

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ЛЕСА»

А.Н. Иванкин, Г.Л. Олиференко, В.А. Беляков, Н.Л.Вострикова

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА. СПЕКТРОМЕТРИЯ

Учебное пособие



Издательство Московского государственного университета леса
Москва – 2016

УДК 543
И 18

Рецензенты: профессор кафедры химической технологии
древесины и полимеров В.А. Винославский;

доцент кафедры ветеринарно-санитарной
экспертизы Московского государственного
университета пищевых производств Т.Г.Кузнецова

Работа подготовлена на кафедре стандартизации и сертификации и химии

Иванкин, А.Н.

И 18 Физико-химические методы анализа. Спектрометрия: учеб. пособие
/А. Н. Иванкин, Г.Л. Олиференко, В.А. Беляков, Н.Л.Вострикова. – М.:
МГУЛ, 2016. – 127 с.

В учебном пособии изложены современные спектрометрические методы, применяемые в системе сертификации продукции, а также в научных исследованиях, представлено описание методик экспериментов, выполняемых на практических занятиях студентами при изучении курсов «Физико-химические методы исследований» и «Спектрометрия».

Рекомендуется для студентов технических специальностей лесного комплекса.

УДК 543

© А.Н. Иванкин, Г.Л. Олиференко,
В.А. Беляков, Н.Л.Вострикова, 2016
© ГОУ ВПО МГУЛ, 2016

Свет и вещества – это то, что постоянно окружает человека и используется им в повседневной деятельности. Прогресс в науке и технике последнего столетия привел к развитию большого числа разнообразных методов и приемов, позволяющих изучать как новые вещества, так и получать информацию о строении, качестве и составе разнообразных материалов, используя воздействие на них электромагнитного излучения. Специальный курс «спектрометрические методы анализа» читается студентам четвертого курса, проходящим подготовку по метрологии, стандартизации и сертификации, а также изучающим физико-химические методы анализа по другим специальностям. Целью дисциплины является формирование представлений в области организации и проведения испытаний лесопромышленной и других видов продукции в рамках общей системы научных исследований и испытаний качества веществ и материалов, а также изучение технологии спектрометрических испытаний, привитие навыков решения практических задач тестирования продукции (формирование методической, информационной и технической базы испытаний).

Спектрометрические методы широко применяются в научной и сертификационной практике. Они достаточно информативны и позволяют получать значительный объем информации о строении, составе и качестве разнообразных веществ.

Методы спектрального анализа широко применяются в научно-исследовательских и производственных химико-аналитических лабораториях потому, что отличаются быстротой выполнения анализов, высокой чувствительностью, точностью и возможностью автоматизации аналитического контроля производства.

При изучении естественнонаучных дисциплин большое значение имеет лабораторный практикум. Известно, что правильно поставленный эксперимент позволяет не только проследить закономерности протекания процессов, но и запомнить свойства веществ. Кроме того, практические работы способствуют выработке методологии технического и философского мышления. Как показывает практика, в ходе проведения лабораторных занятий складываются определенные навыки восприятия определенных жизненных явлений, организации рабочих мест, сборки приборов, соблюдения правил техники безопасности и т.д. В пособие включены методики выполнения лабораторных работ по спектрометрии.

Все разделы книги предусматривают глубокую проработку теоретического материала по изучаемым темам до начала выполнения работ и последующую защиту каждой работы с учетом имеющихся контрольных вопросов по теме.

Программа курса «Физико-химические методы исследований»

Курс «Физико-химические методы исследований» для очной формы обучения со сроком обучения 4 года читается в 6 семестре. Всего часов по учебному плану – 108, из них: аудиторных занятий – 54 (в т.ч. лекции – 18, лабораторно-практические занятия – 36), самостоятельная работа – 54. Вид итогового контроля – зачет.

Цели и задачи курса. Главная цель преподавания курса состоит в освоении знаний по основным разделам данной дисциплины и применении их при решении прикладных задач для обеспечения всесторонней технической подготовки будущего бакалавра.

На основании изучения теоретических основ спектрометрии и выполнения лабораторных работ на практических аудиторных занятиях, а также в результате самостоятельной работы студент должен

знать:

- классификацию физико-химических и физических методов анализа веществ;
- особенности и преимущества физико-химических и физических методов анализа;
- теоретические основы важнейших оптических методов анализа (молекулярной абсорбционной фотометрии, люминесцентного анализа, нефелометрии, турбидиметрии, поляриметрии, ИК, УФ, ЯМР-спектроскопии);
- сущность эмиссионного спектрального и атомно-абсорбционного анализа, радиохимических методов анализа;
- теоретические основы хроматографии со спектрофотометрическим окончанием;
- особенности испытаний в целях сертификации;
- теоретические основы разработки методов испытаний;
- виды и цели испытаний;
- роль испытаний в разработке и при изготовлении новой продукции;
- показатели качества испытаний и способы определения их значений;
- методы планирования и проведения испытаний;
- информационное, методическое, техническое и метрологическое обеспечение испытаний;
- методы обработки и анализа результатов испытаний;
- способы сбора, хранения и защиты результатов испытаний;

уметь:

- владеть техникой лабораторных работ по фотометрическим методам анализа;
- разбираться в методиках выполнения физико-химического анализа различных веществ;

- предложить рациональный способ физического или физико-химического анализа исследуемого материала;
- произвести обработку результатов анализа;

владеть:

- принципами и методами простейших химико-аналитических расчетов;
- приемами постановки аналитических задач для решения их коллективом специалистов различных направлений;

иметь представление:

- об электронной системе Интернет и о возможностях поиска в ней справочной информации;
- об экологических задачах, возникающих вследствие нахождения вредных веществ в окружающей среде;
- о современных проблемах, методах и средствах научных исследований и сертификационных испытаний;

иметь опыт:

- использования математических формул и уравнений в обработке полученных результатов;
- проведения анализов в лабораторных условиях.

Основное содержание. Спектроскопия как раздел физики, посвященный изучению спектров электромагнитного излучения. Спектроскопия как раздел химии, связанный с изучением свойств веществ, проявляющихся при воздействии на них электромагнитного излучения. Спектроскопия как раздел биологии, обусловленный воздействием электромагнитного излучения на живые объекты. Природа взаимодействия излучения и вещества. Строение атома и возможности регистрации энергетических переходов при облучении. Основы физических воздействий на вещество с целью установления химического строения.

Особенности и преимущества физико-химических и физических методов анализа. Значение физико-химических и физических методов анализа в современной науке, промышленности и технике. Сущность и классификация физико-химических методов анализа. Классификация физических методов анализа. Понятие об эмиссионном и атомно-абсорбционном спектральном анализе. Рентгеновские и масс-спектрометрические методы. Радиоаквационный анализ. Радиохимические методы исследования веществ (метод изотопного разбавления). Достоинства физико-химических и физических методов анализа: селективность, экспрессность, высокая чувствительность.

Оптические методы анализа. Классификация оптических методов анализа. Фотометрический анализ. Природа электромагнитного излучения. Происхождение молекулярных спектров поглощения. Законы поглощения электромагнитного излучения и их применение в абсорбционной спектроскопии. Закон Бугера – Ламберта – Бера. Оптическая плотность раствора. Основное уравнение фотометрического анализа. Поглощение света рас-

творами. Молярный коэффициент светопоглощения. Основные приемы фотометрического анализа: метод сравнения, метод градуировочного графика, метод добавок, метод дифференциальной фотометрии. Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа. Люминесцентный метод анализа. Происхождение спектров люминесценции. Спектр поглощения и спектр люминесценции. Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации. Количественный люминесцентный анализ. Виды качественного люминесцентного анализа: сортовой анализ, люминесцентная микроскопия, флуоресценция алкалоидов.

Хроматографические методы разделения и анализа со спектрометрическим окончанием. Теоретические основы хроматографии. Классификация хроматографических методов. Газовая хроматография и жидкостная хроматография. Особенности адсорбционной, распределительной, ионообменной, осадочной хроматографии. Способы получения и анализ хроматограмм в различных видах хроматографии. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

Принципы отбора содержания и организации учебного материала. При составлении программы учтены практически все вопросы современной науки о спектрометрии. Принцип преемственности позволяет в полной мере использовать физико-химический базис (знание строения вещества, теории растворов, электрохимии, кинетики, электромагнитных свойств веществ) для успешного освоения разделов дисциплины. При отборе материала для аудиторной и самостоятельной работы в соответствии с принципом дополненности разрабатываются задания и вопросы по темам, определяется содержание практических и лабораторных занятий, раскрывающих основные положения лекционного курса.

Изучение дисциплины базируется на знаниях химии, математики, физики, биологии и информатики, приобретенных на младших курсах обучения в университете.

Полученные при изучении данной дисциплины знания будут использоваться при изучении других специальных дисциплин, а также при дипломном проектировании.

Введение

Изучение основ химического анализа веществ и материалов является необходимым звеном в подготовке инженеров лесотехнических специальностей. В частности, для изучения сложных процессов, происходящих в почве (усвоение удобрений растениями, влияние микрокомпонентов на развитие и рост растений), требуется применение методов физико-химического анализа. На промышленном предприятии инженер должен знать состав материалов, подвергающихся переработке, на любой стадии технологического процесса. Хотя сам он анализов непосредственно не производит, сущность и возможности современных методов анализа должны быть ему известны. Лабораторные работы по физико-химическим методам анализа способствуют развитию практических навыков по обращению с приборами, развивают наблюдательность и способность логически рассуждать, повышают интерес к исследовательской работе.

Все современные методы анализа основаны на получении и измерении *аналитического* сигнала, то есть какого-либо относительно легко измеряемого свойства вещества, функционально связанного с содержанием или наличием в системе нужного компонента. По происхождению аналитического сигнала они обычно делятся на *химические*, *физико-химические* и *физические* методы анализа.

В *химических методах* анализа используется способность веществ вступать в различные химические реакции (кислотно-основные, окислительно-восстановительные, комплексообразования, осаждения). Аналитический сигнал, например выделение газа, появление осадка или изменение окраски индикатора, как правило, фиксируют визуально. Определяемый элемент или ион переводят в какое-либо соединение, с помощью которого можно установить его присутствие или количественное содержание. Химическое превращение, проводимое с целью получения нового соединения, называется *аналитической реакцией*, а вещество, его вызывающее – *аналитическим реагентом*.

К химическим методам относят *гравиметрический* и *титриметрический* методы анализа, их также принято называть *классическими*. Эти методы наиболее старые, с них начиналась аналитическая химия, но они продолжают играть важную роль в практике анализа. В основе гравиметрического метода анализа лежит определение массы вещества взвешиванием. В титриметрических методах измеряют объемы растворов исследуемого вещества и реагента или объемы газов.

Определение концентрации, например, раствора соляной кислоты не

вызовет затруднения у исследователя: надо взять определенный объем раствора кислоты, прибавить к нему индикатор и провести титрование раствором щелочи известной концентрации до изменения окраски индикатора. Но как быть, если исследуемый раствор мутный или окрашенный и изменение окраски индикатора незаметно? Тогда смогут помочь *физико-химические методы* анализа, например *кондуктометрия*. В этом случае эквивалентная точка титрования определяется не по изменению окраски индикатора, а по изменению электропроводности исследуемого раствора в процессе титрования, которое измеряют специальными приборами.

В *физико-химических методах* анализа наблюдают за изменением физических свойств анализируемой системы, происходящих в результате аналитической реакции, с помощью приборов. Например, измеряют изменение интенсивности окраски, флуоресценции, появление цвета или помутнение раствора, возрастание электропроводности, изменение температуры в системе и т. д.

Характерной особенностью физико-химических методов анализа в отличие от химических методов является и то, что для получения аналитического сигнала в них часто используется не просто взаимодействие вещества с реагентом, но и взаимодействие вещества с различными видами энергии (электрической, тепловой, энергией электромагнитного излучения). Аналитический сигнал в этих методах возникает с участием валентных электронов вещества.

Классификация физико-химических методов анализа основана на характере используемых свойств системы. Различают *оптические, электрохимические, хроматографические, кинетические, термометрические* методы. Наибольшее практическое значение имеют оптические, электрохимические и хроматографические методы анализа, причем современные исследовательские приборы, как правило используют одновременно комбинацию методов, позволяющих получать надёжные результаты.

В оптических методах анализа используют связь между оптическими свойствами системы и ее составом. В эту группу входят *фотометрический, нефелометрический, турбидиметрический, люминесцентный, поляриметрический, рефрактометрический* методы анализа.

Электрохимические методы анализа основываются на взаимосвязи электрохимических свойств системы и её состава. К этой группе относят *электрогравиметрический, кондуктометрический, потенциометрический, кулонометрический, вольтамперометрический, полярографический* методы анализа.

Хроматографические методы основаны на избирательном поглощении (адсорбции) отдельных компонентов анализируемой смеси различными адсорбентами. Они широко применяются для разделения и определения близких по составу и свойствам неорганических и органических веществ.

В *физических* методах возникновение аналитического сигнала связа-

но с участием внутренних электронов или ядер атомов. Агрегатное состояние вещества и его химическая форма в большинстве случаев не имеют значения, другими словами, физические методы позволяют определять состав исследуемого объекта, не прибегая к химическим реакциям. Физические методы включают *спектроскопические, ядерно-физические и радиохимические*.

Из спектроскопических методов анализа наиболее распространен *эмиссионный спектральный анализ*. Атомы или ионы вещества, возбужденные искровым разрядом или дугой переменного тока, испускают световое излучение. Каждый химический элемент Периодической системы Д. И. Менделеева характеризуется своим набором спектральных линий, поэтому элементы можно отличить друг от друга. Интенсивность же излучения атомов данного элемента при определенной длине волны зависит от его концентрации в анализируемом образце, что позволяет проводить количественный анализ.

Не меньшее значение имеет *атомно-абсорбционная спектрометрия*. Она состоит в измерении поглощения света свободными атомами элементов. В атомизаторе, не столь мощном, как дуга или искра (например, в пламени), молекулы химических соединений распадаются на отдельные атомы. Последние избирательно поглощают свет определенной длины волны, а степень поглощения зависит от концентрации этих атомов.

В данной группе методов важны также и *рентгеновские* методы. Вещество облучают потоком электронов. Возникающее при этом рентгеновское излучение вещества измеряют специальными устройствами. Энергия излучения зависит от природы элемента, а интенсивность – от его количества. В другом варианте метода вещество облучают рентгеновскими лучами и измеряют возникающее при этом вторичное рентгеновское излучение вещества (*рентгенофлуоресцентный* метод). Рентгеновские методы пригодны для анализа в точке (фокусируют пучок электронов) и без разрушения анализируемого образца.

Ядерно-физические и радиохимические методы основаны на явлении радиоактивности. В наиболее важном ядерно-физическом методе, *радиоактивационном*, вещество облучают нейтронами, гамма-квантами или заряженными частицами. При взаимодействии облучающих частиц с ядрами атомов элементов в веществе в результате ядерных реакций образуются радиоактивные изотопы. По величине радиоактивности определяют количество элемента в веществе. Радиоактивационный метод обладает исключительно низким пределом обнаружения (до 10^{-8} – 10^{-10} %). Такие содержания никак другим методом, кроме активационного анализа определить невозможно. При получении тяжелых элементов Периодической системы, таких, как менделевий и курчатовий (резерфордий), исследователям удавалось считать почти каждый атом полученного элемента. По характеру используемого для активации излучения различают *нейтронно-*

активационный анализ, гамма-активационный анализ и другие разновидности метода. К достоинствам радиоактивационного анализа относится также возможность анализа без разрушения образца и без прямого контакта с ним. Данным методом проводят анализы на расстоянии, например анализ донных отложений, анализ объектов с высокой радиоактивностью, анализ месторождения в скважине.

Из радиохимических методов анализа следует упомянуть *метод изотопного разбавления*. К анализируемому образцу прибавляют радиоактивный изотоп определяемого элемента. Измеряя активность исходного радиоактивного вещества и вещества, разбавленного образцом, можно рассчитать содержание исследуемого компонента на основании закона радиоактивного распада.

Существенным недостатком большинства физических методов анализа является необходимость применения сложного дорогостоящего оборудования. Например, для осуществления нейтронно-активационного анализа требуется использование громоздкого и сложного источника нейтронов.

Физические и физико-химические методы анализа объединяются общим названием «инструментальные» методы анализа, так как для их проведения обычно используются специальные приборы – инструменты.

В настоящем пособии рассмотрены основные спектрометрические методы анализа, используемые в практике научных и производственных лабораторий.

Быстрота, точность, простота операций, высокая чувствительность, возможность автоматизации процесса анализа обеспечивают применение спектральных методов анализа в самых разных отраслях промышленности, а также при проведении научных исследований.

Глава 1

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

1.1. Классификация оптических методов анализа

В основе классификации оптических методов анализа лежат различия в характере взаимодействия электромагнитного светового излучения с веществом.

Абсорбционные методы основаны на поглощении электромагнитного излучения частицами вещества. В зависимости от частиц, поглощающих электромагнитные волны, различают: *атомно-абсорбционный* анализ при поглощении энергии атомами вещества (его относят к физическим методам анализа); *молекулярно-абсорбционный* анализ при поглощении света молекулами или сложными ионами вещества (*фотометрический* анализ).

Турбидиметрический и *нефелометрический* методы основаны на рассеивании световой энергии взвешенными в растворе частицами.

Люминесцентные методы основаны на излучении, возникающем в результате выделения энергии возбужденными молекулами.

Рефрактометрические методы основаны на преломлении света при прохождении его через раствор вещества.

Поляриметрические методы основаны на использовании плоскополяризованного света.

1.2. Фотометрический анализ

В фотометрическом анализе используют поглощение электромагнитного излучения оптического диапазона длин волн, который включает ультрафиолетовую (УФ), видимую и инфракрасную (ИК) области, молекулами или ионами вещества в растворе. Набор длин волн (или частот), характеризующий электромагнитное излучение, называется электромагнитным спектром излучения. Для оптического диапазона он имеет характеристики, приведенные в табл. 1.1.

Наибольшее распространение получили фотометрические методы анализа, основанные на поглощении в видимой области спектра. Это объясняется возможностью получения множества интенсивно окрашенных органических и неорганических соединений, пригодных для их фотометрического определения в видимой области спектра с помощью достаточно несложных и относительно недорогих приборов.

В практике фотометрического анализа используют различные химические реакции, приводящие к образованию соединений, растворы которых обладают сравнительно большими поглощающими свойствами. Чаще

всего используют реакции комплексообразования.

Т а б л и ц а 1.1

Электромагнитный спектр излучения (оптическая область)

Спектральная область	Длина волны λ , нм	Энергия E , эВ	Процессы, протекающие в результате поглощения
Ультрафиолетовая: вакуумная близкая	<200 200 – 400	10^2 – – 10	Электронные переходы
Видимая	400 – 700	10 – 1	Электронные переходы
Инфракрасная: близкая фундаментальная далекая	700 – $1,5 \cdot 10^3$ $1,5 \cdot 10^3$ – $7,5 \cdot 10^4$ $7,5 \cdot 10^4$ – 10^6	1 – 10^{-2}	Колебания молекул Колебания молекул Вращение молекул

Происхождение молекулярных спектров поглощения. Энергетическое состояние молекулы сложнее, чем у атома. Наряду с движением электронов в молекуле происходит колебательное движение самих атомов, вернее их ядер, и вращение молекулы как целого. В любом стационарном состоянии энергия молекулы (E) складывается из электронной ($E_{эл}$), колебательной ($E_{кол}$) и вращательной ($E_{вр}$) энергии:

$$E = E_{эл} + E_{кол} + E_{вр}$$

Наибольший вклад в полную энергию вносит энергия электронов, наименьший – энергия вращения молекулы (вращение молекул проявляется лишь в газообразном состоянии): $E_{эл} \gg E_{кол} \gg E_{вр}$.

Согласно квантово-механическим представлениям молекула, так же как и атом, может существовать только в определенных энергетических состояниях. Вещество поглощает только такое излучение, энергия которого вызывает определенные изменения в молекуле данного вещества. То есть молекула поглощает фотоны с энергией, равной разности энергий ее молекулярных орбиталей.

Поглощение молекулой электромагнитного излучения может сопровождаться изменением энергии электронов (электронные переходы), изменением колебаний ядер (колебательные переходы), а также изменением вращательного состояния (вращательные переходы). Очевидно, что для возбуждения электронных переходов необходима большая энергия, чем для осуществления колебательных и вращательных переходов. Электронные переходы вызываются поглощением ультрафиолетового и видимого

излучения, а поглощение инфракрасного и более длинноволнового излучения вызывает колебательные и вращательные переходы (табл. 1.1).

Число энергетических состояний молекулы велико, и энергии отдельных переходов бывают настолько близки, что различить их невозможно. Поэтому в молекулярных спектрах спектральные линии с близкими частотами сливаются в одну полосу поглощения.

Возвращаясь в исходное состояние, молекула чаще теряет поглощенную энергию в виде теплоты (фотометрический анализ), реже – в виде излучения (люминесценция). Поскольку количество возбуждаемых молекул по сравнению с их общим числом мало, выделившаяся теплота не влияет на состояние излучаемой системы.

Зависимость поглощения от строения молекул или ионов. Избирательное поглощение в определенной области спектра связано с наличием в молекуле определенных групп атомов. Они содержат одну или несколько кратных связей или неподеленные пары электронов. Такие группы, определяющие окраску веществ, если поглощение происходит в видимой области спектра, называют хромофорами. Примерами хромофоров являются следующие группы: карбонильная $>C=O$, карбоксильная $-COOH$, этиленовая $-CH=CH-$, азотиновая $>C=N-$, нитрозо- $-N=O$, нитритная $-ONO$, нитратная $-ONO_2$, фенильная $-C_6H_5$. Иногда в молекуле рядом с хромофором находится активная группа атомов, которая сама по себе не определяет поглощения, но может усиливать интенсивность поглощения. Такие группы (амино- $-NH_2$, диметиламино- $-N(CH_3)_2$, гидроксигруппа $-OH$, метокси- $-OCH_3$) называют ауксохромами.

Растворы солей неорганических соединений первых периодов в большинстве своем не обладают характерным поглощением в УФ-, видимой и ИК-областях спектра. Точнее, в этих областях наблюдается только поглощение для некоторых анионов, но катионы (вернее их аква-комплексы) обычно «бесцветны». Это зависит от того, что данные катионы имеют, как правило, устойчивую завершённую электронную оболочку, образовавшуюся после того, как атом, переходя в катион, потерял все наименее прочно связанные электроны, и для возбуждения оставшихся электронов недостаточно даже энергии ультрафиолетового излучения. Электронная система анионов менее стабильна. Так, например, отрицательно заряженные ионы галогенов, содержащие один лишний электрон, возбуждаются меньшими квантами излучений, и полосы поглощения их попадают в доступную УФ-область спектра.

Окраска аква-комплексов катионов, имеющих незаполненные *d*-орбитали, обусловлена возможностью легких электронных переходов между энергетически близкими *d*-орбиталями. Поэтому растворы солей меди, кобальта, никеля, железа, хрома, марганца окрашены, а растворы солей цинка и кадмия бесцветны, поскольку ионы Zn^{2+} и Cd^{2+} имеют завершённый *d*-подуровень.

Основные законы поглощения электромагнитного излучения.

При прохождении светового потока интенсивностью I_0 (падающий или начальный световой поток) через стеклянный сосуд, заполненный окрашенным раствором (рис. 1.1), происходит его ослабление. Потеря светового

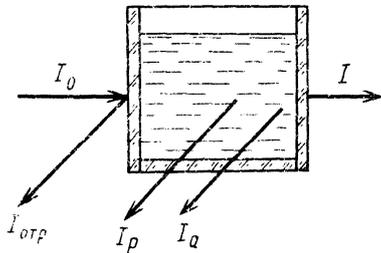


Рис. 1.1. Прохождение светового потока через раствор

потока обусловлена отражением на границе воздух – стекло и стекло – раствор ($I_{отр}$), рассеянием света взвешенными в растворе частицами (I_p) и поглощением (абсорбцией) света частицами окрашенного вещества (I_a). Следовательно, для оценки прохождения светового потока через раствор справедливо уравнение: $I_0 = I_{отр} + I_p + I_a + I$,

где I – интенсивность выходящего светового потока. Для оценки интенсивности поглощенного света (I_a) измерения проводят в одной и той же кювете относительно холостого раствора сравнения, в результате чего интенсивность света отраженного ($I_{отр}$) остается постоянной и ее можно не учитывать. Кроме того, фотометрическим методом анализируют истинные растворы, не рассеивающие свет, т. е. I_p можно принять за нуль. Таким образом,

$$I_0 = I_a + I.$$

Интенсивность света падающего (I_0) зависит от источника света. Интенсивность света поглощенного (I_a) и, следовательно, интенсивность света выходящего зависит от концентрации окрашенного вещества в растворе. Современные методы не позволяют непосредственно измерить I_a , поэтому оценить интенсивность окраски раствора, а значит, и концентрацию окрашенного вещества можно, измеряя интенсивность света выходящего.

В основе фотометрических методов анализа лежат два основных закона поглощения. Первый из них – закон Бугера-Ламберта гласит: «Относительное количество поглощенного пропускающей средой излучения не зависит от интенсивности падающего излучения. Каждый слой равной толщины поглощает равную долю падающего монохроматического излучения». Математически эта зависимость выражается следующим уравнением:

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

где l – толщина поглощающего слоя;

k – коэффициент поглощения световой энергии, зависящий от природы вещества, температуры и длины волны падающего света.

Таким образом, закон Бугера-Ламберта дает зависимость между количеством поглощенной световой энергии и толщиной поглощающего слоя вещества.

Второй закон поглощения – закон Бера – формулируется следующим

образом: «Поглощение потока электромагнитного излучения прямо пропорционально числу частиц поглощающего вещества, через которое проходит поток этого излучения». Таким образом, закон Бера фактически выражает зависимость коэффициента поглощения от концентрации поглощающего вещества в однородном растворе:

$$k = \varepsilon C,$$

где ε – коэффициент пропорциональности, называемый коэффициентом погашения;

C – концентрация.

Объединив оба закона, получили уравнение основного закона светопоглощения – объединенного закона Бугера-Ламберта-Бера:

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

или в логарифмической форме

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon Cl.$$

Величину $\lg \frac{I_0}{I}$ называют *оптической плотностью* поглощающего вещества и обозначают буквой A :

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon Cl.$$

Последнее уравнение называют *основным уравнением фотометрического анализа*. Согласно данному уравнению оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации вещества в растворе и толщине поглощающего слоя.

Отношение интенсивности потока монохроматического излучения, прошедшего через исследуемый раствор, к интенсивности первоначального потока излучения называется *прозрачностью*, или *пропусканием* раствора, и обозначается буквой T :

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon Cl}.$$

Пропускание часто выражают в процентах.

Величина коэффициента погашения ε зависит от способа выражения концентрации вещества в растворе и толщины поглощающего слоя. Если концентрация выражена в моль/л, а толщина слоя в см, то ε называется *молярным коэффициентом погашения*. При $C = 1$ моль/л и $l = 1$ см $\varepsilon = A$, т. е. молярный коэффициент погашения представляет собой оптическую плотность раствора с концентрацией 1 моль/л, помещенного в кювету с толщиной слоя 1 см.

Молярный коэффициент погашения является основной характеристикой поглощения системы при данной длине волны. Поскольку поглощение при разных длинах волн будет различно, то ε меняется с изменением длины волны.

Значение ε для каждого вещества можно рассчитать из экспериментальных данных.

Важным дополнением к закону Бугера – Ламберта – Бера является закон аддитивности. «При данной длине волны оптическая плотность смеси компонентов, не взаимодействующих между собой, равна сумме оптических плотностей отдельных компонентов при той же длине волны». Закон аддитивности используют для анализа многокомпонентных систем.

Спектр поглощения. Спектр поглощения вещества – это графическое изображение зависимости светопоглощения от характеристики падающего светового потока. Способы представления спектра различны в зависимости от величин, откладываемых по оси абсцисс и ординат. Так, по оси абсцисс откладывают длину волны, частоту или волновое число, по оси ординат – оптическую плотность, пропускание, молярный коэффициент погашения или их логарифмы.

Спектр поглощения характеризуется наличием в нем определенного числа полос поглощения. Каждая полоса поглощения характеризуется максимумом поглощения ($A_{\text{макс}}$ или $\varepsilon_{\text{макс}}$), длиной волны $\lambda_{\text{макс}}$ или волновым числом $\bar{\nu}_{\text{макс}}$ и полушириной полосы a , т. е. расстоянием между длинами волн, соответствующими половинным значениям максимальной величины оптической плотности или максимального молярного коэффициента погашения (рис. 1.2).

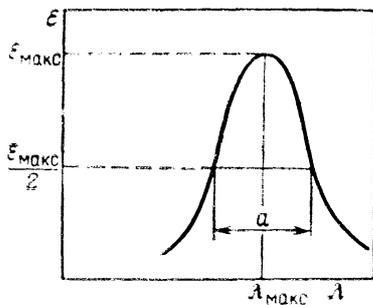


Рис. 1.2. Параметры, характеризующие полосу поглощения в спектре

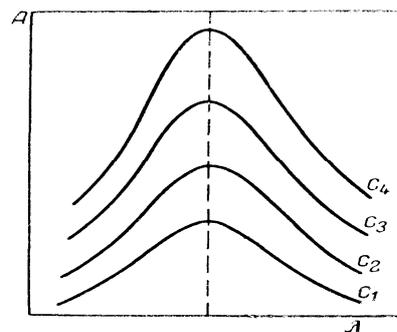


Рис. 1.3. Зависимость оптической плотности от длины волны при различных концентрациях вещества в растворе ($C_4 > C_3 > C_2 > C_1$)

Спектр поглощения является индивидуальной характеристикой данного вещества. На изучении спектров поглощения основан качественный анализ поглощающих свет веществ. Количественный анализ основан на

использовании прямо пропорциональной зависимости оптической плотности от концентрации вещества при постоянной толщине поглощающего слоя и постоянной длине волны (рис. 1.3).

На рис. 1.4 и 1.5 представлены спектр раствора дихромата калия в воде, содержащего основной максимум поглощения при 350 – 400 нм, и спектр поглощения раствора перманганата калия с двумя основными максимумами поглощения при 350 нм и 550 нм.

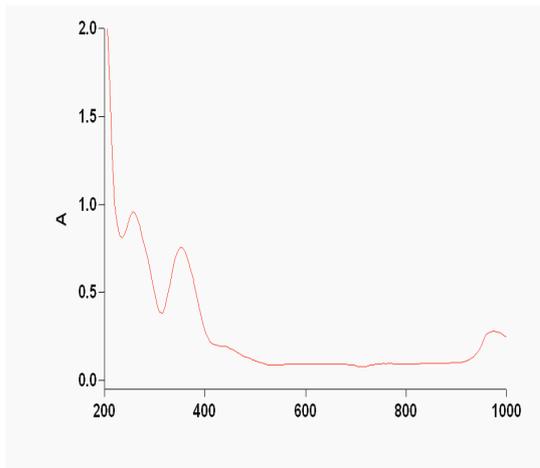


Рис. 1.4. Спектр раствора $K_2Cr_2O_7$ в воде

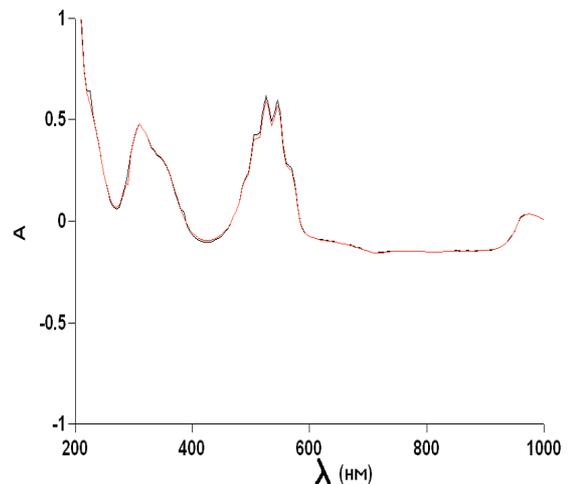


Рис. 1.5. Спектр раствора $KMnO_4$ в воде

Методы фотометрического анализа. В зависимости от характера поставленной задачи фотометрический анализ можно проводить *спектрофотометрическим* или *фотоэлектроколориметрическим* методом.

Фотоэлектроколориметрия – это анализ на основе измерения поглощения не строго монохроматического излучения видимой области спектра. Измерения проводят с помощью приборов, называемых фотоэлектроколориметрами. Данный метод получил очень широкое распространение, что обусловлено простотой и доступностью аппаратуры.

Излучения видимой области спектра поглощают только окрашенные соединения. Поэтому метод фотоэлектроколориметрии применяют для анализа окрашенных растворов. Если исследуемое вещество не окрашено, его можно анализировать, предварительно переведя в окрашенное соединение путем проведения химической реакции с определенными реагентами.

Спектрофотометрия – это анализ на основе измерения поглощения монохроматического излучения как в видимой, так и в примыкающих к ней ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра. Приборы, применяемые в спектрофотометрии (различные типы спектрофотометров), более сложны, чем приборы, используемые в фотоэлектроколориметрии. Од-

нако спектрофотометрический анализ отличается от фотоэлектроколориметрического не только большими возможностями, благодаря широкому диапазону длин волн, но и большей точностью в связи с использованием монохроматического излучения.

Фотометрические методы применяют для определения концентраций в интервале $10^{-2} - 10^{-6} \%$. Относительная ошибка определения этими методами обычно составляет примерно 1 – 2 %.

Основные приемы количественного фотометрического анализа.

Нахождение абсолютных значений I_0 и I практически весьма затруднительно. Поэтому при измерении величин поглощения излучений проводится относительное сравнение интенсивности потока излучения, проходящего через испытуемый раствор, с интенсивностью потока излучения, проходящего через нулевой раствор или раствор сравнения, поглощение которого условно принимают равным нулю.

Для определения концентрации вещества существует несколько методов.

Метод сравнения. В этом методе измеряют и сравнивают оптические плотности исследуемого (A_x) и стандартного (эталонного) (A_{cm}) растворов при одной и той же длине волны и толщине поглощающего слоя. Согласно основному закону светопоглощения:

$$A_x = \varepsilon C_x l \quad \text{и} \quad A_{cm} = \varepsilon C_{cm} l.$$

Решая эти уравнения относительно C_x , получают расчетную формулу:

$$C_x = C_{cm} \frac{A_x}{A_{cm}}.$$

Метод применяют для однократных определений. Стандартные растворы берут по интенсивности окраски близкими к исследуемому раствору. Их можно взять 2 – 3.

Метод градуировочного графика. Данный метод является наиболее распространенным. Градуировочный график представляет собой графическую зависимость $A = f(C)$. В соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера этот график должен представлять прямую линию, проходящую через начало координат. Для его построения готовят серию стандартных растворов определяемого вещества различной концентрации. При выбранной длине волны и толщине поглощающего слоя раствора измеряют оптические плотности стандартных растворов и строят график зависимости оптической плотности от концентрации. Затем измеряют оптическую плотность исследуемого раствора A_x и по графику находят его концентрацию C_x . Метод градуировочного графика обычно применяют для серийных анализов.

Метод молярного коэффициента погашения. Готовят 2 – 3 стандартных раствора и при одинаковых условиях измеряют их оптическую плотность. Рассчитывают значение молярного коэффициента погашения:

$$\varepsilon = \frac{A_{cm}}{C_{cm}l}$$

Находят среднее значение ε (ε не зависит от концентрации). Затем измеряют оптическую плотность исследуемого раствора и рассчитывают его концентрацию:

$$C_x = \frac{A_x}{\varepsilon l}$$

Метод добавок. Метод добавок заключается в том, что сначала измеряют оптическую плотность A_x раствора с неизвестной концентрацией C_x , а затем в тех же условиях измеряют оптическую плотность A_1 того же раствора с добавкой некоторого известного количества определяемого вещества C_1 . Применяя основной закон светопоглощения и закон аддитивности получают уравнения:

$$A_x = \varepsilon C_x l \quad \text{и} \quad A_1 = \varepsilon C_x l + \varepsilon C_1 l.$$

Решая эти уравнения относительно неизвестной концентрации C_x , находят расчетную формулу метода добавок:

$$C_x = \frac{A_x}{A_1 - A_x} C_1.$$

Метод добавок часто используют в графическом варианте (рис. 1.6). В этом случае по оси концентраций откладывают добавленное количество стандартного раствора. Значения A_x и A_1 откладывают по оси ординат. Соединяют обе точки и продолжают до пересечения с осью концентраций. Отсекаемый отрезок является определяемой концентрацией C_x . Через две точки экспериментальную прямую обычно не проводят во избежание большой ошибки. Поэтому готовят еще один раствор, содержащий добавку C_2 , измеряют его оптическую плотность A_2 и проводят прямую через три точки.

Важно выбрать количество добавки. Погрешность будет наименьшей, если первая добавка близка к определяемому количеству, а вторая – в два раза больше первой.

Метод добавок особенно употребим при определении веществ в присутствии примесей, которые могут повлиять на поглощение исследуемого компонента. Именно такие случаи встречаются при анализе реальных объектов. При измерении методом добавок все растворы содержат одинаковое количество примесей, что и позволяет исключить их влияние.

Условие применимости метода – подчинение растворов закону Бугера – Ламберта–Бера.

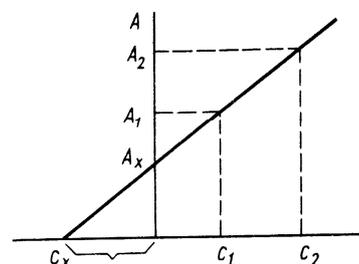


Рис. 1.6. Определение концентрации методом добавок

Метод спектрофотометрического титрования. В этом методе титриметрии изменяющимся параметром является оптическая плотность титруемого раствора, титранта (или обоих). Кювету с анализируемым раствором помещают на пути светового потока в специальном держателе, добавляют титрант порциями при перемешивании и измеряют оптическую плотность после каждого добавления. Строят кривую титрования, откладывая по оси абсцисс объем прибавленного реагента-титранта V , мл, а по оси ординат – оптическую плотность A . Получают линейные кривые, пересекающиеся в точке эквивалентности (рис. 1.7). При этом возможны различные варианты: а) титруемое вещество поглощает свет при данной длине волны, а титрант не поглощает; б) поглощает титрант, но не титруемое вещество; в) титруемое вещество и титрант не поглощают свет при данной длине волны, но поглощает продукт реакции; г) поглощают свет титруемое вещество и титрант.

