-рефлектрон*. В их дрейфовой трубе устанавливают специальный отражатель (ионное зеркало), который позволяет отсеивать частицы с определенным электростатическим полем и фокусировать ионы с различными энергиями по времени пролета.

Одна из современных систем анализаторов, основанных на *ионно-циклотронном резонансе (ИЦР) с преобразованием Фурье* (рис. 75), позволяет регистрировать ионы без их пространственного или временного деления (в отличие от предыдущих методов). Происходит этот процесс за счет поглощения и испускания анализируемыми ионами радиочастотного излучения при характерных зависящих от массы циклотронных частотах.

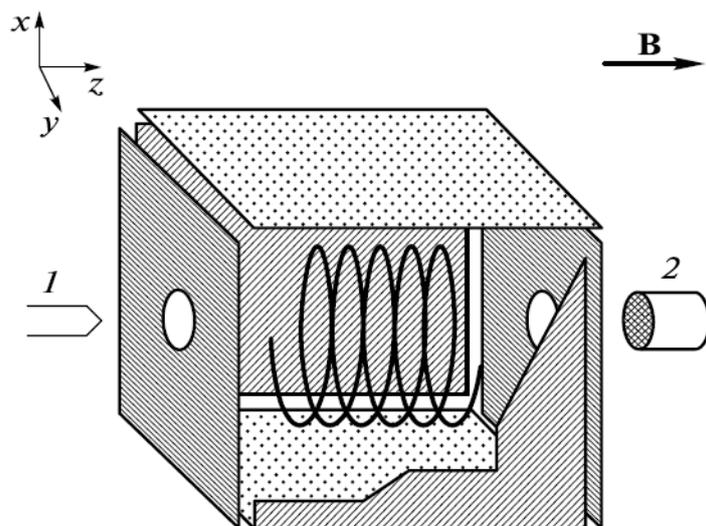


Рис. 75. Схема ячейки для масс-спектрометра ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье [2, с. 110]:

I – электронная пушка; 2 – коллектор ионов

В магнитном поле, создаваемом этой установкой, электроны двигаются по определенной окружности, радиус r которой мы можем найти по уравнению:

$$\frac{mv^2}{r} = e\upsilon B \quad (164),$$

где B – магнитная индукция, υ – скорость иона.

Отсюда находим циклотронную частоту ω_c , с которой ион вращается по окружности:

$$\omega_c = \frac{eB}{m} \quad (165).$$

Остается только выразить отношение массы к заряду, подставив в выражение (165) значение циклотронной частоты $\nu_c = \omega_c / (2\pi)$:

$$\frac{m}{e} = \frac{B}{2\pi\nu_c} \quad (166).$$

Таким образом, масса иона в спектрометрах с ИЦР определяется исключительно по его циклотронной частоте, которая зависит от величины магнитного поля, но не зависит от скорости иона. Благодаря этой особенности масс-спектрометры с Фурье преобразованием имеют огромную разрешающую способность, достигающую до сотен миллионов.

Ионная ловушка (рис. 76) представляет собой систему из 3 электродов, два из которых заземлены, а на третий подается высоко-

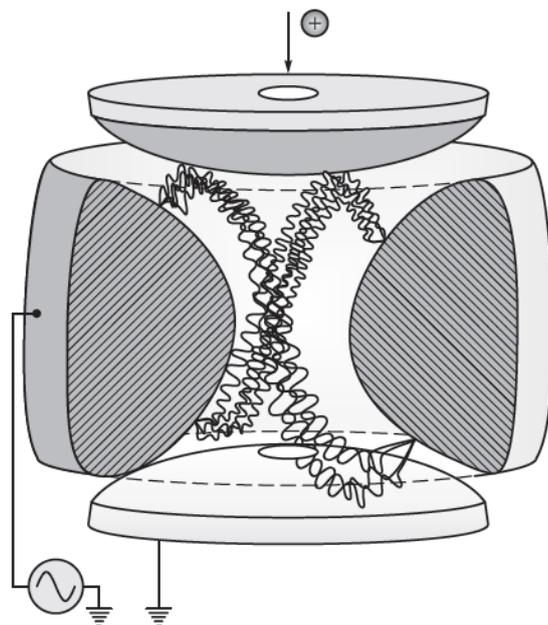


Рис. 76. Схема ионной ловушки [43, с. 228]

частотное напряжение. Получается своеобразная ловушка, в которой ионы удерживаются с помощью импульсного пучка электронов. Сканирование по значениям m/e осуществляется при изменении амплитуды высокочастотного напряжения. На сегодняшний момент масс-спектрометры с ионной ловушкой являются одними из самых доступных в плане стоимости и приемлемых с точки зрения разрешающей способности (достигающей значений до 25 000). К недостаткам можно отнести возможность протекания ионно-молекулярных реакций в таких ловушках, что в конечном итоге приводит к искажениям масс-спектра [2, с. 105–111].

Для детектирования ионов могут быть использованы различные устройства, например, коллекторы ионов, фотопластинки и вторично-электронные умножители.

Коллектор ионов представлен заземленной пластинкой или цилиндром Фарадея, такое устройство позволяет непосредственно измерять ионный ток (вплоть до 10^{-14} А) и, следовательно, число ионов, выходящих из масс-анализатора.

Фотопластинки подходят для методов, реализованных с помощью искрового источника ионов или магнитного масс-анализатора. К достоинствам этого типа детектирования относят возможность одновременной регистрации всего спектра в широком диапазоне значений m/e , однако из-за зависимости чувствительности фотоэмульсии от

энергии иона, происходит уменьшение динамического диапазона определений.

Вторично-электронные умножители позволяют регистрировать поток электронов, выбиваемый регистрируемым ионом из электрода на входе в прибор. Этот сигнал усиливается с помощью умножительной системы в результате вторичной электронной эмиссии.

Масс-спектрометрический метод решает огромное количество аналитических задач, начиная с качественного и количественного анализа содержащихся в пробе элементов и заканчивая определением органических, биоорганических и сложных высокомолекулярных соединений.

Качественный анализ можно производить несколькими способами, например, фиксируя расположение аналитической линии на фотопластинке, принадлежащей неизвестному веществу и сравнивая ее с линией, полученной для вещества с известной массой [10, с. 263].

Другой путь решения этой задачи – сравнение полученного в ходе исследования спектра с уже известными, собранными в специальных компьютерных библиотеках масс-спектров.

Количественный анализ осуществляемый масс-спектрометрическим методом можно рассматривать в зависимости от задач, стоящих перед исследователем. Например, для анализа загрязнителей объектов окружающей среды используют *хромато-масс-спектрометрию*. Снимают хроматограмму и по площади хроматографического пика, полученного при регистрации полного ионного тока, оценивают содержание соединения в пробе. Кроме того имеется возможность идентифицировать загрязнитель, проанализировав масс-спектр. Чувствительность этого метода сравнительно невысока – всего 10^{-9} – 10^{-6} г.

Масс-фрагментография – разновидность хромато-масс-спектрометрии, служит для поиска, идентификации и количественного анализа веществ с известным масс-спектром в составе сложной смеси. Основное отличие ее в том, что хроматограмма снимается не по полному ионному току, а по наиболее характерным для данного вещества ионам. Этот метод имеет лучшую чувствительность по сравнению с хромато-масс-спектрометрией, которая достигает порядка 10^{-15} – 10^{12} г.

Определение органических веществ осуществляют с помощью *молекулярной* (применительно к биополимерам – *биоорганической*) *масс-спектрометрии*, которая позволяет анализировать практически все высокомолекулярные вещества биологического происхождения. Этот метод чрезвычайно важен для таких отраслей как фармацевтика, биотехнология, молекулярная биология, активно применяется в биохимических и клинических исследованиях и др. [43, с. 233].

Для элементного и изотопного анализа больше всего подходит *масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой*. На таких установках достигается высокая относительная чувствительность – порядка 10^{-15} – 10^{-9} (в зависимости от природы определяемого элемента).

Тандемная масс-спектрометрия используется с целью идентификации компонентов в смеси, при этом установка включает в себя 2 масс-анализатора: в первом компоненты смеси распадаются на фрагменты, а во втором происходит непосредственное определение масс-спектров получаемых в результате разделения индивидуальных соединений [2, с. 111–119].

Таким образом, масс-спектрометрия является чрезвычайно востребованным методом анализа в настоящий момент, который способен решать большинство аналитических задач в огромном спектре отраслей науки и производства.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение масс-спектрометрии.
2. Поясните, на каких принципах основан масс-спектрометрический анализ? Как находят отношение массы к заряду анализируемого вещества?
3. Какие основные узлы, входящие в принципиальную схему масс-анализатора вам известны?
4. Каким образом осуществляется ввод пробы в прибор? В чем особенности пробоподготовки?
5. На каких процессах основана работа блока ионизации? В чем сущность существующих схем ионизирующих блоков?

6. В чем принципиальная важность наличия в приборе для масс-спектрометрических измерений масс-анализатора? На какие группы делят эти устройства и по какому принципу?

7. Назовите наиболее важные характеристики масс-анализатора.

8. Какие масс-анализаторов вы знаете? Кратко охарактеризуйте каждый из них.

9. Какие способы существуют для детектирования ионов в масс-спектрометрическом методе?

10. Дайте характеристику качественному и количественному методам масс-спектрометрического анализа. В каких отраслях они применяются? Приведите примеры.

3.7. 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 ν_{nk} соотношением

$$E_n - E_k = h\nu_{nk} \quad (167),$$

а длина волны λ излученного света связана с величиной кванта соотношением

$$E_n - E_k = h \frac{c}{\lambda} \quad (168),$$

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 [35, с. 166–168].

Рентгеновские характеристические спектры. Линии спектров возникают при переходах внутренних электронов с оболочки на оболочку. Такие переходы возможны, когда один из электронов предвременно был удален из атома. Если удален электрон оболочки K (рис. 77), то освободившееся место может занять либо один из элек-

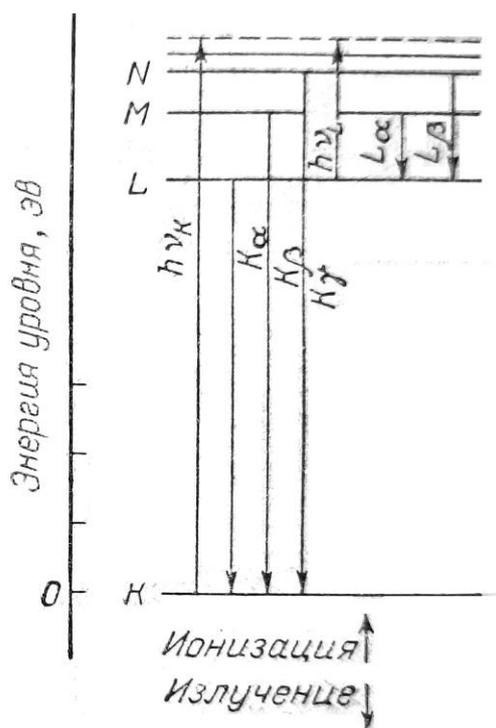


Рис. 77. Рентгеновский спектр: схема энергетических уровней в атоме [35, с. 167]

тронов 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_α , K_β , K_γ , ... L_α , L_β , L_γ и т. д.

Возникновение рентгеновского спектра можно изобразить схематически так же, как и возникновение оптического спектра (см. рис. 77). Расстояние между уровнями зависит от строения атома (заряда ядра). Поэтому длина волны линий каждой серии за-

висит от положения элемента в периодической системе Менделеева. Каждому элементу соответствуют свои характеристические рентгеновские частоты (длины волн).

В отличие от оптических спектров между частотами определенных линий (K_α , L_α , K_β , L_β 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_α , L_α 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* [35, 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 [29, 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 исследовании спектров поглощения служит величина поглощения характеристических линий. При прохождении через исследуемое вещество интенсивность этих линий уменьшается с увеличением концентрации определяемого элемента [35, 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) диспергирующий элемент;
- 3) детектор излучения;
- 4) спектрометрическое устройство обработки сигналов (амплитудный анализатор).

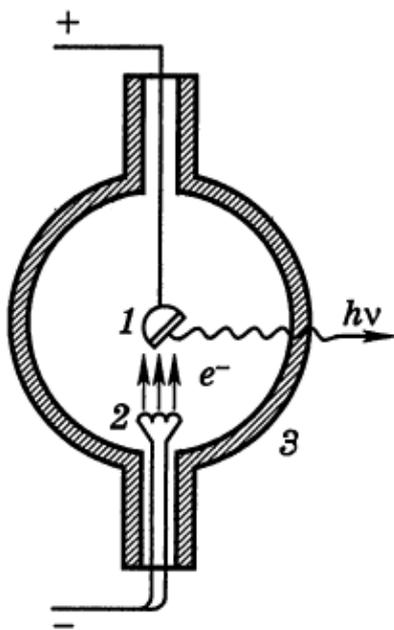


Рис. 78. Рентгеновская трубка
[10, с. 114]

Для возбуждения атомов, находящихся в пробе, в конструкции спектрометра предусмотрено наличие *рентгеновской трубки* (рис. 78). Она представляет собой вакуумированный сосуд, в котором располагаются охлаждаемый анод 1 и термоэмиссионный катод 2, между которыми постоянно пропускается ток 50–100 мА. Катод, раскаляемый током, испускает электроны, которые под воздействием электрического поля ускоряются и попадают на поверхность анода-мишени. Бомбардирующий электронный пучок, во-первых, выбивает электроны из внутренней оболочки атомов вещества, из которого

сделан анод (происходит *ионизация атомов электронным ударом* – возникновение характеристического спектра). Во-вторых, разогнанные электроны, ударяясь об анод, теряют свою кинетическую энергию, часть которой идет на создание непрерывного спектра рентгеновского излучения (так называемое *тормозное излучение*), остальная часть энергии расходуется на нагревание анода. Таким образом, рентгеновский эмиссионный спектр состоит из непрерывного тормозного излучения и характеристического излучения элементов, входящих в состав анода. Чтобы выделить ту или иную составляющую излучения, рентгеновские трубки могут оборудоваться специальным металлическим фильтром. Через выходное отверстие 3 рентгеновское излучение направляется на анализируемую пробу [10, с. 114].

В качестве диспергирующих элементов в РФА используются *кристалл-анализаторы* – своеобразные дифракционные решетки, в которых происходит выделение из спектра образца характеристиче-

ской линии в результате дифракции на узлах кристаллической решетки по закону, описываемому формулой Вульфа – Брэгга:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (169),$$

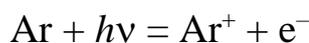
где λ – длина волны излучения, отраженного от кристалла, n – целое число, характеризует порядок отражения, т.е. определенный тип отражения, повторяющийся при значениях $\sin \theta$, соответствующих значениям множителя $n = 1, 2, 3, \dots$, $2d$ – расстояние между узлами кристаллической решетки, θ – угол падения излучения на кристалл.

Таким образом, от плоскости кристалла под углом θ (углом скольжения) будет отражаться излучение с длиной волны λ , удовлетворяющий условию Вульфа – Брэгга. Если излучение не соответствует этому условию, то оно либо поглощается кристаллом, либо рассеивается. Угол скольжения в ходе анализа меняется поворотом плоскости кристалла-анализатора с помощью гониометра, который, как правило, предусмотрен в конструкции прибора [10, с. 115].

Среди детекторов излучения можно выделить следующие счетчики рентгеновских квантов: ионизационные и сцинтилляционные.

Ионизационный счетчик (рис. 79) представляет собой стеклянную колбу, заполненную инертным газом (например, аргоном), внутри которой установлены анод в виде металлической нити и катод. Такой цилиндрический конденсатор, в зависимости от режима работы может служить ионизационной камерой, пропорциональным счетчиком или счетчиком Гейгера – Мюллера.

Принцип действия счетчика основан на ионизации газонаполнителя. Под действием рентгеновского излучения атомы аргона ионизируются



а образовавшиеся в результате этого процесса электроны при столкновениях вызывают ионизацию и других атомов. Под действием подаваемого напряжения ионы Ar^+ будут двигаться к катоду, а

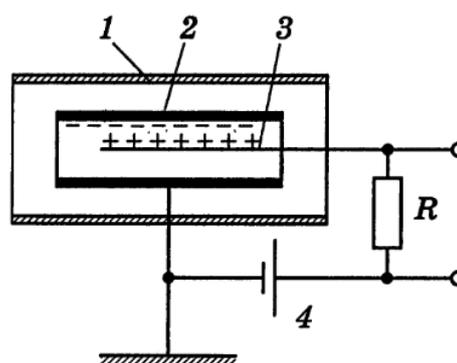


Рис. 79. Ионизационный счетчик [10, с. 116]:

1 – стеклянная колба; 2 – катод; 3 – анодная нить; 4 – источник высокого напряжения

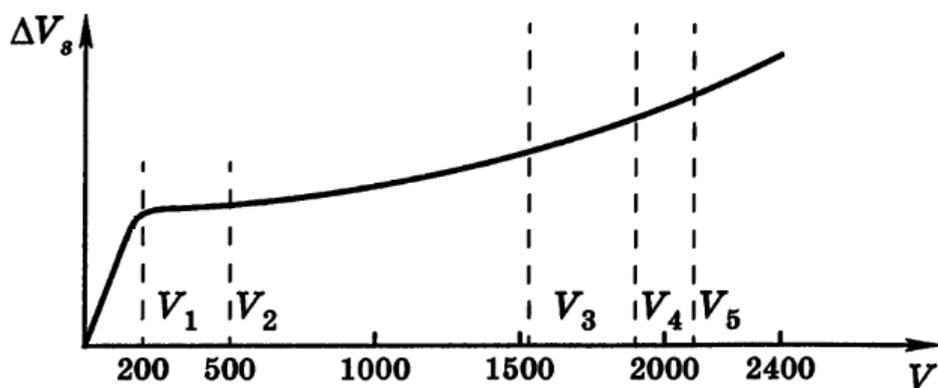


Рис. 80. Зависимость импульса от напряжения [10, с. 117]:

электроны к аноду. Далее, в зависимости от приложенного напряжения, могут происходить следующие процессы: во-первых, если напряжение мало, то скорость движения ионов аргона невелика, следовательно, они успевают рекомбинировать до достижения электродов (в таком случае невозможна оценка интенсивности рентгеновского излучения). Во-вторых, при определенном пороговом значении напряжения V_1 (рис. 80) происходит т.н. «насыщение», то есть увеличение скорости ионов приводит к уменьшению вероятности рекомбинации и все образовавшиеся ионы доходят до электродов практически нерекombинированными. В диапазоне насыщения ($V_1 - V_2$) прибор работает в режиме ионизационной камеры, с помощью которой можно регистрировать рентгеновское излучение достаточно большой интенсивности ($10^5 - 10^6$ импульсов в минуту). Дальнейшее повышение напряжения на электродах приводит к эффекту ударной ионизации, благодаря чему скорость электронов возрастает, следовательно, лавинообразно увеличивается и число ионов. Прибор, работающий в диапазоне напряжений $V_2 - V_3$, называется *пропорциональным счетчиком*. В следующем интервале ($V_3 - V_4$) ионизационные приборы не используются (это т.н. область *ограниченной пропорциональности*). Ну и последний диапазон напряжений $V_4 - V_5$ соответствует *гейгеровской области*, здесь попадание в счетчик фотона вызывает лавинообразную ионизацию, которая не зависит от энергии этого фотона. Приборы, работающие в этом режиме, носят название *счетчика Гейгера-Мюллера*.

Еще одна разновидность детекторов излучения – *сцинтилляционный счетчик*. В его основе лежит измерение сцинтилляций – световых вспышек, возникающих в люминофорах под действием

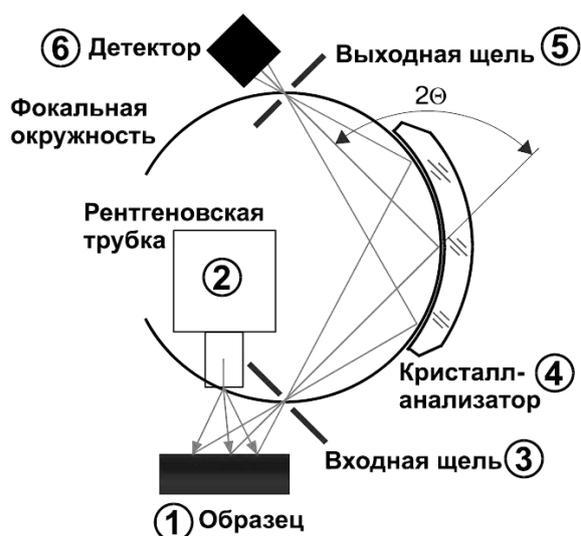


Рис. 79. Рентгенооптическая схема [59, с. 7]:

- 1 – исследуемый образец,
- 2 – рентгеновская трубка, 3 – входная щель, 4 – кристалл-анализатор,
- 5 – приемная (выходная) щель,
- 6 – блок детектирования



Рис. 80. Внешний вид прибора «СПЕКТРОСКАН-МАКС-G»

рентгеновского излучения. В качестве люминофоров могут выступать NaI, ZnS, антрацен и др. вещества, способные под действием рентгеновских лучей возбуждаться и, переходя в основное состояние, давать вспышку света, которая затем регистрируется фотоэлектронными умножителями (ФЭУ). Сцинтилляционный счетчик более точен (разрешающая способность доходит до 10^{-9} с) и отличается высокой чувствительностью по сравнению с ионизационными аналогами. Кроме того, имеется возможность измерять энергию излучения, что также делает использование приборов, основанных на явлении сцинтилляции, более приоритетным [10, с. 116–119].

Принципиальная рентгенооптическая схема спектрометра отображена на рис. 79. Рентгеновская трубка 2 облучает образец 1, вызывая флуоресцентное излучение, которое через входную щель 3 попадает на кристалл-анализатор 4. Далее выделенное излучение фокусируется в приемную щель 5 блока детектирования 6, сигнал с которого поступает на вход усилителя-дискриминатора, затем на вход счетного устройства [59, с. 6–7].

На таком принципе построена работа волнодисперсионного рентгенофлуоресцентного спектрометра «СПЕКТРОСКАН-МАКС-G», внешний вид которого представлен на рис. 80.

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}Ca) до урана (^{92}U). Этот вид анализа проводится путем сравнения наиболее характеристических 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 обеспечением формируется график с отображенным на нем спектром, где по одной оси отложена шкала длин волн (λ , мА), а по другой – интенсивность излучения (I , имп./с) (рис. 81) [59, с. 12–13].

