



К.ГЕККЕЛЕР
Х.ЭКШТАЙН

АНАЛИТИЧЕСКИЕ
И ПРЕПАРАТИВНЫЕ
ЛАБОРАТОРНЫЕ
МЕТОДЫ

Kurt E. Geckeler
Heiner Eckstein

ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE LABORMETHODEN

Grundlegende Arbeitstechniken
für Chemiker, Biochemiker,
Mediziner, Pharmazeuten und Biologen

Mit 323 Bildern und 74 Tabellen



Friedr. Vieweg & Sohn Braunschweig / Wiesbaden

К. ГЕККЕЛЕР
Х. ЭКШТАЙН

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ПРЕПАРАТИВНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ



МОСКВА
«ХИМИЯ»
1994

Предисловие авторов	8
1. Общие методы выделения и очистки веществ	9
1.1. Кристаллизация	9
1.1.1. Перекристаллизация	10
1.1.2. Возгонка	17
1.1.3. Зонная плавка	20
1.2. Фильтрование и микрофильтрация	22
1.3. Перегонка	27
1.3.1. Обычная перегонка	27
1.3.2. Перегонка при пониженном давлении (вакуумная перегонка)	33
1.3.3. Перегонка в противотоке (ректификация)	41
1.3.4. Перегонка с водяным паром	44
1.4. Экстракция	48
1.4.1. Экстрагирование твердых веществ и жидкостей	48
1.4.2. Многоступенчатое распределение	55
1.5. Мембранная фильтрация	62
1.6. Диализ и электродиализ	68
1.7. Лиофилизация	71
2. Хроматографические и электрофоретические методы разделения	77
2.1. Физико-химические основы процесса хроматографии	77
2.1.1. Адсорбционная хроматография	79
2.1.2. Распределительная хроматография	88
2.1.3. Ионообменная хроматография	90
2.1.4. Аффинная хроматография	102
2.1.5. Гель-хроматография	107
2.2. Тонкослойная (ТСХ) и бумажная (БХ) хроматография	119
2.2.1. Сорбенты, применяемые в ТСХ	121
2.2.2. Аналитическая ТСХ	121
2.2.3. Препаративная ТСХ	129
2.2.4. Количественное определение методом ТСХ	131
2.2.5. Специальные варианты ТСХ	138
2.2.6. Переход от ТСХ к хроматографии на колонке	142
2.2.7. Бумажная хроматография	143
2.2.8. Источники ошибок	150
2.3. Колоночная хроматография	153
2.3.1. Жидкостная хроматография низкого давления	159
2.3.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	175

Геккелер К. Е., Экштайн Х.

Г30 Аналитические и препаративные лабораторные методы:
Справ. изд.: Перев. с нем. — М.: Химия, 1994. — 416 с. ил.
ISBN 5—7245—0468—5

Описаны практически все классические и современные методы разделения, очистки, исследования и анализа веществ. Для каждого метода даны краткое емкое определение, теоретическое введение, описание аппаратуры, методика эксперимента, источники возможных ошибок, форма представления информации, области применения. Приведены необходимые справочные данные, библиография.

Для специалистов различного профиля — химиков, биохимиков, биологов, медиков, фармацевтов и др., а также студентов и начинающих исследователей.

Г 1707000000—056 КБ—48—4—94
050(01)—94

ББК 543

ISBN 5—7245—0468—5 (Россия)
ISBN 3—528—08447—2 (ФРГ)

© Friedr. Vieweg a. Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, 1987

© Перевод на русский язык
П. Д. Решетов, А. С. Пышкин,
1993

2.3.3. Детекторы	184
2.3.4. Оптимизация условий хроматографического разделения	187
2.3.5. Источники ошибок	199
2.4. Газовая хроматография	200
2.4.1. Аналитическая газовая хроматография	203
2.4.2. Препаративная газовая хроматография	214
2.5. Электрофоретические методы разделения	218
2.5.1. Зональный электрофорез (ЗЭ)	219
2.5.1.1. Электрофорез на бумаге	223
2.5.1.2. Электрофорез в тонком слое	227
2.5.1.3. Гель-электрофорез	229
2.5.1.4. Электрофорез в свободном потоке	235
2.5.2. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ)	237
2.5.2.1. Аналитическое изоэлектрическое фокусирование	242
2.5.2.2. Препаративное изоэлектрическое фокусирование	248
2.5.3. Изоэлектрофорез (ИТФ)	257
2.6. Планирование эксперимента при разделении веществ биологического происхождения (например, белков)	264
3. Аналитические методы	266
3.1. Контроль чистоты вещества	267
3.1.1. Определение температуры плавления	267
3.1.2. Определение температуры кипения	276
3.1.3. Рефрактометрия	280
3.2. Физические методы определения строения вещества	286
3.2.1. Спектроскопические методы	286
3.2.2. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния	289
3.2.2.1. Инфракрасная спектроскопия (ИК)	289
3.2.2.2. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР)	303
3.2.3. Спектроскопия в ультрафиолетовом (УФ) и видимом свете	305
3.2.4. Дисперсия оптического вращения (ДОВ)	312
3.2.5. Круговой дихроизм (КД)	316
3.2.6. Магнитная дисперсия оптического вращения (МДОВ) и магнитный круговой дихроизм (МКД)	319
3.2.7. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)	323
3.2.8. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)	341
3.2.9. Масс-спектрометрия (МС)	347
3.3. Определение молекулярной массы	357
3.3.1. Определение молекулярной массы по плотности пара	358
3.3.2. Эбулиоскопия и криоскопия	360
3.3.3. Осмометрия	364
3.3.3.1. Мембранная осмометрия	364
3.3.3.2. Паровая осмометрия	367

3.3.4. Вязкозиметрия	370
3.3.5. Другие методы определения молекулярной массы	374
3.4. Количественные методы анализа	376
3.4.1. Фотометрия и флуориметрия	376
3.4.1.1. Фотометрия	376
3.4.1.2. Флуориметрия	381
3.4.2. Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) и атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС)	384
3.4.3. Аминокислотный анализ (АКА)	391
3.4.4. Определение значения pH	396
4. Приложение	401
4.1. Справочные таблицы	401
Таблица 4.1/1. Единицы международной системы (СИ)	401
Таблица 4.1/2. Внесистемные единицы и единицы системы СГС и их перевод в систему СИ	402
Таблица 4.1/3. Десятичные приставки	402
Таблица 4.1/4. Соотношение между единицами энергии и силы	403
Таблица 4.1/5. Физические константы	403
Таблица 4.1/6. Способы выражения концентраций веществ	403
Таблица 4.1/7. Органические растворители	404
Таблица 4.1/8. Элюотропный ряд растворителей	405
Таблица 4.1/9. Взаимная растворимость веществ	406
Таблица 4.1/10. Сравнительная высушивающая способность различных веществ	407
Таблица 4.1/11. Высушивание растворителей над оксидом алюминия	407
Таблица 4.1/12. Концентрация кислот, выпускаемых промышленностью	408
Таблица 4.1/13. Правило смешения («правило креста»)	408
Таблица 4.1/14. Охлаждающие смеси	408
Таблица 4.1/15. Буферные растворы, применяемые для стабилизации значений pH	409
4.2. Первая помощь при несчастных случаях	409

1. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВЕЩЕСТВ

1.1. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРОВ

Основная цель этой книги — систематическое и предельно краткое изложение аналитических и препаративных методов выделения и идентификации веществ, т. е. тех методов, которые применяются на практике в химических и смежных по профилю лабораториях.

Книга призвана помочь начинающим исследователям в выполнении экспериментов и анализе полученных результатов. Разнообразный материал, представленный в ней, способствует правильному выбору методик при решении конкретных задач аналитического или препаративного характера. В книгу включены методы, хорошо проверенные на практике.

При написании книги авторы использовали свой многолетний педагогический опыт проведения практических занятий и курсов лекций для студентов и молодых специалистов. Она представляет собой расширенный курс лекций и других учебных методических материалов; теоретические основы излагаются здесь в объеме, ограниченном, но достаточном для осмысленного применения приведенных методов. Соответствующие разделы могут быть полезны при подготовке к коллоквиумам, семинарам, экзаменам. Книга, по-видимому, будет полезным учебным пособием не только для студентов начальных курсов, но и для дипломников, молодых специалистов, аспирантов; для специалистов, работающих в смежных с химией областях, может служить сборником методик получения чистых веществ.

Авторы выражают признательность проф. Г. Хефлингеру, В. Рунделю, К. Шеффнеру (Тюбинген) и докт. Г. Берту (Стэнфорд, США) за редактирование отдельных глав и ценные замечания. Авторы также благодарят издательство за поддержку при оформлении и издании настоящей книги. Критические замечания и предложения принимаются с благодарностью.

Тюбинген

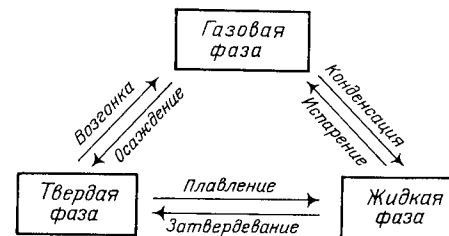
К. Е. Геккелер, Х. Экштайн

Кристаллизацией называется процесс образования кристаллической упорядоченной фазы (кристаллов) из раствора, расплава или газовой фазы.

Кристаллы — твердые тела, характеризующиеся периодическим закономерным расположением частиц (молекул, атомов, ионов) в пространстве.

Наиболее простым элементом кристаллической решетки является элементарная ячейка, которая описывается элементами симметрии и является характеристикой кристаллической формы того или иного вещества. К элементам симметрии относятся оси симметрии, плоскости симметрии и др. По совокупности элементов симметрии кристаллы подразделяются на шесть систем: триклинную, моноклинную, ромбическую, тетрагональную, гексагональную и кубическую. Однако на практике кристаллы часто называют по внешнему виду: листочки, иглы, призмы, кубики, палочки, параллелепипеды и т. п.

Кристаллизация — один из важнейших методов получения чистых веществ. Процесс очистки кристаллизацией из раствора называется перекристаллизацией (см. разд. 1.1.1), из расплава — зонной плавкой (см. разд. 1.1.3), из газовой фазы — возгонкой (см. разд. 1.1.2). Фазовые переходы между различными агрегатными состояниями приведены на схеме:



БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- D'Ans/Lax*, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Bd. 1—3, Springer, Heidelberg 1964/1983
R. C. Weast (Hrsg.), Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, Cleveland 1984
H. U. Vogel (Hrsg.), Chemiker-Kalender, Springer, Heidelberg 1966
The Merck Index, 10th Ed., Merck Co., Rahway 1984

В указанных источниках приводятся табличные данные, в частности такие параметры веществ, как температура плавления, растворимость и др., характеризующие условия проведения кристаллизации.

1.1.1. ПЕРЕКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Перекристаллизацией называется процесс очистки и разделения веществ, при котором вещество вначале растворяют при нагревании в подходящем растворителе, затем раствор охлаждают и вещества выкристаллизовываются в чистом виде.

Физические основы метода

Очистка веществ перекристаллизацией основана на разнице в растворимости целевого вещества и примесей в используемом растворителе. Оптимальным растворителем считается такой, в котором вещество имеет максимальную растворимость при температуре кипения и минимальную — на холоду (рис. 1.1.1/1). Существенным фактором при перекристаллизации является наличие центров кристаллизации, в отсутствие которых при охлаждении могут образовываться пересыщенные растворы. Такими центрами кристаллизации могут служить, например, кристаллы целевого вещества, или механические примеси. В некоторых случаях кристаллизацию инициируют путем испарения растворителя, тогда при охлаждении насыщенного раствора выпадает дополнительное количество кристаллов чистого вещества.

При проведении перекристаллизации очень важно правильно выбрать растворитель.

Растворитель должен иметь наиболее высокий температурный градиент растворимости.

Растворимость целевого вещества в выбранном растворителе должна заметно увеличиваться с ростом температуры.

Точка кипения растворителя должна быть ниже температуры плавления целевого вещества (в противном случае растворитель не следует нагревать до точки кипения), иначе вещество будет плавиться, а не растворяться в нагретом растворителе, и вместо кристаллизации при охлаждении будет наблюдаться застывание расплава.

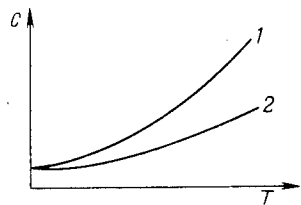


Рис. 1.1.1/1. Зависимость растворимости вещества в различных растворителях от температуры:

1 — растворимость вещества сильно зависит от температуры растворителя; 2 — растворимость вещества слабо зависит от температуры растворителя (для перекристаллизации следует использовать первый растворитель)

Таблица 1.1.1/1. Ряд полярности растворителей (см. разд. 4.1)

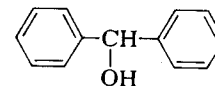
Полярность	Растворители	Полярность	Растворители
Низкая полярность	Петролейный эфир Толуол	Умеренная полярность	Ацетон
Умеренная полярность	Диэтиловый эфир	Высокая полярность	Этанол Вода

Температура кипения растворителя должна быть по возможности низкой, так как в этом случае кристаллы легче высушить.

Растворитель даже при температуре кипения должен быть инертным по отношению к целевому веществу.

Если предстоит перекристаллизовать неизвестное вещество, которое невозможно отнести к какому-либо определенному классу, приходится действовать эмпирическим путем. В тех случаях, когда формула вещества известна или его можно отнести к известному классу, действуют по определенной схеме. Прежде всего по структурной формуле вещества делают вывод о его гидрофильности или гидрофобности (неполярные группы: $-\text{CH}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_5$ и др.; полярные группы: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ и др.), на этом основании выбирают наиболее подходящий растворитель (табл. 1.1.1/1). Подробный перечень растворителей дан в Приложении (см. разд. 4.1).

Подобный подход может быть проиллюстрирован на примере дифенилкарбинола:



Наряду с двумя гидрофобными фенильными группами в молекуле дифенилкарбинола присутствует гидрофильная группа OH^- ; в целом такая молекула обладает средней полярностью, поэтому ее перекристаллизовывают из растворителей высокой полярности. При наличии только фенильных групп вещество относилось бы к неполярным и его следовало кристаллизовать из неполярной смеси петролейный эфир — толуол.

Подобный подход применяют для общей оценки с тем, чтобы сократить число возможных вариантов смеси растворителей. При этом такие параметры растворителей, как дипольный момент, диэлектрическая проницаемость, сольватирующие свойства и др., не учитываются. Однако в конечном счете в основе всех рекомендаций лежат результаты эксперимента. Для многих соединений составлены таблицы растворимости в различных растворителях и при различных температурах (см. библиографический список к разд. 1.1).

Если не удастся добиться хорошей очистки при помощи одного растворителя, то положительного эффекта достигают, используя

пару растворителей, в которых растворимость целевого вещества может быть выше или ниже:

петролейный эфир — диэтиловый эфир	этанол — ацетон
толуол — петролейный эфир	этанол — вода
хлороформ — петролейный эфир	метанол — диэтиловый эфир
хлороформ — четыреххлористый углерод	метанол — дихлорметан
этанол — петролейный эфир	вода — ацетон
этанол — диэтиловый эфир	вода — уксусная кислота

Кроме того, известны специальные виды перекристаллизации.

Дробная кристаллизация. Возможность такого разделения объясняется неодинаковой растворимостью веществ при различных температурах. При некоторой определенной температуре раствор будет насыщенным в отношении одного и ненасыщенным в отношении другого вещества. Естественно, что в то время, когда первое вещество станет при охлаждении выпадать в осадок, второе еще будет полностью находиться в растворе.

Осаждение заменой одного растворителя другим. Этот способ применяется в том случае, когда вещество способно разлагаться при нагревании или изменять свой состав. Способ заключается в том, что к концентрированному раствору вещества добавляют второй растворитель, в котором целевое вещество практически нерастворимо. Далее выдерживают раствор при комнатной температуре или в холодильнике до завершения кристаллизации.

Приборы

Для проведения перекристаллизации чаще всего используют круглодонную колбу с обратным холодильником (рис. 1.1.1/2) или, в редких случаях, колбу Эрленмейера.

Для перекристаллизации микроколичеств или пробных экспериментов — обычные пробирки.

Для нагревания пользуются колбонагревателем или баней.

Порядок работы

При подборе растворителя необходимо прежде всего обратиться к специальной литературе или использовать табличные данные; в крайнем случае проводят предварительные опыты.

Небольшую порцию вещества (30—50 мг) смешивают в пробирке с 5—10 каплями растворителя (необходимо испытать по крайней мере три растворителя различной полярности) и раствор доводят до кипения. Если вещество полностью не растворяется, добавляют растворитель до полного растворения пробы. При охлаждении раствора должно выпасть по возможности наибольшее количество кристаллического осадка.

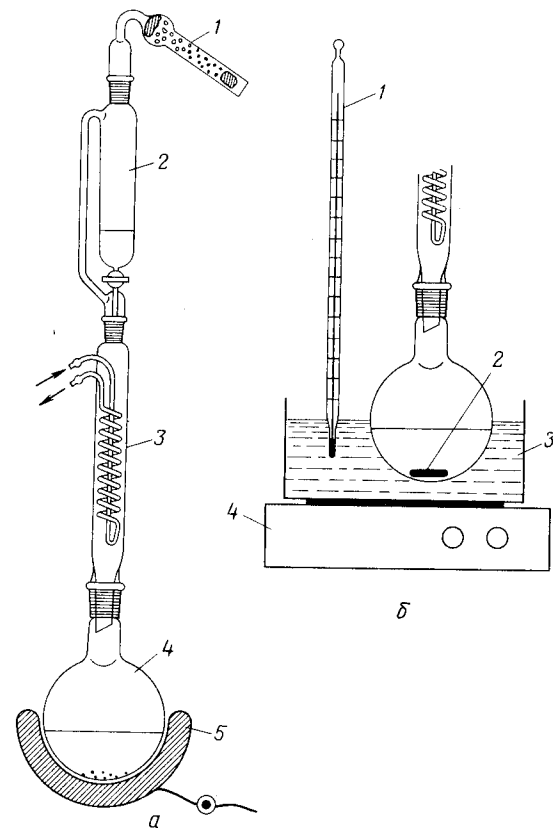


Рис. 1.1.1/2. Стандартная аппаратура для перекристаллизации:

a — с колбонагревателем; 1 — хлоркальциевая трубка; 2 — капельная воронка с отводной трубкой для выравнивания давления; 3 — обратный холодильник Димрота; 4 — круглодонная колба с раствором; 5 — колбонагреватель; *б* — с водяной или масляной баней; 1 — термометр для бани; 2 — магнит; 3 — водяная или масляная баня; 4 — магнитная мешалка с нагревом

После завершения предварительных опытов приступают к проведению основного эксперимента. Вещество помещают в круглодонную колбу подходящего объема и добавляют примерно 80% необходимого по теоретической или экспериментальной оценке количества растворителя, причем колба должна быть заполнена не более чем наполовину (см. рис. 1.1.1/2).

После добавления кипятильников (кусочки фаянса, капилляры) присоединяют обратный холодильник и раствор нагревают до кипения.

Через холодильник небольшими порциями прибавляют дополнительное количество растворителя до полного растворения вещества. В целях безопасности и точности работы рекомендуется

добавлять растворитель через капельную воронку. Наличие нерастворимых примесей не должно смущать: их отделяют при последующем фильтровании.

В случае, если раствор непрозрачен или окрашен, добавляют активный уголь и затем горячий раствор фильтруют (необходимо перед добавлением угля содержимое колбы немного охладить, так как при добавлении угля в нагретый раствор может произойти вскипание или вспенивание).

Когда вещество полностью растворится, нагрев отключают и раствор медленно охлаждается до комнатной температуры. В большинстве случаев этого вполне достаточно, но иногда для повышения выхода кристаллического вещества раствор выдерживают в холодильнике.

В затруднительных случаях решающее значение приобретает фактор времени. Это связано с тем, что скорость понижения температуры раствора влияет на размеры кристаллов. Если раствор охлаждается медленно, то образующиеся кристаллы постепенно растут и могут достигнуть иногда очень больших размеров, и, наоборот, при быстром охлаждении образуются мелкие кристаллы. При перекристаллизации стараются получать кристаллы промежуточных размеров. Выращивание кристаллов часто требует терпения: этот процесс может длиться несколько дней, недель или даже месяцев. Однако в большинстве случаев хорошие выходы достигаются за несколько часов.

Выпавшее при кристаллизации вещество отделяют от маточного раствора путем фильтрования под вакуумом (см. разд. 1.2).

Маточный раствор сохраняют для последующей обработки (растворитель частично отгоняют в вакууме и повторяют стадию охлаждения, или полностью упаривают раствор и повторяют кристаллизацию).

Исходные данные, результаты эксперимента и условия его проведения записывают в рабочем журнале.

При проведении кристаллизации иногда возникают затруднения, которые преодолевают при помощи специальных приемов. Если примеси нерастворимы на холоду или при нагревании, их отделяют фильтрованием. Если примеси хорошо растворимы, то при кристаллизации основного вещества они остаются в растворе. При наличии окрашенных примесей или опалесценции к раствору добавляют гранулированный или порошкообразный активный уголь (1—2% в расчете на растворенное вещество) и нагревают раствор, не доводя до кипения, в течение 10—15 мин. Затем фильтруют нагретый раствор при нормальных условиях или под вакуумом, причем используют двойной слой фильтровальной бумаги или специальную бумагу, предназначенную для отделения активного угля. В случае неполярных растворителей вместо активного угля используют активированный оксид алюминия. При этом не следует применять большое количество адсорбента,

так как могут происходить потери основного вещества за счет адсорбции. Опалесценцию обычно удается устранить с помощью кизельгура. Во всех указанных случаях перед внесением адсорбента раствор следует охладить до температуры ниже точки кипения (по крайней мере, на 10 °С, чтобы избежать бурного вскипания).

Микрорекристаллизация

Кристаллизация небольших количеств веществ (до 100 мг) обладает своей спецификой. Образец помещают в небольшую лабораторную или центрифужную пробирку, добавляют соответствующий растворитель и нагревают. После охлаждения до комнатной температуры пробирку помещают в ледяную баню и маточный раствор отбирают пипеткой, при этом кончик пипетки вводят под слой кристаллов (рис. 1.1.1/3). Аналогичным способом проводят и промывание кристаллов. Затем пробирку помещают в вакуум-эксикатор для высушивания вещества. Эти операции (отделение маточника и промывание) можно проводить путем центрифугирования и декантации.

Отсутствие кристаллизации

Если кристаллы вообще не образуются, то раствор переохлаждают до температуры от +4 до —18 °С в зависимости от температуры плавления вещества и растворителя. Затем медленно нагревают раствор и вносят затравочный кристалл (по возможности один) (см. также разд. «Маслообразование»).

Маслообразование

Если при перекристаллизации вместо кристаллов целого вещества образуются капли «масла», это свидетельствует о наличии примесей, которые препятствуют кристаллизации, причем примеси могут растворяться в «масле» и затруднять дальнейшую очистку. Такое явление часто наблюдается при очистке низкоплавких веществ. В этом случае полезно:

использовать большее количество растворителя и повторить очистку;

добавить активный уголь, высушить над сульфатом магния, отфильтровать, растворитель упарить в вакууме, остаток снова перекристаллизировать;

добавить кристалл того же или сходно кристаллизующегося вещества в раствор, а еще лучше — в пересыщенный раствор;

Рис. 1.1.1/3. Прибор для микрорекристаллизации [Fieser L. F., Williamson K., Organic Experiments, Heath, Lexington/MA 1979, p. 40]



потереть стеклянной палочкой по стенкам колбы или добавить кипятильник;

отделить «масло» и перекристаллизовать из другого растворителя, в конце концов несколько раз заменить растворитель;

встряхивать некоторое время раствор при помощи специальной аппаратуры или обработать ультразвуком;

провести осаждение вещества заменой одного растворителя другим.

При работе с легкоокисляющимися веществами используют стандартные приборы, которые продувают инертным газом, или специальную аппаратуру, например трубки Шленка.

Источники ошибок

Избыток растворителя (это ведет к снижению выхода или отсутствию кристаллизации). Рекомендации: уменьшить объем растворителя путем упаривания в роторном испарителе.

Кристаллизация плохо растворимых примесей вместе с целевым веществом. Рекомендации: растворять вещество не полностью и фильтровать раствор горячим; использовать другие растворители.

Слишком быстрое охлаждение (способствует соосаждению или адсорбции примесей).

Смешанная кристаллизация при наличии в растворе нескольких веществ.

Слишком длительное нагревание с обратным холодильником (вызывает химические изменения целевого вещества).

Недостаточный для полной кристаллизации период времени.

Загрязнение вакуумной смазкой раствора (препятствует кристаллизации). Рекомендации: использовать небольшое количество смазки.

Оформление результатов

Наименование растворителей для перекристаллизации обычно указывают в описании работы или дают в скобках после данных о температуре плавления исследуемого вещества (см. разд. 3.1.1). Например: $T_{пл}$ 117 °C (этанол); $T_{пл}$ 145 °C (этанол — вода; 1:1).

Область применения

Очистка неорганических и главным образом органических веществ. Результаты очистки контролируют следующими методами: тонкослойной хроматографией, спектроскопией ЯМР, определением точки плавления.

Разделение веществ, имеющих различную растворимость, методом дробной кристаллизации.

Получение веществ в кристаллическом виде.

Фракционирование полимеров по молекулярной массе.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- R. S. Tipson, in: A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, Bd. 3/1, S. 395, Interscience, New York 1956
A. I. Vogel, Practical Organic Chemistry, S. 122, Wiley, New York 1956
См. библиографический список к разд. 1.1.

1.1.2. ВОЗГОНКА

Процесс перехода вещества из твердого состояния непосредственно в газообразное, минуя жидкую фазу, называется возгонкой.

Физические основы метода

Фазовое состояние системы зависит определенным образом от основных параметров состояния — температуры, давления, объема. Фазовая диаграмма однокомпонентных систем обычно строится в координатах давление — температура (рис. 1.1.2/1). Если нагревать твердое вещество при атмосферном давлении $p_{атм}$ (точка A), то оно расплавится в точке B (температура плавления) и при дальнейшем нагревании до температуры кипения $T_{кип}$ (точка C) перейдет в газообразное состояние (прямая ABC). Если это вещество нагревать при рабочем давлении $p_э$, которое меньше давления в тройной точке T, то, минуя стадию плавления, оно перейдет в газообразное состояние (прямая DE).

В принципе возгоняться способны практически все вещества, однако в большинстве случаев этот процесс идет лишь при крайне низком давлении. Из органических веществ только относительно немногие соединения способны возгоняться при нормальном давлении, например камфора и некоторые соединения ароматического ряда (табл. 1.1.2/1). Условием применения возгонки как метода выделения и очистки, помимо высокого давления паров целевого соединения, является достаточно большое различие между давлением паров исследуемого вещества и примесей.

