

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.21 Физико-химические методы анализа

Направление подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции

Профиль подготовки Технология производства и переработки продукции животноводства

Квалификация выпускника бакалавр

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Общие вопросы теории физико-химического анализа	
1.2 Лекция № 2 Спектральные методы анализа. Классификация спектральных методов	
1.3 Лекция № 3 Молекулярная абсорбционная спектроскопия	
Рефрактометрический и поляриметрический методы анализа	
1.4 Лекция № 4 Спектрофотометрия	
1.5 Лекция № 5 Электрохимические методы анализа Потенциометрия.	
1.6 Лекция № 6 Вольтамперметрия	
1.7 Лекция № 7 Хроматографические методы и их классификация	
1.8 Лекция № 8 Жидкостная хроматография	
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	22
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1. Общие вопросы теории физико-химического анализа	
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 Спектральные методы анализа. Классификация спектральных методов	
2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 Атомно-эмиссионный спектральный анализ	
2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 Атомно-абсорбционная спектрометрия	
2.5 Лабораторная работа № ЛР-5 Молекулярная абсорбционная спектроскопия	
Рефрактометрический и поляриметрический методы анализа.	
2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 Фотометрия	
2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 Спектрофотометрия	
2.8 Лабораторная работа № ЛР-8 Нефелометрия	
2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 Электрохимические методы анализа	
Потенциометрия.	
2.9.1 Лабораторная работа № ЛР-10 Кондуктометрия.	
2.9.2 Лабораторная работа № ЛР-11 Кулонометрия..	
2.9.3 Лабораторная работа № ЛР-12 Вольтамперметрия.	
2.9.4 Лабораторная работа № ЛР-13 Хроматографические методы и их классификация	
2.9.5 Лабораторная работа № ЛР-14 Газовая хроматография.	
2.9.6 Лабораторная работа № ЛР-15 Ионообменная хроматография.	
2.9.7 Лабораторная работа № ЛР-16 Жидкостная хроматография.	

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция №1(2 часа).

Тема: Общие вопросы теории физико-химического анализа

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Классификация физико-химических методов анализа.
2. Метрологические характеристики физико-химических методов анализа.

1.1.2 Краткое содержание вопросов

Физико-химические методы анализа:

спектральные
электрохимические
хроматографические

Принцип определения химического состава вещества любым методом сводится к тому, что состав вещества определяется по его свойствам. Свойства веществ делятся на 2 группы. Интенсивные свойства не зависят от количества вещества и не обладают свойством аддитивности (способностью суммироваться). Их используют для целей качественного анализа. При этом свойство только фиксируется. К интенсивным свойствам относятся, например, характерный спектр поглощения или испускания, показатель преломления вещества, длина волны или частота линии в спектре и др. Экстенсивные свойства зависят от количества вещества и обладают свойством аддитивности. Их используют для целей количественного анализа. При этом основное внимание уделяют измерению

свойства вещества в исходном состоянии или после химических превращений. К экстенсивным свойствам относятся, например, светопоглощение, интенсивность спектральной линии, показатель преломления раствора и др.

Классификация методов аналитической химии по принципу получения аналитического сигнала

В зависимости от принципа получения АС все методы аналитической химии делятся на 3 основные группы

1 Химические методы анализа основаны на использовании химических реакций. При этом проводят реакцию, а затем наблюдают аналитический эффект или измеряют аналитический сигнал.

2 Физические методы анализа основаны на измерении физических свойств веществ, зависящих от химического состава. При этом наблюдение аналитического эффекта или измерение аналитического сигнала выполняют непосредственно с анализируемым веществом.

Химические реакции либо совсем не проводят, либо они играют вспомогательную роль. Основной упор делают на измерение АС.

3 Биологические методы анализа основаны на измерении интенсивности развития микроорганизмов в зависимости от количества анализируемого вещества – аминокислоты, фермента, витамина и т. п. Об интенсивности роста судят по числу выросших колоний или их

диаметру. Кроме того, различают ещё 3 группы комбинированных (переходных) методов анализа

4 Физико-химические методы анализа основаны на измерении физических свойств веществ, которые появляются или изменяются в результате химических реакций. При этом сначала проводят реакцию, а затем измеряют физическое свойство продукта реакции или используют измерение физического свойства в ходе реакции для установления конечной точки титрования.

2 В биофизических методах анализа об интенсивности роста колоний микроорганизмов судят по интенсивности помутнения среды, что можно определить с помощью нефелометрии.

3 В биохимических методах анализа об интенсивности роста колоний микроорганизмов судят по количеству образовавшейся молочной кислоты (определяется титриметрически), высушенной массе выросших микроорганизмов (определяется гравиметрически).

Химические методы анализа иначе называют классическими, а физические и физико-химические методы анализа — инструментальными, т. к. проведение анализа с привлечением этих методов невозможно без использования измерительной аппаратуры. Инструментальные методы анализа — это основные методы современной аналитической химии.

Спектральные и другие оптические методы анализа, основанные на измерении оптических свойств и различных эффектов, наблюдаемых при взаимодействии вещества с электромагнитным излучением.

Электрохимические методы анализа, основанные на измерении электрических параметров.

Хроматографические методы анализа, основанные на использовании сорбции в динамических условиях, применяются для разделения и анализа однородных многокомпонентных смесей.

1. 2 Лекция №2(2 часа).

Тема Спектральные методы анализа. Классификация спектральных методов

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Спектральные методы анализа.

2. Классификация спектральных методов

1.1.2 Краткое содержание вопросов

Под названием *спектральный анализ* мы понимаем физический метод анализа химического состава вещества, основанный на исследовании спектров испускания и поглощения атомов или молекул. Эти спектры определяются свойствами электронных оболочек атомов и молекул, колебаниями атомных ядер в молекулах и вращением молекул, а также воздействием массы и структуры атомных ядер на положение энергетических уровней; кроме того они зависят от взаимодействия атомов и молекул с окружающей средой. В соответствии с этим спектральный анализ использует широкий интервал длин волн — от рентгеновых до микрорадиоволн. В спектральный анализ не входят масс-спектрометрические методы анализа, как не относящиеся к области использования электромагнитных колебаний.

Задача ограничивается пределами оптических спектров. Однако и эта область достаточно широка, она охватывает вакуумную область ультрафиолетовых излучений, ультрафиолетовую, видимую и инфракрасную области спектра. В практике современный спектральный анализ использует излучения с длиной волны примерно от 0,15 до 40—50 μm . Различные типы спектрального анализа следует рассматривать с трех точек зрения.

1. По решаемым задачам:

1. *элементный*, когда устанавливается состав пробы по элементам;
2. *изотопный*, когда устанавливается состав пробы по изотопам;
3. *молекулярный*, когда устанавливается молекулярный состав пробы;
4. *структурный*, когда устанавливаются все; или основные структурные составляющие молекулярного соединения.

2. По применяемым методам:

1. *эмиссионный*, использующий спектры излучения, главным образом атомов. Однако возможен эмиссионный анализ и молекулярного состава, например в случае определения состава радикалов в пламенах и газовом разряде. Особым случаем эмиссионного анализа является люминесцентный анализ;
2. *абсорбционный*, использующий спектры поглощения, главным образом молекул и их структурных частей; возможен анализ по спектрам поглощения атомов;

3. *комбинационный*, использующий спектры комбинационного рассеяния твердых, жидких и газообразных проб, возбуждаемые монохроматическим излучением, обычно — светом отдельных линий ртутной лампы;
4. *люминесцентный*, использующий спектры люминесценции вещества, возбуждаемые главным образом ультрафиолетовым излучением или катодными лучами;
5. *рентгеновский*, использующий а) рентгеновские спектры атомов, получающиеся при переходах внутренних электронов в атомах, б) дифракцию рентгеновых лучей при прохождении их через исследуемый объект для изучения структуры вещества;
6. *радиоспектроскопический*, использующий спектры поглощения молекул в микроволновом участке спектра с длинами волн больше 1 мм.

По характеру получаемых результатов:

- 1) *качественный*, когда в результате анализа определяется состав без указания на количественное соотношение компонентов или дается оценка — много, мало, очень мало, следы;
- 2) *полуколичественный*, или грубоколичественный, или приближенный. В этом случае результат выдается в виде оценки содержания компонентов в некоторых более или менее узких интервалах концентраций в зависимости от применяемого метода приближенной количественной оценки. Этот метод благодаря его быстрой работе нашел широкое применение при решении задач, не требующих точного количественного определения, например при сортировке металла, при оценке содержания геологических проб при поисках полезных ископаемых;
- 3) *количественный*, при котором выдается точное количественное содержание определяемых элементов или соединений в пробе. Все эти типы анализа, за исключением качественных, используют упрощенные или точные методы фотометрирования спектров.

По способу регистрации спектров различаются следующие методы:

1. *Визуальные* при наблюдении спектров в видимой области с помощью простых или специализированных спектроскопов. В ультрафиолетовой области возможно наблюдение сравнительно ярких спектров с помощью флуоресцирующих экранов, располагаемых вместо фотографической пластинки в кварцевых спектрографах. Применение электронно-оптических преобразователей позволяет визуально наблюдать спектры в ультрафиолетовой и ближней инфракрасной областях (до 12000 Å).
2. *Фотографические*, использующие фотографическую пластинку или пленку для регистрации спектров с последующей обработкой.
3. *Фотоэлектрические* для ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной областей, использующие фотоэлементы разных типов» фотоумножители и фотосопротивления (инфракрасная область). Фотоэлектрические методы иногда называются методами прямого анализа, т. е. анализа без посредства фотографической пластинки.
4. *Термоэлектрические* для инфракрасной области, в том числе далекой, с использованием термоэлементов, болометров и других типов термоэлектрических приемников.

Рассмотренные выше типы спектрального анализа имеют ряд общих черт, поскольку все они используют спектры атомов или молекул как средство для проведения анализа. Действительно, во всех случаях необходимо в первую очередь получить спектр пробы, затем расшифровать этот спектр по таблицам или атласам спектров, т. е. найти в этом спектре линии или полосы, характерные для определяемых атомов, молекул или структурных элементов молекул. Этим ограничивается качественный анализ. Для получения количественной величины концентрации надо, кроме того, определить интенсивность этих характерных линий или полос (фотометрировать спектр), затем определить величину концентрации, используя зависимость между концентрацией и интенсивностью линий или полос. Зависимость эта "должна быть получена либо на

основании теоретических соображений, либо эмпирическим путем в виде аналитической кривой, построенной на основе набора проб с заданными концентрациями (эталоны).

1. 3 Лекция №3(2 часа).

Тема «Молекулярная абсорбционная спектроскопия Рефрактометрический и поляриметрический методы анализа»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Молекулярная абсорбционная спектроскопия

2. Рефрактометрический и поляриметрический методы анализа

1.3.2 Краткое содержание вопросов

Молекулярная абсорбционная спектроскопия основана на поглощении электромагнитного излучения веществами. В зависимости от энергии поглощаемых фотонов различают абсорбционную спектроскопию в видимой и УФ, инфракрасной, микроволновой, рентгеновской областях. Спектроскопию в видимой и УФ-областях традиционно называют *спектрофотометрией*. Энергия фотонов в этих областях спектра достаточна для переходов электронов в молекуле с одного энергетического уровня на другой. Количественное поглощение системой излучения описывается законами Бугера-Ламберта-Бера и аддитивности.

Закон Бугера-Ламберта-Бера.

Пусть поток монохроматического излучения с интенсивностью I_0 проходит через слой раствора с концентрацией поглощающих частиц c и толщиной l . При этом одна часть потока рассеивается, другая – отражается, третья – поглощается. В результате выходящий поток с интенсивностью I_l будет ослаблен, т.е. $I_l < I_0$.

Отношение I_l/I_0 называют *пропусканием*. Оно показывает, какая доля падающего на раствор света поглощается, при этом доля рассеянного и отраженного света обычно мала, и ее пренебрегают. Пропускание часто выражают в процентах. Для абсолютно прозрачных растворов $T=100\%$, для абсолютно непрозрачных $T=0$.

Выделим в растворе слой толщиной dx . Чем больше частиц встретится на пути светового потока в этом слое, тем больше света поглотится. Число поглощающих частиц в слое пропорционально их концентрации и объему раствора.

Уравнение $A = \epsilon cl$,

является математически выражением основного закона светопоглощения или Бугера-Ламберта-Бера: *количество электромагнитного излучения, поглощенного раствором, пропорционально концентрации поглощающих частиц и толщине слоя раствора.*

Значение ϵ отражает способность вещества поглощать свет. Эта способность не безгранична и определяется строением молекулы. Ее значение можно рассчитать для каждого вещества из экспериментальных данных.