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

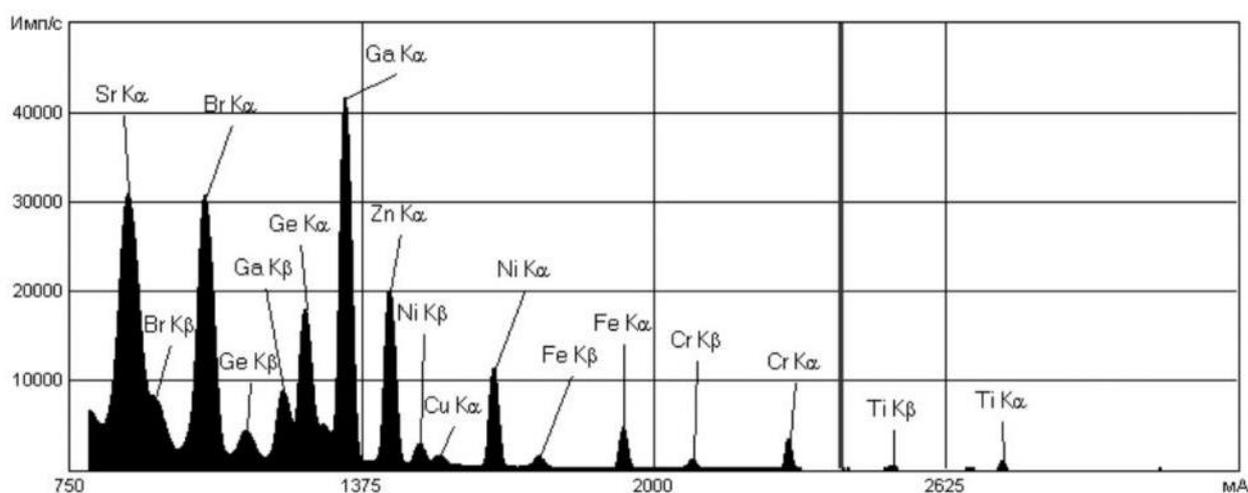


Рис. 81. Расшифрованный рентгенофлуоресцентный спектр [59, с. 14]

конкретного вещества в пробе проводится дискретное сканирование, ограниченное областью длин волн вторичного излучения искомого элемента [29, 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. 82) [59, с. 17].

Градуировочное уравнение в общем виде выглядит следующим образом:

$$C_{(x)} = A_0 + A_1 \cdot T_{(x)} \quad (170),$$

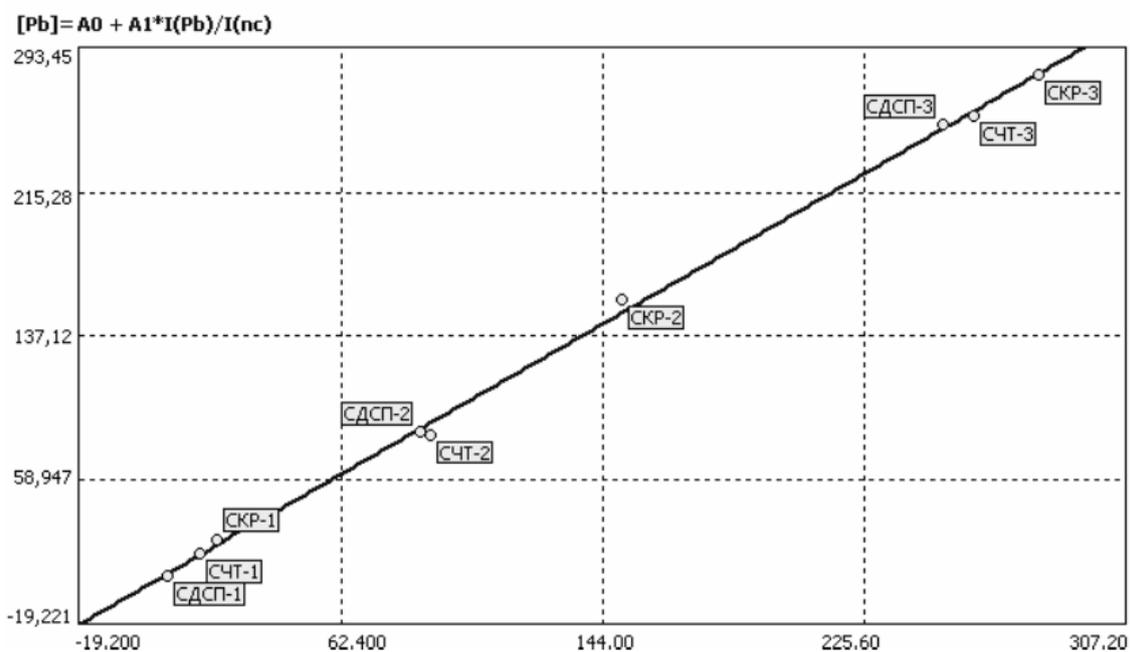


Рис. 82. Градуировочный график, построенный для Pb по стандартным образцам различных типов почв [59, с. 25]:

СДПС – дерновоподзолистые, СЧТ – черноземы, СКР – красноземы

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 [29, с. 8–9].

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} – $10^{-6}\%$.

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.

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. Как функционирует рентгеновская трубка?
7. В чем особенность диспергирующего элемента, используемого в РФА?
8. Какие детекторы излучения используются в рентгенофлуоресцентных анализаторах?
9. В чем состоит сущность качественного РФА?
10. Назовите особенности количественного РФА.
11. Какое применение нашел метод рентгенофлуоресцентного анализа в различных отраслях производства и промышленности?

3.8. СПЕКТРОСКОПИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Теоретические основы спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – физико-химический метод анализа, основанный на явлении резонансного поглощения электромагнитного излучения радиочастотного диапазона веществом, содержащим атомы с ненулевыми магнитными моментами ядер и находящимся во внешнем магнитном поле.

Известно, что атомы состоят из атомных ядер и электронных оболочек. Каждое ядро несет положительный заряд, кратный заряду ядра водорода (протона). Ядра многих изотопов имеют, кроме того, собственный момент количества движения, называемый *спином* и характеризующийся *спиновым квантовым числом* I . В отличие от спина электрона, который может принимать значения $\pm 1/2$, спин ядра может быть равным нулю, целому или полуцелому числу. Вращение заряженного ядра, спин которого отличается от нуля, создает магнитное поле, направленное по оси вращения. Напряженность этого магнитного поля выражается как магнитный момент μ .

К ядрам, имеющим спин, отличный от нуля, относятся ядра элементов с нечетным порядковым номером или изотопов каких-либо (даже четных) элементов, имеющих нечетное массовое число, например ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P (всего 135 естественных изотопов). Ядра элементов с четным массовым числом и четным атомным номером, такие как ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S , не имеют спина ($I = 0$) и не обладают магнитными свойствами [44, с. 112].

Магнитный момент и спин ядра взаимосвязаны:

$$\mu = \gamma \frac{h}{2\pi} I \quad (171),$$

где γ – константа пропорциональности, характеризующая данный тип ядра (гиромангнитное отношение), h – постоянная Планка.

При наложении внешнего однородного постоянного магнитного поля H_0 ядро может занимать относительно него любую из $(2I+1)$ -ориентаций, определяемых магнитным квантовым числом m . Последнее может принимать значения $I, (I-1), \dots, 0, \dots, (-I+1), -I$. Наибольший интерес для исследователей представляют ядра с $I = 1/2$, прежде всего ядро атома водорода ^1H , состоящее из единственного протона. В отсутствие внешнего магнитного поля спины протонов ориентированы беспорядочно (рис. 83, а), но в магнитном поле они

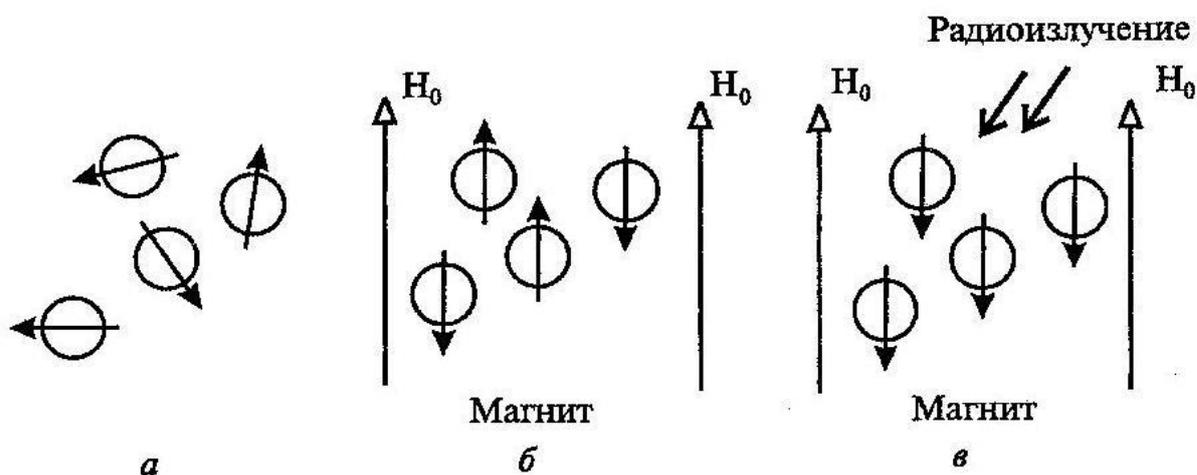


Рис. 83. Спиновые состояния протонов (магнитный момент указан стрелкой) [22, с. 235]:

а – в отсутствие магнитного поля; б – во внешнем магнитном поле; в – во внешнем магнитном поле после поглощения радиочастотного излучения (спины под воздействием энергии волнового облучения занимают более высокий энергетический уровень)

могут находиться только в двух разрешенных энергетических состояниях ($2 \cdot \frac{1}{2} + 1$), ориентируясь, подобно магниту, имеющему северный и южный полюс, «по полю» (α -состояние с энергией $E_1 = \mu H_0$) либо «против поля» (β -состояние, $E_2 = -\mu H_0$) (рис. 83, б). Разность между этими энергетическими уровнями составляет

$$\Delta E = 2\mu H_0 \quad (172).$$

Как уже обсуждалось, при поглощении электромагнитного излучения (в ультрафиолетовой и инфракрасной областях), энергия которого равняется разности энергий ΔE двух энергетических состояний, могут происходить переходы между электронными и колебательными уровнями. Поглощение излучения, лежащего в области радиочастот (10–500 МГц), приводит при определенной частоте ν (принцип квантования $\Delta E = h\nu$) к переходу между энергетическими уровнями ядер, или, иными словами, к переориентации спина (рис. 83, в) из несколько более выгодного состояния «по полю» в положение «против поля». Исходя из принципа квантования и выражения (172) можно выразить частоту, при которой происходит поглощение:

$$\nu = \frac{2\mu H_0}{h} \quad (173).$$

Эта частота называется *резонансной*, а само явление – *ядерным магнитным резонансом*. Энергетические уровни ядер в отличие от электронных и колебательных уровней находятся на равном расстоянии друг от друга и в обычных условиях переходы могут происходить только между соседними уровнями. Это означает, что для данного ядра для каждого значения H_0 имеется только одна частота перехода.

На описанном явлении основан метод исследования веществ по спектрам ЯМР, под которыми понимают графическое выражение зависимости величины поглощаемой энергии радиочастотного поля от напряженности внешнего магнитного поля H_0 при постоянной частоте поля ν (или от частоты ν при постоянной H_0). Наиболее часто применяется ЯМР ^1H , или протонный магнитный резонанс (ПМР), поскольку протоны входят в состав многих соединений, а природное содержание ^1H среди других изотопов водорода составляет 99,985%.

Из рассмотренной теории следовало бы ожидать, что спектр ЯМР должен состоять из одной резонансной линии. Однако это не так, как видно из приведенного на рис. 84 спектра этанола. На нем

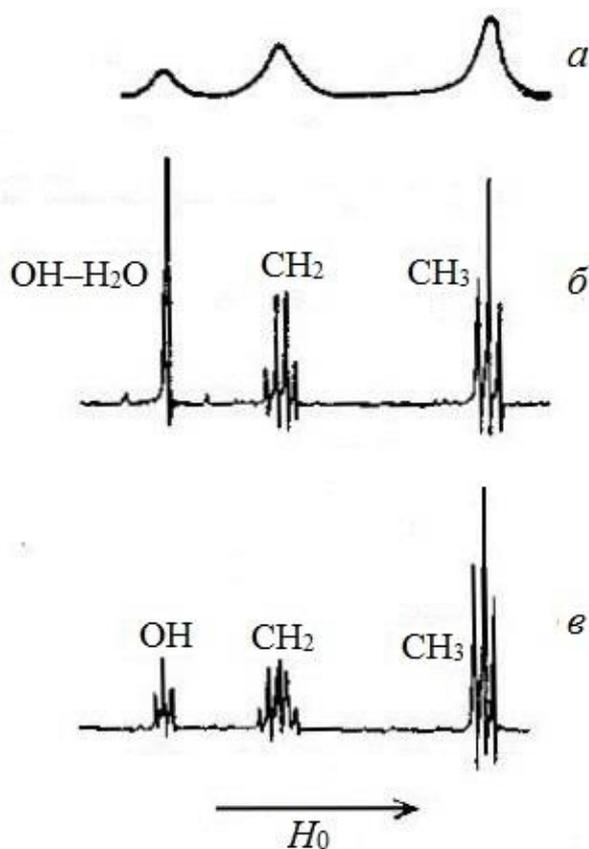


Рис. 84. Спектры ЯМР ^1H этанола: низкого разрешения (а), высокого разрешения (б), высокого разрешения для особо чистого вещества (в) [58, с. 202]

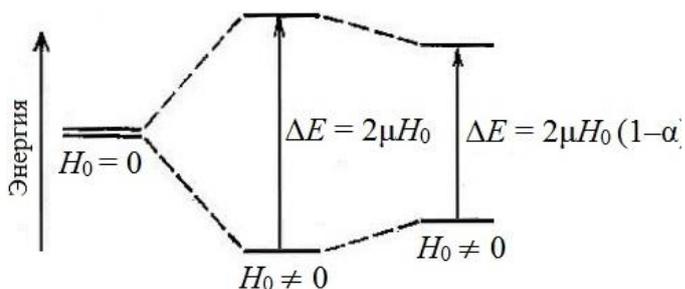


Рис. 85. Влияние электронного экранирования на условия ЯМР [58, с. 202]

наблюдаются три линии с отношением площадей под максимумами 1:2:3, что соответствует протонам групп $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2$ и $-\text{CH}_3$.

Причина этого заключается в том, что ядра окружены (экранированы) электронами, и приложенное магнитное поле H_0 индуцирует также циркуляцию этих электронов. Движущиеся электроны в свою очередь создают дополнительное магнитное поле противоположного знака с напряженностью $H = -\alpha H_0$, где α – константа экранирования, значения которой меняются от 10^{-6} (для тяжелых ядер) до 10^{-2} (для протонов). В зависимости от положения конкретного ядра в молекуле оно может в большей или меньшей степени экранироваться электронами внешних оболочек других атомов. Чем сильнее оттянуты электроны от ядра, тем в более слабых полях (т. е. тем левее в спектре)

будет наблюдаться его резонансная частота в виде пика поглощения, и наоборот, чем больше экранирование, тем правее в спектре (т. е. в более сильных полях) находится пик поглощения.

Благодаря электронному экранированию на ядро каждого типа действует эффективное поле, несколько отличающееся от внешнего магнитного поля H_0 :

$$H_{\text{эфф}} = H_0 - \alpha H_0 = (1 - \alpha)H_0.$$

Экранирование ядер приводит к сближению уровней энергии (рис. 85), поэтому для наблюдения резонанса при неизменной частоте напряженность приложенного поля должна быть больше, чем в случае неэкранированного ядра.

На величину $H_{\text{эфф}}$ также оказывают влияние межмолекулярные эффекты. Например, если ядро находится в молекуле биополимера, то проявляется взаимное влияние различных участков или остатков, которые отдалены в цепи полимера, но находятся по соседству в трехмерном пространстве. Иначе говоря, при свертывании молекулы и формировании третичной структуры биополимера могут оказаться сближенными удаленные химические группы, в результате чего создается новое окружение ядер.

Таким образом, наблюдаемая резонансная частота каждого ядра одинакового типа зависит от химической группы, которой оно принадлежит, и данный фактор лежит в основе всех структурных исследований методом спектроскопии ЯМР. Смещение резонансной частоты в зависимости от химического окружения, обусловленное различием в константах экранирования, называется *химическим сдвигом*.

Для изучения спектров ЯМР удобно иметь соединение, относительно которого проводится отсчет химических сдвигов. В качестве международного стандарта выбран тетраметилсилан $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (ТМС), который отличается химической инертностью и способностью давать единичный узкий сигнал. Для водных растворов биополимеров в качестве стандартного вещества часто применяется ДСС (2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоная кислота) [11, с. 169].

Величину химического сдвига можно выражать в единицах частоты (герцах), но тогда она будет возрастать с увеличением магнитного поля. Чтобы этот параметр не зависел от типа прибора, вводится величина δ , измеряемая в миллионных долях (м. д.) приложенного поля или частоты от сигнала эталонного вещества по формулам

$$\delta = \frac{H_{\text{обр}} - H_{\text{эт}}}{H_0} \cdot 10^6, \quad \delta = \frac{\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{эт}}}{\nu_0} \cdot 10^6 \quad (174),$$

где $H_{\text{обр}} - H_{\text{эт}}$, $\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{эт}}$ – разности резонансных значений напряженности поля и частоты для исследуемого и эталонного образцов; ν_0 – частота генератора. У величины δ остается зависимость от эталонного соединения, поэтому, приводя ее значение, указывают, относительно какого соединения оно определялось.

Химический сдвиг δ двенадцати эквивалентных протонов ТМС принят равным нулю, поскольку резонансные сигналы большинства органических и природных соединений расположены в более слабых полях (рис. 86). Реже в спектрометрии ЯМР используется τ -шкала, в которой сигнал ТМС принят равным 10. Пересчет химических сдвигов из одной шкалы в другую производится по формуле

$$\tau = 10 - \delta \quad (175).$$

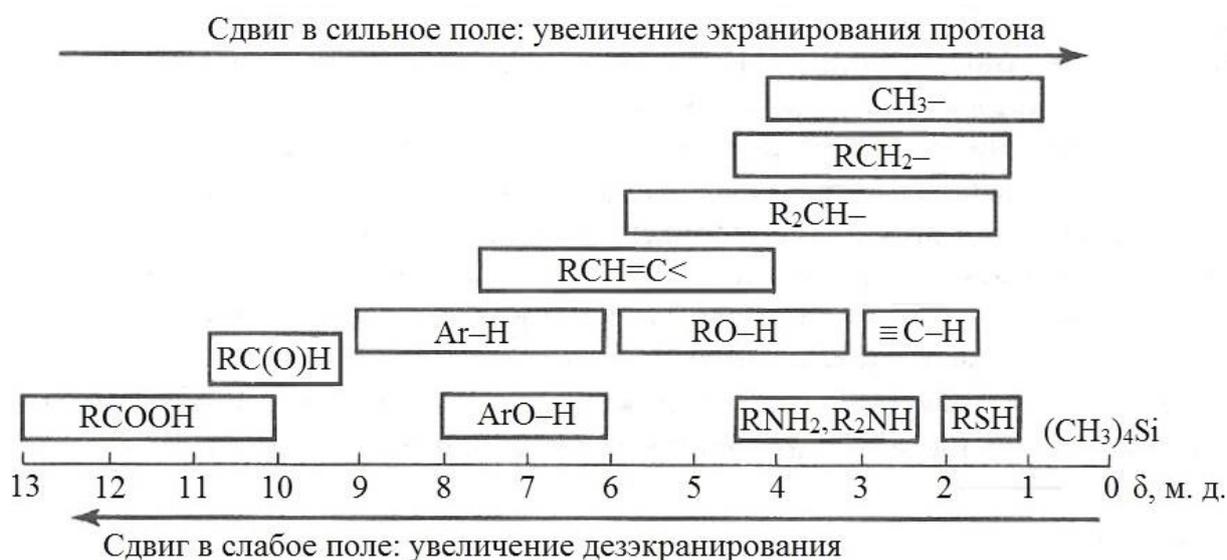


Рис. 86. Усредненные значения химических сдвигов протонов различного типа [50, с. 520]

В большинстве случаев химические сдвиги протонов органических веществ находятся в области $\delta = 0-10$ м. д.; исключение составляют протоны, связанные водородными связями, для которых $\delta > 10$ м. д. Как видно из рис. 85, чем более кислым является протон, тем, как правило, больше его химический сдвиг. Особое положение занимают протоны в бензольных кольцах, дающие сигнал в более слабом поле, чем можно было бы ожидать, исходя из электроотрицательности sp^2 -гибридизированного атома углерода. Такое сильное дезэкранирование объясняется возникновением «кольцевого тока» за счет циркуляции электронов бензольного кольца под действием внешнего

магнитного поля. Кольцевой ток индуцирует магнитное поле, которое совпадает с направлением внешнего магнитного поля в области нахождения протонов и дезэкранирует их.

На рис. 87 показан протонный спектр лизина, на котором видно влияние химической группы, к которой принадлежит протон, на положение сигнала. Так, сдвиг сигнала 1, соответствующего протону при атоме углерода, который непосредственно связан с электроноакцепторной карбоксильной группой лежит в области наиболее слабого поля. В то же время в области самого сильного поля лежит сдвиг сигнала 3, соответствующий протонам метиновой ($-CH$) группы, наиболее удаленной от функциональных групп.