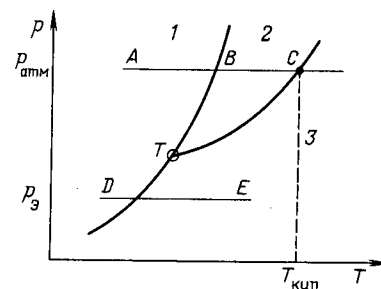


Рис. 1.1.2/1. Фазовая диаграмма:
 $p_{атм}$ — атмосферное давление; $p_э$ — давление в эксперименте; T — тройная точка; $T_{кип}$ — точка кипения; 1 — твердое вещество; 2 — жидкость; 3 — газообразное вещество

Таблица 1.1.2/1. Свойства легковогоняемых веществ

Соединение	$T_{\text{кип.}}^{\circ\text{C}}$	$T_{\text{пл.}}^{\circ\text{C}}$	Давление паров при температуре кипения		Соединение	$T_{\text{кип.}}^{\circ\text{C}}$	$T_{\text{пл.}}^{\circ\text{C}}$	Давление паров при температуре кипения	
			кПа	мм рт. ст.				кПа	мм рт. ст.
Камфора	204	179	49,32	370	Бензол	79	11	4,80	36
Иод	185	114	11,98	90	Нафталин	218	82	0,93	7
Антрацен	340	218	5,46	41	Бензойная кислота	132	122	0,80	6

Принцип возгонки в вакууме используется также при лиофилизации (см. разд. 1.8), однако конечным продуктом в этом случае является не сублимат, а сухой остаток.

Приборы

Для возгонки применяют комплекты приборов на шлифах (или самостоятельно изготовленный прибор) из двух стеклянных пробирок с отводами (рис. 1.1.2/2).

Для проведения предварительных опытов применяют две пробирки различных размеров или два часовых стекла (рис. 1.1.2/3).

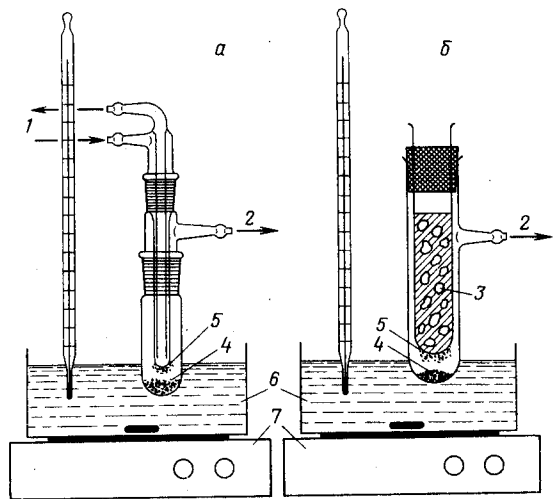
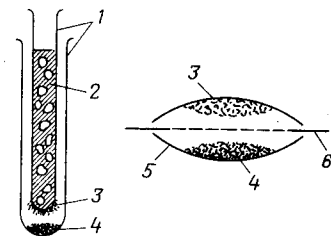


Рис. 1.1.2/2. Прибор для возгонки со шлифом (а) и без шлифа (б):

1 — подача холодной воды; 2 — к вакуумному насосу; 3 — пробирка со смесью льда и воды; 4 — образец; 5 — сублимат; 6 — баня с магнитом для перемешивания; 7 — магнитная мешалка

Рис. 1.1.2/3. Приборы для возгонки полумикроколичеств:

1 — пробирки; 2 — смесь льда и воды; 3 — сублимат; 4 — образец; 5 — часовое стекло; 6 — перфорированная пластинка



Порядок работы

Тонкоизмельченный образец вещества помещают во внешний сосуд (в лаборатории обычно работают с порциями вещества менее 1 г).

Включают вакуумный насос и подачу воды, создают вакуум в системе.

Медленно нагревают образец до появления первых кристалликов сублимата.

По завершении возгонки отключают нагрев, вакуум и охлаждение, соединяют охлаждаемую пробирку и счищают сублимат.

Иногда перед началом работы проверяют способность вещества к возгонке. Для этого образец нагревают в приборе для определения температуры плавления (см. разд. 3.1.1). Если вещество возгоняется легко, на верхней охлажденной части капилляра наблюдается появление сублимата.

Помимо возгонки в вакууме существует способ возгонки в токе инертного газа или воздуха.

Источники ошибок

Охлаждаемая поверхность слишком мала для взятого количества образца.

Слишком большое расстояние между охлаждаемой поверхностью и образцом (оптимальное расстояние не более 1 см).

Слишком медленный нагрев.

Вещество недостаточно измельчено.

Оформление результатов

Сведения об условиях возгонки вещества приводятся вместе с данными об определении температуры плавления, например: $t_{\text{пл}}^{1,3} = 87^{\circ}\text{C}$ (возг.). Это означает, что вещество возгоняется при 87°C и давлении 1,3 кПа (примерно 10 мм рт. ст.).

Область применения

Возгонка является универсальным методом очистки небольших количеств вещества, содержащего нелетучие примеси. Если же вещества много, то предпочтительнее использовать перекристал-

лизацию или хроматографические методы. Возгонка позволяет получать вещества высокой степени чистоты.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

J. T. Davies, Sublimation, MacMillan, New York 1948
R. Tipton, in: A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, Vol. IV/9, Interscience, New York 1965
См. библиографический список к разд. 1.1.

1.1.3. ЗОННАЯ ПЛАВКА

Зонная плавка — метод очистки твердых термостойких веществ, основанный на перераспределении компонентов смеси в расплаве.

Физические основы метода

При расплавлении небольшого участка твердого вещества происходит перераспределение компонентов смеси между соприкасающимися жидкой и твердой фазами. Метод зонной плавки заключается в медленном перемещении зоны расплава вдоль сформированного в виде цилиндра твердого вещества (рис. 1.1.3/1). Нагрев для создания расплавленных зон производят различными способами: электронагревателями, токами высокой частоты, электронной бомбардировкой.

На рис. 1.1.3/2 представлены диаграммы плавления вещества, очищенного методом зонной плавки. Диаграмма *a* соответствует случаю, когда примеси в виде кристаллов сконцентрированы на одном конце цилиндра и образуют с кристаллами целевого вещества эвтектическую смесь. Эвтектика — это микрогетерогенная смесь кристаллических твердых фаз, одновременно выделяющихся при так называемой эвтектической температуре из жидкой фазы, с которой она совпадает по составу. Диаграмма *б* соответствует случаю, когда примеси присутствуют в чистом веществе в виде смешанных кристаллов. Диаграмма *в* соответствует сочетанию вариантов *a* и *б*, диаграмма *г* — случаю, когда смесь не удается разделить методом зонной плавки, так как она представлена в виде эвтектической смеси.

Условием применения метода зонной плавки является термостабильность вещества при температуре плавления, а также его способность к кристаллизации. Этот метод не требует применения

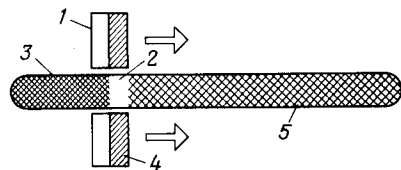


Рис. 1.1.3/1. Схема процесса зонной плавки:

1 — охлаждающий элемент; 2 — зона расплава; 3 — чистое вещество; 4 — нагревательный элемент; 5 — образец

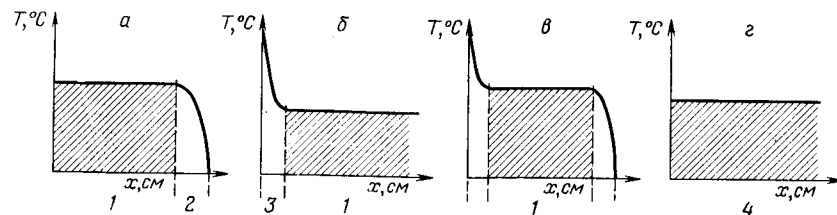


Рис. 1.1.3/2. Диаграмма плавления вещества при зонной плавке:

a — зона очищенного целевого вещества + зона примесных компонентов (эвтектическая смесь); *б* — зона очищенного целевого вещества + зона смешанных кристаллов; *в* — зона очищенного вещества + зона эвтектики + зона смешанных кристаллов (сочетание случаев *a* и *б*); *г* — зона целевого вещества или эвтектической смеси (разделение методом зонной плавки невозможно); 1 — очищенное целевое вещество; 2 — концентрат примесей; 3 — смешанные кристаллы целевого вещества и примесных компонентов; 4 — эвтектическая смесь

растворителя, и, следовательно, здесь исключаются потери вещества за счет отбрасывания маточного раствора.

Приборы

Для проведения зонной плавки, как правило, используют стандартные приборы, которые состоят из стеклянной трубки с образцом, запаянной с обеих сторон, блока нагрева и блока охлаждения, а также электромотора (рис. 1.1.3/3). В зависимости от типа прибора подвижными являются либо печь для нагревания, либо трубка с образцом. Для повышения эффективности разделения формируют большое число зон плавления (до 50).

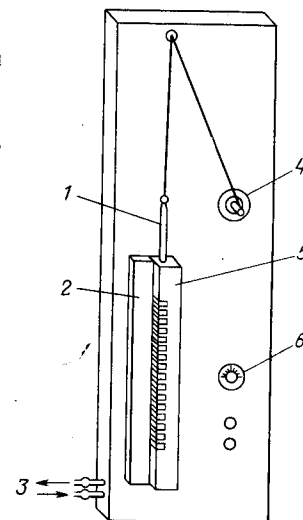
Порядок работы

Эксперимент можно проводить на уровне микроколичеств (мг) и в макромасштабе (примерно 30 г); в зависимости от массы вещества продолжительность эксперимента меняется от нескольких часов до нескольких суток.

Вещество помещают в запаянную с одного конца трубку соответствующего размера, после чего трубку запаивают с другого конца.

Рис. 1.1.3/3. Прибор для зонной плавки:

1 — трубка с образцом; 2 — нагревательный блок; 3 — подача холодной воды; 4 — приводная нить; 5 — блок охлаждения; 6 — регулятор нагрева (Desaga GmbH, Heidelberg)



В случае повышенного содержания в образце примесей рекомендуется провести предварительную очистку путем перекристаллизации (см. разд. 1.1.1).

При работе с микроколичествами веществ используют тонкие трубки (капилляры). Однако заполнить их твердым веществом затруднительно, поэтому вещество расплавляют в отдельном сосуде и заполняют капилляр, погружая его в расплав. Затем капилляр охлаждают и запаивают.

Трубку или капилляр помещают в прибор и там фиксируют. После окончания опыта трубку открывают и извлекают отдельные фракции вещества.

После анализа каждой фракции отбрасывают те из них, которые содержат примеси.

Источники ошибок

- Вещество недостаточно гомогенно.
- Образец слишком загрязнен.
- В трубке имеется воздушный пузырь.

Область применения

Получение в небольших количествах особо чистых веществ (органических соединений, солей, металлов).

Концентрирование и выделение ценных примесей, присутствующих в образце.

При наличии соответствующих приборов метод применим к жидким образцам.

Разделение сложных азеотропных смесей.

Обратный процесс: тщательное и равномерное смешивание двух веществ.

Дробная перекристаллизация легкоплавких веществ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- W. G. Pfann, Zone Melting, John Wiley Sons, New York 1958
H. Schildknecht, Zonenschmelzen, Verlag Chemie, Weinheim 1964

1.2. ФИЛЬТРОВАНИЕ И МИКРОФИЛЬТРАЦИЯ

Фильтрованием называется разделение неоднородных систем жидкость — твердые частицы или газ — твердые частицы при помощи пористых фильтрующих материалов.

Микрофильтрацией называется фильтрование (разделение) суспензий на полупроницаемых мембранах.

Физические основы метода

Движущей силой процесса фильтрования является разность давления по обе стороны фильтрующего материала. В лаборато-

Таблица 1.2/1. Размеры частиц

Частицы	Размеры, мкм	Частицы	Размеры, мкм
Асбестовая пыль	< 5	Угольная пыль	1—70
Атмосферная пыль	< 10	Морская пыль	0,03—0,3
Бактерии	0,5—20	Металлическая пыль	0,01—60
Эритроциты	7,5	Вирусы	< 0,05
Красители	0,1—7		

рии чаще всего применяется обычное фильтрование, когда жидкость проходит через фильтр под давлением небольшого столба жидкости, находящегося над фильтром, или фильтрование под вакуумом, когда жидкость проходит через фильтр под давлением почти в 1 атм. Фильтрование под вакуумом характеризуется высокой скоростью и эффективностью. Фильтрование под давлением применяется реже, однако имеет определенные преимущества, так как позволяет проводить процесс в атмосфере инертного газа и использовать растворители с высокой летучестью.

В зависимости от размеров отделяемых частиц (табл. 1.2/1), а следовательно, и от способа фильтрования (рис. 1.2/1) применяют фильтры различной плотности. В случае микрофильтрации диаметр пор составляет 0,01—10 мкм. Микрофильтры, в отличие от мембранных фильтров, предназначенных для ультрафильтрации и обратного осмоса (см. разд. 1.5), имеют поры правильной цилиндрической формы.

Приборы

В лаборатории применяются три основных типа воронок (рис. 1.2/2): *воронки Бюхнера* для больших количеств веществ, *воронки Хирша* для небольших количеств веществ и *воронки со стеклянными пористыми фильтрами* (фильтр Шотта), достоинством которых являются незначительные потери вещества при фильтровании. Воронки с пористыми фильтрами маркируются в

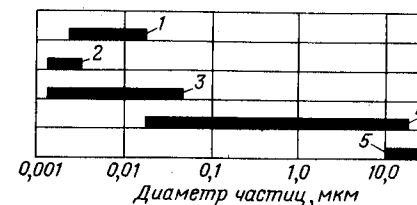


Рис. 1.2/1. Различные способы фильтрования в зависимости от размеров частиц (Berghof-Membran technik GmbH, Tübingen):
1 — мембранная фильтрация; 2 — электродиализ; 3 — диализ; 4 — микрофильтрация; 5 — обычное фильтрование

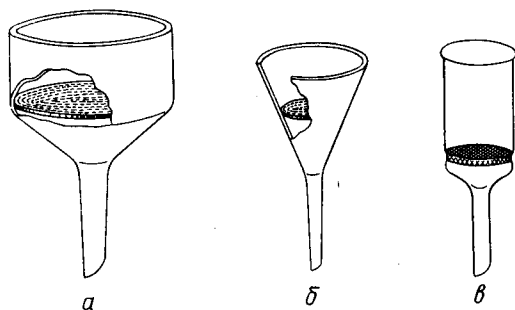


Рис. 1.2/2. Виды воронок для фильтрования:

а — воронка Бюхнера; *б* — воронка Хирша; *в* — пористый фильтр (фильтр Шотта)

соответствии с сортом стекла пористой пластинки (Г — иенское стекло, D — стекло типа дюран, В — кварцевое стекло). Недостатком этих воронок является непрочность пористой пластинки, поэтому рекомендуется промывать их сразу после использования (так как присохшие частицы вещества существенно затрудняют промывание пористой пластинки). Промывание ведется в противотоке или под давлением.

Успешное фильтрование возможно лишь при правильном выборе плотности фильтра (табл. 1.2/2).

При работе с микроколичествами веществ применяют специальные воронки (рис. 1.2/3).

Для фильтрования горячих растворов применяют фильтры с подогревом; в простейших случаях стеклянную воронку помещают в обогреваемый кожух (рис. 1.2/4).

Для фильтрования растворов веществ, изменяющихся под действием воздуха, применяют прибор для фильтрования в атмосфере инертного газа (рис. 1.2/5).

Выбор фильтрующего материала зависит как от требований к чистоте раствора (важно, чтобы фильтр полностью задерживал нерастворимые частицы), так и от свойств самого фильтра.

Таблица 1.2/2. Области применения фильтров с различным диаметром пор

Номер фильтра	Максимальный размер пор, мкм	Область применения
0	200	Удерживание на фильтре наиболее крупных частиц (пыли, дыма), барботирование газов в слое жидкости
1	150	Удерживание на фильтре крупнодисперсных осадков, барботирование газов в слое жидкости
2	80	Препаративное фильтрование кристаллических осадков
3	40	Аналитическое и препаративное фильтрование тонкодисперсных осадков
4	14	Аналитическое фильтрование тонкодисперсных осадков
5	1,5	Микрофильтрация клеточных суспензий (стерилизующая фильтрация)

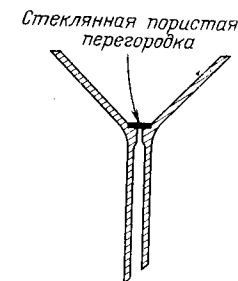


Рис. 1.2/3. Воронка для фильтрования микроколичеств веществ

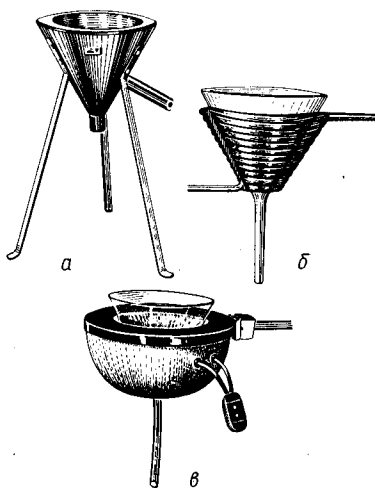


Рис. 1.2/4. Воронки для горячего фильтрования:

а — воронка с рубашкой, обогреваемой горячей водой; *б* — воронка с металлической спиралью для нагрева; *в* — воронка с кожухом для электронагрева [Diamond P. S., Laboratory Techniques in Chemistry and Biochemistry, Butterworths, London 1966, p. 52]

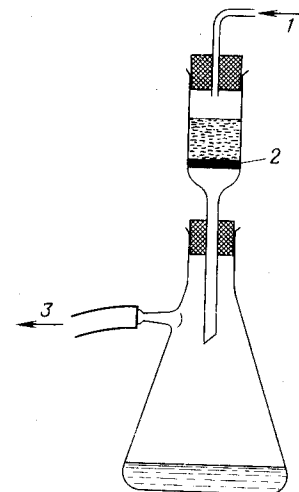


Рис. 1.2/5. Прибор для фильтрования в атмосфере инертного газа:
1 — подача инертного газа; 2 — пористый фильтр; 3 — к вакуумному насосу

Поликарбонатные фильтры устойчивы к действию большинства органических кислот и растворителей, однако неустойчивы к действию оснований и галогенсодержащих углеводородов.

Порядок работы

В качестве примера рассмотрим фильтрацию под вакуумом (рис. 1.2/6).

Колбу Бунзена с воронкой и фильтром присоединяют к склянке Вульфа (небольшая жестко закрепленная трехгорлая склянка).

Поверхность фильтровальной бумаги смачивают небольшим количеством растворителя, который используется для растворения целевого вещества.

Включают вакуум-насос и проверяют равномерность прилегания фильтра к фильтрующей пластинке.

Суспензию переливают в воронку, жидкость отсасывают, систему разгерметизируют (при помощи трехходового крана).

Вещество на фильтре заливают холодным растворителем, через некоторое время вновь включают насос (промывание осадка на фильтре). На этой стадии можно заменить высококипящий растворитель на низкокипящий с близкими по растворимости свойствами, чтобы ускорить промывание осадка на фильтре.

Осадок на фильтре отжимают стеклянной пробкой для более полного удаления растворителя (остаток на фильтре все еще содержит не менее 5—20% растворителя).

Микрофильтрация проводится аналогичным образом. Иногда при этом рекомендуется поместить на фильтр предфильтр из стекловолокна, чтобы уменьшить вероятность потери вещества. Для отделения тонких осадков, которые впоследствии можно потерять, применяют специальные сорбирующие материалы —

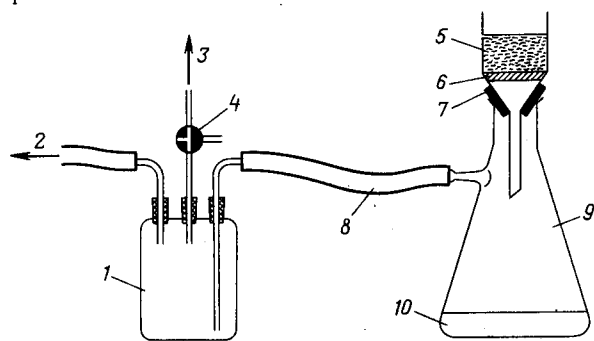


Рис. 1.2/6. Прибор с предохранительной склянкой для фильтрации под вакуумом:

1 — предохранительная склянка Вульфа; 2 — к вакуумному насосу; 3 — к манометру; 4 — трехходовой кран; 5 — воронка Бюхнера; 6 — фильтр; 7 — резиновая прокладка; 8 — соединительный шланг; 9 — колба Бунзена; 10 — фильтрат

кизельгель, целлюлозный порошок. При невозможности отделения тонких осадков фильтрованием следует применять центрифугирование.

Источники ошибок

Размер фильтра не соответствует размерам воронки (следует тщательно подгонять фильтр, иначе возможны потери вещества).

Фильтр не прилегает к краю воронки, т. е. при присасывании фильтра к поверхности воронки образуются складки.

Неправильно выбрана плотность фильтра (происходит забивание пор или существенное замедление процесса).

Область применения

Фильтрация: выделение и разделение веществ; гравиметрический анализ; очистка воды и воздуха.

Микрофильтрация: дегазация жидкости; концентрирование клеточных суспензий, стерилизующая фильтрация.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Firmenschrift, Membranfilter, Fa. Berghof, Tübingen 1980
Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 1/1, S. 135, Thieme, Stuttgart 1958
A. Weissberger (Hrsg.), Technique of Organic Chemistry, Vol. III, S. 485, Interscience, New York 1950

1.3. ПЕРЕГОНКА

1.3.1. ОБЫЧНАЯ ПЕРЕГОНКА

Перегонка — процесс разделения и очистки веществ, при котором жидкое или расплавленное вещество испаряется при нормальном давлении и вновь конденсируется в приемнике.

Физические основы метода

Давление пара над жидкостью возрастает при повышении температуры вследствие увеличения кинетической энергии молекул. Когда давление пара над жидкостью достигает значения атмосферного давления, жидкость закипает. Зависимость температуры кипения от давления описывается уравнением Клаузиуса — Клапейрона (см. разд. 1.3.2). Типичный график зависимости давления пара от температуры приведен на рис. 1.3.1/1.

Точку кипения обычно указывают при нормальном атмосферном давлении (101,3 кПа, или 760 мм рт. ст., или 1 атм, см. разд. 3.1.2). Если место проведения опыта находится не на уровне моря, то вводится так называемая барометрическая поправка (коррекция). Как правило, очистку веществ осуществляют при

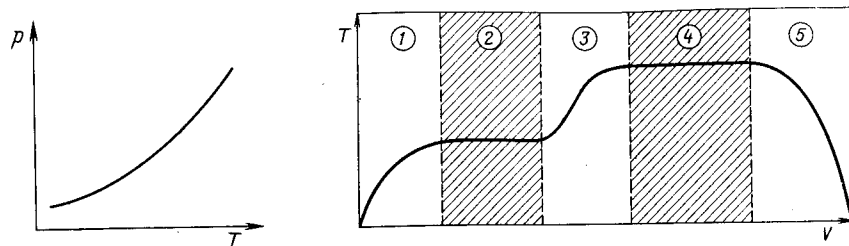


Рис. 1.3.1/1. График зависимости давления пара от температуры

Рис. 1.3.1/2. Перегонка бинарной смеси:

T — температура кипения; V — объем дистиллята; 1 — начальная фракция; 2 — фракция А; 3 — промежуточная фракция; 4 — фракция Б; 5 — конечная фракция

помощи перегонки при атмосферном давлении. На рис. 1.3.1/2 приведен график изменения температуры в процессе перегонки.

Некоторые смеси не удается разделить при помощи перегонки, даже если компоненты имеют различные температуры кипения. Это происходит в том случае, когда пар и жидкость имеют одинаковый состав. Такая смесь называется азеотропной смесью или азеотропом. Она ведет себя при перегонке как гомогенное вещество и перегоняется при постоянной температуре. Рассмотрим, например, диаграмму кипения смеси этанол — вода (рис. 1.3.1/3). При содержании в жидкой фазе 50% этанола (1) доля этанола в газовой фазе существенно выше (2). Однако при содержании в жидкой фазе 99% этанола в газовой фазе выше доля воды (4), хотя вода имеет более высокую температуру кипения. Только при концентрации этанола 96% (5) состав жидкой и газовой фаз одинаков. Следовательно, конденсат имеет тот же состав, что и перегоняемая жидкость; в этом случае разделение двух веществ с помощью перегонки невозможно. Независимо от того, при какой концентрации этанола начинается перегонка, заканчивается она в точке азеотропа (5). Поэтому с помощью перегонки нельзя получить безводный этанол. Вследствие этого обычно имеют дело не с абсолютным, а с 96%-м этанолом.

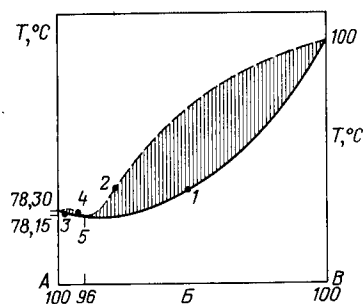


Рис. 1.3.1/3. Диаграмма кипения смеси этанол — вода (сплошная линия — жидкость; пунктирная линия — пар):
А — этанол (100%); Б — смесь этанол — вода, %; В — вода (100%)

Таблица 1.3.1/1. Состав и температура кипения бинарных и тройных азеотропов

Качественный состав азеотропа	Температура кипения азеотропа, °C	Температура кипения каждого компонента азеотропа, °C	Количественный состав, %	Качественный состав азеотропа	Температура кипения азеотропа, °C	Температура кипения каждого компонента азеотропа, °C	Количественный состав, %
Вода		100	2	Этанол		78	32
Дихлорметан	39	40	98	Бензол	68	80	68
Вода		100	3	Бензол		80	91
Хлороформ	56	61	97	Вода	69	100	9
Вода		100	12	Этанол		78	37
Ацетон	56	56	88	Вода	74	100	12
				Толуол		111	51
Этанол		78	7	Этанол		78	96
Хлороформ	59	61	93	Вода	78	100	4
Этанол		78	19				
Бензол	65	80	74	Толуол		111	80
Вода		100	7	Вода	85	100	20

В табл. 1.3.1/1 приведены температуры кипения и состав азеотропных жидкостей.

Приборы

Прибор для обычной перегонки (рис. 1.3.1/4) включает жидкостную (табл. 1.3.1/2) или электрическую бани, круглодонную колбу, термометр, холодильник с форштоссом и отводом и приемную колбу (комплект может включать отдельную колбу, насадку Кляйзена, холодильник и алонж).

Роторный испаритель (рис. 1.3.1/5) пригоден для перегонки небольших масс веществ от 50 мг до 5 г или для высококипящих жидкостей.

Двойная U-образная трубка (рис. 1.3.1/6) применяется для очистки микроколичеств веществ (10—500 мг).