Аппаратура для измерения поглощения света.

Прибор для измерения светопоглощения должен выполнять две основные задачи: 1). Разложение полихроматического света и выделение нужного интервала длин волн, 2). Измерение поглощения света веществом (монохроматор или светофильтр), кюветное отделение, детектор, преобразователь сигнала (шкалу или цифровой счетчик).

Кондуктометрический метод.

Основателем кондуктометрического метода (анализа) считается немецкий физик и физико-химик Ф.В.Кольрауш (1840-1910), который впервые в 1885 г. предложил уравнение, устанавливающее связь между электропроводностью растворов сильных электролитов и их концентрацией.

К.а. основан на использовании зависимости между электропроводностью растворов электролитов и их концентрацией.

Спектральный анализ.

Физический метод качественного и количественного определения состава вещества на основе изучения спектров. Оптический спектральный анализ отличается относительной простотой выполнения, экспрессностью, отсутствием сложной подготовки проб к анализу и, наконец, незначительным количеством вещества (10-30 мг), необходимого для анализа на большое число элементов.

Спектры эмиссии получают переводением вещества в парообразное состояние и возбуждением атомов элементов нагреванием вещества до 1000 –10000 °С. В качестве источников возбуждения спектров при анализе материалов, проводящих ток, применяют искру, дугу переменного тока. Пробу помещают в кратер одного из угольных электродов. Для анализа растворов широко используют пламя различных газов. Качественный и полуколичественный С.а. сводятся к установлению наличия или отсутствия в спектре характерных линий и оценки по их интенсивностям содержания искомых элементов. Количественное определение содержания элемента основано на эмпирической зависимости (при малых содержаниях) интенсивности спектральных линий от концентрации элемента в пробе. Чувствительный метод и широко применяется в химии, астрофизике, металлургии, машиностроении, геохимии. Метод С.А был предложен в 1859 г. Г.Кирхгофом и Р.Бунзеном.

Люминесцентный метод.

Люминесцентный анализ— совокупность методов анализа, основанных на наблюдении люминесценции – излучения тел, представляющего избыток над температурным излучением тела и обладающего длительностью около 10^{-10} сек и больше. Для возбуждения свечения вещество должно предварительно поглотить некоторое количество энергии и перейти в возбужденное состояние, более богатое энергией. При возвращении вещества в нормальное состояние часть избыточной энергии выделяется в виде излучения с большей длиной волны. Длительность возбужденного состояния отличает явление люминесценции от рассеяния света, отражения и др. кратковременных видов свечения.

- 1) интенсивность люминесценции возрастает с увеличением концентрации вещества только до некоторого предела, после чего она начинает уменьшаться (концентрационное тушение)
- 2). на интенсивность л. сильное влияние оказывает присутствие примесей, которые могут вызывать ее гашение
- 3). спектры поглощения и люминесценции являются зеркальными, т.е. они как правило, не перекрывают друг друга
- 4). спектры люминесценции сужаются, иногда они даже могут трансформироваться в квазилинейные, что облегчает идентификацию вещества и определение его концентраций по интенсивности линий.

Для возбуждения Л. применяют обычно фильтрованный УФ-свет (ртутно-кварцевая лампа ПРК и светофильтр марки УФС-3 и УФС-4, почти полностью поглощающий видимый свет, но пропускающий ближний ультрафиолетовый. Л. лучше наблюдать в темном помещении Наблюдения ведут визуально или пользуясь специальными приборами типа колориметров или фотоколориметров в которых источник УФ-света и приемник люминесценций расположены под прямым углом

Фотолюминесценция – люминесценция, возникающая под действием световых квантов. Различают Ф. с коротким послесвечением (10^{-10} сек), наз. *флуоресценцией* и с длительным послесвечением (секунды, минуты, часы) наз. *фосфоресценцией*.

В случае *флуоресценции* происходит самопроизвольный переход электронов на невозбужденный уровень с излучением кванта света, меньшего чем поглощенный. В случае *фосфоресценции* дискретных центров предполагается, кроме невозбужденного и возбужденного уровней, еще и метастабильный уровень, на котором возможна некоторая задержка электронов. За счет тепловой энергии электроны могут вновь подняться на возбужденный уровень и возвратиться на невозбужденный с испусканием кванта свет

Рефрактометрия- это физико-химический метод исследования для определения состава и структуры веществ, а также для контроля качества и состава различных продуктов в химической, фармацевтической, пищевой и многих других отраслях промышленности.

Рефрактометрический метод анализа, основан на зависимости от коэффициента преломления и концентрации двухкомпонентных растворов или смесей двух жидкостей, рефрактометрия **твердых** веществ в анализе пищевых продуктов не применяется. Метод основан на преломлении луча света при переходе из одной среды в другую. Правильность показания шкалы рефрактометра проверяют измерением показателя преломления дистиллированной воды при $t=20$. Он должен быть равен $n=1.3330$.

Достоинства метода:

- относительная простота аппаратуры и техники выполнения
- высокая точность
- экспрессность (несколько минут)
- микрометод (1-2 капли)

Поляриметрия- методы физико-химических исследований, основаны 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 оптически активных веществ.

Поляриметрия широко применяется в аналитической химии для быстрого измерения концентрации оптически-активных веществ. Для идентификации эфирных масел и в других исследованиях.

Поляризация- процессы и состояния, связанные с разделением каких-либо объектов, преимущественно в пространстве.

Методы основаны на измерении:

- степени поляризации излучения (света, радиоволн)
- оптической активности веществ или их растворов.

Поляриметрия- дает ценную информацию о природе заместителей в органических молекулах, о строении комплексных неорганических соединений.

Поляриметр.

Это прибор, измеряющий параметры поляризации частично поляризованного излучения. Применяется для изучения структуры и свойств вещества. Имеет прикладное применение в лабораториях пищевой, химической промышленности и других отраслях науки и производства для определения концентрации растворов оптически активных веществ, таких как сахар, глюкоза, белок.

Строение прибора:

- источник света
- неполяризованный свет
- поляризатор
- поляризованный свет
- кювета с раствором исследуемого вещества
- оптическое вращение
- анализатор

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Спектрофотометрия

1.4.2 Краткое содержание вопросов

Спектрофотометрия – метод исследования и анализа, основанный на измерении спектров поглощения в оптической области электромагнитного излучения. Спектрофотометрия широко применяется для исследования органических и неорганических веществ, для качественного и количественного определения различных веществ, для контроля технологических процессов и окружающей среды. По типам изучаемых систем спектрофотометрию обычно делят на атомную и молекулярную. Спектры возникают при переходе системы из одного стационарного состояния в другое. При этом система поглощает или испускает энергию в виде кванта, величина которого равна разности энергии двух состояний:

$$h\nu = E_2 - E_1$$

где h – постоянная Планка; ν – частота кванта света.

Вместо частоты ν используют волновое число $\omega = \nu/c = 1/\lambda$, где c – скорость света; λ – длина волны. Волновое число ω также называют частотой. Тогда частота спектральных линий определяется по формуле:

$$\omega = (E_2 - E_1)/ch$$

В свою очередь, энергетическое состояние определяется свойствами электронных оболочек атомов и молекул, колебаниями атомных ядер в молекулах и вращением молекул. Различают спектроскопию в инфракрасной (ИК), видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях спектра.

Съёмка молекулярных спектров основывается на следующем законе: молекула поглощает электромагнитное излучение только таких длин волн, какие она может излучать. При пропускании пучка лучей, имеющего сплошной спектр, сквозь слой определяемого вещества последнее поглощает лучи определённых длин волн. По спектральному составу света, поглощаемого молекулами данного вещества, можно судить о природе этих молекул. На этом основаны качественная и структурная спектроскопия. Применение спектроскопии в УФ и видимой областях спектра основано на поглощении электромагнитного излучения соединениями, содержащими хромофорные и ауксохромные группы.

Количественный спектральный анализ основан на том, что количество поглощаемой энергии зависит от числа молекул, принимающих участие в этих процессах. Основным законом, на котором основан количественный спектрофотометрический анализ, является закон Бугера-Ламберта-Бера.

Закон Бугера-Ламберта-Бера: каждая молекула (ион) растворённого вещества поглощает одинаковую часть монохроматического излучения; интенсивность излучения после прохождения слоя раствора уменьшается экспоненциально с увеличением концентрации растворённого вещества, а оптическая плотность линейно увеличивается с ростом концентрации. Этот закон объединяет два более простых закона: закон Бугера-Ламберта и закон Бера.

Закон Бугера-Ламберта: говорит о том, что каждый слой однородного вещества поглощает равную долю падающего на него монохроматического излучения.

Закон Бера: устанавливает связь между поглощением и концентрацией: поглощение монохроматического излучения прямо пропорционально концентрации поглощающего вещества.

Вывод закона Бугера-Ламберта-Бера: В толще раствора мысленно выделим элементарный слой сечением 1 см^2 и толщиной dx см. Объём этого слоя равен $dx \text{ см}^3$. Если концентрацию раствора выразить через число молекул (ионов) растворённого вещества в 1 см^3 , то их количество в элементарном слое равно Ndx . Направим на элементарный слой, перпендикулярно к нему поток излучения с длиной волны λ и интенсивностью I (интенсивность равна энергии излучения, падающего на единицу

поверхности в единицу времени). Предположим, что монохроматическое излучение с длиной волны λ поглощается только молекулами растворённого вещества и притом в равных количествах. Тогда уменьшение интенсивности излучения при прохождении через элементарный слой будет пропорционально числу поглощающих молекул и интенсивности падающего излучения. Закон Ламберта справедлив при любой толщине слоя, если свет является монохроматичным, т.е. характеризуется только одной определённой частотой колебаний. Несоблюдение условия монохроматичности света приводит к нарушению этого закона, так как коэффициент поглощения зависит от длины волны.

Область применения закона Бера является значительно более узкой, так как он предполагает независимость коэффициента поглощения от концентрации. Однако в растворах небольших концентрации коэффициент поглощения изменяется с ростом концентрации, так как при этом изменяется состояние вещества в растворе (вследствие ассоциации, диссоциации, полимеризации и т.д.).

Спектры излучения и поглощения. Как правило, анализируемая проба излучает и поглощает полихроматический свет, включающий кванты разной энергии и разной длины волны. Однако для аналитика предпочтительнее измерять испускание или поглощение света, в котором все кванты примерно одинаковы по энергии, соответствуют одной длине волны. Чтобы выделить ее из полихроматического излучения, нужно особое устройство – *монохроматор*. На рис.1. показана схема спектрального прибора с призмным монохроматором.

Спектральные приборы, снабженные монохроматорами, называют спектрометрами, спектрографами или стилоскопами, в зависимости от используемого в них приемника излучения, то есть от того, какой способ регистрации спектра (фотоэлектрический, фотографический или визуальный) применяется в этих приборах. С помощью таких приборов можно зарегистрировать спектр излучения или спектр поглощения исследуемой пробы.

Особенности спектров разного типа и их аналитическое применение. Атомные спектры поглощения и излучения, наблюдаемые во всем оптическом диапазоне, определяются переходами электронов, относящихся к наружным слоям («валентные электроны»). Таким образом, атомные спектры по своей природе являются *электронными*, а по внешнему виду – *линейчатыми*. Положение спектральных линий в шкале длин волн и их относительную интенсивность используют как идентификационные признаки в качественном элементном анализе.

Молекулярные спектры излучения или поглощения обычно не являются линейчатыми. Вид молекулярных спектров в разных диапазонах длин волн различен, поскольку различно происхождение соответствующих спектров. Спектры поглощения молекул в видимой или УФ-области являются *широкополосными*. Они дают сравнительно мало информации для выяснения состава и структуры поглощающих молекул. Это мешает проведению качественного анализа по спектрам в УФ- или видимой области.

Изучение молекулярных спектров – это важнейший способ количественного химического анализа. Заметим, что количественное определение какого-либо вещества по известной методике вовсе не требует регистрации полного спектра излучения (или поглощения) пробы. Достаточно было бы измерить аналитический сигнал на заранее выбранной длине волны. Спектры нужны для решения гораздо более сложных задач. А именно:

По спектру индивидуального вещества выбирают ту длину волны, на которой в дальнейшем, в ходе количественного анализа, будут измерять аналитический сигнал этого вещества (I или A). Если для определения какого-либо элемента в атомно-эмиссионном спектральном анализе используют наиболее интенсивные линии эталонного спектра, то в молекулярно-абсорбционном (спектрофотометрическом) анализе аналитический сигнал обычно измеряют на длине волны, соответствующей максимуму на спектральной кривой.