Дифференциальный метод. Фотометрические методы чаще всего используются для определения малых концентраций веществ. Кроме того, интервал оптических плотностей, а, следовательно, и определяемых концентраций, которые могут быть измерены с допустимой погрешностью, ограничен. Теоретически рассчитано и практически доказано, что минимальная относительная погрешность определения концентрации исследуемого компонента в растворе получается, когда оптическая плотность раствора находится в интервале значений $0,1 < A < 1,0$. Для расширения интервала определяемых концентраций и повышения точности измерений при анализе интенсивно окрашенных растворов применяют метод дифференциальной фотометрии.

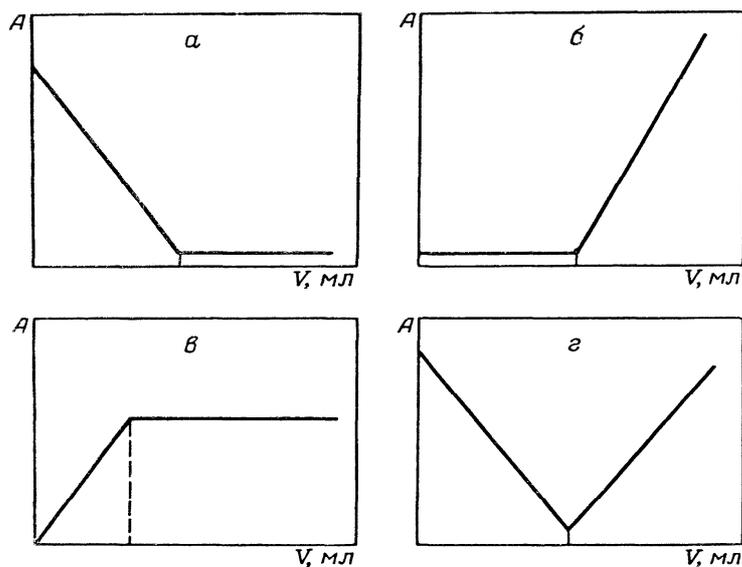


Рис. 1.7. Кривые спектрофотометрического титрования

Сущность метода состоит в том, что оптические плотности исследуемого и стандартных растворов измеряют не по отношению к чистому растворителю с нулевым поглощением, а по отношению к одному из стандартных растворов с концентрацией определяемого элемента C_0 . Этот раствор должен, во-первых, иметь достаточно высокую оптическую плотность, во-вторых, его пропускание должно быть как можно более близким к пропусканию испытуемого раствора. Измеряемые оптические плотности будут иметь отрицательные значения, если поглощение испытуемого раствора меньше поглощения раствора сравнения. Отрицательные оптические плотности получают, измерив оптическую плотность раствора сравнения относительно испытуемых растворов и взяв их со знаком «-» (рис. 1.8). Для измерений используют положительную и отрицательную ветви градуировочного графика.

Дифференциальным методом можно провести определение больших количеств веществ с точностью, не уступающей классическим титриметрическим и гравиметрическим методам.

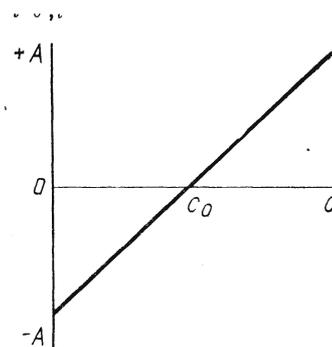


Рис. 1.8. Градуировочный график дифференциальной фотометрии

Пример использования фотометрии. Определение белка. Количественное определение содержания белка в конкретном образце или растворе является важной прикладной задачей.

Определение белка методом Лоури-Фолина. Метод основан на сочетании биуретовой реакции на пептидные связи и реакции Фолина на ароматические аминокислоты. Метод является достаточно надежным и позволяет определять плохо растворимые белки после их кипячения в 0,1 М растворе NaOH и получения раствора с концентрацией 25–500 мкг белка в 1 мл. Разные белки дают заметно различающиеся величины поглощения в методе Лоури-Фолина, отчасти это зависит от содержания тирозина и триптофана.

Реактивы

1. 2 %-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 М растворе NaOH.
2. 0,5 %-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 %-ном растворе тартрата натрия (калия) или тринатрийцитрате.
3. Смесь 1 мл раствора 2 с 50 мл раствора 1, приготовленная перед началом определения.
4. Реактив Фолина-Чокальтеу. Растворяют 50 г вольфрамата натрия Na_2WO_4 и 12,5 г молибдата натрия Na_2MoO_4 в 350 мл воды, к полученному раствору приливают 25 мл 85 %-ного раствора фосфорной кислоты, 50 мл концентрированной соляной кислоты и смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 ч. Затем добавляют 75 г сульфата лития, 25 мл во-

ды, 3–5 капель брома и кипятят без холодильника в течение 15 мин под тягой для удаления избытка брома. Раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до объема 500 мл, перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 1 мл, разводят в 10 раз водой, титруют 0,1 М раствором NaOH до нейтральной реакции по фенолфталеину. После чего к раствору добавляют такое количество воды, чтобы получить конечную концентрацию кислоты в растворе, равную 1 н. Реактив 4 хранят в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике. Перед употреблением реактив Фолина разводят водой 1:1.

5. Испытуемый раствор белка с концентрацией от 25 до 500 мкг/мл.

Ход определения. Для построения градуировочной кривой в 6 пробирок вносят 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл стандартного раствора белка с известной концентрацией, содержащего 0,25 мг/мл вещества (т. е. 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мкг), и доводят водой объем проб до 1 мл. В 7-ю пробирку вносят 1 мл воды (контрольная проба). Во все пробирки прибавляют по 5 мл смеси растворов 1 и 2 и оставляют пробирки с растворами стоять при температуре 18 – 25 °С в течение 10 мин. Затем к растворам добавляют по 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного водой 1:1, и оставляют растворы на 30 мин, после чего измеряют интенсивность окрашенных в синий цвет растворов при 750 нм на спектрофотометре или на фотоэлектроколориметре с красным фильтром относительно контрольного раствора.

Величины оптической плотности (A) для шести растворов откладывают на оси ординат, а значения концентрации белка (C , мкг/мл) – на оси абсцисс и получают градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации белка (рис. 1.9), по которому затем определяют неизвестные концентрации. Точность метода анализа белка $\pm 0,1 \%$.

Обычное содержание белка в объектах животного и рыбного происхождения составляет 15–22 %; в клетках микроорганизмов, бактерий, дрожжей – 12–15 %; в овощах и фруктах – 0,5–1,5 %; в зерне – 9–12 %; в древесине – 0,5–5 %.

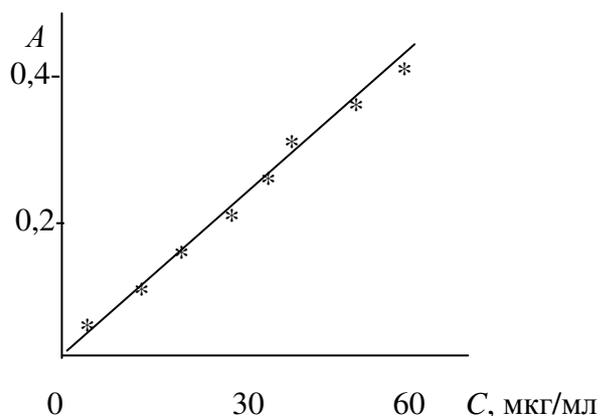


Рис. 1.9. Градуировочный график, построенный по стандартным растворам белка с известной концентрацией

1.3. Атомно-абсорбционная спектрофотометрия

Атомно-абсорбционный метод анализа основан на резонансном поглощении характеристического излучения элемента его невозбужденными атомами, находящимися в свободном состоянии, т. е. в состоянии атомного «пара». В результате поглощения кванта света валентный электрон атома возбуждается и переходит на ближайший разрешенный энергетический уровень, а резонансное излучение, проходящее через плазму, ослабляется. Ослабление резонансного излучения элемента, падающего на плазму с интенсивностью I_0 до интенсивности I для выходящего светового потока происходит по экспоненциальному закону, который идентичен закону Бугера – Ламберта – Бера:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = klc,$$

где A – абсорбция поглощающего слоя плазмы,
 l – толщина поглощающего слоя атомного пара (плазмы),
 k – атомный коэффициент поглощения (абсорбции),
 c – концентрация поглощающих атомов.

При постоянной толщине поглощающего слоя градуировочный график, построенный в координатах $A - c$ представляет собой прямую, проходящую через нулевую точку.

Для атомизации вещества используют пламена различных типов и электротермические атомизаторы. В качестве горючей смеси в пламенных атомизаторах наиболее часто применяют смесь воздуха с ацетиленом или оксида азота (I) с ацетиленом.

Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов в пищевых продуктах. Ионы металлов содержатся в объектах в свободном и связанном в прочные химические комплексы состоянии. Поэтому для количественного определения содержания токсичных элементов исследуемые объекты необходимо подвергнуть полной минерализации для высвобождения связанных металлов. Для минерализации применяют высокотемпературную окислительную обработку, особенно эффективную в присутствии минеральных кислот.

На результаты определения элементов могут оказывать существенное влияние загрязнения анализируемых проб металлами от используемой лабораторной посуды, воды и химических реактивов, что необходимо учитывать при подготовке к анализу. Лабораторную посуду моют раствором горячей азотной кислоты, раствор в бидистиллированной воде (1:1), ополаскивают дистиллированной водой, моют раствором горячей соляной кислоты, раствор в бидистиллированной воде (1:1), промывают бидистиллированной водой и высушивают.

Навеску пищевого продукта в количестве 20 г берут на обеззоленную бумагу, заворачивают и помещают в колбу Кьельдаля. Жидкие про-

дукты в количестве 100 мл (молоко, минеральная вода) упаривают в колбе на электроплитке до объема 10 мл.

Параллельно проводят холостой опыт, добавляя в качестве пробы 10–20 мл бидистиллированной воды.

Минерализация проб мокрым способом (кроме жиров). В колбу с навеской вносят азотную кислоту из расчета 10 мл на каждые 5 г продукта, выдерживают 15 мин, вносят 3 стеклянных шарика, закрывают грушевидной пробкой и проводят постепенно усиливающееся нагревание смеси, обеспечивая ее равномерное кипение и упаривание до объема 5 мл. Затем в колбу вносят еще 10 мл азотной кислоты и упаривают раствор до 5 мл. Процесс повторяют 2–4 раза до прекращения выделения бурых паров.

В охлажденную колбу вносят, строго сохраняя последовательность, 10 мл азотной кислоты, 2 мл серной кислоты и 2 мл пероксида водорода на каждые 5 г продукта (молочные продукты минерализуют без серной кислоты), содержимое упаривают до объема 5 мл, не допуская образования коричневой окраски жидкости. При появлении коричневой окраски нагрев прекращают, пробу охлаждают до комнатной температуры.

В колбу добавляют 5 мл азотной кислоты и 2 мл H_2O_2 и нагревают до появления белых паров серного ангидрида. Если при этом раствор не обесцветится, то процедуру повторяют. Минерализацию считают законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным.

Для удаления остатков кислот в охлажденную колбу добавляют 10 мл бидистиллированной воды, нагревают до появления белых паров и кипятят в течение 10 мин, охлаждают. Добавление воды, кипячение и охлаждение повторяют 2 раза. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 мл бидистиллированной воды, 2 мл серной кислоты, 5 мл соляной кислоты и кипятят до растворения осадка, дополняя испаряющуюся воду. После растворения осадка раствор упаривают до влажных солей.

Минерализация жиров. Колбу с образцом нагревают на электроплитке в течение 8 ч до образования вязкой массы, охлаждают, добавляют 25 мл азотной кислоты и вновь осторожно нагревают, избегая бурного вспенивания. После прекращения вспенивания в охлажденную колбу добавляют 25 мл азотной кислоты, 12 мл пероксида водорода и нагревают до получения бесцветной жидкости. Если жидкость темнеет, то к ней периодически добавляют по 5 мл азотной кислоты, продолжая нагревание до завершения минерализации. Минерализацию считают законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным.

Для удаления остатков кислот в охлажденную колбу добавляют 10 мл бидистиллированной воды, нагревают до появления белых паров, кипятят в течение 10 мин и охлаждают. Добавление воды, кипячение и охлаждение повторяют 2 раза. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 мл бидистиллированной воды, 2 мл серной кислоты, 5 мл соляной кислоты и кипятят до растворения осадка, дополняя испаряющуюся

воду. После растворения осадка раствор упаривают до влажных солей.

Приготовление растворов. В емкость с озоленной пробой добавляют разбавленную (1:1) азотную кислоту в количестве 1–5 мл в зависимости от зольности продукта и нагревают на электроплитке для растворения золя. Полученный раствор выпаривают до влажных солей, растворяют в 20 мл 1 % раствора азотной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки той же кислотой.

Если зола растворилась не полностью, раствор с осадком упаривают до влажных солей, растворяют в минимальном объеме разбавленной (1:1) соляной кислоты, снова упаривают до влажных солей и растворяют в 20 мл 1 %-ной соляной кислоты. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки той же кислотой. Если зола не растворилась, раствор доводят до объема 40 мл 1 %-ной соляной кислотой, осторожно кипятят на плитке в течение 0,5 ч, отфильтровывают осадок через промытый растворителем обеззоленный фильтр, переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки той же кислотой.

Содержание определяемых элементов в растворах не должно выходить за пределы концентраций (мкг/мл): для железа и цинка 0,1 – 10, для меди 0,05 – 5, для хрома и никеля 0,1 – 5, для свинца 0,1 – 2, для кадмия 0,02 – 1. Разбавление растворов проб проводят той же кислотой в случае превышения результатов определения для указанного интервала.

Коэффициент разбавления $K > 1$, определяется как $K = V_2/V_1$, где V_1 – объем аликвотной части раствора, взятой для разбавления, мл; V_2 – объем разбавленного раствора, мл.

Концентрирование проводят для повышения точности анализа и в том случае, когда результаты определения лежат ниже указанного оптимального интервала концентраций.

В стаканы вместимостью 150 мл помещают по 10–50 мл испытуемых растворов в зависимости от требуемой степени концентрирования, доводят их объемы до 50 мл 1 %-ным раствором кислоты, применявшейся для растворения проб. Параллельно берут в такие же стаканы по 50 мл стандартных растворов сравнения.

В стаканы приливают по 10 мл 20 %-ного раствора лимонной кислоты, добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором аммиака до появления слабо розового окрашивания.

Растворы переносят в делительные воронки емкостью 100 мл, приливают по 5 мл 0,5 %-ного раствора натрия N,N'-диэтилдитиокарбамата и по 5 мл диэтилового эфира, встряхивают 1 мин. Проводят трехкратную экстракцию. Нижние водные слои отбрасывают, органические слои собирают и объединяют. Коэффициент концентрирования $K < 1$, определяется как $K = V_2/V_1$, где V_1 – объем аликвотной части раствора, взятой для концентрирования, мл; V_2 – объем органической фазы, мл.

Проведение атомно-абсорбционных измерений. Проводят подготовку атомно-абсорбционного спектрофотометра к работе в соответствии с технической документацией. Прогревают прибор в течение 30 мин. Прогревают включенную горелку с одновременной промывкой ее дистиллированной водой в течение 10 мин. Проводят настройку источников резонансного излучения и монохроматора, используя для работы наиболее чувствительные линии поглощения элементов (табл. 1.2).

Т а б л и ц а 1.2

Атомно-абсорбционное определение содержания металлов

Элемент	Длина волны, нм	Оптимальный диапазон рабочих концентраций, мкг/мл	Предел определения, мкг/мл
1	2	3	4
Na	330,2	10 – 100	1
Na	589,6	2 – 30	0,1
Na	589,0	0,5 – 5	0,005
K	404,5	50 – 1000	8
K	769,9	5 – 50	0,5
K	766,5	0,5 – 10	0,005
Mg	285,2	0,1 – 10	0,001
Ca	422,7	5 – 30	0,01
Fe	248,3	1 – 10	0,01
Zn	213,9	1 – 10	0,002
Cu	324,8	0,005 – 5	0,003
Mn	279,5	0,1 – 2	0,003
Pb	283,3	0,1 – 2	0,02
Pb	217,0	0,1 – 2	0,01
Cd	228,8	0,02 – 1	0,001
Co	240,7	0,05 – 2	0,01
Ni	232,1	0,1 – 5	0,01
Cr	357,9	0,1 – 5	0,005
Cr	359,4	0,05 – 5	0,005

Выбор резонансной линии при измерениях абсорбции элементов определяется в зависимости от технических характеристик ламп спектрофотометра и проводится по критерию большего отношения сигнал / шум и по меньшей величине дрейфа нуля и чувствительности.

Распыляют в пламени нулевой стандарт (холостая проба без определяемого элемента), затем в порядке возрастания концентрации измеряют абсорбцию стандартных растворов сравнения, в конце вновь определяют нулевое положение распылением в пламени нулевого стандарта. При прямом определении свинца, кадмия, никеля коррекция фонового поглощения обязательна для каждого измерения.

При наличии компьютерной системы обработки данных для получе-

ния результата используют рекомендованную программу, либо строят зависимость величины абсорбции от концентрации. Массовую долю элемента в пробе ω (ppm или мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$\omega = (c_1 - c_2) \cdot V \cdot K / g,$$

где c_1 – концентрация элемента в испытуемом растворе, мкг/мл;
 c_2 – среднеарифметическая концентрация элемента для параллельных контрольных растворов, мкг/мл;
 V – исходный объем испытуемого раствора, мл;
 g – навеска пробы, г;
 K – коэффициент разбавления.

1.4. Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа

Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа применяют для анализа суспензий, эмульсий, различных взвесей и других мутных сред.

В нефелометрии измеряют интенсивность рассеянного света в направлении, перпендикулярном к свету падающему.

В турбидиметрии измеряют интенсивность выходящего светового потока в том же направлении, что и падающий свет.

Если длина волны падающего света меньше линейных размеров частиц, то рассеяние света происходит за счет преломления и отражения света на границе частица – растворитель. Это рассеяние называют *рассеянием Ми* (по фамилии ученого, разработавшего теорию этого явления в 1908 г.).

Если длина волны больше линейных размеров частиц, то происходит дифракция световой волны, т.е. огибание частицы световой волной. Возникает *эффект Тиндаля* (1871 г.).

Интенсивность света, рассеянного частицами, подчиняется *закону Рэлея* (1871 г.):

$$I_p = I_0 \left[F \frac{NV^2}{\lambda^4 r^2} (1 + \cos^2 \beta) \right],$$

где I_0 – интенсивность падающего света;
 I_p – интенсивность рассеянного света;
 F – функция, зависящая от величины показателей преломления частиц в растворе;
 N – общее число частиц в данном объеме раствора;
 V – средний объем частицы;
 λ – длина волны падающего света;
 r – расстояние до приемника рассеянного света;
 β – угол между направлениями падающего и рассеянного света.

При нефелометрических определениях сравнивают светорассеяние одинаково приготовленных коллоидных систем одних и тех же веществ на одном и том же приборе. Поэтому все величины, зависящие от типа выбранной суспензии (F, V) и от типа прибора (β, r) остаются постоянными. При пользовании одним и тем же источником света длина волны λ также постоянна.

Объединяя все постоянные величины в одну константу k^I , для одинакового объема суспензии можно записать

$$I_p = k^I C,$$

где C – молярная концентрация частиц в растворе.

Таким образом, интенсивность рассеянного света пропорциональна концентрации взвешенных частиц. Эту зависимость и используют в нефелометрическом методе анализа.

Для нефелометрических определений используют специальные приборы – нефелометры, имеющие приспособление для наблюдения рассеянного света под углом 90° к направлению падающего света.

В турбидиметрии связь между выходящим световым потоком и концентрацией частиц взвеси дается следующим уравнением:

$$A = \lg \frac{I_o}{I} = \frac{k_1 l C r^3}{r^4 + a \lambda^4},$$

где A – рассеивающая способность (величина, аналогичная оптической плотности);

I_o – интенсивность падающего света;

I – интенсивность выходящего света;

k_1 – коэффициент пропорциональности, зависящий от природы раствора и метода измерения;

l – толщина слоя раствора;

C – концентрация коллоидного раствора;

r – средний диаметр частиц взвеси;

a – константа, зависящая только от метода измерения;

λ – длина волны падающего света.

При турбидиметрических измерениях величины k_1, r, a, λ остаются постоянными, поэтому рассеивающая способность может быть представлена уравнением $A = kCl$. Полученное уравнение аналогично уравнению основного закона фотометрии, поэтому для измерений в турбидиметрическом методе анализа можно использовать фотоэлектроколориметры.

Пользуясь нефелометрическим и турбидиметрическим методами анализа, можно определять очень малые концентрации веществ, способных к образованию суспензий (сульфаты, хлориды и др.). По точности нефелометрия и турбидиметрия уступают фотометрическим методам, что связано, главным образом, с трудностями получения суспензий или эмульсий с определенными размерами частиц, нестабильностью их во времени. К обычным сравнительно небольшим погрешностям фотометрического

определения добавляются ошибки, связанные с недостаточной воспроизводимостью химико-аналитических свойств коллоидных растворов.

Пример использования нефелометрии. Определение ионов хлора. Для количественного определения хлорид-ионов в воде используется высокочувствительная реакция образования хлорида серебра (возникновение помутнения при низких концентрациях хлоридов в присутствии ионов серебра):



Определение можно провести с использованием фотоэлектрического колориметра-нефелометра типа ФЭКН-57, НФМ или их аналогов, действие которых основано на уравнивании двух световых потоков: одного от рассеивающей взвеси, другого – от матового молочного стекла прибора.

Оптическая схема нефелометра НФМ изображена на рис. 1.10. 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 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.

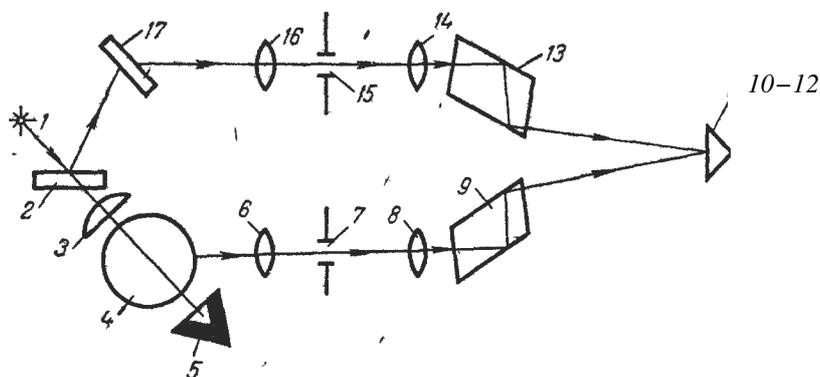


Рис. 1.10. Оптическая схема нефелометра НФМ: 1 – лампа накаливания; 2 – стеклянная пластинка; 3 – конденсор; 4 – кювета; 5 – светоловушка; 6, 16 – насадочные линзы; 7, 15 – диафрагмы; 8, 14 – объективы; 9, 13 – ромбические призмы, 10 – бипризма, 11 – светофильтры; 12 – окуляр, 17 – рассеиватель

При низких концентрациях хлорид-ионов выпадение осадка не происходит. Возникает помутнение раствора. Степень помутнения зависит от концентрации хлоридов. Стабилизацию растворов обеспечивают стабилизирующие компоненты.

Ход определения. Навеску KCl растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл (содержание ионов Cl^- должно приблизительно соответствовать 0,1 мг/мл хлорида) и тщательно перемешивают. Из анализируемого раствора отбирают микропипеткой 5 мл раствора и помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл. В нее же прибавляют 10 мл 0,1 М раствора азотной кислоты, 2 мл 0,5 %-ного раствора желатины, дистиллированной воды до общего объема приблизительно 30 мл, прибавляют 10 мл 0,005 М раствора $AgNO_3$ и доливают водой до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Через 5 мин раствор переносят в кювету нефелометра и измеряют рассеивание света не менее трех раз. Из полученных результатов вычисляют среднее значение и по градуировочной кривой определяют содержание хлорид-ионов.

Градуировочный график строят следующим образом. Из эталонного раствора KCl (0,1 г KCl в 500 мл водного раствора) отбирают в четыре мерные колбы емкостью 50 мл микропипеткой соответственно 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 мл и приготавливают стандартные растворы, добавляя в них все указанные выше реактивы. Начинают измерения с пробы, имеющей наибольшую концентрацию. Раствор помещают в кювету. Устанавливают светофильтр, цвет которого близок к окраске исследуемого раствора в рассеянном свете. Если жидкость бесцветна, устанавливают зеленый светофильтр. Отсчетные барабаны ставят на «0» и подбирают такой рассеиватель, при котором в окуляре левое фотометрическое поле будет несколько светлее правого. Вращением правого барабана уравнивают фотометрические поля по яркости и отсчитывают «кажущуюся» оптическую плотность.

1.5. Люминесцентный метод анализа

Понятие о люминесценции. Молекулы вещества, поглощая энергию, переходят в возбужденное энергетическое состояние, в котором они находятся лишь незначительное время. Возвращаясь в исходное состояние, молекулы теряют энергию в виде теплоты, реже – в виде излучения.

Способность некоторых веществ излучать световую энергию («светиться») при невысоких температурах под действием различных видов энергии называется *люминесценцией*.

По определению С.В. Вавилова, *люминесценцией называется избыток излучения тела над температурным в том случае, если это избыточное излучение обладает конечной длительностью примерно от 10^{-10} с и больше.*

В отличие от температурного свечения раскаленного тела люминесцентное свечение является неравновесным и продолжается относительно долгое время после прекращения действия внешнего возбуждающего фактора. Это отличает люминесценцию также от других видов неравновесного

свечения – рассеяния и отражения света, комбинационного рассеяния и т. д. Люминесценция практически не использует тепловую энергию излучающей системы, поэтому ее часто называют холодным светом.

Люминесценция возникает в результате электронного перехода при возвращении частиц из возбужденного состояния в исходное состояние. Таким образом, молекулы преобразуют поглощенную энергию в собственное излучение. Этим люминесценция также отличается от процессов не-собственного излучения – рассеяния и отражения света.

Длительность возбужденного состояния для различных веществ различна и колеблется от миллиардных долей секунды до часов и даже нескольких суток.

Люминесцентной способностью обладают многие вещества, находящиеся во всех трех агрегатных состояниях. Они имеют общее название – *люминофоры*. Простейшими люминесцирующими веществами являются газы и пары простых веществ: кислород, сера, йод и др. Люминесцируют соединения редкоземельных элементов, соли урана. На солнечном свету люминесцируют некоторые тонирующие напитки (из-за добавок хинина); бензин, содержащий полициклические ароматические углеводороды (нафталин, антрацен и др.); некоторые лекарства и наркотики. Способностью к люминесценции обладают некоторые виды микроорганизмов и спор насекомых и глубоководных рыб.

Классификация люминесценции. Явления люминесценции весьма разнообразны по свойствам и происхождению.

В зависимости от способа возбуждения частиц различают следующие виды люминесценции.

1. *Фотолюминесценция* – свечение, возникающее под действием электромагнитного излучения оптического диапазона длин волн.

2. *Катодолюминесценция* – свечение, возникающее под действием катодных лучей.

3. *Хемилюминесценция* – свечение вещества при протекании химической реакции. Энергия возбуждения люминесценции в этом случае черпается из запасов энергии реагирующих веществ (например, свечение оксида фосфора, возникающее при окислении фосфора).

4. *Биолюминесценция* – свечение, возникающее в различных растительных и живых организмах. Также обусловлено химическими процессами, протекающими в них (свечение светлячков, моллюсков и др.).

5. *Рентгенолюминесценция* – свечение под действием рентгеновских лучей.

6. *Электролюминесценция* – свечение под действием электрической энергии. Используется в проекционном телевидении, в часах, в калькуляторах и т. д.

В химическом анализе наиболее широкое применение находит фотолюминесценция.

По длительности свечения различают два вида люминесценции: *флуоресценцию* и *фосфоресценцию*. Флуоресценцией называют люминесценцию с длительностью порядка $10^{-8} - 10^{-10}$ с. Фосфоресценцией называют свечение, продолжающееся заметный промежуток времени после прекращения возбуждения – от 10^{-8} с до нескольких часов.

Для аналитических целей обычно применяют флуоресценцию.

Выход люминесценции. Часть поглощенной энергии при люминесценции тратится на безызлучательные переходы, т. е. не все поглощенные кванты света преобразуются в люминесценцию. Эффективность преобразования возбуждающего света в люминесцентное свечение характеризуется энергетическим и квантовым выходом люминесценции.

Энергетический выход люминесценции ($B_э$) представляет собой отношение излучаемой веществом энергии люминесценции ($E_л$) к энергии поглощенного света (E_n):

$$B_э = \frac{E_л}{E_n}.$$

Квантовый выход люминесценции ($B_к$) представляет собой отношение числа квантов люминесценции, излученных веществом ($N_л$), к числу поглощенных квантов возбуждающего света (N_n):

$$B_к = \frac{N_л}{N_n}.$$

Учитывая, что энергия кванта света равна $h\nu$, энергия N квантов света $E = N h \nu$. Тогда связь между $B_э$ и $B_к$ следующая:

$$B_э = \frac{N_л h \nu_л}{N_n h \nu_n} = \frac{\nu_л}{\nu_n} B_к.$$

Зависимость энергетического выхода люминесценции от длины волны возбуждающего света подчиняется *закону Вавилова*, в соответствии с которым *энергетический выход люминесценции в некотором спектральном интервале растет пропорционально длине волны падающего света, затем в некотором спектральном интервале он остается постоянным и после достижения некоторой граничной длины волны резко падает*.

Можно показать, что для спектрального интервала, в котором энергетический выход пропорционален длине волны поглощенного света, квантовый выход люминесценции постоянен. Чем больше квантовый выход люминесценции, тем меньшие количества люминесцирующего вещества могут быть определены по его люминесценции.

Постоянство квантового выхода люминесценции в определенном спектральном интервале позволяет использовать такие длины волн для возбуждения люминесценции, при которых энергетический выход люми-

несценции будет наибольшим, что имеет значение для количественного анализа.

Спектры поглощения и спектры люминесценции. Изучение спектров поглощения дает возможность установить, какие длины волн вызывают люминесценцию.

Спектром люминесценции называется зависимость интенсивности люминесценции от длины волны или частоты излучения. Подобно спектру поглощения спектр люминесценции является индивидуальной характеристикой вещества.

Спектры поглощения и люминесценции у многих веществ тесно связаны между собой. Энергия квантов света, выделившихся при люминесценции, меньше, чем энергия квантов возбуждающего света (за исключением небольших участков спектра, где полосы возбуждения и люминесценции перекрываются). Это положение установлено на основе простых наблюдений и известно как закон Стокса – Ломмеля: *спектр излучения в целом и его максимум сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн* (рис. 1.11).

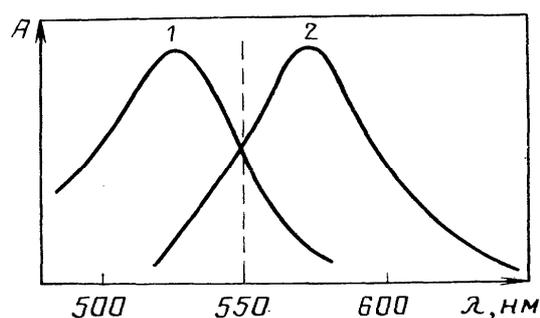


Рис. 1.11. Спектры поглощения (1) и люминесценции (2)

Расстояние между максимумом спектра поглощения и максимумом спектра люминесценции называют стоксовым смещением. Люминесцирующие вещества характеризуются стоксовым смещением. Чем оно больше, тем более надежно определение вещества люминесцентным методом.

Левшиным было установлено зеркальное подобие спектров поглощения и люминесценции для ряда веществ (*правило Левшина*). Соблюдение правила зеркальной симметрии позволяет построить спектр флуоресценции или поглощения, имея только один из них.

Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации. В люминесцентном химическом анализе о концентрации исследуемого вещества в растворе (C) судят по интенсивности люминесценции или флуоресценции (I_l), которая пропорциональна числу излучаемых квантов (N_l):

$$I_l = kN_l = kB_k N_n,$$

где k — коэффициент пропорциональности.

Число поглощенных квантов света (N_n) пропорционально интенсивности поглощенного света:

$$N_n = k^l(I_o - I),$$

где k^l – коэффициент пропорциональности;

I_o – интенсивность падающего света;

I – интенсивность света, прошедшего через раствор.

По закону Бугера – Ламберта – Бера

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

следовательно,

$$N_n = k^l(I_o - I_o \cdot 10^{-\varepsilon l C}) = k^l I_o (1 - 10^{-\varepsilon l C}),$$

а

$$I_l = k B_k k^l I_o (1 - 10^{-\varepsilon l C}).$$

Если произведение $\varepsilon l C$ невелико ($< 0,01$), то, проведя необходимые математические преобразования и вынеся постоянные величины в коэффициент пропорциональности (K), можно получить линейную зависимость между интенсивностью люминесценции и концентрацией

$$I_l = K C.$$

Таким образом, при малых концентрациях наблюдается прямолинейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации. В этой связи верхний предел определяемой концентрации вещества в растворе обычно не превышает $10^{-3} - 10^{-4}$ моль/л.

Люминесцентный метод анализа – один из самых чувствительных методов. Важнейшей особенностью данного метода является его применимость к определению микропримесей (следовых количеств элементов). Погрешность метода составляет 5 – 7 %.

В отличие от фотометрического анализа, где измеряют разность двух сигналов I_o и I , в люминесцентном методе измеряют сам сигнал, и предел обнаружения зависит от интенсивности источника и чувствительности детектора.

Факторы, влияющие на интенсивность люминесценции. На люминесценцию влияет ряд факторов. Процессы, которые ведут к снижению выхода люминесценции, называют *тушением люминесценции*.

Температурное тушение. С повышением температуры обычно наблюдается ослабление свечения. Это объясняется тем, что при повышении температуры увеличивается колебательная энергия молекул и возрастает вероятность безызлучательных переходов, а также вероятность диссоциации возбужденных частиц, происходящая без излучения квантов света.

Концентрационное тушение. При достижении определенной концентрации вещества наступает постепенное и полное тушение люминесценции. Для большинства люминесцирующих веществ концентрационное тушение происходит в области концентраций $10^{-3} - 10^{-4}$ моль/л. Причинами концентрационного тушения могут быть изменение степени диссоциации, образование ассоциатов молекул вещества, не обладающих способно-

стью к люминесценции. Явление концентрационного тушения обратимо: при разбавлении концентрированных растворов свечение восстанавливается.

Тушение примесями. Отрицательное влияние на выход люминесценции оказывают некоторые вещества, присутствующие в растворе. Их называют тушителями (гасителями) люминесценции. Тушителями люминесценции являются, например, примеси кислорода, ионов переходных элементов (Fe^{3+} , Cu^{2+} и др.), тяжелых атомов (Г, Вг⁻). Соответствующие примеси поглощают часть падающей лучистой энергии (или выделяемой энергии люминесценции), вследствие чего и снижается выход люминесценции определяемого вещества.

Аппаратура для люминесцентного анализа. Для измерения флуоресценции используют *спектрофлуориметры* и *флуориметры*.

Для возбуждения фотолюминесценции применяют ртутные, ксеноновые, вольфрамгалогенидные лампы, дающие излучение в УФ- и видимой областях спектра.

Для выделения полосы излучения, возбуждающего вещество, и для выделения нужной длины волны из спектра люминесценции используют монохроматоры (в спектрофлуориметрах) и светофильтры (в флуориметрах).

Применение люминесцентного анализа. Люминесцентным методом можно определять микропримеси в количествах до $10^{-6} - 10^{-10} \%$.

Люминесцентный метод анализа применим для анализа особо чистых веществ. В неорганическом анализе его, в частности, используют для определения редкоземельных элементов, а также малых количеств примесей в полупроводниковых материалах.

Люминесценцию широко применяют для определения органических веществ: витаминов, лекарств, наркотиков, канцерогенных соединений и др.

По характеру задач рассматривают несколько видов люминесцентного анализа: сортовой люминесцентный анализ, люминесцентная микроскопия, люминесцентный химический анализ (качественный и количественный).

Сортовой люминесцентный анализ. Сортовой люминесцентный анализ часто используют в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. В частности, жизнеспособные семена под действием ультрафиолетовых лучей дают желтое свечение, а нежизнеспособные – коричневое. По цвету люминесценции можно установить сорт муки: чем больше в ней отрубей, тем интенсивнее свечение. С помощью люминесценции можно обнаружить начальную стадию загнивания овощей и фруктов. Например, подмороженные клубни картофеля дают слабое белесовато-голубоватое свечение.

Сортовой анализ применяют при сортировке ископаемых пород, раз-

личных видов топлива, для выявления подделок документов, в целях медицинской экспертизы, для диагностики заболеваний рака, малярии и других болезней, контроля качества лекарственных препаратов.

Люминесцентная микроскопия. Этот вид люминесцентного анализа используют для выявления дефектов на поверхности металлических и других изделий. Флуоресцирующее вещество (масло) наносят на исследуемую поверхность. После того, как масло снимают с поверхности, флуоресцирующая жидкость удерживается лишь на микротрещинах. Места дефектов выявляются на темном фоне по их яркой флуоресценции.

Этот же метод используется в бумажной промышленности для установления качества целлюлозы. В алмазодобывающей промышленности по характерному свечению отбирают алмазы. В палеонтологии с помощью люминесцентной микроскопии изучают отпечатки древних животных и растений на осадочных породах.