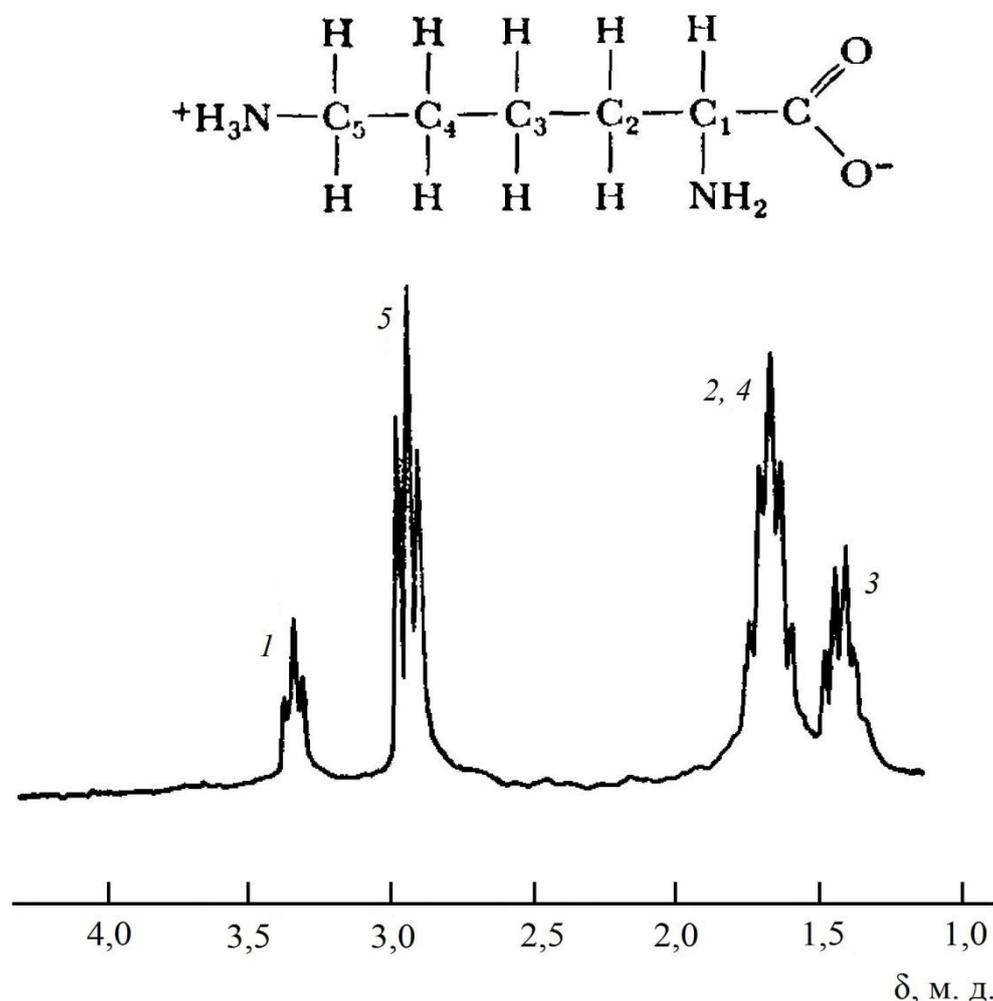


Рис. 87. Спектр ЯМР 1H лизина, находящегося в форме цвиттер-иона в D_2O [54, с. 486]. Номера пиков указывают атомы углерода, у которых находятся протоны, дающие данную группу линий

Во всех предыдущих рассуждениях допускалось, что один протон в определенном электронном окружении дает единственную резонансную линию, однако при высоком разрешении метода пик обычно состоит из группы линий, как видно из рис. 83, б, в. Такое расщепление или, иными словами, *сверхтонкая (мультиплетная) структура* линий ЯМР, возникает в результате *спин-спинового взаимодействия* структурно неэквивалентных ядер через электронные облака атомных связей.

В спектре ЯМР ^1H этанола $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--OH}$ сигнал группы $\text{--CH}_2\text{--OH}$ состоит из четырех линий с отношением интенсивностей 1:3:3:1, а сигналы группы $\text{--CH}_3\text{--}$ из трех линий с отношением интенсивностей 1:2:1 (см. рис. 84, б). Это объясняется тем, что протоны внутри каждой группы взаимодействуют с внешним магнитным полем и, кроме того, на каждый из них действует локальное поле, создаваемое протонами соседней группы. Благодаря

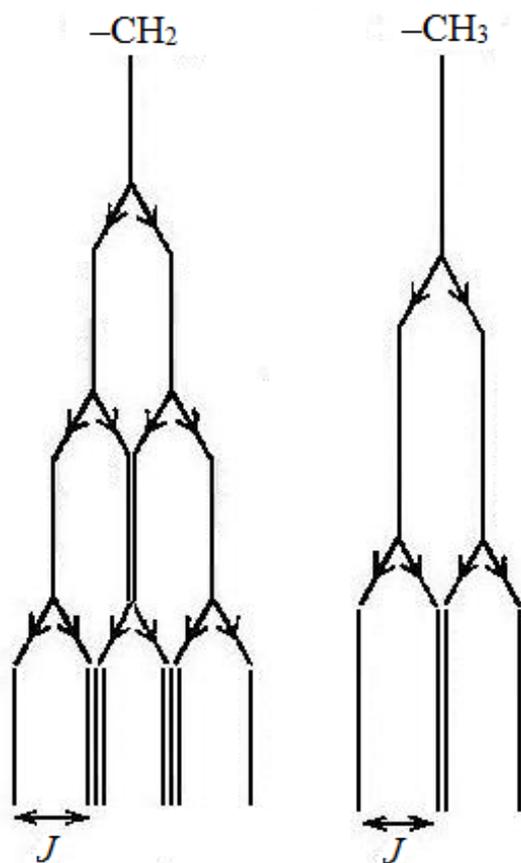


Рис. 88. Спин-спиновое расщепление между группами --CH_2 и --CH_3 в этаноле [58, с. 205]. Константа взаимодействия (J) в обоих случаях одинакова

благодаря двум возможным ориентациям каждого ядерного спина сигнал метильной группы (--CH_3) расщепляется на две линии одним из протонов метиленовой группы (--CH_2). Каждый из этих сигналов снова расщепляется на две линии вторым протоном метиленовой группы, так что всего должно наблюдаться четыре линии. Но регистрируются только три линии (триплет), поскольку две линии из четырех совпадают по своему положению. Аналогично получают четыре линии (квадруплет) для метиленовой группы (рис. 88). Сигнал гидроксила чистого этанола испытывает триплетное расщепление протонами метиленовой группы с отношением интенсивностей 1:2:1, а каждая из четырех линий метиленовой

группы расщепляется в дублет линий равной интенсивности гидроксильным протоном (см. рис. 84, в). Однако при наличии в этаноле даже небольших примесей кислоты или основания имеет место быстрый обмен протонов или гидроксильных ионов между группами –ОН и водой, который подавляет спин-спиновое взаимодействие.

Расстояния между соседними линиями в мультиплетах строго одинаковы и равны константе спин-спинового взаимодействия J протонов соседних групп. Число пиков в мультиплете (M), обусловленном спин-спиновым взаимодействием, для чистых веществ можно рассчитать по следующей формуле¹:

$$M = nI + 1 \quad (176),$$

где I – спиновое квантовое число, n – число соседствующих магнитоэквивалентных ядер. Если взаимодействуют ядра с $I = 1/2$, то

$$M = n + 1 \quad (177),$$

т. е., например, для ядра ^1H (или группы эквивалентных протонов) число пиков в мультиплете всегда на один больше числа атомов водорода у соседнего углеродного атома. Наличие в спектре ЯМР ^1H нерасщепленного (синглетного) сигнала означает, что исследуемая молекула включает группу атомов водорода, рядом с которой нет других водородных атомов [44, с. 120].

Химические сдвиги протонов при наличии спин-спинового расщепления определяются расстоянием от центра мультиплета до сигнала эталона. Величина J не зависит от напряженности приложенного магнитного поля H_0 ; она определяется природой взаимодействующих ядер, числом и характером связей между ними и геометрией молекул. Значения J обычно лежат в области 1–20 Гц. Важно отметить, что спин-спиновое взаимодействие осуществляется только в том случае, если ядра соединены ковалентными связями; оно не является результатом простого сближения, имеющего место при связывании, адсорбции или свертывании макромолекулы.

Мультиплетность сигнала дает информацию о характере химического окружения той или иной группы атомов. С другой стороны, мультиплеты могут осложнять анализ из-за присутствия неразрешенных компонентов, сигнал которых имеет вид широкой линии, или перекрывания компонентов одного мультиплета с другим. Это особенно

¹ Формула справедлива, если разность химических сдвигов взаимодействующих ядер во много раз превышает константу спин-спинового взаимодействия.

справедливо в случае макромолекул. К счастью, преобладающие в природе изотопы ^{12}C и ^{16}O обладают нулевым ядерным спином. Если бы не это обстоятельство, то спин-спиновые взаимодействия ограничи бы область применения спектроскопии ЯМР ^1H только исследованием простейших молекул [58, с. 206].

При резонансной частоте происходит переориентация магнитных моментов ядер. Переходы с более высокого на более низкий энергетический уровень происходят с той же вероятностью, что и с более низкого на более высокий, но из-за очень малой разницы между энергетическими уровнями распределение ядер на них сильно зависит от температуры. При абсолютном нуле все ядра находятся на более низком уровне. В интервале температур, обычно используемых для измерения ($0\text{--}25^\circ\text{C}$), в результате теплового движения многие ядра переходят на более высокий уровень, но и на более низком уровне остается небольшой избыток ядер (~ 1 на 10^5). При наложении радиочастотного излучения, имеющего резонансную частоту, энергия поглощается, и населенности обоих энергетических состояний выравниваются. Когда они станут равными, дальнейшее поглощение энергии прекратится, и сигнал ЯМР регистрироваться не будет.

Чтобы поглощение было непрерывным (как и происходит на самом деле), ядра должны достаточно быстро передавать избыточную энергию для восстановления изначально неравного распределения на энергетических уровнях. Избыточную энергию они могут отдавать и без излучения окружающей среде – «решетке», под которой в данном случае понимаются электроны или ядра другого сорта, чем исследуемые. Происходит релаксационный процесс, непрерывно возвращающий систему спинов в равновесное состояние, которому отвечает распределение Больцмана. Этот процесс называют *спин-решеточной (продольной) релаксацией*. Изменение населенностей уровней после выключения внешнего магнитного поля описывается уравнением

$$\Delta n_{(\tau)} = \Delta n_{(0)} e^{-\frac{\tau}{T_1}} \quad (178),$$

где $\Delta n_{(\tau)}$ – избыток ядер в момент времени τ на более высоком энергетическом уровне по сравнению с равновесной населенностью, $\Delta n_{(0)}$ – то же в момент выключения поля, T_1 – время спин-решеточной релаксации. Время T_1 зависит от концентрации магнитных ядер в веществе, подвижности молекул и температуры. Ширина спектральной линии

ЯМР тем больше, чем меньше время жизни ядра на данном энергетическом уровне.

Возбужденные ядра могут также передавать энергию ядрам такого же сорта, находящимся в низшем энергетическом состоянии. Этот процесс называют *спин-спиновой (поперечной) релаксацией* и характеризуют величиной T_2 – временем спин-спиновой релаксации. Время T_2 также связано со строением молекул и характером теплового движения. В твердых телах $T_2 \leq 10^{-5}$ с, $T_1 \geq 10^2$ с, и ширина линии в спектре определяется только T_2 ; в вязких жидкостях T_2 имеет тот же порядок, что и T_1 (~1 с), ширина линии составляет доли герца.

Если выделить в исследуемой молекуле разные пары ядер a и b с $I = 1/2$, пространственно сближенные до расстояния не более 0,5 нм и связанные друг с другом диполь-дипольным взаимодействием, то при насыщающем облучении на резонансной частоте ядер b произойдет изменение равновесной населенности энергетических уровней не только ядер b , но и ядер a , в результате чего в ЯМР-спектре помимо подавления сигнала спинов b будет наблюдаться изменение интенсивности сигнала спинов a . Если оба ядра – протоны, то сигнал может быть усилен в 1,5 раза, в то время как при наблюдении резонанса ^{13}C по мере облучения соседнего протона сигнал может возрасти почти в 3 раза. Такое изменение спектральной интенсивности сигнала ядер одного типа в условиях насыщающего селективного облучения на резонансной частоте ядер другого типа называется *ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО, или NOE)*. Данный эффект связан с процессами переноса избыточной энергии от спинов b к спинам a по механизму *диполь-дипольной кросс-релаксации*: если одно из вращающихся ядер насыщено энергией, другому ядру становится труднее отдавать свою избыточную энергию, и это проявляется в усилении сигнала ЯМР.

Величина ЯЭО, наблюдаемая между спинами a и b , определяется значением скорости кросс-релаксации σ_{ab} между ними и длительностью времени облучения τ :

$$NOE_{ab} = \sigma_{ab}\tau \quad (179).$$

В свою очередь скорость кросс-релаксации обратно пропорциональна шестой степени расстояния между ядрами a и b ($\sigma_{ab} \sim r_{ab}^{-6}$), поэтому величина NOE_{ab} , измеряемая в ЯМР-эксперименте, позволяет идентифицировать пики ядер, находящихся на близком расстоянии друг от друга и определить эти расстояния. Таким образом, определяя

ЯЭО для различных пар ядер исследуемой молекулы, можно получить количественную информацию о геометрии молекулы [27, с. 316].

Практическая реализация и применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса реализуется посредством использования специальных *ЯМР-спектрометров*. Эти приборы представляют собой совокупность сложных электронных устройств, предназначенных для обеспечения высокой стабильности и точности задаваемых параметров поля. Для успешной работы прибора существует необходимость поддержания частоты и напряженности магнитного поля с погрешностью порядка 10^{-6} – $10^{-7}\%$ [10, с. 136]. Схема типичного прибора показана на рис. 89.

Для работы ЯМР-спектрометра необходимы два магнитных поля – одно постоянное, а другое радиочастотное, держатель образца и детектор того или иного вида.

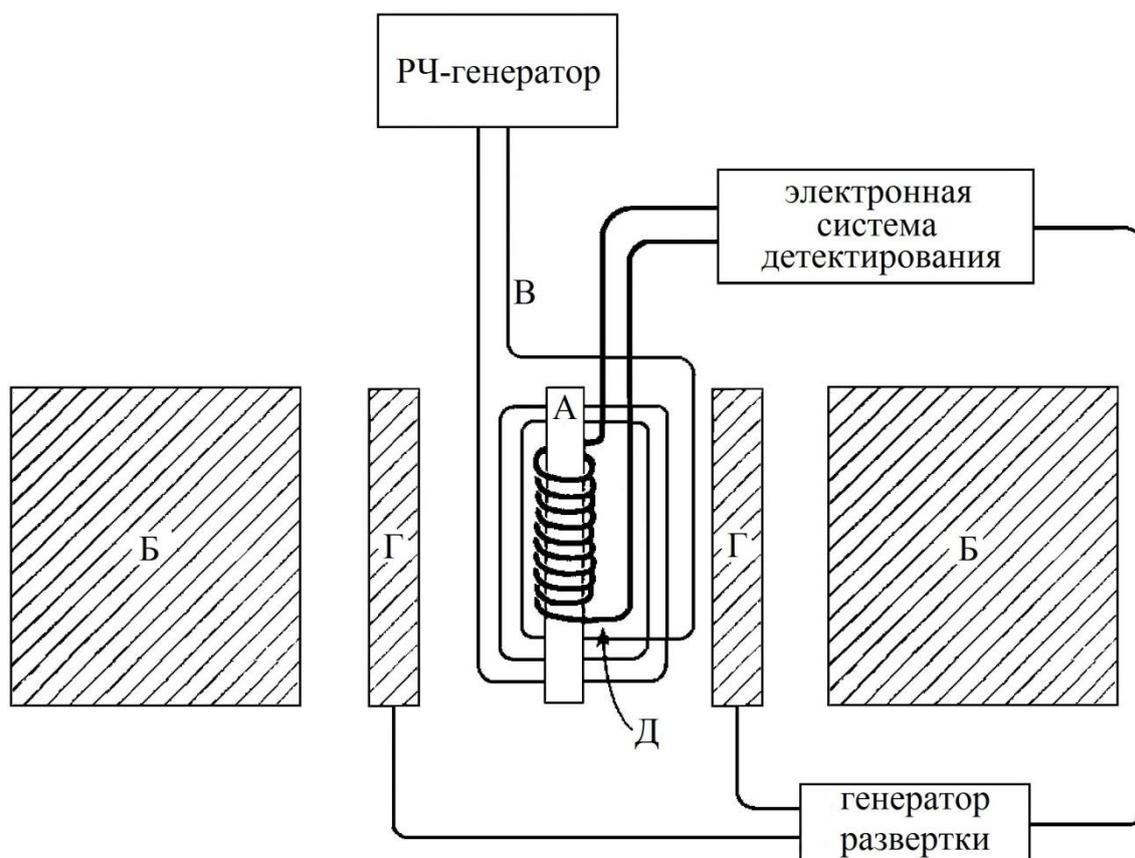


Рис. 89. Принципиальная схема ЯМР-спектрометра [54, с. 493]

Ампула с образцом A помещается в зазор между полюсами B мощного электромагнита, который дает однородное постоянное поле H_0 . Наиболее сильные поля в современных ЯМР-спектрометрах достигаются с помощью магнитов, использующих сверхпроводящие соленоиды; с целью поддержания сверхпроводящих свойств материала используется охлаждение до 5 К с помощью жидкого гелия. Для уменьшения неоднородности поля ампула быстро вращается. Ампула окружена высокочастотной катушкой B , расположенной в плоскости, перпендикулярной полю H_0 электромагнита. Радиочастотный (РЧ) генератор создает в катушке осциллирующее магнитное поле H_1 постоянной частоты. Для достижения резонанса медленно увеличивают магнитное поле небольшого вспомогательного магнита G . (В некоторых приборах вспомогательный магнит отсутствует, и H_1 изменяется путем изменения частоты.) В момент резонанса ядерные магнитные моменты изменяют свою ориентацию, а связанное с этим поглощение энергии вызывает падение напряжения в небольшой катушке D , которая находится под прямым углом как к H_0 , так и H_1 . Это падение напряжения детектируется, усиливается и регистрируется на осциллографе или самопишущем потенциометре.

Разрешающая способность метода увеличивается с ростом силы магнитного поля и, следовательно, частоты. В наиболее эффективных современных спектрометрах используются поля с H_0 до 14,4 Тл, что в случае протонов соответствует резонансным частотам 600 МГц.

Методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса можно с успехом реализовать *качественные измерения* в пробах неизвестных вновь синтезированных веществ. В этом и заключается преимущество ЯМР-спектроскопии – в возможности расшифровки компонентов сложной смеси «без остатка», то есть полностью, даже если содержанию каких-то компонентов соответствуют слабейшие линии спектра. Кроме того, для упрощения реализации качественного определения постоянно создаются и обновляются компьютерные каталоги спектров, химических сдвигов, значений констант спин-спинового взаимодействия, позволяющих в кратчайшие сроки расшифровать спектры неизвестных соединений [43, с. 206].

Двумерная ЯМР-спектроскопия является современным методом конформационного анализа биополимеров, которая в конце 1970-х гг. получила развитие в виде новых методов двумерной (2D) ЯМР-

спектроскопии – 2D-корреляционной спектроскопии (COSY – *Correlated Spectroscopy*) и 2D-спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).

Двумерный спектр ЯМР представляет собой диаграмму, построенную в системе координат резонансных частот вдоль вертикальной и горизонтальной осей (рис. 90). В спектре есть *диагональные сигналы*, представляющие собой обычный ЯМР-спектр, и *кросс-пики*, которые располагаются вне диагонали. Наличие кросс-пика между любыми двумя ядрами свидетельствует о спин-спиновом взаимодействии

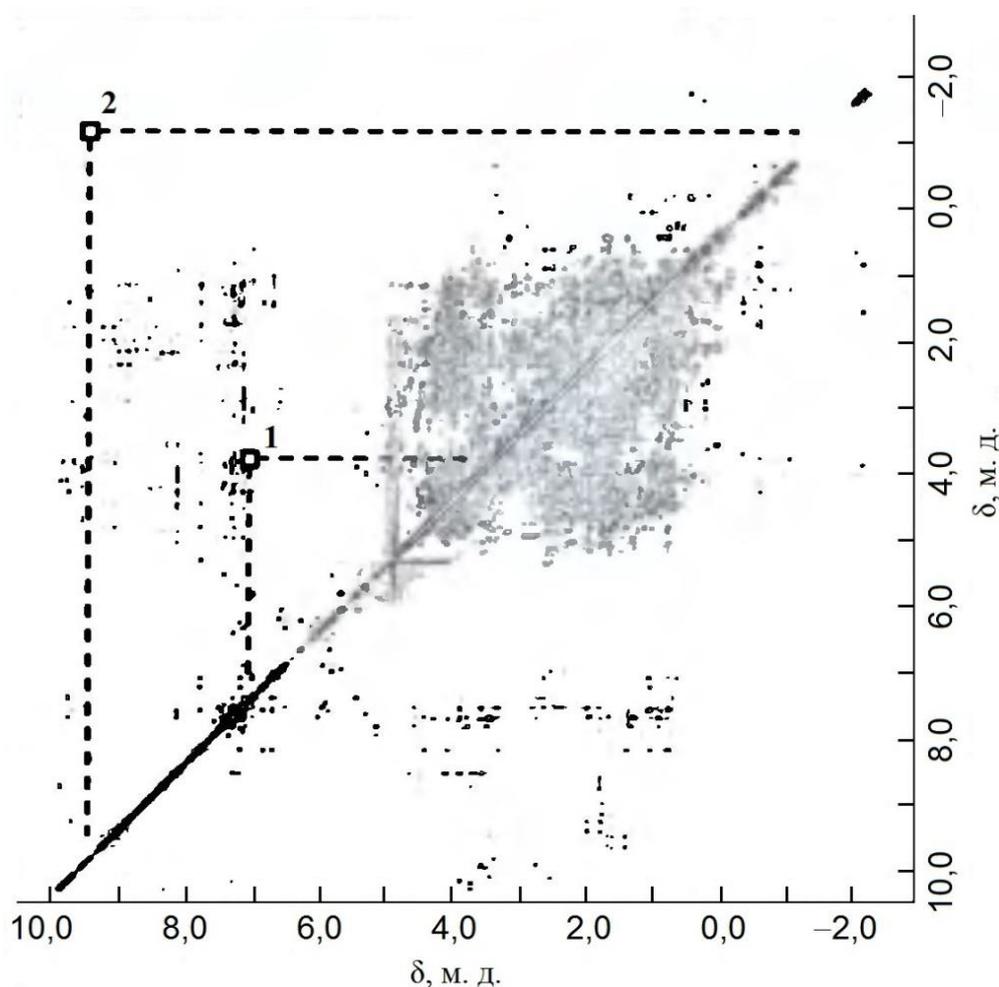


Рис. 90. Метод двумерной спектроскопии ЯМР для получения трехмерной структуры глобина морского червя. Диагональ двумерного спектра ЯМР эквивалентна одномерному спектру. Пики, лежащие вне диагонали, соответствуют сигналам ЯЭО, возникшим в результате взаимодействия расположенных близко друг от друга атомов ^1H , сигналы которых в одномерном спектре могут быть достаточно удалены друг от друга. На данном спектре идентифицированы два таких взаимодействия (обозначены цифрами) [38, с. 198]

между этими ядрами (в случае COSY-спектра) или о ядерном эффекте Оверхаузера (в случае NOESY-спектра). В двумерных спектрах ЯМР сигналы макромолекул идентифицируют, используя методологию последовательного отнесения сигналов, разработанную для определенных типов макромолекул. С использованием кросс-пиков COSY-спектра ядра, связанные скалярным спин-спиновым взаимодействием, объединяют в соответствующие спиновые системы. Далее из NOESY-спектров путем анализа кросс-релаксационных взаимодействий ядер соседних остатков биополимера, получают информацию об относительном расположении данной спиновой системы в последовательности биополимера. Эта информация с учетом известной последовательности мономерных звеньев обеспечивает практически полное отнесение сигналов макромолекулы [28, с. 316].

Для воспроизведения трехмерной структуры биополимера в компьютерную программу закладывают значения межатомных расстояний, а также такие известные геометрические параметры, как хиральность, ван-дер-ваальсовы радиусы, длины и углы связей. На основании этих данных компьютер создает серию структур, отражающих возможный диапазон конформационных состояний молекулы с учетом ограничений межатомных расстояний, полученных из NOESY-спектров.