Порядок работы

Перед началом обычной перегонки вещество высушивают, чтобы исключить образование азеотропа или гидролиз вещества при повышенной температуре (см. разд. 4). Осушитель перед перегонкой отфильтровывают.

Вещество помещают в круглодонную колбу (не более $\frac{2}{3}$ объема), добавляют кипятильники (в случае нагревания колбы при помощи бани) или магнит (в случае магнитной мешалки). Каждый раз перед новым нагреванием колбы добавляют свежий кипятильник.

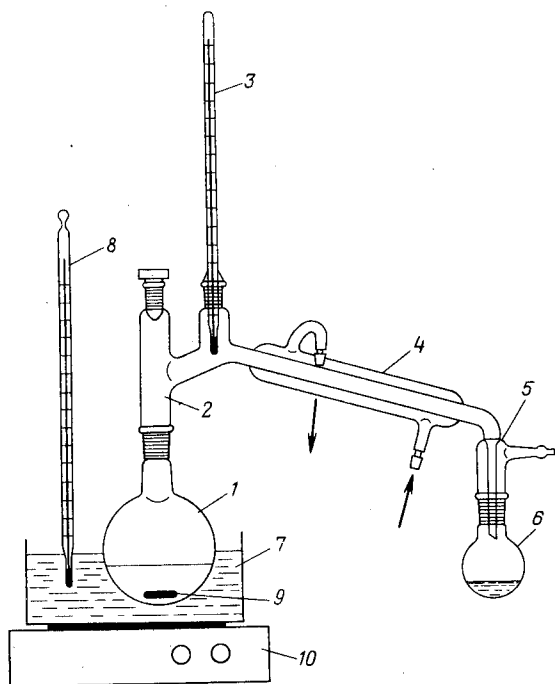


Рис. 1.3.1/4. Стандартный прибор для обычной перегонки:

1 — круглодонная колба; 2 — насадка Кляйзена; 3 и 8 — термометры; 4 — холодильник; 5 — форштос; 6 — приемная колба; 7 — масляная или водяная баня; 9 — «кипелки» или магнит; 10 — плитка или магнитная мешалка

Включают подачу воды в холодильник и нагревают колбу. Регулируя нагрев, устанавливают определенную скорость перегонки (нормальная скорость перегонки 1—2 капли дистиллята в 1 с).

Перегонку прекращают, когда в колбе еще остается немного жидкости и температура кипения остатка на 2—3 °C начинает превышать температуру кипения дистиллята.

Начальную, основную и более высококипящие фракции собирают в отдельные емкости и отмечают в рабочем журнале пределы температуры кипения каждой фракции.

Таблица 1.3.1/2. Общепринятые теплоносители для заполнения бань

Теплоноситель	Максимальная температура бани, °C
Вода	80—100
Триэтиленгликоль	200—250
Силиконовое масло	150—350

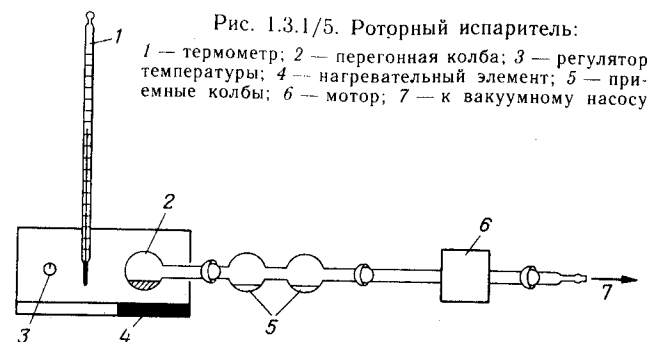


Рис. 1.3.1/5. Роторный испаритель:

1 — термометр; 2 — перегонная колба; 3 — регулятор температуры; 4 — нагревательный элемент; 5 — приемные колбы; 6 — мотор; 7 — к вакуумному насосу

При перегонке во влажной атмосфере на отвод холодильника (алонж) надевают хлоркальциевую трубку.

Перегонка в роторном испарителе

Колбу заполняют жидкостью до уровня отводной трубки со сферическим шлифом (примерно $\frac{1}{3}$ объема) и нагревают на воздушной бане. При этом колбу вращают или покачивают, чтобы избежать вскипания. В случае необходимости перегонку ведут при пониженном давлении. Вещества с высоким давлением пара лучше всего перегонять при нормальном давлении. Дистиллят собирают в круглодонные колбы (см. разд. 1.3.2).

Перегонка в двойной U-образной трубке

В первую петлю U-образной трубки помещают вещество, после чего конец трубки запаивают. Петлю с веществом охлаждают и в системе устанавливают вакуум. Охлаждают вторую (приемную) петлю; при нагревании первой петли вещество конденсируется в нижней части второй петли.

Перегонка азеотропа в приборе с ловушкой-сепаратором

Перед перегонкой к целевому веществу прибавляют растворитель, образующий с водой азеотроп. Азеотроп перегоняют в

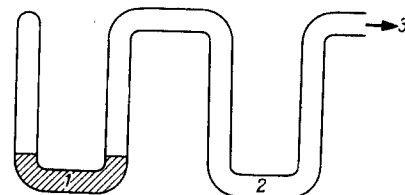


Рис. 1.3.1/6. U-образная трубка:

1 — вещество; 2 — дистиллят; 3 — к вакуумному насосу

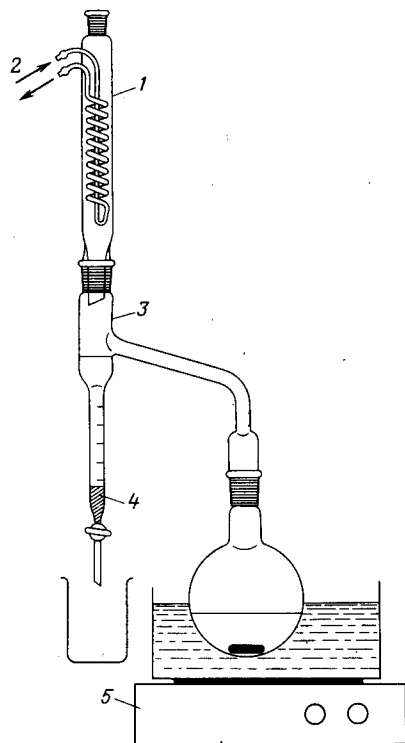


Рис. 1.3.1/7. Прибор для перегонки азеотропа с ловушкой-сепаратором (пример: толуол — вода):

1 — обратный холодильник; 2 — подача холодной воды; 3 — ловушка-сепаратор; 4 — слой воды; 5 — магнитная мешалка

приборе с ловушкой-сепаратором (рис. 1.3.1/7), после чего перегоняют не содержащее влаги целевое вещество.

Источники ошибок

Вещество предварительно не высушено.

Шарик термометра расположен не точно против входа в холодильник и вследствие этого не полностью окружен парами вещества, что приводит к неверному определению температуры кипения.

Для высококипящих веществ используется не водяной, а воздушный холодильник.

Температура перегонки на 3—4 °С отличается от истинной температуры кипения вещества. Это указывает на недостаточное чистое вещество или на перегонку смеси, что требует дополнительной очистки методом ректификации (см. разд. 1.3.3) или любым другим методом.

Оформление результатов

Необходимо указать способ перегонки и температуру кипения (или интервал температур кипения) (см. разд. 3.1.2).

Область применения

Перегонка является важнейшим методом разделения и очистки жидких и способных перегоняться при нормальном давлении твердых веществ с температурой кипения примерно до 180 °С.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

E. W. Berg, Physical and Chemical Methods of Separation, McGraw-Hill, New York 1963

E. Krell, Handbook of Laboratory Distillation, Elsevier, New York 1963
A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, Bd. 4, 6, Wiley-Interscience, New York 1971
M. van Winkle, Distillation, McGraw-Hill, New York 1968

1.3.2. ПЕРЕГОНКА ПРИ ПОНИЖЕННОМ ДАВЛЕНИИ (ВАКУУМНАЯ ПЕРЕГОНКА)

Физические основы метода

Зависимость между давлением пара и температурой кипения вещества описывается уравнением Клаузиуса — Клапейрона и представлена в виде соответствующей диаграммы на рис. 1.3.2/1.

Уравнение Клаузиуса — Клапейрона:

$$d \ln p / dT = \Delta H_v / RT^2.$$

Предположив, что молярная теплота испарения не зависит от температуры, после интегрирования получают следующее уравнение:

$$\ln p = (-\Delta H_v / RT) + C,$$

где p — давление; ΔH_v — молярная теплота испарения; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; C — константа.

Для оценки температуры кипения вещества при определенном давлении используют номограмму зависимости температуры от давления (рис. 1.3.2/2 и 1.3.2/3). Сначала в колонке *Б* выбирают поперечный штрих, соответствующий температуре кипения вещества при нормальном давлении, и находят точку его пересечения с продольной линией, соответствующей номеру группы вещества (различные группы веществ приведены в табл. 1.3.2/1). Через найденную точку пересечения и точку на ординате *А* (давление), соответствующую предполагаемому рабочему давлению, проводят прямую и продолжают ее до пересечения с ординатой *В* (температура). Найденная точка соответствует температуре кипения вещества при заданном рабочем давлении.

Приборы

Прибор для перегонки в вакууме (рис. 1.3.2/4) аналогичен прибору для обычной перегонки (см. рис. 1.3.1/4). Дополнительными элементами в случае перегонки в вакууме являются капил-

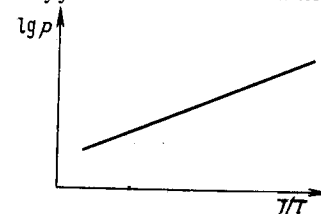


Рис. 1.3.2/1. Диаграмма давление пара — температура

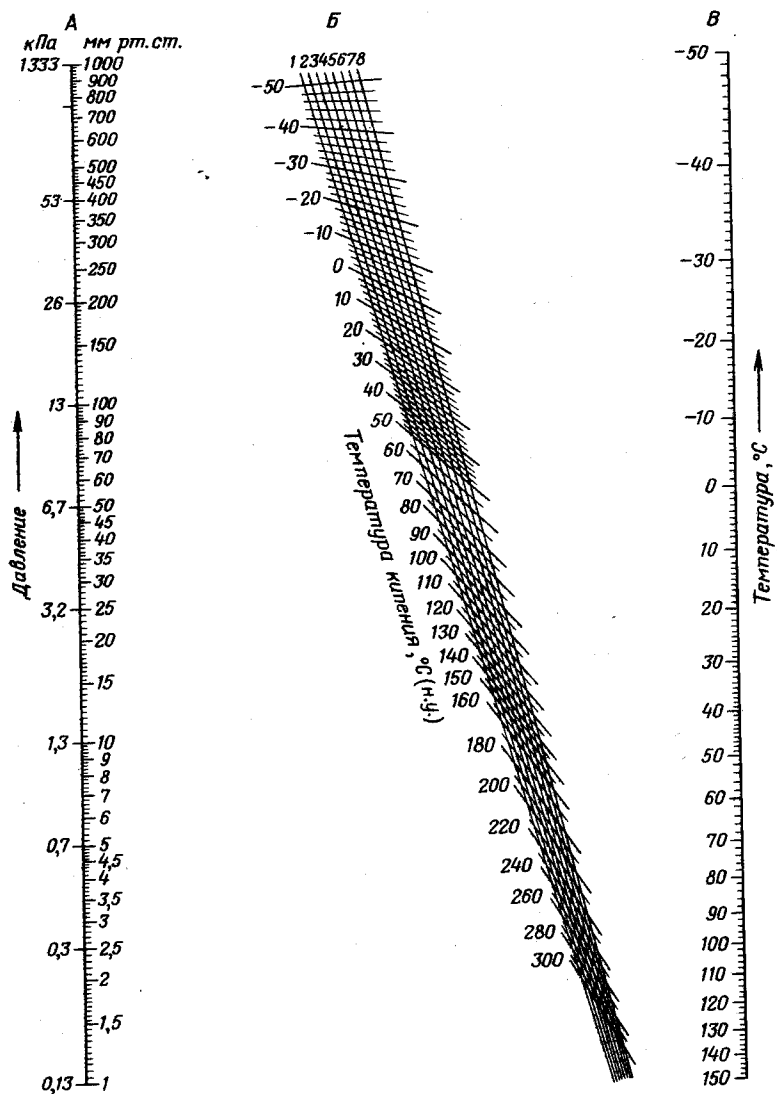


Рис. 1.3.2/2. Номограмма давление пара — температура (см. табл. 1.3.2/1):
 А — давление; В — номер группы вещества; В — температура. Пример: температура кипения при нормальном давлении (101 кПа, или 760 мм рт. ст.) 200 °С (колонка В), рабочее давление 2,7 кПа, или 20 мм рт. ст. (колонка А). Для определения температуры кипения при этом давлении необходимо через соответствующие этим величинам точки кипения в колонках А и В провести прямую до колонки В; точка пересечения этой прямой с колонкой В соответствует температуре кипения 90 °С при заданном давлении [Lippincott S. B., Lyman M. M., Ind. Eng. Chem. 38, 320 (1946)]

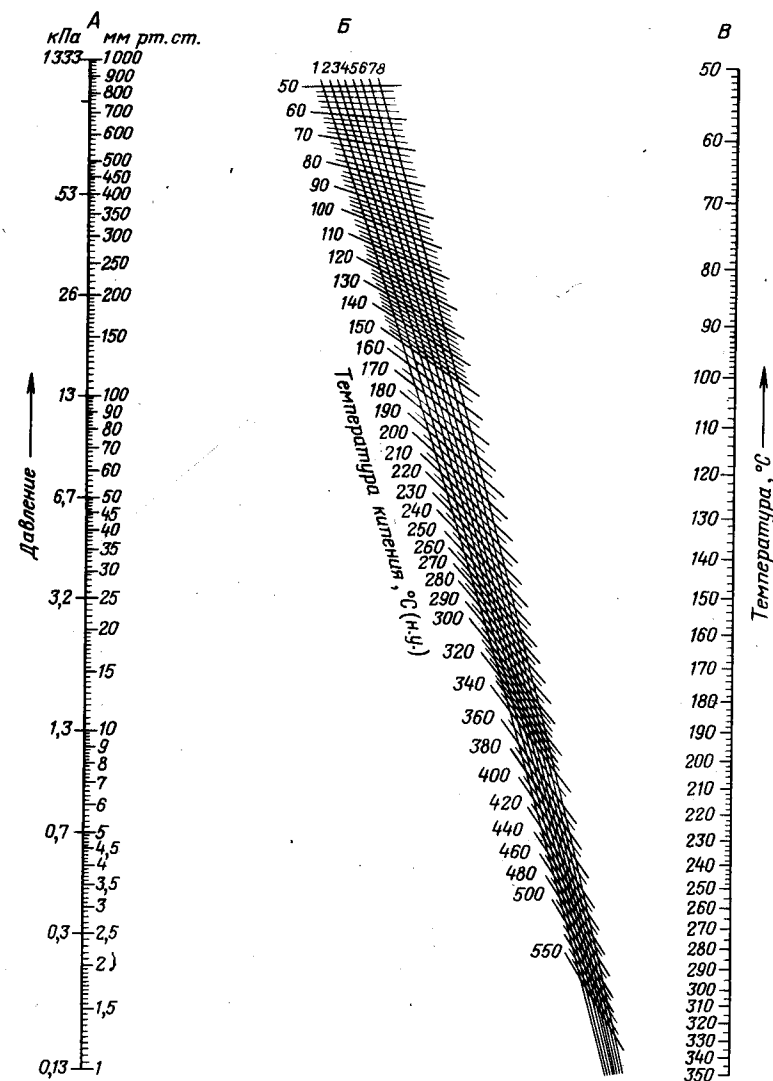


Рис. 1.3.2/3. Номограмма давление пара — температура для высококипящих веществ:
 А — давление; В — номер группы вещества; В — температура. Пример: температура кипения 100 °С (колонка В) при давлении 1,3 кПа, или 10 мм рт. ст. (колонка А) соответствует температуре кипения 220 °С при нормальном давлении (колонка В) [Lippincott S. B., Lyman M. M., Ind. Eng. Chem. 38, 320 (1946)]

Таблица 1.3.2/1. Группы веществ (см. рис. 1.3.2/2 и 1.3.2/3)

Группа 1	Группа 3	Группа 5
Антрацен	Ацетальдегид	Бензиловый спирт
Антрахинон	Ацетон	Метиламин
Фенантрен	Амины	Фенол
Трихлорэтилен	Хлоранилин	Пропионовая кислота
Группа 2	Сложные эфиры	Группа 6
Бензальдегид	Этиленоксид	Уксусный ангидрид
Бензонитрил	Муравьиная кислота	Изомасляная кислота
Бензофенон	Нафтол	Вода
Камфора	Нитробензол	Группа 7
Эфиры простые	Группа 4	Бензойная кислота
Галогеноуглеводороды	Уксусная кислота	Масляная кислота
Углеводороды	Ацетофенон	Этиленгликоль
Метилэтилкетон	Крезол	Метанол
Хинолин	Этиламин	Группа 8
		Амиловый спирт
		Этанол
		Изобутанол
		n-Пропанол

ляр, вакуумный насос, предохранительная склянка или охлаждаемая ловушка, манометр, насадка для отбора фракций.

Капилляр — тонкая стеклянная трубочка, укрепленная в горле перегонной колбы, применяется для равномерного кипения жидкости в вакууме. Очень тонкие капилляры вытягивают из обычной стеклянной трубки. Толщина капилляра должна быть такой, чтобы

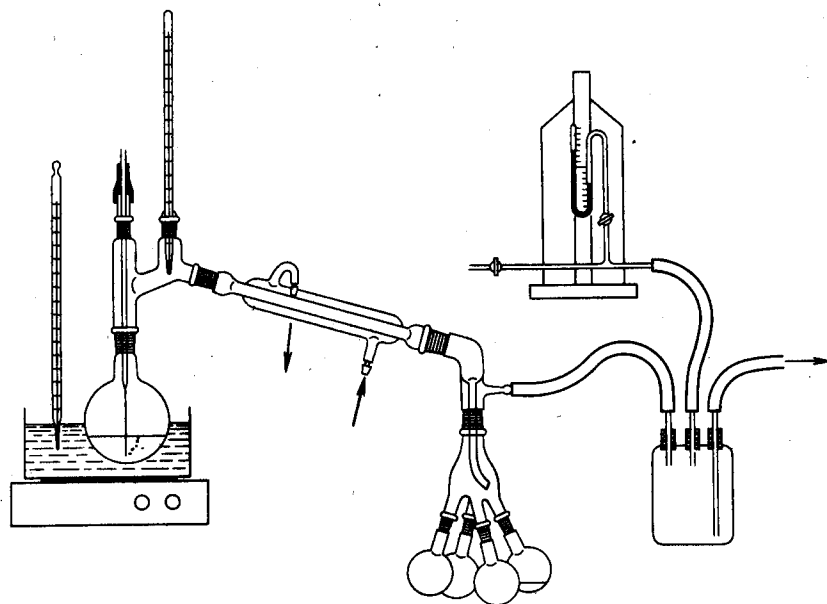


Рис. 1.3.2/4. Прибор для перегонки в вакууме

Таблица 1.3.2/2. Давление водяного пара при различных температурах

Температура, °C	Давление		Температура, °C	Давление	
	Па	мм рт. ст.		Па	мм рт. ст.
0	532	4	20	2400	18
5	800	6	25	3200	24
10	1200	9	30	4266	32
15	1733	13	35	5600	42

при продувании воздуха через ацетон проходили лишь отдельные пузырьки.

Вакуумный насос. Наиболее простым и чаще всего используемым устройством для вакуумирования является водоструйный насос, который обеспечивает давление порядка 1,3—4,4 кПа (10—33 мм рт. ст.) (слабый вакуум). Давление, создаваемое водоструйным насосом, соответствует давлению паров воды при температуре окружающей среды (табл. 1.3.2/2). Применение водоструйного насоса позволяет отказаться от использования ловушки с охлаждением и применять предохранительную склянку Вульфа. Недостатками водоструйного насоса являются большой расход воды и нестабильность создаваемого вакуума вследствие колебания давления в водной сети. Применение ротационного масляного насоса (рис. 1.3.2/5) позволяет уменьшить давление с 400 до 0,133 Па (3—10⁻³ мм рт. ст.) (средний вакуум). Давление, создаваемое масляным насосом, соответствует давлению паров масла. В особых случаях применяют ртутный диффузионный насос, который позволяет уменьшить давление до 1,3·10⁻⁶ Па (10⁻⁸ мм рт. ст.) (глубокий вакуум).

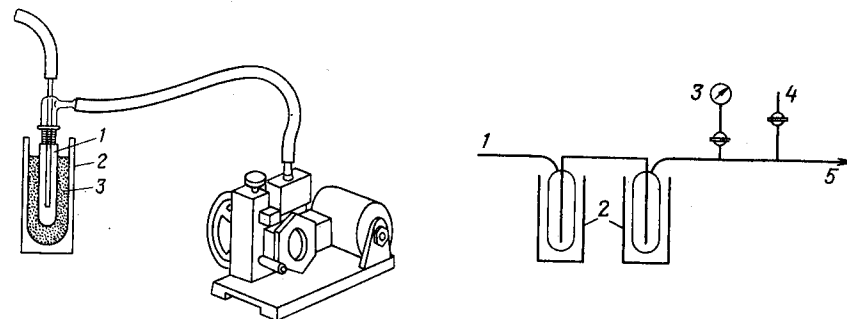


Рис. 1.3.2/5. Ротационный масляный насос с охлаждаемой ловушкой: 1 — охлаждаемая ловушка; 2 — сосуд Дьюара; 3 — хладагент [Fieser L. F., William-son K., Organic Experiments, Heath, Lexington/MA 1979, p. 382]

Рис. 1.3.2/6. Общая схема вакуумной системы: 1 — к прибору (для перегонки, лиофилизации и т. д.); 2 — охлаждаемая ловушка (жидкий азот, сухой лед с ацетоном); 3 — манометр Маклеода; 4 — кран сброса вакуума; 5 — к вакуумному насосу

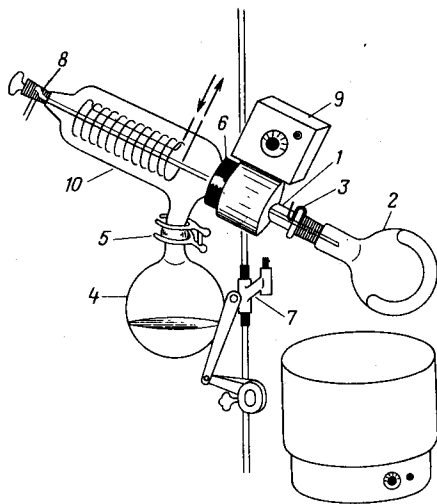


Рис. 1.3.2/7. Роторный испаритель:

1 — трубка с керном для перегонной колбы; 2 — перегонная колба; 3, 5 — соединительная муфта; 4 — приемная колба; 6 — уплотнитель; 7 — регулятор высоты; 8 — кран для сброса вакуума; 9 — мотор с регулятором; 10 — обратный холодильник

Охлаждаемая ловушка. Обычно при работе с ротационным вакуумным насосом применяют одну или несколько ловушек, охлаждаемых жидким азотом (или смесью ацетона с сухим льдом) (рис. 1.3.2/6). Ловушка предохраняет насос от загрязнения и разбавления летучими веществами, например растворителями, и одновременно предотвращает коррозию металлических частей насоса.

Роторный испаритель. Применяется для концентрирования раствора путем испарения в вакууме (рис. 1.3.2/7). Преимущество роторного испарителя заключается в том, что большая поверхность испарения повышает скорость упаривания растворителя. Вращение колбы препятствует вскипанию жидкости, возможность поддержания низкой температуры кипения раствора исключает разложение растворенного вещества. Помимо этого имеется возможность непрерывного упаривания больших объемов раствора: по мере отгонки растворителя новые порции раствора подаются в перегонную колбу через специальную трубку.

Манометр. Используется при проведении вакуумной перегонки для точной регистрации давления. Обычно в лаборатории применяют ртутные манометры (см. рис. 1.3.2/4) (разряжение определяют по перепаду высоты ртутного столбика в двух параллельных трубках). Вакуум с остаточным давлением менее 1—2 мм рт. ст. измеряют манометром Маклеода (рис. 1.3.2/8).

Для измерения манометр из нормального положения (резервный баллон расположен горизонтально и заполнен ртутью) пере-

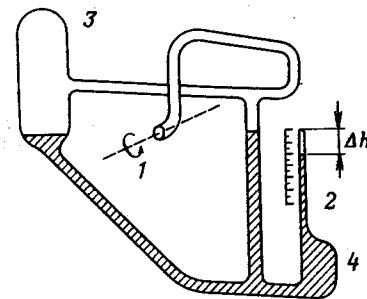


Рис. 1.3.2/8. Манометр Маклеода (в положении измерения):

1 — ось поворота; 2 — капилляр с нанесенной шкалой; 3 — резервный баллон; 4 — измерительный баллон

водят в положение измерения. Для этого манометр медленно поворачивают на 90° по часовой стрелке. При этом ртуть заполняет измерительный баллон и поднимается по капилляру. Находящийся в капилляре остаточный газ сжимается до тех пор, пока давление в капилляре не будет уравновешено давлением в эвакуируемой системе. Для установления равновесия достаточно нескольких минут, и точное значение остаточного давления может быть определено по предварительно проградуированной шкале, нанесенной на капилляре.

Насадка для отбора фракций. Применяется, когда при вакуумной перегонке необходимо собрать несколько фракций. Насадка Аншюца — Тиле — неограниченное число фракций (рис. 1.3.2/9), насадка «Паук» позволяет собрать 3—4 отдельные фракции (рис. 1.3.2/10).

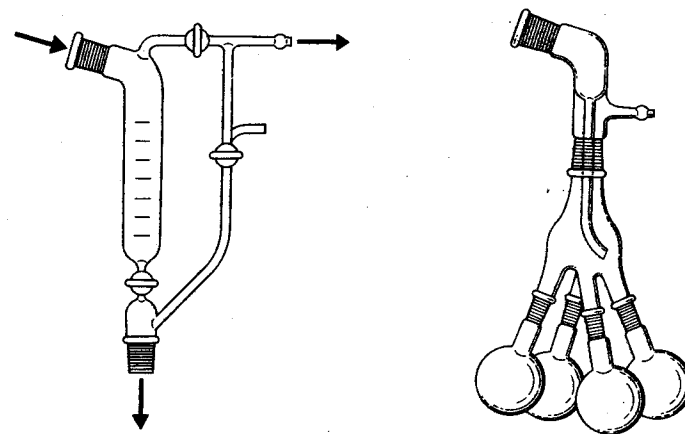


Рис. 1.3.2/9. Насадка Аншюца — Тиле

Рис. 1.3.2/10. Насадка для перегонки в вакууме

Область применения

Перегонка веществ с температурой кипения выше 150°C .
Перегонка веществ, разлагающихся при простой перегонке.
Перегонка в атмосфере инертного газа.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 1.3.1.