Качественный люминесцентный анализ. Качественный анализ основан на способности различных веществ люминесцировать при определенных условиях или, реже, гасить люминесценцию.

В качественном анализе снимают и расшифровывают спектр люминесценции. По расположению максимумов люминесценции делают заключение о присутствии того или иного люминофора.

Во многих случаях возникновение или исчезновение люминесценции наблюдается визуально. Например, некоторые алкалоиды флуоресцируют характерным светом: кокаин – светло-синим, кодеин – слабо-желтым, наркотин – темно-фиолетовым, что используется для идентификации наркотиков.

Очень чувствительные люминесцентные качественные реакции дают растворы некоторых неорганических веществ при добавлении к ним органических реагентов. Например, интенсивную люминесценцию вызывает добавление салициловой кислоты к раствору соли цинка, что может быть использовано для его качественного открытия. Для обнаружения лития и алюминия люминесцентным методом предложен 8-оксихинолин, для открытия бериллия, циркония и других элементов используют морин и т. д. Низким пределом обнаружения и селективностью обладают реакции получения особых люминесцирующих веществ – кристаллофосфоров. Кристаллофосфоры – кристаллические неорганические вещества (например, ZnS, CdS), кристаллические решетки которых искажены введением небольших количеств ионов металлов-активаторов (серебра, меди, марганца, лантаноидов). Под действием активаторов кристаллофосфоры приобретают способность люминесцировать.

Количественный люминесцентный анализ. Основан на зависимости интенсивности люминесценции от концентрации люминофора. В практике количественного люминесцентного анализа обычно применяют метод градуировочного графика и метод добавок.

Для высокочувствительного люминесцентного анализа используются реактивы с квалификацией «особой чистоты». Особое внимание обращается на качество применяемой воды: ее очищают дважды дистилляцией в кварцевой аппаратуре.

Пример использования флуоресценции в количественном анализе. Определение содержания витамина В₂. Сущность метода заключается в высвобождении связанных форм витамина В₂ (рибофлавина) ферментативным и кислотным гидролизом образца, очистке гидролизата и измерении интенсивности флуоресценции рибофлавина до и после восстановления гидросульфитом натрия в сравнении со стандартом на флуориметре типа ЭФ–3МА, обеспечивающим длины волн возбуждения в области 350–480 нм и флуоресценции – 475–650 нм. Метод предназначен для анализа содержания витамина В₂ в пищевых продуктах.

Приготовление стандартных растворов. Навеску 0,02 г рибофлавина переносят в колбу вместимостью 1 л, добавляют 750 мл воды и 1 мл ледяной уксусной кислоты, смесь подогревают для полного растворения, охлаждают раствор до комнатной температуры и доводят объем раствора водой до метки, получая основной стандартный раствор с концентрацией витамина 20 мкг/мл. Раствор помещают в склянку из темного стекла. Срок хранения основного стандартного раствора при 4 °С – 1 мес.

Для приготовления рабочего стандартного раствора 5 мл основного стандартного раствора рибофлавина переносят в колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем раствора водой до метки, получая основной рабочий стандартный раствор с концентрацией витамина 1 мкг/мл. Раствор готовят в день проведения анализа.

Гидролиз. Навеску измельченного продукта в количестве 20 г (предполагаемое содержание В₂ составляет 0,2 мг в 100 г продукта) помещают в колбу вместимостью 250 см³, приливают 150 мл 0,1 М раствора HCl. Массу навески выбирают такой, чтобы в гидролизате концентрация витамина составляла 0,04–0,2 мкг/мл. Смесь кипятят в течение 40 мин на водяной бане с обратным холодильником, охлаждают до комнатной температуры и устанавливают рН гидролизата потенциометрическим методом до величины 4,5 прибавлением насыщенного водного раствора ацетата натрия. К нейтрализованному гидролизату добавляют 0,1 г фермента амилоризина и выдерживают в течение 15 ч при температуре 37 °С, гидролизат охлаждают, доводят его объем до 250 мл и фильтруют через бумагу.

Одновременно проводят обработку холостой пробы, взяв вместо 20 г навески образца 20 мл воды.

Ход определения. В четыре флуориметрические пробирки с притертыми пробками отмеривают по 10 мл фильтрата анализируемой пробы. В две пробирки с фильтратом добавляют по 1 мл воды, в две другие добавляют по 1 мл рабочего стандартного раствора рибофлавина, в пятую пробирку приливают 10 мл фильтрата контрольной пробы и 1 мл дистиллиро-

ванной воды. Во все пробирки добавляют по 1 мл ледяной уксусной кислоты и перемешивают их содержимое. Вносят в пробирки по 0,5 мл водного раствора KMnO_4 с концентрацией 0,03 г/мл и выдерживают в течение двух мин. В каждую пробирку прибавляют по 0,5 мл 0,03 г/мл раствора пероксида водорода и энергично встряхивают для удаления избытка кислорода.

Интенсивность флуоресценции рибофлавина измеряют при длине волны возбуждения 350–480 нм и флуоресценции 475–650 нм, начиная с проб стандартного раствора витамина. После этого в каждую пробирку вносят по 25 мг натрия гидросульфита, перемешивают и вновь проводят измерение. Эту операцию повторяют до установления наименьшей интенсивности флуоресценции. Содержание витамина B_2 (X , мг/100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = [(A - A^1) - (C - C^1)] \cdot c_{\text{ст}} \cdot V_1 / [(B - B^1) - (A - A^1)] \cdot V_2 \cdot g \cdot 10,$$

где A – среднее показание флуориметра для испытуемой пробы без добавления стандартного раствора рибофлавина, условных единиц (делений) прибора;

A^1 – показание флуориметра после восстановления рибофлавина гидросульфитом натрия;

B – среднее показание флуориметра для испытуемой пробы с добавлением стандартного раствора рибофлавина;

B^1 – среднее показание флуориметра для испытуемой пробы с добавлением стандартного раствора рибофлавина после восстановления рибофлавина гидросульфитом натрия;

C – показание флуориметра для контрольного опыта на реактивы;

C^1 – показание флуориметра для контрольного опыта на реактивы после восстановления рибофлавина гидросульфитом натрия;

$c_{\text{ст}}$ – количество витамина во взятом для окисления объеме стандартного раствора, мкг;

V_1 – общий объем испытуемого раствора гидролизата, мл;

V_2 – объем испытуемого раствора, взятого для окисления, мл;

g – навеска образца, взятого для анализа, г;

10 – пересчет из мкг/г в мг/100 г продукта.

Минимальный уровень флуориметрического обнаружения рибофлавина составляет 0,02 мкг в флуориметрируемом объеме, что соответствует 0,02 мкг/мл при степени извлечения витамина из пробы > 75–85 %.

1.6. Рентгенофлуоресцентный метод анализа

Быстролетающие частицы, например электроны, могут вызывать возбуждение или ионизацию атомов не только в газообразном состоянии. При столкновении электронов с какой-либо твердой поверхностью может также произойти возбуждение или ионизация атомов. Если энергия летящего электрона достаточна, происходит выбивание электрона из внутренних К- или L-оболочек атомов вещества, подвергающегося бомбардировке. На освободившееся место в К- или L-оболочке переходит электрон с более высокого энергетического уровня, что сопровождается характеристическим рентгеновским излучением.

Характеристическое рентгеновское излучение наблюдается не только при бомбардировке электронами, оно возникает также при облучении поверхности электромагнитным излучением большой энергии (рентгеновским излучением), достаточной для выбивания внутренних электронов из атомов. Характеристический спектр, полученный таким способом, называется *флуоресцентным* или *вторичным*.

Практически ввиду более легкого осуществления чаще используют второй способ возбуждения. На этом основан метод, известный под названием *рентгенофлуоресцентная спектроскопия*.

Метод основан на зависимости интенсивности рентгеновской флуоресценции от концентрации элемента в образце. При облучении образца мощным потоком излучения рентгеновской трубки возникает характеристическое флуоресцентное излучение атомов, которое пропорционально их концентрации в образце. Излучение разлагается в спектр при помощи кристалл-анализаторов, далее с помощью детекторов и счетной электроники измеряется его интенсивность. Математическая обработка спектра позволяет проводить количественный и качественный анализ.

Рентгеновская флуоресценция. Когда атомы образца облучаются фотонами с высокой энергией – возбуждающим первичным излучением рентгеновской трубки, это вызывает испускание электронов. Электроны покидают атом. Как следствие, в одной или более электронных орбиталях образуются «дырки» – вакансии, благодаря чему атомы переходят в возбужденное состояние, т.е. становятся нестабильными. Через миллионные доли секунды атомы возвращаются к стабильному состоянию, когда вакансии во внутренних орбиталях заполняются электронами из внешних орбиталей. Такой переход сопровождается испусканием энергии в виде вторичного фотона – этот феномен и называется «флуоресценция». Энергия вторичного фотона находится в диапазоне энергий рентгеновского излучения, которое располагается в спектре электромагнитных колебаний между ультрафиолетовым и гамма-излучением (рис. 1.12).

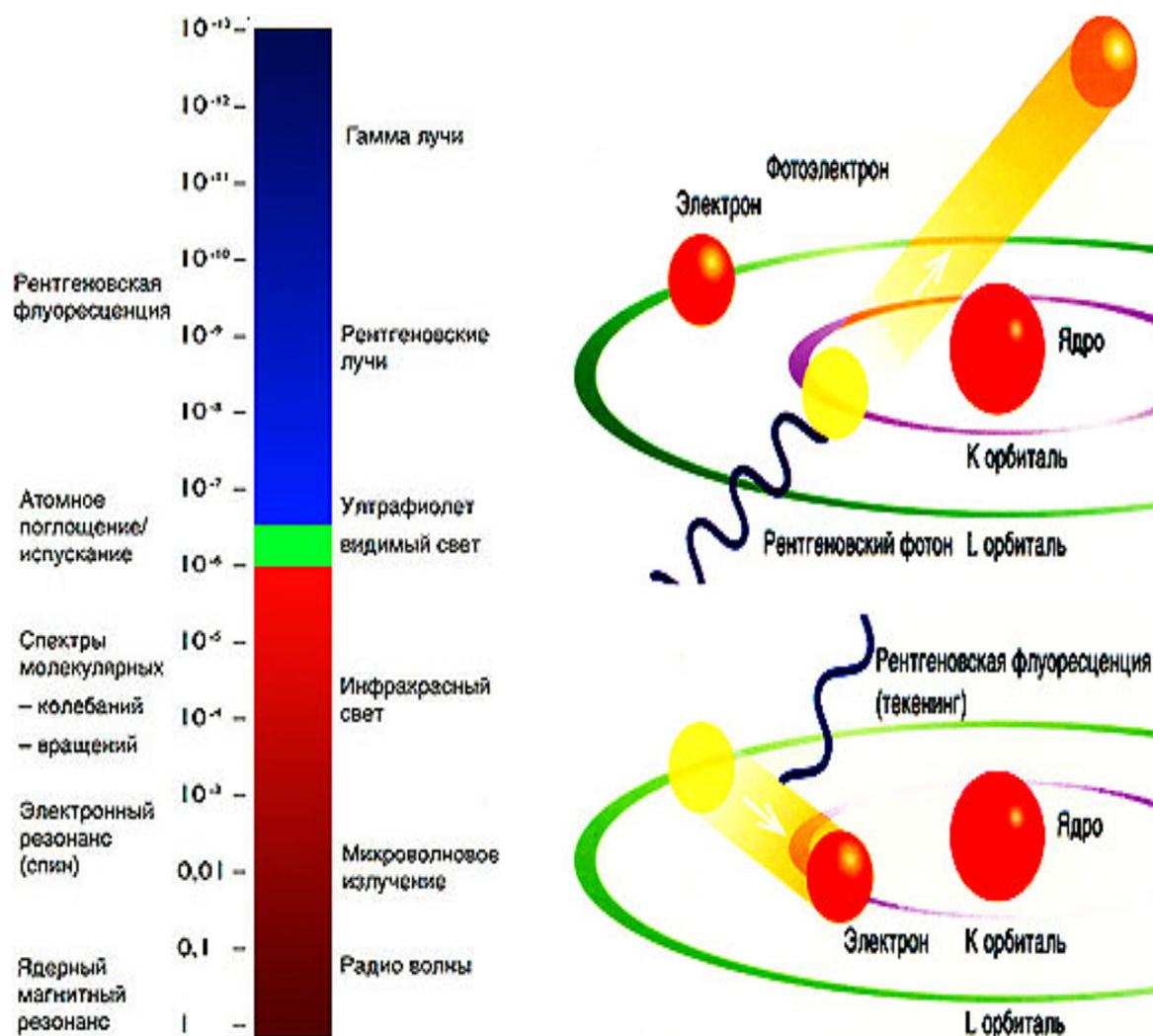


Рис. 1.12. Шкала электромагнитных колебаний и образование эффекта флуоресценции

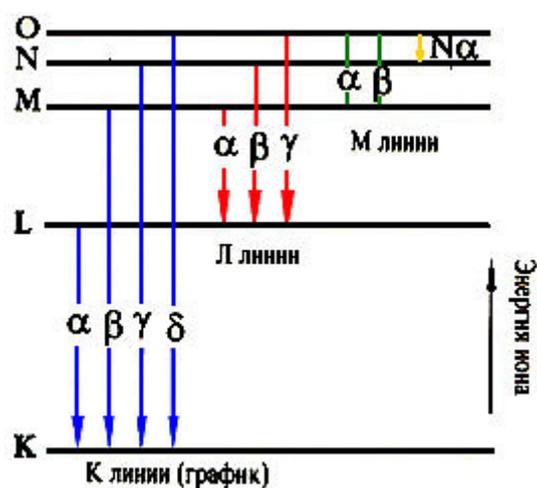


Рис. 1.13. Электронные уровни атома (К, L, M, N, O...) и образование линий в спектрах ($\alpha_1, \beta_1, \gamma_1, \delta_1, \alpha_2, \beta_2, \gamma_2, \dots$ и т.д.). Указана наиболее яркая линия спектра Na

Различные электронные орбитали обозначаются К, L, М и т.д., где К – орбиталь, ближайшая к ядру. Каждой орбитали электрона в атоме элемента соответствует собственный энергетический уровень. Энергия испускаемого вторичного фотона определяется разницей между энергией начальной и конечной орбиталей, между которыми произошел переход электрона (рис. 1.13).

Длина волны испускаемого фотона связана с энергией формулой $E = E_1 - E_2 = hc/\lambda$, где E_1 и E_2 – энергии орбиталей, между которыми произошел переход электрона, h – постоянная Планка, c – скорость света, λ – длина волны испускаемого (вторичного) фотона. Таким образом, длина волны флуоресценции является индивидуальной характеристикой каждого элемента и называется характеристической флуоресценцией. В то же время интенсивность (число фотонов, поступающих за единицу времени) пропорциональна концентрации (количеству атомов) соответствующего элемента. Это дает возможность элементного анализа вещества: определение количества атомов каждого элемента, входящего в состав образца.

Рентгеновская трубка. Источником возбуждающего (первичного) излучения высокой энергии является рентгеновская трубка, питаемая высокостабильным генератором высокого напряжения. Механизм возникновения первичного излучения похож на механизм флуоресценции, за исключением того, что возбуждение материала анода трубки происходит при его бомбардировке электронами высоких энергий, а не рентгеновским излучением, как при флуоресценции. Спектральный состав излучения трубки зависит от выбора материала анода. Для большинства областей применения оптимальным является родиевый анод, хотя другие материалы, например молибден, хром или золото, могут быть предпочтительнее в определенных случаях (рис. 1.14).

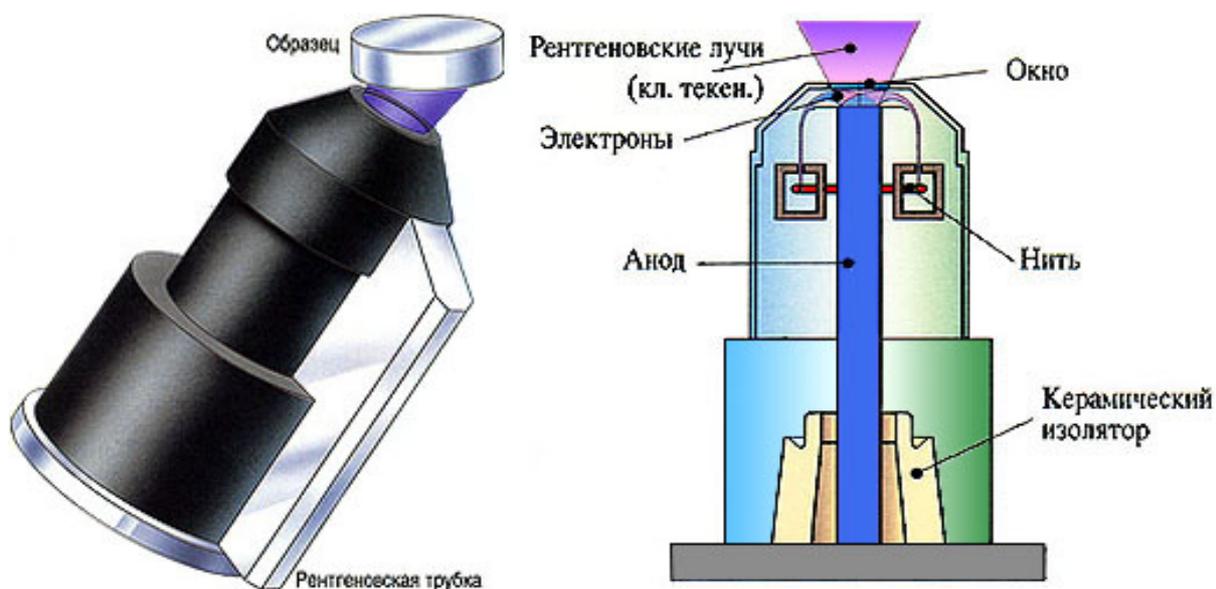


Рис. 1.14. Рентгеновская трубка в рентгенофлуоресцентном спектрометре

При проведении анализа все элементы, присутствующие в образце, одновременно излучают фотоны характеристической флуоресценции. Для изучения концентрации какого-либо элемента в образце необходимо из общего потока излучения, поступающего от пробы, выделить излучение такой длины волны, которая является характеристической для исследуемого элемента. Это достигается разложением суммарного потока излучения, поступающего от пробы, по длинам волн и получением спектра. Спектром называется кривая, описывающая зависимость интенсивности излучения от длины волны.

Разложение излучения в спектр. Для разложения излучения в спектр (выделения различных длин волн) используются кристалл-анализаторы с кристаллическими плоскостями, параллельными поверхностями и имеющими межплоскостное расстояние d (рис. 1.15).

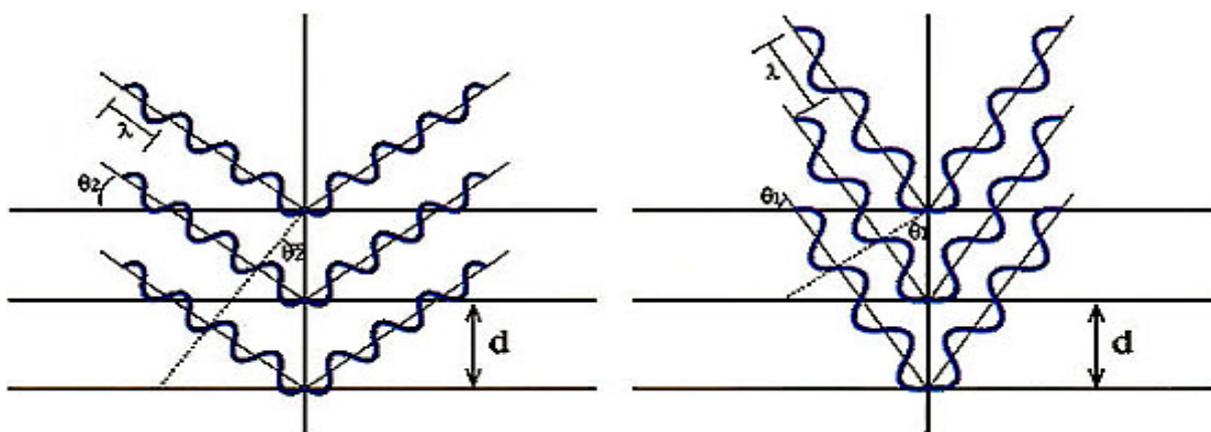


Рис. 1.15. Принцип разложения излучения в спектр на кристалл-анализаторе

Если излучение с длиной волны λ падает на кристалл под углом θ , дифракция возникнет, если только расстояния, проходимые фотонами при отражении от соседних кристаллических плоскостей, отличаются на целое число (n) длин волн. С изменением угла θ при вращении кристалла по отношению к потоку излучения, дифракция будет возникать последовательно для различных длин волн в соответствии с законом Брэгга: $n \lambda = 2d \sin \theta$. Угловое положение (θ) кристалла-анализатора задается компьютером в зависимости от длины волны, которую нужно выделить из спектра для анализа требуемого элемента. Выделенное излучение поступает в детектор рентгеновского излучения для измерения интенсивности. Интенсивностью называется число фотонов, поступающее за единицу времени. Так как разделение пиков рентгеновской флуоресценции зависит от соотношения длины волны и межплоскостного расстояния (d), для увеличения селективности и чувствительности аппаратуры, измерение спектра исследуемой пробы в широком диапазоне энергий производят с помощью нескольких кристалл-анализаторов из различных материалов. Монокри-

сталлы, такие как германий, фторид лития, антимонид индия являются идеальными анализаторами для излучения многих элементов. В последнее время, многослойные синтетические покрытия используются для увеличения чувствительности при анализе легких элементов.

Детектирование излучения. Детектирование флуоресцентного излучения основано на преобразовании энергии флуоресценции в импульсы напряжения определенной амплитуды. Существуют разные типы детекторов. Для относительно больших длин волн при анализе легких элементов используются наполненные газом пропорциональные детекторы. Их действие основано на ионизации газа излучением и измерении числа электрических импульсов, прошедших через ионизированный газ. Для коротких длин волн (тяжелые элементы) применяются сцинтилляционные детекторы, в которых измеряется ток фотоэлемента, чувствительного к светимости специального вещества – сцинтиллятора (NaI/Tl) при попадании на него рентгеновского излучения. Чем больше атомов определенного типа в образце, тем больше импульсов регистрируется детектором. Счетная электроника фиксирует число импульсов, поступающих от детекторов, и энергетические уровни, соответствующие амплитудам. Современное качество анализирующей техники (усилители и анализаторы импульсов) позволяет во многих случаях получить удовлетворяющую большинство пользователей статистическую погрешность измерений за время всего в 2 с. Большее время счета требуется для легких элементов, которые излучают относительно небольшое число фотонов с малыми энергиями, либо для анализа элементов с концентрациями, близкими к пределу обнаружения.

В качестве стандартных образцов возможно использование таблеток толщиной 5 мм, полученных прессованием смеси 9,5 г борной кислоты и по 0,15 г CaO, Co₂O₃, SrO и TiO₂. Элементы, входящие в состав стандарта, имеют следующие характеристические полосы (мÅ): ²⁰Ca – K_{β1} = 3090; K_{α1} = 3359; K_{α2} = 3362; ²⁷Co – K_{β1} = 1621; K_{α1} = 1789; K_{α2} = 1793; ³⁸Sr – K_{β2} = 771; K_{β1} = 783; K_{α1} = 875; K_{α2} = 879; ⁴⁸Ti – K_{β1} = 2514; K_{α1} = 2749; K_{α2} = 2753. Эти характеристические полосы можно использовать для настройки спектрометра. Соответственно все остальные металлы также имеют характеристические полосы, наиболее сильные из которых выбираются для количественной обработки результатов. На рис. 1.16. приведен типичный пример получения результата на рентгенофлуоресцентном спектрометре. Площадь (высота) максимального пика первого порядка, так же как и площадь пика второго порядка пропорциональна содержанию измеряемого элемента.

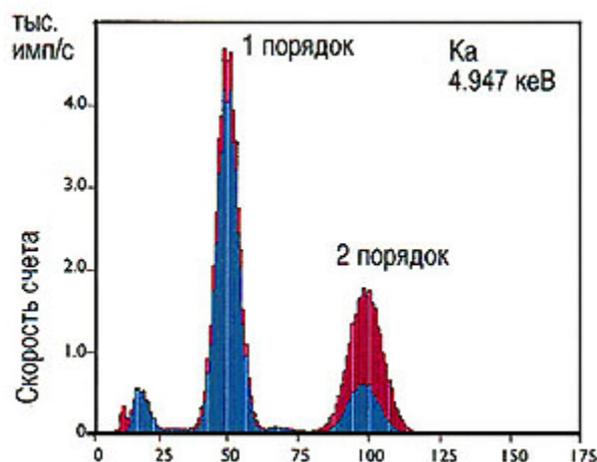


Рис. 1.16. Типичная картинка результата измерения на рентгенофлуоресцентном детекторе

Анализ и обработка результатов измерений проводится в автоматическом режиме. Для этого разработаны методики анализа многих элементов для различных типов веществ. Методики реализованы в виде компьютерных программ. Во время измерения компьютер управляет всеми узлами спектрометра в соответствии с заданной программой анализа. Современный уровень надежности оборудования и устройство автоматической подачи образцов позволяют выполнять анализ непрерывно круглосуточно без участия оператора. По окончании измерений компьютер выполняет расчет концентраций. Результаты анализа передаются электронными средствами связи автоматически по указанным адресам, либо накапливаются в базе данных измерений для дальнейшей обработки.

Рентгенофлуоресцентные приборы. Существует два типа рентгенофлуоресцентных спектрометров, в которых выделение характеристического излучения происходит с помощью кристаллов-анализаторов. Такие спектрометры называются «спектрометры волновой дисперсии – (WDS)». Среди них различают спектрометры последовательного действия и квантометры.

Спектрометры последовательного действия («со сканирующим каналом»). На таких спектрометрах осуществляется последовательное выделение каждой характеристической линии рентгеновского излучения любого числа элементов с помощью движущегося кристалла-анализатора и высокоточного гониометра (прибора для измерения углов), сопряженного с устройством вращения, управляемого компьютером. Преимущества приборов последовательного действия: универсальность – определение любого числа элементов; оптимальные условия измерения программируются для каждого элемента; очень высокая чувствительность, низкие уровни детектирования.

Квантометры (спектрометры «с фиксированными каналами»). С

помощью квантометров осуществляются параллельные измерения. Интенсивности характеристического излучения элементов измеряются одновременно благодаря использованию нескольких настроенных фиксированных «каналов», расположенных вокруг образца. Фактически каждый из них является отдельным спектрометром с кристалл-анализатором и детектором, настроенными на прием определенной длины волны одного элемента.

1.7. Преломление света. Рефрактометрия

Рефрактометрия (от лат. *refractus* – преломленный и ...метрия), метод исследования веществ, основанный на определении показателя преломления n . Применяется для идентификации химических соединений и количественного определения физико-химических параметров веществ. Показатель преломления n – отношение скоростей света в двух граничащих средах. Абсолютный показатель преломления $N = v_{\text{вак}}/v_{\text{ср}}$, где $v_{\text{вак}}$ – скорость света в вакууме, $v_{\text{ср}}$ – скорость света в данной среде. Обычно используют относительный показатель преломления $n = v_1/v_2$. Для жидкостей и твердых тел n определяют, как правило, относительно воздуха, для газов – относительно вакуума.

Значения n зависят от длины волны λ света и температуры, которые указывают соответственно в подстрочном и надстрочном индексах, например n_{D}^{20} – показатель преломления при 20 °С для D-линии спектра Na ($\lambda = 589$ нм). Часто используют также линии C и F спектра водорода (λ соответственно 656 и 486 нм). В случае газов необходимо учитывать зависимость n от давления, которое необходимо указывать или приводить данные к нормальному давлению, т.е. $n = f(T, P, \text{концентрации } c, \text{ природы вещества})$. Обычно измеряемые значения n находятся в пределах 1,3 – 1,7. Для чистой воды $n_{\text{D}}^{20} = 1,333$.

Зная величину показателя преломления n и его дисперсию (зависимость от длины волны света) D , можно определить другие величины, зависящие от n и D , например концентрацию.

Рефрактометрические методы разделяются на методы прямого измерения углов преломления света при прохождении им границы раздела двух сред; методы, в которых используется явление полного внутреннего отражения света; интерференционные методы; фотометрические методы, в которых используется зависимость коэффициента пропускания света на границе двух сред от соотношения их показателей преломления; прочие методы. Наиболее распространены первые две из этих групп.

Для измерения методами 1-й группы образцу придают форму призмы и определяют показатель преломления, добиваясь поворотом призмы того, чтобы угол отклонения луча был минимален (рис. 1.17, а). При другом способе измерения n исследуемый образец помещают в специально из-

готовленную призму с известным показателем преломления N (рис. 1.17, б). Для измерения показателя преломления жидкостей призматические образцы выполняются полыми и заливаются исследуемой жидкостью. Точность определения n этими методами – 10^{-5} , а разности показателей преломления двух веществ $\sim 10^{-7}$.

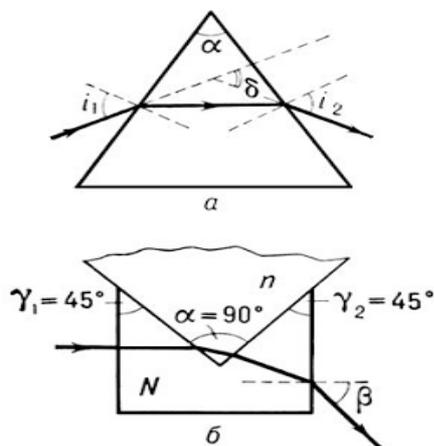


Рис. 1.17. Определение показателя преломления n по отклонению луча в призматических образцах: a – ход луча через призму с преломляющим углом α , угол отклонения δ имеет наименьшую величину при равенстве углов входа луча в призму и выхода из неё: $i_1 = i_2$ (симметричный ход луча через призму), $n = \sin \frac{1}{2}(\alpha + \beta) / \sin (\frac{1}{2} \alpha)$; b – ход луча через призму с измеряемым n , помещенную в прямоугольную выемку призмы с известным показателем преломления N ; показан вариант с преломляющим углом призмы $\alpha = 90^\circ$ и углами $\gamma_1 = \gamma_2 = 45^\circ$, n связан с измеряемым углом β выхода луча выражением:

$$n = \sqrt{N^2 + \sin^2 \beta} / \sqrt{N^2 - \sin^2 \beta}$$

Чаще всего жидкий образец с измеряемым показателем преломления наносят на эталонную призму из материала с высоким и заранее точно измеренным показателем преломления N (рис. 1.18). Свет может направляться как со стороны образца, так и со стороны призмы. В обоих случаях в определенном (очень узком) интервале углов падения пучка лучей на границу раздела образца и призмы в поле зрения наблюдательной зрительной трубы появится чёткая граница, разделяющая тёмный и светлый участки поля. Один из участков (тёмный при освещении со стороны образца, светлый при освещении со стороны призмы) соответствует лучам, претерпевающим полное внутреннее отражение, а граница этого участка – предельному углу падения луча. Точность метода $\sim 10^{-5}$.

Обычно n жидких и твердых тел определяют с точностью до 0,0001 на рефрактометрах, в которых измеряют предельные углы полного внутреннего отражения, при этом нет необходимости придавать образцу строго определенную геометрическую форму. Наиболее распространены рефрактометры с призматическими блоками и компенсаторами дисперсии типа Аббе, позволяющие определять n_D в «белом» свете по шкале или цифровому индикатору.

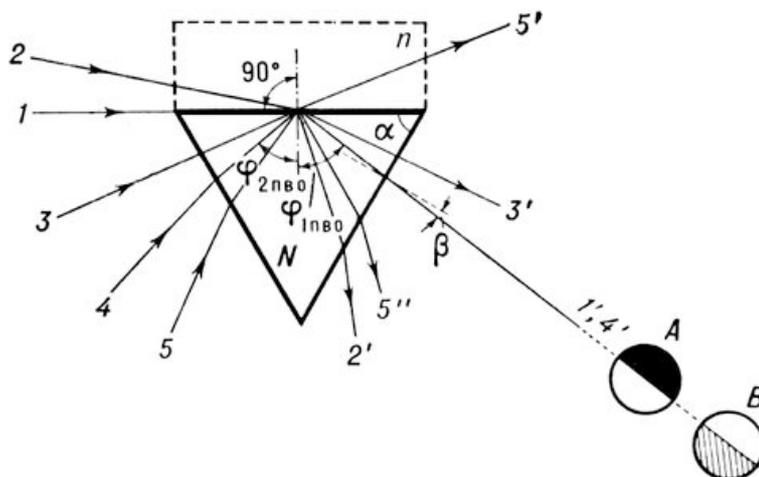


Рис. 1.18. Измерение показателя преломления n с использованием явления полного внутреннего отражения (ПВО): 1—1', 2—2' – ход лучей при освещении со стороны исследуемого образца (для упрощения рисунка отражённая часть луча 2 не показана); 1—1' – предельный луч, соответствующий углу $\varphi_{1\text{ПВО}}$ в материале нижней призмы; 3—3'; 4—4'; 5—5' – ход лучей при освещении снизу, со стороны призмы с известным показателем преломления N ; 4—4' – предельный луч, при падении которого под углом $\varphi_{2\text{ПВО}}$ на границу раздела призмы и образца происходит полное внутреннее отражение. А и В – схематические изображения поля зрения наблюдательной трубки при прохождении через неё предельных лучей 1' и 4'; n связан с измеряемым углом β между направлением предельного луча и нормалью к грани призмы формулой

$$n = \sin \alpha \sqrt{N^2 - \sin^2 \beta} \pm \cos \alpha \sin \beta$$

Автоматические рефрактометры для непрерывной регистрации n в потоках жидкостей используют при контроле технологических процессов и автоматического управления ими, а также в лабораториях для контроля, например, ректификации и как универсальные детекторы жидкостных хроматографов.

Для рефрактометрического анализа растворов в широких диапазонах концентраций пользуются таблицами или эмпирическими формулами, важнейшие из которых (для растворов сахарозы, этанола и др.) утверждаются международными соглашениями и лежат в основе построения шкал специализированных рефрактометров для анализа промышленной и сельскохозяйственной продукции. Разработаны способы анализа трехкомпонентных растворов (рис. 1.19), в том числе основанные на одновременном определении их n и плотности или вязкости (рис. 1.20), либо на проведении химических превращений с измерением n исходных и конечных растворов; эти способы применяют при контроле нефтепродуктов, фармацевтических препаратов, идентификации органических соединений, минералов, лекарственных веществ.

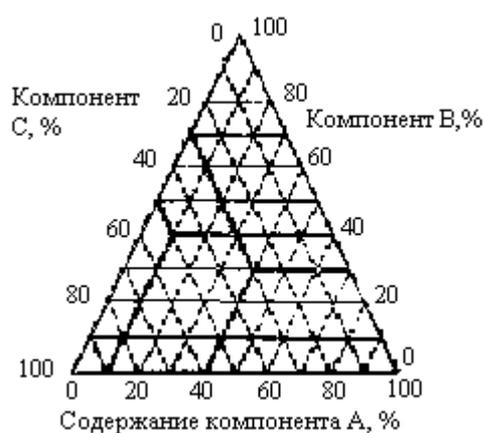


Рис. 1.19. Графическое изображение состава тройной смеси

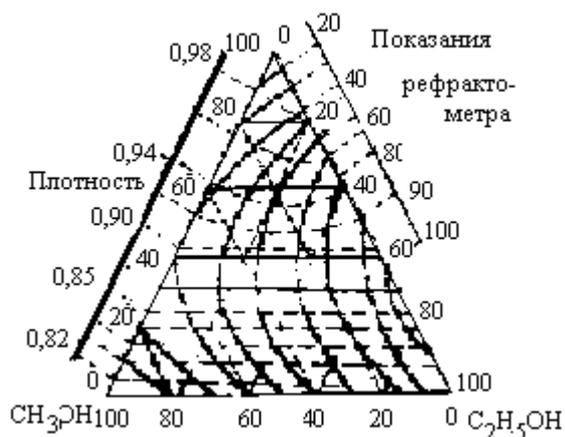


Рис. 1.20. Треугольная номограмма рефрактометрического анализа тройной системы этанол - метанол - вода

Рефрактометр Аббе – визуальный оптический прибор для измерения показателя преломления жидких и твёрдых сред. Его действие основано на измерении угла полного внутреннего отражения в случае непрозрачной исследуемой среды или предельного угла преломления на плоской границе раздела прозрачных сред (исследуемой и известной) при распространении света из среды с меньшим показателем преломления n_1 в среду с большим показателем n_2 . В обоих методах используется закон преломления света $n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2$ (i_1 – угол падения, i_2 – угол преломления). Рефрактометр Аббе состоит из двух стеклянных прямоугольных призм – измерительной призмы с высоким показателем преломления $n_2 = 1,7$ (для желтой линии натрия $\lambda = 589,3$ нм) с полированной гипотенузной гранью и вспомогательной откидной призмы с матированной гипотенузной гранью, зрительной трубы, отсчётной шкалы и специального компенсатора. В поле зрения трубы наблюдается резкая линия раздела светлого и тёмного полей, соответствующая предельному углу. Исследуемые жидкости помещаются в зазор (0,1 мм) между гранями призм. Твёрдые прозрачные образцы должны иметь одну плоскую полированную грань, а одна из боковых граней должна быть перпендикулярной к полированной. Полированной гранью образцы прижимаются к гипотенузной грани измерительной призмы (при откинутой вспомогательной призме). При измерении прозрачных жидких сред свет на границу раздела сред направляется через малый катет вспомогательной призмы (измерение в проходящем свете), а в случае непрозрачных сред освещается матовая грань измерительной призмы – ее большой катет (измерение в отражённом свете). При совмещении линии раздела светлого и тёмного полей с перекрестием нитей в поле зрения трубы по шкале непосредственно отсчитывается величина n .