Сопоставляя спектры предполагаемых компонентов пробы, выясняют возможность определения одних веществ в присутствии других. Если спектры компонентов пробы накладываются друг на друга, результаты анализа смеси будут завышенными. Для снижения систематических погрешностей, связанных с наложением спектров, созданы особые приемы измерений и расчета результатов. Другие выходы из положения - маскирование или предварительное отделение мешающих компонентов. **Аппаратура.** Для измерения оптической плотности растворов и регистрации спектров поглощения используют спектрофотометры (рис.3). Важнейшая их часть - монохроматор. Другие узлы - источник света, приемник излучения и регистрирующее устройство. **Источники света.** В зависимости от оптической области, в которой работает прибор, источниками света служат: в УФ-области – водородная или дейтериевая газоразрядные лампы, дающие сплошной спектр излучения; в видимой области – обычная лампа накаливания с вольфрамовой нитью, в ИК-области – *глобар*. Это керамический стержень, нагреваемый до температур порядка 1600 °С. **Монохроматоры.** В спектрофотометрах применяют призмные монохроматоры или дифракционные решетки. Материал, из которого изготавливают оптическую систему прибора, должен хорошо пропускать свет в рабочем диапазоне длин волн. В УФ-области используют кварц, в видимой области – стекло, в ИК-области – кристаллические соли, галогениды щелочных и щелочноземельных металлов (NaCl, KBr, CaF₂).

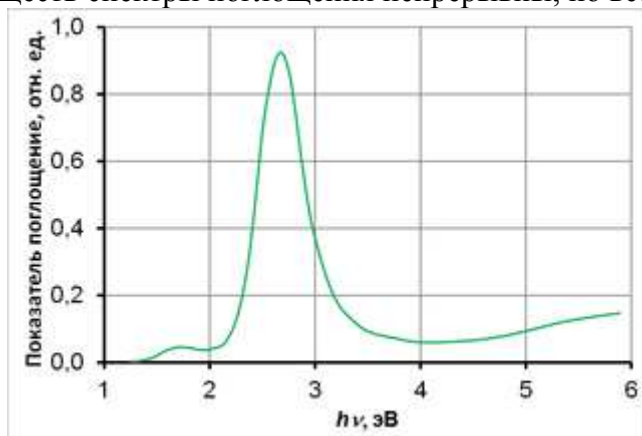
Спектр поглощения — зависимость показателя поглощения вещества от длины волны (или частоты, волнового числа, энергии кванта и т. п.) излучения. Он связан с энергетическими переходами в веществе. Для различных веществ спектры поглощения различны^[1].

Исторически первые наблюдения линейчатых оптических спектров поглощения в спектре Солнца проделал в 1802 году Волластон, но не придал открытию значения, поэтому эти линии были названы «фраунгоферовыми» в честь другого учёного Фраунгофера, который детально изучил их в 1814—1815 гг

Измерения спектров поглощения могут проводиться как с источником белого света, так и с источниками монохроматического излучения.

Для почти свободных атомов и молекул в разрежённых газах, оптический спектр поглощения состоит из отдельных спектральных линий и называется линейчатым.

Разным веществам соответствуют разные спектры поглощения, что позволяет использовать спектроскопические методы для определения состава вещества. Для твёрдых веществ спектры поглощения непрерывны, но встречаются и отдельные линии.



Спектр поглощения F-центров в кристалле NaCl

Спектр поглощения — зависимость показателя поглощения вещества от длины волны (или частоты, волнового)

Тема «Электрохимические методы анализа Потенциометрия»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Электрохимические методы анализа

2. Потенциометрия.

1.5.2 Краткое содержание вопросов

Электрохимические методы анализа (ЭХМА) основаны на использовании процессов, которые протекают на поверхности электродов или в приэлектродном пространстве.

Аналитическим сигналом в ЭХМА может служить любой электрический параметр, связанный с составом раствора и концентрацией вещества в нём, например, потенциал (E), сила тока (I), сопротивление (R), электрическая проводимость (W), количество электричества (Q).

Названия конкретных методов чаще всего связаны с измеряемыми электрическими параметрами: потенциометрия, амперометрия, кондуктометрия и т. д.

Основные узлы приборов электрохимических методов анализа. Приборы электрохимических методов анализа, несмотря на всё их многообразие, содержат одни и те же основные узлы: электрохимическую ячейку, устройство для измерения электрического параметра и внешние металлические проводники.

Гальванические элементы используются в потенциометрии, кондуктометрические ячейки, в которых электроды выполняют одинаковую функцию, – в кондуктометрии. В методах, основанных на протекании электролиза, применяются электролитические ячейки.

В качестве устройств для измерения электрических параметров служат микроамперметры (измерение силы тока I), милливольтметры (измерение разности потенциалов E), мосты переменного тока (измерение сопротивления R), кондуктометры (измерение электрической проводимости W) и др. Внешние металлические проводники осуществляют связь электрохимической ячейки с устройством для измерения электрического параметра.

Потенциометрия

Потенциометрией называют группу методов количественного анализа, основанных на использовании зависимости равновесного потенциала электрода, опущенного в раствор, от активности (концентрации) ионов этого раствора.

Теоретической основой потенциометрии является уравнение Нернста. Практически потенциометрия реализуется путем создания на основе исследуемой системы гальванического элемента.

В потенциометрии используют гальванические элементы, в которых потенциал одного из электродов зависит от концентрации исследуемого вещества. Этот электрод называют **рабочим (индикаторным) или электродом измерения**. Второй электрод в потенциометрии является **электродом сравнения**. Этот электрод выбирают с таким расчетом, чтобы его потенциал оставался постоянным и не зависел от состояния исследуемого раствора.

В таком случае измеренная э.д.с. будет зависеть только от потенциала индикаторного электрода. На основании изменения величины э.д.с. можно судить о концентрации вещества в исследуемом растворе.

Потенциометрические измерения являются надежными при изучении констант равновесия электродных реакций, коэффициентов активности ионов в растворе, констант нестойкости комплексных ионов, pH растворов.

Потенциометрические методы анализа имеют ряд преимуществ. Они особо чувствительны и не требуют для исследования больших объемов растворов. Существуют модификации потенциометрического определения, позволяющие проводить анализ в пробах, объем которых может не превышать десятых долей миллилитра, что важно для

биологических исследований. Поскольку равновесное значение потенциала устанавливается быстро, то потенциометрические измерения не требуют значительных затрат времени. Их можно проводить в мутных и окрашенных растворах, вязких средах.

Различают прямую и косвенную потенциометрию или потенциометрическое титрование.

Прямая потенциометрия (ионометрия) – это потенциометрический метод, в котором индикаторным электродом является ионоселективный электрод. Ионометрия – удобный, простой, экспрессный современный метод анализа. Для его реализации достаточно подобрать соответствующий ионоселективный электрод для определяемого иона. Особенно широко ионометрия используется при определении точной концентрации ионов H^+ в растворе. В качестве индикаторного электрода, как правило, применяют стеклянный электрод, селективный по отношению к ионам H^+ . Измерения э.д.с. производят с помощью специальных приборов, называемых рН-метрами. Их шкала откалибрована таким образом, что вместо измеряемой э.д.с. показывает значение рН раствора.

Потенциометрическое титрование является разновидностью титриметрических методов анализа. При потенциометрическом титровании анализируемый раствор, находящийся в электрохимической ячейке, титруют подходящим титрантом, фиксируя точку эквивалентности на основании характера изменения э.д.с. измеряемой цепи в зависимости от объема добавляемого раствора. По полученным данным строят кривую потенциометрического титрования и на этой кривой определяют точку эквивалентности и объем израсходованного титранта в точке эквивалентности.

Потенциометрическое титрование может быть использовано для определения концентрации кислоты или основания в анализируемом растворе. В этом случае составляют гальваническую цепь, содержащую индикаторный стеклянный электрод и электрод сравнения с постоянным известным потенциалом (например, хлорсеребряный):

Э.д.с. такой гальванической цепи будет зависеть от концентрации ионов H^+ в исследуемом растворе. Измеряя её с помощью соответствующего прибора, можно непосредственно определить рН среды.

Титруемый раствор строго определенного объема помещают в электролитическую ячейку с электродами и при перемешивании из бюретки небольшими порциями добавляют титрант (например, раствор щелочи при определении концентрации кислоты в исследуемой системе). После каждого добавления очередной порции раствора щелочи с помощью потенциометра определяют рН раствора и затем по полученным данным строят кривую титрования в координатах рН раствора – V(титранта)

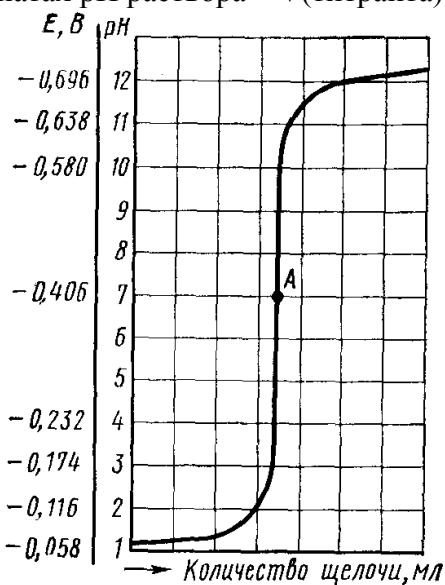


Рис. Кривая потенциометрического титрования соляной кислоты гидроксидом натрия: А – точка эквивалентности

В случае титрования сильной кислоты щелочью точка эквивалентности будет лежать на середине скачка титрования ($pH = 7$).

В ряде случаев чувствительность потенциометрического метода превышает чувствительность обычного объемного метода, а также метода кондуктометрического титрования

1. 6 Лекция №6(2 часа).

Тема Вольтамперметрия

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Вольтамперметрия

1.7.2 Краткое содержание вопросов

Вольтамперметрическими называют методы анализа, основанные на регистрации и изучении зависимости тока, протекающего через электролитическую ячейку, от внешнего наложенного напряжения. Графическое изображение этой зависимости называется вольтамперограммой

Для регистрации вольтамперограмм используют индикаторный электрод и электрод сравнения. В зависимости от типа индикаторного электрода вольтамперметрические методы принято делить на полярографию и собственно вольтамперметрию. Вольтамперметрия – один из электрохимических методов анализа, основанный на использовании явления поляризации микроэлектрода, получении и интерпретации поляризационных кривых, отражающих зависимость силы тока от приложенного напряжения. В вольтамперметрии используют два электрода: рабочий поляризуемый электрод с малой поверхностью и неполяризуемый электрод сравнения.

При прохождении постоянного тока через электролитическую ячейку процесс характеризуется соотношением:

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

где E – приложенное извне напряжение; E_a – потенциал анода; E_k – потенциал катода; I – ток в цепи; R – сопротивление электролитической ячейки.

2 При вольтамперметрических измерениях анализируемый раствор содержит индифферентный электролит большой концентрации, поэтому $R = 1$ кОм, а ток не превышает 10-5 А, откуда падением напряжения на ячейке пренебрегают. Если потенциал рабочего электрода измерять относительно потенциала электрода сравнения, условно приняв последний за нуль, то $E = E_a$ для рабочего микроэлектрода и $E = -E_k$ для рабочего микроэлектрода. Таким образом регистрируемая вольтамперограмма отражает электрохимический процесс, происходящий только на одном электроде. Если в растворе присутствуют вещества, способные электрохимически восстанавливаться или окисляться, то при наложении на ячейку линейно изменяющегося напряжения кривая ток-потенциал имеет форму волны (вольтамперограмма, или полярограмма). При низких значениях потенциала на рабочем микроэлектроде не протекает электрохимическая реакция.

При увеличении потенциала электрохимически активное вещество вступает в электрохимическую реакцию на электроде и ток резко возрастает (рис. 1, В).

При дальнейшем росте потенциала он достигает некоторое предельное значение, далее оставаясь постоянным. Если в качестве рабочего выбран электрод с постоянно обновляющейся поверхностью (например, ртутный капаящий электрод),

то метод анализа называют полярографическим.