1.3.3. ПЕРЕГОНКА В ПРОТИВОТОКЕ (РЕКТИФИКАЦИЯ)

Ректификацией называется процесс перегонки, при котором часть конденсата находится в постоянном контакте с парами вещества, в результате чего между ними устанавливается равновесие. При этом удается разделить вещества с очень близкими температурами кипения.

Физические основы метода

Принцип противоточной перегонки наглядно показан на диаграмме кипения (рис. 1.3.3/1) на примере смеси циклогексан — толуол. По диаграмме можно определить температуру кипения смеси при любом соотношении обоих компонентов. Например, смесь, содержащая 25% циклогексана и 75% толуола (даны мольные проценты), имеет температуру кипения 100°C (точка A), в то время как пары этой смеси при той же температуре содержат 57% циклогексана (точка B). Это максимальное разделение, которого можно достичь при помощи обычной перегонки. Для получения чистого циклогексана требуется многократное повторение перегонки. Если теперь сконденсировать пары в точке B, то получают жидкость состава C, которая кипит при 90°C . Если перегонять конденсат состава C, то в паровой фазе доля циклогексана составит 85% (точка D). Последовательное многократное повторение этого процесса (точки E, F и т. д.) осуществляется в ректификационной колонке. При равновесной дистилляции

Рис. 1.3.3/1. Диаграмма кипения смеси циклогексан — толуол:

1 — паровая фаза; 2 — жидкая фаза; на оси абсцисс в верхней строке — содержание циклогексана в смеси; в нижней строке — содержание толуола в смеси [Fieser L. F., Williamson K., Organic Experiments, Heath, Lexington/MA 1979, p. 17]

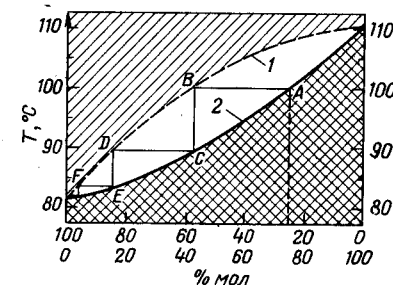
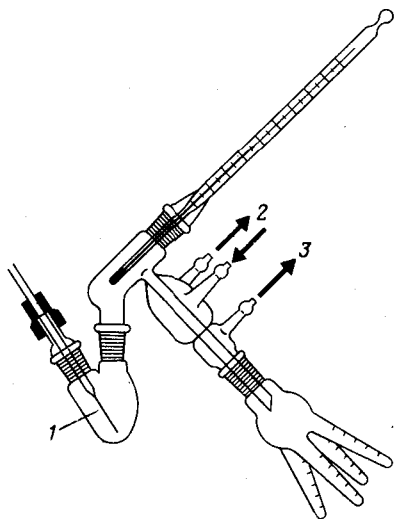


Рис. 1.3.2/11. Прибор для перегонки в вакууме небольших количеств веществ:
1 — капилляр; 2 — подача холодной воды;
3 — к вакуумному насосу [Fieser L. F., Williamson K., Organic Experiments, Heath, Lexington/MA 1979, p. 381]



Перегонка небольших количеств (от 10 мг до 2 г) осуществляется в специальном приборе. Его применение позволяет уменьшить потери вещества при перегонке (рис. 1.3.2/11).

Порядок выполнения операций (Надеть защитные очки!)

Перед началом работы проверяют надежность (герметичность) прибора.

Вещество помещают в колбу и вставляют керн с капилляром. Систему вакуумируют, нагревают, убеждаются в стабильности вакуума на основании показаний манометра.

По окончании перегонки выключают нагрев, дают прибору остыть и медленно подают воздух в прибор.

При перегонке в атмосфере инертного газа прибор несколько раз вакуумируют, а затем заполняют его инертным газом (азотом, аргоном, двуокисью углерода).

Источники ошибок

Прибор негерметичен, так как шлифы загрязнены или неправильно смазаны (после нанесения смазки шлиф должен быть прозрачен).

Температура кипения вещества слишком низкая (температура кипения вещества при нормальном давлении должна быть не ниже 150°C).

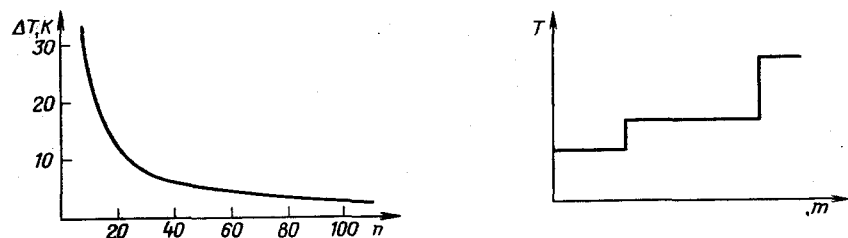


Рис. 1.3.3/2. График для определения числа теоретических тарелок n , необходимого для разделения веществ с разными ΔT

Рис. 1.3.3/3. Регистрация процесса ректификации хорошо разделяющейся трехкомпонентной смеси (m — объем дистиллята; ступени на графике соответствуют температуре кипения и получаемому объему каждого компонента смеси)

(см. разд. 1.3.1 и 1.3.2) происходят только однократное испарение и конденсация вещества.

Эффективность таких колонок описывается числом теоретических тарелок и зависит от площади контакта между двумя фазами. Число теоретических тарелок примерно соответствует числу простых перегонок, необходимых для достижения того же эффекта разделения, который достигается перегонкой на ректификационной колонке. Условием высокой эффективности ректификации является более интенсивный массо- и теплообмен, благодаря которому может достигаться равновесие между паровой и жидкой фазами. Число необходимых теоретических тарелок для получения дистиллята с предельным содержанием примесей 1% в зависимости от разности точек кипения компонентов можно определить по графику (рис. 1.3.3/2). График на рис. 1.3.3/3 иллюстрирует случай хорошего разделения компонентов смеси.

Приборы

Для проведения процесса ректификации используется стандартный прибор для перегонки (см. рис. 1.3.1/4 и 1.3.2/4), однако между круглодонной колбой и насадкой помещают *ректификационную колонку* (рис. 1.3.3/4), необходимую для увеличения поверхности контакта паров с жидкостью.

В лабораториях чаще всего используют колонку Вигре (см. рис. 1.3.3/4). Она представляет собой елочный дефлегматор высотой 20—30 см, помещенный в стеклянную трубку («рубашку»). Пространство между обеими трубками вакуумировано, что способствует лучшей теплоизоляции колонки. Разделение в колонках ведут в адиабатических условиях, поэтому часто дополнительно «рубашку» изолируют такими материалами, как алюминиевая фольга или асбестовый шнур. Колонка Вигре применяется при

Рис. 1.3.3/4. Стандартный прибор для проведения процесса ректификации

разности температур кипения 15—20 °С. При меньшей разнице температур кипения используют колонки со специальными наполнителями или колонки специальной конструкции. Различные типы ректификационных колонок и наполнителей (таких, например, как кольца Рашига) изображены на рис. 1.3.3/5.

Для ректификации также используют колонки специальной конструкции (так называемые колонки с вращающейся обмоткой) (рис. 1.3.3/6), которые состоят из длинных, вертикально расположенных трубок, имеющих по всей длине ленточную обмотку из стали, платины или тефлона. Во время перегонки ленточная обмотка быстро вращается (до 3000 об/мин). Таким путем достигается перемешивание паров, что обеспечивает интенсивный массо- и теплообмен.

Порядок работы

Колонку заполняют насадкой в вертикальном положении. Ректификацию проводят практически так же, как обычную перегонку (см. разд. 1.3.1). Во время перегонки нельзя допускать слишком сильного нагрева, чтобы избежать так называемого «захлебывания» колонки.

Источники ошибок

- Неправильно выбран тип колонки.
- Повышение температуры кипения из-за разгерметизации колонки.
- Неудовлетворительная изоляция колонки.

Область применения

Разделение и очистка веществ с разницей в температурах кипения менее 40 °С.

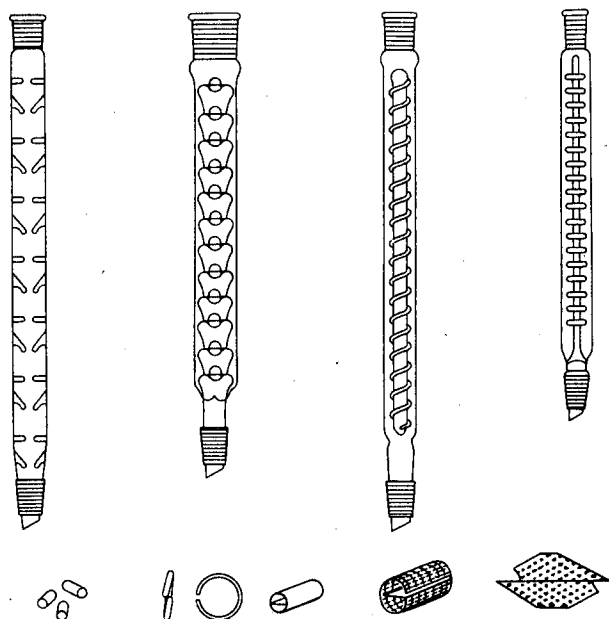


Рис. 1.3.3/5. Виды ректификационных колонок и насадок (кольца Рашига)
[Diamond P. S., Laboratory Techniques in Organic Chemistry, Butterworths,
London 1966, p. 81, 82]

Использование в тех случаях, когда обычная перегонка не приводит к удовлетворительным результатам.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 1.3.1.

1.3.4. ПЕРЕГОНКА С ВОДЯНЫМ ПАРОМ

Процесс осуществляется путем пропускания водяного пара через нагретую суспензию (эмульсию) целевого вещества в воде и применяется для перегонки нерастворимых в воде и высококипящих веществ при нормальном давлении и температуре не выше 100 °С.

Физические основы метода

Перегонка с водяным паром является особым случаем перегонки азеотропа. Метод основан на сложении давлений паров компонентов. Общее давление p бинарной смеси представляет собой сумму давлений паров обоих компонентов — p_1 и p_2 :

$$p = p_1 + p_2.$$

Смесь перегоняется при температуре, при которой суммарное давление обоих компонентов равно атмосферному. Температура

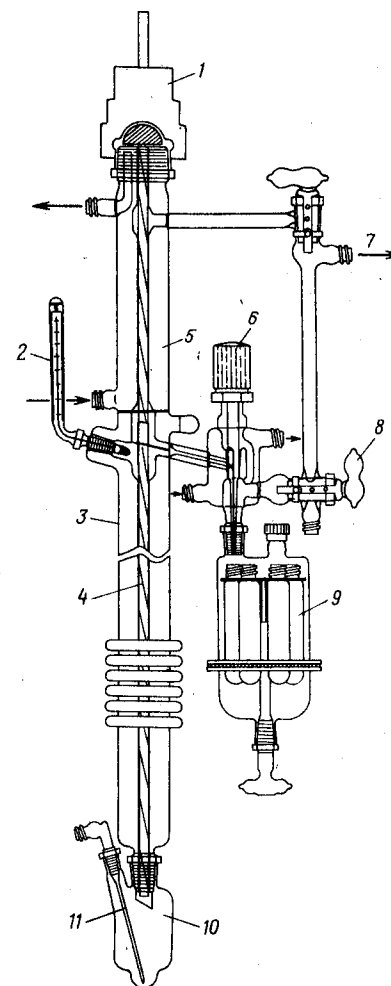


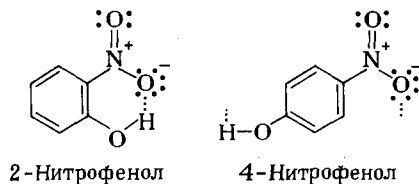
Рис. 1.3.3/6. Схема колонки с вращающейся обмоткой (Otto Tritz GmbH, Hofheim):

1 — мотор; 2 — термометр; 3 — вакуумированная рубашка; 4 — вращающаяся обмотка (тефлон); 5 — обратный холодильник; 6 — запирающий клапан; 7 — к вакуумному насосу; 8 — трехходовой кран; 9 — сменные приемники; 10 — перегонная колба; 11 — капилляр

кипения гетерогенной смеси лежит ниже температуры кипения отдельных компонентов, в то время как температура кипения гомогенной смеси находится между температурами кипения отдельных компонентов. Таким образом водонерастворимые или слабо растворимые в воде вещества становятся летучими при температурах ниже их температур кипения и могут быть выделены при помощи перегонки с водяным паром.

Эффективность метода можно продемонстрировать на примере разделения смеси 2- и 4-нитрофенолов, которые не удастся разделить другими методами. Различное положение гидроксильных групп в обоих изомерах ведет к различиям в их свойствах.

Образование внутримолекулярной водородной связи в орто-изомере повышает его летучесть с водяным паром, тогда как образование межмолекулярных водородных связей в пара-изомере уменьшает его летучесть с водяным паром.



Отношение мольных долей компонентов дистиллята пропорционально отношению давления паров обоих компонентов:

$$n_1/n_2 = p_1/p_2,$$

где n_1 и n_2 — мольные доли компонентов 1 и 2.

На практике очистка веществ данным методом требует большего количества воды по сравнению с рассчитанным, так как равновесие предполагает полную несмешиваемость обоих компонентов, а этот случай встречается крайне редко.

Вещества, способные перегоняться с парами воды, принадлежат, как правило, к следующим классам: ароматические и алифатические углеводороды, галогеноуглеводороды, спирты, альдегиды, кетоны, ненасыщенные соединения.

Приборы

Типичный прибор для перегонки с водяным паром (рис. 1.3.4/1) состоит из парогенератора с мерной трубкой, отводной трубки для подачи пара и собственно перегонного аппарата. Насадка Гопкина снижает вероятность переброса в холодильник твердых веществ или жидкой фазы.

Для перегонки полумикроколичеств веществ используется специальный прибор (рис. 1.3.4/2).

Порядок работы

Прежде всего определяют летучесть вещества с водяным паром. Для этого 0,5—1 мл (или г) образца нагревают до кипения с 2—3 мл воды в пробирке с охлаждаемым пальцем (или соединенной со второй пробиркой, охлаждаемой льдом). Помутнение конденсата свидетельствует о летучести вещества с водяным па-

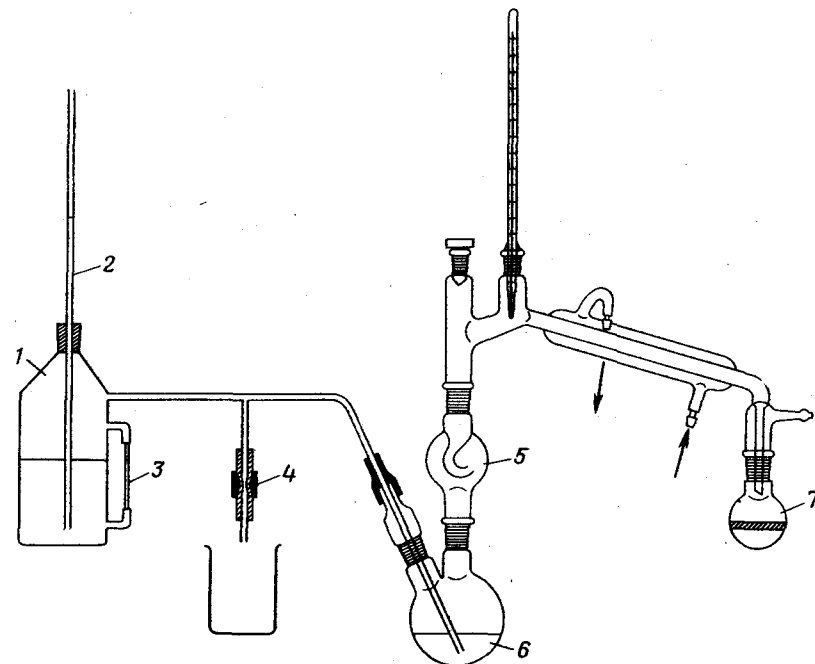


Рис. 1.3.4/1. Стандартный прибор для перегонки с водяным паром:

1 — парогенератор; 2 — трубка (для выравнивания давления); 3 — обводная трубка (для измерения уровня воды); 4 — шланг с зажимом; 5 — ловушка Гопкина; 6 — перегонная колба; 7 — приемная колба

ром. Лучше же попытаться провести перегонку в приборе для полумикроколичеств (см. рис. 1.3.4/2).

Вещество помещают в колбу с водой (в соотношении 1:1), заполняя колбу примерно наполовину.

Нагревают парогенератор и колбу; по достижении постоянного потока пара прекращают нагрев колбы, так как тепла подводящего пара достаточно для перегонки.

По окончании перегонки отсоединяют парогенератор от колбы, предварительно отключив нагрев.

Дистиллят переносят в делительную воронку, разделяют верхний и нижний слои; если вещества смешиваются с водой или образуют стабильные эмульсии, то их выделяют методом экстракции (см. разд. 1.4), а суспензии отфильтровывают на воронке.

Органический слой, содержащий целевой продукт, высушивают, растворитель упаривают в вакууме (см. разд. 1.3.2).

Область применения

Выделение, разделение и очистка веществ, плохо растворимых или нерастворимых в воде, но в то же время летучих с парами

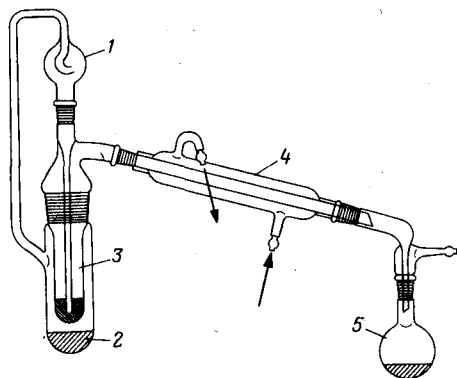


Рис. 1.3.4/2. Прибор для перегонки полумикроколичеств веществ с водяным паром:

1 — ловушка Гопкина; 2 — пробирка с водой; 3 — пробирка с веществом; 4 — холодильник; 5 — приемная колба

воды (особенно полезно в случае высококипящих и термолабильных веществ, например эфирных масел).

Избирательная перегонка из смесей веществ, летучих с парами воды.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 1.3.1.

1.4. ЭКСТРАКЦИЯ

1.4.1. ЭКСТРАГИРОВАНИЕ ТВЕРДЫХ ВЕЩЕСТВ И ЖИДКОСТЕЙ

Экстракцией называется процесс извлечения при помощи растворителя отдельных компонентов сложной смеси. При работе с твердыми образцами (тонкоизмельченным порошком) используют различную растворимость отдельных компонентов смеси, при экстракции из раствора — различное распределение компонентов смеси в двух несмешивающихся жидкостях.

Физические основы метода

Распределение веществ в двух несмешивающихся жидкостях описывается законом распределения Нернста:

$$C_v/C_n = K,$$

где C_v — концентрация вещества в верхней (более легкой) фазе; C_n — концентрация вещества в нижней (более тяжелой) фазе; K — коэффициент распределения.

Согласно закону Нернста, отношение концентраций вещества, растворенного в двух несмешивающихся, но находящихся в равновесии жидких фазах, при постоянной температуре не зависит от их абсолютных количеств и, следовательно, является величиной постоянной (коэффициент распределения K). Этот закон соблюдается только в идеальных условиях (невысокие концентрации, одинаковое агрегатное состояние молекул веществ

в обеих фазах). На практике он выполняется лишь с определенной степенью приближения.

Экстракция протекает без осложнений в том случае, когда целевое вещество хорошо растворяется в одном растворителе, а сопутствующие примеси растворяются преимущественно в другом растворителе. В зависимости от того, извлекается ли вещество из жидкой или из твердой фазы, различают и способы выполнения экстракции. Обычную экстракцию вещества из жидкой фазы используют, когда коэффициент распределения > 100 . В этом случае вещество практически целиком переходит в экстрагент в результате однократной экстракции. Здесь вполне подходит операция «встряхивание» (в делительной воронке или аппарате для встряхивания). Когда коэффициент распределения $K < 100$, простая экстракция уже недостаточно эффективна, в этом случае процесс проводят многократно, используя каждый раз чистый экстрагент. Если процесс экстракции необходимо повторить несколько раз, целесообразно использовать специальные приборы для непрерывной экстракции.

На практике чаще всего приходится иметь дело со смесями, компоненты которых имеют близкую растворимость (близкие коэффициенты распределения). Чем меньше различаются их коэффициенты распределения, тем труднее разделить эти вещества путем выполнения обычного «встряхивания», так как каждый раз будет происходить лишь небольшое обогащение экстракта одним веществом по отношению к другому. Возможность разделения двух веществ определяется различием коэффициентов распределения. Мерой возможности разделения двух веществ служит фактор разделения:

$$\beta = K_1/K_2,$$

где всегда $\beta \geq 1$.

Два вещества удовлетворительно разделяются встряхиванием только в том случае, если $\beta \geq 100$. Для разделения смесей с $\beta < 100$ необходимо многократное повторение операции (см. разд. 1.4.2).

При любом способе экстракции процесс распределения вещества протекает лишь на границе фаз, и, следовательно, для достижения равновесного состояния необходимо обеспечить максимальную площадь контакта. Для этого жидкие фазы встряхивают или пропускают через пористую пластинку, а твердые образцы перед экстракцией измельчают в тонкий порошок. Большая площадь контакта двух фаз характерна для распределительной хроматографии (см. разд. 2.1.2). Однако этот метод применяют успешно лишь для разделения небольших количеств вещества.

Экстрагирование твердых образцов

Экстрагирование проводят в аппарате Сокслета (рис. 1.4.1/1, а). Экстрагирование ведут легкокипящими растворителями (например, петролевым эфиром, дихлорметаном, четыреххлористым углеродом или ацетоном), которые нагревают в круглодонной колбе до кипения (электрическая баня, песчаная баня). Пары проходят через отводную трубку 1 в холодильник Димрота, где конденсируются. Конденсат стекает во вкладыш — патрон из фильтровальной бумаги (в аппарате Сокслета) или на пористую пластинку (в трубке Тиле), где находится экстрагируемый образец. При омывании образца растворителем осуществляется собственно экстракция растворимых компонентов. При этом объем жидкости в аппарате Сокслета увеличивается до тех пор, пока верхний уровень не достигает перегиба сливной трубки, после чего жидкость сливается из насадки вместе с экстрагируемым веществом. Необходимо, чтобы верхний уровень вкладки (патрона) на несколько миллиметров превышал перегиб сливной трубки, так как в противном случае возможно вымывание экстрагируемого материала при сливе. На практике экстрагирование проводят в периодическом режиме.

Экстракция плохо растворимых веществ проводится в аппарате Сокслета специальной конструкции — аппарате для горячего экстрагирования (см. рис. 1.4.1/1). От аппарата Сокслета он отличается наличием так называемой «рубашки», по которой поднимаются пары растворителя. Таким образом, образец все время оmyвается парами растворителя. Свойства выбранного растворителя определяют температуру, при которой происходит экстракция.

Непрерывное экстрагирование проводят в трубке Тиле (рис. 1.4.1/2). В ходе процесса через двухпозиционный кран отбирают пробу (например, для анализа или с целью сохранения термолabile веществ).

Экстрагирование жидкостей

Экстрагирование проводят в делительной воронке. Воронку заполняют на $\frac{2}{3}$ ее объема. При этом $\frac{1}{3}$ объема жидкости составляет растворитель — экстрагент. Например, 200 мл раствора вещества (обычно в воде) и 100 мл растворителя — экстрагента, составляющие в сумме 300 мл, должны встряхиваться в делительной воронке объемом 500 мл.

При использовании легколетучих и легковоспламеняющихся растворителей диэтилового эфира, этилацетата, бензола вблизи места проведения работ не должны находиться горелки с открытым пламенем или включенные нагревательные приборы. Так как некоторые растворители к тому же токсичны или являются канцеро-

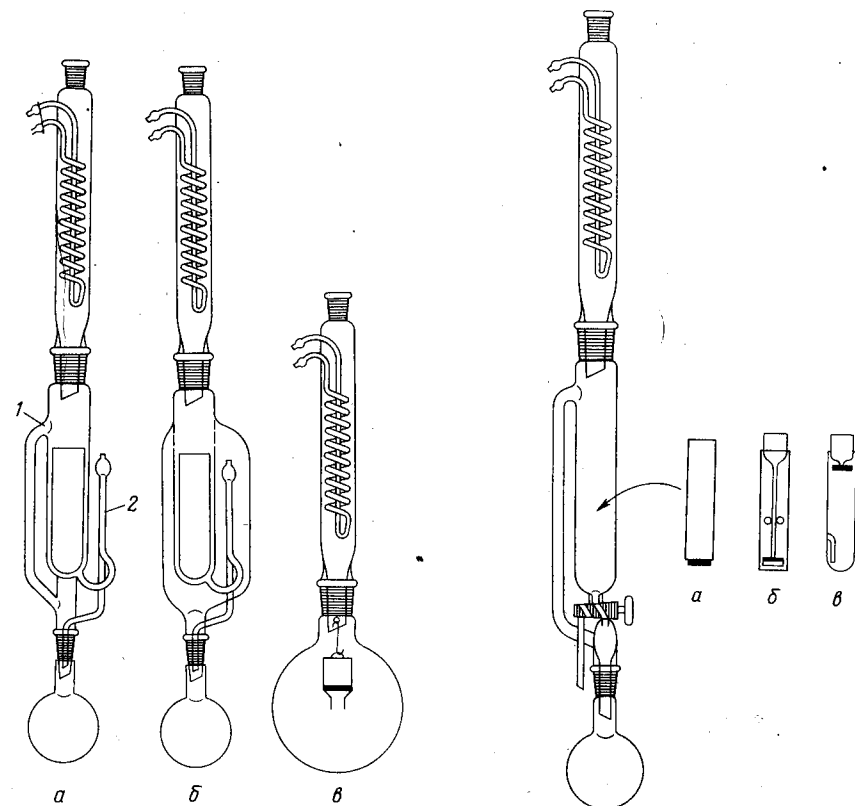


Рис. 1.4.1/1. Приборы для экстрагирования твердых веществ:

а — аппарат Сокслета; б — аппарат для горячего экстрагирования; в — аппарат для экстрагирования небольших количеств веществ; 1 — обводная трубка; 2 — сливная трубка

Рис. 1.4.1/2. Прибор для экстракции с трубкой Тиле и различными вкладышами:

а — пористый стеклянный фильтр для твердых веществ; б — вкладыши для экстракции раствора более легким растворителем; в — вкладыши для экстракции раствора более тяжелым растворителем

генами, работать необходимо при включенной вытяжной вентиляции в вытяжном шкафу.