Кросс-поляризационная спектроскопия ЯМР разработана специально для анализа структуры твердых тел (кристаллов, порошков, твердых полимеров и т.д.) Существовавшие трудности в определении структуры твердых тел, связанные с дипольными уширениями, которые препятствовали регистрации тонкой структуры спектров, вызванной химическими сдвигами и спин-спиновыми взаимодействиями, были решены с помощью нескольких технических приемов. Используя возможность смены угла вращения образца по отношению к поляризирующему полю, добились уменьшения внутренних дипольных полей, что позволило нивелировать эффект дипольных уширений и повысить точность снятия спектров. Другая трудность в регистрации спектров твердых веществ была решена с помощью *кросс-поляризации*. Дело в том, что спектры ЯМР твердых тел легко насыщаются, поэтому многоимпульсные методы становятся малоэффективными. Но применив подготовку протонных спинов, приводящую к существенному увеличению намагниченности ядер ^{13}C , удалось пре-

одолеть и эту проблему. В результате этих манипуляций интенсивность сигналов ЯМР ^{13}C сильно возрастает, и становится возможной регистрация спектров твердых образцов [43, с. 209–210].

Количественные определения методом ЯМР-спектроскопии можно разделить на две группы: абсолютный количественный анализ и относительный количественный анализ. В рамках *абсолютного количественного анализа* решается задача определения по интенсивности сигнала ЯМР какому количеству ядер (в граммах или молях) соответствует тот или иной зарегистрированный сигнал. *Относительный количественный анализ* позволяет определить при наличии двух сигналов в спектре, в какой степени отношение интенсивностей этих сигналов соответствует отношению концентраций (количеств) веществ, соответствующих этим сигналам [43, с. 210].

С помощью этого метода можно с высокой точностью определять количества десятков веществ, находящихся в растворе в очень широком интервале от 10^{-7} – 10^{-5} до 1–2 моль/л и выше, используя совсем незначительные объемы проб (до 0,5 мл). Для реализации количественного анализа чаще всего строят градуировочный график или готовят серию стандартных растворов, добавляя некоторое количество анализируемого вещества в каждый раствор (метод добавок).

Безусловным преимуществом метода ЯМР-спектроскопии является возможность многократного использования уже изученной пробы для анализа с помощью других методов. В ходе ЯМР исследований не происходит деградации веществ, содержащихся в изучаемых образцах, что и дает возможность использовать их повторно. Кроме того, для успешного снятия ЯМР спектра совершенно никакого значения не имеет агрегатное состояние вещества, цвет раствора или его мутность, степень кислотности или щелочности т.п. Но есть у данного метода и ограничения. Малые концентрации анализируемых веществ в растворах могут быть и не обнаружены, вследствие достаточно низкой чувствительности метода [43, с. 210–212].

Таким образом, метод ЯМР-спектрометрии является одним из передовых в решении вопросов, возникающих в рамках различных отраслей научной и производственной деятельности, таких как химия, биология, биохимия, медицина, материаловедение, нефтехимия и др. Результаты анализа обладают высочайшей информативностью, позволяющей разобраться в конформационных равновесиях, диффузии

атомов и молекул в твердых телах, внутримолекулярных движениях, упорядоченности и распределении звеньев в полимерных цепях, адсорбции веществ и в огромном количестве других аналитических вопросов. Это один из самых надежных методов в определении структурных особенностей биополимеров, например, белковых молекул в растворах. Вклад ЯМР-спектроскопии в современное состояние науки и техники трудно переоценить [2, с. 150–151].

Контрольные вопросы

1. Что представляют собой ядерный спин и магнитный момент атомного ядра? Какие значения может принимать спиновое квантовое число атомных ядер?

2. Как ориентируются ядра во внешнем магнитном поле? Когда наблюдается ядерный магнитный резонанс? Какая частота называется резонансной?

3. Что называется химическим сдвигом и какими причинами он вызывается? В каких единицах измеряется химический сдвиг?

4. Приведите примеры влияния структуры соединений на величину химического сдвига.

5. Чем обусловлено спин-спиновое взаимодействие? Как рассчитывается число пиков в мультиплетах?

6. В чем заключается сущность процессов спин-решеточной и спин-спиновой релаксации?

7. Что называется ядерным эффектом Оверхаузера? Как определяется величина этого эффекта?

8. Назовите наиболее распространенные методы двумерной спектроскопии ЯМР. Как строятся двумерные спектры ЯМР и в чем их преимущество перед одномерными спектрами?

9. Охарактеризуйте возможности качественного определения веществ методом ЯМР-спектроскопии.

10. Каковы возможности использования явления ядерного магнитного резонанса для решения задач количественного определения соединений различного состава и происхождения?

3.9. СПЕКТРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Теоретические основы спектроскопии электронного парамагнитного резонанса

Явление электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было открыто в 1944 г. советским физиком Е. К. Завойским в Казанском университете. Метод спектроскопии ЭПР основан на присутствии в атомах неспаренных электронов, оси которых в сильном магнитном поле могут выполнять движения с определенной частотой. Если к веществу подводить микроволновое излучение этой же частоты, происходит резонансное поглощение излучения.

Теория электронного парамагнитного резонанса в основных чертах сходна с теорией ЯМР. Электрон, как и магнитные ядра, обладает спином, ориентация которого во внешнем магнитном поле характеризуется спиновым квантовым числом $M_S = \pm 1/2$. Условия резонанса (рис. 91) выражаются в виде

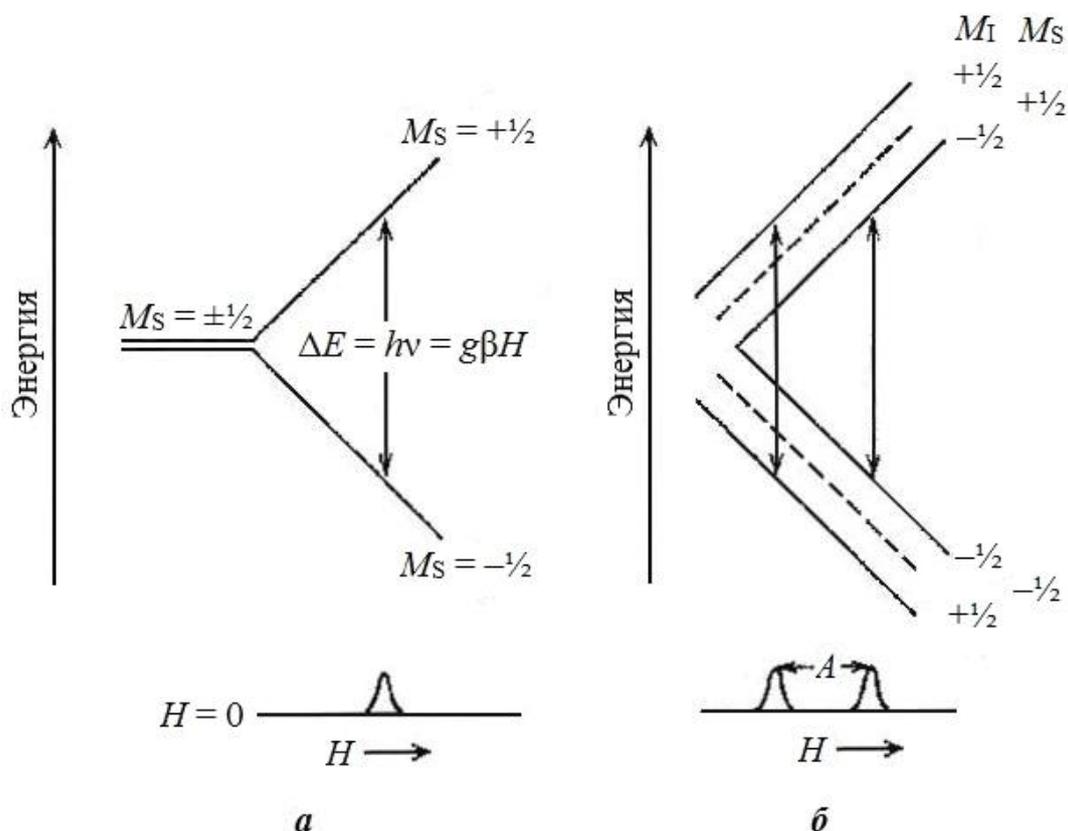


Рис. 91. Условия резонанса [58, с. 209]:
 а – для электрона, б – для электрона в атоме водорода

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \quad (180),$$

где g – безразмерная постоянная, называемая g -фактором (фактором Ланде) и равная для свободного электрона 2,0023 (для свободных радикалов, ионов переходных металлов и других носителей неспаренных электронов g -фактор на несколько процентов отклоняется от этого значения); β – универсальная постоянная, называемая *магнетон Бора* и равная $eh/2\pi mc = 9,274 \cdot 10^{-24}$ Дж/Тл, где e и m – заряд и масса электрона, c – скорость света.

В подавляющем большинстве органических соединений спины электронов скомпенсированы и ЭПР отсутствует. Спектры ЭПР можно наблюдать для свободных радикалов и молекул, содержащих в своем основном состоянии один или несколько неспаренных электронов, например O_2 , NO , NO_2 , CO_2 . Неспаренные d -электроны имеются также в ионах многих переходных металлов¹, например Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} . Данный факт играет важную роль в биохимических исследованиях, т. к. эти парамагнитные ионы являются кофакторами многих ферментов, и метод ЭПР может дать важную информацию об их электронном строении [11, с. 171–172].

Обычно, кроме неспаренных электронов, исследуемые системы содержат ядра, обладающие собственными магнитными моментами. За счет взаимодействия электронных и ядерных магнитных моментов электронные уровни подвергаются дополнительному расщеплению и возникает *сверхтонкая структура* спектров ЭПР. При взаимодействии неспаренного электрона с одним протоном в спектре будут наблюдаться две линии равной интенсивности. Если неспаренный электрон взаимодействует с двумя структурно эквивалентными протонами, то возникает триплет с соотношением интенсивностей 1:2:1. В общем случае число линий сверхтонкой структуры можно получить из выражения $(2nI + 1)$, где n – число однотипных или эквивалентных протонов, а I – ядерный спин. Расстояние между линиями сверхтонкой структуры дает *константу сверхтонкого взаимодействия* (A).

Ширина линий в спектре ЭПР определяется, как и в ЯМР, спин-спиновой и спин-решеточной релаксацией. Время спин-спиновой ре-

¹ Неспаренные электроны имеются у всех ионов переходных металлов, однако не во всех случаях удается получить спектр ЭПР. Согласно теореме Крамерса, для исследования методом ЭПР больше всего подходят ионы с *нечетным* числом неспаренных электронов [58, с. 208].

лаксации T_2 зависит от подвижности частиц с ненулевыми спинами и почти не зависит от температуры. Время спин-решеточной релаксации T_1 связано с подвижностью окружающих молекул и возрастает при понижении температуры [11, с. 172].

Практическая реализация и применение спектроскопии электронного парамагнитного резонанса

Поскольку магнитный момент электрона примерно в 600 раз больше, чем магнитный момент протона, техника ЭПР и ЯМР весьма различна. Большинство исследований в области ЭПР выполнено при силе поля около 340 мТл и постоянной частоте вблизи 9,5 ГГц, попадающей в микроволновый диапазон. Некоторые приборы работают на частотах до 35 ГГц.

На рис. 92 приведена блок-схема простого видеоспектрометра ЭПР. Источником микроволнового излучения служит клистронный осциллятор 1, уровень излучения регулируется аттенюатором 2. Генератор 1 согласуется с резонатором 6, в который помещается образец, при помощи фазовращателя 3. Магнитное поле, создаваемое электромагнитом 4, модулируется сетевой частотой при помощи модуляционных катушек 5. Сигнал ЭПР детектируется полупроводниковым диодом 7, усиливается широкополосным усилителем 8 и поступает на вертикальные пластины осциллографа 9. Горизонтальная развертка осциллографа синхронизована с питанием модуляционных катушек. Постоянное поле магнита 4 устанавливается вблизи резонансного значения. Модуляция поля, осуществляемая катушками 5, должна пере-

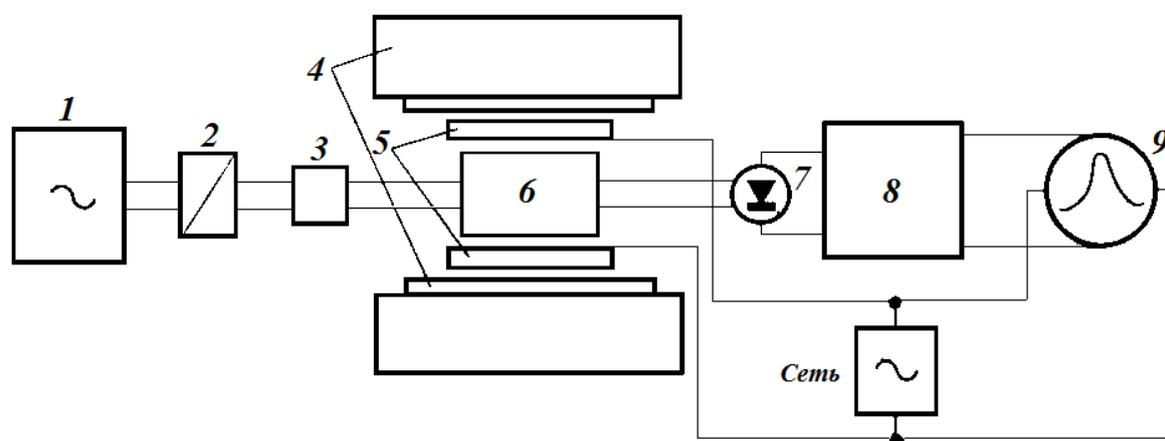


Рис. 92. Блок-схема спектрометра ЭПР [52, с. 292]

крывать линию ЭПР. В момент прохождения поля через резонансное значение часть микроволнового излучения поглощается образцом, и уровень мощности, поступающей на детектор, уменьшается. При такой схеме прибора на экране осциллографа появляется линия поглощения в координатах интенсивность поглощения I – напряженность магнитного поля H (рис. 92) [52, с. 292].

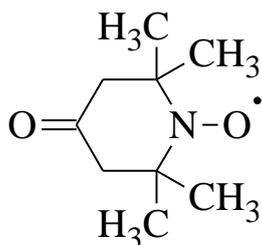
Для получения лучшего разрешения выгодно записывать спектр ЭПР в дифференциальной форме, регистрируя первую или вторую производную I по H . Для получения таких спектров (рис. 93) на постоянное магнитное поле накладывается переменное поле.



Рис. 93. ЭПР-спектр [27, с. 89]

ЭПР-спектроскопия находит широкое применение в биологических и биохимических исследованиях, в частности в изучении механизмов окислительно-восстановительных ферментативных реакций, радиохимических и фотохимических процессов, которые сопровождаются образованием свободных радикалов. ЭПР очень важен для изучения гемопротеинов, содержащих в качестве кофакторов атомы металла с некомпенсированным спином.

Широкое распространение для исследования конформационных превращений биополимеров получил *метод спиновых меток*. Его суть заключается в том, что к определенным группам макромолекул химическим путем «пришивают» молекулы метки, а затем по форме спектра ЭПР наблюдают за изменениями ее молекулярной подвижности, обусловленными структурными перестройками в макромолекуле. Особенно удобны в качестве спиновых меток вещества, фрагментом которых является химически стабильный нитроксильный радикал $>N-O\cdot$, например 1,1,4,4-тетраметилпиперидиноксил:



С помощью спиновых меток удалось обнаружить слабые структурные изменения гемоглобина, происходящие при связывании им кислорода, которые не удавалось обнаружить при рентгеноструктурном исследовании [27, с. 89]. В 1970-е гг. опыты с использованием спиновых меток, проведенные в СССР и США, наглядно доказали существование конформационных перестроек молекулы миозина задолго до того, как было выяснено ее детальное строение и изучена динамика структурных изменений в мышечном волокне [48, с. 13].

Спиновые метки широко используются для изучения динамики биополимеров в растворах и составе сложных макромолекулярных комплексов, то есть в условиях, наиболее близких к естественным. Тем самым метод спиновых меток удачно дополняет другие физические методы исследования биополимеров, такие, как рентгеноструктурный анализ и ядерный магнитный резонанс.

Контрольные вопросы

1. На чем основан метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса? Для каких веществ или частиц можно наблюдать спектры ЭПР?
2. Как выражаются условия электронного парамагнитного резонанса?
3. Чем обусловлено возникновение сверхтонкой структуры спектров ЭПР? Как определяется число пиков в мультиплетах?
4. Опишите принципиальную схему устройства спектрометра ЭПР.
5. В чем заключается метод спиновых меток и какова область его применения?

3.10. НЕФЕЛОМЕТРИЯ И ТУРБИДИМЕТРИЯ

Теоретические основы нефелометрического и турбидиметрического методов анализа

При прохождении пучка света через взвеси мельчайших твердых частиц в растворителе (дисперсную систему) наблюдается боковое рассеяние света, благодаря чему можно наблюдать пучок света, проходящий через среду, в виде мутной полосы. Системы, в которых наблюдается явление рассеяния света, называются *мутными*. В случае если линейные размеры частиц превосходят длину падающей световой волны, то светорассеяние может происходить двумя путями:

- 1) в ходе преломления света на границе раздела частица-растворитель;
- 2) в результате отражения света частицами.

Если же длина волны падающего света велика по сравнению с линейными размерами частиц, то наблюдается т.н. *эффект Тиндаля* – явление дифракции световой волны в результате огибания ею находящейся на пути частицы. В связи с данными особенностями распространения света в мутных растворах, оказалось возможным разработать два родственных аналитических метода определения концентрации вещества – нефелометрия и турбидиметрия.

Нефелометрический метод анализа (нефелометрия) – метод анализа, в основе которого лежит измерение интенсивности светового потока, рассеянного твердыми частицами, находящимися в растворе.

Турбидиметрическим методом анализа (турбидиметрией) называют метод, основанный на измерении ослабления интенсивности светового потока, прошедшего через раствор, содержащий твердые частицы.

Рассеяние и поглощение света мутными растворами. При нефелометрических определениях измеряют интенсивность рассеянного светового потока (I_r) в направлении, перпендикулярном направлению падающего потока (I_0). Турбидиметрия, в свою очередь, применяется для определения интенсивности ослабленного света, прошедшего через кювету с раствором (I_t) (рис. 94).

Интенсивность светового потока, рассеиваемого мельчайшими частицами взвеси можно определить с помощью уравнения Рэлея:

$$I_r = I_0 \left[\frac{n_1^2 - n^2}{n^2} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 r^2} (1 + \cos^2 \beta) \right] \quad (181),$$

где n и n_1 – коэффициенты преломления частиц и среды; N – общее количество частиц; V – объем частицы; λ – длина волны падающего света; r – расстояние до наблюдателя; β – угол, образованный падающим и рассеянным светом.

Уравнение (181) можно представить в упрощенном виде, вследствие того, что величины

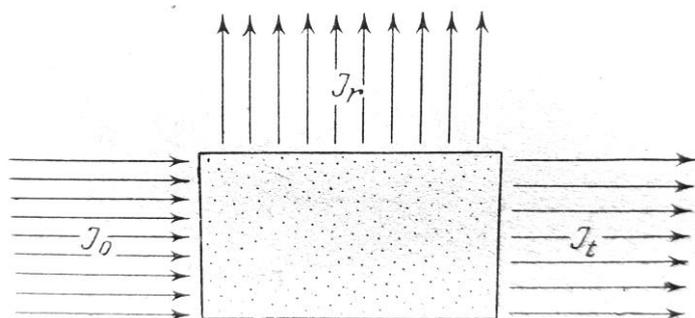


Рис. 94. Рассеивание и поглощение света мутным раствором [35, с. 68]

в нефелометрических исследованиях остаются постоянными:

$$I_r = I_0 K \frac{NV^2}{\lambda^4} \quad (182),$$

где K – коэффициент пропорциональности.

Из уравнения (182) следует, что интенсивность

рассеянного светового потока прямо пропорциональна количеству дисперсных частиц, то есть концентрации определяемого вещества. Кроме количества частиц, на интенсивность светорассеяния также влияют размеры частиц – это значительно усложняет практическое применение нефелометрического метода анализа.

При турбидиметрических измерениях интенсивность прошедшего через суспензию светового потока I_t находят по уравнению:

$$D = \lg \frac{I_0}{I_t} = k \frac{cld^3}{d^4 + \alpha\lambda^4} \quad (183),$$

где D – рассеивающая способность (эта величина аналогична оптической плотности); I_0 – интенсивность падающего светового потока; I_t – интенсивность светового потока, прошедшего через раствор; c – концентрация поглощающих частиц в растворе; l – толщина поглощающего слоя раствора; d – средний диаметр поглощающих частиц; k и α – константы, зависящие от природы суспензии и метода измерения; λ – длина волны.

При постоянных значениях величин d , λ , k и α получаем:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = klc \quad (184).$$

Таким образом, основное уравнение турбидиметрии имеет вид, аналогичный уравнению Бугера – Ламберта – Бера:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-klc} \quad (185),$$

где k – молярный коэффициент мутности раствора [35, с. 68–70].

При работе с данными методами исследования для получения достоверного результата очень важно соблюдать ряд условий:

1) Нефелометрический и турбидиметрический методы чаще всего применяют для измерения концентрации веществ в сильно разбавленных растворах, поэтому получаемые взвеси должны иметь ничтожно малую растворимость.

2) Из вышеизложенных уравнений следует, что величины поглощенного и рассеянного света зависят от размеров частиц, находящихся в растворе. Поэтому необходимо создавать одинаковые условия в ходе приготовления суспензий, подвергающихся измерению. Для того, чтобы получить растворы, имеющие одинаковые оптические свойства и размер взвешенных частиц, необходимо контролировать следующие факторы: а) концентрацию ионов, образующих осадок; б) отношения между концентрациями смешиваемых растворов; в) порядок смешивания; г) время, необходимое для получения максимальной мутности раствора; д) стабильность дисперсии; е) присутствие посторонних электролитов; ж) присутствие неэлектролитов; з) скорость смешивания; и) температура; к) кислотность среды; л) наличие защитных коллоидов (которые применяют для увеличения стойкости взвесей и предотвращения их осаждения) [35, с. 70–71].

Практическая реализация и применение нефелометрии и турбидиметрии

Для проведения нефелометрических измерений пользуются нефелометрами – приборами, предназначенными для измерения степени светорассеяния раствора под углом 90° к направлению падающего луча. Кроме того данный тип измерений в настоящий момент можно производить и на флуориметрах (например, «Флюорат-02»), так как конструкция данных приборов в целом совпадает (см. главу 3.2). Люминесцентные анализаторы, как правило, комплектуются методиками и специальными приспособлениями для нефелометрических измерений (светофильтрами и т. п.).