Для рефрактометра ИРФ-22 пределы измерения n в проходящем све-

те 1,3–1,7, в отражённом 1,3–1,57, точность измерения $\pm 2 \cdot 10^{-4}$.

Пример использования рефрактометрии. *Сертификация водного раствора гидролизата, содержащего смесь природных аминокислот.* Определение содержания сухого остатка (с.о.) жидкого гидролизата рефрактометрическим методом можно проводить в сопоставлении с гравиметрическими данными, полученными сушкой гидролизата в вакууме при температуре 105 °С до постоянной массы сухого остатка.

На призму рефрактометра в соответствии с паспортом по эксплуатации прибора наносят одну каплю жидкого гидролизата и измеряют показатель преломления.

Примерное содержание сухих веществ в жидком гидролизате оценивают по градуировочному графику (рис. 1.21).

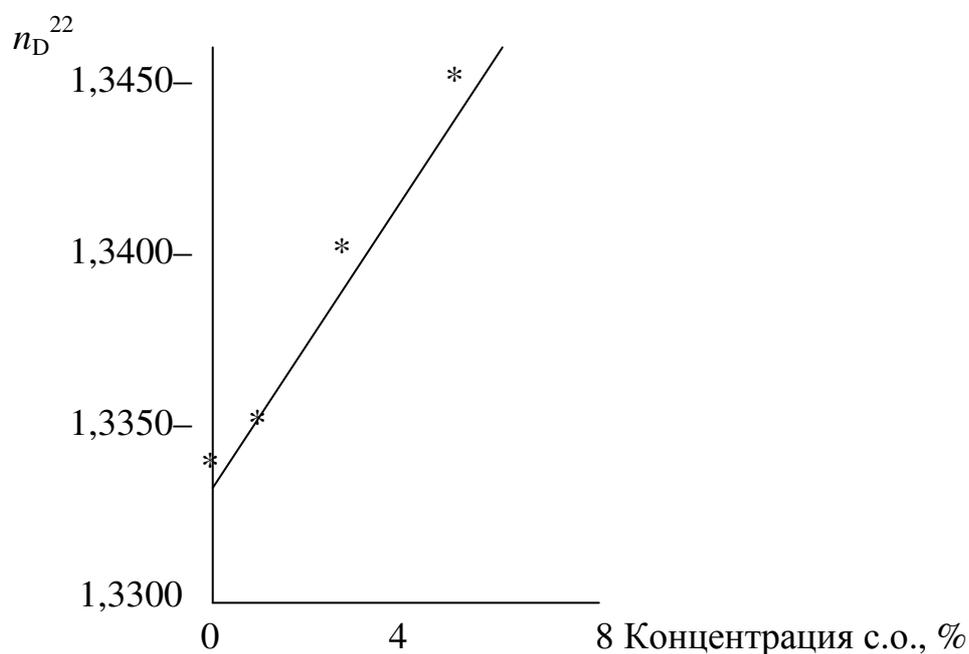


Рис. 1.21. Зависимость содержания сухого остатка в гидролизате в % от показателя преломления при температуре 22 °С

1.8. Поляриметрия

Понятие поляриметрии. *Поляриметрия* – метод физических исследований, основанный на измерении степени поляризации света и угла поворота плоскости поляризации света при прохождении его через оптически активные вещества. Угол поворота в растворах зависит от их концентрации, поэтому поляриметрия широко применяется для измерения концентрации именно оптически активных веществ.

Измерение вращательной дисперсии – изменения угла вращения при изменении длины волны света (*спектрополяриметрия*) – позволяет изучать строение веществ. Измерения производятся поляриметрами и спектрополяриметрами.

Оптическая активность чрезвычайно чувствительна к любым изменениям строения вещества и к межмолекулярному взаимодействию, поэтому она может дать ценную информацию о природе заместителей в молекулах (как органических, так и комплексных неорганических соединений), об их конформациях, внутреннем вращении и т.д.

Оптическая активность – эффект, получаемый при учёте различия фаз световой волны в разных точках молекулы. Он возникает в результате электронных взаимодействий в молекуле. Влияние межмолекулярного взаимодействия на оптическую активность изучается в теории поляризуемости, где молекула рассматривается как система, состоящая из анизотропно поляризующихся атомных групп, ионов и молекул. Оптическая активность – способность среды вызывать вращение плоскости поляризации проходящего через неё излучения (света). Впервые обнаружена в 1811 г. Д. Ф. Араго в кварце. В 1815 г. Ж. Б. Био открыл оптическую активность чистых жидкостей (скипидара), а затем растворов и паров многих, главным образом органических, веществ. Он же установил, что угол поворота плоскости поляризации α линейно зависит от толщины l слоя активного вещества (или его раствора) и концентрации C этого вещества $\alpha = [\alpha]lC$. Коэффициент $[\alpha]$ называется удельной оптической активностью. Поворот в данной среде происходит либо по часовой стрелке ($\alpha > 0$), либо против неё ($\alpha < 0$), если смотреть навстречу ходу лучей света. Соответственно оптически-активные вещества, проявляющие естественную оптическую активность, разделяют на правовращающие (положительно вращающие, (d) , $\alpha > 0$) и левовращающие (отрицательно вращающие, (l) , $\alpha < 0$). Это условное деление применимо в широких интервалах длин волн излучения. Некоторые вещества оптически активны лишь в кристаллическом состоянии (кварц, киноварь и пр.). Другие вещества активны в любом агрегатном состоянии (рис. 1.22).

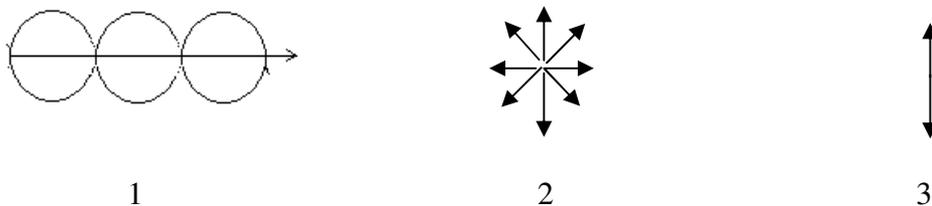


Рис. 1.22. Поляризация света: 1 – схематическое направление волнообразного распространения светового луча; 2 – условные векторы колебаний волны обычного неполяризованного луча света в направлениях, перпендикулярно лучу; 3 – колебания световой волны после поляризации (в одной плоскости) в поляризаторе

Удельная оптическая активность зависит не только от рода вещества, но и от агрегатного состояния, температуры, давления, типа растворителя и т.д. Типичные значения $[\alpha]_D^{20}$: +66,473 (раствор сахарозы в воде); +14,83 (виннокаменная кислота в воде); -5,7 (яблочная кислота в ацетоне); -37 (скипидар в воде); +43,8 (камфара в этиловом спирте). Эти значения приведены для стандартных условий: длины волны света 589,3 нм (соответствует желтой линии D в спектре натрия) и температуры 20 °С.

Оптическую активность обнаруживают различные классы веществ. Оптически активные вещества подразделяются на 2 типа. Относящиеся к первому из них оптически активны в любом агрегатном состоянии (сахара, камфара, винная кислота), ко второму – активны только в кристаллической фазе (кварц, киноварь). У веществ первого типа оптическая активность обусловлена асимметричным строением их молекул, у второго типа – специфической ориентацией молекул (ионов) в элементарных ячейках кристалла (асимметрией поля сил, связывающих частицы в кристаллической решётке). Кристаллы оптически активных веществ всегда существуют в двух формах – правой и левой. Решётка правого кристалла зеркально-симметрична решётке левого и не может быть пространственно совмещена с ней (т. н. *энантиоморфные* формы).

Физические и химические свойства чистых оптических изомеров совершенно одинаковы в отсутствии какого-либо асимметричного агента, реагирующего на зеркальную асимметрию молекул. Продукт химической реакции без участия такого агента – всегда смесь оптических изомеров в равных количествах, т. н. *рацемат*. Физические свойства рацемата и чистых оптических изомеров зачастую различны. Например, температура плавления рацемата несколько ниже, чем чистого изомера. Рацемат разделяют на чистые изомеры либо отбором энантиоморфных кристаллов, либо в химической реакции с участием асимметричного агента – чистого изомера или асимметричного катализатора, либо микробиологически. Последнее свидетельствует о наличии асимметричных агентов в биологических процессах и связано со специфическим и пока не нашедшим удовлетворительного объяснения свойством живой природы строить белки из левых оптических изомеров аминокислот: 19 из 20-ти жизненно важных аминокислот оптически активны. Применительно к оптической активности термины «левый» и «правый», L и D , условны в том смысле, что не соответствуют непосредственно направлению вращения плоскости поляризации в них, в отличие от этих же терминов l и d для веществ второго типа или терминов «левовращающий» и «правовращающий».) Физиологическое и биохимическое действие оптических изомеров часто совершенно различно. Например, белки, синтезированные искусственным путём из D -аминокислот, не усваиваются организмом; бактерии сбрасывают лишь один из изомеров, не затрагивая другой; L -никотин в несколько раз ядовитее D -никотина. Удивительный феномен преимущественной роли только

одной из форм оптических изомеров в биологических процессах может иметь фундаментальное значение для выяснения путей зарождения и эволюции жизни на Земле.

Характер дисперсии оптической активности весьма чувствителен к различным факторам, определяющим внутри- и межмолекулярные взаимодействия. Поэтому методы, основанные на измерении этого параметра, широко используются в физических, химических, биологических и других научных исследованиях, а также в промышленности для технического контроля и при сертификации продукции (например, сахариметрия).

В современных исследованиях, связанных со стереометрией молекул, широко используют физические и физико-химические методы. Так, рентгено- и электронографическими методами определяют межатомные расстояния, валентные углы и тем самым находят картину расположения атомов в молекуле. Стереохимическую информацию можно получить также из измерений дипольных моментов, из спектров ядерного магнитного резонанса и данных инфракрасной и ультрафиолетовой спектроскопии. Пространственное строение молекул может быть предсказано также расчётными квантово-химическими методами.

Возможности поляриметрии в современных стереохимических исследованиях приобрели большое практическое значение. Так, установлено, что свойства полимеров сильно зависят от их пространственного строения. Это относится как к синтетическим полимерам, например, полистиролу, полипропилену, бутадиеновому и изопреновому каучукам, так и к природным высокомолекулярным соединениям – целлюлозе, лигнину и другим полисахаридам, белкам, нуклеиновым кислотам, натуральному каучуку. Пространственное строение существенно влияет и на физиологические свойства веществ; от него, в частности, зависит активность многих лекарственных препаратов. Измерение оптической активности – важный метод количественного определения оптически-активных веществ в сахарной промышленности, в производстве лекарственных препаратов, душистых веществ.

Сахариметрия – метод определения концентрации растворов оптически активных веществ (главным образом сахаров, откуда название метода). В сахариметрии условия измерения стандартизуют, а шкалу измерительного прибора градуируют так, чтобы при измерении в этих стандартных условиях непосредственно отсчитывать концентрацию оптически-активного вещества в %. Концентрацию сахара определяют по Международной сахарной шкале, 100 градусов которой (100 °S) соответствуют вращению плоскости поляризации света водным раствором 26,000 г чистой сахарозы в 100 мл раствора, измеренному при 20 °C в трубке длиной 200 мм. 100 °S = 34,620 кругового градуса. Стандартные условия предусматривают освещение раствора сахара белым светом. В этих условиях получается, что содержание пищевого сахара можно определить по формуле:

$C, \% = \alpha / 130$, где α – измеренное значение по показаниям поляриметра. Поляриметр, предназначенный для этих измерений, называется *сахариметром*. Сахариметр – это прибор для определения содержания сахара в растворах путём измерения угла вращения плоскости поляризации света, пропорционального концентрации раствора, и противоположный по знаку Компенсатором служит не вращающийся анализатор, как в поляриметре, а линейно смещающийся кварцевый клин. Зависимости оптической активности кварца и сахара от длины волны света (их вращательные дисперсии) почти одинаковы, что позволяет, применяя кварцевый компенсатор при измерении концентрации сахара, освещать раствор белым светом. Шкалу, вдоль которой перемещается клин-компенсатор, градуируют непосредственно в процентах содержания активного вещества в растворе. Как и в поляриметрах, при компенсации происходит уравнивание яркостей двух половин поля зрения. Точность измерения концентрации в отсутствии других оптически активных веществ $\pm 0,1 \%$.

1.9. Изучение объектов при освещении видимым светом. Микроскопия

Понятие оптической микроскопии. При проведении работ в области сертификации продукции, особенно в биологии и биотехнологии, достаточно простым и распространённым методом исследований является визуальное наблюдение прозрачных и полупрозрачных препаратов в проходящем свете. Подобные наблюдения проводятся с помощью оптического микроскопа и называются *микроскопированием*. Свет используется в простейшем варианте для освещения объектов без идентификации спектральных характеристик.

Для микроскопирования объектов применяют оптический микроскоп, а в качестве препаратов для исследования могут быть использованы срезы растений, культуры микроорганизмов, водных простейших и другие микрообъекты.

Биологический оптический микроскоп типа «Биолам Р-12» предназначен для исследований прозрачных препаратов в проходящем свете. Микроскоп базируется на одном штативе, укомплектованном предметным столиком, визуальными насадками, осветительными устройствами, набором объективов и окуляров.

Оптическая схема микроскопа делится на две системы:

- осветительную, включающую в себя зеркало (или искусственный осветитель), и конденсор прямого или косого освещения;
- наблюдательную, состоящую из объектива, призмы и окуляра монокулярной насадки.

Пучок лучей света от источника падает на зеркало, которое отра-

жает свет к диафрагме, проходит через конденсор, исследуемый препарат и попадает в объектив.

Если естественного света недостаточно, то вместо зеркала используют искусственный осветитель. Объектив дает изображение препарата в плоскости диафрагмы окуляра, который служит для рассматривания увеличенного изображения объекта. Устойчивое положение микроскопа на рабочем столе обеспечивается четырьмя опорными винтами внизу основания. К основанию крепится также коробка с механизмом микрометрической системы фокусировки. При вращении диска, связанного с микрометрическим винтом, происходит перемещение тубусодержателя. Один оборот диска соответствует перемещению тубуса на 0,5 мм.

Предметный столик крепится на кронштейне, который смонтирован на коробке механизма микрометрического фокусирования. При помощи двух винтов столик можно перемещать для центрирования, что позволяет привести в поле зрения нужный участок препарата.

На поверхности столика имеются пружинные клеммы, прижимающие препарат. В нижней части тубуса на головке укреплен револьвер, в котором имеется четыре отверстия с резьбой для ввинчивания четырех объективов: 8×0,2; 20×0,40; 40×0,75; 90×1,25. В верхней части тубуса имеется отверстие для одного из двух окуляров: 7х и 15х. С каждым из объективов можно применять любой из окуляров. В начале наблюдений, однако, рекомендуется пользоваться самым слабым окуляром (7х).

Порядок проведения микроскопических исследований.

1. Ввернуть в револьвер объективы и вставить в трубку визуальной насадки один из двух окуляров.

2. Настроить освещение естественным или искусственным светом. При ответственных работах или фотографировании препарата следует пользоваться искусственным освещением, для чего рекомендуется применять специальные осветители.

При работе с естественным светом микроскоп надо поставить так, чтобы зеркало было обращено к окну и направляло свет в микроскоп от яркого участка неба или от светлого облака. Следует избегать положений зеркала, при которых солнечные лучи создают ослепляющее освещение. На пути лучей света не должны быть расположены посторонние предметы.

Яркое и равномерное освещение поля зрения достигается наклоном зеркала, которое должно быть повернуто к свету плоской стороной. Вогнутой стороной зеркала пользуются в редких случаях при работе со слабыми объективами.

3. Подготовить образцы препаратов клеток. Существует два способа подготовки подобных препаратов: метод раздавленной капли и метод висячей капли.

3.1. Для приготовления препарата методом раздавленной капли необходимо предметное стекло без лунки и покровное стекло. В каплю во-

ды на предметном стекле с помощью предварительно прокаленной микробиологической петли помещают исследуемую культуру. Затем каплю закрывают покровным стеклом, «раздавливая».

3.2. Для приготовления препарата методом висячей капли необходимо предметное стекло с лункой и покровное стекло. В каплю воды на предметном стекле с помощью предварительно прокаленной микробиологической петли помещают исследуемую культуру и закрывают каплю покровным стеклом так, чтобы капля «повисла».

4. После приготовления препарата можно приступить к его исследованию под микроскопом. Для этого препарат фокусируют пружинными клеммами на предметном столике, а затем рассматривают с помощью нужного объектива (в зависимости от степени увеличения). Револьвер обеспечивает центрирование любого из объективов над предметным столиком с помощью фиксатора, расположенного внутри револьвера.

5. В микроскопе имеются четыре объектива. Рекомендуются исследовать препарат в порядке возрастания увеличения.

5.1. Работа с объективом 8×0,20.

Этот объектив имеет наибольшее поле зрения, он применяется, главным образом, в качестве искателя для предварительного осмотра препарата и выбора участков для более подробного исследования.

После проверки удовлетворительности освещения и фиксирования препарата в клеммах на предметном столике установить, аккуратно вращая микрометрический винт, достаточную для наблюдения четкость изображения. Передвигая с помощью винтов предметный столик, провести наблюдения и записать в журнал наблюдения.

5.2. Работа с объективом 20×0,40.

После того, как выбран участок препарата, намеченный для изучения, необходимо возможно точнее привести его изображение в центр поля микроскопа, повернуть револьвер до щелчка и ввести в ход лучей объектив 20×0,40. При необходимости микроскоп фокусируют на резкость изображения поворотом микрометрического винта. Рассматривают препарат и записывают наблюдения. Объектив 20×0,40 дает контрастное и резкое изображение только с покровным стеклом толщиной 0,17 мм. При отклонении толщины покровного стекла от указанной на $\pm 0,02$ мм качество изображения ухудшается.

5.3. Работа с объективом 40×0,75 (объектив водной иммерсии).

При работе с данным объективом необходимо применять водную иммерсию. Для этого, при включении объектива 40×0,75 в ход лучей (после выбора участка препарата и приведения его изображения в центр поля микроскопа со слабым объективом 8×0,20) предварительно наносят на фронтальную линзу иммерсионного объектива и на препарат (на покровное стекло) по капле дистиллированной воды.

После включения объектива необходимо снова сфокусировать мик-

роскоп, затем провести наблюдения и записать результаты. Следует помнить, что данный объектив очень чувствителен к изменению толщины покровного стекла. Недопустимо соприкосновение объектива с препаратом, так как это ведет к поломке микроскопа. По окончании работы воду с объектива необходимо удалить протиранием поверхности ватой, намотанной на деревянную палочку.

5.4. Работа с объективом 90×1,25 (иммерсионный объектив).

До начала работы с объективом 90×1,25 необходимо, пользуясь объективами 20×0,40 или 40×0,75 и окуляром 7х, возможно точнее установить интересующий участок объекта в центр поля зрения микроскопа.

Перед введением в ход лучей иммерсионного объектива необходимо нанести на его фронтальную линзу и на препарат по капле специального иммерсионного масла. Работа с объективом ведется аналогично работе с объективом 40×0,75. После коррекции и фокусировки изображения проводят наблюдение объекта и записывают результаты. После завершения работы иммерсионное масло снимают с объектива с помощью ваты, слегка смоченной этиловым спиртом.

6. После завершения наблюдений все предметные и покровные стекла следует промыть и протереть от влаги и загрязнений.

Изучение препаратов живых клеток и образцов методом световой микроскопии. Препараты живых культур. Препараты живых клеток сохраняют форму, структуру, размеры и подвижность изучаемых микроорганизмов, однако простое микроскопирование не позволяет изучать более тонкое строение клетки.

1. *Метод раздавленной капли.* Метод применяется наиболее часто при исследовании морфологии и подвижности микроорганизмов.

Каплю микробной суспензии помещают на поверхность чистого обезжиренного предметного стекла. При работе с культурой, выросшей на твердой питательной среде, на предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды, затем стерильной петлей берут небольшое количество культуры и перемешивают ее в капле. Покровное стекло помещают ребром на предметное стекло и осторожно опускают его на суспензию, следя за тем, чтобы между стеклами не было пузырьков воздуха. Избыток жидкости удаляют полоской фильтровальной бумаги.

2. *Метод висячей капли.* Препараты, подготовленные методом висячей капли, используются при изучении подвижности микроорганизмов, а также для исследования особенностей размножения бактерий, когда необходимо длительное наблюдение за развивающейся культурой.

Для подготовки препарата удобно использовать специальное предметное стекло с лункой. На середину покровного стекла наносят каплю исследуемой суспензии так, чтобы она не растекалась. Покровное стекло переворачивают и помещают на предметное стекло с лункой так, чтобы капля свободно висела, не касаясь дна лунки. Края лунки предварительно сма-

зывают вазелином. В результате получается герметичная камера. Такую же камеру можно приготовить, если использовать вместо стекол с лунками кольца из стекла или полиэтилена.

При соблюдении стерильных условий (стерильные стекла, стерильная питательная среда) возможно достаточно длительное наблюдение за особенностями деления клеток и развитием культуры.

3. *Агаровая пластинка.* Агар используется для изучения морфологии микроорганизмов в тех случаях, когда необходимо наблюдать агрегации клеток в ненарушенном состоянии, например псевдоколонии дрожжей, подвижность скользящих бактерий и др.

Для приготовления агаровых пластинок чистые (стерильные) предметные стекла погружают в расплавленную агаровую питательную среду в чашке Петри. С нижней стороны стекол агар вытирают увлажненной тканью. С помощью пастеровской пипетки или петли наносят на верхнюю сторону стекла суспензию микроорганизма. Скальпелем или лезвием бритвы обрезают агар вокруг засеянной области и кладут сверху стерильное покровное стекло. Препарат инкубируют во влажной камере в течение нескольких суток и микроскопируют. Чтобы препарат дольше не высыхал можно по краям покровного стекла залить воск или прозрачный лак.

В некоторых случаях, когда микроорганизмы чувствительны к недостатку кислорода, можно не накрывать заселенную область покровным стеклом, или накрывать лишь часть нанесенного штриха на поверхности пластинки, чтобы иметь возможность сравнить морфологию клеток в аэробных и полуаэробных условиях.

4. *Отпечаток.* Метод используют для изучения естественного расположения клеток микроорганизмов, чаще всего для исследования спорных форм и мицелиальных грибов.

Вырезают кусочек агара вместе с культурой и помещают его на предметное стекло колониями вверх. Затем к агаровой пленке прикладывают чистое покровное стекло и тотчас снимают, избегая смещений в сторону. Покровное стекло (с отпечатком вниз) накладывают на каплю воды на предметном стекле и микроскопируют.

Фиксированные препараты. Тонкую морфологию бактерий удобнее изучать на фиксированных окрашенных препаратах. Такие препараты применяют для количественных определений микроорганизмов. Приготовление фиксированных препаратов включает стадии: приготовление мазка, высушивание, фиксирование и окрашивание.

Приготовление мазка.

На обезжиренное предметное стекло наносят исследуемый материал и равномерно распределяют его петлей или краем покровного стекла по площади $1 - 2 \text{ см}^2$ возможно более тонким слоем.

Высушивание.

Мазок высушивают на воздухе при комнатной температуре. В от-

дельных случаях допускается осторожное подогревание препарата в струе теплого воздуха. Работу выполняют осторожно, во избежание деформации клеток микроорганизмов.

Фиксация.

Высушенный мазок необходимо зафиксировать, то есть умертвить клетки микроорганизмов. Фиксацию применяют, поскольку мертвые клетки лучше окрашиваются и закрепляются на поверхности стекла, а также при фиксации погибают патогенные микроорганизмы.

Применяют разные способы фиксации.

1. Обработка фиксирующим раствором. Для этих целей используют формалин, метанол, этанол, специальные растворы. Фиксирующий раствор наносят на поверхность мазка пипеткой или стекло с мазком погружают в кювету с фиксирующим раствором. Продолжительность фиксации составляет 3 – 5 мин.

2. Фиксация парами. Удобный метод фиксации препаратов в парах летучих веществ, в качестве которых применяют оксид осмия (VIII), формальдегид и глутаровый альдегид. Наиболее широко распространен метод фиксации препаратов в парах OsO₄. Оксид осмия OsO₄ является достаточно токсичным веществом, поэтому работу с ним осуществляют под тягой и в защитных очках. Раствор OsO₄ наливают на дно чашки Петри. В нее помещают обрезки стеклянных палочек, на которые кладут препарат. Время фиксации составляет до 2 мин. Метод позволяет фиксировать агаровые пластинки.

3. Термическая фиксация. Наиболее простой метод, который, однако, требует осторожного проведения. Прогрев стекла с культурой осуществляют осторожно в верхней части пламени без резкого перегрева.

Окраска.

Высушенные и фиксированные мазки окрашивают различными красителями. Окраска препаратов позволяет сделать микроскопическую картинку более четкой, а также выявить более тонкие детали строения клетки и некоторые функциональные свойства (кислотоустойчивость). Различают простые и сложные способы окрашивания. При простом окрашивании используют только один краситель. Способ применяют при изучении общей морфологии микроорганизмов или их количественного определения. Сложные способы окрашивания осуществляют несколькими красителями одновременно с целью выявления тонких клеточных структур.

Для прокрашивания препаратов микроорганизмов применяют 1–2 %-ные спиртовые растворы разных красителей:

красные: сафранин, фуксин, эритрозин;

фиолетовые: кристаллический фиолетовый;

синие: метиленовый синий;

зеленые: метиленовый зеленый, малахитовый зеленый;

желтые: конго, пикриновая кислота;

черные: индулин, нигрозин.

Простую окраску осуществляют тремя способами.

1. Препарат помещают на специальную подставку над кюветой и пипеткой наносят на мазок краситель. Длительность окраски зависит от применяемого красителя. После окраски препарат промывают водой, удаляют влагу фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе.

2. На мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, на которую наносят краситель. При этом способе уменьшается расход красителя и слабее прокрашивается пространство между клетками. После окончания окраски бумагу удаляют, препарат промывают и высушивают.

3. Наиболее простой способ заключается в том, что препарат целиком опускают в кювету с красителем и выдерживают в нем необходимое время.

Сложную окраску можно проводить по методу Шефера-Фултона.

1. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют нагреванием.

2. Покрывают препарат полоской фильтровальной бумаги и наносят на нее раствор малахитового зеленого до насыщения красителем. Препарат подогревают над пламенем горелки до появления паров и держат в таком состоянии в течение 5 мин, поддерживая влажное состояние добавлением красителя по мере испарения.

3. Промывают препарат дистиллированной водой до прекращения смыва красителя.

4. Прокрашивают препарат раствором сафранина в течение 30 с.

5. Препарат промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе. Эндоспоры окрашиваются в ярко-зеленый цвет, а вегетативные клетки – в красно-коричневые тона.

Применение нескольких красителей позволяет осуществлять более тонированное прокрашивание, поскольку разные части клеток прокрашиваются красителями разной химической природы по-разному.

Количественная оценка данных микрокопирования. Для определения количества клеток в 1 мл суспензии готовят препарат из известного объема суспензии клеток (с учетом, если необходимо, разведения) и подсчитывают количество клеток микроорганизмов в поле зрения микроскопа. Зная площадь поля зрения и объем суспензии, взятой для приготовления препарата, можно сделать пересчет на исходный объем суспензии и получить значение титра клеток.

Ход работы.

1. Приготовить препарат методом раздавленной капли из дрожжевой культуры, изучить его под микроскопом и зарисовать.

2. Ознакомиться с методиками приготовления препаратов методом «висячей капли» и агаровой пластинки.

3. Приготовить окрашенный фиксированный препарат бактериальной культуры, рассмотреть под микроскопом и зарисовать.

4. Приготовить препарат для количественного учета численности микроорганизмов.

Для этого пипеткой отобрать точно 0,02 мл исследуемой суспензии, нанести ее на хорошо обезжиренное сухое предметное стекло, помещенное на миллиметровую бумагу с очерченной площадью в 4 см². К капле суспензии добавить каплю стерильного 0,1 %-ного раствора агара, быстро перемешать и распределить равномерно при помощи микробиологической петли на отмеченной площади. Мазок высушить на воздухе, фиксируя в течение 20 мин 96 %-ным этанолом, окрасить подходящим красителем. Препарат промыть водой и высушить на воздухе.

Подсчет клеток микроорганизмов проводят с помощью иммерсионного объектива 90×1,25. Передвигая препарат по диагонали, просчитывают количество клеток не менее, чем в 50-ти полях зрения.

Измерение площади поля зрения микроскопа проводят с помощью микрометра, который представляет собой металлическую пластинку с отверстием в центре, в которое вставлено стекло. На стекло нанесена линейка длиной 1 мм с ценой деления 0,01 мм. Сфокусировав изображение линейки с тем объективом, с которым выполняют работу, измеряют диаметр поля зрения (d) и рассчитывают площадь поля зрения (S).

5. Подсчитать количество клеток дрожжей в суспензии при разбавлении исходной 3 %-ной суспензии в тысячу раз. Произвести расчет числа частиц в дезинтегрированной дрожжевой суспензии.

Расчет. Площадь поля зрения равна $S = (1/4)\pi d^2$, где $\pi = 3,14$.

Расчет численности клеток (N) в 1 г (1 мл) образца проводят по формуле:

$$N = (S_c \cdot n / V \cdot S) \cdot P,$$

где N – количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата;

n – среднее количество клеток в поле зрения;

S_c – площадь предметного стекла, на которой распределяли суспензию, мм²,

S – площадь поля зрения микроскопа, мм²;

V – объем суспензии, взятой для приготовления препарата, мл;

P – разведение.

Атомный силовой микроскоп. В 1982 году два швейцарских физика Герд Бинниг и Генрих Рорер сконструировали прибор, с помощью которого можно было рассматривать отдельные атомы на поверхности. Создателям этого прибора – *сканирующего туннельного микроскопа* (сокращенно СТМ) в 1986 году была присуждена Нобелевская премия. Исследователи всего мира, занимающиеся физикой поверхности, да и вообще физикой конденсированных сред, немедленно убедились, что туннельный микроскоп – прибор совершенно замечательный. Действительно, ведь до его появления еще никому не удавалось разглядывать поверхность с такой не-

слыханной детальностью – атом за атомом. Однако у СТМ есть один недостаток: с его помощью *можно изучать только материалы, хорошо проводящие электрический ток*. Такое ограничение вытекает из самого принципа работы СТМ – для эффективного туннелирования (просачивания) электронов через зазор между поверхностью исследуемого образца и чувствительным элементом прибора (иглой) на поверхности должно быть много, как говорят физики, электронных состояний. Поэтому когда исследователи принялись изучать с помощью СТМ непроводящие вещества, они были вынуждены покрывать такие вещества металлической пленкой либо «пришивать» их к поверхности проводника, например золота (рис. 1.23).

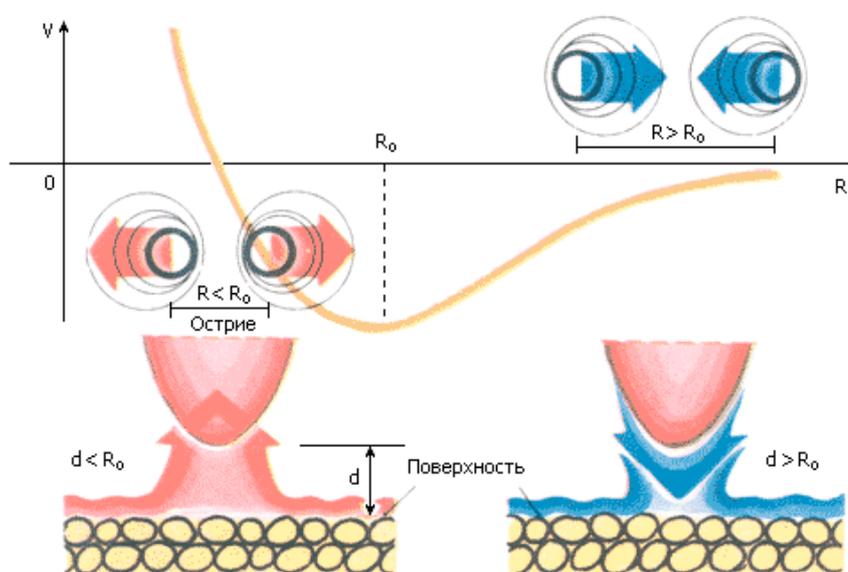


Рис. 1.23. Принцип действия атомного силового микроскопа

В конце 1986 года тот же Бинниг предложил конструкцию прибора нового поколения, который тоже позволяет исследовать поверхности с беспрецедентной детальностью, но уже вовсе не обязательно электропроводящие. Новый прибор был назван *атомным силовым микроскопом*, и сегодня именно он представляет наибольший интерес для исследователей.

На рис. 1.24 изображена схема атомного силового микроскопа. O – острие (игла), P – пружина, на которой оно закреплено; P , P_x , P_y , P_z – пьезоэлектрические преобразователи. При этом P_x и P_y служат для сканирования образца под иглой, а P_z управляет расстоянием от острия до поверхности, D – туннельный датчик, который регистрирует отклонения пружинки с острием.

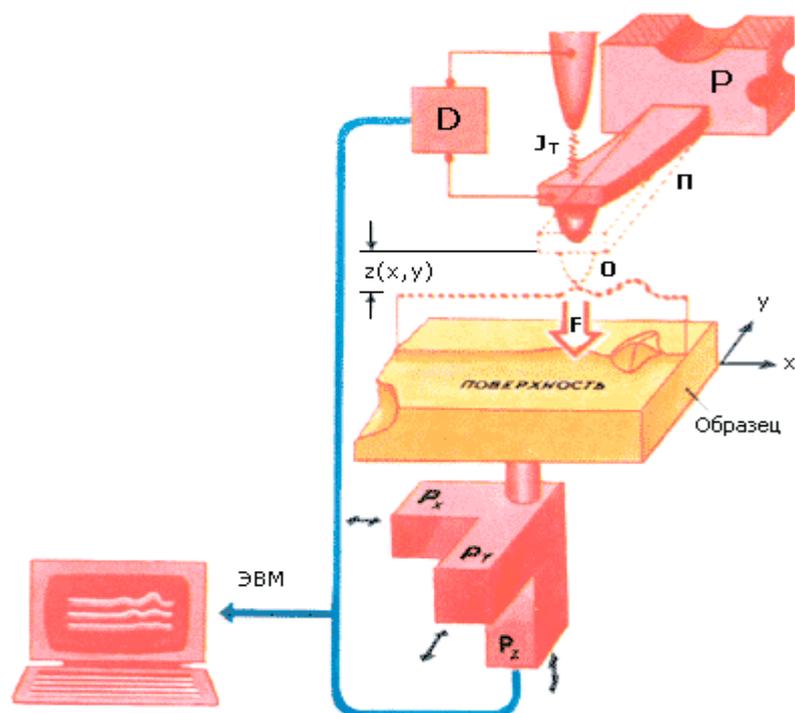


Рис. 1.24. Схема сканирующего атомного силового микроскопа

Принцип действия атомного силового микроскопа (АСМ) основан на использовании сил атомных связей, действующих между атомами вещества. На малых расстояниях между двумя атомами (около одного ангстрема, $1 \text{ \AA} = 10^{-8} \text{ см}$) действуют силы отталкивания, а на больших – силы притяжения. Совершенно аналогичные силы действуют и между любыми сближающимися телами. В сканирующем атомном силовом микроскопе такими телами служат исследуемая поверхность и скользящее над нею острие. Обычно в приборе используется алмазная игла, которая плавно скользит над поверхностью образца (сканирует эту поверхность). При изменении силы F , действующей между поверхностью и острием, пружинка Π , на которой оно закреплено, отклоняется, и такое отклонение регистрируется датчиком D . В качестве датчика в АСМ могут использоваться любые особо точные и чувствительные – прецизионные – измерители перемещений, например оптические, емкостные или туннельные датчики. На рис. 1.24 показан именно последний тип датчика, – фактически это такая же игла, какая применяется в сканирующем туннельном микроскопе. Величина отклонения упругого элемента (пружинки) несет информацию о высоте рельефа – топографии поверхности и, кроме того, об особенностях межатомных взаимодействий. Можно сказать, что в атомном силовом микроскопе сканирование исследуемого образца происходит по «поверхности постоянной силы», тогда как в СТМ – по поверхности постоянного туннельного тока. Принципы же прецизионного управления, основанного на обратной связи и улавливающего самые ничтожные изменения рельефа поверхности, в СТМ и АСМ практически одинаковы.

Атомный силовой микроскоп может использоваться для определения микрорельефа поверхности любых веществ, как проводящих, так и непроводящих, с его помощью можно наблюдать всевозможные несовершенства структуры, локализованные на изучаемых поверхностях, например, дислокации или заряженные дефекты, а также всяческие примеси. Кроме того, АСМ позволяет выявить границы различных блоков в кристалле, в частности доменов. В последнее время с помощью атомного силового микроскопа физики стали интенсивно изучать биологические объекты, например молекулы ДНК и другие макромолекулы, главным образом для целей нарождающегося и, судя по всему, чрезвычайно перспективного направления – биомолекулярной технологии. Интересно, что АСМ позволяет решать не только прикладные задачи, но и глобальные проблемы фундаментальной физики. В частности, определив с его помощью поведение межатомных сил и константы взаимодействий между атомами поверхности и острия, можно сделать довольно точные заключения о существовании или отсутствии новых фундаментальных взаимодействий и даже о структуре физического вакуума.