Если коэффициент распределения целевого вещества $K < 20$, экстракцию проводят в непрерывном режиме методом барботажа. В этом случае целевое вещество может быть проэкстрагировано небольшим объемом растворителя. В зависимости от плотности используемых растворителей применяют барботеры различного типа (рис. 1.4.1/2, б и 1.4.1/3). Растворитель непрерывно испаряется в круглодонной колбе (электрическая или песчаная баня) и конденсируется в холодильнике Димрота. Конденсат про-

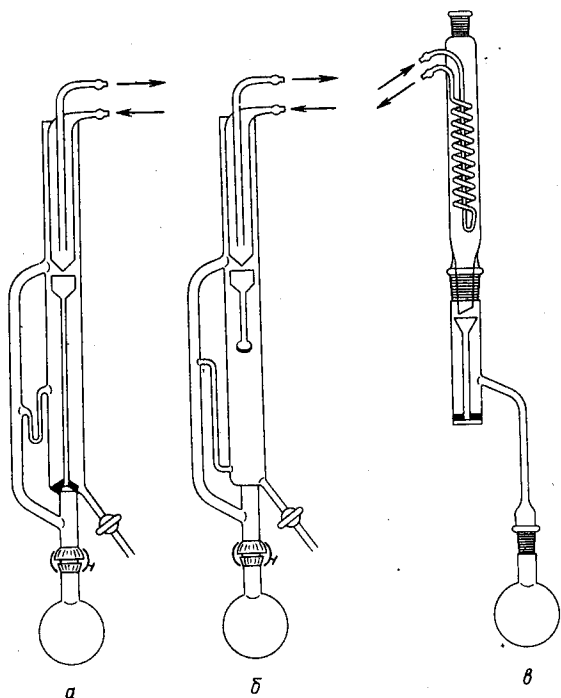


Рис. 1.4.1/3. Барботеры для экстрагирования:

а — более легким растворителем; *б* — более тяжелым растворителем; *в* — полумикро-барботер Кучера — Штейделя (для экстракции легким растворителем, существуют также барботеры аналогичной конструкции для экстракции больших объемов)

ходит через пористую пластинку, в виде мелких капелек барботирует через экстрагируемый раствор, обогащая растворимыми компонентами, и через сливную трубку вновь возвращается в колбу.

Порядок работы

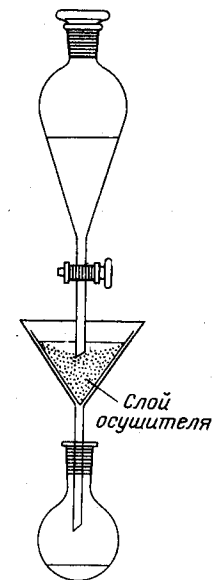
Экстрагирование твердых образцов. Работа с аппаратом Сокслета несложна и требует только осторожного обращения с экстрактором при сборке и разборке аппарата.

Экстрагирование жидкостей. В простейшем случае экстрагирование из раствора проводят в делительной воронке.

Кран делительной воронки необходимо смазать несколькими каплями растворителя для экстракции или воды, но не смазкой. Смазку для шлифов в данном случае использовать не рекомендуется, так как она будет растворяться в органическом растворителе и тем самым загрязнять раствор целевого вещества.

После заполнения воронки верхнее горло закрывают пробкой и воронку легко встряхивают. При этом обычно в воронке возникает

Рис. 1.4.1/4. Высушивание органических растворителей фильтрованием через слой осушителя



небольшое избыточное давление паров растворителя. Для удаления паров растворителя воронку переворачивают сливом вверх и медленно открывают кран, при этом второй рукой удерживают пробку. Кран закрывают, воронку встряхивают в течение 1 мин и вновь повторяют операцию удаления паров.

Для разделения фаз вставляют воронку в кольцо штатива, вытаскивают пробку и оставляют воронку в покое до полного расслоения фаз.

Нижнюю фазу осторожно сливают через кран, верхнюю фазу сливают через горло воронки.

Экстрагирование повторяют трижды. Затем объединенные органические экстракты не менее трех раз промывают водой, контролируя значение pH.

Органическую фазу высушивают, медленно пропуская через слой сульфата натрия или другого осушителя, помещенного в воронку для обычного фильтрования (рис. 1.4.1/4). Раствор вытекает из закрытой сверху делительной воронки в заполненный осушителем фильтр до тех пор, пока конец воронки не окажется ниже уровня жидкости на фильтре; в этот момент раствор прекращает поступать на фильтр. Как только уровень жидкости на фильтре понизится и воздух попадет в делительную воронку, раствор снова начинает вытекать на фильтр. Процесс повторяется периодически, пока вся жидкость не отфильтруется и одновременно не высушится. В конце процесса осушитель обязательно промывают чистым органическим растворителем во избежание довольно значительных потерь целевого вещества за счет адсорбции его осушителем. Растворитель упаривают на роторном испарителе, остаток очищают путем перегонки, кристаллизации или хроматографии.

Источники ошибок

При экстрагировании

Высокие потери вещества в процессе встряхивания с растворителями. Рекомендации: многократное встряхивание с небольшими

порциями растворителя эффективнее, чем однократная экстракция большим объемом растворителя*.

Длительное расслоение при близкой плотности фаз. Рекомендации: если органическая фаза легче воды, в водную фазу добавляют хлорид натрия, если органическая фаза тяжелее воды, ее следует разбавить чистым растворителем.

Образование эмульсий. Рекомендации: делительную воронку осторожно покачивают, а затем ее выдерживают длительное время с целью лучшего расслоения; иногда фазы расслаиваются быстрее, если отфильтровать всю смесь.

Повышенное избыточное давление в делительной воронке. Возникает за счет выделения CO_2 , если водную кислотную фазу промыть содой или водную щелочную (карбонатсодержащий раствор) кислотой. Рекомендации: воронку осторожно встряхивают в перевернутом состоянии и с открытым краном (!); после полной нейтрализации кислоты (основания), убедившись в прекращении выделения CO_2 , кран закрывают и продолжают встряхивание.

При барботировании

При экстракции растворителем меньшей плотности уровень нижней фазы должен находиться ниже уровня сливной трубки, так как при нагревании фазы увеличиваются в объеме (рис. 1.4.1/4, а).

При экстракции растворителем большей плотности вначале вносят достаточный объем экстрагента, а затем прибавляют экстрагируемый раствор (рис. 1.4.1/4, б).

Область применения

Экстракция веществ из твердых органических и неорганических смесей.

Экстракция веществ из органических жидкостей водой (или наоборот) при обработке продуктов синтеза или при подготовке образцов для количественного анализа.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 1.4.2.

* Преимущество многократной экстракции небольшими порциями растворителя объясняется следующим образом: допустим, вещество растворяется в воде с концентрацией 1 моль/л, а в органическом растворителе — в 10 раз лучше. После однократной экстракции равным объемом органической фазы его концентрация в воде составит $1/10$, после трехкратной экстракции — $1/1000$. Если вместо этого провести один раз экстракцию трехкратным объемом органической фазы, то конечная концентрация в водной фазе будет составлять всего $1/30$ от исходной. Иными словами, трехкратная экстракция небольшими порциями в этом случае была бы в 33 раза эффективнее.

Многоступенчатым распределением называется процесс экстракции с многократной и автоматической заменой фаз. Наиболее известным вариантом многоступенчатой экстракции является противоточное распределение по Крейгу.

Физические основы метода

Обычная экстракция имеет смысл лишь в том случае, если целевое вещество намного лучше растворяется в одной фазе по сравнению с другой. При этом недостаточно, чтобы целевое вещество имело высокий коэффициент распределения. Коэффициенты распределения примесей должны значительно отличаться от коэффициента распределения целевого вещества, для того, чтобы обеспечивался высокий фактор разделения $\beta \gg 10$ (см. разд. 1.4.1).

Если $\beta < 10$, проблему разделения решают при помощи многоступенчатой экстракции: однократное извлечение повторяют несколько раз посредством смещения верхней и нижней фаз друг относительно друга. Вначале экстрагент (обычно это верхняя фаза) контактирует с нижней фазой (частичное извлечение), после чего переносится во вторую ячейку, где вступает в контакт со свежей порцией нижней фазы; соответственно нижняя фаза в первой ячейке вступает в контакт со свежей порцией верхней фазы. Однократная экстракция и многократное распределение находятся в таком же соотношении, как обычная перегонка и ректификация в колонках (см. разд. 1.3).

Разработано множество вариантов противоточного распределения. Одни из них основаны на принципе ступенчатого переноса фаз («распределение по Крейгу»), другие — на принципе непрерывного переноса фаз («распределение по О'Кифу»). Исходная смесь может полностью загружаться в систему в начале процесса или добавляться по частям при выполнении каждого цикла.

На рис. 1.4.2/1 представлены результаты распределения вещества после 8 циклов, причем растворимость вещества в верхней и нижней фазах одинакова ($K=1$). График распределения симметричен, и при достаточно большом числе циклов ($n \rightarrow \infty$) он приобретает вид гауссовой кривой. Рассчитанные кривые распределения двух веществ с $K=3$ и $K=1/3$ изображены на рис. 1.4.2/2. Экспериментальная кривая распределения совпадает с суммарной кривой, полученной при сложении этих двух графиков. В данном случае $\beta=9$, т. е. оба вещества достаточно хорошо разделяются при проведении 8 циклов.

Расчет распределения по Крейгу менее трудоемок, чем расчет распределения по О'Кифу. По данным экспериментальной кривой распределения можно вычислить коэффициент распределения

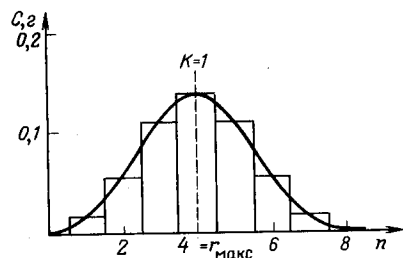


Рис. 1.4.2/1. График распределения вещества (количество вещества — 1 г; $K=1$; $n=8$; $r_{\text{макс}}=4$)

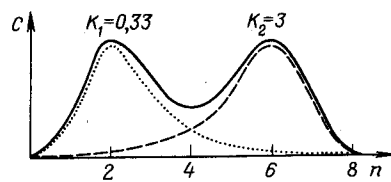


Рис. 1.4.2/2. Кривые распределения:

точечная линия — вещества с $K_1=1/3$; пунктирная линия — вещества с $K_2=3$; сплошная линия — смеси обоих веществ (получается путем сложения кривых индивидуальных веществ)

отдельных компонентов смеси по приближенной формуле:

$$K = (r_{\text{макс}} + 0,5) / (n - r_{\text{макс}} + 0,5),$$

где K — коэффициент распределения; $r_{\text{макс}}$ — номер ячейки с максимальной концентрацией вещества; n — число циклов.

В случае, если коэффициенты распределения известны, можно:

1) рассчитать положение пика целевого вещества после любого числа циклов по приближенной формуле:

$$r_{\text{макс}} = nK / (K + 1);$$

2) по таблицам [2] определить количества вещества в каждой ячейке при любых значениях K после n циклов, т. е. рассчитать график распределения;

3) сравнить рассчитанный и экспериментальный графики распределения. Если оба графика точно совпадают, то велика вероятность того, что исследователь имеет чистое вещество. Маловероятно, чтобы два вещества имели идентичные коэффициенты распределения.

По данным табл. 1.4.2/1 можно оценить, сколько циклов необходимо выполнить, чтобы при определенном значении фактора разделения β достичь, например, 99%-го или 90%-го разделения.

Приборы

Непрерывное распределение. Прибор, изображенный на рис. 1.4.2/3, позволяет выполнять как непрерывную, так и ступенчатую противоточную экстракцию.

Колонка для расслаивания фаз состоит из множества отдельных ячеек. Ячейки отделяются друг от друга подвижными тефлоновыми перегородками. Мешалки из тефлона, помещенные в каждую ячейку, закреплены на валу, проходящему вдоль всей ко-

Таблица 1.4.2/1. Взаимосвязь между фактором разделения β , числом рабочих циклов и выходом целевого вещества

β	Число рабочих циклов при различном выходе очищенного целевого вещества, %								
	99,7	99,0	97,5	95,0	90,0	80,0	70,0	60,0	50,0
11,0	22								
10,0	24								
9,0	27	21							
8,0	30	24	21						
7,0	35	28	24	21					
6,0	42	33	28	25	21				
5,0	53	42	36	32	27	22			
4,5	61	48	41	36	31	25	21		
4,0	72	57	49	43	37	29	25	21	
3,5	89	70	60	53	45	36	31	26	22
3,0	116	92	79	70	59	48	40	34	29
2,7	143	113	97	86	73	59	49	42	36
2,4	185	146	126	111	94	76	64	55	46
2,2	229	181	155	137	117	94	79	67	57
2,0	292	230	198	175	149	120	101	86	72
1,9	346	274	236	208	177	142	119	102	87
1,8	413	326	281	248	211	169	143	121	103
1,7	508	401	345	305	259	208	175	149	127
1,6	649	512	441	389	331	266	224	191	162
1,5	872	689	593	523	445	357	301	256	218
1,4	1 268	1 096	867	760	646	520	436	372	317
1,3	2 023	1 804	1 428	1 253	1 064	857	722	615	523
1,2	4 286	3 741	2 961	2 598	2 206	1 777	1 495	1 274	1 083
1,1	15 652	13 700	10 841	9 509	8 078	6 504	5 473	4 662	3 966

лонки. При повороте вала перегородки одновременно поворачиваются и ячейки открываются. Таким образом осуществляется перенос фаз. Вещества подаются в колонку при помощи мембранного насоса.

Ступенчатое распределение по Крейгу. В ячейках, изображенных на рис. 1.4.2/4, выполняются четыре рабочие операции: перемешивание (встряхивание), установление равновесия, расслаивание фаз, перенос верхней фазы. Секции ячеек соединены между собой тефлоновым шлангом. Каждая ячейка имеет пробку со сферическим шлифом с зажимом. Когда ячейки находятся в положении, изображенном на рисунке, верхняя и нижняя фазы располагаются в основных (рабочих) трубках и перемешивание осуществляется покачиванием вдоль продольной оси (направление движения показано стрелкой). После разделения фаз трубки приводятся в вертикальное положение, нижняя фаза при этом остается в рабочей трубке, а верхняя фаза переносится в промежуточную трубку. После возвращения системы в горизонтальное положение верхняя фаза перетекает в соседнюю ячейку (на рис. 1.4.2/4 слева направо).

В зависимости от числа ячеек в приборе возможно проведение

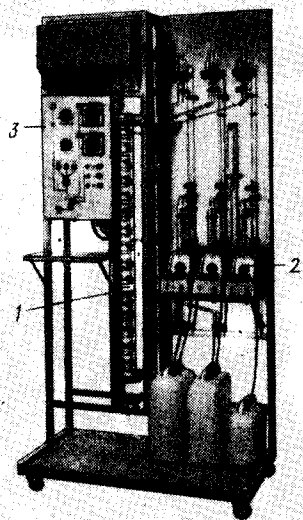


Рис. 1.4.2/3. Прибор для непрерывной и ступенчатой противоточной экстракции:
1 — колонка для расслаивания фаз; 2 — мембранный насос; 3 — блок управления колонкой (во взрывобезопасном исполнении)

от 70 до 280 циклов. Число рабочих циклов можно увеличить, отбирая только верхнюю фазу или работая в циклическом режиме. Работа в циклическом режиме целесообразна в тех случаях, когда разделению подвергаются вещества с небольшими значениями факторов разделения, при этом достигается значительная экономия растворителя по сравнению с методом отбора верхней фазы.

Емкость прибора определяется объемом ячеек. Наиболее распространены ячейки с объемами верхней и нижней фаз 2, 10 или 50 мл. В лаборатории обычно используют ячейки с объемом фаз по 2 мл. Современные приборы оснащены двумя рядами ячеек, которые могут располагаться не только друг под другом, но и параллельно на одном уровне. Таким образом, емкость каждой установки удваивается.

Подготовка эксперимента (выбор системы фаз)

Основным условием эффективного разделения является правильный выбор системы растворителей. Применять можно только такие растворители, которые плохо смешиваются друг с другом (см. разд. 4). Часто используют многокомпонентные смеси, причем добавление кислот или оснований (например, уксусной кислоты или аммиака) в значительной степени влияет на растворимость ионных соединений в обеих фазах.

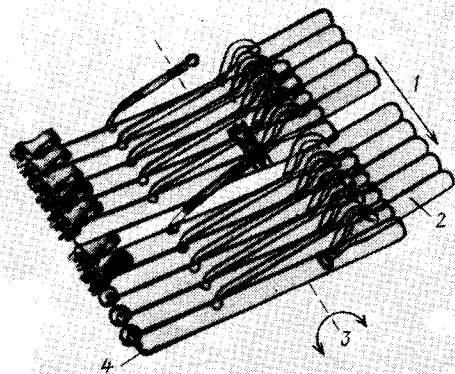


Рис. 1.4.2/4. Секция ячеек для противоточного распределения (Labortec, Bubendorf/Schweiz):

1 — направление перемещения верхней фазы (по цепи ячеек); 2 — промежуточная камера ячейки; 3 — ось вращения; 4 — рабочая камера ячейки

В предварительном опыте небольшое количество вещества (мг) встряхивают в пробирке с wybranными растворителями (по 1 мл каждой фазы), после чего определяют концентрацию вещества в обеих фазах. Для этого существует несколько методов:

тонкослойная хроматография (см. разд. 2.2.2); метод особенно пригоден при анализе смесей;

поглощение в УФ-области спектра (см. разд. 3.4.1), определение коэффициента экстинкции при характеристических длинах волн; области поглощения компонентов смеси не должны заметно перекрываться;

упаривание обеих фаз; дает точное представление об общем количестве вещества в каждой фазе, однако не позволяет получить никакой информации о распределении отдельных компонентов.

На основании полученных данных о концентрации веществ в каждой фазе рассчитывают коэффициент распределения (см. разд. 1.4.1). Изменение состава фаз проводят, исходя из данных элюотропного ряда (см. разд. 4.1), а также руководствуясь следующими общими положениями:

подобное растворяется в подобном, т. е. хорошей растворимости следует ожидать, когда растворитель и разделяемые вещества близки по своим химическим свойствам;

большая разница плотностей верхней и нижней фаз способствует быстрому расслоению, что позволяет значительно сэкономить время;

не следует применять смеси растворителей, склонных к образованию эмульсий;

низкие температуры кипения растворителей позволяют упаривать растворы в более мягких условиях.

Порядок работы

Заполняют емкость или склянку Мариотта (рис. 1.4.2/5) нижней фазой. В автоматическом режиме вносят нижнюю фазу в ячейки прибора, причем склянка Мариотта должна быть плотно закрыта сверху. После того как число циклов вдвое превысит число ячеек, все ячейки оказываются одинаково заполненными нижней фазой.

Заполняют запасную емкость верхней фазой и проводят около 10 циклов распределения.

Растворяют исследуемую смесь в равном объеме верхней и нижней фаз (следует избегать слишком концентрированных растворов, так как в этом случае может измениться объемное соотношение фаз!).

Опорожняют пипеткой или водоструйным насосом ячейки (начиная с № 3), предназначенные для внесения исходной смеси.

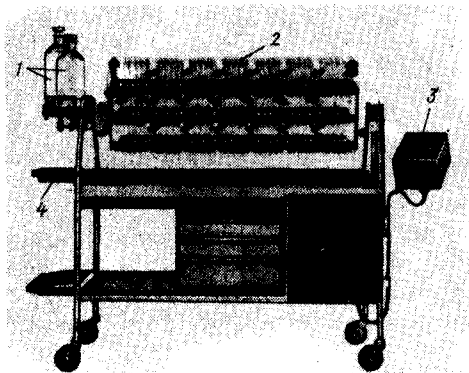


Рис. 1.4.2/5. Аппарат для противоточного распределения (по Крейгу):

1 — емкость для верхней и нижней фаз (иногда используется склянка Мариотта); 2 — секции ячеек; 3 — блок управления. (во взрывобезопасном исполнении); 4 — поддон

Вносят в пустые ячейки равные объемы верхней и нижней фаз с исходной смесью. Для этого можно воспользоваться склянкой с дозирующей насадкой.

Выполняют один цикл вручную. После этого устанавливают режим работы: интенсивность перемешивания, продолжительность перемешивания, продолжительность расслаивания и выполняют 10 циклов в автоматическом режиме.

После успешного выполнения 10 циклов определяют распределение компонентов смеси. По найденным концентрациям рассчитывают коэффициент распределения и факторы разделения для отдельных компонентов. По данным табл. 1.4.2/1 определяют необходимое число циклов.

После выполнения найденного числа циклов отбирают из каждой пятой ячейки микрошприцем пробу и определяют состав смеси. В первой половине ячеек отбирают пробу из нижней фазы, во второй половине — из верхней. Полученных данных, по большей части, оказывается достаточно для построения относительно точного графика распределения.

Содержимое ячеек, содержащее очищенное целевое вещество, отбирают обычным шприцем, сходные фракции объединяют и подвергают дальнейшей обработке.

После заполнения свободных ячеек нижней фазой неразделившиеся компоненты смеси подвергают дальнейшему фракционированию в циклическом режиме. При этом верхняя фаза из последней ячейки вновь направляется в первую ячейку.

По окончании работы аппарат промывают автоматически. Для этого запасную склянку заполняют ацетоном, затем водой с детергентом, дистиллированной водой и ацетоном. Количество промывной жидкости должно быть достаточным для проведения 20 циклов (через каждую ячейку). Во время процесса очистки прибор непрерывно вращается, что обеспечивает более полное промывание системы. В заключение прибор высушивают при пониженном давлении (например, с помощью водоструйного насоса).

Источники ошибок

Склянка Мариотта закрыта неплотно или неверно вставлены краны, что ведет к изменению объема верхней фазы.

Изменение температуры приводит к частичному смешиванию фаз. Если объем нижней фазы во время разделения слишком велик, то часть неподвижной (нижней) фазы переносится механически, что существенно снижает эффект разделения. Рекомендации: приготовить верхнюю и нижнюю фазы в равном объеме и непосредственно перед распределением еще раз провести уравнивание. В крайнем случае можно в нескольких местах цепи поместить «ловушки» для нижней фазы, чтобы иметь возможность при необходимости перед началом процесса производить отбор избыточного объема растворителя. Целесообразно также две первые ячейки заполнять только верхней фазой.

При определенной концентрации компонентов возможно образование эмульсий; последние чаще всего образуются на стадии перемешивания. Рекомендации: в начале эксперимента использовать более низкие концентрации веществ, для чего вносить образец сразу в несколько ячеек; интенсивность встряхивания следует уменьшить, а продолжительность расслаивания увеличить; в некоторых случаях целесообразно изменить систему растворителей.

Оформление результатов

При наличии достаточного количества экспериментальных данных можно построить график распределения (рис. 1.4.2/6). При этом на оси ординат могут быть отложены: концентрация веществ в верхней и нижней фазах; концентрация веществ в верхней или нижней фазах. Лучше всего указывать небольшие

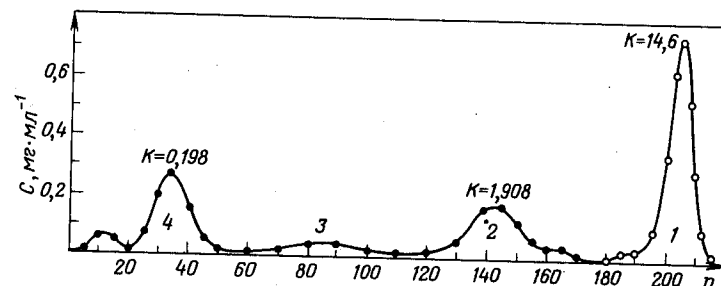


Рис. 1.4.2/6. График распределения продуктов реакции тироцидина А (250 мг) с 2,4-динитрофторбензолом в системе метанол — 0,1 н. НСl — бензол — хлороформ (23:7:20:10):

1 — тироцидин А; 2 — N-динитрофенилтироцидин А; 3 — не идентифицирован; 4 — N,O-бис(динитрофенил)тироцидин А; темные кружки — результаты анализа нижней фазы; светлые кружки — результаты анализа верхней фазы [Batterby A. R., Craig L. C., J. Amer. Chem. Soc. 74, 4023 (1952)]

значения концентрации: в первой половине ячеек определять концентрацию веществ в нижней фазе, а во второй половине ячеек — в верхней фазе.

Особенности анализа описываются в сопроводительной надписи (легенде).

Далее в рабочем журнале указываются следующие данные: состав или способ приготовления фаз; объем фаз; количество образца и объемы верхней и нижней фаз, используемые для его растворения; число циклов; температура, если процесс проводился не при комнатной температуре.

Пример оформления результатов эксперимента приведен на рис. 1.4.2/6.

Область применения

Разделение лабильных веществ следующих классов: алкалоиды, антибиотики, хиноны, порфирины, гормоны, ненасыщенные углеводороды, нуклеиновые кислоты, пептиды и протеины, стероиды, витамины, сахара.

Разделение легкоизомеризирующихся веществ (ароматизаторов).

Разделение неорганических металлокомплексов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- A. Bittel, Flüssig-Flüssig-Extraktion, Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 3. Aufl., Bd. II/1, S. 77 ff., Urban und Schwarzenberg, München 1961
E. Hecker, Verteilungsverfahren im Laboratorium, Verlag Chemie, Weinheim 1955

1.5. МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Мембранная фильтрация (см. разд. 1.2, рис. 1.2/1) — процесс селективного выделения веществ при помощи тонкоструктурированных мембран. С помощью давления или слабого вакуума можно проводить процесс в непрерывном (диафильтрация) или периодическом (ультрафильтрация) режимах.

Физические основы метода

При диафильтрации объем раствора остается постоянным вследствие непрерывной подачи растворителя, в то время как при ультрафильтрации объем раствора уменьшается и таким образом достигается концентрирование раствора. Для диафильтрации существует следующая зависимость между концентрацией и объемом:

$$\ln (C_0/C_k) = V_k/V_0,$$

где C_0 — начальная концентрация; C_k — конечная концентрация; V_k — конечный объем; V_0 — начальный объем.

В случае ультрафильтрации зависимость имеет следующий вид:

$$C_k = (V_0/V_p)^n C_0,$$

где V_p — объем после разбавления.

Мембранная фильтрация проводится под давлением, причем в большинстве случаев избыточное давление составляет 0,2—1,5 МПа. В процессе фильтрации раствор хорошо перемешивают, чтобы исключить вероятность возникновения концентрационной поляризации, т. е. образования на поверхности фильтра вторичной мембраны — пограничного слоя с более высокой концентрацией анализируемых веществ. Образование вторичной мембраны влечет за собой изменение пределов пропускания и частичный проскок целевого вещества.

Приборы

Для мембранной фильтрации используют приборы, рассчитанные на различные объемы рабочего раствора: ячейки с дисковыми мембранами и встроенными мешалками объемом 10—1000 мл (рис. 1.5/1 и рис. 1.5/2) и ячейки с мембранами в виде полых волокон, рассчитанных на объемы более 1 л (рис. 1.5/3). Для изготовления ячеек применяют инертные пластики (оргстекло, поликарбонат, тефлон и др.) и частично — нержавеющую сталь.