Для турбидиметрии можно использовать любой фотометр или спектрофотометр, их назначение и принцип действия подробно описаны в главе 3.1. Условия эксперимента подбираются в зависимости от природы изучаемой взвеси. При определении бесцветных частиц в бесцветном растворителе целесообразно использовать излучение голубой или ближней ультрафиолетовой части спектра. Для определения концентрации частиц в окрашенных системах, чаще всего длину волны определяют экспериментально [43, с. 187].

Принципиальная оптическая схема нефелометра НФМ представлена на рис. 95. Свет от лампы накаливания 1 проходит через стеклянную пластинку 2, конденсор 3 и попадает в кювету 4, помещенную в камеру с дистиллированной водой. Камеру с водой применяют для того, чтобы уменьшить рассеивание света стенками кюветы. Световой поток, прошедший через кювету, гасится в светоловушке 5, а части светового потока, рассеянного частицами взвеси в кювете 4 и стеклянным рассеивателем 17, собираются насадочными линзами 6 и 16. Образовавшиеся два пучка проходят через диафрагмы 7 и 15, связанные с отсчетными барабанами и объективами 8 и 14, направляются в ромбические призмы 9 и 13. Бипризма 10 дает возможность наблюдать в поле зрения окуляра 12 интенсивность двух пучков света. При нефелометрических определениях на пути пучков света вводят светофильтры 11, применение которых нивелирует разницу в оттенках двух световых потоков [33, с. 272].

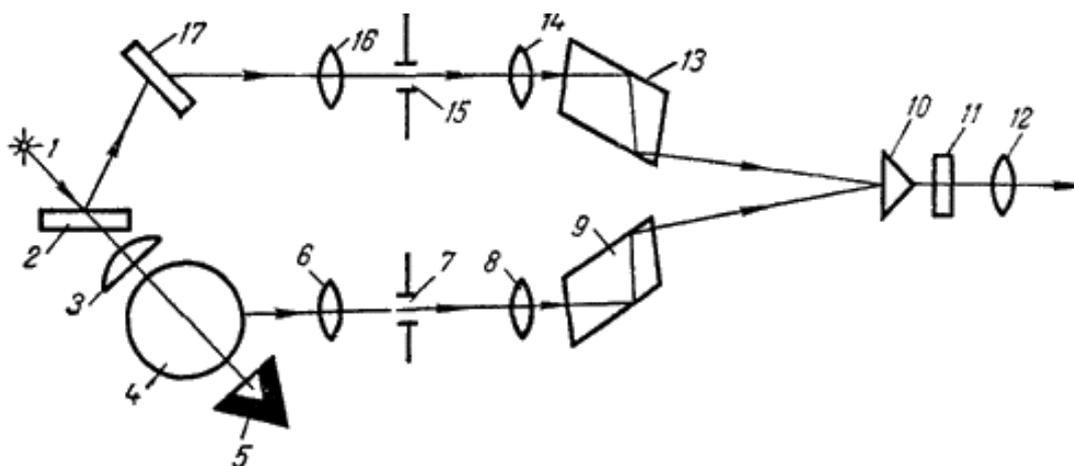


Рис. 95. Оптическая схема нефелометра НФМ [33, с. 272]:

- 1 – лампа накаливания; 2 – стеклянная пластинка; 3 – конденсор; 4 – кювета;
 5 – светоловушка; 6, 16 – насадочные линзы; 7, 15 – диафрагмы; 8, 14 – объективы;
 9, 13 – ромбические призмы; 10 – бипризма; 11 – светофильтры;
 12 – окуляр; 17 – рассеиватель

Количественные определения нефелометрическим и турбидиметрическим способом проводят по стандартным растворам с последующим построением градуировочного графика. В случае с нефелометрией строят график в координатах $I/I_0 - c$, для турбидиметрии график строится по зависимости рассеивающей способности от концентрации вещества ($D - c$) [39, с. 78]. Количественное определение веществ данными методами сопряжено с рядом сложностей: взвеси стандартных растворов устойчивы непродолжительное время, вследствие постоянного укрупнения частиц и их вероятного выпадения в осадок. Поэтому применение данного приема носит ограниченный характер [7, с. 90].

В ряде случаев для определения концентрации веществ в растворе пользуются методом турбидиметрического титрования. Сущность его состоит в том, что к испытываемому раствору в кювете небольшими порциями добавляют раствор реактива, образующего малорастворимый осадок с определяемым ионом. После добавления каждой порции реагента определяют рассеивающую способность D исследуемого раствора, при достижении точки эквивалентности будет наблюдаться максимум помутнения. Дальнейшее титрование не будет оказывать влияние на степень мутности. Точку эквивалентности находят по графику зависимости рассеивающей способности от объема титранта. На рис. 96 приводится кривая турбидиметрического титрования молибдата аммония раствором уксуснокислого свинца.

Известен способ определения молекулярной массы полимеров в различных растворах посредством рассматриваемых методов исследования. Для успешного решения задачи необходимо знать мутность, концентрацию, показатель преломления, длину волны, производную показателя по концентрации и величину,

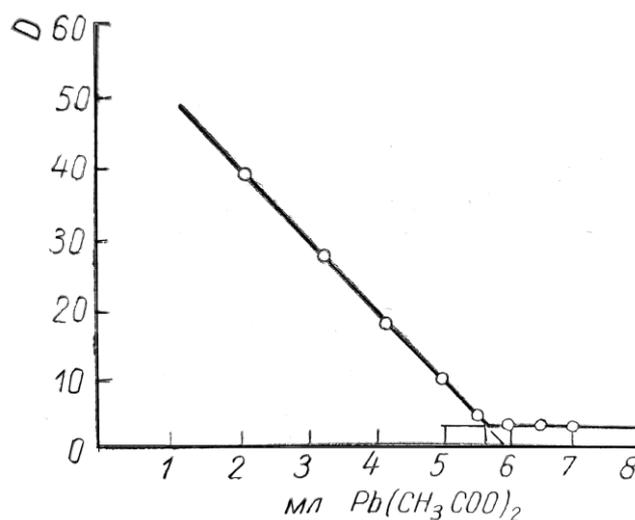


Рис. 96. Турбидиметрическое титрование молибдата аммония раствором уксуснокислого свинца [7, с. 97]

являющуюся мерой неидеальности раствора – т.н. вириальный коэффициент. Важным условием также является размер частиц – они должны быть меньше длины волны. Для осуществления такого рода исследований применяют специальные фотометры, предназначенные для измерения светорассеяния, они позволяют проводить наблюдения под несколькими углами, снабжены набором кювет и поляризаторами, которые дают возможность получить информацию о форме частиц, взвешенных в растворе.

Также методы, связанные со светорассеянием, можно применять в целях изучения воздушной среды, в таком случае пользуются особенностью лазерного потока уменьшать интенсивность излучения с увеличением числа частиц, содержащихся в воздухе. Сконструировав нехитрый детектор, состоящий из лазера и фотоэлемента, можно определить несколько микрограммов мельчайших частиц дыма, размеры которых не превышают 0,1–1,0 мкм в 1 м³ воздуха.

Нефелометрические и турбидиметрические методы анализа отличаются высокой чувствительностью, что делает их незаменимыми при определении концентрации веществ, не дающих окрашенных соединений в ходе химических реакций или при отсутствии методик по их фотометрическому или другому типу определения. Однако, по точности измерения нефелометрия и турбидиметрия уступают тем же фотометрическим методам, связано это с многообразием факторов, влияющих на стабильность эксперимента: это и размер взвешенных частиц, и скорость их осаждения, стабильность суспензии во времени и т.п. Ошибки определения концентраций нефелометрическим методом обычно лежат в пределах 2–5%, в турбидиметрических методах примерно так же (около 5%).

В целом данные методы применяют при анализе взвесей, эмульсий, суспензий, коллоидных растворов искусственного и природного происхождения, то есть они нашли свое применение в химической, пищевой промышленности, биологических и экологических исследованиях. Но сложности в воспроизведении одинаковых условий в ходе анализа побуждают исследователей прибегать к более универсальным и распространенным методам измерений концентраций химических веществ [39, с. 78–79].

Контрольные вопросы

1. Какие системы называют мутными?
2. В каких условиях проявляется эффект Тиндаля?
3. Дайте понятия нефелометрическому и турбидиметрическому методам анализа.
4. Охарактеризуйте особенности рассеяния и поглощения света мутными растворами.
5. Какие условия необходимо соблюдать при использовании турбидиметрии и нефелометрии?
6. Назовите приборы, используемые для нефелометрических и турбидиметрических исследований. В чем их особенность?
7. Отметьте основные узлы оптической схемы нефелометра НФМ.
8. В чем сущность количественных определений посредством использования нефелометрии и турбидиметрии?
9. Как осуществляют турбидиметрическое титрование?
10. Какое применение нашли нефелометрические и турбидиметрические методы исследования на практике? Приведите примеры.

3.11. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Теоретические основы рефрактометрии

Рефракцией (от лат. *refractus* – «преломленный») называют явление преломления световых лучей на границе раздела двух различных 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. 97) [7, с. 101].

Закон преломления (закон Снеллиуса): отношение синуса угла падения α_1 к синусу угла преломления α_2 есть величина постоянная (рис. 98):

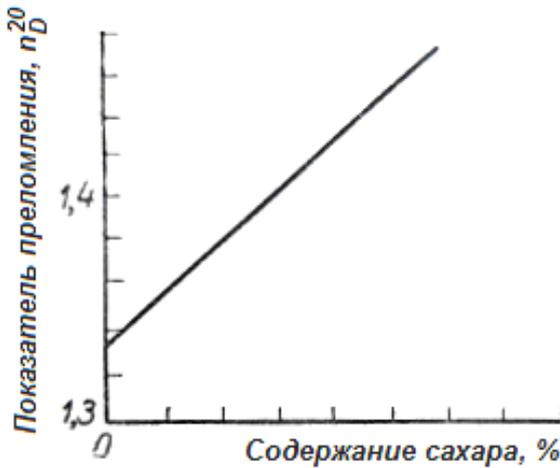


Рис. 97. График зависимости показателя преломления водного раствора сахара от концентрации [7, с. 102]

$$n_{2(\text{отн})} = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} \quad (186).$$

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:

$$n_{2(\text{абс})} = \frac{\sin \alpha_{\text{вакуум}}}{\sin \alpha_2} \quad (187).$$

Аналогично для первой среды:

$$n_{1(\text{абс})} = \frac{\sin \alpha_{\text{вакуум}}}{\sin \alpha_1} \quad (188).$$

Отсюда относительный показатель преломления будет равен отношению абсолютных показателей преломления:

$$n_{2(\text{отн})} = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{\sin \alpha_{\text{вакуум}} n_{2(\text{абс})}}{\sin \alpha_{\text{вакуум}} n_{1(\text{абс})}} = \frac{n_{2(\text{абс})}}{n_{1(\text{абс})}} \quad (189),$$

$$n_{1(\text{абс})} \sin \alpha_1 = n_{2(\text{абс})} \sin \alpha_2 \quad (190).$$

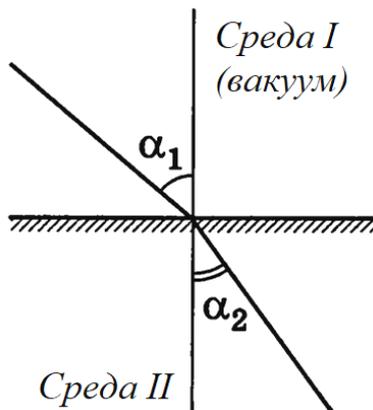


Рис. 98. Преломление светового луча на границе вакуума с более плотной средой [7, с. 144]

Относительный показатель преломления $n_{2(\text{отн})}$ по отношению к воздуху называют просто *показателем преломления n* , т. е. если $n_{1(\text{абс})} = n_{\text{абс(воздух)}}$, $n_{2(\text{отн})} = n$, то выражение (189) можно записать в виде

$$n_{\text{абс}} = n_{\text{абс(воздух)}} n \quad (191).$$

При нормальном атмосферном давлении и комнатной температуре $n_{\text{абс(воздух)}} = 1,00027$, поэтому

$$n_{\text{абс}} = 1,00027 n \quad (192).$$

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°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 (186) приобретает вид

$$n_{2(\text{отн})} = \sin \varphi \quad (193).$$

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 φ называют *углом полного внутреннего отражения*, а также *предельным или критическим углом* (рис. 99). Его величина на границе двух веществ зависит только от их показателей преломления:

$$n_{2(\text{отн})} = \frac{n_1}{n_2} \sin \varphi \quad (194).$$

Следовательно, если известен показатель преломления одного вещества, то показатель преломления другого вещества можно определить, измерив предельный угол φ . На этом основан метод рефрактометрии [39, 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

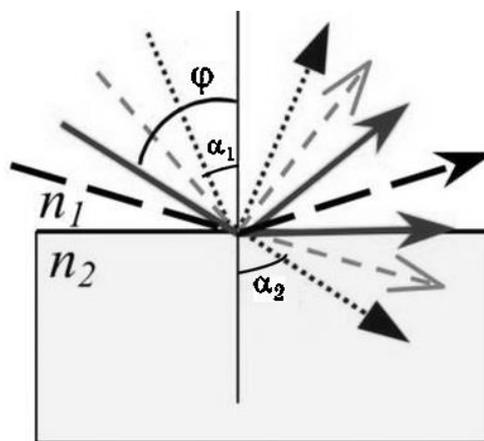


Рис. 99. Полное внутреннее отражение [35, с. 116]

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 α между входной и выходной гранями называется *преломляющим углом* призмы. Луч, соответствующий предельному углу φ и называемый *предельным лучом*,



Рис. 100. Рефрактометр ИРФ-454-Б2М (типа Аббе)

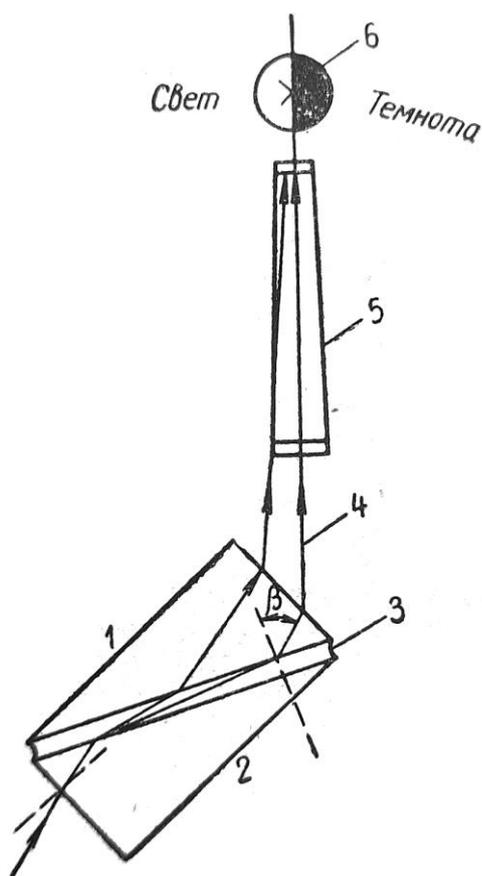


Рис. 101. Принципиальная схема рефрактометра Аббе [7, с. 112]

после преломления на границе стекло призмы – воздух составляет с нормалью к выходной грани некоторый угол β . При рассматривании 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 φ , а угол β между предельным лучом и нормалью к выходной грани (см. рис. 101, 102) [24, с. 29].

Существуют 2 основных типа рефрактометров, имеющих свои конструктивные особенности.

Рефрактометр типа Аббе (рис. 100). 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° . Диапазон измерений показателей преломления 1,2–1,7 [24, с. 156].

Главным и характерным узлом для рефрактометров этого типа является так называемый *призменный блок*, состоящий из измерительной 1 и осветительной 2 призм (рис. 101). Тонкий

слоем 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 [7, с. 111–113].

Точность измерения на данном приборе $\pm 0,0001$ [24, с. 156]. Для того чтобы добиться такой точности, во время измерений необходимо с помощью термостата поддерживать постоянную температуру с погрешностью $\pm 0,2^\circ\text{C}$. Обычно при повышении температуры на 1° показатель преломления уменьшается на 0,0005, соответственно понижение температуры на 1° увеличивает показатель преломления на 0,0005.

Рефрактометр типа Пульфриха. Принципиальная схема рефрактометра Пульфриха представлена на рис. 102. Особенностью приборов этого типа является то, что угол между входной 1 и выходной 2 гранями оптической призмы равен 90° . 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

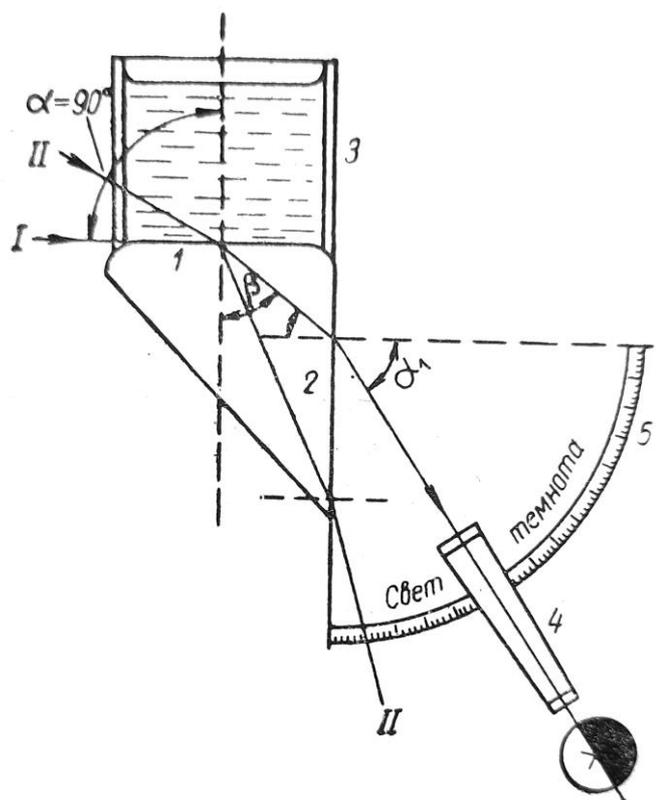


Рис. 102. Принципиальная схема рефрактометра Пульфриха [7, с. 121]

встречает слоя клея и, следовательно, не искажается. Так как угол падения этого луча равен точно 90° , то величина угла β 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 α_1 . Для измерений применяется источник монохроматического света (натриевая лампа). Внешний вид рефрактометра типа Пульфриха ИРФ-23 представлен на рис. 103 [7, с. 119–121].



Рис. 103. Рефрактометр ИРФ-23 (типа Пульфриха)

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 их себестоимость. В то же время значительно ограничиваются пределы измеряемых показателей преломления и, следовательно, такие рефрактометры могут применяться только для однородных объектов определенной природы [24, 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 гра-

ничной линией. Погружные рефрактометры комплектуются 6–12 призмами, каждая из которых охватывает интервал показателя преломления 0,03–0,04.

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 на практике:

- 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.

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?
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.

3.12. ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Теоретические основы поляриметрии

Поляриметрический анализ – это метод, основанный на зависимости угла вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света от концентрации в растворе оптически активного вещества.

Определяются с помощью этого метода именно оптически активные вещества, свойства которых зависят от строения их молекул. Измеряемый угол поворота плоскости поляризации оказывается тем больше, чем большее число молекул вещества встречается в растворе на пути поляризованного светового луча. Эта величина зависит от концентрации оптически активного вещества в растворе и от расстояния, которое проходит луч света от одной стенки сосуда до другой. Если это расстояние неизменно, то угол вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света окажется в прямо пропорциональной зависимости от концентрации изучаемых веществ в пробе [7, с. 132].

Оптическая активность вещества оценивается по показателю *удельного вращения*. Удельным вращением $\alpha_{\text{уд}}$ называют такое значение угла вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света, которое соответствовало бы данному веществу, если бы его плотность равнялась единице, а концентрация в растворе составляла бы 1 г/см³ при толщине слоя 1 см.

Для чистых веществ удельное вращение определяется следующим соотношением:

$$\alpha_{\text{уд}} = \frac{\beta}{ld} \quad (195);$$

для растворов:

$$\alpha_{\text{уд}} = \frac{\beta}{lc'} \quad (196),$$

где β – замеренный угол вращения плоскости поляризации; l – толщина слоя вещества в дм; d – плотность в г/см³; c' – концентрация вещества в г/см³ раствора. Если концентрация c оптически активного вещества в растворе выражена в г/100 см³ раствора, то

$$c' = \frac{c}{100} \quad (197),$$

тогда

$$\alpha_{\text{уд}} = \frac{\beta 100}{lc} \quad (198).$$

Зная показатель удельного вращения, можно рассчитать *угол вращения плоскости поляризации* β , который зависит от концентрации оптически активного вещества в растворе c' (г/см³) и толщины слоя раствора l (дм):

$$\beta = \alpha_{\text{уд}} lc' \quad (199).$$

Молярная вращающая способность Φ – еще одна величина, характеризующая оптическую активность вещества. Она определяется по формуле:

$$\Phi = \frac{M\alpha_{\text{уд}}}{100} \quad (200),$$

где M – молярный вес, а $\alpha_{\text{уд}}$ – величина удельного вращения плоскости поляризации. Коэффициент 100 вводится для того, чтобы величина Φ не выражалась слишком большими числами. Молярная вращающая способность выражает величину угла вращения плоскости поляризации, которая наблюдалась бы при концентрации оптически активного вещества, равной 1 моль/дм³ при толщине слоя раствора в 1 мм. Таким образом, молярная и удельная величины вращения плоскости поляризации зависят от природы оптически активного вещества, от природы растворителя, от длины волны поляризованного света и от температуры [7, с. 136–137].

Для реализации поляриметрического метода анализа необходимо получить *поляризованный свет* – это свет, колебания световых волн в котором совершаются только в одной какой-либо плоскости. Под *поляризацией* подразумевают определенную направленность, определенную ориентацию колебаний волн света.

Обычный неполяризованный свет не имеет определенной ориентации, но если пучок такого света направить через кристалл известкового шпата (кальцит, исландский шпат), то можно добиться его поляризации, так как подобные кристаллические вещества обладают способностью пропускать световые колебания только в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Схематически это явление отображено на рис. 104.