Г л а в а 2

СОВРЕМЕННЫЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

2.1. Инфракрасная спектрометрия (ИК-спектрометрия)

Понятие ИК-спектрометрии. ИК спектроскопия, как вид молекулярной оптической спектроскопии, изучает спектры поглощения и отражения электромагнитного излучения в ИК области, т.е. в диапазоне длин волн от 10^{-6} до 10^{-3} м. В координатах интенсивность поглощенного излучения – длина волны (или волновое число) ИК спектр представляет собой сложную кривую с большим числом максимумов и минимумов. Полосы поглощения появляются в результате переходов между колебательными уровнями (валентные колебания) основного электронного состояния изучаемой системы. Спектральные характеристики (положения максимумов полос, их полуширина, интенсивность) индивидуальной молекулы зависят от масс составляющих ее атомов, строения, особенностей межатомных сил, распределения заряда и др. Поэтому ИК спектры отличаются большой индивидуальностью, что и определяет их важность при идентификации и изучении строения соединений. Для регистрации спектров используют классические спектрофотометры и фурье-спектрометры.

ИК-спектрофотометры включают источник непрерывного теплового излучения, монохроматор, неселективный приемник излучения. Кювета с веществом (в любом агрегатном состоянии) помещается перед входной

(иногда за выходной) щелью. В качестве диспергирующего устройства монохроматора используют призмы из различных материалов (LiF, NaCl, KCl, CsF и др.) и дифракционной решетки. Последовательное выведение излучения различных длин волн на выходную щель и приемник излучения (сканирование) осуществляется поворотом призмы или решетки. Источники излучения – накаливаемые электрическим током стержни из различных материалов.

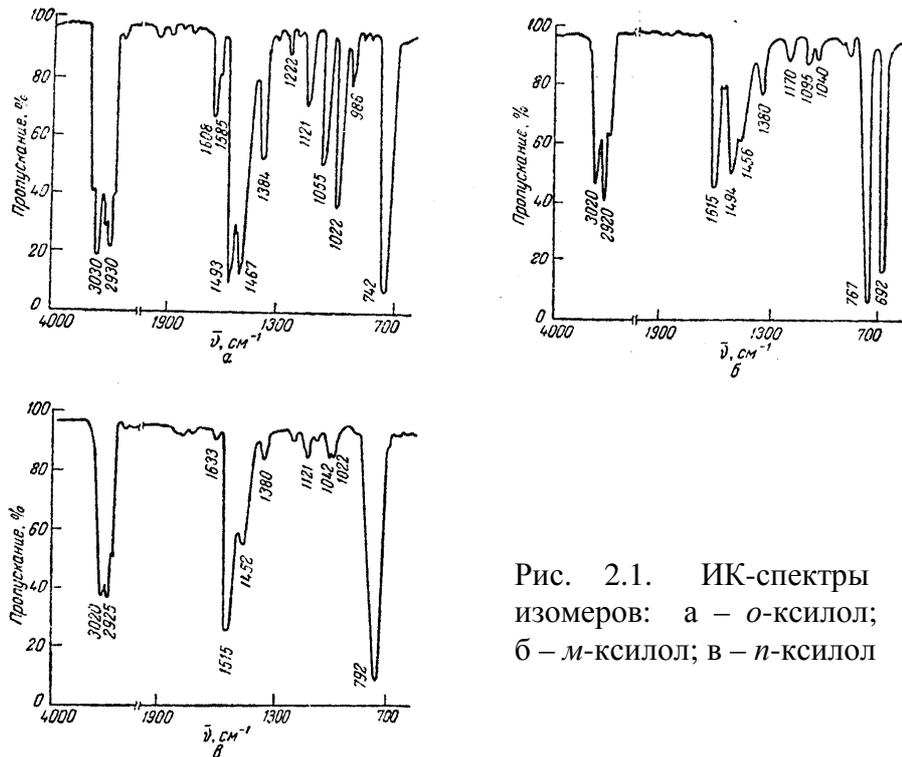


Рис. 2.1. ИК-спектры изомеров: а – *o*-ксилол; б – *m*-ксилол; в – *p*-ксилол

Приемники: чувствительные термодпары, металлические и полупроводниковые термосопротивления и газовые термопреобразователи, нагрев стенки сосуда которых приводит к нагреву газа и изменению его давления, что фиксируется. Выходной сигнал имеет вид обычной спектральной кривой. Достоинства приборов классической схемы: простота конструкции, относительная дешевизна. Недостатки: невозможность регистрации слабых сигналов из-за малого отношения сигнал:шум, что сильно затрудняет работу в далекой ИК области; сравнительно невысокая разрешающая способность (до $0,1 \text{ см}^{-1}$), длительная (в течение минут) регистрация спектров.

Пример. Инфракрасные спектры изомеров ксилола представлены на рис. 2.1. Для отнесения спектров к соответствующим изомерам по таблице характеристических частот ароматических соединений находим, что в спектре *орто*-замещенных бензольного кольца наблюдается сильная полоса в области $770\text{--}735 \text{ см}^{-1}$. Эта полоса обусловлена деформационными колебаниями связи C—H . Полоса 742 см^{-1} имеется в спектре, приведенном на рис. 2.1, а. Из этого можно заключить, что спектр следует отнести к *o*-ксилолу. В спектрах *мета*-замещенных бензольного

кольца наблюдаются две полосы: одна в области $810\text{--}750\text{ см}^{-1}$ и другая в области $710\text{--}690\text{ см}^{-1}$. В спектре, приведенном на рис. 2.1, б, наблюдаются полосы 767 и 692 см^{-1} . Из этого можно заключить, что спектр следует отнести к *m*-ксилолу. В спектрах *пара*-замещенных бензольного кольца имеется полоса в области $840\text{--}810\text{ см}^{-1}$. Эта полоса обусловлена деформационными колебаниями связи С—Н. В спектре (см. рис. 2.1, в) наблюдается полоса 792 см^{-1} . Из этого можно заключить, что спектр следует отнести к *n*-ксилолу.

В фурье-спектрометрах отсутствуют входная и выходная щели, а основным элементом является интерферометр. Поток излучения от источника делится на два луча, которые проходят через образец и интерферируют. Разность хода лучей варьируется подвижным зеркалом, отражающим один из пучков. Первоначальный сигнал зависит от энергии источника излучения и от поглощения образца и имеет вид суммы большого числа гармонических составляющих. Для получения спектра в обычной форме производится соответствующее фурье-преобразование с помощью встроенной ЭВМ. Достоинства фурье-спектрометра: высокое отношение сигнал:шум, возможность работы в широком диапазоне длин волн без смены диспергирующего элемента, быстрая (за секунды и доли секунд) регистрация спектра, высокая разрешающая способность (до $0,001\text{ см}^{-1}$). Недостатки: сложность изготовления и высокая стоимость. Все спектрофотометры снабжаются ЭВМ, которые производят первичную обработку спектров: накопление сигналов, отделение их от шумов, вычитание фона и спектра сравнения (спектра растворителя), изменение масштаба записи, вычисление экспериментальных спектральных параметров, сравнение спектров с заданными, дифференцирование спектров и др.

Кюветы для ИК спектрофотометров изготавливают из прозрачных в ИК области материалов. В качестве растворителей используют обычно CCl_4 , CHCl_3 , тетрахлорэтилен, вазелиновое масло. Твердые образцы часто измельчают, смешивают с порошком KBr и прессуют таблетки. Для работы с агрессивными жидкостями и газами применяют защитные напыления (Ge, Si) на окна кювет. Мешающее влияние воздуха устраняют вакуумированием прибора или продувкой его азотом. В случае слабо поглощающих веществ (разреженные газы и др.) применяют многоходовые кюветы, в которых длина оптического пути достигает сотен метров благодаря многократным отражениям от системы параллельных зеркал.

Большое распространение получил метод матричной изоляции, при котором исследуемый газ смешивают с аргоном, а затем смесь замораживают. В результате полуширина полос поглощения резко уменьшается и спектр получается более контрастным. Применение специальной микроскопической техники позволяет работать с объектами очень малых размеров (доли мм).

ИК спектроскопию широко применяют для анализа смесей и иден-

тификация чистых веществ. Количественный анализ основан на законе Бугера-Ламберта-Бера, т.е. на зависимости интенсивности полос поглощения от концентрации вещества в пробе. При этом о количестве вещества судят как по отдельным полосам поглощения, так и по спектральным кривым в целом в широком диапазоне длин волн. Если число компонентов невелико (4–5), то удастся математически выделить их спектры даже при значительном перекрывании последних. Погрешность количественного анализа, как правило, составляет доли процента. Идентификация чистых веществ производится обычно с помощью информационно-поисковых систем путем автоматического сравнения анализируемого спектра со спектрами, хранящимися в банке данных. Характерные области поглощения ИК излучения наиболее часто встречающихся функциональных групп химических соединений приводятся в справочной литературе по ИК спектроскопии.

Пример использования ИК спектрометрии для идентификации связанных на полимере органических кислот. Карбоксильная группа имеет в ИК спектре интенсивную полосу в области 1720 см^{-1} (5,6 – 5,9 мкм). В полимерной химии известен метод прививки акриловых кислот к пленке из тетрафторэтилена. Исходный фторопласт не имеет полос поглощения в указанной области. Сравнение ИК спектров исходной пленки и привитого сополимера с появившимися $-\text{COOH}$ группировками позволяет регистрировать характеристические полосы поглощения в области 1720 см^{-1} . Интенсивность данной полосы (площадь или высота) пропорциональна количеству связанной на поверхности фторопласта карбоксилсодержащей кислоты. Таким образом удастся количественно определить степень прививки карбоновой кислоты к фторопласту.

Пример использования ИК спектроскопии для сертификации цис- и транс- изомеров в жирах. В последние годы серьезной проблемой становится показатель содержания цис- и транс- изомеров жирных кислот в пищевых жирах. Эта проблема связана с гидрированием жидких масел с целью получения маргаринов и использованием фритюров, сопровождающимся существенным повышением доли как насыщенных жирных кислот, так и транс-изомеров. Большинство входящих в состав жиров природных жирных кислот является цис- формами, в которых заместители расположены в одну сторону по отношению к двойной связи кислоты.

Считается, что транс-жирные кислоты представляют искусственный элемент, содержащийся в новых пищевых продуктах, и следует избегать их потребления, поскольку до конца не понятно воздействие на здоровье человека. Естественное содержание элаидиновой кислоты в подкожном жире – 2...2,5%. Т.к. длительная термическая обработка жиров приводит к существенному повышению содержания вредных транс-изомеров, установлен предельный уровень их содержания – не более 8%.

Проводят определение массовой доли транс-изомеров олеиновой

кислоты в жире, выделенном из спреда или топленой смеси, в пересчете на метилэлаидат. Методика применима для измерения массовой доли транс-изомеров в диапазоне значений от 5 % до 60 %. Границы абсолютной погрешности измерений массовой доли транс-изомеров олеиновой кислоты $\pm 1,1$ % ($P = 0,95$). В работе используют ИК-спектрометр типа ИКС-40 со спектральным диапазоном 400–4200 см^{-1} , позволяющий измерять светопропускание в области 900–1050 см^{-1} .

Подготовка к измерению. Используют растворитель CS_2 . Сероуглерод представляет собой сильнодействующее ядовитое легко воспламеняющееся вещество. Его необходимо хранить под слоем воды. Все работы с применением сероуглерода необходимо выполнять под вытяжным устройством, соблюдая при этом требования личной безопасности. Перед использованием сероуглерода от него отделяют воду в делительной воронке, засыпают прокаленным хлористым кальцием (50 г на 1 дм^3 сероуглерода) и оставляют на сутки. После этого сероуглерод перегоняют (температура кипения 46 °С) на водяной бане с выносным обогревом (с подачей горячей воды от выносного водоподогревателя). Допускается использовать в качестве растворителя четыреххлористый углерод. В этом случае его сушат над прокаленным хлористым кальцием (как указано выше) и перегоняют на водяной бане (температура кипения 77 °С).

Подготовка пикнометра (определение его истинного объема). Взвешивают пикнометры, заполняют дистиллированной водой до метки, помещают в ультратермостат при 20 °С на 2 ч и повторно взвешивают. Результаты взвешиваний записывают с точностью до четвертого десятичного знака. Истинный объем пикнометра V , дм^3 , определяют по формуле $V = [(m_1 - m_2) / d_{\text{в}}^{20}] 1000$, где m_1 – масса пустого пикнометра, г; m_2 – масса пикнометра с водой, г; $d_{\text{в}}^{20}$ – плотность воды при 20 °С, $\text{г}/\text{см}^3$ (0,99823).

Вычисления проводят с точностью до четвертого десятичного знака.

Подготовка пробы – выделение жира из продукта. Пробу продукта массой 40 – 50 г расплавляют в химическом стакане на водяной бане или в сушильном шкафу при температуре 40 – 60 °С, выдерживают при этой температуре до полного расслоения. Жировой слой фильтруют через складчатый фильтр. Если отфильтрованный жир будет прозрачен, то приступают к измерению. При наличии в жире мути его повторно фильтруют.

Проведение измерения. Пробу расплавленной топленой смеси или жировой фазы массой от 0,09 до 0,12 г взвешивают в пикнометре с записью результата до четвертого десятичного знака, растворяют в сероуглероде (или четыреххлористом углероде), доводят до метки сероуглеродом (или CCl_4) и хорошо перемешивают. Раствор помещают в кювету с окошками из хлористого натрия или бромистого калия толщиной около 0,01 см (точная толщина кюветы указана в паспорте прибора) и измеряют светопропускание T , записывая спектр раствора жира в области 900 – 1050 см^{-1} (11,2 – 9,55 $\mu\text{м}$).

Обработка результатов. На записи спектра жира проводят линию через точки с частотами 930 и 1000 см^{-1} и измеряют светопропускание T при частотах 930 см^{-1} (T_1), 968 см^{-1} (T) и 1000 см^{-1} (T_2). Затем вычисляют оптическую плотность раствора при частотах 930 см^{-1} (D_1), 968 см^{-1} (D) и 1000 см^{-1} (D_2) по формуле $D = \lg 100 / T$. Массовую долю транс-изомеров X_{13} , %, в пересчете на метиловый эфир транс-олеиновой (элаидиновой) кислоты, рассчитывают по формуле: $X_{13} = \{ [D - \frac{1}{2}(D_1 + D_2) V] / m d K_{\text{ст}} \} 100$, где D , D_1 , D_2 – оптические плотности раствора жира при частотах 968, 930 и 1000 см^{-1} соответственно; m – масса пробы, г; V – объем пикнометра, дм^3 ; d – толщина кюветы, см; $K_{\text{ст}}$ – коэффициент поглощения метилового эфира транс-олеиновой (элаидиновой) кислоты, равный 0,46 $\text{дм}^3/\text{г}\cdot\text{см}$ для призмных спектрометров и 0,54 $\text{дм}^3/\text{г}\cdot\text{см}$ для спектрометров с дифракционными решетками.

Вычисления проводят до второго десятичного знака с последующим округлением результата до первого десятичного знака. Расхождение между результатами двух независимых единичных определений, выполненных при использовании одного метода, на идентичном испытуемом материале, в одной лаборатории, одним аналитиком, на одном оборудовании, за короткий промежуток времени не должно превышать 0,8 % при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Расхождение между результатами двух единичных определений, выполненных одним методом, на идентичном испытуемом материале, в разных лабораториях, разными аналитиками, на различном оборудовании, не должно превышать 1,6 % при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Спектроскопия отражения – раздел спектроскопии, изучающий закономерности отражения электромагнитного излучения от разных сред. Лежит в основе методов исследования веществ по спектрам отражения. Различают спектры внешнего и внутреннего отражения. Первые, в свою очередь, делятся на спектры зеркального отражения, когда падающий и отраженный лучи лежат в одной плоскости с нормалью к отражающей поверхности, а угол отражения равен углу падения, и спектры диффузного отражения, когда отраженные лучи рассеиваются по разным направлениям. Характер внешнего отражения излучения определяется соотношением между длиной волны λ падающего излучения и размерами неровностей отражающей поверхности. При неровностях, размеры которых меньше λ , наблюдается зеркальное отражение, в остальных случаях – диффузное отражение (рассеянное излучение). Практически отраженное излучение имеет смешанный характер; при специально выбранных условиях преобладает вклад того или иного вида отражения. Зеркальное отражение получают с применением гладкой плоской поверхности, в частности при исследовании молекулярных структур слоев, нанесенных на различные подложки, при изучении явлений адгезии, адсорбции, электрокатализа, ингибирования коррозии, а также при определении оптических постоянных. В последнем

случае измеряют отражательную способность вещества $R(\nu) = I_0/I_{\text{п}}$, где I_0 и $I_{\text{п}}$ – интенсивности отраженного и падающего излучения соответственно для спектра с волновым числом ($\nu = 1/\lambda$). При этом пучок света должен быть параллельным и падать на плоскую полированную поверхность образца. Зная оптические постоянные веществ, можно в спектрах отражения выделить смещение и искажение форм спектральных полос и изменение их интенсивности, вызванные не оптическими эффектами, а изменениями структуры отражающей поверхности или химическими реакциями. Так, например, при исследовании спектра отражения пленки из полиметилметакрилата, нанесенной на подложку из золота, полоса, соответствующая валентному колебанию C=O, оказывается смещенной в высокочастотную область (примерно на 10 см^{-1}) и имеет асимметричную форму. Такие искажения возрастают при увеличении толщины пленки и уменьшении комплексного показателя преломления материала подложки. На искажение полос сильно влияет также угол падения излучения и поляризация падающего пучка. Для оценки искажений в спектрах отражения определяющую роль играет или действительная, или мнимая часть комплексного показателя преломления подложки в зависимости от оптических свойств последней. При использовании поляризованного излучения можно определить пространственную ориентацию молекул, образующих пленку на отражающей подложке, и характер их взаимодействия с подложкой. Однако, необходимо предварительно тщательно учесть роль оптических эффектов в искажении спектров отражения.

Спектры, полученные при зеркальном отражении, представляют собой суперпозицию спектров отражения и пропускания. Обычно наилучшие результаты получают при угле падения излучения ок. 45° и при толщине покрытий ок. 0,01 мм. При малых толщинах пленок ($\ll 0,01 \text{ мм}$) и угле падения 90° спектры отражения не получаются, т.к. образующаяся стоячая волна электрического поля имеет на отражающей поверхности узел и молекулы вещества не могут взаимодействовать с излучением. Количество отраженной энергии при скользящем падении луча м.б. значительно больше, причем проникновение излучения будет более глубоким, т.е. будет исследоваться большая толщина образца.

Обычно при внешнем отражении падающий луч проникает в образец на глубину 10 – 20 мкм. С использованием ИК фурье-спектрофотометров м.б. исследованы слои толщиной от 5 до 500 мкм при площади исследуемого образца до 1 мм^2 за время от 2 до 30 мин. В случае металлической поверхности интенсивность спектров отражения м.б. повышена путем использования излучения, поляризованного в плоскости, параллельной поверхности металла.

Спектры диффузного отражения обычно малоинтенсивны, т.к. удается собрать и направить в спектральный прибор только очень малую часть рассеянного (отраженного) излучения. Поэтому в этом случае необ-

ходимо применять ИК фурье-спектрофотометры, обладающие высокими светосилой и соотношением сигнал:шум ($\sim 10^5$). Получаемые при диффузном отражении спектры часто оказываются подобными спектрам пропускания. Исследуемыми образцами м.б. массивные твердые тела, порошки (иногда содержащие разные наполнители – KBr, KCl, CsI, прозрачные в исследуемой области спектра), волокнистые (ткани, войлок) и ячеистые (напр., электроды с различными наполнителями) материалы, пены, суспензии и аэрозоли, разрядные промежутки с электронными запалами для анализа возможных загрязнений и т.д. Перед исследованием твердый образец обычно натирают на наждачную бумагу на основе карбида кремния тонкого помола, спектр которого либо не проявляется в спектре исследуемого образца, либо м.б. вычтен из полученного спектра и использоваться как спектр сравнения. Спектры отражения при диффузном рассеянии могут наблюдаться от достаточно малых количеств вещества, например, от пятен на хроматографической пластине. Спектры внутреннего отражения наблюдают, когда исследуемый образец находится в контакте с призмой из оптически менее плотного материала; излучение проходит сначала через призму и ее границу с образцом под углом, превышающим критический (т.е. угол падения, при котором преломление света в образец прекращается), а затем проникает в образец (на глубину до 1 – 2 мкм), где теряет часть своей энергии и отражается. Таким образом получают спектры нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). В качестве материала призм используют прозрачные в различных областях спектра материалы, в частности, кварц, оксиды цинка и магния, сапфир, кремний, фторид кальция, сульфид мышьяка, германий, $\text{Ge}_{35}\text{Se}_{50}\text{As}_{15}$, селениды мышьяка и цинка, хлориды натрия, калия и серебра, бромиды калия и серебра, теллурид кадмия, алмаз.

Спектры отражения изучаются, как правило, в оптической (ИК, УФ и видимой) области с помощью спектрофотометров, снабженных специальными устройствами. При исследовании зеркального отражения применяют обычно систему зеркал, которая отклоняет пучок излучения, направляет его на изучаемый объект и возвращает отраженное излучение вновь в спектральный прибор. Для наблюдения спектров НПВО используют такие же приставки, но с той разницей, что в этом случае излучение направляется на призму, находящуюся в контакте с исследуемым образцом.

Спектры отражения – единственный метод получения количественных оптических характеристик веществ, для которых по тем или иным причинам (вследствие очень сильного поглощения, невозможно получить тонкие слои и т. п.) не м.б. получены спектры пропускания. Все физические тела, которые сами не излучают в видимой области спектра, могут наблюдаться вследствие характерного для них спектра отражения. Спектры отражения применяют для определения оптических постоянных веществ, для исследования тонких пленок, в частности в оптической про-

мышленности и микроэлектронике.

Пример использование современного ИК фурье-спектрометра. В последнее время рядом зарубежных фирм выпускаются универсальные компьютеризированные приборы, работающие в проходящем (жидкости) ИК-излучении или по типу спектроскопии на отраженных ИК волнах при $\lambda = 850 - 1050$ нм. Точная настройка оптических характеристик прибора, а также последующее математическое Фурье-преобразование ИК спектров позволяет настраивать такие приборы на количественное содержание совершенно разноплановых малых количеств веществ, традиционный анализ которых по стандартным физико-химическим методикам занимает несколько дней и является весьма трудоемким делом.

Современный ИК фурье-спектрометр типа ФудСкан фирмы Фосс-Электрик (Дания) позволяет анализировать до 50 образцов в час, выдавая одновременно в качестве результата, например, содержание жира, белка, влаги, соли, глюкозы и др. показателей с точностью $\pm 0,01 - 0,05$ % от истинного содержания вещества. Высокая чувствительность прибора позволяет проводить анализ вообще без пробоподготовки, путем простого внесения твердого образца в измерительную камеру или заливки жидкого образца в количестве 1 – 10 мл. Приборы могут настраиваться по желанию исследователя на достаточно широкий перечень определяемых веществ, например при сертификации вин – создаются карты продукции с набором 10 – 20 компонентов, определяющих сортность вина, его вкусовой букет, зависящий от географического места производства. Поскольку выпускаемые приборы по всему миру связаны в единую сеть через Интернет, это позволяет регулярно проводить текущую проверочную градуировку каждого устройства и пользоваться единым банком экспериментальных данных.

2.2. Ядерно-магнитный резонанс. ЯМР-спектроскопия

Понятие ЯМР-спектроскопии. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Явление магнитного резонанса используется для обнаружения и измерения электрических и магнитных взаимодействий электронов и ядер в макроскопических количествах вещества. Это явление обусловлено парамагнитной ориентацией электронного и ядерного токов внешним полем и их прецессией относительно направления внешнего поля. Частота прецессии пропорциональна напряженности магнитного поля, приложенного в области нахождения прецессирующего электрона или ядра. Практическая спектроскопия ЯМР основана преимущественно на магнитных свойствах ядер. Когда соседние частицы дают вклад в локальное магнитное поле, он измеряется по сдвигу частоты прецессии. Дополнительный сдвиг частоты прецессии может произойти также за счет неоднородных электрических полей, создаваемых соседними частицами.

Схема экспериментальной установки изображена на рис. 2.2.

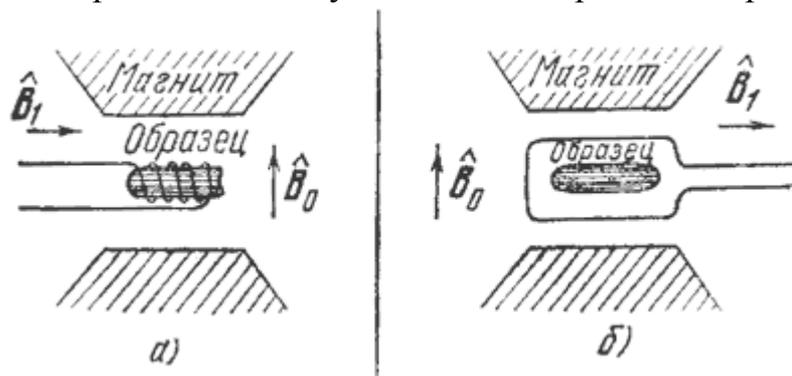


Рис. 2.2. Схематическое изображение установки для эксперимента по магнитному резонансу. Резонанс достигается в радиочастотном диапазоне. Катушка (а) и резонатор (б) присоединяются к источникам переменного поля и измерителям потери мощности

Исследуемый образец помещается внутрь радиочастотной катушки или микроволнового резонатора, расположенных между полюсами магнита. Крайне высокая точность настройки установки и ее чувствительность при определении поглощаемой мощности – главное преимущество метода магнитного резонанса. В стандартной экспериментальной методике частота колебаний поперечного поля поддерживается постоянной и резонанс достигается с помощью изменения напряженности поля, что приводит к медленному изменению частоты прецессии.

Методом ЯМР были измерены моменты атомных ядер, впервые исследованы состояния с инверсной заселённостью уровней. Исследования релаксационных процессов, ширины и тонкой структуры линий ЯМР дали много сведений о структуре жидкостей и твёрдых тел.

В твердых телах возникают сильные локальные магнитные поля, что приводит к значительному уширению линий наблюдаемого сигнала. Благодаря сильному различию в резонансе отдельных ядер в жидких средах, практически используют спектроскопию высокого разрешения для ядер ^1H (т.н. протонный магнитный резонанс или ПМР спектроскопия), ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P .

ЯМР высокого разрешения представляет собой наряду с ИК спектроскопией стандартный метод определения строения органических молекул. Тесная связь формы сигналов с внутренним движением в веществе позволяет использовать ЯМР для исследования заторможенных вращений в молекулах и кристаллах. ЯМР используется также для изучения механизма и кинетики химических реакций. На ЯМР основаны приборы для прецизионного измерения и стабилизации магнитного поля. За открытие и объяснение ЯМР (1946) Ф. Блохи и Э. Перселлу была присуждена Нобелевская премия по физике за 1952 год.

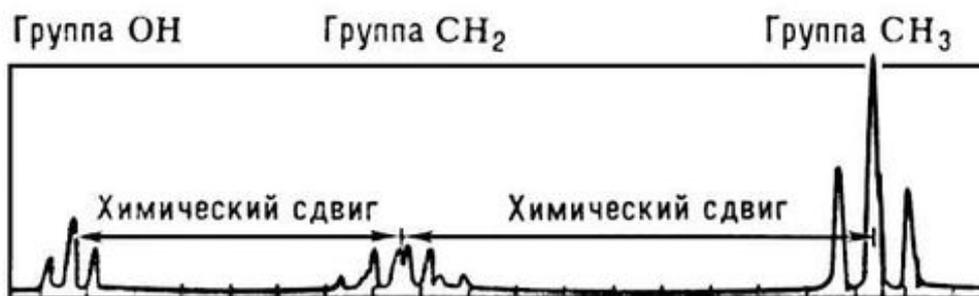


Рис. 2.3. Спектр ЯМР протонов в этиловом спирте

На рис. 2.3 показан т.н. химический сдвиг сигнала в ЯМР спектрометре для протонов молекулы этанола C_2H_5OH .

Спектры ЯМР в подвижных жидкостях для ядер со спином $I = 1/2$ и $Q = 0$ отличаются узкими линиями (ЯМР высокого разрешения). Спектры высокого разрешения получаются для протонов, ядер ^{19}F , ^{13}C , ^{31}P и некоторых других ядер. Одиночные линии в этом случае получаются только если наблюдается ЯМР ядер, занимающих химически эквивалентные положения (например, линии водорода в спектрах воды, бензола, циклогексана). Все соединения более сложного строения дают спектры из многих линий (рис. 2.3), что связано с двумя эффектами. Первый, так называемый химический сдвиг, – результат взаимодействия окружающих ядро электронов с магнитным полем.

Величина химического сдвига зависит от структуры электронных оболочек и от характера химических связей, что позволяет судить о структуре молекул по спектру ЯМР. Вторым эффектом является не прямое спин-спиновое взаимодействие. Непосредственное магнитное взаимодействие ядер в подвижных жидкостях затруднено из-за броуновского движения молекул; не прямое спин-спиновое взаимодействие обусловлено поляризацией электронных оболочек полем ядерных моментов.

Наблюдение спектров ЯМР осуществляется путём медленного изменения частоты поля H_1 или напряжённости поля H_0 . Основным элементом радиочастотной аппаратуры, применяемой для наблюдения ЯМР, является настроенный на частоту прецессии контур, в катушку индуктивности которого помещается исследуемое вещество. Катушка выполняет две функции: создаёт действующее на исследуемое вещество радиочастотное магнитное поле H_1 и воспринимает эдс, наведённые прецессией ядерных моментов. Контур включается в радиочастотный мост или в генератор, работающий на пороге генерации.

Стандартный ЯМР спектрометр – достаточно дорогостоящий прибор, состоящий из: 1) магнита, создающего сильное однородное магнитное поле, напряжение которого можно постепенно изменять; 2) радиочастотного генератора; 3) радиочастотного приемника и усилителя; 4) регистри-

рующего устройства; 4) интегратора; 6) образца.

Раствор образца в сверхчистом растворителе помещают в тонкой стеклянной ампуле диаметром около 4 мм между полюсами магнита внутри катушки генератора радиочастотного поля. Для усреднения неоднородности магнитного поля ампула вращается. При постепенном изменении магнитного поля достигаются условия резонанса, происходит поглощение энергии, она регистрируется приемником, усиливается и подается на следящую систему компьютера. Интенсивность сигнала (площадь под кривой) измеряется интегратором и изображается в виде спектра сигнальных линий, высота которых пропорциональна площади. Для возможности сравнения наблюдаемых сигналов ЯМР в реальных спектрах обычно используют сильный сигнал вещества тетраметилсилана, который принимается за ноль. В этой системе измерения т.н. химический сдвиг δ (в условных миллионных долях – м.д.) составляет для некоторых чистых веществ, (м.д.): гексаметилдисилан – 0,05; ацетон – 2,112; вода – 4,75; хлороформ – 7,33. Для идентификации в ПМР спектроскопии часто в качестве растворителей применяют соединения, не имеющие протонов, например, D_2O – тяжелая вода или CCl_4 .

Пример применения ЯМР в сертификации. Определение испорченного вина с помощью ЯМР-спектроскопии. Ни один коллекционер вин не обрадуется, узнав, что бутылка, за содержимое которой он только что потратил целое состояние, стоит не больше, чем обычный уксус. К сожалению, определение того, испортилось ли вино, обычно происходит при его открывании. М. П. Огюстин и Дэниэл Н. Собиски разработали *метод, основанный на явлении ядерно-магнитного резонанса, позволяющий определять порчу вина без открывания бутылки*. Используя специальную технику эксперимента, они помещали целую бутылку прямо в магнит (рис. 2.4).

Существует два основных пути порчи вина. Этанол может окислиться до ацетальдегида или до уксусной кислоты. Вино считается испортившимся, если содержит 1,4 г уксусной кислоты на литр или 300 мг/л ацетальдегида, что составляет, соответственно, только 0,2 % и 0,02 %. Второй путь, так называемая, пробковая порча, вызывается гниением пробки. От 5 % до 10 % всех бутылок с вином портятся по этим двум механизмам, однако метод Огюстина, основанный на ЯМР-спектроскопии, определяет лишь те, что стали жертвой процесса окисления.

Различие в химических сдвигах метильных протонов уксусной кислоты, ацетальдегида и этанола составляет около одной миллионной доли, чего вполне достаточно для различения этих соединений. Несмотря на то, что первоначально анализ занимал достаточно много времени, Собиски оптимизировал условия эксперимента так, что сейчас на одну бутылку тратится от пяти минут до часа.



Рис. 2.4. Неразрушающая ЯМР-спектроскопия вина

2.3. Масс-спектрометрия

Понятие масс-спектропии. В конце XX столетия из всех ежегодно производимых в мире приборов для научных исследований на долю масс-спектрометров приходилось около 5 %. Нашедшая первоначально свое применение в физике изотопов, масс-спектрометрия в настоящее время – один из наиболее широко используемых методов в химии, геологии, биотехнологии, сертификации и других областях науки.

В 1912 году английский физик Дж. Дж. Томсон, используя свой прибор – первый прототип будущих масс-спектрометров, впервые разделил различные массовые компоненты химических элементов. Оказалось, что неон имеет две разновидности атомов, имеющие относительные массы 20 и 22. В настоящее время известно, что существует также и третий изотоп – $^{10}_{21}\text{Ne}$. Таким образом, впервые были измерены массы различных изотопов, то есть атомов одних и тех же элементов, но с различными массами.

Масс-спектрометрия – метод исследования и анализа вещества, основанный на ионизации атомов и молекул, входящих в состав пробы, и регистрации спектра масс образовавшихся ионов.

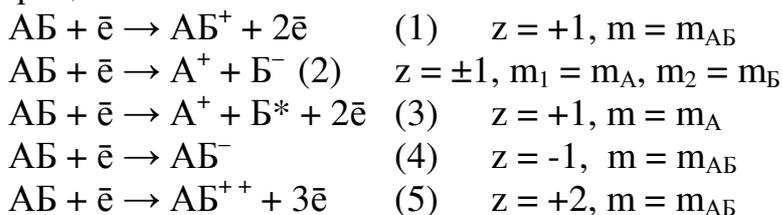
Идея метода проста и может быть изложена в виде схемы.

1. Превратить нейтральные частицы – атомы или молекулы в частицы заряженные – ионы.
2. Разделить образовавшиеся ионы в пространстве в соответствии с их массой посредством электрического или магнитного поля.

3. Измеряя электрический ток, образуемый направленно движущимися ионами, можно судить об изотопном, атомарном и молекулярном составе анализируемого вещества, как на качественном, так и на количественном уровне.

Методы ионизации вещества. Существует много способов сообщить заряд нейтральной частице. Наиболее широко применяется *метод электронного удара*. Ионизация происходит при столкновении пучка электронов с энергией 40 – 80 эВ с молекулами исследуемого вещества. Время взаимодействия электрона с молекулой порядка 10^{-18} с, и, в результате, образуется молекулярный положительный ион, а избыточная кинетическая энергия уносится двумя электронами. Если время жизни образующегося молекулярного иона меньше 10^{-6} с, то он не достигает регистрирующего устройства и отсутствует в масс-спектре. В этом случае фиксируются лишь продукты распада молекулярного иона, время жизни которых превышает 10^{-6} с. Этот процесс называется фрагментацией, а продукты распада – фрагментарными или осколочными ионами.

При электронном ударе молекулы типа АБ возможно протекание различных процессов:



Ионы имеют массу m и заряд z , и, строго говоря, разделение осуществляется не по массе, а по отношению массы иона к его заряду m/z .

Метод фотонного удара по существу аналогичен методу электронного удара, но эффективность ионизации на два-три порядка ниже. Вся избыточная кинетическая энергия уносится одним выбитым электроном, и поэтому пороговые законы, то есть зависимость интенсивности ионного тока от энергии бомбардирующих частиц, отличаются для фотонного и электронного удара. Фотонный удар оказывается существенно более точным при определении таких величин, как потенциалы ионизации. Для ионизации термически нестойких соединений использование обоих методов бесперспективно. Для ионизации труднолетучих соединений в аналитической химии применяются искровая и лазерная ионизация вещества. Ионизации подвергается твердое вещество. В искровом источнике испарение и ионизация исследуемого вещества происходят за счет искрового разряда, зажигающегося между электродами при разности потенциалов между ними от 3 до 5 кВ. На одном из электродов находится сам образец. Лазерная ионизация производится путем импульсного лазерного нагрева твердого вещества, и образующийся плазменный пучок направляется в масс-анализатор. В этих условиях происходит полное разрушение химических соединений, и в масс-спектре фиксируются лишь атомные ионы и опреде-

ляется элементный состав образца.

Метод поверхностной ионизации позволяет получать ионы при термической ионизации веществ на поверхности металлов. Обычно используются металлы с высоким значением работы выхода электрона, и поверхность отбирает электрон у соединения, адсорбированного на этой поверхности.

К методам мягкой ионизации относится *химическая ионизация*. При химической ионизации образование ионов происходит за счет ион-молекулярных газовых реакций. Метод хорош в тех случаях, когда исследуемое вещество – газ.

Способы разделения ионов. На рис. 2.5 приведена схема, иллюстрирующая принцип работы так называемого магнитного масс-спектрометра, в котором ионы разделяются под действием магнитного поля, с ионизацией посредством электронного удара.

Масс-спектрометр требует создания в нем очень чистого вакуума. Давление остаточного газа в приборе обычно составляет около 10^{-5} – 10^{-8} Па. Нейтральные молекулы исследуемого газа поступают в область камеры ионизации, где подвергаются столкновению с ионизирующими электронами. При этом часть молекул (около 0,1%) превращается в ионы по схемам, приведенным выше. Электрическое поле, образованное ускоряющей разностью потенциалов, сообщает ионам кинетическую энергию.