Мембранные фильтры представляют собой тонкие пленки с микропористым рабочим слоем, проницаемым для молекул определенных размеров. Мембраны имеют губчатую структуру с объемом пустот до 60—80% (рис. 1.5/4). Мембраны толщиной 50—250 мкм изготавливают из производных целлюлозы, полиамида, поливинилхлорида, полисульфона и тефлона. Чаще всего они построены асимметрично и состоят из высокопористой подложки, которая несет на себе тонкий рабочий слой (50—150 нм). Удерживающая способность мембран характеризуется номинальной отсекаемой мольной массой (НОММ) (на практике необходимо указывать размер глобулярных частиц, удерживаемых мембраной). Иногда эту величину ошибочно отождествляют с

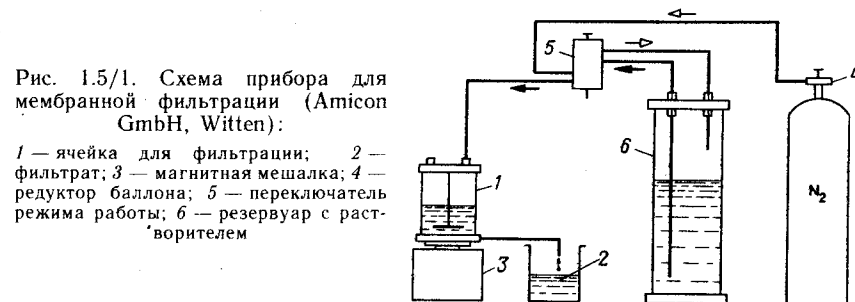


Рис. 1.5/1. Схема прибора для мембранной фильтрации (Amicon GmbH, Witten):

1 — ячейка для фильтрации; 2 — фильтр; 3 — магнитная мешалка; 4 — редуктор баллона; 5 — переключатель режима работы; 6 — резервуар с растворителем

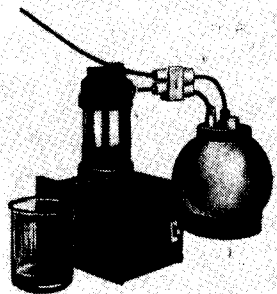


Рис. 1.5/2. Комплектный прибор для мембранной фильтрации

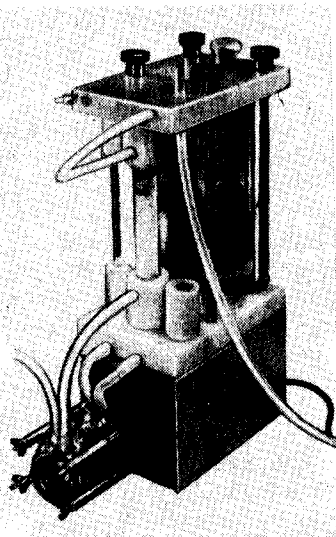


Рис. 1.5/3. Прибор для мембранной фильтрации на полых волокнах (Amicon GmbH, Witten)

размером пор мембраны. Номинальный размер означает, что на мембране удерживается лишь 90—98% вещества указанной молярной массы. Значение НОММ зависит не только от молярной массы, но и от формы и заряда молекул, а также от сорбционных свойств мембраны по отношению к целевому веществу. Приво-

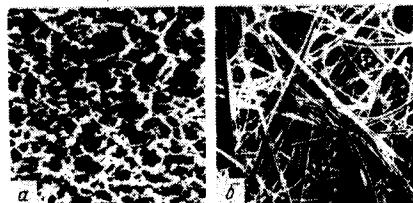


Рис. 1.5/4. Мембранный (а) и обычный (б) фильтры (Schleicher und Schüll, Dassel)

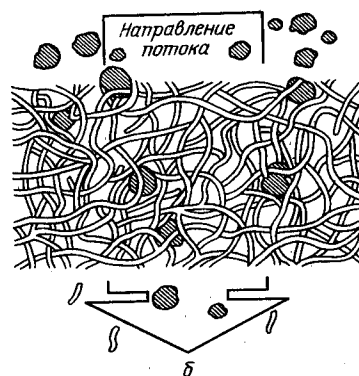
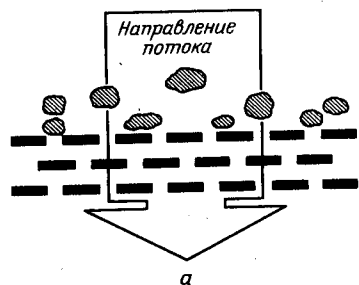


Таблица 1.5/1. Степень удерживания веществ с различными молярными массами на мембране UM-10 (Fa. Amicon) (НОММ = 10^4) при рабочем давлении 380 кПа

Вещество	Молярная масса, г·моль ⁻¹	Степень удерживания, %	Вещество	Молярная масса, г·моль ⁻¹	Степень удерживания, %
Аланин	89	0	Поливинилпирролидон К 15	10 000	80
Триптофан	204	0	Декстран Т 10	10 000	90
Сахароза	342	25	Миоглобин	18 000	95
Раффиноза	594	50	Химотрипсиноген	245 000	98
Инулин	5 000	60	Альбумин	67 000	98

димые в таблицах значения НОММ характеризуют главным образом поведение сферических незаряженных молекул. Вещества равной или большей молярной массы, молекулы которых вытянуты в длину или имеют форму статистического клубка, т. е. являются менее компактными, могут пройти сквозь мембрану.

В табл. 1.5/1 для ряда веществ приведены степени удерживания на мембране UM-10 (Fa. Amicon), НОММ = 10^4 г·моль⁻¹. В лабораториях используют мембраны с минимальной НОММ порядка 10^3 — 10^6 г·моль⁻¹. Обычные мембранные фильтры устойчивы при температурах 50—120 °С, а также в кислых и основных средах при рН от 1 до 13 (табл. 1.5/2). В зависимости от условий

Таблица 1.5/2. Совместимость мембран различных типов с общепринятыми растворителями

(а — нитроцеллюлоза; б — ацетилцеллюлоза; в — регенерированная целлюлоза; г — поли(тетрафторэтилен))

Растворитель	Тип мембраны				Растворитель	Тип мембраны			
	а	б	в	г		а	б	в	г
Ацетонитрил	—	—	+	+	Формальдегид	+	+	+	+
Водноаммиачный раствор, 1 М	+	+	+	+	Глицерин	+	+	+	+
Бензол	+	+	+	+	Гексан	+	+	+	+
Изобутанол	·	·	+	+	Едкий натр, 6 М	—	—	·	+
Хлороформ	+	—	+	+	Изопропанол	·	+	+	+
Дихлорметан	·	—	+	+	Азотная кислота, 25%-я	+	·	+	+
Диэтиловый эфир	·	·	+	·	Растворы солей	+	+	+	+
Диметилформамид	—	—	+	+	Хлороводородная кислота, 25%-я	+	+	+	+
Уксусная кислота, 10%-я	+	+	+	+	Четыреххлористый углерод	+	·	+	+
Уксусная кислота, 100%-я	—	—	+	+	Тетрагидрофуран	—	—	+	·
Этилацетат	—	—	+	+	Толуол	+	+	+	+
Этанол	—	+	+	+	Пероксид водорода	+	+	+	+

Условные обозначения:

+ — совместима; · — ограниченно совместима; — — несовместима.

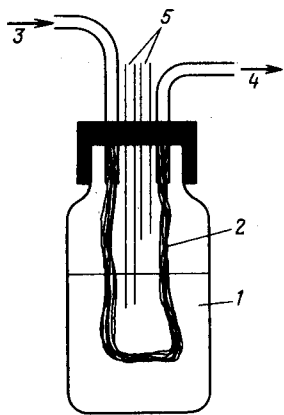


Рис. 1.5/5. Ячейка для фильтрации на полых волокнах (Spectra Por, USA):
1 — стаканчик; 2 — полые волокна; 3 и 4 — выходные трубки; 5 — дополнительные трубки

эксплуатации мембраны можно использовать 10—20 раз без заметного изменения воспроизводимости результатов. В большинстве случаев мембранная фильтрация проводится в водной среде; однако существуют мембраны для работы в органических растворителях.

Мембраны в виде полых волокон представляют собой пучки пористых капилляров с внутренним диаметром 0,2—1 мм. Они характеризуются большой рабочей поверхностью, что позволяет быстро обрабатывать большие объемы рабочих растворов (см. рис. 1.5/3). Раствор образца (рис. 1.5/5) при проведении диафильтрации помещают в стакан 1, дистиллированная вода или буфер подаются насосом в полые волокна 2 в указанном стрелками направлении (от цифры 3 к цифре 4). При ультрафильтрации в полых волокнах циркулирует рабочий раствор, а в стакане собирается фильтрат. Дополнительные вводы 5 предназначены для отбора фильтрата. Для работы с небольшими объемами растворов применяются мембраны в форме конических вкладышей в центрифужные пробирки.

С мембранными фильтрами следует обращаться крайне осторожно, так как рабочий слой легко повреждается. Рекомендации: использовать пинцеты с тупыми круглыми концами.

При использовании мембран следует руководствоваться рекомендациями фирмы-изготовителя. Общие рекомендации: мембрану следует не менее 1 ч выдерживать в дистиллированной воде, после чего несколько раз промыть водой в чашке Петри.

Условия хранения: в 10%-м этаноле, который следует заменять каждые 2—4 недели.

Стерилизация: выдерживают в 5%-м формалине или в 75%-м этаноле 24 ч, затем несколько раз промывают дистиллированной водой. Выдерживают в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

Мембраны сохраняют влажными, так как при высыхании они тотчас садятся.

Порядок работы

Приготавливают раствор вещества (рекомендуется 5—10%-я концентрация), заполняют им ячейку для фильтрации, устанавливают предохранительный клапан.

Нагнетают давление в ячейке и включают магнитную мешалку.

Фильтрацию продолжают до достижения необходимой степени концентрирования или же до полного отсутствия в фильтрате низкомолекулярных компонентов.

Следует строго придерживаться следующего правила: при диафильтрации объем фильтрата должен по крайней мере в 10 раз превышать объем исходного раствора.

После окончания фильтрации отключают мешалку, снимают давление, концентрат отбирают пипеткой. При больших объемах рекомендуется отбирать целевой раствор в круглодонную колбу с помощью вакуумного насоса.

При количественной обработке необходимо определить содержание вещества в концентрате (путем взвешивания сухого остатка, рефрактометрически, спектрофотометрически).

Источники ошибок

Слишком низкая скорость фильтрации из-за высокой концентрации исходного раствора или из-за того, что НОММ мембраны не соответствует молекулярной массе целевого вещества.

Слишком низкое давление или вакуум.

Форма и заряд молекул целевого вещества отрицательно сказываются на проницаемости мембраны (формируется прочный пограничный слой).

Оформление результатов

В рабочем журнале указывают количество вещества в концентрате в г/л или %.

Пример: выход 4,2 г (82%, $M > 10^4$, мембранный фильтр ХУ).

Можно также указать размеры мембраны, объем раствора, объем фильтрата, продолжительность процесса.

Область применения

Очистка биополимеров и синтетических полимеров от примесей.

Обессоливание растворов и замена буфера (см. разд. 2.1.5).

Концентрирование (наиболее мягкий и энергосберегающий способ удаления растворителя).

Фракционирование макромолекул (каскадный фильтр).

Применение в клиниках: подготовка анализов, концентрирование плазмы, сыворотки, мочи, суспензий вирусов.

Холодная стерилизация (стерилизующая фильтрация): большинство бактерий задерживается на мембранах с диаметром пор 0,2 мкм.

По сравнению с диализом преимуществом мембранной фильтрации являются высокая скорость и эффективность процесса, недостатком — высокая стоимость аппаратуры.

- A. R. Cooper (Hrsg.), Ultrafiltration Membranes and Applications, Plenum Press, New York, 1980
 Firmenschrift, Membranfilter-Laborkatalog, Fa. Berghof, Tübingen 1980
 Firmenschrift, Ultrafiltration — Anleitung und Katalog, Fa. Amicon, Witten 1980
 Firmenschrift, Literature References to the Use of Amicon Ultrafiltration Systems, Publ. No. 428E, Fa. Amicon, Lexington 1977
 N. Keller, Membrane Technology and Industrial Separation Techniques, Noyes, Park Ridge 1976
 R. Rautenbach und R. Albrecht, Membrantrennverfahren, Ultrafiltration, Umkehrosmose, Sauerländer, Aarau 1981
 H. Strathmann, Trennung von molekularen Mischungen mit Hilfe synthetischer Membranen, Steinkopff, Darmstadt 1979

1.6. ДИАЛИЗ И ЭЛЕКТРОДИАЛИЗ

Диализом называется процесс разделения, основанный на диффузии веществ различной молекулярной массы через полупроницаемые мембраны. Электродиализом называется разделение заряженных частиц при прохождении их через ионообменные мембраны под действием электрического поля.

Физические основы метода

Процесс разделения при диализе описывается законом диффузии Фика:

$$dm/dt = -Ddc/dx,$$

где m — количество вещества, диффундирующего в единицу времени; t — время процесса; D — коэффициент диффузии; c — концентрация; x — расстояние.

Коэффициент диффузии D зависит от площади мембраны и ее проницаемости для определенного вещества. Количество вещества, диффундирующее через мембрану в единицу времени, прямо

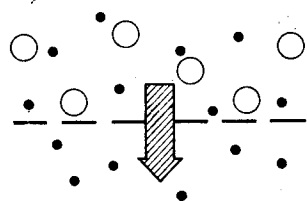
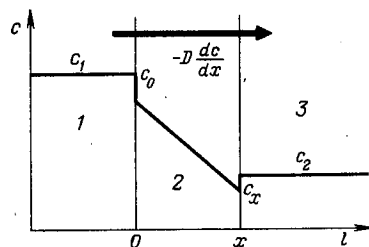


Рис. 1.6/1. Схема разделения на полупроницаемых мембранах

Рис. 1.6/2. Распределение вещества при диализе:

c_1 — концентрация в растворе образца; c_2 — концентрация в диализате; c_0 , c_x — концентрация в примембранном слое по обеим сторонам мембраны; x — толщина мембраны и примембранного слоя; 1 — образец; 2 — область мембраны; 3 — диализат



пропорционально площади мембраны и концентрационному градиенту (рис. 1.6/1 и 1.6/2).

Приборы

В лаборатории диализ проводят в диализных мешках различных размеров, приготовленных из плоских мембран или диализных трубок.

Диализные трубки имеют следующие параметры:

Ширина, мм	10—75
Диаметр, мм	6, 16, 20, 30, 50
Длина, м	10, 25

Простейший диализатор изображен на рис. 1.6/3: здесь перемешивание раствора осуществляется при помощи магнитной или механической мешалки. Более сложная установка приведена на рис. 1.6/4: здесь емкость диализных мешков составляет от 2 до 200 мл, а емкость камеры — до 10 л.

Мембраны для диализа представляют собой пленки из полимерных материалов, проницаемые для низкомолекулярных веществ (солей, аминокислот, сахаров и др.). Обычно это пленки из ацетилцеллюлозы (например, целлофан), изготовленные в виде трубочек диаметром от 3 до 50 мм и предназначенные для обессоливания веществ с молярной массой от 10^3 до $5 \cdot 10^4$ г·моль⁻¹.

Электродиализ проводят в проточном режиме в соответствии со схемой, приведенной на рис. 1.6/5. Схема лабораторного прибора для электродиализа приведена на рис. 1.6/6. Раствор образца помещают между двумя электродами, пространство между которыми разделено ионообменными мембранами двух типов. Мембраны, изготовленные из полимерных материалов (полиэфиры, полиэтилен, поливинилхлорид), несут частицы сильного катионита

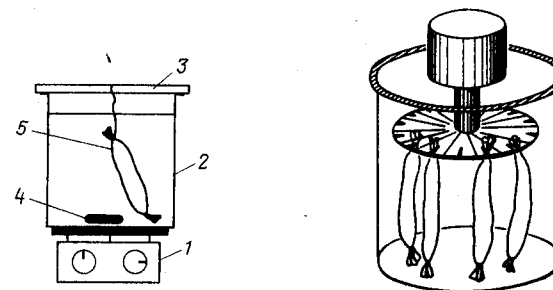


Рис. 1.6/3. Прибор для диализа (диализатор):

1 — магнитная мешалка; 2 — стакан с дистиллированной водой; 3 — стеклянная крышка; 4 — магнит; 5 — диализный мешок

Рис. 1.6/4. Диализатор для одновременной обработки множества образцов (система медленно вращается при помощи моторчика)

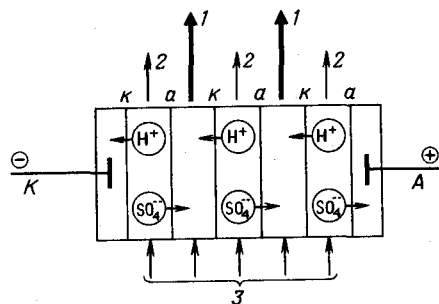


Рис. 1.6/5. Схема непрерывного процесса электродиализа питьевой воды (с целью получения деионизованной воды):

К — катод; А — анод; к — катионообменная мембрана; а — анионообменная мембрана; 1 — концентрированный раствор солей; 2 — деионизованная вода; 3 — питьевая вода

(катионообменная мембрана) или сильного анионита (анионообменная мембрана). В отличие от ионообменных смол, применяемых в хроматографии, мембраны для электродиализа не нуждаются в регенерации. Мембраны хранят во влажном состоянии.

При электродиализе процесс идет очень интенсивно, что позволяет за короткий срок обессолить большие объемы рабочего раствора.

Порядок работы

Диализную трубку необходимой длины завязывают с одной стороны узлом или перевязывают ниткой.

Перед началом диализа мешок выдерживают не менее 2 ч в воде, после чего тщательно промывают (стадия набухания пленки и удаления пластификатора).

Водный раствор целевого вещества заливают в диализный мешок и входное отверстие завязывают узлом или перевязывают ниткой.

При работе с небольшими объемами для увеличения рабочей площади рекомендуется оба конца трубки закрыть оплавленными стеклянными палочками.

Готовый мешок привязывают ниткой (длиной 5—10 см) к стеклянной палочке и подвешивают в стакане (объемом 1—5 л) (см. рис. 1.6/3).

Через некоторое время (от одного до нескольких часов) для увеличения эффективности и сокращения времени диализа заменяют воду в стакане.

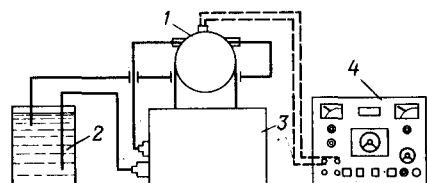


Рис. 1.6/6. Схема лабораторного прибора для проточного электродиализа (Berghof GmbH, Tübingen):

1 — пакет ячеек; 2 — рабочий раствор; 3 — насос; 4 — источник питания

Диализ ведут до исчезновения в диализате низкомолекулярных компонентов или до достижения необходимой степени очистки (общая продолжительность процесса составляет от нескольких часов до нескольких суток).

Для количественной оценки после окончания процесса содержание вещества в диализном мешке определяют взвешиванием, спектрофотометрически и т. д.

Источники ошибок

Повреждение мембраны (целостность мембраны проверяют с помощью красителей — конго красного, метиленового синего, нильского синего).

Один из концов диализного мешка плохо завязан.

Неправильно выбраны диаметр трубки и пористость мембраны.

Плохое перемешивание.

Проницаемость мембраны сильно зависит не только от молекулярной массы, но и от формы и заряда молекул.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят данные о количестве вещества в образце по завершении диализа в г/л и в % (по результатам взвешивания).

Пример: выход 4,2 г (82%, $M > 2 \cdot 10^3$, диализ, мембрана XY).

Область применения

Диализ: разделение низко- и высокомолекулярных веществ; обессоливание растворов полимеров; очистка полимеров (белков, синтетических полимеров и др.); изучение фармацевтических препаратов и биополимеров в процессе их получения.

Электродиализ: удаление солей и ионов металлов из растворов (например, из растворов белков, морской воды); коррекция pH растворов; концентрирование растворов электролитов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. I/1, S. 657, 672, Thieme, Stuttgart 1963
H. Strathmann, Trennung von molekularen Mischungen mit Hilfe synthetischer Membranen, Steinkopff, Darmstadt 1979
A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, Vol. 3, S. 313, Interscience, New York 1950
Firmenschriften, Membranfilter und Elektrodialyse, Fa. Berghof, Tübingen 1980

1.7. ЛИОФИЛИЗАЦИЯ

Лиофилизация — метод высушивания глубоко замороженных образцов путем возгонки (сублимации) воды в вакууме.

Принцип метода лиофильной сушки иллюстрирует фазовая диаграмма, приведенная на рис. 1.7/1. При температуре выше 273,16 К (0,01 °С)* вода может существовать одновременно только в жидком и газообразном состояниях. Фазовый переход из жидкого состояния в газообразное называется испарением. При температуре ниже 273,16 К вода существует только в твердом и газообразном состоянии. Фазовый переход из твердого состояния в газообразное называется сублимацией. Отрезок 220—273 К на кривой (см. рис. 1.7/1) соответствует истинному давлению пара при сублимации. Все три фазовых состояния могут существовать одновременно только при 273,16 К, поэтому эту точку называют «тройной точкой» (кружок на рис. 1.7/1). Давление паров над поверхностью льда снижается при падении температуры и при 253 К (–20 °С) составляет всего 100 Па (см. рис. 1.7/1). При удалении паров воды из пространства над поверхностью льда или замороженного раствора происходит интенсивное испарение льда. Этот процесс сопровождается потерей части энергии льдом, в результате чего температура льда снижается, и на протяжении всего периода возгонки (сублимации) образец остается в глубоко замороженном состоянии. Температура образца при этом определяется давлением пара над льдом. Для осуществления лиофилизации весьма важно, чтобы на протяжении всего процесса в установке поддерживалось низкое давление.

Низкое давление поддерживают при помощи ротационного масляного насоса. Однако этот процесс экономически нерентабелен, так как образующийся водяной пар занимает слишком большой объем**. Наиболее эффективной ловушкой паров воды служит конденсатор льда, имеющий развитую, сильно охлаждаемую поверхность. В этом случае конденсация водяных

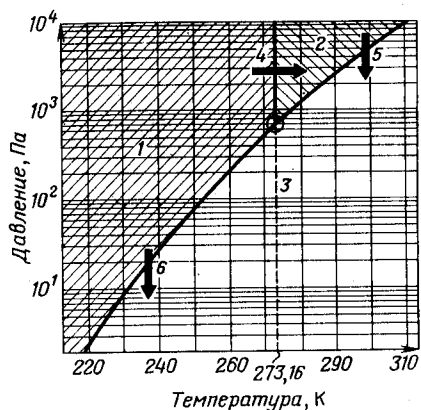


Рис. 1.7/1. Фазовая диаграмма системы лед — вода — водяной пар:

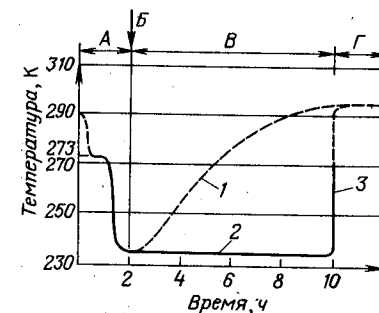
1 — твердая фаза; 2 — жидкая фаза; 3 — газообразная фаза; 4 — плавление; 5 — испарение; 6 — возгонка (сублимация).

* При нормальном давлении температура плавления льда составляет 273,15 К (0 °С).

** При 10 Па 1 г воды занимает объем равный 10 000 л.

Рис. 1.7/2. Регистрация процесса лиофилизации:

А — замораживание; Б — начало возгонки; В — возгонка; Г — окончание возгонки, подсушивание; 1 — изменение температуры в высушиваемом верхнем слое образца; 2 — изменение температуры в замороженном слое образца; 3 — изменение температуры по окончании возгонки



паров идет эффективно и давление над образцом сохраняется достаточно низким. Вакуумный насос служит только для удаления небольших количеств воздуха из образца или воздуха, просачивающегося в систему за счет отдельных неплотностей. Для поддержания необходимого давления используют также масляный насос. Процесс высушивания протекает быстро, если парциальное давление неконденсируемого газа (воздушной смеси) не превышает 100 Па. При давлении выше 100 Па молекулы воды имеют ограниченную подвижность, процесс лиофилизации затруднен. При давлении 1 Па процессы испарения воды из образца и ее конденсации в ловушке протекают равномерно.

Скорость лиофильного высушивания зависит не только от давления паров, которое должно поддерживаться на минимальном уровне. Большое значение имеет компенсация энергии, затраченной на сублимацию льда. Это обеспечивается прямым контактом, обогревом путем облучения, конверсией. Процесс лиофилизации вещества (рис. 1.7/2) подразделяется на три этапа: замораживание образца до температуры, определяемой остаточным давлением в системе; возгонка; подсушивание образца.

Основной процесс — возгонка — начинается, как только в испарителе достигается рабочий вакуум (остаточное рабочее давление). Процесс заканчивается при полном испарении льда. Подсушивание образца необходимо только в том случае, если последний имеет слишком высокую остаточную влажность, нежелательную при последующем хранении. В этом случае образец высушивают с использованием диффузионного насоса (10^{-5} Па) или над P_2O_5 в вакууме.

Приборы

Ллиофилизацию проводят в специальных приборах (рис. 1.7/3), которые состоят из нескольких функциональных блоков.

Камера для образца. Образцы размещают в лотках, чашках и др. емкостях, стоящих на полке. Полку можно нагревать (нагреватель с плавной регулировкой нагрева) или охлаждать. Камера имеет насадку («зонтик»), на которой можно разместить

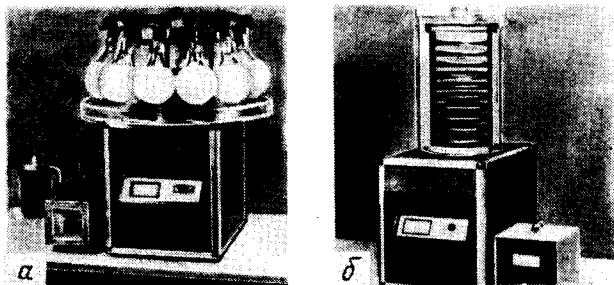


Рис. 1.7/3. Приборы для проведения лиофилизации:
а — высушивание в круглодонных колбах («зонтик»); б — высушивание в открытых сосудах (на обогреваемых полках) (Christ, Osterode/Harr)

множество круглодонных колб. Эти колбы отличаются от обычных круглодонных колб тем, что вместо конического шлифа имеют сферический внешний шлиф-кern. Такая конструкция исключает загрязнение образца вакуумной смазкой при извлечении высушенного вещества из колбы.

Конденсатор (охлаждаемая ловушка). Наиболее эффективным конденсатором водяных паров является охлаждаемая извне поверхность. От степени охлаждения конденсатора зависит парциальное давление паров воды и, как следствие, остаточная влажность препарата. Емкость конденсатора определяется площадью охлаждаемой поверхности. В зависимости от конструкции ловушки объемы высушиваемых образцов варьируются от 50 до 200 мл.