3 В основе качественного анализа лежит величина потенциала полуволны ($E_{1/2}$), характеризующая природу депольаризатора: чем менее отрицателен потенциал, тем легче протекает восстановление. Количественный анализ основан на прямой зависимости диффузионного тока I (или высоты волны h) от концентрации анализируемого вещества:

$$I = k \cdot c,$$

где k – постоянная, зависящая от природы электрода и определяемого

вещества; c – концентрация исследуемого вещества, моль/ дм³.

Способы количественного определения концентрации вещества:

- 1) метод градуировочного графика;
- 2) метод стандартов;
- 3) метод добавок.

1. 7 Лекция №7 (2 часа).

Тема Хроматографические методы и их классификация

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Хроматографические методы и их классификация

1.7.2 Краткое содержание вопросов

Хроматография –это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – *подвижной* и *неподвижной*. Неподвижной фазой обычно служит твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.

Компоненты анализируемой смеси вместе с подвижной фазой перемещаются вдоль стационарной фазы, которую обычно помещают в колонку (стеклянную или металлическую трубку). Если молекулы разных компонентов разделяемой смеси обладают различной адсорбируемостью или растворимостью, то время их пребывания в неподвижной фазе, а следовательно, и средняя скорость передвижения по колонке различны. Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей адсорбируемостью, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Так достигается разделение компонентов. Хроматография – динамический метод, связанный с многократным повторением сорбционных и десорбционных процессов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы. Это обеспечивает эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции в статических условиях.

С помощью хроматографии возможны: разделение сложных смесей органических и неорганических веществ на отдельные компоненты, очистка веществ от примесей, концентрирование веществ из сильно разбавленных растворов, качественный и количественный анализ исследуемых веществ.

2. Классификация хроматографических методов

В основу классификации многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки:

1. агрегатное состояние фаз;
2. механизм взаимодействия сорбент – сорбат;
3. способы проведения хроматографического анализа;
4. аппаратное оформление (техника выполнения) процесса хроматографирования;
5. цель хроматографирования.

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на газовую и жидкостную. Газовая хроматография включает газожидкостную и газотвердофазную, жидкостная – жидкостно-жидкостную и жидкостно-твердофазную. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе – неподвижной.

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов хроматографии: *адсорбционная* основана на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом; *распределительная* основана на различной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газожидкостная хроматография) или на различной растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах (жидкостная хроматография); *ионообменная хроматография* – на разной способности веществ к ионному обмену; *эксклюзионная хроматография* – на различии в размерах и формах

молекул разделяемых веществ; *аффинная хроматография* – на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов (например, антитело и антиген, гормон и рецептор и др.). Существует *осадочная хроматография*, основанная на образовании отличающихся по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом, *адсорбционно-комплексобразовательная*, основанная на образовании координационных соединений разной устойчивости в фазе или на поверхности сорбента, и др. Следует помнить, что классификация по механизму взаимодействия весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

По технике выполнения выделяют *колоночную* хроматографию, когда разделение проводится в специальных колонках, и *плоскостную* хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (*бумажная хроматография*) или в тонком слое сорбента (*тонкослойная хроматография*). В колоночной хроматографии используют насадочные или капиллярные колонки. Насадочную колонку заполняют сорбентом (насадкой), а внутреннюю стенку капиллярной колонки покрывают пленкой жидкости или пылью адсорбента.

В зависимости от **цели проведения** хроматографического процесса различают *аналитическую* хроматографию (качественный и количественный анализ); *препаративную* хроматографию (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей); *промышленную* (производственную) хроматографию для автоматического управления процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик). Хроматографию часто используют для исследовательских целей при изучении растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов и т.п.

Классификация **по способам проведения анализа** подразделяет хроматографию на три вида: 1) фронтальный, 2) проявительный, 3) вытеснительный.

Фронтальный метод наиболее прост по выполнению. Через хроматографическую колонку с сорбентом непрерывным потоком пропускают раствор или газовую смесь исследуемых веществ, сорбируемость которых увеличивается в ряду $A < B < C$. Соответственно этому компоненты располагаются в колонке. Однако они разделяются не полностью. В чистом виде может быть выделен лишь первый, наиболее слабо сорбирующийся компонент, который движется вдоль слоя сорбента впереди остальных. За зоной первого компонента следует в непосредственном контакте зона, содержащая первый и второй компоненты. Третья зона содержит смесь первого, второго и третьего компонентов. В некоторый момент времени сорбент насыщается, и наступает «проскок», т.е. из колонки начинают выходить компоненты в соответствии с их сорбируемостью. Если пропускать жидкость или газ, выходящие из колонки, через детектор концентраций и наносить показания его в течение всего опыта на график, то полученная выходная кривая будет иметь форму ступенчатой кривой (рис.1.1).

Фронтальный метод не нашел широкого применения в анализе, т.к. не дает полного разделения компонентов анализируемой смеси. Однако этот метод весьма эффективен для препаративного выделения чистого вещества из технического образца при условии, что это вещество удерживается в колонке слабее всех других компонентов объекта анализа.

Типичные примеры применения фронтального анализа: очистка и умягчение воды ионообменными материалами; очистка воздуха активированными углями от отравляющих веществ в противогазах и вентиляционных фильтрах химических предприятий; концентрирование ценных веществ из сточных промышленных вод металлургических предприятий; очистка лекарственных препаратов и пищевых продуктов с помощью ионообменников и т.д.

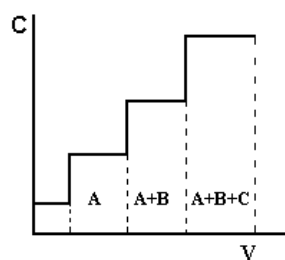


Рис.. Выходная кривая фронтального анализа
A, B, C – разделяемые вещества

Проявительный (элюентный) метод выгодно отличается от фронтального тем, что он позволяет полностью разделить много-компонентную смесь. Хроматографическую колонку промывают растворителем или газом-носителем (элюентом), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку вводят исследуемую смесь в виде порции раствора или газа, а не непрерывно, и продолжают пропускать элюент. При этом разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью. На выходе из колонки детектор фиксирует непрерывно концентрацию компонентов, а связанный с ним регистрирующий прибор записывает выходную кривую в виде ряда пиков, число которых соответствует числу разделенных компонентов

Проявительный метод анализа получил широкое применение как в жидкостной, так и в газовой хроматографии. Это объясняется тем, что при правильном выборе условий разделения компоненты смеси выходят из колонки в чистом виде, и их можно выделить для исследования другими методами анализа. Кроме того, качественный и количественный состав анализируемой смеси можно определить простым измерением объемов удерживания и площадей пиков соответствующих компонентов на полученной хроматограмме.

Вытеснительный метод отличается от фронтального и проявительного тем, что после введения пробы исследуемой смеси колонку

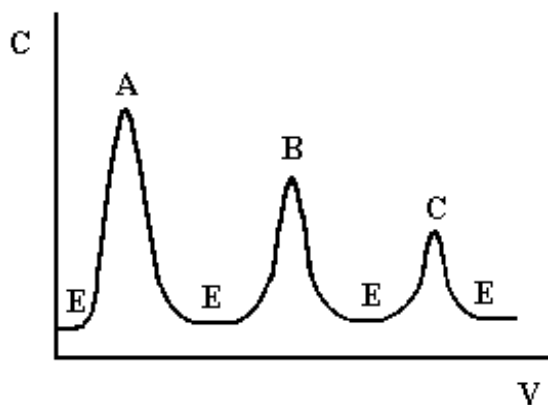


Рис. 1.2. Выходная кривая проявительного анализа
A, B, C – разделяемые вещества, E – растворитель (элюент)

промывают растворителем или газом-носителем, к которым добавляют раствор вещества (вытеснитель), обладающего большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. По мере продвижения по колонке элюент вытесняет вещество C, которое в свою очередь вытесняет вещество B и т.д. В результате вытесняемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и скорость движения вещества равна скорости движения вытеснителя. Разделяемые вещества и на колонке, и в элюате располагаются последовательно друг за другом. Каждый из компонентов выделяется в чистом виде, но не количественно, так как зоны компонентов не разделены промежутками чистого сорбента. Невозможность получения на выходе из колонки достаточно чистых компонентов разделяемой смеси, а также длительность процесса разделения затрудняют использование

этого метода в аналитических целях. Однако для препаративных целей метод не потерял значения, так как возможность применения таких высокоактивных и доступных адсорбентов, как активированные угли, позволяет достигнуть высокой производительности. Достоинством метода является также то, что зоны не размываются в отличие от проявительного анализа.

1. 8 Лекция №8(2 часа).

Тема Жидкостная хроматография

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Жидкостная хроматография

1.8.2 Краткое содержание вопросов

Жидкостная хроматография—это метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой служит жидкость. Он применим для разделения более широкого круга веществ, чем метод газовой хроматографии. Это связано с тем, что большинство веществ не обладает летучестью, многие из них неустойчивы при высоких температурах (особенно высокомолекулярные соединения) и разлагаются при переводе в газообразное состояние. Разделение веществ жидкостной хроматографией чаще всего производится при комнатной температуре.—

Особенности всех видов жидкостной хроматографии обусловлены тем, что подвижной фазой в ней является жидкость, а сорбция компонентов из газообразного и жидкого элюента протекает по-разному. Если в газовой хроматографии газ-носитель выполняет только транспортную функцию и неподвижной фазой не сорбируется, то жидкая подвижная фаза в жидкостной хроматографии является активным элюентом, его молекулы могут сорбироваться неподвижной фазой. При прохождении через колонку молекулы компонентов анализируемой смеси, находящиеся в элюенте, должны вытеснить молекулы элюента из поверхностного слоя сорбента, что приводит к уменьшению энергии взаимодействия молекул анализируемого вещества с поверхностью сорбента. Поэтому величины удерживаемых объемов V_R , пропорциональные изменению свободной энергии системы, в жидкостной хроматографии меньше, чем в газовой, а диапазон линейности изотермы сорбции в жидкостной хроматографии шире. природой подвижной (элюент) и неподвижной фаз.—Применяя различные элюенты, можно изменять параметры удерживания и селективность хроматографической системы. Селективность в жидкостной хроматографии в отличие от газовой определяется не одним, а двумя факторами

Жидкая подвижная фаза имеет большую плотность и вязкость, чем газообразная, коэффициенты диффузии $D_{ж}$ порядка ниже, чем в газе. Это приводит к замедлению массообмена в жидкостной хроматографии по сравнению с газовой. Уравнение Ван-Деемтера в связи с тем, что член—на $3V$ в жидкостной хроматографии роли не играет ($D_{ж} \ll D_c$), видоизменяется и графическая зависимость эффективности N от линейной скорости потока подвижной фазы имеет вид, представленный на рис. 1.9.



Рис.1.9. Зависимость эффективности N от линейной скорости потока подвижной фазы

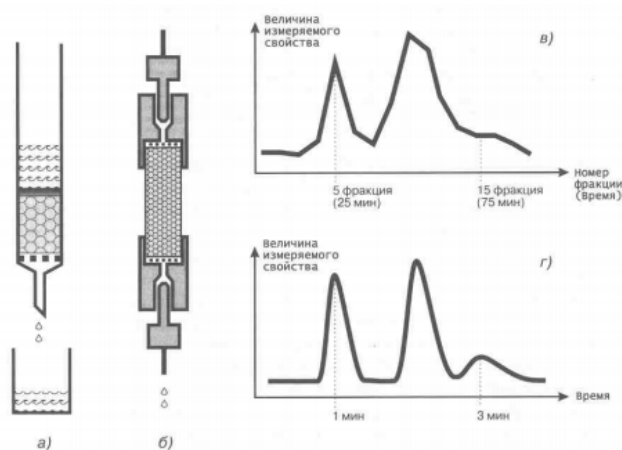


Рис. 1.2. Колонки для хроматографии низкого и высокого давления, а также вид типичных хроматограмм, получаемых на подобных установках: а — колонка для разделения при низком давлении, б — колонка для разделения при высоком давлении, в — типичная хроматограмма разделения трехкомпонентной смеси при низком давлении, г — типичная хроматограмма разделения трехкомпонентной смеси при высоком давлении

100 мкм и элюентом, вводят анализируемую пробу, растворенную в элюенте, и пропускают элюент, отбирая на выходе из колонки порции элюата. Этот вариант жидкостной хроматографии до настоящего времени применяют в лабораторной практике, но так как скорость прохождения элюента под действием силы тяжести мала, анализ продолжителен. В классическом варианте колоночной жидкостной хроматографии в стеклянную колонку высотой 1–2 м, заполненную сорбентом с размером частиц 5–10 мкм, используют объемно- и поверхностно-пористые сорбенты с размером частиц 5–10 мкм, нагнетательные насосы, обеспечивающие давление в системе до 400 атм., высокочувствительные детекторы. Быстрый массоперенос и высокая эффективность разделения позволяют использовать ВЭЖХ для разделения молекул (жидкостно-адсорбционная и жидкость-жидкостная распределительная хроматографии), для разделения ионов (ионообменная, ионная, ион-парная хроматография), для разделения макромолекул (эксклюзионная хроматография). — так называемая высокоэффективная жидкостная хроматография ВЭЖХ — Современный вариант жидкостной хроматографии

УДЕРЖИВАНИЕ И СИЛА РАСТВОРИТЕЛЯ

Для того чтобы анализируемые вещества разделялись на колонке, как уже упоминалось выше, коэффициент емкости k' должен быть больше 0, т.е. вещества должны удерживаться неподвижной фазой, сорбентом. Однако коэффициент емкости не должен быть и слишком большим, чтобы получить приемлемое время элюирования. Если для данной смеси веществ выбрана неподвижная фаза, которая их удерживает, то дальнейшая работа по разработке методики анализа заключается в выборе такого растворителя, который обеспечил бы в идеальном случае различные для всех компонентов, но приемлемо не очень большие k' . Этого добиваются, меняя элюирующую силу растворителя.