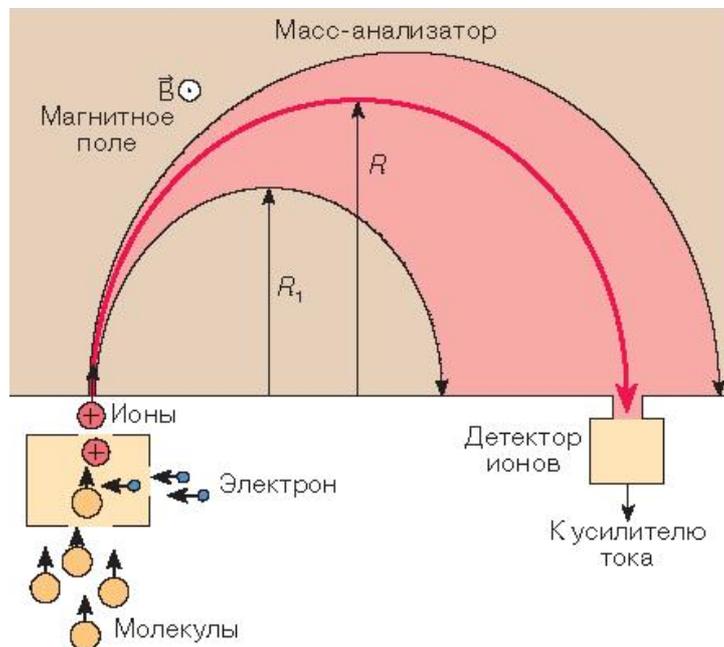


Рис. 2.5. Схема ионизации методом электронного удара и разделения ионов по массам в магнитном поле масс-спектрометра

Ион с массой m и зарядом z будет двигаться в магнитном поле по дуге окружности радиуса R . Изменяя параметры можно заставлять двигаться по окружности радиуса R_d , на линии которой находится щель входа в де-

тектор, ионы той или другой массы или величины заряда. Записывая зависимость ионного тока от m/z , получают набор пиков, называемый масс-спектром.

Физические и химические задачи, решаемые масс-спектрометрией. Определение изотопного состава элементов и массовых чисел новых элементов. Многие химические элементы имеют несколько стабильных изотопов. У углерода, например, два стабильных изотопа – ${}^6\text{C}^{12}$ и ${}^6\text{C}^{13}$, распространенности которых 99 и 1% соответственно. Натрий моноизотопен. Природный хлор обладает двумя изотопами с массовыми числами 35 (76%) и 37 (24%), вследствие чего его средняя атомная масса, приводимая в справочниках, нецелочисленна и равна 35,5. Элемент бром представлен двумя изотопами – ${}_{35}\text{Br}^{79}$ и ${}_{35}\text{Br}^{81}$ с практически одинаковой распространенностью – 51 и 49%. В результате в расчетах мы как бы используем массу несуществующего стабильного изотопа бром-80.

Масс-спектрометрический метод позволяет также идентифицировать и определять изотопный состав ядер, образующихся в результате ядерных реакций и бомбардировки ядер быстрыми частицами в ускорителях.

Разделение изотопов. То обстоятельство, что в масс-анализаторе ионы разделяются в пространстве в зависимости от их массы m (при равном заряде z) используется для разделения изотопов одного и того же элемента по массе. Это позволяет производить обогащение вещества требуемым изотопом. Масс-сепараторы для обогащения изотопов в промышленном масштабе существовали уже в первой половине 50-х годов XX столетия.

Определение периодов полураспада изотопов и определение геологического возраста. Изучая изменение относительной распространенности изотопов одного и того же элемента, происходящего вследствие естественного радиоактивного распада, определяют важную временную характеристику процесса – период полураспада. Масс-спектрометрия позволяет также отслеживать пути распада.

Речь идет об определении геологического возраста путем расчета больших временных интервалов из измерений распространенности изотопов в образцах горных пород, предметов археологических раскопок и т.д. Метод определения геологического возраста по отношению распространенностей $\text{Pb}^{207} / \text{Pb}^{206}$ был впервые применен в конце 30-х годов XX столетия.

Определение состава вещества. Определение структуры молекулы и энергетических характеристик. Все большее применение находит масс-спектрометрия в химии, особенно органической, а также в биологии. Метод предоставляет информацию о том, какое вещество или смесь каких веществ представляют собой исследуемый образец (качественный анализ) и какова концентрация веществ в смеси (количественный анализ). В ходе анализа иногда также представляется возможным выяснить, какие фрагменты и в какой последовательности образуют молекулу исследуемого

вещества.

По-видимому, самым ярким и эффективным применением масс-спектрометрии в химическом анализе смесей явилась разработка метода, объединяющего два мощнейших аналитических инструмента: хроматографию и масс-спектрометрию, что привело к созданию хромато-масс-спектрометрического метода. В этом методе образец (исследуемая газовая смесь) смешивается с газом-носителем (обычно гелий) на входе в хроматограф. Смесь проходит через длинную капиллярную хроматографическую колонку. Скорость диффузии компонентов смеси сильно зависит от химической природы каждого из них, вследствие чего происходит разделение смеси. Образующиеся на выходе хроматографа порции разделенных компонентов смеси поступают последовательно один за другим в масс-спектрометр. Таким образом, получается набор масс-спектров, каждый из которых соответствует индивидуальному компоненту смеси. Использование вместо газового хроматографа жидкостного позволило изучать не только газовые, но и жидкие смеси. Метод жидкостной хроматомасс-спектрометрии широко используется для анализа нефти и других сложных органических смесей.

Глава 3

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА

Аналитические сигналы от разных определяемых веществ в смеси часто бывают так сходны, что их не всегда можно отличить с помощью современных приборов. Прежде чем измерять сигнал, во многих случаях требуется произвести операцию разделения определяемых компонентов. Универсальным приемом разделения самых разнообразных смесей является хроматография. Но это не только метод разделения.

3.1. Сущность хроматографии

Возникновение хроматографии как научного метода связано с именем русского ученого-ботаника М.С. Цвета, который осуществил в 1903 г. разделение растительного пигмента хлорофилла на ряд составляющих окрашенных веществ. В стеклянную трубку (колонку), заполненную твердым адсорбентом (мелом), Цвет поместил небольшое количество хлорофилла и промыл систему петролейным эфиром. В результате компоненты пигмента распределились вдоль адсорбента, образуя различно окрашенные зоны. После полного разделения компонентов ученый извлек влажный адсорбент из колонки, полученный столбик разрезал на отдельные полосы и исследовал разделенные вещества. Этот метод он назвал хроматографией (от греч. *хроматос* – цвет).

Хроматография – это физико-химический метод разделения, обнаружения и определения веществ, основанный на различном распределении компонентов смеси между двумя несмешивающимися фазами – подвижной и неподвижной.

В основе хроматографических методов лежат *сорбционные* процессы. Под *сорбцией* понимается поглощение газов, паров или растворенных веществ твердыми или жидкими поглотителями (сорбентами). Различают два вида сорбции: *адсорбцию* – поглощение веществ твердой поверхностью и *абсорбцию* – поглощение веществ в объеме фазы.

В хроматографии используется сорбция в динамических условиях. Разделяемые вещества перемещаются через слой неподвижного сорбента (неподвижной фазы) вместе с подвижной фазой (жидкой или газообразной) с различной скоростью вследствие различной сорбируемости.

В простейшем виде разделение смесей сорбционными методами осуществляется при прохождении потока растворителя, содержащего анализируемую смесь, через колонку, заполненную зерненым сорбентом. При движении подвижной фазы вдоль неподвижной, компоненты анализируемой смеси сорбируются на неподвижной фазе в соответствии со своим сродством к материалу неподвижной фазы. Поглощенные сорбентом молекулы могут опять перейти в подвижную фазу – десорбироваться – и продвигаться вместе с ней дальше, затем снова сорбироваться. Таким образом происходит распределение молекул каждого компонента между двумя фазами. Чем сильнее сродство компонента к неподвижной фазе, тем сильнее он сорбируется и дольше задерживается на сорбенте, тем медленнее его продвижение вместе с подвижной фазой. Поскольку компоненты смеси обладают разным сродством к сорбенту, при перемещении вдоль сорбента произойдет разделение: одни компоненты задержатся в начале пути, другие продвинулись дальше и т. д. Таким образом, в хроматографическом процессе сочетаются термодинамический (установление равновесия между фазами) и кинетический (движение компонентов с различной скоростью) аспекты.

Характерной особенностью хроматографии является многократность повторения процессов сорбции и десорбции в новых слоях сорбента, что обеспечивает высокую эффективность разделения.

3.2. Классификация хроматографических методов анализа

При классификации хроматографических методов учитывают природу подвижной и неподвижной фаз, механизм взаимодействия между сорбентом и разделяемыми веществами, технику эксперимента.

В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы различают *газовую хроматографию* (ГХ) и *жидкостную хроматографию* (ЖХ), если подвижная фаза газ или жидкость, соответственно.

Неподвижной фазой, в свою очередь, могут служить твердые вещества и жидкости. В соответствии с этим существуют: *газовая твердофазная хроматография* (ГТХ), *газовая жидкостная хроматография* (ГЖХ), *жидкостная твердофазная хроматография* (ЖТХ) и *жидкость-жидкостная хроматография* (ЖЖХ).

По механизму взаимодействия вещества и сорбента различают *сорбционные* методы и *гель-фильтрационные (молекулярно-ситовые)* хроматографические методы.

Сорбционные методы включают *адсорбционные, распределительные, ионообменные, осадочные, окислительно-восстановительные, комплексообразовательные*.

Адсорбционные методы основаны на различной адсорбируемости компонентов смеси сорбентом, *распределительные* – на распределении компонентов смеси между двумя не смешивающимися жидкими фазами, *ионообменные* – на способности к ионному обмену.

Для *осадочной* хроматографии характерно многократное повторение элементарных актов образования и растворения осадков и их закрепление в порах носителя (в месте образования) в процессе фильтрации раствора разделяемых веществ через колонку, содержащую осадитель. Различия в растворимости образующихся в колонке осадков (при взаимодействии раствора разделяемых веществ с осадителем) обуславливает порядок распределения осаждаемых веществ в зонах колонки, а, следовательно, и их разделение.

Окислительно-восстановительная хроматография основана на различиях в скоростях окислительно-восстановительных реакций, протекающих между окислителем или восстановителем, содержащимся в составе сорбента, и ионами анализируемого раствора, и удерживании продуктов реакции в порах носителя (сорбента) на месте их образования.

В основе *гель-фильтрационной* или *молекулярно-ситовой* хроматографии лежит принцип разделения смеси веществ по их молекулярным размерам или молекулярным массам. Такие физико-химические свойства веществ, как сродство к сорбенту, растворимость, поверхностный заряд, играющие важную роль в других вариантах хроматографии, здесь, как правило, не имеют значения, так как разделяемые вещества практически не взаимодействуют с носителем. В качестве носителей в молекулярно-ситовой хроматографии используются различные гели с трехмерной сетчатой структурой – декстрановые, полиакриламидные, агарозные, гели на основе стирола и дивинилбензола, пористые силикагели, а также пористые стеклянные гранулы. Все гели и стекла имеют поры строго определенных размеров, по возможности, не содержат ионогенных групп и не обладают химическим или биологическим сродством к анализируемым веществам.

Разделение смеси веществ происходит за счет того, что в поры геля могут диффундировать только вещества, размеры молекул которых не

превышают размеров пор. В результате диффузии внутрь пор геля молекулы меньшего размера проходят больший путь и вымываются с геля позже, чем более крупные молекулы, не проникающие в поры геля.

Молекулярно-ситовая хроматография используется для выделения и очистки биополимеров – белков, пептидов, поли- и олигосахаридов, нуклеиновых кислот и даже клеток, например лимфоцитов, эритроцитов и др. Другая область применения гель-фильтрации – определение молекулярных масс белков. Гель-фильтрационная хроматография используется также в промышленном производстве различных белковых препаратов, в частности ферментов и гормонов.

По форме проведения процесса хроматография бывает *колоночная, капиллярная, бумажная, тонкослойная*. Наиболее широкое распространение получила колоночная хроматография.

В зависимости от способа перемещения разделяемой смеси вдоль слоя сорбента хроматографический процесс может быть *фронтальным, вытеснительным* или *проявительным (элюентным)*.

Фронтальная хроматография заключается в том, что сначала колонку промывают растворителем, а затем непрерывно пропускают раствор смеси веществ (например, *A, B* и *C*). Через некоторое время после начала процесса плохо сорбируемый компонент смеси (например, *A*) переместится вперед в виде зоны чистого вещества и первым выйдет с раствором из колонки. За зоной чистого вещества *A* будет располагаться зона смеси второго компонента с первым, т. е. *A + B*. Третья зона будет содержать смесь трех компонентов: *A + B + C*. Фронтальный вариант редко используется для анализа, так как он не дает полного разделения компонентов смеси. Наиболее часто его применяют для концентрирования одного из компонентов смеси веществ, а также для определения некоторых физико-химических характеристик исследуемых веществ.

В *вытеснительном* варианте хроматографии компоненты разделяемой смеси перемещаются по слою сорбента потоком сильно сорбирующегося вещества – вытеснителя. По мере их продвижения через колонку образуются зоны чистых веществ *A* и *B*, разделенные зоной их смеси. Этот метод, как и фронтальный, не всегда дает полное разделение, поэтому он очень редко используется в аналитических целях, его чаще применяют для препаративного разделения.

Наибольшее распространение находит *проявительная* или *элюентная* хроматография. В этом случае для разделения компонентов применяют процесс *элюирования*. В колонку вводят небольшую порцию анализируемой смеси и промывают колонку растворителем (*элюентом*), который практически не задерживается на адсорбенте. По мере прохождения элюента через колонку вещества перемещаются с ним с разной скоростью, зависящей от сродства к сорбенту. В результате на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбируемое вещество, затем другие вещества в

порядке возрастания сорбируемости. Движение зон (полос) сорбированных веществ при разделении на колонке показано на рис. 3.1.

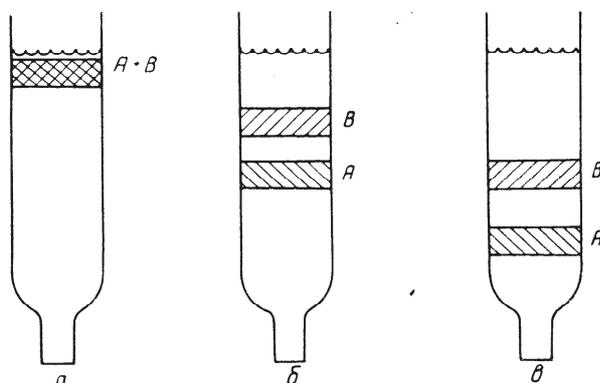


Рис. 3.1. Схема хроматографического разделения: а – после ввода смеси в колонку; б – частичное элюирование; в – после длительного элюирования (полное разделение)

Элюирование проводят до тех пор, пока отдельные вещества не выйдут одно за другим из колонки. Каждый компонент регистрируют непосредственно на выходе из колонки, используя подходящий аналитический сигнал (оптический, электрохимический и др.) с помощью устройств, называемых детекторами.

В результате получают зависимость – *хроматограмму*, состоящую из ряда пиков, каждый из которых соответствует отдельному компоненту смеси (рис. 3.2). По оси абсцисс откладывают время или объем элюата, а по оси ординат концентрацию веществ, либо величину, связанную с ней (оптическую плотность, электропроводность).

Положение пика на хроматограмме используют для качественного анализа, высоту или площадь пика – для количественного анализа.

Основой качественного хроматографического анализа является постоянство времени выхода (времени удерживания) каждого вещества из колонки на данном сорбенте, при данной температуре и при использовании определенного растворителя, зависящего от характера межмолекулярных взаимодействий в системе сорбат – сорбент при строго фиксированных условиях анализа, т. е. постоянное положение пика каждого компонента смеси веществ на хроматограмме. Идентификация исследуемых веществ проводится сравнением полученных и табличных данных. Условия опыта, естественно, не должны отличаться

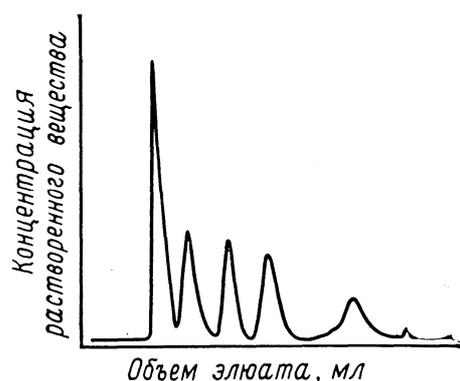


Рис. 3.2. Хроматограмма

от тех, в которых были получены табличные данные.

Основой *количественного хроматографического анализа* является сопоставление высот пиков или площадей под пиками веществ на хроматограммах с учетом коэффициентов чувствительности используемого детектирующего устройства к анализируемым веществам. Для узких пиков предпочтительнее измерение высоты, для широких размытых – измерение площади. В тонкослойной и бумажной хроматографии измеряется интенсивность окрашенного или светящегося пятна на хроматограмме.

3.3. Хроматографические характеристики

Из всех видов хроматографии наибольшее значение имеет элюентная колоночная хроматография. Рассмотрим основные характеристики метода.

Любой сорбционный процесс характеризуется *константой распределения* ($K_{распред}$), которая представляет собой отношение равновесной концентрации вещества в одной определенной форме в неподвижной фазе (C_1) и концентрации вещества в той же форме в подвижной фазе (C_2):

$$K_{распред} = \frac{C_1}{C_2}.$$

В хроматографии определяемое вещество может присутствовать не только в одной форме. В этом случае используют *коэффициент распределения* D , равный отношению концентраций всех форм вещества в неподвижной ($C_{неподв}$) и подвижной фазах ($C_{подв}$):

$$D = \frac{C_{неподв}}{C_{подв}}.$$

Коэффициент распределения зависит от природы определяемого вещества, природы неподвижной и подвижной фаз, температуры, рН, концентрации и ионной силы раствора.

Скорость движения зоны данного вещества обратно пропорциональна D . При больших значениях коэффициента распределения большая часть вещества находится в неподвижной фазе и перемещается медленно. Если значение D мало, то вещество быстро продвигается по колонке с подвижной фазой. Два любых вещества с различными коэффициентами распределения будут перемещаться с разными скоростями, что является определяющим фактором хроматографического разделения.

Для каждого вида хроматографии коэффициент распределения имеет свое название: в распределительной и ионообменной – коэффициент распределения, в адсорбционной – коэффициент адсорбции, в гелефильтрационной – коэффициент проницаемости.

Пусть разделяются два вещества А и В, тогда степень их разделения выражается *коэффициентом разделения* α , равным отношению коэффициентов распределения веществ А и В:

$$\alpha = \frac{D_A}{D_B}.$$

Параметры хроматограммы. Сорбционная способность неподвижной фазы по отношению к разделяемым веществам характеризуется *временем удерживания* t_R . Время удерживания – это расстояние на хроматограмме от момента введения вещества в слой сорбента до момента появления на выходе из слоя сорбента вещества в максимальной концентрации в потоке подвижной фазы (рис. 3.3).

С параметром t_R связан параметр, называемый *индексом удерживания* R :

$$R = \frac{t_m}{t_R},$$

где t_m – время прохождения растворителя или неудерживаемого вещества через ту же колонку (мертвое время).

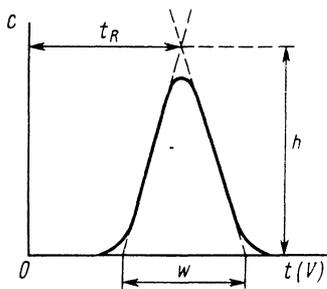


Рис. 3.3. Характеристики хроматографического пика

Для каждого вещества характерно свое значение R , поэтому время и индекс удерживания могут служить для идентификации веществ.

Для характеристики хроматограммы используют также *объем удерживания* V_R :

$$V_R = t_R v,$$

где v – объемная скорость подвижной фазы.

Высота выходной кривой (пика) h – это перпендикуляр, опущенный из максимума пика на нулевую линию. Нулевая линия – часть хроматограммы, полученная при регистрации сигнала детектора во время выхода из колонки чистой подвижной фазы.

Каждый пик характеризуется своей *шириной* w , равной основанию треугольника, образованного касательными к левой и правой ветвям пика (рис. 3.3).

Полнота разделения и правильность определения зависят от того, насколько отделены пики друг от друга, желательно, чтобы они не перекрывались, в то же время расстояние между ними не должно быть очень большим, так как это неоправданно замедляет анализ. Для характеристики разделения пиков служит величина, называемая *разрешением* R_S . Если пики имеют примерно одинаковую ширину, то

$$R_S = \frac{\Delta t_R}{w}.$$

Показано, что для симметричных пиков оптимальным является значение R_S , равное 1,5, если пики ассиметричны, оптимальное значение R_S будет больше.

3.4. Виды хроматографии

Рассмотрим отдельные наиболее широко применяемые виды хроматографии.

3.4.1. Ионообменная хроматография

Ионы некоторых твердых веществ способны к обмену с ионами того же заряда и знака, находящимися в растворах электролитов. Ионообменными свойствами обладают многие природные объекты, например, почвы.

Вещества, способные к обмену ионами, называют *ионообменниками* или *ионитами*. Иониты – полизарядные материалы, нерастворимые в воде, содержащие связанные *ионогенные* группы и группы, способные к ионному обмену.

Ионообменная хроматография основана на обратимом (стехиометрическом) обмене ионов, содержащихся в растворе, на подвижные ионы ионообменника.

В зависимости от знака заряда обмениваемых ионов различают *катиониты* и *аниониты*. В качестве ионитов используют оксид алюминия, алюмосиликаты, фосфат циркония, целлюлозу и др. В настоящее время широкое применение в аналитической химии находят синтетические полимерные иониты, называемые *ионообменными смолами*.

Обычно синтетический ионообменник представляет собой полимер, например поперечно-сшитый полистирол (сополимер стирола и дивинилбензола), называемый матрицей (R). С матрицей ковалентно связаны функциональные ионогенные группы.

Катиониты содержат кислотные группы, например сульфо-, карбоксил-, гидроксил-, фосфоновую группы: $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$. Подвижными остаются только ионы водорода этих групп или замещающие их катионы. У анионитов активными группами являются основные группы, например $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $\equiv\text{N}$.

В общем катионообменный и анионообменный цикл можно показать так:



Синтетические иониты выпускают в виде сферических гранул.

Важной количественной характеристикой ионита является его *обменная емкость*. Она выражается количеством миллимолей эквивалентов (мэкв) ионов, обмениваемых 1 г сухого ионита или 1 мл набухшего ионита. (Если сухую смолу поместить в водный раствор, она поглощает какое-то количество воды и набухает). Например, емкость сухой сульфированной

смолы, находящейся в H^+ -форме (катионит КУ-2), составляет около 5 мэкв/г, а емкость влажной смолы, помещенной в колонку, равна примерно 1,8 мэкв/мл.

Применение ионного обмена в химическом анализе. *Определение солей.* Используя катионит в H^+ -форме, можно определить большинство растворимых солей. При пропускании анализируемого раствора через катионит происходит обмен ионов металла на эквивалентное количество ионов водорода. Содержание катиона металла в образце определяют титрованием образующейся кислоты раствором щелочи.

Деионизация воды – очистка воды методом ионного обмена. Деионизация воды позволяет получить воду очень высокой чистоты. Очищаемую воду пропускают через колонку, содержащую катионит в H^+ -форме, а затем через колонку с анионитом в OH^- -форме. При этом примеси катионов и анионов, содержащиеся в воде, поглощаются, а выделяющиеся ионы H^+ и OH^- образуют воду. Деионизованная вода необходима для выполнения анализов высокочистых веществ.

Отделение мешающих ионов. Ионный обмен используют для отделения мешающих ионов.

Например, ионы железа (III) и ионы калия мешают гравиметрическому определению сульфат-ионов, соосаждаясь с сульфатом бария. Чтобы устранить их влияние, раствор анализируемого образца пропускают через колонку с катионитом в H^+ -форме и мешающие примеси обменивают на катионы водорода. После этого получают осадок сульфата бария, не содержащий посторонних катионов.

3.4.2. Распределительная хроматография

В распределительной хроматографии разделение веществ обусловлено различиями в коэффициентах распределения компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами – подвижным и неподвижным растворителями. Таким образом, распределительная хроматография относится к жидкость-жидкостной хроматографии.

Подвижной фазой в распределительной хроматографии служит органический растворитель, не смешивающийся с неподвижной фазой. Неподвижной фазой обычно служит вода, адсорбированная на твердом носителе. В качестве носителей чаще используют силикагель (кремниевая кислота), целлюлозу, крахмал и другие вещества, хорошо удерживающие молекулы воды на своей поверхности.

Иногда воду используют в качестве подвижной фазы. Тогда на гидрофобный носитель (например, фторопласт) наносят тонкий слой органического растворителя. Этот метод называют хроматографией с обращенной фазой или экстракционной хроматографией.

Бумажная хроматография. Вариантом распределительной хрома-

тографии является *бумажная хроматография*, в которой подвижной фазой служит органический растворитель, а неподвижной – вода, адсорбированная на носителе, роль которого выполняет бумага. Для бумажной хроматографии можно использовать многие сорта фильтровальной бумаги, обычно более плотные (синяя лента), а также специальные сорта бумаги для хроматографии.

Для получения хроматограммы берут полоску бумаги длиной 30 – 50 см и шириной 1,5 см. На один из концов этой полоски бумаги с помощью капилляра наносят каплю анализируемого раствора. Затем этот конец бумаги опускают в ванночку с растворителем так, чтобы растворитель не касался нанесенного пятна. Под действием капиллярных сил растворитель передвигается по бумаге, при этом компоненты смеси непрерывно перераспределяются между подвижной и неподвижной фазами согласно своим коэффициентам распределения, образуя зоны, содержащие разделенные компоненты. После разделения бумажную хроматограмму высушивают и проявляют, т. е. обрабатывают раствором реагента, дающего цветные реакции с компонентами исследуемого раствора.

Основной характеристикой бумажной хроматографии является эмпирический параметр R_f , иногда называемый *подвижностью*. Величина R_f равна отношению расстояния, пройденного веществом от стартовой линии до центра его зоны (l), к расстоянию, пройденному растворителем (L) за определенное время:

$$R_f = \frac{l}{L} .$$

При достаточном постоянстве условий опыта R_f определяется природой вещества, растворителя, а также сортом хроматографической бумаги.

По величине R_f , используя справочные таблицы или эталонные растворы определяемых веществ, производят идентификацию (качественный анализ) смеси.

Количество вещества в каждом пятне определяют визуально по интенсивности окраски по сравнению с эталоном; по площади пятна; для люминесцирующих веществ – по интенсивности люминесценции; методом отражательной спектрофотометрии, измеряя интенсивность света, отраженного окрашенным пятном и др.

По технике выполнения различают одномерную, двумерную и радиальную бумажную хроматографию.

Для получения двумерных хроматограмм процесс проводят дважды под углом 90° , применяя две различные системы растворителей. Такая методика позволяет получить более четкое разделение сложных смесей.

Для получения радиальной хроматограммы используют круглый бумажный лист, который накладывают на борта чашки Петри с растворителем. В центре бумажного листа оставляют небольшое отверстие, в которое помещают фитилек из фильтровальной бумаги. На небольшом расстоянии

от центра наносят пипеткой одну каплю анализируемого раствора. Растворитель поднимается по бумажному фитильку и продвигается от центра бумажного листа к его краям, захватывая компоненты пробы. После проявления хроматограммы на бумаге образуются концентрические полосы компонентов, по которым можно определить состав анализируемой пробы.

Метод бумажной хроматографии применяют для разделения и определения очень малых количеств веществ – это микрометод. Особой ценностью метода является высокая разрешающая способность. Примером использования распределительной хроматографии на бумаге является разделение смесей аминокислот.

Тонкослойная хроматография. Метод *тонкослойной хроматографии (ТСХ)* по чувствительности и возможности идентификации наряду с методом бумажной хроматографии превосходит все приемы разделения и концентрирования малых количеств веществ из сложных смесей.

Разделение в этом методе производится в тонком слое сорбента, в качестве которого используют силикагель, оксид алюминия, порошок целлюлозы, крахмал, гипс.

На стеклянную пластинку наносят равномерный тонкий слой сорбента. Раствор анализируемого образца наносят из микропипетки на небольшом расстоянии от края пластинки (стартовая линия). Край пластинки под небольшим углом помещают в растворитель так, чтобы линия старта не касалась растворителя. Под действием адсорбционных сил растворитель поднимается вверх по пластинке. Компоненты образца перемещаются по пластинке с различной скоростью и в результате удаляются друг от друга. После подъема растворителя хроматограмму сушат и проявляют так же, как в бумажной хроматографии.

Сорбент может быть нанесен на пластинку в виде пасты (закрепленный слой), тонкого порошка (незакрепленный слой) или быть приготовленным при обжиге силикагеля на стеклянной пластине.

Для качественного анализа используют величину параметра R_f . Количественные определения в ТСХ могут быть сделаны непосредственно на пластинке, или после удаления вещества с пластинки. При непосредственном определении на пластинке измеряют тем или иным методом площадь пятна и по заранее построенному градуировочному графику находят количество вещества. Применяют также прямое фотометрирование пластинки, измеряя оптическую плотность в центре пятна. Наиболее точным считается метод, в котором вещество после разделения удаляется с пластинки и анализируется спектрофотометрическим или иным методом. Удаление вещества с пластинки обычно производят механическим путем, иногда применяют вымывание подходящим растворителем.

Достоинством метода тонкослойной хроматографии является быстрое выполнение анализа, так как в тонком слое носителя подвижный растворитель движется быстрее, чем по бумаге, пятна получают более чет-

кими. Кроме того, в этом методе появляется возможность применять более широкий круг реагентов, в том числе использовать реагенты, разрушающие бумагу (H_2SO_4 , I_2).

3.4.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Хроматографирование на колонке – длительный процесс, поскольку скорость продвижения через пористый носитель раствора под действием силы тяжести очень мала. Для уменьшения продолжительности разделения жидкую подвижную фазу пропускают через колонку со скоростью в 100 раз выше, чем в обычной колоночной хроматографии. Это делают под высоким давлением (от 2 до 40 МПа). Такой метод называют *высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ)*.

Следует отметить, что при повышении скорости потока не успевает устанавливаться равновесие между фазами, так как скорость установления равновесия контролируется в основном диффузией веществ, которая в жидкостях протекает медленно. Чтобы свести к минимуму влияние диффузии и ускорить массообмен, используют как можно меньший размер частиц твердого носителя и как можно тоньше пленку нанесенного растворителя.

Колонки изготавливают чаще всего из нержавеющей стали. Внутренний диаметр колонки составляет 1 – 3 мм, ее длина в зависимости от сложности разделения может быть от 0,5 до 1,0 м. Образец вводят в колонку микрошприцем.

Преимуществом ВЭЖХ является не только большая скорость разделения, но и высокая разрешающая способность и чувствительность.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию используют для анализа смесей высококипящих органических соединений, в том числе витаминов, нуклеиновых кислот, пестицидов, аминокислот, жиров, углеводов и др.

3.4.4. Газовая хроматография

Газовая хроматография применяется для разделения и определения компонентов летучих смесей. Метод основан на различной растворимости газов в жидкостях или различной адсорбции их на поверхности твердых веществ.

Большим преимуществом газовой хроматографии является быстрота разделения, которая определяется, в основном, временем прохождения компонентов газовой смеси через колонку.

Подвижной фазой в газовой хроматографии является газ – азот, гелий, водород и др. Пробу подают в виде паров, неподвижной фазой служит либо твердое вещество, либо жидкость, нанесенная на твердый носи-

тель.

Разделение летучих смесей проводят в специальных приборах – *газовых хроматографах*. Разделяемую смесь вводят в колонку с помощью микрошприца. В системе ввода поддерживают такую температуру, которая обеспечивает испарение образца. Вместе с газом-носителем, который подается с помощью крана из баллона, введенный газообразный образец попадает в колонку, где происходит разделение компонентов. Хроматографические колонки различаются по размерам, форме (спиральные, капиллярные) и конструкционным материалам. Колонки помещают в термостат, так как температура является важным фактором процесса разделения.

Компоненты исследуемой смеси распределяются между движущимся газом-носителем и неподвижной фазой и перемещаются по колонке с различными скоростями, которые зависят от природы разделяемых компонентов, природы неподвижной фазы и температуры колонки. После этого отдельные компоненты разделяемой смеси в порядке их расположения в колонке поступают в детектор, подключенный к записывающему устройству.

В газовых хроматографах обычно применяют детекторы по теплопроводности или пламенно-ионизационные детекторы. Детектор по теплопроводности измеряет разность теплопроводностей чистого газа-носителя и газа-носителя, содержащего отдельные компоненты. Сигнал пламенно-ионизационного детектора пропорционален числу ионов, образующихся при сгорании газа-носителя с разделяемыми компонентами в пламени водорода. Этот детектор на несколько порядков чувствительнее, чем детектор по теплопроводности.

С помощью газовой хроматографии разделяют и анализируют смеси летучих углеводородов, жирных кислот, эфиров, спиртов, альдегидов, кетонов, аминов, фенолов, аминокислот и др.

Примеры использования хроматографии со спектрометрическим окончанием в сертификации продукции пищевого назначения.

Анализ микробных токсинов.

Микотоксины являются вторичными метаболитами микроскопических плесневых грибов. Ввиду достаточно широкой распространенности плесени в местах хранения продуктов питания и кормов опасность загрязнения продовольствия метаболитами высока. Микробные токсины проявляют токсический эффект в очень малых концентрациях и способны быстро диффундировать в глубину продуктов. Микотоксины – гепатотропные яды, поражающие печень. Наиболее часто микотоксины встречаются в продуктах растительного происхождения – кукурузе 0,5–600 мкг В₁/кг, 0–80 мкг В₂ и G₁/кг (частота обнаружения > 4 %), – пшенице 0–13 мкг В₁/кг (частота обнаружения > 1 %), – горохе 0,5–4 мкг В₁/кг (частота обнаружения > 1,5 %), – комбикормах 0–60 мкг В₁/кг (частота обнаружения > 2 %), – орехах 0,5–200 мкг В₁/кг (частота обнаружения > 5 %), – мясо-

растительных продуктах 0–10 мкг В₁/кг (частота обнаружения > 1 %).

Для афлатоксина В₁ ПДК в мясных и многих других пищевых продуктах установлена на уровне 5 мкг/кг, в молоке ПДК В₁ – 1 мкг/л, М₁ – 0,5 мкг/л. Для зерна и зернобобовых ПДК В₁ – 5 мкг/кг, ПДК зеараленона – 1 мг/кг, ПДК Т-2 токсина – 0,1 мг/кг, ПДК дезоксиниваленола – 1 мг/кг, патулина в овощах – 0,05 мг/кг.

Метод определения основан на экстракции афлатоксинов из образцов органическими растворителями с последующей очисткой экстракта и количественном определении методом жидкостной хроматографии.

Подготовка к определению. Афлатоксины являются канцерогенными веществами. Все работы с ними проводятся под тягой с соблюдением правил безопасной работы с вредными и опасными химическими веществами. Детоксикацию афлатоксинов проводят обработкой 10 %-ным раствором хлорамина, затем 1 % раствором натрия гидрокарбоната. При попадании на кожу пораженные участки промывают 1 % раствором борной кислоты и водой. Работу с кристаллическими афлатоксинами и их растворами проводят в вытяжном шкафу с применением индивидуальных средств защиты (перчатки, маска и т.п.).

Очистка ваты. В коническую колбу помещают хлопковую вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

Подготовка хроматографической камеры. В хроматографическую камеру за 1 ч до начала хроматографирования заливают смесь растворителей для насыщения ее парами. Объем растворителя в камере должен находиться на высоте не более чем 0,5 см от уровня дна.

Подготовка пластин для тонкослойной хроматографии. Пластины для ТСХ типа "Силуфол" перед употреблением промывают. Для этого в хроматографическую камеру наливают систему растворителей бензол-этилацетат-уксусная кислота (100:50:1) или ацетон-аммиак (1:1) на высоту 5–7 мм и помещают туда пластинки в вертикальном положении. После того, как линия фронта растворителя поднимется, не доходя 10 мм до верха пластинки, ее вынимают, высушивают на воздухе, затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 60 мин. Перед употреблением с вертикальных сторон пластинки удаляют слой в 3 мм, что способствует выравниванию фронта растворителя. Пластинки сохраняют в эксикаторе над осушителем.

Очистка силикагеля. В стакан насыпают силикагель, заливают гексаном, перемешивают, гексан сливают. Промывку повторяют три раза. Промытый силикагель прокаливают при температуре 180 °С в течение 2 ч. Хранят в плотно закрытой стеклянной банке.

Подготовка хроматографа ВЭЖХ. Подготовку проводят в соответствии с техническим описанием хроматографа, получая на экране или ре-

гистрирующем устройстве устойчивую горизонтальную базовую линию при установленных параметрах записи хроматограммы.

Приготовление стандартных растворов афлатоксинов. Навески 1 мг кристаллических афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂, М₁ с соблюдением необходимых предосторожностей растворяют в мерных колбах в объеме 100 мл в смеси бензол-ацетонитрил (98:2) и получают растворы с концентрацией 10 нг/мкл. Для получения рабочих растворов стандартов афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂, М₁ с концентрациями 0,5; 0,25; 0,2 и 0,1 нг/мкл соответственно в мерную колбу на 50 мл помещают 2,5; 1,25; 1,0; 0,5 мл стандартного раствора афлатоксина и доводят объем раствора до метки смесью бензол-ацетонитрил (98:2).

Для получения рабочей смеси стандартов афлатоксинов в мерную колбу вносят 2,5 мл стандартного раствора 10 нг/мкл афлатоксина В₁, 1,25 мл раствора В₂, 1 мл раствора G₁, 0,5 мл раствора G₂, 1 мл раствора М₁. Срок хранения стандартного раствора афлатоксинов при температуре 0 °С – 1 год.

Проведение анализа.