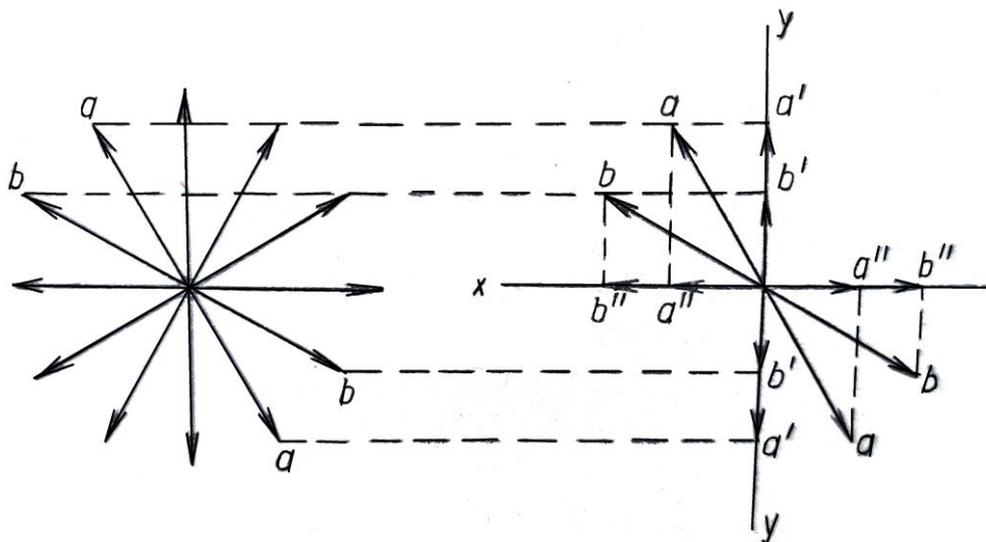


Рис. 104. Разложение светового луча на два с взаимно перпендикулярными плоскостями колебаний [7, с. 134]

Каждая из волн неполяризованного света, например, aa или bb разлагается в кристалле соответственно на две волны $a'a'$ и $a''a''$ и $b'b'$ и $b''b''$, колебания которых происходят в двух перпендикулярных направлениях и которые соответствуют двум поляризованным лучам. Причем, один луч не подчиняется закону преломления (его называют необыкновенным), а тот, который подчиняется – носит название обыкновенного луча. Из этих свойств следует, что для каждого луча характерен свой коэффициент преломления и своя скорость распространения в кристалле исландского шпата. Логично, что и углы, под которыми преломляются обыкновенный и необыкновенный лучи, так же будут различны. Это явление получило название *двойного лучепреломления*.

В поляриметрическом методе анализа используют так называемые *призмы Николя* (сокращенное название – *николь*), которые изготавливаются из исландского шпата (рис. 105). Кристалл шпата разре-

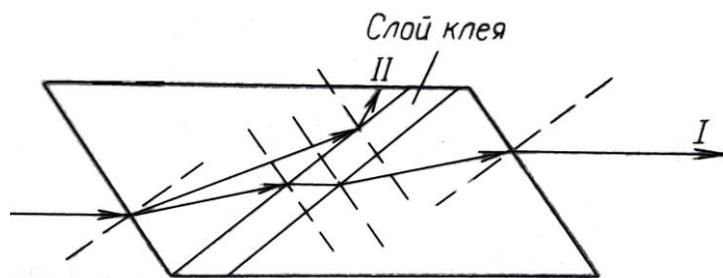


Рис. 105. Призма Николя [7, с. 135]

зают на две половины в направлении оптической оси, а затем эти половинки склеивают специальным прозрачным клеем.

Лучи света проходят через такую призму

неодинаковым образом. Для обыкновенного луча (*II*) среда клея, которым склеены половинки призмы, является менее оптически плотной, поэтому может произойти явление полного внутреннего отражения, если угол падения этого луча будет больше предельного. Регулируется это посредством расположения призмы по отношению к источнику света. Поведение необыкновенного луча (*I*) характеризуется следующим образом: вследствие того, что среда клея для луча является относительно более плотной, поэтому на границе кристалл – клей для необыкновенного луча угол преломления будет меньше угла падения. Луч пройдет через слой клея в призме, как через плоскопараллельную пластинку. Принцип действия призмы Николя заключается в поглощении полностью отраженного обыкновенного луча с помощью зачерненной грани и пропускания необыкновенного луча, который несет свет, колеблющийся в одной единственной плоскости. Такой поток света и называется *плоскополяризованным*. А сама призма Николя – *поляризатором* света.

Применимость этих явлений объясняется тем фактом, что среди оптически активных веществ имеются их модификации – *правовращающие* и *левовращающие*. Поэтому, используя явление вращения плоскости поляризации, можно установить асимметричность в строении молекул этих веществ или дефекты в структуре их кристаллических решеток.

Например, кристаллы кварца имеют две разновидности: выделяют правовращающий и левовращающий кварц (т.н. *бикварц*). Обеспечивается это тем, что молекулы, входящие в состав этого минерала, располагаются по правой или левой винтовой линии. Органические вещества, например, сахара, так же обладают оптической активностью, вследствие наличия в их составе асимметричных атомов углерода, связанных с четырьмя различными радикалами. Эти радикалы могут располагаться двояким образом, причем одна форма расположения может являться зеркальным отображением другой. Направление вращения плоскости поляризации у этих форм противоположно. Если в одинаковые сосуды поместить одинаковые концентрации правовращающих и левовращающих изомеров, то с соблюдением одинаковых условий (длина оптического пути, температура) эти растворы дадут равный по величине, но противоположный по знаку угол вращения плоскости поляризации.

В таблице 8 представлены величины удельного вращения для некоторых органических соединений в водных растворах при температуре 20 и 25 °С для монохроматического света с длиной волны, соответствующей желтой линии D натрия. Знаками «+» и «-» отмечены соответственно правое вращение по часовой стрелке и левое вращение [7, с. 137].

Таблица 8

Удельные вращения ряда органических веществ [43, с. 137]

Наименование соединения	Температура	Удельное вращение
Глюкоза	20 °С	+52,5°
Миндальная кислота	20 °С	+156,57°
Никотин	20 °С	-164,0°
Глутамин	25 °С	+6,3°
Пролин	25 °С	-86,2°
Лейцин	25 °С	-11,0°

Кроме температуры важным условием является выбор растворителя, в котором растворено исследуемое вещество, так как удельное вращение плоскости поляризации будет зависеть и от его природы. Например, удельное вращение яблочной кислоты, растворенной в метиловом спирте, будет равняться +2,92°, тогда как в случае с ацетоном эта величина составит +5,2° [7, с. 132–138]. В разных средах значение и даже направление вращения могут меняться. Допустим, в кислой среде большинство L-аминокислот правовращающие, а в воде некоторые из них становятся левовращающими.

Для определения смесей оптически активных веществ используют зависимость удельного вращения плоскости поляризации от длины волны. На этой закономерности строится *спектрополяриметрический метод*. Как правило, с увеличением длины волны абсолютное значение удельного или молярного вращения плоскости поляризации уменьшается (рис. 106, кривые 1 и 2). В некоторых случаях может происходить изменение знака удельного вращения при пересечении кривой оси длин волн – как в случае с кривой 3 на рис. 106. В точке пересечения графика с осью не наблюдается явление вращения

плоскости поляризации, поэтому длина волны, характерная для этой точки, получила название *длины волны нулевого вращения*.

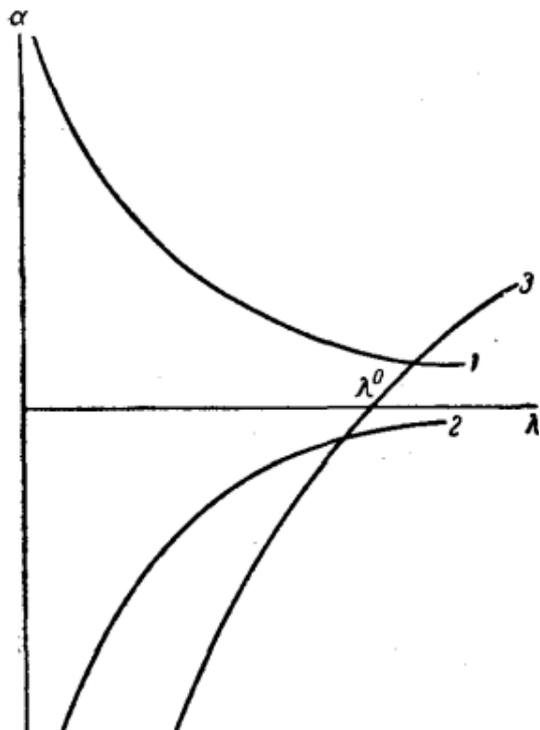


Рис. 106. Зависимость угла вращения плоскости поляризации от длины волны [35, с. 121]

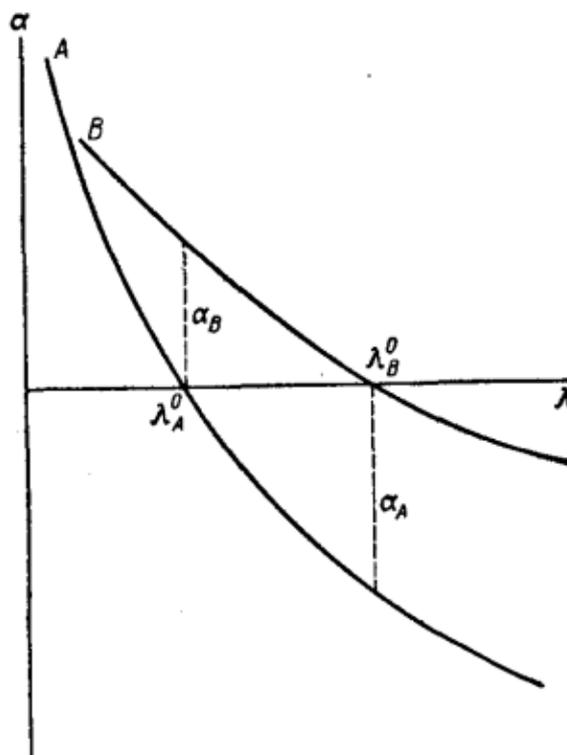


Рис. 107. Кривые спектрополяметрического анализа [35, с. 121]

Если в растворе имеются два вида оптически активных веществ, имеющие разные длины волн нулевого значения (рис. 107), то можно найти концентрацию одного вещества, выразив ее через длину волны нулевого вращения другого вещества. Например, определив угол вращения плоскости поляризации веществом В при длине волны λ^0 , можно легко рассчитать его концентрацию c_B :

$$\beta_{\lambda_A^0} = \frac{\alpha_B b c_B}{100} \quad (201)$$

и

$$c_B = \frac{\beta_{\lambda_A^0} 100}{\alpha_B b} \quad (202).$$

Концентрацию вещества А (c_A) определяют по углу вращения плоскости поляризации при длине волны нулевого вращения для вещества В:

$$\beta_{\lambda_A^0} = \frac{\alpha_A b c_A}{100} \quad (203),$$

откуда

$$c_A = \frac{\beta_{\lambda_0} 100}{\alpha_A b} \quad (204).$$

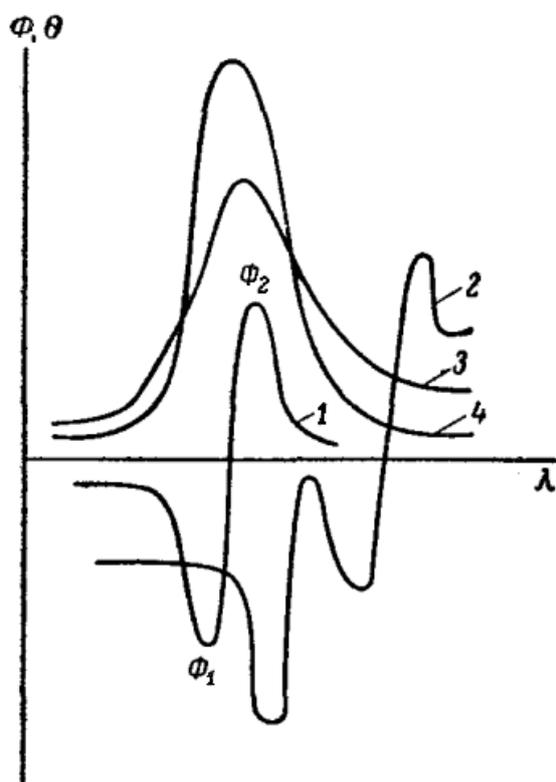


Рис. 108. Кривые дисперсии оптического вращения (1, 2), разностного дихроичного поглощения (3) и оптического поглощения (4) для сложных органических веществ [35, с. 122]

Графики, отражающие поведение сложных оптически активных молекул, обладающих способностью к двойному лучепреломлению, представлены на рис. 108. Кривая 4 отображает область длин волн, где вещество обладает максимумом поглощения, здесь зависимость удельного и молярного вращения плоскости поляризации от длины волны подчиняется сложным законам. Может наблюдаться т.н. кривая дисперсии оптического вращения (ДОВ), которая соответственно проходит через минимум и максимум (линия 1 на рис. 108).

Для характеристики веществ, обладающих двойным лучепреломлением, используют значение молярной амплитуды α , равной разности молярных вра-

щений плоскости поляризации в точках максимума и минимума кривой поглощения (эффект Коттона):

$$\alpha = \frac{\Phi_2 - \Phi_1}{100} \quad (205).$$

Колоколообразная кривая 3 на рис. 108 отображает еще одну особенность, характерную для сложных оптических веществ, обладающих двойным лучепреломлением – это *круговое дихроичное поглощение* КД. Выражают его через разность молярных коэффициентов поглощения света, поляризованного влево ε_L и вправо ε_R :

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad (206),$$

или *молярной (молекулярной) эллиптичностью*:

$$\theta = 3300\Delta\varepsilon \quad (207).$$

Для сложных органических веществ, имеющих несколько максимумов поглощения, характерен график 2 (рис. 108), на котором соответственно усложняются кривая дисперсии оптического вращения и кривая разностного кругового дихроичного поглощения, на них появляется несколько перегибов или несколько максимумов.

Молярная амплитуда, разностное круговое дихроичное поглощение, их расположение по оси длин волн – все это характеризует исследуемое вещество. Кроме того, все эти характеристики зависят от природы растворителя и температуры. В качестве примера можно рассмотреть характеристики ментона в изопентане для различных температур и ментона в различных растворителях (рис. 109).

Дисперсия оптического вращения, характерная для различных изомеров какого-либо вещества, так же может изменяться. На рис. 110 представлены кривые ДОВ, для изомеров холестена, отличающихся друг от друга положением двойной связи в молекуле.

Как показано на рис. 111, для некоторых соединений (например, кетостероида), отличающихся между собой заместителями, так же характерно изменение молярной эллиптичности и расположения кривых дисперсии.

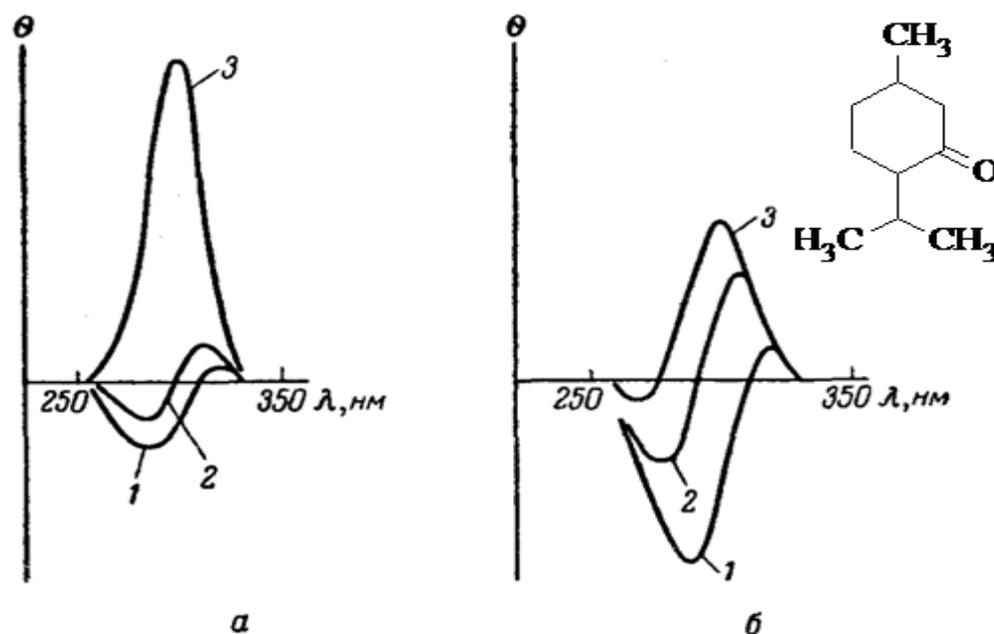


Рис. 109. Кривые разностного дихроичного поглощения ментона и его формула [35, с. 123]:

а – в зависимости от температуры: 1 – $t = +25\text{ }^\circ\text{C}$; 2 – $t = 74\text{ }^\circ\text{C}$; 3 – $t = 192\text{ }^\circ\text{C}$;

б – в зависимости от растворителя: 1 – изооктан; 2 – хлористый метилен;

3 – метанол

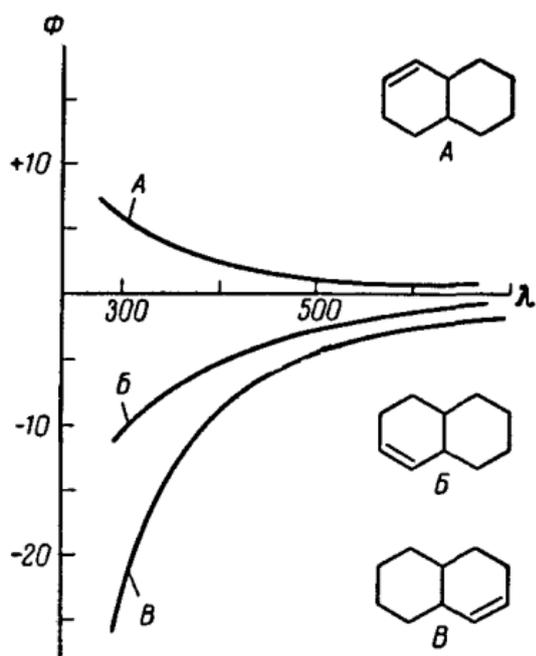


Рис. 110. Кривые дисперсии оптического вращения для изомеров холестерина [35, с. 124]

Таким образом, для проведения измерений поляриметрическим методом необходимо использование

монохроматических источников света (или светофильтров), также важнейшей частью исследований является выбор наиболее подходящих растворителей и термостатирование растворов изучаемых веществ [35, с. 117–123]. А характеристики эффекта Коттона, кривая ДОВ и зависимость кругового дихроизма от длины волны дают ценную информацию о структуре, стереохимии и конформации органических и других оптически активных веществ [10, с. 153].

Практическая реализация и применение поляриметрических методов

Для проведения исследований, основанных на измерении угла вращения плоскости поляризации света оптически активными веществами, используют *поляриметры* и *спектрополяриметры*.

В основе измерительной системы этих приборов лежат две призмы Николя (также это могут быть поляроиды – пластинки с нане-

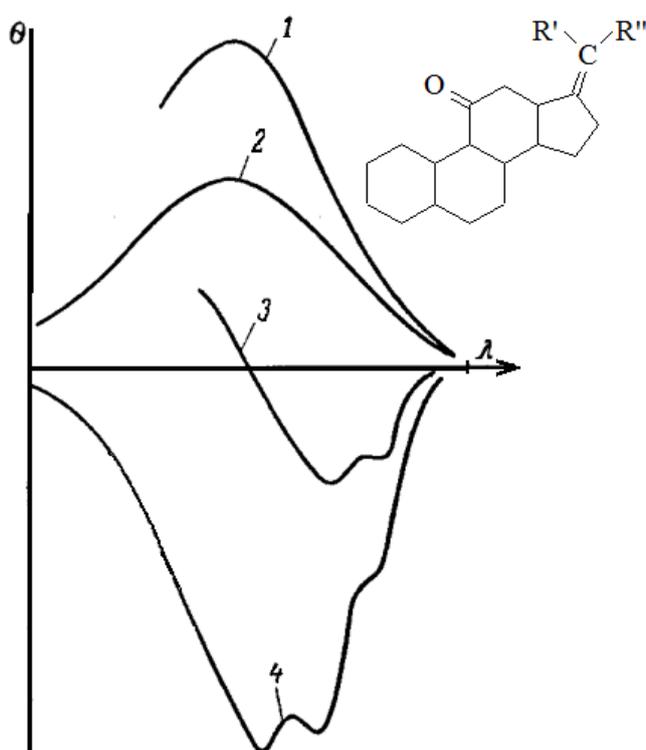


Рис. 111. Формула и кривые дихроичного поглощения кетостероида с разными заместителями [35, с. 124]:

- 1 – R'=H, R''=CN; 2 – R'=CH₃, R''=CN;
3 – R'=CN, R''=C₂H₅; 4 – R'=CN, R''=H

сенным слоем органических соединений йода, или пластинки из бикварца), одна из которых носит название *поляризатор*, а вторая – *анализатор* [35, с. 125–126]. В зависимости от их взаимного расположения, можно реализовать различные схемы поляриметрических наблюдений. Если расположить эти призмы таким образом, чтобы их плоскости поляризации были взаимно параллельны (как указано на рис. 112, *а*), и пропускать через них монохроматический свет, то лучи этого света пройдут через обе призмы без изменений. Повернув анализатор на 90° (рис. 112, *б*), мы добьемся перпендикулярного расположения плоскостей поляризации обеих николей, вследствие чего луч света, прошедший через поляризатор уже не сможет пройти через анализатор, так как плоскость его колебаний будет отлична от плоскости пропускания второй призмы. Такое скрещенное расположение николей получило название установка «на темноту». В схему, отображенную на рис. 112, *в*, к скрещенным призмам добавляют кювету с изучаемым раствором. Если этот раствор содержит оптически активные вещества, то плоскость, в которой поляризатор преобразовал свет, будет повернута на определенный угол. Это объясняется тем, что луч, вышедший из раствора, колеблется уже не в плоскости, перпендикулярной плоскости анализатора, а в плоскости *MN* (рис. 112, *г*). Разложение света (согласно рис. 104) происходит в двух направлени-

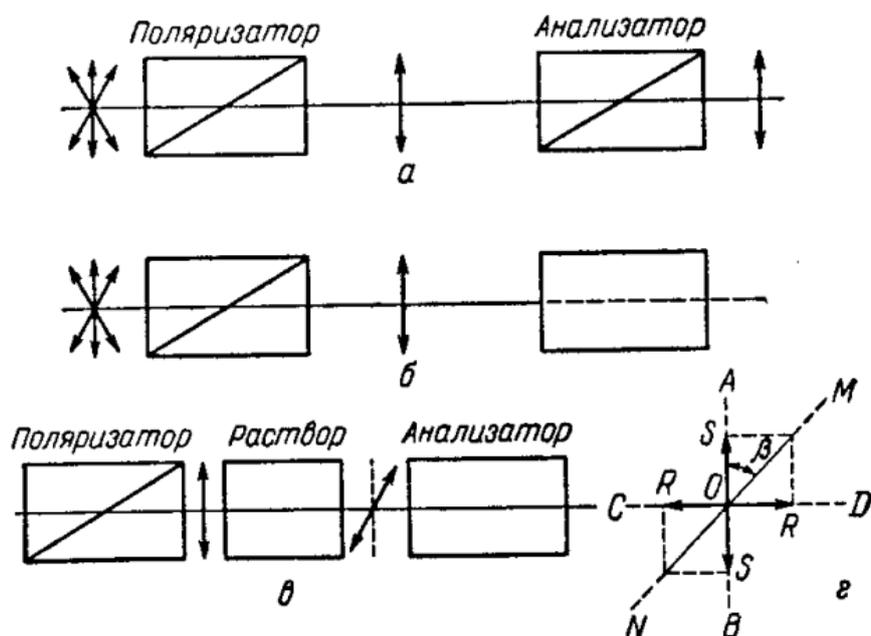


Рис. 112. Схема расположения поляризатора и анализатора при поляриметрическом исследовании [35, с. 117]

ях OR и OS . Луч OR колеблется как раз в плоскости пропускания лучей анализатора и, следовательно, может пройти через него. Для того чтобы свет был вновь погашен, необходимо повернуть вторую призму таким образом, чтобы ее плоскость стала перпендикулярной к плоскости MN , т.е. на угол β . Если этот угол измерить, то найденное значение и будет соответствовать углу вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света.