В случае адсорбционной хроматографии на силикагеле или оксиде алюминия, как правило, силу двухкомпонентного растворителя (например, гексана с добавкой изопропанола) увеличивают, увеличивая в нем содержание полярного компонента (изопропанола), или же уменьшают, уменьшая содержание изопропанола. Если содержание полярного компонента становится слишком малым (менее 0,1%), следует заменить его более слабым по элюирующей силе. Так же поступают, заменяя на другие либо полярную, либо неполярную составляющую и в том случае, если данная система не обеспечивает желаемой селективности по отношению к интересующим компонентам смеси. При подборе систем растворителей принимают во внимание как растворимости

компонентов смеси, так и элюотропные ряды растворителей, составленные разными авторами.

Примерно так же подбирают силу растворителя в случае использования привитых полярных фаз (нитрил, amino, диол, нитро и др.), учитывая возможные химические реакции и исключая опасные для фазы растворители (например, альдегиды и кетоны для аминофазы).

В случае обращенно-фазной хроматографии силу растворителя увеличивают, повышая содержание в элюенте органической составляющей (метанола, ацетонитрила или ТГФ) и уменьшают, добавляя больше воды. Если не удастся добиться желаемой селективности, используют другую органическую составляющую либо пытаются изменить ее с помощью разных добавок (кислот, ион-парных реагентов и др.).

При разделениях методом ионообменной хроматографии силу растворителя меняют, увеличивая или уменьшая концентрацию буферного раствора или меняя pH, в некоторых случаях используют модификацию органическими веществами.

Однако, особенно в случае сложных природных и биологических смесей, зачастую не удастся подобрать силу растворителя таким образом, чтобы все компоненты пробы элюировались за приемлемый срок. Тогда приходится прибегать к градиентному элюированию, т.е. использовать растворитель, элюирующая сила которого в процессе анализа изменяется так, что она постоянно увеличивается по заранее заданной программе. Таким приемом удастся добиться элюирования всех компонентов сложных смесей за относительно короткий промежуток времени и их разделения на компоненты в виде узких пиков.

Адсорбционная жидкостная хроматография неполярный адсорбент и полярные подвижные фазы, но в обоих вариантах выбор подвижной фазы часто важнее, чем выбор неподвижной. Неподвижная фаза должна удерживать разделяемые вещества. Подвижная фаза, т. е. растворитель, должна обеспечивать различную емкость колонки и эффективное разделение за приемлемое время.—. Адсорбционная жидкостная хроматография в зависимости от полярности неподвижной и подвижной фаз подразделяется на нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографии. В НФХ используют полярный адсорбент и неполярные подвижные фазы, в ОФХ

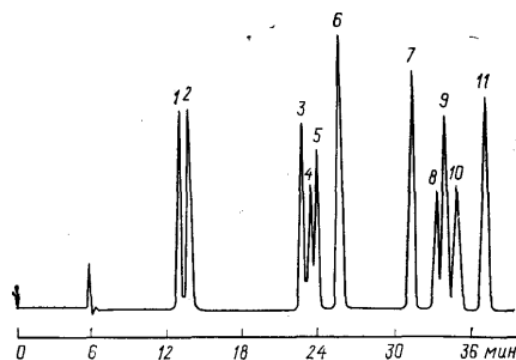


Рис. 2.1. Хроматограмма фенола, крезолов и ксиленолов, полученная на колонке размером 2x250x4.6 мм с зорбаксом Сил (6 мкм), подвижная фаза — гексан — метилхлорид — изопропанол (100 : 10 : 1 по объему), расход 1 мл/мин, детектор — УФ (254 нм), проба 10 мкл: 1 — 2,4,6-триметилфенол; 2 — 2,6-ксиленол; 3 — 2,5-ксиленол; 4 — 2,3-ксиленол; 5 — 2,4-ксиленол; 6 — о-крезол; 7 — 3,5-ксиленол; 8 — 3,4-ксиленол; 9 — м-крезол; 10 — п-крезол; 11 — фенол

В качестве неподвижной фазы в адсорбционной жидкостной хроматографии применяют полярные и неполярные тонкодисперсные пористые материалы с удельной поверхностью более 50 м²/г. Полярные адсорбенты (SiO₂, Al₂O₃, флорисил и др.) имеют на поверхности слабокислотные группы, высокая чувствительность к содержанию воды в применяемых элюентах. Для устранения этого недостатка полярные сорбенты

обрабатывают аминами, диолами и другими реагентами, в результате чего происходит поверхностная прививка этих реагентов, модифицирование поверхности и изменение селективности по отношению к анализируемым веществам. – группы, способные удерживать вещества с основными свойствами. Эти адсорбенты используют главным образом для разделения неполярных и среднеполярных соединений. Их недостаток SiR–Неполярные адсорбенты (графитированные сажи, диатомит, кизельгур) неселективны к полярным молекулам. Для получения неполярных адсорбентов часто на поверхность, например, силикагеля прививают неполярные группы, например, алкилсилильные алкильные группы C_n- , где $R_2 C_{n-22}$.

Подвижная фаза должна полностью растворять анализируемую пробу, обладать невысокой вязкостью (чтобы коэффициенты диффузии были достаточно большими), желательно, чтобы из нее было возможно выделить разделенные компоненты. Она должна быть инертной по отношению к материалам всех частей хроматографа, безопасной, дешевой, подходящей для детектора.

Подвижные фазы, применяемые в жидкостной хроматографии, различаются по своей элюирующей силе. Элюирующая сила растворителя показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента на данном адсорбенте больше, чем энергия сорбции элюента, выбранного в качестве стандарта, например *n*-гептана. Слабые растворители плохо адсорбируются неподвижной фазой, поэтому коэффициенты распределения сорбируемых веществ (сорбата) высокие. Наоборот, сильные растворители адсорбируются хорошо, поэтому коэффициенты распределения сорбата низкие. Растворитель тем сильнее, чем выше растворимость в нем анализируемой пробы, чем сильнее взаимодействие растворитель – сорбат.

Для обеспечения высокой эффективности разделения на колонке необходимо подобрать такую подвижную фазу, которая имеет полярность, оптимальную для разделяемой смеси в выбранных условиях разделения. Обычно сначала выбирают неподвижную фазу, которая имеет полярность, близкую к полярности разделяемых компонентов. Затем подбирают подвижную фазу, добиваясь того, чтобы коэффициент емкости k' оказался в интервале от 2 до 5. Если полярность подвижной фазы слишком близка к полярности неподвижной, время удерживания компонентов будет слишком малым, а если полярности подвижной и неподвижной фаз различаются очень сильно, время удерживания становится слишком большим.

При подборе подвижных фаз ориентируются на так называемые элюотропные ряды, основанные на применении индексов полярности Снайтера P' , который подразделяет все растворители на сильные (полярные) и слабые (слабополярные и неполярные). В основе шкалы полярности лежит растворимость веществ, используемых в качестве подвижных фаз, в диоксане, нитрометане и этаноле.

В таблице 1.2 приведены значения индексов полярности и элюирующей силы (по отношению к SiO_2) ряда растворителей, наиболее часто применяемых в жидкостной хроматографии в качестве подвижных фаз. Здесь же указаны коротковолновые границы прозрачности этих растворителей, что облегчает подбор условий детектирования компонентов смеси.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Общие вопросы теории физико-химического анализа

2.1.1 Цель работы: рассмотреть общие вопросы теории физико-химического анализа

2.1.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику физико-химических методов анализа.
2. Рассмотреть свойства соединений и простых веществ, положенных в основу физико-химических методов анализа.
3. Метрологические характеристики физико-химических методов анализа.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Нитратомер - №3044 , ФЭК-60 , плитка электрическая, колбонагреватель «ЛАБКН-100» , поляриметр ИГП-01, спектрофотометр UNIKO-1200, термостат ТЖ-ТС-ТС - 01/16-100.

2.1.4 Описание (ход) работы:

1. Классификация и преимущества физико-химических методов анализа
2. Чувствительность физико-химических методов анализа.
3. Воспроизводимость и избирательность ФХМА.
4. Чистота вещества и ее значение для результатов анализа.
5. Виды, источники и характеристики погрешностей физико-химических методов анализа.
6. Графическая обработка результатов физико-химического анализа.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Спектральные методы анализа. Классификация спектральных методов

2.2.1 Цель работы:

Спектрофотометрическое определение содержания двух веществ в пробе

2.2.2 Задачи работы:

Определить содержание хрома (VI) и марганца (VII) при совместном присутствии. Провести статистическую обработку и обсуждение результатов анализа.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Пипетки градуированные вместимостью 5;10 мл.;
2. Мерные колбы вместимостью 50 мл.;
3. Стандартный раствор никеля(II), 0.010 мг/мл.;
4. Иод, 0.05 М раствор;
5. Диметилглиоксим, 1%-ный раствор в 20 %-ом растворе NaOH.
- 6 спектрофотометр UNIKO-1200

2.2.4 Описание (ход) работы:

Для определения хрома и марганца при совместном присутствии, их окисляют соответственно до бихромата и перманганата. Оптическая плотность исследуемого раствора пропорциональна содержанию марганца и хрома. В растворе не должны присутствовать восстановители, в том числе и хлорид-ионы. Так как в спектре имеется участок, в котором поглощает один из компонентов – KMnO_4 , система уравнений

Для проведения определений применяют метод градуировочного графика. Этот метод применим для определения двух компонентов, когда имеется участок спектра, на котором поглощением одного из компонентов можно пренебречь.

В 5 мерных колб вместимостью 50,0 мл приливают 20 мл воды, стандартный раствор никеля с содержанием (мг): 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 и 0,10 соответственно, 0,5 мл раствора иода, 0,5 мл раствора диметилглиоксима. Содержимое колбы разбавляют

дистиллированной водой до метки. Через 10 мин растворы фотометрируют относительно воды и строят градуировочный график.

Аликвотную часть анализируемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, разбавляют водой до 20 мл и далее проводят те же операции и в той же последовательности, что и при приготовлении растворов, используемых для построения градуировочного графика. Спустя 10 мин после приготовления, раствор фотометрируют относительно воды. Содержание никеля находят по градуировочному графику. Измерения повторяют три раза. Проводят статистическую обработку и обсуждение результатов.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Атомно-эмиссионный спектральный анализ

2.3.1 Цель работы:

Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения.

2.3.2 Задачи работы:

1. Происхождение спектров

Рассмотреть зависимость между интенсивностью спектральной линии определяемого элемента и его содержанием в пробе. Источники возбуждения спектров: дуговые и искровые разряды, плазматроны, лазеры

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

2.3.4 Описание (ход) работы:

Атомно-эмиссионный спектральный анализ состава вещества основан на двух фундаментальных принципах:

1. спектр, испускаемый предварительно возбужденными атомами и ионами данного химического элемента, **строго индивидуален** (т.е. характерен только для данного химического элемента);
2. интенсивность линий этого спектра зависит от концентрации этого элемента, определение которой и является целью анализа.

Спектр представляет собой распределение мощности излучения по длинам волн и характеризуется зависимостью интенсивности от длины волны $I(\lambda)$.