Экстракция. Навеску 25 г измельченного образца помещают в плоскодонную коническую колбу вместимостью 250 мл, перемешивают с 25 мл 10 % раствора хлорида натрия, добавляют 100 мл ацетона и встряхивают смесь в течение 30 мин. Смесь фильтруют через бумажный фильтр и отбирают 50 мл профильтрованного экстракта

Очистка экстракта. К 50 мл фильтрата добавляют 20 мл 15 % раствора ацетата свинца и 30 мл дистиллированной воды, перемешивают и оставляют стоять в темноте на 10 мин. Смесь фильтруют через бумажный фильтр и отбирают 80 мл фильтрата. Фильтрат обезжиривают в делительной воронке гексаном (2 x 30 мл), затем переэкстрагируют в хлороформ, добавляя 1-й раз 30 мл хлороформа, 2-й раз смесь хлороформ-ацетон, 3:1 – 45 мл. Объединенные хлороформные экстракты помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 7 г безводного сульфата натрия, встряхивают и оставляют стоять в темноте на 30 мин. Раствор фильтруют через вату, помещенную на химическую воронку в круглодонную колбу.

Осушенный и профильтрованный хлороформный экстракт упаривают на роторном испарителе до остаточного объема 1 мл и далее очищают колоночной хроматографией.

На пористое дно хроматографической колонки 30 x 2 см помещают кусочек ваты, затем слой 5 мм безводного сульфата натрия, наливают суспензию 2 г силикагеля в хлороформе, сверху насыпают слой 20 мм сульфата натрия, хлороформу дают стечь, затем на колонку наносят хлороформный экстракт образца и элюируют 60 мл смеси хлороформ-ацетон (9:1).

Элюат упаривают досуха на роторном испарителе.

Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку, упаривают или отдувают растворитель в токе инертного газа досуха, остаток растворяют в 400 мкл хлороформа (экстракт А).

Жиры и масла в количестве 15 г смешивают с 25 мл гексана, 5 мл 4 % раствора хлорида натрия и 100 мл ацетонитрила и встряхивают смесь в течение 45 мин, затем отделяют нижний ацетонитрильный слой.

Ацетонитрильный экстракт обезжиривают в делительной воронке гексаном (3x50 мл), высушивают сульфатом натрия и упаривают досуха, остаток растворяют в 2 мл хлороформа и проводят очистку колоночной хроматографией.

На колонку с 4 г силикагеля наносят хлороформный экстракт, дают хлороформу стечь, промывают 10 мл смеси гексан-бензол-эфир (1:1:2). Афлатоксины элюируют 100 мл смеси хлороформ-ацетон (9:1). Элюат упаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку, упаривают или отдувают растворитель в токе инертного газа досуха, остаток растворяют в 400 мкл хлороформа.

Молоко в количестве 50 мл (5 г сухого молока) смешивают с 50 мл воды, 10 мл раствора, содержащего 2 г хлорида натрия и 0,24 г лимонной кислоты, 120 мл хлороформа при температуре 35 °С, смесь встряхивают 3 мин и подвергают центрифугированию при 4000 G в течение 15 мин, отделяют нижний хлороформный слой, высушивают его над 10 г безводного сульфата натрия, отфильтровывают, измеряют объем экстракта V_{M_1} и упаривают его до 5 мл.

Проводят очистку экстракта колоночной хроматографией. В колонку помещают 5 мм слой ваты, заливают суспензию 2 г силикагеля в гексане, сверху насыпают слой безводного сульфата натрия. Гексану дают стечь так, чтобы остался слой в 5 мл над слоем сульфата натрия. На колонку наносят 5 мл хлороформного экстракта, дают хлороформу стечь, промывают 25 мл смеси толуол-уксусная кислота (9,5:0,5), 25 мл гексана и 25 мл смеси эфир-гексан-ацетонитрил (5:3:1). Афлатоксин M_1 элюируют с колонки 60 мл смеси хлороформ-ацетон (4:1). Элюат упаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку, упаривают или отдувают растворитель в токе инертного газа досуха, остаток растворяют в 200 мкл хлороформа.

Подтверждение наличия афлатоксинов двумерной ТСХ. На хроматографическую пластинку в правый нижний угол на расстоянии 1,5 см от краев наносят 20 мкл (из 400 мкл) очищенного экстракта пробы. Разметку пластинки делают карандашом, проводя линии на 1,5 см от правого и нижнего края, 3 см – от верхнего края и 3,5 см от левого края. В правом верхнем углу наносят 5 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов. В левом нижнем углу на расстоянии 1,2 и 3 см от левого края и 1,5 см от нижнего края пластины наносят 2, 5 и 10 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью эфир-метанол-

вода (94:4,5:1,5) и проводят процесс хроматографирования в одном направлении до достижения фронтом растворителей линии, проведенной карандашом на расстоянии в 3 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают и сушат на воздухе в течение 5 мин, затем проводят хроматографирование в другом направлении, повернув пластинку вправо на 90°, в системе хлороформ-ацетон-вода (90:10:1). После достижения фронтом растворителя второй линии, проведенной карандашом, пластинку подсушивают на воздухе и рассматривают в УФ-свете.

Идентификацию афлатоксина M_1 проводят методом ТСХ, хроматографируя в 1-м направлении в системе эфир-метанол-вода (90:8:2), во втором направлении в смеси хлороформ-ацетон-изопропиловый спирт (85:10:5). Наличие на пластинке пятен из экстракта, соответствующих по хроматографической подвижности и цвету флуоресценции пятнам стандартов афлатоксинов свидетельствует о возможном присутствии афлатоксинов в пищевом продукте.

Пластинку опрыскивают раствором азотной кислоты в воде (1:2) и рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Если цвет флуоресценции стандартов афлатоксинов изменился с синего (B_1 , B_2) или сине-зеленого (G_1 , G_2) на желтый, а цвет флуоресценции пятен экстракта не изменился на желтый, то афлатоксины в пробе отсутствуют. Изменение цвета флуоресценции пятен из экстракта на желтый свидетельствует о наличии афлатоксинов.

Определение афлатоксинов B_1 , B_2 , G_1 , G_2 методом ВЭЖХ. Условия хроматографирования: подвижная фаза эфир-метанол-вода 95:4:1, скорость потока 1 мл/мин. Для ВЭЖХ используют очищенные растворители квалификации «для ВЭЖХ», профильтрованные через фильтр 0,45 мкм.

Флуоресцентный детектор настраивают на длину волны возбуждающего излучения 360 нм и эмиссионную длину волны 418 нм. Чувствительность детектора устанавливают таким образом, чтобы пик сигнала введенного в хроматограф 1 нг афлатоксина B_1 соответствовал высоте пика на полную шкалу измерения экрана или самописца.

Для калибровки хроматографа с флуоресцентным детектором вводят 1 мкл рабочего раствора афлатоксинов B_1 , B_2 , G_1 , G_2 (соответственно 0,5 нг афлатоксина B_1 , 0,25 нг афлатоксина B_2 , 0,2 нг афлатоксина G_1 и 0,1 нг афлатоксина G_2), а также 2 мкл рабочего раствора афлатоксинов B_1 , B_2 , G_1 , G_2 (соответственно 1 нг афлатоксина B_1 , 0,5 нг афлатоксина B_2 , 0,4 нг афлатоксина G_1 и 0,2 нг афлатоксина G_2) и определяют площади соответствующих пиков.

Для хроматографической колонки типа «Ultrasphere SF» 25 x 0,46 см времена удержания афлатоксинов для B_1 составляет 9–10 мин, B_2 11,0–11,8 мин, для G_1 13–14 мин, для G_2 15,6–17,0 мин в зависимости от состава подвижной фазы и времени уравнивания колонки.

При высоком содержании афлатоксинов (>10 мкг/кг по афлатоксину

V_1) используют УФ-детектор.

Для калибровки хроматографа с УФ-детектором вводят 10 мкл рабочего раствора афлатоксинов B_1, B_2, G_1, G_2 (соответственно 5 нг афлатоксина B_1 , 2,5 нг афлатоксина B_2 , 2 нг афлатоксина G_1 и 1 нг афлатоксина G_2), 15 мкл рабочего раствора афлатоксинов B_1, B_2, G_1, G_2 (соответственно 7,5 нг афлатоксина B_1 , 3,75 нг афлатоксина B_2 , 3 нг афлатоксина G_1 и 1,5 нг афлатоксина G_2), 20 мкл рабочего раствора афлатоксинов B_1, B_2, G_1, G_2 (соответственно 10 нг афлатоксина B_1 , 5 нг афлатоксина B_2 , 4 нг афлатоксина G_1 и 2 нг афлатоксина G_2) и определяют площади соответствующих пиков. В инжектор хроматографа вводят 20 мкл очищенного экстракта (экстракт А).

Расчет концентрации афлатоксина X (мкг/кг) в пищевом продукте проводят с помощью автоматической программы обработки хроматографических данных по формуле:

$$X = V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 \cdot m_{СТ} \cdot S / V_2 \cdot V_4 \cdot V_6 \cdot M \cdot S_{СТ},$$

где V_1 – объем водно-ацетоновой смеси, мл (125 мл); V_2 – объем водно-ацетонового фильтрата, взятый для анализа, мл (50 мл); V_3 – объем водно-ацетонового фильтрата и раствора ацетата свинца, мл (100 мл); V_4 – объем фильтрата после очистки ацетатом свинца, мл (80 мл); V_5 – объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ, мл (400 мкл); V_6 – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа, мл (20 мкл); $m_{СТ}$ – количество нг афлатоксина в введенном объеме стандарта, нг; $S_{СТ}$ – площадь пика стандарта афлатоксина, mm^2 или условных единиц; S – площадь пика афлатоксина во введенном объеме экстракта, mm^2 или условных единиц; M – навеска продукта, г.

При анализе масел расчет концентрации афлатоксина X (мкг/кг) в масле проводят по формуле: $X = V_1 \cdot m_{СТ} \cdot S / V_2 \cdot M \cdot S_{СТ}$, где V_1 – объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (200 мкл); V_2 – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл); $m_{СТ}$ – количество нг афлатоксина в введенном объеме стандарта, нг; $S_{СТ}$ – площадь пика стандарта афлатоксина, mm^2 или условных единиц; S – площадь пика афлатоксина во введенном объеме экстракта, mm^2 или условных единиц; M – навеска продукта, г.

Анализ афлатоксина M_1 в молоке методом ВЭЖХ. Условия хроматографирования: подвижная фаза эфир-метанол-вода 90:8:2, скорость потока 1 мл/мин. Для ВЭЖХ используют очищенные растворители квалификации «для ВЭЖХ», профильтрованные через фильтр 0,45 мкм.

Флуоресцентный детектор настраивают на длину волны возбуждающего излучения 360 нм и эмиссионную длину волны 418 нм. Чувствительность детектора устанавливают таким образом, чтобы пик сигнала введенного в хроматограф 0,6 нг афлатоксина M_1 соответствовал высоте пика на полную шкалу измерения экрана или самописца.

Для калибровки хроматографа с флуоресцентным детектором вводят

1, 2, 3 мкл рабочего раствора афлатоксина M_1 (соответственно 0,2; 0,4; 0,6 нг афлатоксина M_1) и определяют площади пиков.

Для хроматографической колонки типа «Ultrasphere SF» 25 x 0,46 см время удержания афлатоксина M_1 составляет 8–9 мин в зависимости от состава подвижной фазы и времени уравнивания колонки.

При высоком содержании афлатоксинов (>10 мкг/кг по афлатоксину M_1) применяют УФ-детектор, используя для калибровки 10-кратные количества указанных стандартов. В инжектор хроматографа вводят 20 мкл очищенного экстракта (экстракт А).

Расчет концентрации афлатоксина M_1 в молоке, X (мкг/кг) в пищевом продукте проводят с помощью автоматической программы обработки хроматографических данных по формуле:

$$X = V_1 \cdot V_3 \cdot m_{СТ} \cdot S / V_2 \cdot V_4 \cdot M \cdot S_{СТ},$$

где V_1 – объем хлороформа взятого для экстракции, мл (120 мл); V_2 – объем хлороформного экстракта, взятого для анализа, мл; V_3 – объем очищенного экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ, мл (200 мкл); V_4 – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа, мл (20 мкл); $m_{СТ}$ – количество нг афлатоксина M_1 в введенном объеме стандарта, нг; $S_{СТ}$ – площадь пика стандарта афлатоксина, $мм^2$ или условных единиц; S – площадь пика афлатоксина во введенном объеме экстракта, $мм^2$ или условных единиц; M – навеска продукта, г. За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания афлатоксинов любой пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов $\pm 0,15X$.

Минимальный уровень обнаружения по афлатоксину V_1 составляет для флуоресцентного детектора 0,1 нг в пробе, для УФ-детектора 1 нг во вводимой в хроматограф пробе (20 мкл), что соответствует 0,05 нг/мкл для УФ-детектора и 0,005 нг/мкл для флуоресцентного детектора при степени извлечения афлатоксинов из пробы 75–90 %. Предел определения содержания афлатоксинов методом ТСХ и методом ВЭЖХ с УФ-детектором – 0,001 мг/кг, методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектором – 0,0002 мг/кг.

Анализ пестицидов. Пестициды относятся к ядохимикатам, в основном, к группе сильнодействующих ядовитых веществ ($LD_{50} < 50$ мг/кг). Вследствие интенсификации сельскохозяйственного производства существует реальная опасность загрязнения продукции растительного происхождения остатками пестицидов.

В основу количественного определения положен принцип экстрагирования пестицидов органическими растворителями с последующим по-

лучением очищенного раствора и определением содержания пестицида в таком растворе, как правило, хроматографическим методом. Для пестицидов в зависимости от объекта и типа самого пестицида величины ПДК составляют от 0,1 до 0,001 мг/кг.

В действующих в настоящее время нормативах регламентируется остаточное содержание хлорорганических пестицидов – ГХЦГ, ДДТ и 2,4-Д. Анализ наличия остатков других пестицидов проводится в специально оговариваемых случаях.

Определение хлорсодержащих пестицидов методом тонкослойной хроматографии. Метод основан на экстракции пестицидов органическим растворителем из продукта, очистке экстракта, упаривании его досуха и хроматографировании в тонком слое. Метод предназначен для анализа содержания остаточных количеств пестицидов ДДТ и его метаболитов, гамма-ГХЦГ, кельтана, альдрина, гептахлора.

Подготовка к анализу.

Очистка силикагеля АСК. В стакан насыпают силикагель, заливают гексаном, перемешивают, гексан сливают. Промывку повторяют три раза. Промытый силикагель прокалывают при температуре 180 °С в течение 2 ч. Хранят в плотно закрытой стеклянной банке.

Очистка ваты. В коническую колбу помещают вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

Подготовка хроматографической колонки для очистки от жиров. В нижнюю часть колонки помещают кусочек очищенной ваты, насыпают силикагель АСК на высоту ($26,0 \pm 0,5$) см, уплотняют постукиванием по колонке деревянной палочкой. Затем помещают силикагель, пропитанный серной кислотой в отношении 4:1 (по массе), на 3 см, далее насыпают безводный сульфат натрия слоем ($1,0 \pm 0,5$) см. Через колонку пропускают 30 см³ гексана и отжимают резиновой грушей. Эффективность колонки проверяют, внося 5 см³ смеси хлорорганических пестицидов с заданной концентрацией (в пределах 0,1–0,2 мкг). Дают возможность раствору впитаться в колонку, а затем элюируют пестициды 50 см³ гексана со скоростью одна капля в секунду.

Элюат с помощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют при температуре 40 °С. К сухому остатку пипеткой добавляют 10 см³ гексана, колбу закрывают пробкой на шлифе. Стенки колбы ополаскивают растворителем и аликвотную часть раствора (5 мкл) вводят в хроматограф и проводят измерения. При определении не менее 90 % от заданного количества пестицидов сорбент можно считать пригодным для работы, а колонку использовать для анализа. При поступлении новой партии силикагеля проверяют его эффективность, как описано выше.

Приготовление растворов для проявления пятен пестицидов на пла-

стинках ТСХ. Раствор 1. 0,5 г азотнокислого серебра растворяют в 5 см³ дистиллированной воды, прибавляют 10 см³ аммиака и доводят объем до 100 см³ ацетоном. Раствор хранят в течение 3 дней в холодильнике. Раствор 2. 0,25 г азотнокислого серебра помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, приливают 2,5 см³ дистиллированной воды, 5 см³ 2-феноксиэтанола, доводят до метки ацетоном и добавляют 3 капли 30 %-ного раствора пероксида водорода.

Подготовка хроматографической камеры. В хроматографическую камеру за 1 ч до начала хроматографирования заливают смесь подвижных растворителей для насыщения ее парами. Объем подвижного растворителя в камере должен находиться на высоте не более чем 0,5 см от уровня дна.

Приготовление основных растворов пестицидов с массовой концентрацией 100 мкг/см³. Для приготовления основного раствора любого пестицида 10 мг эталонного препарата ГСО растворяют гексаном в мерной колбе вместимостью 100 см³ и доводят гексаном до метки. Хранят основные растворы в колбах с притертой пробкой в холодильнике в течение 6 мес.

Подготовка пластин силуфол для хроматографии. Пластины "Силуфол" перед употреблением промывают. Для этого в хроматографическую камеру наливают систему растворителей ацетон-аммиак (1:1) на высоту 5–7 мм и помещают туда пластинки в вертикальном положении. После того, как линия фронта растворителя поднимется, не доходя 10 мм до верха пластинки, ее вынимают, высушивают на воздухе, затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 30 – 60 мин. Перед употреблением с вертикальных сторон пластинки удаляют слой в 3 мм, что способствует выравниванию фронта растворителя.

Анализ. Из объединенной пробы продукта отбирают навеску массой 50,0 г, помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 см³ и заливают 100 см³ этилацетата. Содержимое колбы перемешивают в течение 20 мин на аппарате для встряхивания.

Экстракт декантируют в круглодонную колбу, пропуская через слой безводного сернокислого натрия. Эту операцию повторяют еще 2 раза. Экстракт объединяют и концентрируют с помощью ротационного испарителя досуха при температуре водяной бани 40 – 45 °С.

Очистка экстракта. Сухой остаток количественно переносят с помощью 5 см³ гексана в делительную воронку вместимостью 100 см³, добавляют 5 см³ концентрированной серной кислоты и содержимое воронки осторожно встряхивают 5 – 10 раз. После разделения слоев нижний слой сливают и отбрасывают. Очистку экстракта повторяют еще несколько раз. Очищенный экстракт промывают дважды раствором бикарбоната натрия с массовой долей 1 % порциями по 5 см³, а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Гексановый раствор количе-

ственно переносят в колбу грушевидной формы вместимостью 25 см³ и отгоняют на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40–45 °С.

Если анализируют объекты, содержащие жир, то полученный экстракт подвергают дополнительной очистке на колонке. Сухой остаток растворяют в 10 см³ гексана, переносят на подготовленную колонку и элюируют пестициды с помощью 110 см³ смеси бензола с гексаном в соотношении 4:7 со скоростью одна капля в секунду. Элюат обезвоживают, пропуская через слой безводного сернокислого натрия и отгоняют растворитель досуха. Для очистки экстракта от восков или твердых примесей полученный сухой остаток растворяют охлажденной смесью ацетона и воды в соотношении 2 : 1 и выдерживают 30 мин в холодильнике. Воски отфильтровывают через бумажный фильтр, который промывают охлажденной смесью ацетона и воды 2:1. Пестициды экстрагируют из водно-ацетонового раствора гексаном. Растворитель упаривают.

Сухой очищенный остаток растворяют в колбе, внося пипеткой 1 см³ гексана. 0,1 см³ полученного раствора наносят микропипеткой или шприцем на хроматографическую пластинку на линию старта, находящуюся от края на расстоянии 1,0 см. Для увеличения чувствительности метода сухой остаток растворяют в нескольких каплях гексана и полностью наносят на пластинку. Справа и слева от пробы наносят стандартные растворы пестицидов, содержащие 1, 2, 4, 5, 10 мкг препарата.

Т а б л и ц а 3.1

Ориентировочные значения R_f пестицидов в различных системах растворителей

Наименование пестицидов	Система растворителей		
	№ 1 гексан-ацетон (6:1)	№ 2 гексан	Ацетонитрил-вода (2:1)
	значение R_f на пластинках «Силуфол»	«Мерк»	значение R_f на Пластинках «Сорбфил»
Кельтан	0,15	0,05	0,21
Гамма-ГХЦГ	0,23	0,15	0,30
ДДД	0,32	0,37	0,42
Гептахлор	0,57	0,45	0,73
ДДЭ	0,61	0,45	0,70
Альдрин	0,70	0,82	0,80
ДДТ	0,78	0,67	0,85

После нанесения пробы на пластину типа "Силуфол" ее помещают в хроматографическую камеру с подвижным растворителем (№ 1) – гексан-ацетон (6:1) или (№ 2) – гексан (табл. 3.1). После того, как фронт растворителя поднимется по пластинке, ее вынимают из камеры, обрабатывают проявляющим реактивом и подвергают УФ-облучению в течение 5–10 мин

лампой типа ПРК–4. Пластины располагают на расстоянии 20 см от источника света.

При отсутствии пластин "Силуфол" можно использовать пластины "Сорбфил" отечественного производства, с системой подвижных растворителей ацетонитрил-вода (2:1) (табл. 3.1).

При наличии хлорорганических пестицидов при описанных выше условиях на пластинах проявляются пятна серо-черного цвета на светлом фоне. По значениям, соответствующих R_f определяют, какие пестициды присутствуют в продукте (табл. 3.1).

Обработка результатов. Измерение содержания пестицидов проводят путем сопоставления площади пятна испытуемого экстракта и площади пятна рабочего стандартного раствора, наиболее близкого по интенсивности окраски к пятну экстракта. Площади пятен измеряют с помощью линейки или шаблона из миллиметровой бумаги. Содержание пестицидов X , мг/кг, вычисляют по формуле: $X = m \cdot S_1 \cdot V_1 / m_1 \cdot S_2 \cdot V_2$, где: m – масса пестицида в 1 см³ стандартного раствора, мкг; m_1 – масса навески исследуемого продукта, г; S_1 – площадь пятна, полученного при нанесении испытуемого экстракта, мм²; S_2 – площадь пятна, полученного при нанесении стандартного раствора, мм²; V_1 – объем экстракта, в котором перерастворен сухой остаток, см³; V_2 – объем исследуемого экстракта, нанесенного на пластинку, см³. При нанесении всей пробы $V_1 = V_2$.

Вычисления производят до первого десятичного знака. Окончательный результат округляют до целого числа.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 30 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания пестицидов любой пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов $\pm 0,15 X$.

Минимально обнаруживаемое содержание пестицидов в хроматографируемой пробе 1 мкг.

Значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей погрешности измерений содержания пестицидов одной и той же пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов составляет $\pm 0,2 X$. При измерении содержания пестицидов определяемая величина варьирует в пределах: для гамма-ГХЦГ 75–80 %, кельтана 75–85 %, альдрина 72–80 %, ДДТ 76–90 %, ДДД 75–85 %, ДДЭ 70 %.

Пример определения хлорсодержащих пестицидов методом газожидкостной хроматографии с электрозахватным детектором. Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) основан на экстракции пестицидов этилацетатом, очистке экстракта концентрированной серной кислотой или силикагелем АСК с последующим анализом хлорорганических пе-

стицидов на газовом хроматографе с детектором захвата электронов.

Метод предназначен для анализа остаточных количеств пестицидов альфа-, бета-, гамма-ГХЦГ, кельтана, альдрина, гептахлора, ДДТ и его метаболитов. Газохроматографический метод используют как самостоятельный метод анализа, а также для подтверждения результатов, полученных тонкослойной хроматографией.

Подготовка к анализу. В стакан насыпают силикагель, заливают гексаном, перемешивают, гексан сливают. Промывку повторяют три раза. Промытый силикагель прокаливают при температуре 180 °С в течение 2 ч. Хранят в плотно закрытой стеклянной банке.

В коническую колбу помещают хлопковую вату, заливают гексаном, выдерживают 15 мин. Операцию повторяют два раза. Очищенную вату сушат на воздухе под тягой. Хранят в закрытой стеклянной банке.

В нижнюю часть колонки помещают кусочек очищенной ваты, насыпают силикагель АСК на высоту $(26,0 \pm 0,5)$ см, уплотняют постукиванием по колонке деревянной палочкой. Затем помещают силикагель, пропитанный серной кислотой в отношении 4:1 (по массе), на 3 см, далее насыпают безводный сульфат натрия слоем $(1,0 \pm 0,5)$ см. Через колонку пропускают 30 см³ гексана и отжимают резиновой грушей. Эффективность колонки проверяют, внося 5 см³ смеси хлорорганических пестицидов с заданной концентрацией (в пределах 0,1–0,2 мкг). Дают возможность раствору впитаться в колонку, а затем элюируют пестициды 50 см³ гексана со скоростью одна капля в секунду.

Элюат с помощью ротационного вакуумного испарителя полностью отгоняют при температуре 40 °С. К сухому остатку пипеткой добавляют 10 см³ гексана, колбу закрывают пробкой на шлифе. Стенки колбы ополаскивают растворителем, аликвотную часть раствора (5 мкл) вводят в хроматограф и проводят измерения. При определении не менее 90 % от заданного количества пестицидов сорбент можно считать пригодным для работы, а колонку использовать для анализа. При поступлении новой партии силикагеля проверяют его эффективность, как описано выше.

Приготовление градуировочных растворов пестицидов. Основные градуировочные растворы с массовой концентрацией $(100 \pm 0,5)$ мкг/см³ готовят весовым способом отдельно для каждого пестицида путем растворения навески 10 мг в мерной колбе вместимостью 100 см³ в гексане. Из основных растворов готовят промежуточные градуировочные растворы массовых концентраций: 1 мкг/см³ (раствор 1), 0,1 мкг/см³ (раствор 2) и 0,01 мкг/см³ (раствор 3), перенося пипеткой в мерные колбы вместимостью 100 см³ соответственно 1 и 0,1 см³ основного раствора пестицида. Для приготовления промежуточного раствора 3 с содержанием 0,01 мкг/см³ в мерную колбу вместимостью 100 см³ переносят 1 см³ промежуточного раствора 1 и доводят до метки гексаном.

Все промежуточные растворы стабильны при хранении в колбах с притертой пробкой в холодильнике в течение 6 мес.

Подготовка хроматографических материалов. Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носителем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100 °С; 2 ч при 150 °С; 4 ч при 200 °С; 4 ч при 220 °С. При кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора. Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

Т а б л и ц а 3.2

Шкала градуировочных растворов для альфа-ГХЦГ и 4,4'-ДДЭ

Раствор	1	2	3	4	5	6	7	8
Объем промежуточного раствора 3 (0,01мкг/мл), мл	1	2	5	–	–	–	–	–
Объем промежуточного раствора 2 (0,1 мкг/мл), мл	–	–	–	1	2	3	4	5
Объем гексана, мл	4	3	0	4	3	2	1	0
Количество пестицида в градуировочном растворе, мкг/мл	0,002	0,004	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Количество пестицида в 5 мкл пробы, нг	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0

Т а б л и ц а 3.3

Шкала градуировочных растворов для β и γ-ГХЦГ, альдрина и гептахлора

Раствор	1	2	3	4	5	6	7
Объем промежуточного раствора 3 (0,01 мкг/мл), мл	3	5	–	–	–	–	–
Объем промежуточного раствора 2 (0,1 мкг/мл), мл	–	–	1	2	3	4	5
Раствор	1	2	3	4	5	6	7
Объем гексана, мл	2	0	4	3	2	1	0
Количество пестицида в градуировочном растворе, мкг/мл	0,006	0,01	0,02	0,02	0,06	0,08	0,1
Количество пестицида в 5 мкл пробы, нг	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

Приготовление градуировочных растворов. В пробирках вместимостью 5 см³ с пробками на шлифах для каждого пестицида готовят шкалу градуировочных растворов (табл. 3.2 – 3.4). Для этого пипетками вносят определенный объем промежуточных растворов пестицидов и недостающий до 5 см³ объем гексана.

Т а б л и ц а 3.4

Шкала градуировочных растворов для 4,4'-ДДТ и 4,4'-ДДД

Раствор	1	2	3	4	5	6	7	8
Объем промежуточного раствора 2 (0,1 мкг/мл), мл	0,5	1	2	3	4	5	–	–
Объем промежуточного раствора 1 (1 мкг/мл), мл	–	–	–	–	–	–	1	2
Объем гексана, мл	4,5	4	3	2	1	0	4	3
Количество пестицида в градуировочном растворе, мкг/мл	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,2	0,4
Количество пестицида в 5 мкл пробы, нг	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2

Градуировочные растворы хранят не более двух недель. При проверке градуировочных графиков готовят свежие градуировочные растворы.

Проведение анализов. Из объединенной пробы продукта отбирают навеску массой 50,0 г, помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 см³ и заливают 100 см³ этилацетата. Содержимое колбы перемешивают в течение 20 мин на аппарате для встряхивания.

Экстракт декантируют в круглодонную колбу, пропуская через слой безводного сернокислого натрия. Эту операцию повторяют еще 2 раза. Экстракт объединяют и концентрируют с помощью ротационного испарителя досуха при температуре водяной бани 40–45 °С.

Сухой остаток количественно переносят с помощью 5 см³ гексана в делительную воронку вместимостью 100 см³, добавляют 5 см³ концентрированной серной кислоты и содержимое воронки осторожно встряхивают 5–10 раз. После разделения слоев нижний слой сливают и отбрасывают. Очистку экстракта повторяют еще несколько раз. Очищенный экстракт промывают дважды раствором бикарбоната натрия с массовой долей 1 % порциями по 5 см³, а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Гексановый раствор количественно переносят в колбу грушевидной формы вместимостью 25 см³ и отгоняют на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40–45 °С.

Если анализируют объекты, содержащие жир, то полученный экстракт подвергают дополнительной очистке на колонке. Сухой остаток рас-

творяют в 10 см³ гексана, переносят на подготовленную колонку и элюируют пестициды с помощью 110 см³ смеси бензола с гексаном в соотношении 4:7 со скоростью одна капля в секунду. Элюат обезвоживают, пропуская через слой безводного сернокислого натрия и отгоняют растворитель досуха.

Для очистки экстракта от восков или твердых примесей полученный сухой остаток растворяют охлажденной смесью ацетона и воды в соотношении 2:1 и выдерживают 30 мин в холодильнике. Воски отфильтровывают через бумажный фильтр, который промывают охлажденной смесью ацетона и воды 2:1. Пестициды экстрагируют из водно-ацетонового раствора гексаном. Растворитель упаривают. Сухой очищенный остаток растворяют в колбе, внося пипеткой 10 см³ гексана.

5 мкл гексанового раствора вводят в испаритель газового хроматографа и анализируют в условиях, указанных в табл. 3.4.

Содержание пестицидов X мг/кг, в анализируемом сырье вычисляют в соответствии с градуировочными графиками по формуле:

$X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2$, где m_1 – масса пестицида, найденная по градуировочному графику, мкг; V_1 – общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m_2 – масса анализируемой пробы, г; V_2 – объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 20 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Г л а в а 4

УЧЕБНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРАКТИКУМ

4. 1. Лабораторные работы

Работа 4.1.1. Фотометрическое определение марганца в виде перманганата методом градуировочного графика

Метод основан на измерении светопоглощения водного раствора KMnO_4 , обладающего интенсивной малиново-розовой окраской. Раствор перманганата калия максимально поглощает свет в области длин волн $\lambda \approx 460 - 580$ нм. Минимальное определяемое количество Mn – 0,2 мкг/мл. Закон поглощения соблюдается до 70 мкг/мл Mn.

Работу проводят на колориметре фотоэлектрическом концентрационном КФК-2.

Методика работы на приборе. Колориметр включают в сеть за 15 мин до начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто (при этом шторка перед фотоприемниками перекрывает световой пучок). Ручкой 3 (см. рис. 4.1) вводят необходимый по роду измерения цветной светофильтр. Устанавливают минимальную чувствительность прибора. Для этого ручку 5 «чувствительность» ставят в положение «1», ручку 6 «установка 100 грубо» – в крайнее левое положение. Перед измерениями и при переключении фотоприемников проверяют установку стрелки микроамперметра на «0» по шкале коэффициентов пропускания T при открытом кюветном отделении. При смещении стрелки от нулевого положения ее подводят к нулю с помощью потенциометра «нуль», выведенного под шлиц.

В световой поток вводят кювету с растворителем или контрольным раствором, по отношению к которому производят измерения. Закрывают крышку кюветного отделения. Ручками «чувствительность», «установка 100 грубо» и «точно» устанавливают нуль по шкале оптической плотности. Ручка «чувствительность» может находиться в одном из трех положений: 1, 2 или 3.

Поворотом ручки 4 кювету с раствором сравнения заменяют на кювету с исследуемым окрашенным раствором. Снимают отсчет по шкале микроамперметра в единицах оптической плотности.

Измерения проводят 3 – 5 раз и окончательное значение измеренной оптической плотности определяют как среднее арифметическое из полученных значений.

Приборы и материалы

Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.

Набор кювет для фотометрирования.

Мерная колба емкостью 100 мл.

Мерные колбы емкостью 50 мл, 7 шт.

Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5, 10 мл.

Стандартный раствор перманганата калия с концентрацией марганца, равной 1 мг/мл, готовят растворением 1,436 г KMnO_4 в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 500 мл. Перед применением 10 мл раствора разбавляют дистиллированной водой до 100 мл в мерной колбе. Раствор содержит 0,1 мг марганца в 1 мл.

Приготовление эталонных растворов. Готовят шесть эталонных (стандартных) растворов, содержащих 2, 4, 5, 10, 15, 20 мкг/мл Mn. Для этого в мерные колбы емкостью 50 мл помещают последовательно 1; 2; 2,5; 5; 7,5; 10 мл раствора KMnO_4 с концентрацией марганца 0,1 мг/мл, доводят объем каждого раствора до 50 мл дистиллированной водой и перемешивают.

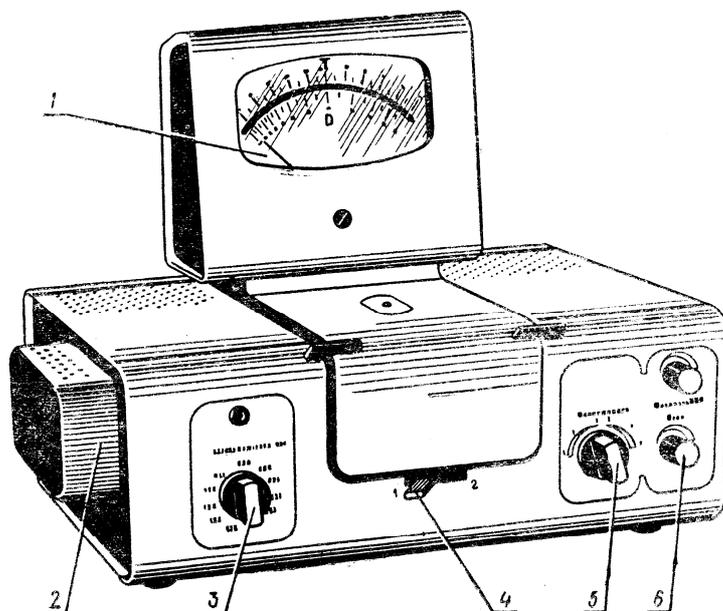


Рис. 4.1. Внешний вид КФК-2:

1 – микроамперметр; 2 – источник света; 3 – ручка установки светофильтра; 4 – ручка перестановки кювет; 5 – ручка установки чувствительности прибора; 6 – ручка «установка 100 грубо»

Выполнение работы. В ы б о р с в е т о ф и л ь т р а. Для выбора светофильтра измеряют оптическую плотность стандартного раствора максимальной концентрации на всех светофильтрах. Ставят ручку 3 (см. рис. 4.1) последовательно на значения: 315, 364, 400 и т. д. Причем, когда ручка 3 стоит на отметках, обозначенных черным цветом, ручку 5 «чувствительность» устанавливают в одно из положений: «1», «2», «3», отмеченных на

шкале также черным цветом. Аналогично поступают при положении на красных отметках. Полученные данные заносят в таблицу:

λ , нм	315	364	400	440	490	540	590	620	750
A									

Строят спектр светопоглощения в координатах: оптическая плотность (A) – длина волны, λ . Для дальнейшей работы выбирают светофильтр, соответствующий наибольшему значению поглощения исследуемого раствора.

В ы б о р к ю в е т ы. Измеряют оптическую плотность эталонного раствора максимальной концентрации на выбранном светофильтре в различных кюветах. Дальнейшую работу проводят в такой кювете, в которой оптическая плотность данного раствора близка к единице.

П о с т р о е н и е г р а д у и р о в о ч н о г о г р а ф и к а. После выбора условий фотометрирования измеряют последовательно поглощение всех стандартных растворов, используя в качестве раствора сравнения воду. Полученные данные заносят в таблицу:

C , мкг/мл	2	4	5	10	15	20
A						

Строят градуировочный график в координатах: концентрация – оптическая плотность.

О п р е д е л е н и е с о д е р ж а н и я м а р г а н ц а в а н а л и з и р у е м о м р а с т в о р е. Полученный у преподавателя раствор с неизвестным содержанием марганца разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 50 мл до метки и тщательно перемешивают. Измеряют оптическую плотность анализируемого раствора в тех же условиях и, пользуясь градуировочным графиком, находят концентрацию марганца в анализируемом растворе.

Р а б о т а 4.1.2. Фотометрическое определение хрома в виде дихромата методом сравнения

Для определения хрома используется светопоглощение ионами дихромата $Cr_2O_7^{2-}$. Измеряют оптические плотности стандартного раствора известной концентрации и исследуемого раствора. Максимальное поглощение света растворами дихромата наблюдается при 400 – 450 нм.

Чувствительность метода – 2 мкг/мл при толщине поглощающего слоя раствора 30 мм.

Работу проводят на колориметре фотоэлектрическом концентрационном КФК-2.

Приборы и материалы

Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.

Набор кювет для фотометрирования.

Мерные колбы емкостью 50 мл, 3 – 4 шт.

Пипетки мерные вместимостью 2, 5 и 10 мл.

Стандартный раствор дихромата калия. Растворяют 0,3523 г $K_2Cr_2O_7$ в воде и раствор доводят дистиллированной водой до метки в мерной колбе емкостью 500 мл. Стандартный раствор содержит 0,25 мг хрома в 1 мл.