Холодильный агрегат. Только в небольших лабораторных установках конденсатор (ловушку) замораживают охлаждающей смесью — жидким азотом или сухим льдом. На предприятиях применяют холодильные агрегаты, которые делают возможным непрерывное производство. Во многих случаях используются одноступенчатые холодильники (максимальное охлаждение до 230 К). Для более глубокого замораживания используют двухступенчатые агрегаты, способные поддерживать температуру ниже 200 К. Холодильные агрегаты должны иметь достаточно высокую производительность, чтобы при высокой скорости возгонки обеспечивать быструю конденсацию и замораживание водяных паров.

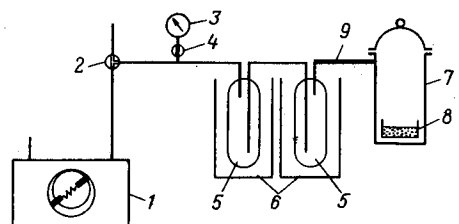


Рис. 1.7/4. Схема установки для лиофилизации:

1 — ротационный насос (остаточное давление ~ 10 Па); 2 — трехходовой кран; 3 — манометр; 4 — кран манометра; 5 — ловушка; 6 — сосуд Дьюара; 7 — вакуум-экссикатор или колба; 8 — чашка Петри (колба с образцом); 9 — широкий и короткий шланг (с внутренним диаметром 7 мм)

Вакуумный насос. Небольшое количество водяных паров не улавливается охлаждаемой ловушкой. Эти пары и всегда имеющиеся в системе сопутствующие газы должны удаляться ротационным насосом с достаточно высокой производительностью (рис. 1.7/4). Большинство установок снабжены дополнительным диффузионным масляным насосом, с помощью которого осуществляют досушивание (при отключенной ловушке) образца.

Подготовка образца

Способ замораживания и необходимая температура лиофилизации зависят от свойств высушиваемых веществ, а также от размера и формы сосуда для лиофилизации. Некоторые вещества могут быть высушены уже при 260 К, другие, с более высоким содержанием солей, при 230 К.

Образец может быть лиофилизован в круглодонных колбах или в открытых сосудах.

Колбы для лиофилизации отличаются от обычных круглодонных колб тем, что вместо конического шлифа имеют сферический внешний шлиф-кern. Такая конструкция исключает загрязнение образца вакуумной смазкой при извлечении высушенного материала из колбы.

Перед замораживанием колбу с образцом прикрывают бумажной салфеткой, чтобы воспрепятствовать уносу высушенного вещества в конденсатор.

При лиофилизации фиксируют салфетку в керне упругой пружинкой и избыточный материал обрезают (рис. 1.7/5).

В случае использования лотков, чашек, стаканчиков, пробирок салфетка прикрепляется липкой лентой. Сосуд можно также закрыть термопластичной пленкой парафильм, в которой затем продельвают сеть тонких отверстий с помощью иглы.

Замораживание образца проводят в бане с хладагентом (жидкий азот, ацетон — сухой лед) или непосредственно в камере.

Ампулы или чашки заполняют слоем раствора толщиной не более 2 см, после чего их устанавливают на полку камеры и там охлаждают до 240 К.

Круглодонные колбы с образцом вращают на рамках или валках и одновременно охлаждают. При этом раствор равномерно распределяется тонким слоем по стенкам сосудов. О полном замораживании свидетельствует потрескивание слоя льда. Различные способы замораживания приведены на рис. 1.7/6.

Порядок выполнения операций

Устанавливают сосуды и чашки в камеру. После снижения давления до 100 Па круглодонные колбы закрепляют на насадке («зонтик»).

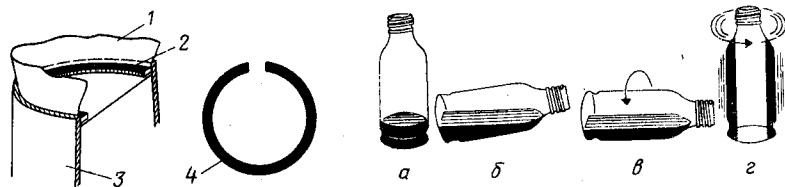


Рис. 1.7/5. Горло колбы для лиофилизации:

1 — бумажная салфетка; 2 — пружина; 3 — горло колбы в разрезе; 4 — пружина (вид сверху)

Рис. 1.7/6. Способы замораживания образца (Leybold-Heraeus, Hanan):

а — замораживание в вертикальном сосуде; б — замораживание в слегка наклоненном сосуде; в — замораживание при медленном вращении; г — замораживание при сильном вращении

Круглодонные колбы с замороженными образцами присоединяют вращательным движением к кернам «зонтика», слегка прижимают (перед этим шлиф необходимо тщательно очистить и правильно смазать), а затем открывают кран на керне. Колбы удерживаются на керне самостоятельно лишь после вакуумирования. Перед тем как присоединить очередную колбу, необходимо убедиться, что в закрепленных колбах достигнута температура возгонки, по этому признаку судят и о глубине вакуума в системе.

Начало лиофилизации можно проконтролировать через некоторое время следующим образом: при помощи запорного крана отключают камеру-испаритель от ловушки. Через некоторое время (несколько секунд) определяют уровень давления в испарителе. В начале лиофилизации давление немного повышается, или при нормальном течении процесса несколько падает и после завершения сушки практически не изменяется.

По окончании лиофилизации систему (осторожно!) разгерметизируют и разбирают. Сосуд с образцом герметично закрывают или помещают в эксикатор, поскольку тонкодисперсные лиофилизованные препараты часто бывают гигроскопичны и расплываются на воздухе.

При необходимости образец дополнительно высушивают в рабочей камере. Для этого перед включением диффузионного насоса камеру отключают от конденсатора. Менее эффективным, но более часто встречающимся приемом является подсушивание образца над P_2O_5 в вакуум-эксикаторе.

Особые случаи

Нерастворимые в воде твердые вещества методом лиофильного высушивания часто удается перевести в порошкообразное состояние. Этот прием чрезвычайно удобен при работе с ультрамикроколичеством вещества. Вначале вещество растворяют в

минимальном объеме *n*-бутанола, затем добавляют 2—3-кратный объем воды и быстро замораживают. После лиофилизации вещество представляет собой тонкодисперсный порошок.

Область применения

Мягкое высушивание лабильных веществ с сохранением их свойств (структуры, ферментативной активности, бактериостатических свойств).

Работа с ультрамикроколичествами вещества.

Возможность длительного сохранения лиофильно высушенных образцов.

Применение в области клинических исследований: препараты ферментов, бумага и трубки для тестирования, плазма крови, препараты белков, антигены, антитела, гормональные препараты.

Применение в биохимии: белки и нуклеиновые кислоты.

Применение в химии: природные вещества и полимеры.

Применение в области гигиены и бактериологии: душистые вещества, антитоксины, антитела, сыворотки, препараты для определения группы крови, бактериальные культуры.

Применение в пищевой промышленности: сублимированные продукты, такие как чай, кофе, молоко, супы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- E. Emblik*, Kälteanwendung, Braun, Karlsruhe 1971
Firmenschrift, Grundlagen der Gefriertrocknung, Leybold-Heraeus, Köln 1973
J. D. Mellor, Fundamentals of Freeze Drying, Academic Press, New York 1978

2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

2.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССА ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматографией называется процесс разделения веществ, основанный на распределении компонентов смеси между неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной) фазами. В зависимости от строения разделяемые вещества в различной степени удерживаются той и другой фазами и вследствие этого могут быть отделены друг от друга.

Под действием диффузии молекулы разделяемых веществ пересекают поверхность раздела фаз и в зависимости от свойств удерживаются той или иной фазой. При продвижении компонентов смеси в разделяющей среде такой процесс перехода между фазами осуществляется многократно, причем каждый раз достигается небольшой эффект разделения (или обогащения). Чем выше единичный эффект разделения (обогащения), тем лучше конечный результат. Чем чаще повторяется этот единичный процесс, тем выше эффект разделения, или, иными словами, выше «разрешающая способность» процесса.

В этой связи хроматографию сравнивают с фракционной перегонкой и используют понятием «теоретическая тарелка» (см. разд. 1.3.3). Однако если при фракционной перегонке для оценки эффективности ректификационной колонки достаточно понятия «число теоретических тарелок», то в хроматографии для оценки эффективности системы предпочитают пользоваться понятием «высота, эквивалентная теоретической тарелке» (ВЭТТ). ВЭТТ соответствует расстоянию между двумя соседними теоретическими тарелками. Лабораторные установки для перегонки имеют обычно 10—50 теоретических тарелок (см. разд. 1.3.3). В ТСХ — наиболее простом варианте хроматографии — используют пластинки эффективностью несколько тысяч теоретических тарелок. Современная хроматография (в частности ВЭЖХ, см. разд. 2.3.2) располагает высококачественными сорбентами, позволяющими готовить колонки эффективностью несколько десятков тысяч теоретических тарелок.

В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы различают жидкостную и газовую хроматографию (табл. 2.1/1). В хроматографии пользуются принятыми в англоязычной литературе названиями фаз — твердая и жидкая.

По механизму взаимодействия разделяемых веществ с непод-

Таблица 2.1/1. Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию подвижной и неподвижной фаз

Неподвижная фаза	Подвижная фаза	
	жидкая	газообразная
	жидкостная хроматография	газовая хроматография
Твердая	Твердо-жидкостная хроматография (ТЖХ) (адсорбционная, ионообменная, аффинная)	Газоадсорбционная хроматография (ГАХ)
Жидкая	Жидко-жидкостная хроматография (ЖЖХ) (распределительная)	Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) (распределительная)

вижной фазой жидкостная хроматография подразделяется на: адсорбционную (см. разд. 2.1.1); распределительную (см. разд. 2.1.2); ионообменную (см. разд. 2.1.3); аффинную (см. разд. 2.1.4); гель-хроматографию (см. разд. 2.1.5).

В основе газовой хроматографии лежат процессы распределения и адсорбции. Свойства подвижной фазы (газа-носителя) имеют второстепенное значение для процесса разделения. В жидкостной хроматографии процесс разделения в значительной степени определяется составом подвижной фазы. В качестве подвижной фазы используется множество веществ, поэтому для каждого специального случая можно подобрать подходящую систему разделения. ГЖХ применяют главным образом для аналитических целей, в то время как жидкостную хроматографию чаще используют для препаративных целей. По этой причине, а также вследствие возрастающего применения микроэлектроники жидкостная хроматография в настоящее время интенсивно развивается.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- H.-P. Angele (Hrsg.), Dictionary of Chromatography — English — German — French — Russian, Hüthig, Heidelberg 1984
 L. S. Ettre, A. Zlatkis, 75 Years of Chromatography — A Historical Dialogue, Journal of Chromatography Library, Bd. 17, Elsevier, Amsterdam 1979
 G. L. Hawk (Hrsg.), Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography, Chromatographic Science Series, Vol. 10, Marcel Dekker AG, Basel 1979
 G. Hesse, Chromatographisches Praktikum, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1968
 J. J. Kirkland (Hrsg.), Modern Practice of Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York 1971
 O. Mikes, Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods, Ellis Horwood, Chichester 1979
 G. Schwedt, Chromatographische Trennmethode, Thieme, Stuttgart 1979
 G. Schwedt, Chromatographische Methoden in der anorganischen Analytik, Hüthig, Heidelberg 1980
 L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York 1974
 B. L. Williams, K. Wilson, Principles and Techniques of Practical Biochemistry, 2. Aufl., Edward Arnold, London 1976

2.1.1. АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Адсорбционной хроматографией называется процесс разделения веществ, основанный на различной адсорбируемости компонентов исследуемой смеси на данном адсорбенте. В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы метод носит название твердо-жидкостной или газоадсорбционной хроматографии (см. табл. 2.1/1).

Пористые материалы обладают свойством более или менее прочно сорбировать различные вещества. Если колонку, заполненную пористым материалом *, промывают растворителем, несущим анализируемую смесь, то компоненты смеси с различной прочностью удерживаются на поверхности адсорбента (например, обесцвечивание растворов с помощью активированного угля, или использование активированного угля в качестве фильтрующего материала в противогазе).

Адсорбция является результатом проявления дисперсионных сил и сил электростатического характера.

Электростатические взаимодействия лежат в основе ионообменной хроматографии (см. разд. 2.1.3). В этом случае руководствуются закономерностями, свойственными не адсорбционной, а ионообменной хроматографии.

Адсорбенты подразделяются на полярные и неполярные. Полярные вещества сорбируются на полярных сорбентах. Затем они могут быть вытеснены с поверхности адсорбента — десорбированы — при повышении температуры (в газовой хроматографии) или с помощью полярного растворителя. В жидкостной хроматографии разделение на полярном адсорбенте называется хроматографией с нормальными фазами (НФХ). Разделение на неполярном адсорбенте называют хроматографией с обращенными фазами (ОФХ) (табл. 2.1.1/1).

Между полярной поверхностью адсорбента и полярными (или способными поляризоваться) группами или участками молекул возможно специфическое взаимодействие (диполь-дипольное или образование водородной связи). Достаточно часто высокоактивные адсорбенты обладают каталитическими свойствами и способны трансформировать вещества в процессе разделения (хемосорбция). Например, третичные спирты могут подвергать-

Таблица 2.1.1/1. Полярность сорбента, элюента и целевого вещества при различных вариантах хроматографии

Хроматография	С нормальными фазами	С обращенными фазами
Тип сорбента	Силикагель Оксид алюминия	Модифицированный силикагель, реже — производные агарозы и декстрана
Поверхность сорбента	Полярная	Неполярная
Элюент	Малополярный Неполярный	Полярный
Целевое вещество	Малополярное Неполярное	Полярное

* Другие термины: носитель, матрица.

ся дегидратации или изомеризации. Многие вещества, обычно нечувствительные к действию света, в адсорбированном состоянии разлагаются на свету. Поэтому многие адсорбенты рекомендуются использовать в частично инактивированном состоянии.

Материалы

Силикагель. Получают из золь кремневой кислоты. В зависимости от условий проведения реакции образуются нерегулярные или сферические частицы различной величины и пористости. Хроматографию при нормальном давлении обычно проводят на сорбентах с размерами частиц 40—60 мкм, хроматографию при высоком давлении проводят на сорбентах с размерами частиц 3, 5, 7, 10 мкм. Важной характеристикой сорбента наряду с размерами частиц является средний диаметр пор частиц. Обычно этот показатель включают в название сорбента, например у сорбентов Si40 и кизельгель 4000 средний диаметр пор составляет 40 и 4000 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ м}$). На кизельгеле 60 преимущественно разделяют вещества с молекулярной массой до $1000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$. На сорбентах с большими диаметрами пор разделяют биополимеры или синтетические полимеры, или же их используют в том случае, когда необходим сорбент средней активности. Наиболее известными торговыми марками сорбентов, получаемых размолотом более крупных частиц силикагеля, являются лихросорб (LiChrosorb), лихропреп (LiChroprep, Merck) и полигосил (Polygosil, Macherey-Nagel). Макропористые микросферические кремнеземы применяются главным образом для аналитических целей. Чаще всего применяют следующие марки кремнезёмов: лихросфер Si (LiChrospher Si, Merck), нуклеосил (Nukleosil, Macherey-Nagel), порасил (Porasil, Waters), перисорб (Perisorb, Merck), корасил (Corasil, Waters), видак (Vydac, Riedel de Haen). Три последние из перечисленных сорбентов представляют собой частицы сферической формы диоксида кремния, покрытого слоем пористого силикагеля.

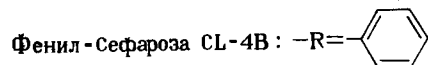
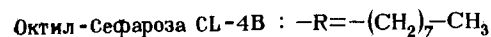
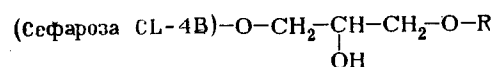
Оксид алюминия. Характеристикой сорбента являются не только размеры частиц, но и его кислотно-основные свойства. Водная суспензия сорбента может показывать кислую, нейтральную или основную реакцию. Кроме того, сорбент может обладать различной степенью активности. Как правило, выпускаются сорбенты максимальной активности, а перед употреблением их доводят до необходимой активности согласно рекомендациям фирм-изготовителей. Частичная инактивация позволяет исключить необратимую сорбцию, а также возможность каталитических превращений разделяемых веществ.

Поверхностно-модифицированный силикагель. К находящимся на поверхности частиц диоксида кремния атомам Si могут быть привиты различные группы (образование ковалентной свя-

зи Si—C): углеводородные цепи с различным числом углеродных атомов — 2 (RP 2), 8 (RP 8), 18 (RP 18 или OD), причем RP означает, что речь идет о материале для хроматографии с обращенными фазами (Reverse phase), а OD означает октадецил; фенильные группы. Вследствие того, что привитые группы полностью покрывают поверхность силикагеля, полярный сорбент приобретает гидрофобные свойства. Наиболее прочная адсорбция неполярных и умеренно полярных соединений наблюдается в водной среде. Десорбция происходит в присутствии органических растворителей (главным образом метанола, ацетонитрила). В последнее время ОФХ широко применяется для аналитических целей.

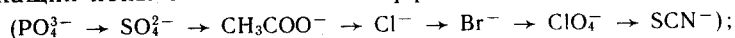
Определенные недостатки препятствуют применению ОФХ для препаративных целей. Так, разделяемые вещества бывают недостаточно хорошо растворимы в воде, а при использовании органических растворителей сорбируются недостаточно прочно. Кроме того, емкость колонок невелика, а стоимость сорбента выше по сравнению с обычным силикагелем.

Производные агарозы. К ним относятся производимые фирмой Pharmacia октил-сефароза CL-4B (Octyl-Sepharose CL-4B) и фенил-сефароза CL-4B (Phenyl-Sepharose CL-4B). Матрица — агароза, сшитая 2,3-дибромпропанолом, несет присоединенные эфирными связями октильные и фенильные группы:



Гидрофобные группы сорбента способны вступать во взаимодействие с боковыми цепями аминокислотных остатков белков. При увеличении концентрации соли в растворе прочность гидрофобного взаимодействия возрастает (эффект «высаливания»). При максимальной концентрации соли вещества адсорбируются, а при ее снижении (снижении ионной силы) элюируются. В общем случае элюирование веществ с гидрофобного сорбента может быть осуществлено следующим образом:

путем замены начального раствора на буфер (элюент), содержащий ионы с более низким эффектом высаливания



путем снижения ионной силы раствора;

за счет снижения полярности элюента, например при добавлении этиленгликоля;

путем увеличения значения pH.

Прочие адсорбенты. В колоночной хроматографии применяются следующие сорбенты:

целлюлоза (главным образом в распределительной хроматографии, см. разд. 2.1.2);

производные декстрана (торговая марка сефасорб НР ультратонкий, Sephasorb HP ultrafine, Pharmacia), представляющие собой жестко сшитый гидроксипропиловыми мостиками слабонабухающий декстран. За счет жесткости структуры (высокой степени сшитости) частицы сефасорба НР устойчивы при давлении до 10^7 Па. Сорбент производится в виде мелкого порошка (с диаметром частиц до 10—23 мкм), что позволяет существенно повысить разрешение;

кизельгур (Kieselgur) (о применении кизельгура для подготовки пробы в клинических анализах см. разд. 2.2.8).

Кроме того, применяются различные марки поверхностно-модифицированных силикагелей (силикагели, содержащие разнообразные функциональные группы):

ОН-группа: лихросорб диол (LiChrosorb Diol, Merck),
CN-группа: кизельгель CN (Riedel de Haen), полигосил CN и нуклеосил CN (Macherey-Nagel), бондапак CN (Bondapack CN, Waters),

NO₂-группа: кизельгель NO₂ (Riedel de Haen), полигосил NO₂ и нуклеосил NO₂ (Macherey-Nagel),

NH₂-группа: кизельгель NH₂ (Riedel de Haen), полигосил NH₂ и нуклеосил NH₂ (Macherey-Nagel), лихросорб NH₂ (Merck), бондапак NH₂ (Waters).

Приборы

Аппаратура, необходимая для проведения тонкослойной и газовой хроматографии, описана в разд. 2.2 и 2.4. Для проведения жидкостной хроматографии (в частности, адсорбционной хроматографии) используется установка, схема которой приведена на рис. 2.1.1/1. Колонки для препаративной и аналитической жидкостной хроматографии низкого и высокого давления описаны в разд. 2.3.1 и 2.3.2.

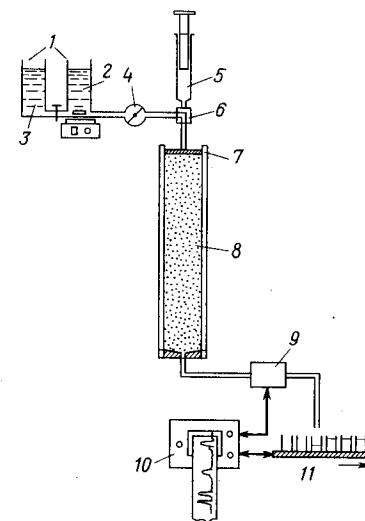


Рис. 2.1.1/1. Общая схема хроматографической установки:

1 — градиентный смеситель; 2 — смеситель;
3 — резервуар; 4 — насос; 5 — проба; 6 —
кран для переключения потока; 7 — адаптер;
8 — сорбент; 9 — детектор; 10 — самописец;
11 — коллектор

Подготовка образца

Для проведения ТСХ образец растворяют в наименее полярном растворителе, для проведения хроматографии на колонке — в элюенте, который используют в начале разделения. При использовании колонок с фильтрами (фриттой — стеклянной пористой перегородкой) на входе, например, колонок Lobar (Merck), или колонок для ВЭЖХ образец предварительно фильтруют (диаметр пор фильтра — 4 мкм) или центрифугируют с целью удаления взвешенных частиц (пылинок, коллоидных частиц).

Специальные приемы подготовки образца

При клинических анализах необходимо определять небольшие количества органических веществ в большом объеме биологических жидкостей (мочи, ликвора и др.). Присутствие в пробах солей и белков заметно затрудняет проведение анализа. На рис. 2.1.1/2 сопоставлены общепринятые приемы подготовки образцов с двумя новыми методами, позволяющими существенно упростить эту операцию.

Методика Sep-Pak (Waters). Для разделения веществ применяют патроны Sep-Pak, которые представляют собой небольшие колонки, заполненные силикагелем RP18. Колонки укомплектованы стеклянными шприцами, при помощи которых образец вводят в колонку. Элюирование ведут растворителями, подходящими для ОФХ. Последующий анализ экстракта ведут методом ОФХ.

Методика Extrelut (Merck). Используют колонки, заполненные кизельгуром. Очистку образца проводят методом НФХ. Образец экстрагируют неполярными растворителями, после чего экстракт хроматографируют на силикагеле или оксиде алюминия (однако вначале проводят ТСХ).

Порядок выполнения операций

Рассмотрим последовательность выполнения операций для ТЖХ (методы ТСХ и ГАХ рассматриваются в разд. 2.2.1 и 2.4.1).

Выбор размеров колонки. Примерное отношение диаметра колонки к высоте должно составлять 1—2:50. Колонки должны

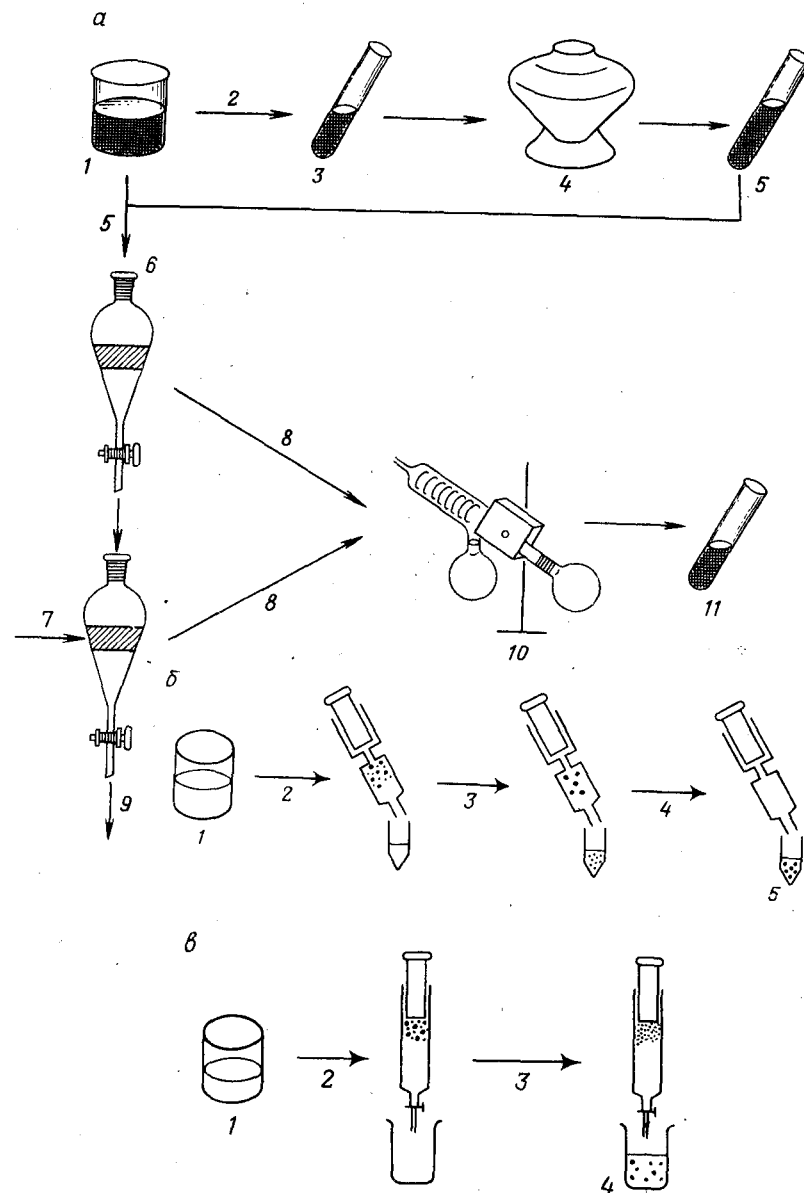


Рис. 2.1.1/2. Методики подготовки пробы при клинических анализах:

а — стандартная методика; 1 — проба (моча); 2 — удаление белков; 3 — осаждение белков; 4 — центрифугирование; 5 — депротеинизированная моча; 6 — экстракция; 7 — этилацетат; 8 — органическая фаза; 9 — моча после экстракции; 10 — концентрирование; 11 — растворение в подходящем растворителе; *б* — методика Sep-Pak; 1 — проба (моча); 2 — фильтрование пробы через Sep-Pak-C₁₈-патрон; 3 — вымывание посторонних примесей из патрона растворителем (например, 0,1%-й водной трифторуксусной кислотой); 4 — элюирование целевых веществ 1—2 мл растворителя (например, ацетонитрил — вода — трифторуксусная кислота 80:20:1); проба в экстракте пригодна для последующего анализа (методом ВЭЖХ — ОФХ); *в* — методика Extrelut; 1 — проба (моча), 20 мл; 2 — проба в колонке выдерживается в течение 15 мин; 3 — элюирование целевого продукта 40 мл растворителя, не смешивающегося с водой; экстракт пригоден для последующего анализа (ТСХ, ВЭЖХ — НФХ); (*а* и *б* — Waters, Königstein/Taunus; *в* — Merck, Darmstadt)

быть по возможности короткими, так как длинные колонки нелегко заполнить равномерно.