Для получения эмиссионного спектра атомам анализируемого вещества необходимо придать дополнительную энергию так, чтобы электроны перешли на более высокие орбиты, т.е. перевести атомы в «возбужденное» состояние. (Термин «возбужденное» состояние является устоявшимся и далее будет применяться без кавычек).

С этой целью анализируемую пробу вводят в источник возбуждения спектров, где она подвергается абляции (т.е. «вырыванию» с поверхности микрочастиц), нагреву и испарению. Источник возбуждения спектров тем или иным способом формирует насыщенную энергией область пространства с достаточно высокой температурой.

Попавшие в эту высокотемпературную область пространства микрочастицы анализируемой пробы распадаются на атомы. Эти атомы пробы при столкновениях с другими частицами переходят в возбужденное и ионизированное состояния. В таком состоянии атомы и ионы могут находиться очень короткое время ($10^{-8} - 10^{-7}$ с). Самопроизвольно возвращаясь в нормальное или промежуточное состояние, они испускают избыточную энергию в виде фотонов, совокупность которых и образует эмиссионный спектр.

Измеряя интенсивность линий спектра атомов (или ионов) того или иного химического элемента, определяют концентрацию этого химического элемента в анализируемой пробе

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Атомно-абсорбционная спектрометрия

2.4.1 Цель работы:

Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения.

2.4.2 Задачи работы:

Теоретические основы метода атомно-абсорбционной спектрометрии.

Устройство атомно-абсорбционных спектрометров.

Возможности метода атомно-абсорбционной спектрометрии

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

2.4.4 Описание (ход) работы:

Атомно-абсорбционные спектрометры — это оборудование, предназначенное для осуществления количественного элементного анализа посредством использования атомных спектров поглощения, для определения содержания таких элементов, как металлы, в растворах их солей: в природных водах, технологических и других растворах. Основной сферой применения данных спектрометров является контроль объектов окружающей среды, анализ продуктов питания, медицина, металлургия, геология, химическая промышленность, научные исследования и многие другие среды, где может применяться такого рода прибор.

Принцип действия этих устройств основан на измерении уровня поглощения луча света резонансной длины волны от источника, который проходит через атомный пар пробы, которая исследуется. Для преобразования объекта исследования в атомный пар применяется атомизатор. Источником света могут выступать различные узкополосные источники света. После прохождения через атомные пары луч света перенаправляется на монохроматор, а затем он переходит на приемник, который фиксирует уровень излучения.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Молекулярная абсорбционная спектроскопия Рефрактометрический и поляриметрический методы анализа.

2.5.1 Цель работы:

Определить концентрации раствора сахара с помощью поляриметра

2.5.2 Задачи работы:

Изучить закономерности взаимодействия поляризованного света с веществом, определить концентрацию оптически активного вещества с помощью поляриметра

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

поляриметр ИГП-01

глюкоза и сахароза

2.5.4 Описание (ход) работы:

1. В кювету поляриметра налить воду. Если в кювете оказался пузырек воздуха, поймать его с помощью ловушки (утолщение на кювете).

2. Поставить кювету в поляриметр. Закрыть крышку.

3. Включить поляриметр в сеть.

4. Добиться светлого поля зрения анализатора.

5. По шкале барабана определить угол поворота плоскости поляризации света φ_0 .

6. Вылить из кюветы воду и налить раствор оптически активного вещества с известной концентрацией C_1 . Поле зрения анализатора изменится. Поворотом рукоятки барабана добиться светлого поля зрения. Показание шкалы барабана φ' занести в таблицу.

7. Рассчитать значение угла поворота плоскости поляризованного света раствором оптически активного вещества по формуле: $\varphi = \varphi' - \varphi_0$. Полученный результат занести в таблицу.

8. Прodelать п.6-7 для остальных известных концентраций и для раствора с неизвестной концентрацией. Измерение провести 4 раза для всех растворов. Рассчитать ошибку измерения.

9. Построить график зависимости $\varphi=f(C)$. Нанести на график для каждого значения доверительные интервалы.

10. По графику отыскать неизвестную концентрацию с учетом ошибки измерения.

11. Закончив исследование, сделать выводы о проделанной работе

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Фотометрия

2.6.1 Цель работы:

овладение практическими приемами фотометрического анализа.

2.6.2 Задачи работы:

изучение устройства фотоэлектроколориметра;

- изучение способов подготовки образцов сельскохозяйственной продукции для анализа методом фотометрического анализа;
- овладение приемами проведения фотометрических измерений;
- изучение способов обработки результатов фотометрических измерений.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мерные колбы на 100см³ - 6шт.
2. Пипетки градуированные на 10см³ -2 шт.
3. Раствор роданида калия KSCN, 5%-ный
4. Раствор железо-аммонийных квасцов
- 5.ФЭК-60

2.6.4 Описание (ход) работы:

метод определения Fe³⁺ с помощью роданида калия основан на образовании комплекса, имеющего кроваво-красную окраску.

Реакцию проводят в присутствии HNO₃(d=1.2) и 30%-ного раствора H₂O₂: $Fe^{3+} + n(SCN^-) \rightarrow Fe(SCN)_n$

FeNH₄(SO₄)₂·12H₂O с содержанием 20 мкг в 1 см³- раствор №1 (0,8636 г. химически чистых железоаммонийных квасцов растворяют в мерной колбе на 1000 см³ дистиллированной водой, куда прибавлено 4см³H₂SO₄d=1,54 тщательно перемешивают. Полученный раствор содержит 0,1 мг/см³ Fe³⁺. Далее в мерную колбу на 250 см³ отмеряют пипеткой 50см³ приготовленного раствора, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают).

Построение градуированной кривой

Для построения градуировочного графика в четыре мерные колбы на 100см³ вносят 5, 10, 15, 20 см³ раствора №1, что соответствует содержанию железа 100, 200, 300, 400 мкг в 100 см³. Прибавляют в каждую колбу по 2 см³ HNO₃, по 6 капель 30% H₂O₂, по 40 см³ 5%-ного раствора KSCN и доводят дистиллированной водой до метки. Спустя 30 минут по завершении химических реакций измеряют абсорбционность каждого из растворов на приборе с зеленым светофильтром в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В одну кювету наливают раствор фона, а в другую кювету- раствор с содержанием железа 100 мкг и измеряют абсорбционность (оптич. плотность).

Каждое определение следует повторить 3 раза. Далее, меняя раствор во второй кювете, находят абсорбционность для растворов с содержанием железа 200, 300, 400 мкг.

2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).

Спектрофотометрия

2.7.1 Цель работы: ознакомление с фотометрическим определением элементов при их совместном присутствии методом калибровочного графика.

2.7.2 Задачи работы:

Определение марганца (VII) и хрома (VI) при совместном присутствии.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Стандартный раствор KMnO_4 , 0,1 мг/мл.
Стандартный раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 0,1 мг/мл.
2. Колбы мерные вместимостью 50 мл.
Пипетки градуированные вместимостью 10 мл.
3. с пектрофотометр UNIKO-1200

2.7.4 Описание (ход) работы:

1. В мерные колбы помещают по 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл стандартного раствора KMnO_4 и содержимое разбавляют до метки дистиллированной водой. В мерные колбы помещают по 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 мл стандартного раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и содержимое разбавляют до метки дистиллированной водой.
2. Регистрируют спектр поглощения индивидуальных компонентов. Для этого измеряют оптическую плотность наиболее концентрированного раствора KMnO_4 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) в кюветах длиной 1 см в области длин волн 400–750 нм поочередно со всеми светофильтрами. Данные наносят на один график зависимости $A = f(\lambda)$. Затем выбирают длину волны, при которой наблюдается суммарное поглощение обоими окрашенными соединениями (λ_1) и длину волны, при которой поглощает лишь перманганат-ион (λ_2).
3. Измеряют оптические плотности стандартных растворов перманганата калия при выбранных длинах волн λ_1 и λ_2 , для стандартных растворов дихромата калия измерения проводят при λ_1 . Измерения проводят до получения трех воспроизводимых результатов, находят среднее, данные заносят в таблицу.
4. Исследуемый раствор, содержащей неизвестные количества Cr(VI) и Mn(VII) , разбавляют в мерной колбе до метки дистиллированной водой. Измеряют оптическую плотность смеси в тех же кюветах при выбранных длинах волн λ_1 и λ_2 .
5. Используя градуировочную зависимость 1, находят концентрацию перманганат-ионов по оптической плотности смеси, измеренной при длине волны λ_2 . По градуировочной зависимости 2 находят оптическую плотность раствора перманганата данной концентрации при длине волны λ_1 , затем по разности поглощения смеси при λ_1 и раствора перманганата при λ_1 находят оптическую плотность дихромат-ионов при данной длине волны и с помощью градуировочной зависимости 3 находят соответствующую ей концентрацию дихромат-ионов в смеси.

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Нефелометрия

2.8.1 Цель работы:

Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения.

2.8.2 Задачи работы:

изучение методов определения белковых веществ в пищевых продуктах.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Конические колбы
бюретки

0,05 н. раствор гидроксида натрия.
сульфосалициловая кислота
Фотоэлектроколориметр-60

2.8.4 Описание (ход) работы:

Метод основан на измерении интенсивности светового потока, рассеянного твердыми или коллоидными частицами, находящимися в растворе во взвешенном состоянии. По интенсивности светорассеяния, определяемой нефелометром, судят о концентрации исследуемого вещества.

В настоящее время находят широкое использование фотоэлектрические нефелометры.

Растворы высокомолекулярных соединений, например растворы белков, способны при определенных условиях в присутствии некоторых химических реагентов опалесцировать. Одним из таких реагентов является сульфосалициловая кислота. Концентрация белка в этом случае может быть определена по интенсивности опалесценции.

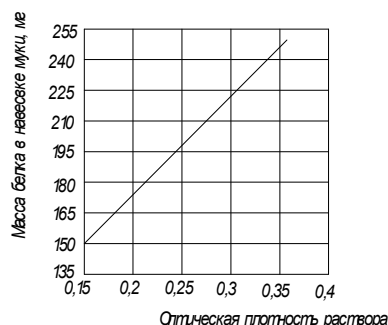
Продукты гидролиза белка – пептоны, аминокислоты и другие азотосодержащие вещества – не опалесцируют.

Экспериментальной проверкой установлено, что нефелометрический метод с использованием сульфосалициловой кислоты отличается быстротой, высокой точностью, простотой и хорошей корреляцией с методом Кьельдаля.

Около 0,5 г исследуемой муки взвешивают с погрешностью $\pm 0,001$ и помещают в коническую колбу вместимостью 250—300 см³, снабженную пробкой. В колбу добавляют из бюретки 50 см³ 0,05 н. раствора гидроксида натрия. Закрытую пробкой колбу встряхивают на механическом встряхивателе в течение 15 мин. Затем вытяжку центрифугируют 10 мин при частоте вращения 6000 мин⁻¹. 5 см³ прозрачного центрифугата пипеткой переносят в мерную колбу на 50 см³ и содержимое колбы доводят до метки сульфосалициловой кислотой.

При нефелометрическом анализе получение правильных результатов в значительной мере зависит от методики получения суспензии, в частности от порядка смешивания растворов, скорости смешивания. Поэтому после добавления сульфосалициловой кислоты колбу быстро переворачивают 2—3 раза (не более), раствор наливают в кювету с толщиной слоя 5 мм и измеряют величину оптической плотности раствора при длине волны 550 нм. Замеры следует производить сразу после добавления кислоты, так как частицы белка быстро агрегируют.

Массовую долю белка определяют по калибровочной кривой



2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Электрохимические методы анализа Потенциометрия.

2.9.1 Цель работы:

Определить рН раствора кислоты (щелочи) потенциометрическим методом.

2.9.2 Задачи работы:

Методом потенциометрического титрования определить концентрацию кислоты (щелочи).

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Стандартные буферные растворы.

Вода дистиллированная.

Раствор кислоты.

Раствор щелочи.

рН-метр

Стаканы на 100 мл на 250 мл.

Бюретка на 25 мл.

Пипетка.

Бумага фильтровальная.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Измерение рН раствора кислоты. В стакан без надписи наливают раствор кислоты и опускают электроды в стакан. При этом должна быть нажата клавиша –1 , 19, анион/катион, рХ. По самой нижней шкале (–1 , 19) определяют примерное значение рН кислоты, нажимают клавишу узкого диапазона измерений, которому соответствует измеряемая величина рН. Например, если рН = 1,2, значит, нажимают –1 , 4 и по шкале –1 , 4 смотрят точное значение рН.