Приготовление эталонных растворов. Готовят три эталонных (стандартных) раствора, содержащих 10; 20; 30 мкг/мл Cr. Для этого в мерные колбы емкостью 50 мл помещают соответственно 2; 4; 6 мл раствора $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией хрома 0,25 мг/мл, доводят объем каждого раствора до 50 мл дистиллированной водой и перемешивают.

Выполнение работы. Выбор светофильтра и рабочей кюветы производят так же, как в работе 4.1.1.

Определение содержания хрома в анализируемом растворе. Полученный у преподавателя раствор с неизвестным содержанием хрома разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 50 мл до метки и тщательно перемешивают.

Оптические плотности анализируемого и стандартного растворов измеряют по отношению к холостому раствору (дистиллированной воде) в кювете с толщиной поглощающего слоя 30 мм, применяя синий светофильтр ($\lambda \approx 400$ нм). Измерения проводят несколько раз и по средним значениям оптической плотности вычисляют концентрацию исследуемого раствора. Концентрацию элемента в исследуемом растворе C_x определяют по формуле:

$$C_x = C_{cm} \frac{A_x}{A_{cm}},$$

где C_{cm} – концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

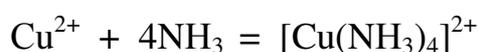
A_{cm} – оптическая плотность стандартного раствора;

A_x – оптическая плотность анализируемого раствора.

При более точных определениях следует брать несколько стандартных растворов.

Работа 4.1.3. Определение меди в виде аммиаката дифференциально-фотометрическим методом

При действии избытка аммиака на раствор соли меди (II) появляется интенсивное сине-фиолетовое окрашивание, вызываемое образованием комплексного соединения меди с аммиаком:



Максимум светопоглощения этого соединения соответствует $\lambda \approx 620$ нм.

Для повышения воспроизводимости определения используют метод дифференциальной фотометрии, когда раствор сравнения содержит определенное точно известное количество ионов меди в виде аммиаката.

Работу проводят на колориметре фотоэлектрическом концентрационном КФК-2 (рис. 4.1).

Приборы и материалы

Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр

Набор кювет для фотометрирования.

Мерные колбы емкостью 50 мл, 7 шт.

Пипетки мерные вместимостью 2, 5 и 10 мл.

Стандартный раствор сульфата меди, содержащий 1 мг меди в 1 мл. Растворяют 3,931 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 25 мл 2М H_2SO_4 , доводят объем раствора дистиллированной водой до метки в мерной колбе емкостью 1000 мл.

Аммиак, 5 %-ный раствор.

Приготовление эталонных растворов. Готовят шесть эталонных (стандартных) растворов, содержащих 50; 100; 150; 200; 250; 300 мкг/мл Cu . Для этого в мерные колбы емкостью 50 мл помещают соответственно 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15 мл стандартного раствора меди, добавляют в каждую колбу 10 мл 5 %-ного раствора аммиака, доводят объем каждого раствора до 50 мл дистиллированной водой и перемешивают. Через 10 мин приступают к измерениям.

Выполнение работы. Выбор светофильтра и рабочей кюветы производят так же, как в работе 4.1.1.

П о с т р о е н и е г р а д у и р о в о ч н о г о г р а ф и к а. После выбора условий фотометрирования измеряют последовательно поглощение всех стандартных растворов, используя в качестве раствора сравнения раствор, содержащий 100 мкг/мл меди. Если содержание меди в фотометрируемом растворе меньше, чем в растворе сравнения, применяют обратный порядок измерений: фотометрируемый раствор условно принимают за «нулевой» раствор сравнения, устанавливают по нему оптический нуль прибора и по отношению к нему измеряют светопоглощение исследуемого раствора. Найденное значение поглощения берут со знаком «минус». Сочетание прямого ($C_o > C_x$) и обратного ($C_o < C_x$) порядков измерений в дифференциальном методе называют двусторонним дифференцированием. Полученные данные заносят в таблицу:

C , мкг/мл	50	100	150	200	250	300
A		0				

Строят градуировочный график в координатах: концентрация – оптическая плотность.

О п р е д е л е н и е с о д е р ж а н и я м е д и в а н а л и з и р у е м о м р а с т в о р е. К полученному у преподавателя раствору с неизвест-

ным содержанием соли меди (II) приливают 10 мл 5 %-ного аммиака, доводят объем раствора дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 50 мл до метки и тщательно перемешивают. Приготовленный раствор через 10 мин фотометрируют с выбранным светофильтром относительно раствора сравнения, содержащего 100 мкг/мл меди, используя при необходимости приемы двустороннего фотометрирования. Пользуясь градуировочным графиком, находят содержание меди в анализируемом растворе.

Работа 4.1.4. *Преломление света. Определение показателя преломления жидкостей*

Метод основан на измерении величины светопреломления растворами веществ или жидкостями с использованием рефрактометра. Различные жидкости, а также растворы с отличающейся концентрацией веществ характеризуются разными величинами показателя преломления n_D^{20} . Чистая вода при температуре 20°C и длине волны $\lambda \approx 589,3$ нм имеет $n_D^{20} = 1,3330$.

Работу проводят на рефрактометре Аббе или аналогичных приборах типа РЛУ, РЛ, УРЛ.

Методика работы на приборе. Если используемый рефрактометр содержит встроенный источник света (лампу накаливания), то надо включить прибор в сеть 220 В. Если в конструкции используемого рефрактометра внутренний источник света не предусмотрен, надо расположить прибор так, чтобы свет падал максимально на принимающую призму от внешнего источника света, в качестве которого можно использовать дневной свет или автономный светильник.

Величина показателя преломления зависит от температуры. Если в конструкции рефрактометра предусмотрено термостатирование при 20°C, необходимо включить термостат на необходимую температуру или выдержать прибор в помещении с температурой 20°C для обеспечения измерений показателя преломления при стандартной температуре 20°C.

Открывают поверхность измерительной призмы, поворачивая вверх верхнюю призму, наносят 1 каплю исследуемой жидкости на призму и быстро закрывают верхнюю призму, так чтобы жидкость не успела полностью испариться. После измерения поверхности призм ПРОТИРАЮТ начисто ватой или фильтровальной бумагой, смоченными чистой, легко испаряющейся жидкостью, например, этанолом.

Световой поток поступает на нижнюю часть призмы, проходит через границу раздела призм, в которой находится капля измеряемого образца, проходит через верхнюю призму и поступает в окуляр, в котором глазом видна линия раздела темной и светлой части полукругов окуляра. Совмещение этой линии раздела с серединой сектора в перекрестии и считывание по шкале соответствующего числа позволяет определить величину n_D^{20} .

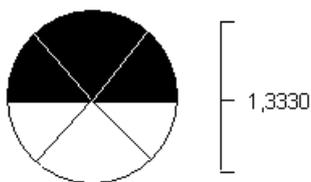


Рис. 4.2. Определение показателя преломления H_2O
(вид в окуляре)

Измерения проводят 3 – 5 раз и окончательное значение измеренного показателя преломления определяют как среднее арифметическое из полученных значений.

Приборы и материалы

Рефрактометр.

Пипетка или капельница для нанесения капли жидкого образца на поверхность призмы.

Фильтровальная бумага.

Спирт этиловый.

Вода дистиллированная.

Уксусная кислота.

Ацетон, гексан, бензол или другие органические растворители с известным показателем преломления.

Выполнение работы. Убедиться, что рефрактометр позволяет правильно осуществлять измерения величины n_D^{20} . Для этого 1 каплю дистиллированной воды нанести на поверхность измерительной призмы, закрыть верхнюю призму и считать в окуляре значение показателя преломления. Открыть призмы и протереть их насухо чистой фильтровальной бумагой, затем ватой, смоченной спиртом. Поверхности призм должны быть чистыми без разводов и загрязнений.

Получить у преподавателя образцы определяемых жидкостей NN 1 – 5. 1 каплю каждого поступившего образца нанести на поверхность измерительной призмы, закрыть верхнюю призму и считать в окуляре значение показателя преломления. Сравнить полученные значения показателей преломления с известными значениями или справочными данными. Сделать вывод о том, какой образец жидкости соответствует образцу, поступившему на исследования.

При анализе водных 3 – 9, 77 %-ных растворов уксусной кислоты воспользуйтесь данными таблицы с учетом необходимой экстраполяции значений n_D^{20} для дистиллированной воды и уксусной кислоты (реактивная 100 %-ная).

Показатели преломления некоторых жидкостей при 20°C, $\lambda = 589$ нм

Вещество	n_D^{20}	Вещество	n_D^{20}
Ацетон C_3H_6O	1,3591	2-Пропанол C_3H_8O	1,3773
Бензол C_6H_6	1,5011	Уксусная кислота $C_2H_4O_2$	1,3717
Вода H_2O	1,3330	Хлороформ $CHCl_3$	1,4456
Гексан C_6H_{14}	1,3751	Этиловый спирт C_2H_6O	1,3613
Глицерин $C_3H_8O_3$	1,4744	Этилацетат $C_4H_8O_2$	1,3726

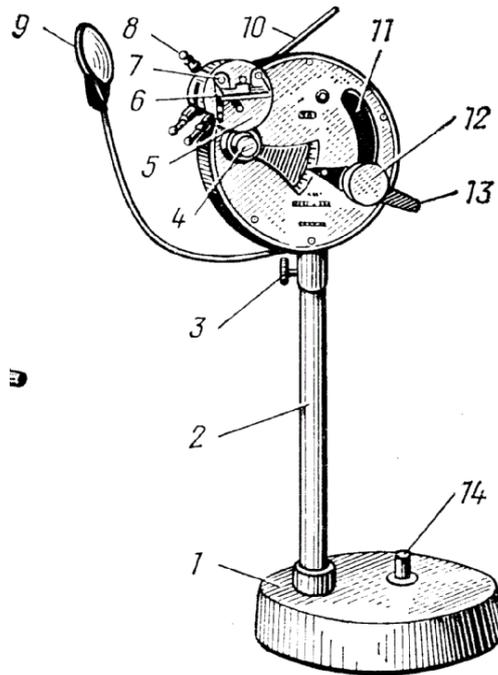


Рис. 4.3. Рефрактометр типа РЛ

Рефрактометр типа РЛ. Данный рефрактометр (рис. 4.3) предназначен для определения показателя преломления жидкости и концентрации веществ (масс. %) в водных растворах – продуктах сахарного производства. Пределы измерения: а) по шкале показателей преломления от 1,300 до 1,540, цена деления $1 \cdot 10^{-3}$ величины n_D^{20} ; б) по шкале сахарозы от 0 до 95%, цена деления в интервале от 0 до 50% – 0,2 и в интервале от 50 до 95% – 0,1. Рефрактометр состоит из основания 1, на котором установлена колонка 2, несущая корпус прибора. К корпусу крепятся верхняя 7 и нижняя 5 камеры Аббе. Нижняя камера 5, в которую заключена измерительная призма, жестко закреплена на корпусе. Верхняя камера 7, в которой находится осветительная призма, соединена шарниром 6 с нижней камерой и может поворачиваться относительно последней. Обе камеры полые и имеют штуцера 8, на которые надеваются резиновые трубки для соединения камер с термостатирующей установкой. Для контроля температуры служит термометр 10 в оправе, который

соединен непосредственно с нижней камерой. Нижняя и верхняя камеры имеют окна, которые закрываются съемной крышкой или в нижней – крышкой, а в верхней – диафрагмой. Для направления светового потока в окно имеется отражательное стекло-зеркало 9, которое можно устанавливать под любым углом к оптической оси рефрактометра и фиксировать в необходимом положении. На переднюю крышку корпуса выведена шкала 11 и рукоятка 13, несущая окуляр 12, в котором нанесены три визирных штриха. Вращая рукоятку вокруг оси, совмещают границу светотени с визирной штриховой линией. На одной оси с рукояткой находится головка дисперсионного компенсатора 4, соединенного с оправой призмы Амичи, при помощи которой устраняется спектральная окраска границы светотени. Светотень должна быть резкой.

Источником света может служить осветитель, прикрепленный к корпусу рефрактометра, электрическая матовая лампа 75 – 100 Вт или дневное освещение. При исследовании светлых жидкостей измерения проводят в проходящем свете, для чего необходимо направлять световой поток в окно верхней камеры. При исследовании темных жидкостей лучше работать в отраженном свете, чтобы не было значительного поглощения световой энергии в жидкости, от чего понижаются контрастность световых полей и резкость границы светотени. Если работают в отраженном свете, световой поток направляют непосредственно в окно измерительной призмы. Измерять показатель преломления рекомендуется при 20°C (температура градуировки шкал). Через камеры Аббе из ультратермостата или другой термостатирующей установки до измерений пропускают воду 10 – 15 мин.

Перед измерениями проверяют нулевую точку прибора. Для этого 1–2 капли дистиллированной воды наносят на полированную плоскость измерительной призмы и устанавливают окуляр на резкость по шкале и визирной линии в виде трех штрихов. Затем перемещают окуляр рукояткой по шкале до тех пор, пока визирная штриховая линия не совместится с границей светотени. При правильной установке прибора на нулевую точку граница светотени при 20°C должна быть совмещена с нулевым делением шкалы для сахарозы и делением $n = 1,333$ шкалы показателей преломления. Если совмещение отсутствует, то отвинчивают пробку на корпусе, надевают на винт внутри корпуса ключ и, вращая винт, совмещают границу светотени с нулевым делением правой шкалы для сахарозы, соответствующим показателю преломления $n_D^{20} = 1,333$ на левой шкале. Правильность установки прибора проверяют 2 – 3 раза.

После установки прибора на нулевую точку отворачивают верхнюю камеру Аббе, вытирают плоскости осветительной и измерительной призм

досуха вначале фильтровальной бумагой, а затем неворсистой салфеткой. На полированную поверхность измерительной призмы осторожно, чтобы ее не поцарапать, наносят пипеткой 2 – 3 капли исследуемой жидкости и плавно опускают верхнюю камеру Аббе. Зеркалом направляют свет в одно из окон, другое окно при этом должно быть закрыто крышкой. Перемещением окуляра вводят в поле зрения прибора границу светотени и устанавливают ее на резкость, наблюдая в окуляр и вращая левой рукой головку дисперсионного компенсатора. Правой рукой перемещают окуляр до совмещения визирной штриховой линии с границей светотени. Положение границы светотени на левой шкале определит результат отсчета, т.е. показатель преломления жидкости.

При определении показателя преломления на рефрактометре раствор следует вносить между призмами в достаточном количестве и быстро, чтобы не успел испариться растворитель и не изменилась концентрация. Отсчет показателя преломления по шкале рефрактометра производят до третьего знака после запятой. Четвертый знак оценивается на глаз. По окончании измерений надо плоскости обеих частей камеры промыть дистиллированной водой и протереть досуха.

Измерения при помощи рефрактометра проводят несколько раз и вычисляют среднее арифметическое значение показателя преломления n_D^{20} . Оно равно:

$$\langle n_D^{20} \rangle = \frac{1}{m} \sum_{m=1}^{m=m} n_D = \frac{n_{D,1} + n_{D,2} + n_{D,3} + \dots + n_{D,m}}{m},$$

где m – число измерений (вариантов). Исходя из $\langle n_D^{20} \rangle$ оценивают точность измерений, вычисляя отклонение отдельного измерения, равное разности между ним и $\langle n_D^{20} \rangle$. $d_1 = n_{D,1} - \langle n_D^{20} \rangle$; $d_m = n_{D,m} - \langle n_D^{20} \rangle$.

Среднее арифметическое отклонение вычисляют по формуле

$$\langle d \rangle = \frac{\sum_{m=1}^{m=m} d}{m},$$

среднюю квадратичную ошибку отдельного измерения (стандартное отклонение) – по формуле

$$\langle S \rangle = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^{m=m} d^2}{m-1}},$$

Выражения $\sum d$ и $\sum d^2$ вычисляют по абсолютному значению d , т. е. без учета его знака; относительное стандартное отклонение среднего значения по формуле $S_r = S / \langle n_D^{20} \rangle$; среднюю квадратичную ошибку среднего арифметического значения по формуле

$$F = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^{m=m} d^2}{m(m-1)}},$$

которая не должна быть больше значения единицы деления шкалы рефрактометра; если она ее превышает, определения надо повторить. Аналогичную оценку точности измерений следует проводить при работе с приборами любого назначения.

Работа 4.1.5. Спектроскопия отражения. Анализ происхождения материалов в ультрафиолетовом свете

Метод основан на изменении цветовых характеристик материалов под воздействием УФ-излучения.

Работу проводят с использованием люминоскопа типа ЛПК-1.

Методика работы на приборе. Прибор включают в сеть за 15 мин до начала измерений. Вручную помещают испытуемый образец сбоку в камеру прибора и закрывают окошко камеры таким образом, чтобы образец находился в темноте и освещался только УФ-лампой прибора. Рассматривают образец через окошко-окуляр. В качестве 1-го образца используют качественное сливочное масло, которое в УФ-лучах обладает слабым лимонно-желтым свечением. Помещают 2-й образец, в качестве которого используют маргарин, содержащий значительное количество предельных жирных кислот. Наблюдают голубовато-зеленоватое свечение, отличающееся от оттенков настоящего сливочного масла. Делают вывод о групповой принадлежности испытуемых образцов.

В прибор помещают денежную купюру любого достоинства и удостоверяются в том, что она является настоящей, так как в УФ-свете защитные полосы на купюре, а также вкрапления волосков в бумаге купюры флуоресцируют яркими цветными красками. Специальные флуоресцирующие красители, применяемые при печати денежных купюр, позволяют проводить соответствующую идентификацию их подлинности.

Приборы и материалы

Люминоскоп или УФ-лампа в защитном кожухе.

Образцы материалов с разной светимостью в УФ-отраженном свете (маргарин, сливочное масло).

По результатам исследования составляют протокол испытаний.

Контрольные вопросы и задачи

1. Теоретические основы спектрометрии.
2. Взаимодействие веществ с электромагнитным излучением.
3. Классификация методов анализа.
4. Общая характеристика и классификация физико-химических методов анализа и их достоинства.
5. Общая характеристика и классификация физических методов анализа.
6. Оптические методы физико-химического анализа. Классификация.
7. Сущность фотометрического анализа. Происхождение молекулярных спектров.
8. Спектры поглощения. Зависимость поглощения от строения молекул или ионов.
9. Законы поглощения электромагнитного излучения. Основное уравнение фотометрического анализа.
10. Основные приемы фотометрического анализа. Метод сравнения. Метод градуировочного графика.
11. Метод добавок в анализе многокомпонентных систем.
12. Метод фотометрического титрования.
13. Метод дифференциальной фотометрии.
14. Нефелометрический метод анализа.
15. Турбидиметрический метод анализа.
16. Люминесценция. Виды люминесценции.
17. Спектры поглощения и спектры люминесценции.
18. Зависимость интенсивности люминесценции (флуоресценции) от концентрации и использование ее в анализе. Тушение люминесценции.
19. Применение люминесцентного метода анализа. Сортный анализ. Люминесцентная микроскопия. Люминесцентный химический анализ.
20. Сущность хроматографии. Классификация хроматографических методов разделения и анализа.
21. Хроматограммы в колоночной хроматографии. Элюирование.
22. Ионнообменная хроматография. Иониты. Применение ионного обмена в аналитической химии.
23. Распределительная хроматография. Бумажная хроматография. Тонкослойная хроматография.
24. Высокоэффективная жидкостная хроматография.
25. Газовая хроматография.
26. Рассчитать концентрацию вещества в растворе, если известно, что $\epsilon = 100$, кювета стандартная 1 см, а величина $D_{546} = 2$.

27. Теоретические основы спектрометрии. Связать процессы, происходящие при облучении веществ электромагнитным излучением, со строением атома.
28. Закон поглощения Бугера-Ламберта-Бера. Экстинкция как аддитивная величина.
29. Дисперсные системы. Нефелометрия.
30. Атомно-абсорбционная спектроскопия. Анализ металлов в растворе.
31. Предложить спектрофотометрический метод определения белка в растворе.
32. Фотометрия. Принципы, аппаратура, порядок выполнения измерений. Примеры анализа.
33. Понятие точности спектрометрического анализа. Минимально определяемая концентрация. Ошибка измерения. Сходящаяся и расходящаяся погрешность.
34. Предложить неразрушающий метод анализа драгоценного сплава.
35. Спектрофотометрия. Устройства для проведения спектрофотометрических измерений. Максимальная и рабочая длина волны. Возможности метода.
36. Основные понятия спектрометрии. Свет как электромагнитное излучение. Спектр. Энергия излучения. Волновое число.
37. Является ли монохроматическим свет настольной лампы накаливания?
38. Теория поглощения света. Связать со строением атома, показать электронные переходы и возникновение линий в ИК и УФ областях спектра.
39. Шкала электромагнитных колебаний.
40. Источники электромагнитного излучения, применяемые в спектрометрических приборах.
41. Явление флуоресценции. Теория возникновения и практическое использование.
42. Фотометрический анализ. Дать примеры. Какие вещества можно анализировать данным методом? Параметры, влияющие на точность результата.
43. Понятие спектра. Причины возникновения дискретных и размытых спектров.
44. Законы поглощения излучения веществом. Пределы линейности. Точность.
45. Приемы фотометрии. Метод сравнения. Метод градуировочного графика.
46. Позволяют ли спектрофотометры определять концентрацию веществ в растворах и твердых смесях.
47. Рефрактометрия. Зависимость показателя преломления от различных параметров. Возможности использования преломления света в техническом анализе.

48. Способы выражения концентрации растворов, применяемых в спектрометрии. Показать на примере использования закона Ламберта-Бугера-Бера.
49. Количественные понятия, используемые для расчетов в спектрометрии. Длина волны, толщина оптического слоя, концентрация, молярная экстинкция, точность, их зависимость от различных факторов.
50. Люминесцентный анализ. Теоретические основы. Виды флуоресценции.
51. Рентген-флуоресцентный анализ. Возникновение линий в спектре. Аналитический сигнал. Понятие стандартного ГСО образца. Количественные и качественные измерения.
52. ИК-спектроскопия. ИК-спектрометры. Характеристические полосы. Возможности получения информации для решения сертификационных задач. Примеры.
53. Примеры анализа твердых, газообразных и жидких веществ спектрометрическими методами.
54. Принципы и правила обработки результатов спектрофотометрических измерений. Линейность зависимости экстинкции от концентрации. Влияние длины волны, температуры и других параметров на точность результата.
55. Хемилюминесценция. Люминофоры. Тушение люминесценции. Факторы, влияющие на люминесценцию.
56. Принципиальная схема устройства спектрометров. Примеры.
57. Понятие эталонов. Возможности проведения измерений со стандартными образцами. Метод сравнения.
58. Спектральные характеристики веществ.
59. Масс-спектрометрический анализ.
60. Принципы выбора материалов для спектрометрии (выбор кювет, растворителей). Поглощение и отражение света в кювете с раствором и растворителем.
61. Нефелометрия. Турбодиметрия. Принципы использования нефелометров для проведения измерений. Примеры.
62. Поляриметрия. Зависимость угла вращения плоскости поляризованного света от концентрации оптически активного вещества. Оптическая изомерия.
63. Выбор длины волны при спектрофотометрическом анализе. Пояснить примерами.
64. Возможности ИК- и УФ- спектроскопии в сертификационном анализе.
65. Понятие хроматографического анализа. Использование спектрометрических устройств в хроматографическом анализе. Примеры.
66. Рефрактометрия. Выбор длины волны при рефрактометрическом и спектрофотометрическом анализе. Пояснить примерами.

Термины и определения

ИСТОЧНИКИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ. Несмотря на физические различия, во всех источниках электромагнитного излучения, будь то радиоактивное вещество, лампа накаливания или телевизионный передатчик, это излучение возбуждается движущимися с ускорением электрическими зарядами. Различают два основных типа источников. В «микроскопических» источниках заряженные частицы скачками переходят с одного энергетического уровня на другой внутри атомов или молекул. Излучатели такого типа испускают гамма-, рентгеновское, ультрафиолетовое, видимое и инфракрасное, а в некоторых случаях и еще более длинноволновое излучение (примером последнего может служить линия в спектре водорода, соответствующая длине волны 21 см, играющая важную роль в радиоастрономии). Источники второго типа можно назвать макроскопическими. В них свободные электроны проводников совершают синхронные периодические колебания. Электрическая система может иметь самые разнообразные конфигурации и размеры. Системы такого типа генерируют излучение в диапазоне от миллиметровых до самых длинных волн (в линиях электропередачи). Гамма-лучи испускаются самопроизвольно при распаде ядер атомов радиоактивных веществ, например радия. При этом происходят сложные процессы изменения структуры ядра, связанные с движением зарядов. Генерируемая частота f определяется разностью энергий E_1 и E_2 двух состояний ядра: $f = (E_1 - E_2)/h$, где h – постоянная Планка. Рентгеновское излучение возникает при бомбардировке в вакууме поверхности металлического анода (антикатода) электронами, обладающими большими скоростями. Быстро замедляясь в материале анода, эти электроны испускают так называемое тормозное излучение, имеющее непрерывный спектр, а происходящая в результате электронной бомбардировки перестройка внутренней структуры атомов анода, в результате которой атомные электроны переходят в состояние с меньшей энергией, сопровождается испусканием так называемого характеристического излучения, частоты которого определяются материалом анода. Такие же электронные переходы в атоме дают ультрафиолетовое и видимое световое излучение. Что же касается инфракрасного излучения, то оно обычно является результатом изменений, мало затрагивающих электронную структуру и связанных преимущественно с изменениями амплитуды колебаний и вращательного момента импульса молекулы. В генераторах электрических колебаний имеется «колебательный контур» того или иного типа, в котором электроны совершают вынужденные колебания с частотой, зависящей от его конструкции и размеров. Наиболее высокие частоты, соответствующие миллиметровым и сантиметровым волнам, гене-

рируются клистродами и магнетронами – электровакуумными приборами с металлическими объемными резонаторами, колебания в которых возбуждаются токами электронов. В генераторах более низких частот колебательный контур состоит из катушки индуктивности (индуктивность L) и конденсатора (емкость C) и возбуждается ламповой или транзисторной схемой. Переменные поля очень низких частот, используемые для передачи электрической энергии, создаются электромашинными генераторами тока, в которых роторы, несущие проволочные обмотки, вращаются между полюсами магнитов.

СПЕКТРОСКОПИЯ, раздел физики, посвященный изучению спектров электромагнитного излучения.

СВЕТ – это электромагнитное излучение с длиной волны λ от 10^{-3} до 10^{-8} м. Этот диапазон длин волн включает инфракрасную (ИК), видимую и ультрафиолетовую (УФ) области. Инфракрасный интервал спектра (от 1 мм до 750 нм) подразделяется на дальнюю (1 мм – 50 мкм), среднюю (50 – 2,5 мкм) и ближнюю (2,5 мкм – 750 нм) области. При комнатной температуре любое материальное тело излучает в дальней инфракрасной области, при температуре белого каления излучение сдвигается в ближнюю инфракрасную, а затем и в видимую часть спектра. Видимый спектр простирается от 750 нм (красная граница) до 400 нм (фиолетовая граница). Свет этих длин волн воспринимается человеческим глазом, и именно на эту область приходится большое число спектральных линий атомов. Диапазон от 400 до 200 нм соответствует ультрафиолетовой области, далее примерно до 1 – 10 нм следует вакуумный ультрафиолет.

ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ, электромагнитные волны, возбуждаемые различными излучающими объектами, – заряженными частицами, атомами, молекулами, антеннами и пр. В зависимости от длины волны различают гамма-излучение, рентгеновское, ультрафиолетовое излучение, видимый свет, инфракрасное излучение, радиоволны и низкочастотные электромагнитные колебания.

Заключение

В процессе обучения большинство студентов сталкивается с разнообразными экспериментальными методами исследования веществ, в том числе со многими спектрометрическими методами анализа.

Методы прикладной спектроскопии (спектрометрические методы анализа) позволяют наблюдать взаимодействие электромагнитного излучения с атомами или молекулами исследуемого вещества. Это взаимодействие можно рассматривать как процесс возникновения сигналов, которые содержат информацию о свойствах исследуемого вещества. Для наблюдения и исследования таких сигналов в различных областях спектра используют самые разнообразные физические закономерности. Благодаря этому, методы прикладной спектроскопии позволяют получать детальную информацию о составе и строении исследуемых веществ и материалов.

Задача данного учебно-методического пособия состоит в том, чтобы показать читателям, как много разных спектроскопических методов исследования веществ используется в настоящее время. Можно надеяться, что после того, как студент познакомится с современными методами прикладной спектроскопии, у него появится желание добавить к минимуму основных сведений, приведенных в данном пособии, информацию, собранную в монографиях, которые посвящены затронутым темам.

Библиографический список

1. **Васильев, В.П.** Аналитическая химия. В 2 кн.: Кн.2: Физико-химические методы анализа: Учеб. для студ. вузов. – М.: Дрофа, 2003. – 384 с.
2. **Олиференко, Г.Л.** Физико-химические методы анализа: учеб. пособие/ Г.Л. Олиференко, А.Д. Неклюдов, А.Н. Иванкин. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. – 232 с.
3. **Олиференко, Г.Л.** Аналитическая химия: Учебное пособие для студентов спец. 260300 / Под ред. проф. А.Д. Неклюдова. – М.: МГУЛ, 2005. – 47 с.
4. **Дорохова, Е.Н.**, Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа / Дорохова Е.Н., Прохорова Г.В. – М.: Высшая школа, 1995. – 256 с.
5. **Неклюдов, А.Д.** Практический курс по общей химии, биотехнологии и экологическим основам производств: учебное пособие для студентов спец. 260300 / А.Д. Неклюдов, А.Н.Иванкин, Г.Н.Федотов. – М.: МГУЛ, 2004. – 500 с.
6. **Иванкин, А.Н.** Спектрометрия. Контрольный тест./ Электронное учебное пособие на CD. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. – 15 с.
7. **Иванкин, А.Н.** Спектрометрия. Контрольный тест к лабораторным работам по спектрометрическим методам/ Электронное учебное пособие на CD. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. – 20 с.
8. http://www.turpion.rosugol.ru/main/pa_rcr.html – обзоры периодических статей по спектроскопии в химии
9. <http://www.yandex.ru> – основная поисковая система информации по спектроскопии и другим вопросам, поиск по ключевым словам на русском языке.
10. <http://www.chemport.ru/?cid=34> – банк многостраничных электронных отечественных и зарубежных книг по химии и спектрометрии выпуска 1970-2006 гг.
11. <http://elibrary.ru/> – научная электронная библиотека.
12. <http://www.fips.ru/> – патенты России.

Приложения

В соответствии с требованиями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) установлены нормативы предельного содержания веществ в питьевой воде – ПДК, мг/л, не более: акриламида – 0,0005; алахлора – 0,02; алюминия – 0,2; альдикарба – 0,01; альдрина – 0,00003; аммония – 0,2; атразина – 0,002; бария – 0,7; бенз(а)пирена – 0,0006; бензатола – 0,03; бензола – 0,0007; бора – 0,3; броматов – 0,025; бромдихлорметана – 0,06; бромформа – 0,1; винилхлорида – 0,01; гексахлорбензола – 0,001; гексахлорбутадиена – 0,005; гептахлора – 0,00003; ДДТ – 0,002; дибромацетонитрила – 0,1; 1,2-дибром-3-хлорпропана – 0,001; дибромхлорметана – 0,1; дихлорацетонитрила – 0,09; 1,2-дихлорбензола – 0,001; 1,4-дихлорбензола – 0,0003; дихлорметана – 0,02; дихлорпропа – 0,1; 1,2-дихлорпропана – 0,02; 1,3-дихлорпропена – 0,02; дихлоруксусной кислоты – 0,05; 2,4-дихлорфеноксимасляной кислоты – 0,09; 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты – 0,009; 2,4-дихлорфенола – 0,0003; 1,2-дихлорэтана – 0,03; 1,2 – дихлорэтилена – 0,05; ди(2-этилгексил)адипината – 0,08; ди(2-этилгексил)фталата – 0,008; железа – 0,3; кадмия – 0,003; ксилола – 0,02; lindana – 0,002; марганца – 0,1; меди – 1; 2-метил-4-хлор-феноксиуксусной кислоты – 0,002; метоксихлора – 0,02; метолахлора – 0,01; молибдена – 0,07; молината – 0,006; монохлорамина – 3; монохлорбензола – 0,01; мышьяка – 0,01; натрия – 200; никеля – 0,02; нитратов – 50; нитритов – 3; нитрилотриуксусной кислоты – 0,2; пендиметалина – 0,02; пентахлорфенола – 0,009; перметрина – 0,02; пиридата – 0,1; пропанила – 0,02; ртути – 0,001; свинца – 0,01; селена – 0,01; сероводорода – 0,05; сильвекса – 0,009; симазина – 0,002; стирола – 0,004; сульфатов – 250; сурьмы – 0,005; 2,4,5-Т – 0,009; текопропа – 0,01; тетрахлорэтилена – 0,04; толуола – 0,02; тригалометана – 0,001; трифлуралина – 0,02; трихлорацетальдегида – 0,01; трихлорбензола – 0,005; трихлортрибутилоловооксида – 0,002; трихлоруксусной кислоты – 0,1; 2,4,6-трихлорфенола – 0,002; 1,1,1-трихлорэтана – 2; трихлорэтилена – 0,07; формальдегида – 0,9; фтора – 1,5; хлора – 0,6; хлордана – 0,0002; хлоридов – 250; хлоритов – 0,2; хлортолурана – 0,03; 2-хлорфенола – 0,0001; хлорциана – 0,07; хрома – 0,05; цианидов – 0,07; цинка – 3; четыреххлористого углерода – 0,002; эпихлоргидрина – 0,0004; ЭДТА – 0,2; этилбензола – 0,002. Показатель кислотности рН 6,5–8,5. Микроорганизмы термотолерантные и другие колиформы не должны обнаруживаться в 100 мл пробы.

Таблица 1

Стандартное пропускание (T) и оптическая плотность (A) стандартных растворов:

1) 0,04 г/л K_2CrO_4 в 0,05 М KOH; 2) 20 г/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 10 мл/л H_2SO_4

λ , нм	0,04 г/л K_2CrO_4 в 0,05 М KOH		20 г/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 10 мл/л H_2SO_4	
	T , %	A	T , %	A
340	48,5	0,307	–	–
405	52,25	0,28	99,55	0,01
495	100	0	99,4	0,0095
546	–	–	97,0	0,01
578	–	–	91,4	0,04

Таблица 2

Характеристические частоты поглощения некоторых группировок в ИК спектрах

Группировка	ν , cm^{-1}	λ , мкм	Интенсивность	Примечание
–CH ₃	2975–2950	3,36–3,39	Сильно	$\nu_{as}(CH_3)$
	2885–2860	3,47–3,50	Сильно	$\nu_s(CH_3)$
С–ОН	1075–1000	9,30–10,00	Сильно	Широкая
	1350–1260	7,40–7,94	Сильно	
–CH ₂ –COOH	1760	5,68	Сильно	
NO ₃ [–]	1410–1340	7,09–7,46	Очень сильно	
	860–800	11,6–12,5	Средне	

Оглавление

Предисловие.....	3
Программа курса «Физико-химические методы исследований».....	4
Введение.....	7
Г л а в а 1. Оптические методы анализа.....	11
1.1. Классификация оптических методов анализа.....	11
1.2. Фотометрический анализ.....	11
1.3. Атомно-абсорбционная спектрофотометрия	23
1.4. Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа.....	27
1.5. Люминесцентный метод анализа.....	30
1.6. Рентгенофлуоресцентный метод анализа	39
1.7. Преломление света. Рефрактометрия.....	45
1.8. Поляриметрия.....	49
1.9. Изучение объектов при освещении видимым светом. Микроскопия...	53
Г л а в а 2. Современные инструментальные методы спектрометрического анализа	63
2.1. Инфракрасная спектрометрия (ИК-спектрометрия).....	63
2.2. Ядерно-магнитный резонанс. ЯМР-спектроскопия.....	71
2.3. Масс-спектрометрия.....	75
Г л а в а 3. Хроматографические методы разделения и анализа.....	79
3.1. Сущность хроматографии.....	79
3.2. Классификация хроматографических методов анализа.....	80
3.3. Хроматографические характеристики.....	84
3.4. Виды хроматографии.....	86
3.4.1. Ионообменная хроматография.....	86
3.4.2. Распределительная хроматография.....	87
3.4.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	90
3.4.4. Газовая хроматография.....	90
Г л а в а 4. Учебно-исследовательский практикум.....	106
4. 1. Лабораторные работы.....	106
Р а б о т а 4.1.1. Фотометрическое определение марганца в виде перманганата методом градуировочного графика	106
Р а б о т а 4.1.2. Фотометрическое определение хрома в виде дихромата методом сравнения.....	108
Р а б о т а 4.1.3. Определение меди в виде аммиаката дифференциально-фотометрическим методом	109
Р а б о т а 4.1.4. Преломление света. Определение показателя преломления жидкостей	111
Р а б о т а 4.1.5. Спектроскопия отражения. Анализ происхождения материалов в ультрафиолетовом свете.....	116
Контрольные вопросы и задачи.....	117
Термины и определения.....	120
Заключение	122
Библиографический список.....	123
Приложение.....	124
Оглавление.....	126

Учебное издание

Иванкин Андрей Николаевич
Олиференко Галина Львовна
Беляков Владимир Алексеевич
Вострикова Наталья Леонидовна

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА. СПЕКТРОМЕТРИЯ

Редакция авторов

Компьютерный набор и верстка А.Н. Иванкина, Г.Л. Олиференко

По тематическому плану внутривузовских изданий учебной литературы на 2016 г, поз. доп....

Подписано в печать .06.2016. Формат 60×90 1/16. Бумага 80 г/м²
Гарнитура «Таймс». Ризография. Усл. печ. л. 7,9
Тираж 100 экз. Заказ №

Издательство Московского государственного университета леса
141005, Мытиши-5, Московская обл., 1-я Институтская, 1, МГУЛ.
E-mail: izdat@mgul.ac.ru