В самом простейшем варианте, поляриметр можно собрать из 2 призм Николя и трубки с изучаемым раствором, расположив ее между двумя призмами. Анализатор устанавливается «на темноту», затем трубка с раствором вводится в систему. Вследствие того, что вращение плоскости поляризации изменяется раствором, в окуляре наблюдается посветление поля. Затем, поворачивая анализатор, вновь добиваются потемнения поля и, измеряя угол поворота анализатора, делают вывод о величине угла вращения плоскости поляризации. Эта конфигурация поляриметра имеет свои недостатки – трудно оценить момент полного затемнения поля, так как этот процесс довольно длителен.

На рис. 113 представлены схемы более удобных для измерений моделей поляриметров. Например, если встроить между поляризатором 1 и трубкой с раствором 3 пластинку из бикварца 2, то можно

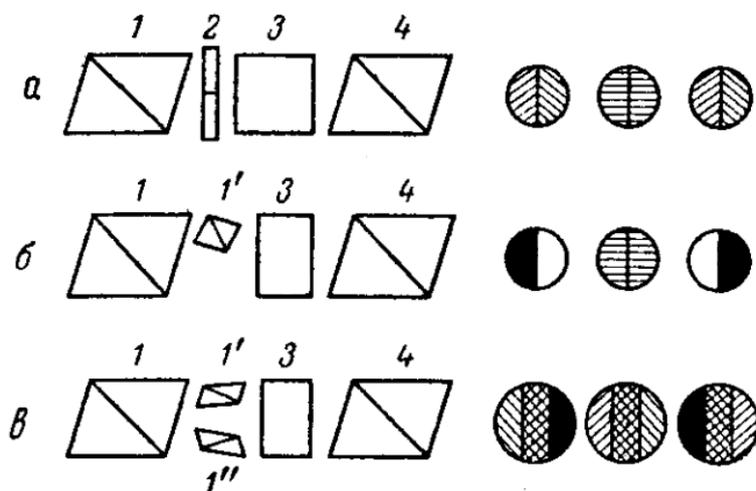


Рис. 113. Схемы поляриметров различных типов [35, с. 127]:

1 – поляризатор; 1', 1'' – призмы Николя;
2 – пластинка из бикварца; 3 – трубка с раствором;
4 – анализатор

увеличить чувствительность прибора даже при малейшем изменении положения анализатора (рис. 113, а). Параллельно установленные николи дают в окуляре серовато-фиолетовую окраску (положение «на темноту»), при дальнейшем вводе трубки с раствором происходит её резкое изменение: пла-

стинки бикварца окрашивают половинки поля в синий и красный цвета. Поворачивая анализатор, добиваются возвращения первоначальной интенсивности окраски и, измеряя градус поворота анализатора, находят угол вращения плоскости поляризации раствором. Преимущество данной схемы в возможности точной установки анализатора «на темноту».

На рис. 113 в правой части иллюстрации отображены картины, наблюдаемые в окуляре каждой конкретной модификации прибора. В центре изображены фотометрические поля в момент оптического равновесия, а справа и слева – в момент отклонения от оптического равновесия.

На рис. 113, б и в приведены схемы *полутеневых поляриметров*. В первом случае в систему к поляризатору добавляют еще один николю, во втором – два николя. При этом изменяется принцип действия приборов. Дополнительный николю I' (рис. 113, б) устанавливают таким образом, чтобы он занимал половину фотометрического поля и плоскость, в которой через него проходят колебания света, была смещена относительно соответствующей плоскости николя I на несколько градусов ($2-3^\circ$). Тогда можно устанавливать анализатор «на темноту» относительно обеих этих призм-поляризаторов. Причем, если установить этот режим относительно николя I , то неосвещенной окажется одна половина, если относительно николя I' – другая. Между этими двумя положениями анализатора, отличающимися на $2-3^\circ$, можно всегда найти такое, в котором поля будут слабо и равномерно освещены. Этот момент равенства полутеней и улавливается в анализаторе. Схема с тремя николями-поляризаторами отображена на рис. 113, в. Два дополнительных николя устанавливаются под небольшими взаимно противоположными углами по отношению к основному поляризатору. При установке анализатора «на темноту» происходит затемнение центральной части поля, а левая и правая части обеспечиваются равномерной слабой освещенностью. При малейшем повороте анализатора будет наблюдаться сдвиг поля освещенности в ту или другую сторону. Таким образом, данная конфигурация поляриметра позволяет чрезвычайно точно устанавливать режим «на темноту», но необходимость установки дополнительных дорогостоящих николей делают этот прибор достаточно затратным в эксплуатации [35, с. 126–127].

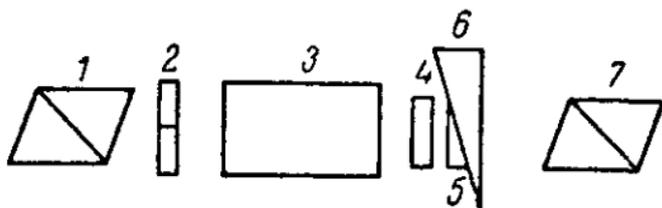


Рис. 114. Принципиальная схема клинового поляриметра [35, с. 127]:

1 – поляризатор; 2 – пластинка бикварца; 3 – кювета с исследуемым раствором; 4 – пластинка из правовращающего кварца; 5 – неподвижный клин; 6 – подвижный клин из левовращающего кварца; 7 – компенсатор

Интересное устройство представляет собой клиновой поляриметр, предназначенный для измерения концентрации сахара в растворе (принципиальная схема отображена на рис. 114). Сахариметр отличается от аналогичных приборов тем, что в нем в качестве источника освещения используется белый немонахроматический свет. Благодаря тому, что вращательная дисперсия кварца и растворов сахара совпадают, оказалось возможным сконструировать прибор, в котором не является принципиальной монохроматичность света, испускаемого источником излучения. Раствор сахара вызывает правое вращение плоскости поляризации. Это вращение компенсируют левовращающим клином из кварца, вводя его в луч света. Клином называют устройство, состоящее из двух клинообразных пластинок левовращающего кварца и плоской пластинки правовращающего, которые могут скользить друг относительно друга. Регулируя их взаимное расположение, можно определить угол вращения плоскости поляризации и его знак. Положение клина часто калибруют в единицах концентрации измеряемого вещества, например, в международных сахарных градусах ($^{\circ}\text{S}$). Величине сто сахарных градусов (100°S) соответствует раствор, содержащий 26 г сахарозы в 100 мл раствора при температуре 20°C и длине трубки 2 дм. Преимущество таких поляриметров заключается в возможности более точного снятия отсчетов, так как измерить толщину сдвига клина можно точнее, нежели угол поворота анализатора [10, с. 154].

Принципиальная схема спектрополяриметра приведена на рис. 115. Луч света от кварцевой лампы 1 (так как явление дихроизма наблюдается преимущественно в инфракрасной части спектра), направляется в монохроматор 2, который осуществляет выделение нужного для исследования участка спектра. Далее пучок света попадает на поляризатор 3. Здесь он претерпевает поляризацию и направ-

Интересное устройство представляет собой клиновой поляриметр, предназначенный для измерения концентрации сахара в растворе (принципиальная схема отображена на рис. 114). Сахариметр отличается от аналогичных приборов тем, что в нем в качестве источника освещения используется белый немонахроматический свет. Благодаря тому, что вращательная дисперсия кварца и растворов сахара совпадают, оказалось возможным сконструировать прибор, в котором не является принципиальной монохроматичность света, испускаемого источником излучения. Раствор сахара вызывает правое вращение плоскости поляризации. Это вращение компенсируют левовращающим клином из кварца, вводя его в луч света. Клином называют устройство, состоящее из двух клинообразных пластинок левовращающего кварца и плоской пластинки правовращающего, которые могут скользить друг относительно друга. Регулируя их взаимное расположение, можно определить угол вращения плоскости поляризации и его знак. Положение клина часто калибруют в единицах концентрации измеряемого вещества, например, в международных сахарных градусах ($^{\circ}\text{S}$). Величине сто сахарных градусов (100°S) соответствует раствор, содержащий 26 г сахарозы в 100 мл раствора при температуре 20°C и длине трубки 2 дм. Преимущество таких поляриметров заключается в возможности более точного снятия отсчетов, так как измерить толщину сдвига клина можно точнее, нежели угол поворота анализатора [10, с. 154].

ляется на кювету с исследуемым раствором 4, выходя из которой попадает на модулятор 5. Модулированный свет выводится на следующую призму – анализатор 6, проходя через него, световой луч фокусируется на фотоумножителе 7. Регистрационное устройство 8 обрабатывает сигнал от ФЭУ, и, будучи связано напрямую с монохроматором, позволяет выводить кривую зависимости дисперсии оптического вращения от длины волны света [35, с. 131–132].

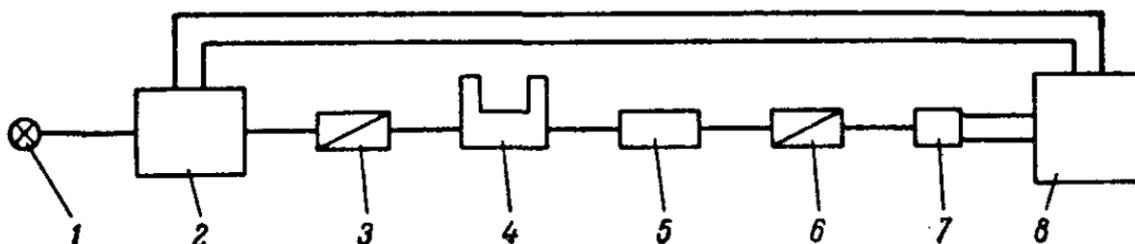


Рис. 115. Принципиальная схема спектрополяриметра [35, с. 131]:
1 – источник света; 2 – монохроматор; 3 – поляризатор; 4 – кювета; 5 – модулятор; 6 – анализатор; 7 – фотоумножитель; 8 – регистрирующее устройство

Из перечисленных блоков особенно интересно остановиться на модулирующих устройствах. Эти приспособления призваны модулировать поляризованный свет для облегчения установления оптического равновесия. Конструктивно выделяют модуляторы трех типов:

- 1) ячейка Фарадея – представляет собой кювету исследуемого вещества, помещенную в переменное магнитное поле;
- 2) механическое устройство, позволяющее попеременно помещать в пучок света пластины из левого и правого кварца;
- 3) механическое устройство, позволяющее качать одну из призм – анализатор или поляризатор [52, с. 155].

Количественные измерения с помощью поляриметрических методов можно производить расчетным методом и графически. В основе расчетного метода лежит уравнение (199), связывающее зависимость угла вращения плоскости поляризации с концентрацией раствора и толщиной кюветы. Однако, точность определения таким методом будет зависеть еще и от показателя удельного вращения $\alpha_{уд}$, а он в свою очередь находится в зависимости от концентрации измеряемого вещества в растворе. Поэтому чаще всего прибегают к использованию метода градуировочного графика, который строят в координатах угол вращения α – концентрация c .

Широко распространены исследования многокомпонентных растворов с помощью спектрополяриметрического метода, который проводится на основании измерения угла вращения при разных длинах волн. Методика практически аналогична спектрофотометрическим измерениям, только вместо молярного коэффициента поглощения ε используют показатель удельного вращения $\alpha_{уд}$, учитывают длину оптического пути и ориентируются на другую концентрационную шкалу. Если в растворе находятся два вещества, одно из которых имеет длину волны нулевого вращения, то используя свет этой длины волны, можно точно определить концентрацию второго компонента, так как только это вещество и будет вращать плоскость поляризации в данном случае [10, с. 155].

Поляриметрический анализ нашел широкое применение в исследовании пищевых продуктов (например, определение содержания масел, жиров в продуктах питания, сахара с помощью сахариметров), в фармацевтической промышленности, в производстве пенициллина, минералогии, микрохимии. Успешно применяют поляриметрию в медицинской практике при определении содержания белков, глюкозы в крови, с помощью этого метода больные сахарным диабетом могут производить индивидуальный контроль концентрации сахара в моче. Данный метод является пригодным для изучения кинетики протекания процессов, в которых участвуют оптически активные вещества [7, с. 132–133]. Спектрополяриметрические методы анализа используются с целью определения структуры и свойств органических и координационных соединений, а также для определения конформации биополимеров [10, с. 155].

Контрольные вопросы

1. Что понимают под поляриметрическим методом анализа?
2. Объясните, что такое показатель удельного вращения, угол вращения плоскости поляризации, молярная вращающая способность.
3. Каким образом получают поляризованный свет?
4. Как устроена призма Николя?
5. Какие группы выделяют среди оптически активных веществ?
6. Что такое длина нулевого вращения, дисперсия оптического вращения, как проявляется эффект Коттона?

7. В чем заключается принцип работы поляризатора и анализатора в поляриметрическом исследовании?
8. В чем особенности поляриметров различных типов?
9. Поясните принцип работы сахариметра (клинового поляриметра).
10. Назовите основные узлы спектрополяриметра. Чем примечателен модулятор?
11. Какие исследования можно проводить с помощью поляриметрических методов анализа?

3.13. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Теоретические основы биологического метода анализа

Биологический метод анализа – метод, в котором аналитическим сигналом по сути служит интенсивность процессов жизнедеятельности живых систем, которые могут нарушаться или стимулироваться при изменении условий окружающей среды, в которую помещен данный организм.

Успешность использования этого метода зависит от возможности измерения с помощью какого-либо оборудования (микроэлектродов, оптических устройств) этого ответного аналитического сигнала. Для нормальной жизнедеятельности живому организму нужен определенный диапазон условий (норма реакции) – температуры, влажности, уровня рН, химического состава среды в целом. При изменении какого-либо фактора окружающей среды, живой организм практически сразу отреагирует на это воздействие. Если создать прибор, с помощью которого можно было бы определить интенсивность ответной реакции организма на изменение условий окружающей среды, можно реализовать метод биологического анализа какой-либо среды. В качестве аналитических индикаторов могут выступать различные живые организмы, их органы, ткани, физиологические функции и т.п. Чаще всего в качестве тест-объектов используются микроорганизмы, беспозвоночные, позвоночные животные, а также растения [43, с. 258].

Исходя из важности химических элементов для жизнедеятельности организма, можно выделить несколько групп таких веществ:

- 1) вещества, жизненно необходимые;

2) вещества, оказывающие токсический эффект и угнетающие процессы жизнедеятельности;

3) физиологически неактивные вещества.

Первые две группы химических соединений можно с успехом использовать для вызова физиологического отклика организма, важно, чтобы он поддавался измерению. Физиологически неактивные вещества так же имеет возможность перевести в активное состояние и использовать в качестве индикатора влияния среды на организм, если удастся связать их с ингибиторами или стимуляторами процессов жизнедеятельности данного вида организмов.

Аналитические сигналы, которые потенциально могут быть использованы для оценки влияния изменившихся условий окружающей среды на биоиндикатор, имеют различный характер проявлений:

– это могут быть нарушения физиологического плана, а именно снижение интенсивности роста, регенерации, изменение состава крови, биоэлектрической активности органов и тканей и т.п.;

– нарушения, касающиеся органов и систем органов (пищеварения, дыхания, размножения, опорно-двигательного аппарата);

– выживаемость или летальный исход так же могут быть интерпретированы в рамках оценки воздействия опасных веществ на тест-объект [43, с. 258].

Чем сложнее устроен индикаторный организм, ответная реакция которого подлежит исследованию, тем информативнее получится анализ, но с усложнением уровня его организации растет и сложность интерпретации аналитического сигнала. Опять же, одни и те же вещества в разных концентрациях могут по-разному воздействовать на живую систему: малые количества вносимых токсических соединений зачастую могут стимулировать процессы жизнедеятельности, большие количества чаще всего приводят к нарушению гомеостаза, а долгое нахождение в таких условиях и вовсе может привести к гибели организма.

Важно определить диапазоны содержания отравляющих веществ таким образом, чтобы можно было уловить тот или иной отклик тест-организма, а также соблюсти однообразие условий эксперимента относительно других параметров: температуры, влажности, уровня рН среды, необходимо учесть индивидуальные, возрастные, половые особенности биоиндикатора.

Организмы, которые обычно рассматриваются в качестве индикаторов для использования в рамках биологического анализа, можно условно разделить на несколько групп: микроорганизмы, беспозвоночные и позвоночные животные, растения.

Микроорганизмы (бактерии, дрожжи, одноклеточные водоросли, плесневые грибы) являются одними из самых удобных объектов для биологического мониторинга состояния окружающей среды. Это обусловлено их высокими темпами размножения (а также угнетения) в условиях анализа. Обычно отбирают некоторое количество представителей этих организмов и часть из них помещают в заведомо нейтральные условия (контроль), не вызывающие никаких отклонений в жизнедеятельности, другая же часть помещается в среду, степень токсичности которой нужно измерить. Интенсивность отклика организмов – своеобразного аналитического сигнала на воздействие полученного извне раздражающего вещества, регистрируется с помощью оптических, электрохимических и других методов.

Микроорганизмы используются не только для индикации загрязняющих веществ, но и в целях очистки среды, которую необходимо избавить от нежелательных примесей. К примеру, в фармации используют микроорганизмы для контроля технологических процессов при производстве антибиотиков, витаминов, аминокислот. В химических лабораториях в целях концентрирования и выделения нужных элементов из раствора используют микроорганизмы, приспособленные к осуществлению этих процессов. Например, плесневые грибки способны избирательно осаждать золото из хлоридных растворов.

В таблице 9 представлен перечень организмов, используемых при анализе загрязнения сред различными соединениями. Существуют работы, посвященные использованию плесневых грибов в биотестировании сред, содержащих неорганические загрязнители. Обнаружено, что нитраты ртути (II), кадмия, таллия наиболее сильно угнетают жизнедеятельность этих организмов, вероятно, вследствие того, что эти соединения блокируют SH-группы молекул белков плесневых грибков, что препятствует образованию дисульфидных мостиков в полипептидных цепях, а это в свою очередь нарушает формирование определенных, характерных для белков конформаций.

**Примеры использования биологического метода для определения
различных соединений [43, с. 260]**

Индикаторный организм	Определяемое вещество	Предел обнаружения, мкг/мл
Микроорганизмы		
Плесневые грибы	Ионы Hg (II)	0,02
	Ионы Cd (II)	0,5
	Ионы Tl (II)	5
	Ионы Zn (II)	0,01
	Ионы Cu (II)	0,001
	Ионы Mn (II)	0,0002
	Ионы Fe (II), Fe (III)	0,002
	Ионы As (III)	100
	Ионы Cr (II)	10
Дрожжи	Эфиры тиосульфокислот	1 нг
	Элементоорганические соединения Pb (II), Sn (II)	3 нг/мл – 4 мкг/мл
Беспозвоночные		
Инфузории	Ионы Ag (I)	0,01
	Ионы Hg (II)	0,05
	Ионы Cu (II)	0,1
	Фурфурол, формальдегид	0,05
Личинки комаров	Пестициды	0,006 – 5
Позвоночные		
Амфибии	Ионы Cu (II)	0,06 нг/мл

Дрожжи так же используют в качестве тест-объектов для оценки качества воды и жидких сред. По степени угнетения их физиологических процессов, а именно биохимической активности, судят о степени влияния на них неблагоприятных факторов.

Очень перспективным методом считается использование явления биолюминесценции, возникающей в результате специфических превращений в клетках, содержащих фермент – люциферазу. Она является катализатором в реакции разложения субстрата люциферина, осуществляющейся с участием кислорода. Люцифераза была выделена из клеток морских светящихся бактерий и жуков-светляков. Для

осуществления катализа необходима энергия, которая в условиях живого организма заключена в виде высокоэнергетического соединения – аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). О благополучии организма, отсутствии или наличии негативного влияния со стороны среды, в которую тот помещен, можно судить по количеству АТФ, находящейся в клетке. При ингибировании процессов жизнедеятельности люминесцирующего организма каким-либо токсическим веществом, будет наблюдаться снижение количества АТФ в клетке, а, следовательно, и интенсивности свечения, продуцируемого в результате разложения люциферазой субстрата. При стимуляции процессов метаболизма наблюдаемое свечение будет более интенсивным и энергии клеткой будет производиться достаточно. Таким образом, либо контролируя уровень АТФ в клетке, либо регистрируя частоту вспышек света, возникающих в результате работы фермента, можно судить о степени токсичности исследуемой среды. Билюминесцентный метод нашел свое применение в решении множества аналитических вопросов по контролю, например, количества антибиотиков в крови или патогенных бактерий в биологических жидкостях, его используют в целях изучения процессов повреждения клеточных мембран и других биохимических и медицинских анализах и исследованиях.

Беспозвоночные животные так же могут рассматриваются в качестве индикаторных организмов. Например, простейшие очень наглядно реагируют на изменившиеся условия окружающей среды и по показателям раздражимости, таким как изменение характера движения, питания, размножения, а также другим биохимическим и физиологическим показателям, поддающимся измерению, можно судить о степени токсичности изучаемой пробы. Как видно из таблицы 9, инфузории способны давать ответную реакцию на введение в среду тяжелых металлов (Ag, Hg, Cu). Выяснено, что при добавлении в раствор таких соединений, как этанол, сахароза, уксусная кислота и др., клетки инфузорий ускоряют движение, а хлорид бария напротив – замедляет его.

Чувствительные к загрязнению водной среды гидробионты (чаще всего ракообразные, например, дафнии) очень часто применяются для оценки степени токсичности какой-либо среды (вытяжки) и санитарно-гигиенического состояния вод. У дафний наиболее подходящие показатели для биологического анализа: выживаемость, частота дви-

жения ножек, период сокращения сердца и др. Все эти аналитические сигналы поддаются измерению, в том числе и аппаратными средствами и по ним можно судить о степени токсичности или чистоты водных сред.