Измерение рН раствора щелочи. Вынимают электроды из кислоты, выливают кислоту в склянку, а электроды промывают дистиллированной водой, сушат фильтровальной бумагой и опускают в стакан со щелочью (h = 4 см). По нижней шкале –1 , 19 смотрят примерное значение, затем нажимают клавишу узкого диапазона измерений, соответствующего измеряемой величине рН. Например, рН щелочи примерно равно 10, значит, включают –9 , 14.

3. Нажимают клавишу –1 , 19, вынимают электроды из раствора щелочи, промывают погружением их в дистиллированную воду, оставляют в свежей порции дистиллированной воды. Отжимают все клавиши.

1. Бюретку ополаскивают стандартным раствором титранта и заполняют ее до нуля. **Записывают концентрацию раствора титранта.**

2. В чистый стакан отбирают пипеткой исследуемый раствор (по указанию преподавателя), при необходимости разбавляют дистиллированной водой. **Записать объем исследуемого раствора.** Опускают электроды в стакан, производят измерение рН, как описано выше.

3. Устанавливают бюретку с раствором титранта над стаканом с электродами. Добавляют сначала по 1 мл раствора при осторожном перемешивании и измеряют каждый раз рН. Данные измерений заносят в таблицу. Когда при очередном добавлении титранта изменение рН становится существенным, далее его добавляют по 0,1 мл. Наблюдается резкое изменение рН. После скачка титрования титрант опять добавляют по 1 мл (не менее 5-6 мл после скачка).

4. После окончания титрования убирают бюретку, нажимают клавишу –1 , 19, вынимают электроды из раствора, промывают погружением их в дистиллированную воду, оставляют на хранение в свежей порции дистиллированной воды. Отжимают все клавиши. Выключают тумблер «сеть» и вынимают вилку из розетки.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Кондуктометрия.

2.10.1 Цель работы:

Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения.

2.10.2 Задачи работы:

изучение теоретических основ и практических применений кондуктометрического и высокочастотного кондуктометрического титрования как одного из видов физико-химических методов анализа.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

2. Мерная колба на 100 мл. 3. Аналитическая пипетка на 10 мл. 4. Бюретка на 25 мл (или микродозатор вместимостью 0,2 мл) 5. Стандартный 0,1 М раствор гидроксида натрия. 6. Пинцет. 7. Магнитная мешалка. 8. стержень магнитной мешалки.

2.10.4 Описание (ход) работы:

Кондуктометрия - это метод анализа, основанный на измерении электропроводности анализируемого раствора. Электропроводностью W называют величину, обратную электросопротивлению R : $W = 1/R$, [Ом $^{-1}$ = См (Сименс)]. Растворы электролитов, являясь проводниками II рода, подчиняются закону Ома: $R = U/I$. Чтобы измерить сопротивление раствора, в него погружают электроды и подают внешнее напряжение U . По аналогии с проводниками I рода сопротивление раствора прямо пропорционально расстоянию между электродами l и обратно пропорционально площади их поверхности S : $S/l, (1/\rho) = R$ - удельное сопротивление, Ом.см, где $\rho = R$ при $l = 1$ см и $S = 1$ см 2 ; χ - сопротивление 1 см 3 р.е. (мл) раствора. χ называют удельной электропроводимостью. Величину, обратную χ (χ равна электропроводности 1 см 3 раствора, находящегося между электродами с площадью поверхности 1 см 2 , удаленными друг от друга на расстоянии 1 см. численно равна току, проходящему). Из закона Ома следует, что через слой электролита с $S = 1$ см 2 под действием градиента потенциала 1В на единицу длины. Электрическая проводимость разбавленных растворов электролитов зависит от суммарного числа ионов в растворе (то есть концентрации) числа элементарных зарядов, переносимых каждым ионом (то есть заряда иона) и от скорости движения одинаково заряженных ионов к катоду или аноду под действием электрического поля. С учетом этих факторов электропроводящие свойства ионов характеризуются λ). Ею называют проводимо-эквивалентной электропроводимостью (4 стью раствора, содержащего 1 моль вещества эквивалента и находящегося между двумя параллельными электродами, расстояние между которыми 1 см.

Контрольный раствор получают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до риски дистиллированной водой и тщательно перемешивают. В сосуд с электродами (ячейку) помещают пипеткой 20 мл раствора контрольной смеси. Соединительными проводами подключают ячейку к клеммам R_x реохордного моста на его передней панели. С помощью корректора устанавливают стрелку гальванометра на реохордном мосте на нуль при положении переключателя гальванометра «точно». Переводят переключатель гальванометра в положение («КЗ» – короткозамкнутый). Включают прибор вилкой в электрическую сеть при положении переключателя питания «~» - переменный ток. Добавляют из бюретки или микродозатором порции титранта к анализируемому раствору по 0,2 мл, тщательно перемешивают раствор с помощью стержня магнитной мешалки и измеряют электросопротивление раствора после каждой порции титранта. Для измерения электросопротивления переключатель гальванометра ставят в положение «грубо» и вращением ручек магазина сопротивлений и реохорда устанавливают стрелку гальванометра на нуль. Затем переводят переключатель в положение «точно» и снова устанавливают гальванометр на нуль. Значение электросопротивления раствора получают как произведение значения на переключателе магазина сопротивлений на значение на шкале реохорда при нулевом положении стрелки гальванометра.

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Кулонометрия..

2.11.1 Цель работы: Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения

Изучить теоретические основы и практические применения кулонометрического титрования как одного из видов физико-химических методов анализа.

2.11.2 Задачи работы:

Кулонометрическое определение хлороводородной и фосфорной кислот в смеси

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Раствор определяемых компонентов в колбе вместимостью 100 мл;
2. Раствор фенолфталеина;
3. Раствор Na_2SO_4 (анодное пространство с одним Pt – электродом);
4. Электролитический мостик, наполненный насыщенным раствором хлорида калия;
5. Дистиллированная вода.

рН-метр

2.11.4 Описание (ход) работы:

Кулонометрический метод анализа основан на применении известного закона Фарадея, связывающего количество прореагировавшего на электроде вещества с величиной прошедшего через электрод заряда. Прохождение электрического тока через металлы и графит связано с движением электронов, а через растворы и расплавы – с движением ионов. Поэтому единственным способом протекания стационарного тока через электрод оказывается электрохимическая реакция. Уравнение Фарадея записывается следующим образом.

$$n = \frac{M \cdot Q}{z \cdot F} = \frac{M \cdot \int I dt}{z \cdot F},$$

где n – количество прореагировавшего вещества;

M – эквивалентная масса определяемого вещества, мг/моль;

I – сила тока, А;

t – время электролиза, с;

z – количество электронов, переходящих в ходе реакции на одну молекулу определяемого вещества;

F – константа Фарадея ($96485,3415 \pm 0,0039$), Кл/моль.

Время электролиза, необходимое для превращения определяемого вещества, определяется различными инструментальными методами, как электрохимическими, так и оптическими.

Наиболее распространенным в настоящее время является гальваностатический режим проведения кулонометрических определений, так как инструментально удобнее определять время, чем какие-либо другие параметры.

Кулонометрическое определение может проводиться с прямой реакцией определяемого вещества на электроде, однако чаще на электроде вырабатывается титрант, реагирующий с определяемым веществом. Этот метод гораздо более универсальный, так как один и тот же титрант может применяться для определения разнообразных веществ, а также и для определения групповых параметров. Измерение антиоксидантной активности различных продуктов: чая, кофе, соков, алкогольных напитков, лекарственных препаратов..

Методика определения.

1. Тщательно промывают электроды в катодном пространстве в двух объемах ячейки дистиллированной водой.
2. Приливают в ячейку 10 мл 0,5 М Na_2SO_4 , 10 мл раствора пробы и 3-5 капель фенолфталеина. Соединяют мостиком катодное и анодное пространство.
3. Включают рН-метр в режим измерения «рН», устанавливают диапазон измерения - 1÷14 рН, добиваются равномерного вращения мешалки (при наличии самописца – стабильного движения пера по прямой линии).
4. Одновременно включают источник постоянного тока и секундомер (при использовании ЭВМ – запускают программу регистрации). На самописце делают отметку о начале титрования. При необходимости подстраивают с помощью потенциометра значение тока 5,0 мА.
5. Фиксируют значение рН через каждые 20 с. Появление розового окрашивания характеризует момент достижения второй точки эквивалентности.
6. Результаты титрования вносят в таблицу, затем на миллиметровке в координатах рН – τ воспроизводят кривую титрования.
7. Методом трех касательных находят первую и вторую точки эквивалентности (τ_1 и τ_2). На самописце отрывают диаграмму и обрабатывают аналогично кривые титрования.
8. Содержание HCl и H_3PO_4 рассчитывают на основании уравнения Фарадея:

2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Вольтамперметрия.

2.12.1 Цель работы: Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения ,
изучение теоретических основ и практических применений вольтамперметрии как одного из видов физико-химических методов анализа.

2.12.2 Задачи работы:

Вольтамперметрическое определение витамина В₉

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Раствор фонового электролита (ацетатный буфер, рН=5);

2. Раствор пробы (в колбе на 100 мл);
3. Стандартный раствор Вс (10^{-2} моль/л);
4. Дистиллированная вода.

2.12.4 Описание (ход) работы:

Вольтамперметрия – высокочувствительный метод анализа неорганических и органических веществ в химических, биологических, геологических, экологических и других объектах. Метод основан на получении и изучении вольтамперных (поляризационных) кривых, отражающих зависимость силы тока (I), протекающего через электрохимическую ячейку от приложенного к ячейке напряжения (E). Поляризацией называют смещение потенциала электрода от равновесного значения под действием прилагаемого напряжения. Соответственно вольтамперные кривые, выражающие зависимость тока разрядки электрохимически активного вещества на поляризуемом электроде от прилагаемого напряжения называют поляризационными. Электрохимическая ячейка для реализации вольтамперметрического анализа представлена на рис. 1. Она состоит из электролизера (стакана) с анализируемым раствором, в который погружены индикаторный электрод (ИЭ) и электрод сравнения (ЭС).

Сила тока I зависит от электростатического взаимодействия электродов с ионами, а также диффузионного процесса. Электростатическая составляющая тока, называемая миграционным током, зависит от напряжения электрического поля, но не зависит от концентрации определяемого вещества, поэтому не может использоваться в

аналитических целях. Для устранения влияния электрического поля в исследуемый раствор вводят 50-100 кратный избыток (по сравнению с концентрацией определяемых ионов) индифферентного электролита, называемого фоном. Ионы фона не участвуют в электродных процессах, но экранируют электрические поля электродов, и доля миграционного тока будет ничтожно мала. В этом случае подвод исследуемых ионов к ИЭ осуществляется за счет диффузии в приэлектродный слой раствора, концентрация в котором ($CЭ$) меньше концентрации в глубине раствора (C). Скорость диффузии и, тем самым, сила тока, определяются разностью (градиентом) концентраций ($C - CЭ$), поэтому данная составляющая тока называется диффузионным током ($I_{диф}$): $I_{диф} = K (C - CЭ)$. Чем больше напряжение, тем больше ионов в приэлектродном пространстве разряжаются, т.е. уменьшается $CЭ$. При некотором потенциале ИЭ значение $CЭ$ становится равным нулю. Это означает, что все ионы, подходящие к ИЭ, разряжаются. Дальнейшее увеличение напряжения не вызывает роста тока – достигается значение предельного диффузионного тока, который линейно зависит от концентрации: $I_{пр} = K C$. Следовательно, величина $I_{пр}$ может использоваться для целей количественного вольтаперометрического анализа. Численное значение $I_{пр}$ измеряют по регистрируемой в ходе анализа вольтамперной кривой, называемой по внешнему виду «волной»

Это метод высокочувствительного определения витамина B_9 . Он основан на высоких адсорбционных свойствах B_9 и его электрохимической активности.

Определение проводят методом добавок, фиксируя зависимость тока ртутного электрода от его потенциала

Витамин B_9 (фолиевая кислота) – гетероароматическое органическое соединение сложного состава, является незаменимым участником биохимических процессов, протекающих в живых организмах. Для контроля за содержанием B_9 в продуктах питания и при биохимических исследованиях можно использовать метод инверсионной вольтаперометрии.

Достижение определяемого минимума (10^{-14} моль/л) для фолиевой кислоты возможно благодаря исключительно высокому адсорбционному сродству B_9 к ртути. Энергия взаимодействия с незаряженной ртутью содержащихся в молекуле B_9 четырех атомов азота, хотя и уступает уровню химической адсорбции, существенно выше уровня энергии физического взаимодействия. Этот эффект позволяет проводить длительное концентрирование B_9 в ячейке при его содержании, недоступном для определения всеми другими аналитическими методами.

2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Хроматографические методы и их классификация

2.13.1 Цель работы: Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения

2.13.2 Задачи работы: разделить и идентифицировать ионы железа и меди методом круговой бумажной хроматографии

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

- Стандартный раствор соли Fe^{3+} , 1 мг/мл
- Стандартный раствор соли Cu^{2+} , 1 мг/мл
- Раствор $K_4[Fe(CN)_6]$, 10% -ный
- Подвижная фаза – смесь этанола с 5М HCl (9:1) по объему
- Обеззоленная фильтровальная бумага «синяя лента»
- Капилляры стеклянные
- Хроматографическая камера

2.13.4 Описание (ход) работы:

. На круглом обеззоленном фильтре «синяя лента» диаметром 12,5 см простым карандашом намечают контуры «фитиля» длиной 40 мм и шириной 4 мм

2. На центр фильтра с помощью капилляра наносят каплю раствора разделяемой смеси. Раствор наносят в несколько приемов, чтобы впитывание происходило за счет капиллярных сил бумаги. Образовавшееся пятно осторожно обводят простым карандашом, т.е. фиксируют его положение на бумаге. Бумагу высушивают, вырезают «фитиль», как показано на схеме.
3. В хроматографическую камеру помещают кристаллизатор и тигель с 10 мл подвижной фазы. Кислоту добавляют к органическому растворителю, чтобы предотвратить адсорбцию ионов бумагой. На кристаллизатор сверху помещают фильтр, следя за тем, чтобы «фитиль» был погружен в растворитель, и закрывают камеру крышкой. Во время разделения не рекомендуется открывать крышку камеры, перемещать камеру.
3. Когда произойдет размывание первичного пятна растворителем, и фронт ПФ пройдет заданное расстояние, бумагу вынимают, отмечают карандашом границы фронта растворителя, высушивают в токе теплого воздуха и приступают к проявлению зон.
4. Для проявления зон локализации ионов Fe^{3+} и Cu^{2+} фильтр опрыскивают раствором $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ из стеклянного пульверизатора (*металлический непригоден!*). В результате на хроматограмме проявляется синяя зона $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ и коричневая зона $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.
5. Рассчитывают для обоих катионов значения R_f , считая началом их пути наружную границу первоначального пятна, отмеченную карандашом, а концом пути – наружные границы появившихся после проявления кольцевых зон локализации. Расстояние же, пройденное фронтом растворителя, мм, отсчитывают от центра хроматограммы (центра бумажного круга).
- как отношение подвижностей α .
6. Рассчитывают коэффициент разделения R_f и оценивают степень разделения катионов.

2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Газовая хроматография.

2.14.1 Цель работы: Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения

2.14.2 Задачи работы:

изучение теоретических основ и практических применений газовой хроматографии как одного из видов физико-химических методов анализа.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Стандартный раствор соли Fe^{3+} , 1 мг/мл
2. Стандартный раствор соли Cu^{2+} , 1 мг/мл
3. Раствор $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 10% -ный
4. Подвижная фаза – смесь этанола с 5М HCl (9:1) по объему
5. Обеззоленая фильтровальная бумага «синяя лента»
6. Капилляры стеклянные
7. Хроматографическая камера

2.14.4 Описание (ход) работы:

Газовая хроматография представляет собой процесс разделения компонентов смеси, основанный на различии в равновесном распределении компонентов между двумя фазами – газом-носителем (*подвижная фаза*) и либо твердой фазой, либо жидкостью, нанесенной в виде тонкой пленки на поверхность твердого носителя или стенки хроматографической колонки (*неподвижная фаза*).

В первом случае метод называется *газоадсорбционной хроматографией*, во втором – *газо-жидкостной распределительной хроматографией*. Из этих двух вариантов газовой хроматографии наиболее распространена распределительная газожидкостная хроматография, которая и рассматривается далее.

Общие сведения о газожидкостной распределительной хроматографии

Сущность метода газожидкостной хроматографии (ГЖХ) состоит в следующем. Анализируемая смесь летучих компонентов (обычно – раствор) переводится в парообразное состояние и смешивается с потоком инертного газаносителя, образуя с ним подвижную фазу. Эта смесь проталкивается далее новой порцией непрерывно подаваемого газа-носителя и попадает в хроматографическую колонку, заполненную неподвижной (стационарной) жидкой фазой.

Разделяемые компоненты распределяются между фазами в соответствии с их коэффициентами распределения K_p , определяемыми по уравнению (3.5). Равновесный обмен хроматографируемого вещества между подвижной и неподвижной фазами осуществляется в результате многократного повторения актов *сорбция* \leftrightarrow *десорбция* по мере движения подвижной фазы вдоль неподвижной внутри хроматографической колонки.

Поток газаносителя увлекает с собой разделяемую парообразную смесь вдоль хроматографической колонки, так что процессы *сорбция* \leftrightarrow *десорбция* разделяемых компонентов повторяются многократно, причем каждый раз в системе между фазами устанавливается динамическое равновесие. Эти многократные переходы разделяемых веществ из подвижной фазы в неподвижную и обратно совершаются по всей длине хроматографической колонки до тех пор, пока пары разделяемых веществ не покинут колонку вместе с газомносителем.

Поскольку сродство различных разделяемых веществ к неподвижной фазе различно, то в процессе сорбционно-десорбционных процессов они задерживаются в неподвижной фазе неодинаковое время. Чем выше температура кипения и относительная растворимость вещества в неподвижной фазе, тем дольше оно в ней находится, тем позже покидает хроматографическую колонку. В конце концов из хроматографической колонки вместе с газомносителем выходят зоны (объемы) парообразных хроматографируемых веществ, разделенных полностью или частично. Если для двух компонентов смеси коэффициенты распределения K_p одинаковы, то они не разделяются. Если же их коэффициенты распределения различны, то разделение происходит, причем первым покидает колонку тот компонент, у которого температура кипения ниже.

Пары разделенных компонентов вместе с газомносителем поступают в детектор хроматографа, генерирующий электрический сигнал – тем больший, чем выше концентрация компонента в парогазовой смеси. Электрический сигнал усиливается и фиксируется регистратором хроматографа в виде *хроматограммы*, записываемой на диаграммной ленте. Эти хроматограммы и используются для качественной и количественной обработки результатов анализа разделяемой смеси компонентов.

Основные характеристики хроматограммы

Параметры удерживания

Хроматограмма – это зарегистрированная во времени последовательность показаний регистратора. Каждому разделенному компоненту смеси соответствует свой пик на хроматограмме. По оси абсцисс откладывается время, по оси ординат – величина аналитического сигнала, которая тем больше, чем выше содержание данного компонента в разделяемой смеси.

На рис. 3.6 схематично показан общий вид хроматограммы в случае разделения трехкомпонентной смеси, состоящей из компонентов *A* и *B*, сорбируемых в колонке, и компонента, не сорбируемого в колонке. Каждому из трех компонентов на

хроматограмме отвечает свой пик. Значение $t = 0$ соответствует моменту ввода пробы, от которого начинает отсчитываться время t .

Величина t_A – время удерживания компонента A , t_B – время удерживания компонента B , t_0 – время выхода несорбируемого компонента. В данном случае оба компонента A и B разделяются полностью, поэтому их пики на хроматограмме не накладываются друг на друга.

Время удерживания – качественная характеристика каждого компонента. Оно измеряется от момента ввода пробы до момента выхода максимума (вершины) пика. Время удерживания зависит от природы хроматографируемого вещества и газаносителя, скорости прохождения подвижной фазы через хроматографическую колонку, от природы и массы неподвижной фазы, температуры, длины колонки.

2.15 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Ионообменная хроматография.

2.15.1 Цель работы: Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения

2.15.2 Задачи работы:

изучение теоретических основ и практических применений ионообменной хроматографии как одной из разновидностей физико-химических методов анализа.

изучение анализа с использованием катионитной хроматографической колонки на примере определения кальция в водном растворе.

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

стеклянная хроматографическая колонка (рис. 1), содержащая катионит универсальный КУ-2 в H^+ -форме; 2) штатив лабораторный; 3) делительная воронка стеклянная на 200 см³ ; 4) колба коническая на 250 см³ ; 5) стакан химический на 50 см³ ; 6) цилиндр мерный на 10 см³ ; 7) бюретка на 25 см³ ; 8) раствор хлороводородной кислоты (1:1); 9) раствор гидроксида натрия с $c(NaOH) = 0,05$ моль/дм³ ; 10) универсальная индикаторная бумага.

2.15.4 Описание (ход) работы:

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимый стехиометрический обмен ионов анализируемого раствора на подвижные ионы сорбентов, называемых ионитами или ионнообменниками. Причиной разделения является различная способность ионов анализируемого раствора к обмену. В качестве ионитов используют природные или синтетические, твердые, нерастворимые в воде неорганические и органические высокомолекулярные кислоты, основания и их соли, содержащие в своем составе активные (ионогенные) группы. Иониты делятся на катиониты и аниониты. Катиониты – сорбенты, способные к обмену катионами. Катиониты содержат в своем составе ионогенные группы различной степени кислотности, например, сульфогруппу – карбоксильную группу – $COOH$, ион водорода которых способен к катионному обмену. Провести регенерацию хроматографической колонки, переведя ее в H^+ - форму. 2) Провести ионный обмен ионов кальция анализируемого раствора на ионы водорода катионита. 3) Установить титрованием содержание ионов водорода в элюате. 4) Рассчитать содержание ионов кальция в анализируемом растворе по объему титранта, пошедшего на титрование элюата. 5) Составить отчет по лабораторной работе со схематичным изображением ионообменной хроматографической колонки и сдать результат анализа преподавателю для оценки

2.16 Лабораторная работа №16 (2 часа).

Жидкостная хроматография.

2.16.1 Цель работы: Рассмотреть принцип метода, его аналитические характеристики и области применения

2.16.2 Задачи работы:

Количественное определение аминокислот методом хроматографии на бумаге

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

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

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

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

Приготовленную хроматограмму помещают в хроматографическую камеру с предварительно налитой в нее системой растворителей для разделения смеси аминокислот, например, смеси бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 15:3:7. Разделение ведут методом восходящей хроматографии, пока линия фронта не дойдет на 2-3 см до верхнего края хроматографической бумаги (линия финиша). После этого хроматограмму вынимают из камеры и верхний конец бумаги немедленно вставляют в держатель, сделанный из трех скрепленных резиновым кольцом стеклянных палочек, и помещают на 20 мин в вытяжной шкаф для удаления из бумаги растворителей. Высушенную хроматограмму обмакивают в 1 %-ном растворе нингидрина в ацетоне для обнаружения на ней положения пятен аминокислот. Затем хроматограмму помещают на 10 мин в вытяжной шкаф для удаления ацетона и переносят в сушильный шкаф, где оставляют ее на 15 мин при 70°C. Аминокислоты стандартной и испытуемой смесей обнаруживают в виде сине-фиолетовых пятен, расположенных цепочкой по направлению движения системы растворителей от линии старта к верхнему краю хроматограммы. Идентификацию аминокислот, содержащихся в испытуемой смеси, ведут по совпадению на хроматограмме позиций, занимаемых аминокислотами стандартной и испытуемой смесей (рис. 8).

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

Очерченные участки бумагу вырезают и помещают в пробирки, номера которых должны соответствовать номерам пятен на хроматограммах. В каждую пробирку наливают из бюретки по 10 мл 75 %-ного раствора этилового спирта, насыщенного сульфатом меда (к 500 мл этилового спирта добавляют 0,2 мл насыщенного раствора сульфата меди).

Пробирку закрывают пробкой и, периодически перемешивая, добиваются полного перехода кирпично-красной окраски (медной соли сине-фиолетового Руэмана) с бумаги в раствор. На это уходит 15-20 мин. Абсорбцию (оптическая плотность) стандартного и испытуемого растворов измеряют на фотоэлектрокалориметре с зеленым светофильтром (540 нм). В поток сравнения устанавливают кювету с 75%-ным раствором этилового спирта с сульфатом меди.

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

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

Оформите результаты собственного эксперимента, сделайте по ним выводы.