В качестве индикаторов могут выступать различные организмы, видимые под микроскопом, например нематоды или коловратки. По характеру и скорости их движений ученые научились определять степень загрязненности среды, например, ионами тяжелых металлов. Так, нематоды при низкой концентрации металла в растворе совершают повторяющиеся изгибы тела то в одну сторону, то в другую (S-образные движения). При повышении концентрации наблюдается замедление движений, а при достижении критического порога черви гибнут, о чем судят по распрямлению их тела. Таким образом, по мере разбавления раствора и при одновременной оценке продолжительности жизни и характера поведения данных беспозвоночных животных, можно делать выводы о содержании ионов металлов вплоть до микрограммовых количеств. Этим способом можно определять концентрацию растворов меди, цинка, серебра и кадмия.

Личинки комаров так же способны давать ответную реакцию на содержание пестицидов в водной, почвенной среде или в растительных или животных тканях [43, с. 259–260].

Среди *позвоночных* животных амфибий чаще всего используют с целью контроля качества фармацевтических препаратов, так, например, физиологические процессы лягушек способны дать информацию о характере воздействия лекарственных средств. Изучают изменение биопотенциала нервной ткани седалищного нерва лягушки в ответ на возможное содержание в растворе тех или иных нежелательных примесей. Таким образом можно обнаружить наличие кислот, щелочей, тяжелых металлов. Чувствительность биоэлектрической активности нерва лягушка к некоторым соединениям достаточно высока: содержание хлорида марганца обнаруживается вплоть до $1 \cdot 10^{-9}$ – 10^{-6} моль/л. По полной блокировке возбудимости седалищного нерва лягушки констатируют наличие меди в растворах в пределах 10^{-9} – 10^{-8} моль/л [43, с. 261].

Растения так же можно использовать в качестве индикаторных организмов, так как они обладают богатым набором различных физиологических реакций, по которым можно судить о влиянии тех или

иных веществ на их состояние. В анализе могут использоваться способности растений к увеличению или уменьшению биомассы, стимуляции или угнетению ростовых процессов, формированию различной степени разветвленности корневой системы в условиях загрязнения почвы, например, такими тяжелыми металлами, как свинец или кадмий. Имеется возможность исследования, например, отклика фотосинтетического аппарата растений на загрязнение почвы, воды, воздуха токсическими веществами в различных агрегатных состояниях посредством оптических методов анализа (фотометрии, флуоресцентной микроскопии) [45, с. 113, 136].

Практическая реализация и применение биологических методов анализа

Для оценки степени интенсивности аналитического сигнала (физиологического отклика, изменения характера движения организма и т.п.) могут быть сконструированы различные устройства, работающие на фотометрических, электрохимических и других принципах. В качестве примера таких устройств мы рассмотрим люминометр, изготовленный при участии кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Прибор экологического контроля «Биотокс-10М» является экспрессным методом оценки степени интегральной токсичности почвенной, водной или воздушной сред (изображен на рис. 116). С его помощью можно тестировать водные вытяжки из различных полимерных материалов, проводить санитарно-гигиеническую оценку косметики, парфюмерной и спиртовой продукции, бытовой химии.

Принцип действия данного аналитического прибора основан на *биолюминесцентном* анализе. Вопросы строения и функционирования люминесцентно-фотометрических анализаторов затрагивались в параграфе 3.2. В целом устройство аналогично уже рассматривавшимся



Рис. 116. Прибор экологического контроля «Биотокс-10М»

приборам. В нем так же установлен фотоумножитель, который считывает слабые световые потоки, продуцируемые биосенсором. В качестве кювет используются стеклянные цилиндрические медицинские пробирки небольшого объема – 1,5 мл с диаметром 12,7 мм, высотой – 48 мм, поставляются они в количестве 20-ти штук. Кюветное отделение закрывается специальной вращающейся заглушкой с прорезью посередине, в которую при закрытии кюветы попадает шторка, защищающая ФЭУ от воздействия внешних источников излучения. При проворачивании заглушки шторка переводится на противоположную сторону, ФЭУ высвобождается и становится способным воспринимать слабые световые потоки, испускаемые биосенсором.

«Биотокс» работает в определенном спектральном диапазоне от 300 до 600 нм, а максимальная чувствительность ФЭУ достигается в пределах 380–490 нм.

Для реализации исследовательских задач в качестве индикаторного объекта используются лиофилизированные люминесцентные генно-инженерные бактерии *Escherichia coli* или ферментные препараты бактериальной люциферазы, входящие в состав биосенсора «Эколюм». Препарат поставляется во флаконах с модифицированной средой, в которой хранится культура бактерий. Для обеспечения жизнеспособности микроорганизмов важна температура хранения от –4 до –18°С. Методика измерений основана на определении интенсивности биолюминесценции бактерий в зависимости от содержания в анализируемой пробе химических веществ-токсикантов по сравнению с контролем (дистиллированная вода). Бактерии, входящие в состав препарата, оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждений (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат), с экспрессностью, объективным и количественным характером отклика целостной системы на интегральное воздействие токсикантов. Это обеспечивается тем, что данные микроорганизмы содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений [37, с. 7].

В пробоподготовку входят несколько этапов: для начала реконструируется биопрепарат, для чего в открытый флакон с бактериаль-

ной культурой добавляют 10 мл дистиллированной воды. Бактерии могут существовать без риска для нарушения их физиологических процессов только в определенных оптимальных условиях. Поэтому критически важно, чтобы уровень рН дистиллированной воды был в пределах диапазона 6,8–7,4, при несоблюдении этого правила бактерии будут ощущать токсичное воздействие по умолчанию и в контрольной пробе, что может сильно исказить результаты измерений. Для выравнивания показателя рН воду рекомендуется подкислять раствором HCl или подщелачивать раствором NaOH. По истечении 30 минут суспензированный бактериальный аппарат готов к использованию. Чтобы обеспечить нужную точность и воспроизводимость интенсивности биолюминесценции бактерий, готовят их рабочую концентрацию. Неразбавленная суспензия может давать чрезвычайно высокий аналитический сигнал до 40 000 импульсов в секунду и выше, что делает анализ в таком виде невозможным. Поэтому разбавлениями первоначальной суспензии добиваются снижения аналитического сигнала до уровня 100–500 имп/с, эти величины являются оптимальными для проведения измерений.

Далее, в зависимости от объекта исследования специальным образом подготавливается его водная вытяжка, согласно методикам, предоставляемым вместе с прибором. Например, в случае с почвой берут навеску не менее 5-ти грамм и приливают к ней пятикратный объем дистиллированной воды. Перемешивают на аппарате для встряхивания в течение 5-ти минут и оставляют для экстракции на 24 часа. Затем фильтруют полученный экстракт через бумажный фильтр и подвергают его биотестированию.

Сам анализ проводится в 3 повторностях для каждой пробы: в шесть кювет помещают по 0,1 мл рабочего раствора бактерий, затем в первые три из них приливают 0,9 мл дистиллированной воды (контроль), а в остальные три – вытяжку из интересующей нас среды или объекта. Культуру бактерий выдерживают в этой среде в течение 30 минут (в экспресс варианте исследований допускается уменьшать экспозицию до 5-ти минут).

Помещая кюветы поочередно контроль–опыт в прибор, определяют величину светового потока, продуцируемого бактериями. Все значения количества зарегистрированных импульсов в пределах серии анализов одной пробы сохраняются в памяти прибора. С помо-

щью кнопок на панели управления можно вывести на экран уже посчитанные показатели, а так же высчитать среднее значение токсичности, погрешность измерений и др.

Ошибка измерения высчитывается прибором по формуле стандартного отклонения по выборке, как мера разброса данных от среднего значения:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x^2 - \bar{x}^2)}{n-1}} \quad (208),$$

где n – количество последовательных замеров ($n \leq 10$, прибор считает ошибку измерения по последним 10-ти снятым и сохраненным в памяти показателям).

Выводы о токсичности пробы делаются на основе изменения интенсивности биолюминесценции бактерий (имп/с) по сравнению с контролем за 30-ти (5-ти) минутный период экспозиции. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально интегральному показателю токсичности « T », который устанавливает характер ответа биосенсора на токсичность среды и рассчитывается по формуле:

$$T = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100 \quad (209),$$

где I_0 и I соответственно интенсивность биолюминесценции контрольного образца и опытного.

Методики измерений предусматривают три пороговых уровня токсичности:

- 1 – допустимый уровень токсичности: индекс T меньше 20;
- 2 – образец токсичен: индекс T равен или больше 20, но меньше 50;
- 3 – высокая токсичность образца: индекс T равен или больше 50.

В ходе испытаний зачастую бывает так, что индекс токсичности, посчитанный прибором, может иметь и отрицательные значения (при $I > I_0$). Тогда становится трудно интерпретировать, отчего проявляется такой эффект (один из вариантов – вещества, находящиеся в пробе, оказывают стимулирующее воздействие на жизнедеятельность бактерий). В таких случаях делается вывод об отсутствии токсичности образца, и индекс T принимает нулевое значение [37, с 11-12].

Посредством люминометра «Биотокс» можно снимать токсикологические параметры пробы, которые представляют собой два

условных порога ЕС20 и ЕС50. По показателям интенсивности светового потока I_0 и I можно определить, при каких объемах исходного слабо токсического образца будут достигнуты установленные пределы токсичности. Либо же можно сделать вывод, при какой степени разбавления сильно токсичный раствор станет безопасным (значение менее ЕС20). Показатель ЕС50 можно интерпретировать следующим образом: это порог токсичности, который достигается в результате тушения свечения биосенсора на 50% по сравнению с контролем. Величине ЕС20 соответствует уменьшение интенсивности свечения на 20% по сравнению с контрольным образцом.

Вычисление величин ЕС проводят с использованием гамма-функции (G-функции). Она устанавливает зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения. Сама функция выглядит следующим образом:

$$G = (I_0 - I)/I.$$

Такое отображение очень удобно для точного определения величин ЕС20 и ЕС50 с помощью экстраполяции графической зависимости в случае, когда образец слабо токсичен, либо чрезвычайно токсичен.

При измерении, например, вытяжки из почвенных образцов имеется возможность оценить вклад уровня рН в интегральный показатель токсичности пробы. Для этого сначала измеряют токсичность вытяжки в неизменном состоянии, а затем доводят показатель рН до диапазона 6,5–8,0 и снова производят измерения. По разнице между индексами можно заключить, насколько ингибирует жизнедеятельность биолюминесцентных бактерий уровень рН почвы и при необходимости вычесть это значение из результата измерений первоначальной вытяжки.

Прибор «Биотокс-10М» имеет разнообразные области применения, например, в промышленности этим методом можно контролировать уровень токсичности отходов и сбросов промышленных предприятий, проверять безопасность новой продукции или производить оценку профвредности рабочих мест на производстве. В экологии этот метод нашел широкое применение в вопросах мониторинга почвенной, водной и воздушной сред на содержание токсикантов. В пищевой промышленности прибор можно использовать для контроля качества и безопасности продуктов питания.

Таким образом, живые организмы можно успешно использовать для мониторинга состояния объектов окружающей среды, а также в санитарно-гигиенической экспертизе продукции, производимой в пищевой, фармацевтической, химической и других отраслях промышленности. Зачастую очень трудно дать оценку токсичности среды без непосредственного использования живых систем в качестве индикаторов негативного влияния того или иного компонента в изучаемой системе. Некоторые задачи и вовсе невозможно решить физическими или химическими методами. За счет множества разнообразных физиологических и других процессов, происходящих в организме индикаторного животного или растения, можно сделать выводы о содержании широкого круга токсикантов как органического, так и неорганического происхождения в различных природных средах. Эти обстоятельства делают биологический метод анализа незаменимым, а зачастую и безальтернативным в вопросах охраны окружающей среды и санитарно-гигиенического контроля [43, с. 261].

Контрольные вопросы

1. Что представляет собой биологический метод анализа?
2. Приведите примеры аналитических сигналов возникающих в живой системе, которые могут быть использованы в целях биологического анализа.
3. На какие особенности процессов жизнедеятельности и метаболизма потенциальных организмов-индикаторов необходимо обратить внимание для успешного их использования в рамках биологического метода анализа?
4. Дайте характеристику микроорганизмам как индикаторам, используемым в рамках биологического анализа.
5. Поясните, каким образом в медицинских, биохимических и других видах исследований используется явление биолюминесценции. В чем сущность данного процесса?
6. Чем примечательны позвоночные, беспозвоночные животные, а также растения с точки зрения мониторинга состояния окружающей среды? Как их используют в санитарно-гигиенических экспертизах?

7. На каких принципах построена работа прибора экологического контроля серии «Биотокс»? Из каких основных узлов состоит данный анализатор?

8. Чем примечателен биосенсор «Эколюм»? Почему он является эффективным индикатором?

9. Озвучьте порядок пробоподготовки для исследований с использованием биосенсора «Эколюм». На что следует обратить внимание в ходе анализа?

10. Каким образом происходит вычисление показателя интегральной токсичности среды « T »? Как можно интерпретировать полученный показатель?

11. Что отражает гамма-функция в биолюминесцентном анализе? Каково ее значение?

12. Дайте оценку применению биологического метода анализа в современной промышленности и научных исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа современных биологических лабораторий немислима без применения физико-химических методов исследования и анализа. 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.

В издании автор постарался найти наиболее доступные формы изложения достаточно сложного материала, познакомиться с теорией и практикой самых актуальных физико-химических методов, применяемых в биохимии, биотехнологии, физиологии, экологии и других биологических и смежных научных дисциплинах. При этом объем издания не позволяет рассмотреть все физико-химические методы исследования максимально подробно, но автор надеется, что данная книга вызовет у студентов интерес к более глубокому самостоятельному освоению представленных в ней тем. Уверенное владение научной базой, умение применять наиболее подходящие методы исследования и усовершенствовать методики – важнейшие качества 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. Амелин, В. Г. Хроматографические методы анализа : практикум / В. Г. Амелин ; Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2008. – 72 с. – ISBN 978-5-89368-846-7.

2. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа: учеб. для студ. учреждений высш. образования : в 2 т. / Н. В. Алов и др.; под ред. А. А. Ищенко. – 3-е изд., стер. – Т. 2. – М.: Издательский центр «Академия», 2014. – 416 с. – ISBN 978-5-7695-5818-4.

3. Андреев, В. С. Кондуктометрические методы и приборы в биологии и медицине / В. С. Андреев. – М.: Медицина, 1973. – 336 с.

4. Антропов, Л. И. Теоретическая электрохимия: учеб. для хим.-технолог. спец. вузов / Л. И. Антропов. – 4-е изд., перераб. – М.: Высшая школа, 1984. – 519 с.

5. Багоцкий, В. С. Основы электрохимии / В. С. Багоцкий. – М.: Химия, 1988. – 400 с. – ISBN 5-7245-0051-5.

6. 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.

7. Барковский, В. Ф. Практикум по физико-химическим методам анализа / В. Ф. Барковский, С. М. Горелик, Т. Б. Городенцева. – М.: Высшая школа, 1963. – 350 с.

8. Биохимия. Лабораторный практикум: учеб. пособие / Сост. В. В. Сенчук, С. И. Мохорева, Н. М. Орел и др. – Минск: БГУ, 2004. – 77 с.

9. Боуэн, Т. Введение в ультрацентрифугирование / Т. Боуэн. – М.: Мир, 1973. – 248 с.

10. 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. – ISBN 978-5-358-03522-5.

11. Волькенштейн, М. В. Биофизика: учеб. руководство / М. В. Волькенштейн. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Наука, 1988. – 592 с. – ISBN 5-02-013835-5.

12. 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.
13. Гельфман, М. И. Химия: учеб. для вузов / М. И. Гельфман, В. П. Юстратов. – СПб.: Лань, 2000. – 480 с. – ISBN 5-8114-0200-7.
14. Гольберт, К. А. Курс газовой хроматографии / К. А. Гольберт, М. С. Вигдергауз. – М.: Химия, 1967. – 400 с.
15. Детерман, Г. Гель-хроматография / Г. Детерман. – М.: Мир, 1970. – 252 с.
16. 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.
17. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. – М.: Мир, 1991. – 544 с. – ISBN 5-03-001032-7.
18. Дубова, Н. М. Физико-химические методы анализа: учеб. пособие / Н. М. Дубова [и др.]. – Томск: Изд. ТПУ, 1999. – 123 с.
19. Дэвени, Т. Аминокислоты, пептиды и белки / Т. Дэвени, Я. Гергей. – М.: Мир, 1976. – 364 с.
20. 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. – ISBN 5-02-005218-7.
21. 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.
22. Иванов, В. Г. Практикум по органической химии: учеб. пособие для студ. высш. пед. учебн. заведений / В. Г. Иванов, О. Н. Гева, Ю. Г. Гаверова. – М.: Академия, 2000. – 208 с. – ISBN 5-7695-0586-9.
23. Илларионова, Е. А. Метод флуориметрии. Применение в фармацевтическом анализе: учеб. пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский. – Иркутск: ИГМУ, 2017. – 41 с.
24. Иоффе, Б. В. Рефрактометрические методы химии / Б. В. Иоффе. – 3-е изд., перераб. – Л.: Химия, 1983. – 352 с.
25. Ищенко, А. А. Люминесцентный анализ: учеб. пособие / А. А. Ищенко, М. А. Гольдштрах. – М.: МИТХТ им. М. В. Ломоносова, 2009. – 36 с.

26. 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.

27. Калоус, В. Биофизическая химия / В. Калоус, З. Павличек. – М.: Мир, 1985. – 446 с.

28. 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. – ISBN 5-06-003720-7.

29. Комиссаренков, А. А. Рентгенофлуоресцентный метод анализа: методические указания к лабораторным работам / А. А. Комиссаренков, С. Б. Андреев. – СПб: СПб ГТУ РП, 2008. – 36 с.

30. Коничев, А. С. Молекулярная биология: учеб. для студ. пед. вузов/А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2003. – 400 с. – ISBN 5-7695-0783-7.

31. Коренман, И. М. Методы количественного химического анализа / И. М. Коренман. – М.: Химия, 1989. – 128 с. – ISBN 5-7245-0269-0.

32. Корица, И. Электрохимия / И. Корица, И. Дворжак, В. Богачкова. – М.: Мир, 1977. – 472 с.

33. Крешков А. П. Основы аналитической химии. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. – М.: Химия, 1970. – 472 с.

34. Кропачева, Т. Н. Электрохимические методы анализа: учеб.-метод. пособие / Т. Н. Кропачева. – Ижевск: Издательский центр «Удмуртский университет», 2016. – 41 с. – ISBN 978-5-4312-0414-2.

35. Ляликов, Ю. С. Физико-химические методы анализа / Ю. С. Ляликов. – М.–Л.: Химия, 1964. – 560 с.

36. Мерецкий, А. М. Основы электрохимической термодинамики: учеб. пособие / А. М. Мерецкий, В. В. Белик. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2011. – 180 с. – ISBN 978-5-7237-0842-6.

37. Методические рекомендации № 01.021-07. Методика экспрессного определения интегральной химической токсичности питьевых, поверхностных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод с помощью бактериального теста «Эколюм».

38. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. / Д. Нельсон, М. Кокс. – Т. 1. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 694 с. – ISBN 978-5-94774-365-4.

39. Новоселова, Н. В. Физико-химические методы анализа: курс лекций / Н. В. Новоселова. – Красноярск: Краснояр. гос. аграр. ун-т., 2009. – 163 с.

40. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. Ч. III. – СПб.: АНО НПО «Мир и Семья», АНО НПО «Профессионал», 2004. – 692 с. – ISBN 5-94365-057-1.

41. 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.

42. 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. – ISBN 5-06-004732-6.

43. 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. – ISBN 5-06-004734-2.

44. Паперно, Т. Я. Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии. Учеб. пособие для студентов пед. ин-тов / Т. Я. Паперно, В. П. Поздняков, А. А. Смирнова, Л. М. Елагин. – М.: «Просвещение», 1977. – 176 с.

45. Практикум по физико-химическим методам исследования в биологии / авт.-сост. Ю. Н. Курбатов. – Владимир: Изд-во ВлГУ, 2021. – 164 с. – ISBN 978-5-9984-1339-1.

46. 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.

47. Рыбальченко, В. К. Структура и функции мембран: практикум / В. К. Рыбальченко, М. М. Коганов. – К.: Выща школа, 1988. – 312 с. – ISBN 5-11-000095-6.

48. Тихонов, А. К. Спиновые метки / А. К. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 1. – С. 8–15.

49. Туркова, Я. Аффинная хроматография / Я. Туркова. – М.: Мир, 1980. – 472 с.

50. Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия: учеб. для вузов / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 544 с. – ISBN 5-7107-7420-0.

51. Урванцева, Г. А. Методы анализа живых систем: учеб. пособие / Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева. – Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 2013. – 104 с. – ISBN 978-5-8397-0492-3.

52. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Под ред. Ю. С. Лазуркина. – М.: Наука, 1967. – 323 с.

53. 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. – ISBN 5-89218-046-8.

54. Фрайфелдер, Д. Физическая биохимия: применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии / Д. Фрайфелдер; ред. З. А. Шабарова. – М.: Мир, 1980. – 582 с.

55. Фридрихсберг, Д. А. Курс коллоидной химии: учеб. для вузов / Д. А. Фридрихсберг. – Л.: Химия, 1974. – 352 с.

56. 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. – ISBN 5-7245-0244-5.

57. Хасанов Р. Р. Атомно-эмиссионный спектральный анализ: учеб.-метод. пособие / Р. Р. Хасанов, Р. Р. Хусаинов. – Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2012. – 27 с.

58. Чанг, Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам / Р. Чанг. – М.: Мир, 1980. – 664 с.

59. Ширкин, Л. А. Рентгенофлуоресцентный анализ объектов окружающей среды: учеб. пособие / Л. А. Ширкин. – Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. – 60 с. – ISBN 978-5-89368-919-8.

60. 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
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БИОПОЛИМЕРОВ	6
1.1. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ	6
1.2. ХРОМАТОГРАФИЯ.....	13
1.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ	34
1.4. ВИСКОЗИМЕТРИЯ	47
Глава 2. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	58
2.1. ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ	59
2.2. ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ И КУЛОНОМЕТРИЯ	74
2.3. КОНДУКТОМЕТРИЯ	95
Глава 3. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	108
3.1. МОЛЕКУЛЯРНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ... ..	109
3.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ.....	123
3.3. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	138
3.4. АТОМНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ.....	154
3.5. АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ.....	165
3.6. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ	178
3.7. РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ.....	192
3.8. СПЕКТРОСКОПИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА.....	203
3.9. СПЕКТРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА.....	220
3.10. НЕФЕЛОМЕТРИЯ И ТУРБИДИМЕТРИЯ.....	225
3.11. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА.....	231
3.12. ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА	238
3.13. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА.....	253
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	266
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	267

Учебное электронное издание

КУРБАТОВ Юрий Николаевич

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ

Учебное пособие

Издается в авторской редакции

Системные требования: Intel от 1,3 ГГц; Windows XP/7/8/10; Adobe Reader; дисковод CD-ROM.

Тираж 25 экз.

Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых
Изд-во ВлГУ
rio.vlgu@yandex.ru

Кафедра биологии и экологии
iur.curbatov@gmail.com