Необходимую длину колонки при анализе смеси неизвестного состава подбирают на основе результатов ТСХ (см. разд. 2.2).

Упаковка колонки. Данные о методах упаковки колонок приведены в разд. 2.3.1 и 2.3.2. Как правило, сорбент суспендируют в растворителе, в котором предполагается проводить элюирование, а затем проводят деаэрацию в вакууме; силикагель можно обработать ультразвуком.

Нанесение образца (более подробное описание операции приведено в разд. 2.3.1). Образец растворяют в растворителе, в котором предполагается проводить элюирование. При анализе смеси объем образца не должен превышать 2% от объема колонки, при препаративном разделении емкость сорбента используется максимально. Однако раствор образца не следует концентрировать, лучше наносить образец в большем объеме. Перегрузка колонки при высокой концентрации вещества в образце нарушает производительность колонки.

Элюирование. Полярность элюентов оказывает существенное влияние на качество разделения. Как правило, полярность растворителей (см. разд. 4.1) подбирают таким образом, чтобы целевой компонент смеси элюировался в объеме, равном трем объемам колонки. При этом достигается наиболее высокое разрешение. Используя смесь растворителей одинаковой полярности, иногда удается еще более повысить качество разделения. В НФХ высокое разрешение достигается при элюировании смесью слабополярных растворителей с добавкой 1—2% сильнополярного компонента. Хроматография в элюенте постоянного состава называется изократической. Если образец состоит из компонентов различной полярности, элюирование проводят в условиях возрастания полярности растворителя (НФХ), или в условиях снижения полярности растворителя (ОФХ). Замена элюента может осуществляться ступенчато или плавно при помощи градиентного смесителя (см. разд. 2.1.3 и рис. 2.3.1/2).

Источники ошибок

Целевое вещество слабо удерживается сорбентом (рис. 2.1.1/3, б). Выбранный растворитель является слишком полярным (в случае ОФХ полярность растворителя слишком мала). Рекомендации: использовать менее полярный растворитель (в случае ОФХ — более полярный); изменить полярность сорбента; работать в режиме ОФХ, если ранее работали в режиме НФХ, и наоборот.

Целевое вещество сильно удерживается сорбентом (рис. 2.1.1/3, в). Рекомендации: использовать более полярный растворитель (в случае ОФХ — менее полярный) или использовать менее полярный сорбент.

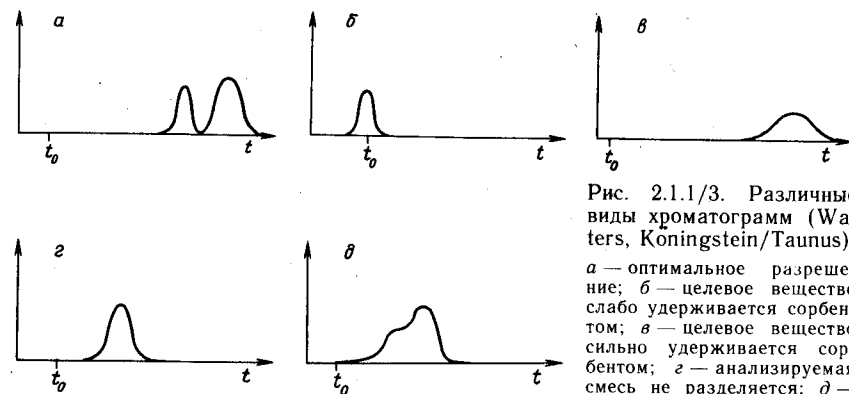


Рис. 2.1.1/3. Различные виды хроматограмм (Waters, Koningsstein/Taunus):

а — оптимальное разрешение; б — целевое вещество слабо удерживается сорбентом; в — целевое вещество сильно удерживается сорбентом; г — анализируемая смесь не разделяется; д — слабое разрешение

Анализируемая смесь не разделяется (рис. 2.1.1/3, г). Рекомендации: уменьшить скорость подачи элюента; использовать более длинную колонку или работать в режиме рецикла; использовать растворитель аналогичной полярности, но с другими сольватирующими свойствами; использовать сорбент с аналогичной полярностью, но иными функциональными группами.

Разрешение неудовлетворительно (рис. 2.1.1/3, д).

Рекомендации: уменьшить скорость подачи элюента; использовать более длинную колонку или работать в режиме рецикла.

Оформление результатов

В рабочем журнале необходимо указать следующие сведения: тип сорбента; размеры колонки (диаметр, высота); элюенты (при градиентной элюции — объем в мл в смесителе и резервуаре); можно также привести хроматограмму; температуру, если анализ велся не при комнатной температуре; скорость элюции в мл/мин; способ детектирования; объем фракций.

Область применения

Силикагели применяются для: фракционирования неполярных и малополярных веществ; контроля качества (главным образом методом ВЭЖХ на колонках с размером частиц 3—15 мкм (см. разд. 2.3.2); препаративного фракционирования при нормальном давлении на сорбентах с размерами частиц 10—30 мкм; препаративного разделения в производственном масштабе на сорбентах с диаметрами частиц 60—200 и 200—500 мкм.

Оксид алюминия применяют для решения тех же задач, что и силикагель: на кислом оксиде алюминия разделяют вещества с кислотными свойствами (фенолы, карбоновые кислоты); на основном оксиде алюминия фракционируют основания (амины);

на оксиде алюминия абсолютируют растворители (см. разд. 4.1); на основном оксиде алюминия удаляют перекиси, присутствующие в органических растворителях (эфире, тетрагидрофуране, диоксане и др.).

Поверхностно-модифицированные силикагели применяют главным образом в ОФХ (см. разд. 2.3.2) для аналитического и полупрепаративного разделения, главным образом полярных веществ.

Производные агарозы применяются для фракционирования белков по гидрофобным свойствам. В отличие от ОФХ, разделение проводится в водной среде (что важно при работе с белками).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Firmenschrift, Octyl-Sepharose CL-4B, Phenyl-Sepharose CL-4B for Hydrophobic Interaction Chromatography, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden 1976
Firmenschrift, Sephasorb HP Ultrafine — Chromatography in Organic Solvents, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden 1978
См. разд. 2.1.

2.1.2. Распределительная хроматография

Распределительная хроматография основана на различии в распределении веществ между несмешивающимися жидкими фазами — подвижной и неподвижной, нанесенной на твердый носитель. В зависимости от состояния подвижной фазы процесс носит название жидко-жидкостная (ЖЖХ) и газо-жидкостная (ГЖХ) хроматография.

Физические основы метода

Процесс, происходящий при ЖЖХ, можно сравнить с распределением вещества между двумя несмешивающимися жидкостями в делительной воронке (см. разд. 1.4.1). Перемешивание двух фаз при многократном встряхивании (распределение по Крейгу, см. разд. 1.4.2) приводит к разделению веществ с различными коэффициентами распределения. При распределительной хроматографии смеси разделяются гораздо быстрее, чем при противоточном распределении, что объясняется большей площадью контакта между подвижной и неподвижной фазами. Процесс разделения в распределительной хроматографии подчиняется закону распределения Нернста. Поэтому можно предсказать возможность разделения смеси веществ, зная коэффициенты распределения компонентов и фактор разделения (см. разд. 1.4.2).

Материалы-носители

В распределительной хроматографии большое значение имеет прочность удерживания неподвижной жидкой фазы на нерастворимом твердом инертном носителе. Прочность удерживания определяется силами адгезии, адсорбцией, химическими связями.

Силы адгезии

Жидкая фаза удерживается на матрице силами адгезии: рассчитанное количество летучей жидкости (в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей) прибавляют к материалу-носителю, встряхивают и выдерживают длительное время. При этом летучий растворитель (вода, нитрометан, изеооктан или β, β' -оксидипропионитрил) равномерно распределяется на матрице за счет поверхностной диффузии.

Нелетучую жидкость (полиэтиленгликоль, гексадекан) растворяют в низкокипящем растворителе, смешивают с материалом-носителем, удаляют летучий растворитель на роторном испарителе. Оба варианта могут применяться при подготовке колонок для газовой хроматографии (см. разд. 2.4).

Неподвижная фаза всегда понемногу растворяется в подвижной фазе и постепенно вымывается из колонки. Это так называемое «истощение колонки» влечет за собой снижение разрешающей способности.

Адсорбция

Материал-носитель обладает адсорбционными свойствами (как, например, силикагель, целлюлоза, декстран). Если в этом случае в качестве подвижной фазы используется смесь растворителей различной полярности (например, хлороформ — метанол или бутанол — вода), то в зависимости от их полярности поверхность носителя с течением времени обогащается одним из компонентов подвижной фазы. Силикагель всегда избирателен по отношению к более полярному компоненту. Таким образом, при проведении жидкостной хроматографии смесью растворителей всегда наблюдаются процессы адсорбции и распределения.

Ковалентные связи

Возможность образования ковалентных связей между веществом подвижной фазы и веществом матрицы позволяет прививать неподвижную фазу непосредственно на поверхности матрицы. Широкое распространение получили силикагели с иммобилизованными углеводородными цепями, содержащими 2, 8 или 18 углеродных атомов (см. разд. 2.1.1). За счет иммобилизации углеводородных цепей на поверхности силикагеля она меняет полярность, т. е. поверхностный слой приобретает гидрофобные свойства, одновременно подавляются адсорбционные свойства. Поэтому в данном случае имеет место ОФХ, занимающая промежуточное место между распределительной хроматографией и адсорбционной. Роль неподвижной жидкой фазы здесь выполняет химически связанный монодисперсный слой.

Общая последовательность операций аналогична порядку работы при адсорбционной хроматографии (см. разд. 2.1.1).

Элюирование проводят в изократическом режиме, т. е. при постоянном составе элюента. Градиентное элюирование здесь лишено смысла.

Нанесение образца. При каждом нанесении пробы разделяемая смесь частично вытесняет жидкую неподвижную фазу, что отрицательно сказывается на работе колонки. Если в первом опыте колонку слегка перегрузить, то в следующем опыте состав элюента будет локально меняться за счет вытеснения неподвижной фазы. При этом компоненты образца могут выпасть в осадок, или может наступить расслоение элюента, а на хроматограмме может наблюдаться значительное уширение пиков.

В случае препаративного разделения следует использовать низкокипящую неподвижную фазу (или дополнить процесс разделения стадией очистки вещества от следов неподвижной фазы).

Разделение методом ОФХ (на иммобилизованной неподвижной фазе) имеет ряд особенностей, которые необходимо учитывать.

Оформление результатов

При оформлении результатов следует руководствоваться требованиями, изложенными в разд. 2.1.1.

Область применения

При анализе всех классов веществ.

Разделение довольно сложных смесей веществ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer, Berlin 1975
L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New York 1974
K. K. Unger, Porous Silica — Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library, Bd. 16, Elsevier, Amsterdam 1979

2.1.3. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ионообменная хроматография основана на различной способности разделяемых ионов в растворе к ионному обмену с ионитом (неподвижная фаза), который представляет собой нерастворимую полимерную матрицу, несущую химически связанные ионные группы. Противоионы удерживаются на матрице за счет

сил электростатического взаимодействия и могут обмениваться на ионы разделяемой смеси, присутствующие в подвижной фазе.

Физические основы метода

По химическому строению матрицы ионообменники подразделяются на следующие группы: синтетические смолы на основе полистирола или полиакриламида; сефадексы на основе сшитого декстрана; сефарозы — на основе агарозы; целлюлозные ионообменники на основе микрокристаллической или сшитой микросферической целлюлозы; неорганические иониты на основе пористо-модифицированных силикагелей.

Тип ионообменника определяется природой функциональных ионогенных групп (табл. 2.1.3/1).

Ионит является слабокислотным при наличии карбоксильных или оксифенильных групп; сильнокислотным при наличии сульфогрупп ($-\text{SO}_3^- \text{H}^+$); слабоосновным при наличии аминогрупп различной степени замещения; сильноосновным при наличии групп четвертичных аммониевых оснований.

Разделение ионитов на сильные и слабые проводится по аналогии с делением на слабые и сильные кислоты и основания и отчасти отражает степень диссоциации ионогенных групп. Это свойство не следует путать с емкостью, которая для ионитов определяется абсолютным числом функциональных групп и их доступностью. Сильный ионит имеет полную емкость в большом диапазоне значений pH раствора, слабый ионит достигает полной емкости лишь в определенной области pH. Так, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) при $\text{pH} < 3$ уже не несет диссоциированных карбоксильных групп и полностью лишена ионообменных свойств. Полной емкости КМЦ достигает при $\text{pH} > 6$.

Ионообменную хроматографию проводят в водной среде. В качестве примера ионообменного процесса можно привести операцию умягчения воды, при которой ионы кальция и магния обмениваются на ионы натрия. Помимо обычного обмена ионов на ионитах можно проводить разделение заряженных частиц, прежде всего биополимеров (белки, нуклеиновые кислоты), некоторые из которых обладают амфотерными свойствами. Именно эта область является главной для применения ионообменной хроматографии. Так как суммарный заряд таких макромолекул зависит от pH среды, хроматографию проводят в буферных растворах. В большинстве случаев pH среды в процессе разделения поддерживают постоянным. Разделение различных типов ионов возможно при условии, что компоненты смеси по-разному взаимодействуют с заряженными группами ионита.

Если несколько повысить ионную силу элюента путем добавления нейтральных солей (например, NaCl), то ионы элюента будут конкурировать с компонентами смеси. Вследствие этого

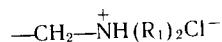
Таблица 2.1.3/1. Иониты различных

Типы ионитов с указанием функциональных групп	Название		
	Merck Lewalit	Amberlyte and Amberlyst	Bio-Rad and Bio-Rex
Сильнокислотные катиониты — сополимеры стирола с дивинилбензолом — $\text{SO}_3^- \text{H}^+$	S 1020 S 1080 S 1080 с индикатором-красителем	IR-118 IR-120, 122 IRF-66 CG-120 I, II, III IR-124	AG 50W-X1 AG 50W-X2 AG 50W-X4 AG 50W-X10 AG 50W-X12 AG 50W-X16 AG MP-50
Макропористые сильнокислотные катиониты	SP 1080	Amberlyst 15 » XN-1005 » XH-1010 » XN-1011 Amberlite 200 Amberlite 252 IRC-50, 84 CG-50 I, II, III	Bio Rex 70
Слабокислотные катиониты на основе полиакриловой кислоты — $\text{COO}^- \text{H}^+$	Ионит типа IV		
Макропористые слабокислотные катиониты	CP 3050		
Сильноосновные аниониты на основе полистирола, тип — $\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	M 5020	IRA-904, 938	AG 1-X1 AG 1-X2 AG 1-X4
	M 5080 M 5080 G3 с индикатором	IRA-400, 405, 410, 425, 900 CG-400, I, II	AG 1-X8 AG 21-K
	Ионит типа III	XE 265	AG 1-X10
Макропористые сильноосновные аниониты, тип I	MP 5080	Amberlyst A-26 Amberlyst A-27	AG MP-1
Сильноосновные аниониты на основе полистирола, тип II		IRA-410	AG 2-X4 AG 2-X8 AG 2-X10
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_3 \text{ Cl}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$			
Макропористые сильноосновные аниониты, тип II		Amberlyst A-29	
Слабоосновные аниониты на основе полистирола	Ионит типа II	IR-45 IRA-47, 68	AG3-X4A

фирм-изготовителей

Ионитов			
Dowex	Permutit	Riedel-Permutit	Serdolit
50W-X1 50W-X2 50W-X4 50W-X10 50W-X12 50W-X16 Dowex 70	Zeo Karb 225	RS-20 RS-40 RS-60 RS-90, 90L, 120 RSP-100-L RSP-100-I-L с индикатором	CS-21C, 22C CS-23C, 24C CS-1, 2, 3 11, 12 Serdolit Red с индикатором-красителем
Dowex CCR-2	Zeo Karb 226 Zeo Karb 216	C-65, 67	CW-1
Dowex 1-X1 Dowex 1-X2 Dowex 1-X4	Deacidite FF1P SRA 61, 62 Deacidite FF1P SRA 65, 66		
Dowex 1-X8 Dowex 21-K	Deacidite FF1P SRA 69, 80 FFDVBSRA 133	ESB-32-L ESB-26	AS-1, 4, 12 Serdolit Blue с индикатором
Dowex 11 Dowex 1-X10 Dowex 1-X16	Deacidite FX1P		
Dowex 31	Deacidite KMP	ESB-274-L ESB-274-I с индикатором EHP-274	AS-3
Dowex 2-X4 Dowex 2-X8 Dowex 2-X10	Deacidite NIP Deacidite NX Deacidite PIP	ES-26, 32	AS-2
Deacidite MIP Deacidite HIP		ES-274 ES-274-I с индикатором	AS-3

Типы ионитов с указанием функциональных групп	Название		
	Merck Lewalit	Amberlyte and Amberlyst	Bio-Rad and Bio-Rex



Ионит типа II

XE-265

IR-4B

CG 4B I, II

CG 45 I, II

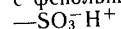
Amberlyst A-21

IRA-93

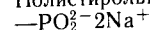
Макропористые слабоосновные аниониты

MP-7080

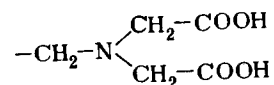
Сильнокислотные катиониты с фенольными группами



Полистирольные катиониты



Полистирольные иониты с комплексообразующими функциональными группами



Bio-Rex 40

Bio-Rex 63

Chelex 100

один или несколько компонентов частично десорбируются и начинают медленно мигрировать по колонке в подвижной фазе. При повышении концентрации соли скорость миграции возрастает, одновременно десорбируются более прочно удерживаемые вещества. При некотором предельном значении ионной силы элюента все компоненты образца полностью десорбируются и мигрируют по колонке со скоростью движения подвижной фазы. Следовательно, важно найти оптимальное значение ионной силы, при котором достигается наибольшее разделение целевых компонентов смеси. В большинстве случаев при постоянной ионной силе буфера не удастся элюировать все компоненты смеси, присутствующие в образце. Поэтому общепринятым приемом в ионообменной хроматографии является элюирование в градиенте ионной силы.

Материалы

Иониты на основе синтетических смол

На рис. 2.1.3/1 приведена схема получения ионитов на основе синтетических смол. Эти иониты производят в виде гранул диаметром от 5 мкм до 2 мм. Гранулы меньшего диаметра, стоимость которых несколько выше, предназначены для проведения анали-

ИОНИТОВ			
Dowex	Permutit	Riedel-Permutit	Serdolit

Deacidite HXIP

Dowex 33

EM-13

EM-13-I

с индикатором

Zeo Karb 215

Dow Chelaring Resin A 1

зов при повышенном давлении (например, анализ аминокислот, углеводов). Гранулы большего диаметра используются в технологических процессах, для которых необходима высокая скорость элюирования.

Сефадексы (Sephadex)

Их готовят путем введения функциональных групп в сефадексы G-25 или G-50 (см. разд. 2.1.5). Катионит C-25 и анионит A-25 используют при разделении веществ с небольшой молекулярной массой, иониты A-50 и C-50 — при разделении высокомолекулярных соединений с молекулярной массой до 30 000. Более высокомолекулярные вещества разделяют на ионообменной агарозе. Перечень ионообменных сефадексов приводится в табл. 2.1.3/2.

Иониты на основе сефарозы

Их готовят на основе матрицы агарозы (см. разд. 2.1.5), сшитой при помощи молекул 2,3-дибромпропанола. В качестве функциональных групп вводят DEAE- и CM-группы. За счет макропористой структуры гранулы ионообменной агарозы обладают достаточной механической прочностью.

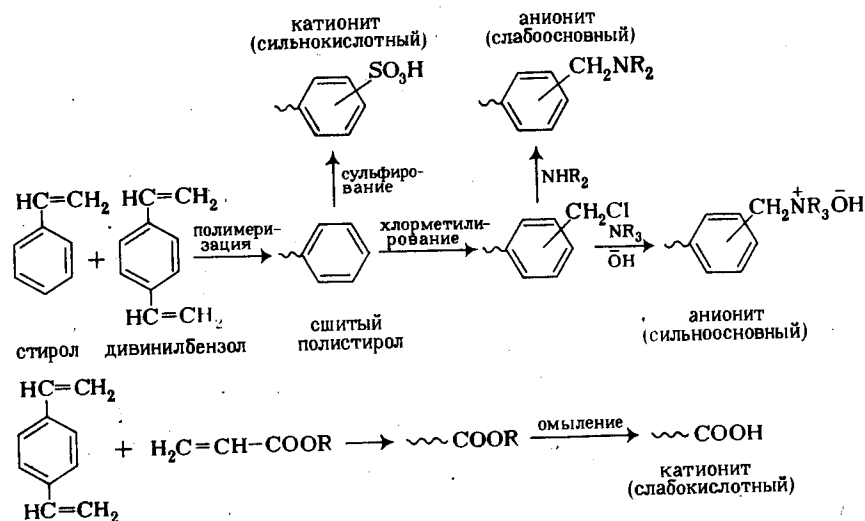


Рис. 2.1.3/1. Схема синтеза наиболее важных ионитов (Merck, Darmstadt)

Иониты на основе целлюлозы

Известны иониты на основе микрокристаллической или дополнительно сшитой целлюлозы. Гранулы последней имеют сферическую форму, что важно при упаковке колонок. Удастся приготовить колонки с равномерной упаковкой и удовлетворительными гидродинамическими свойствами. Гранулы обладают достаточно высокой жесткостью, поэтому высота столбика в колонке в процессе хроматографии изменяется незначительно. Совокупность перечисленных свойств делает иониты этого типа незаменимыми.

Таблица 2.1.3/2. Иониты на основе сшитого декстрана (сефадексы)

Тип ионита	Свойства	Иониты и их функциональные группы	Противоионы
DEAE-сефадекс A-25 и A-50	Слабоосновный анионит	Сефадекс $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Cl^-
QAE-сефадекс A-25 и A-50	Сильноосновный анионит	Сефадекс $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Cl^-
CM-сефадекс C-25 и C-50	Слабокислотный катионит	Сефадекс $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Na^+
SP-сефадекс C-25 и C-50	Сильнокислотный катионит	Сефадекс $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$	Na^+

Вследствие высокой механической прочности (устойчивости при высоком давлении) иониты этого типа применяются при ВЭЖХ (см. разд. 2.3.2). В настоящее время производятся:

слабоосновные иониты, например нуклеосил $5\text{N}(\text{CH}_3)_2$ и $10\text{N}(\text{CH}_3)_2$, полигосил 60-D $5\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (Macherey-Nagel);

сильноосновные иониты, например нуклеосил 5SB и 10SB (Macherey-Nagel), лихросорб AN (Merck), партисил 10 SAX (Partisil 10 SAX, Whatman);

сильнокислотные катиониты, например нуклеосил 5 SA и 10 SA (Macherey-Nagel), лихросорб KAT (Merck), партисил 10 SCX (Whatman).

Также наряду с ранее рассмотренными модифицированными пористыми ионитами производятся материалы, у которых функциональные группы фиксированы в тонком слое на поверхности стеклянных шариков (перисорб AN и перисорб KAT (Perisorb, Merck), видак-201 SB HPLC и видак-401 HPLC (Vydac, Riedel de Haen). Поскольку слой адсорбента у таких ионитов очень тонкий, они обладают низкой емкостью, а упакованные колонки имеют число теоретических тарелок на порядок меньше по сравнению с пористыми ионитами. Однако такие колонки проще упаковать, скорость элюирования на них выше, а результаты достаточно воспроизводимы.

Приборы

Схема прибора для проведения классической ионообменной хроматографии низкого давления приведена на рис. 2.1.1/1. При нанесении образца вся разделяемая смесь адсорбируется в верхней части колонки на отрезке 1—2 см. В большинстве случаев вполне достаточно колонки высотой 20 см. При разделении сложных смесей используют более высокие колонки. При работе на препаративном уровне размер колонки подбирают в соответствии с нагрузкой.

В отличие от других видов хроматографии, при хроматографии на ионитах всегда используют элюент переменного состава. При этом ионную силу раствора изменяют ступенчато (ступенчатое элюирование) или плавно (градиентное элюирование). Линейный градиент ионной силы формируют при помощи градиентного смесителя (см. рис. 2.1.1/1 и 2.3.1/2). В начале процесса на колонку из смесителя подают элюент с низкой ионной силой. По мере изменения объема раствора в смесителе в смеситель из резервуара начинает поступать буфер с высокой ионной силой, содержащее смесителя непрерывно перемешивается при помощи магнитной мешалки. Ионная сила элюента, подаваемого на колонку, постепенно возрастает. Оба сосуда, смеситель и резервуар,

имеют одинаковую форму, вследствие чего формируется линейный градиент концентрации буфера. Процесс хроматографии завершается при концентрации буфера, находящегося в резервуаре. Крутизна градиента определяется разностью в ионной силе буферного раствора в резервуаре и смесителе, а также общим объемом элюента в системе.

Подготовка образца

Содержание солей в образце должно быть минимальным. В случае необходимости образец обессоливают при помощи гель-хроматографии (см. разд. 2.1.5) или диализа (см. разд. 1.6). Возможно также нанесение образца в виде разбавленного раствора, так как при этом присутствующие в образце соли не препятствуют адсорбции всех компонентов смеси. При элюировании в изократическом режиме объем образца не должен превышать 1—5% от объема сорбента. При элюировании в градиентном режиме образец наносится в большом объеме растворителя при условии, что колонка имеет достаточно высокую емкость, позволяющую адсорбировать все компоненты смеси.

Порядок выполнения операций

Подготовка ионита. Необходимое количество ионита рассчитывают по его емкости, указанной фирмой-изготовителем. Нагрузка должна быть рассчитана на 10% объема сорбента, так как в остальном объеме сорбента осуществляется собственно процесс разделения. Перед каждым хроматографическим циклом ионит обязательно подвергается процессу полной перезарядки (регенерации). По завершении регенерации ионит переводится в активную форму.

В табл. 2.1.3/3 приведены условия регенерации синтетических ионитов. Иониты на основе целлюлозы, декстрана и агарозы регенерируют в более мягких условиях (табл. 2.1.3/4).

Заполнение колонки. Эта операция подробно рассматривается в разд. 2.3.1.

Таблица 2.1.3/3. Порядок регенерации ионитов

Тип ионита	Противоион	Рабочие растворы, %	Объем рабочего раствора, л на 1 л ионита
Сильнокислотный катионит	H ⁺	HCl, 6	3,0
	Na ⁺	NaCl, 10	2,5
Слабокислотный катионит	H ⁺	HCl, 6	3,0
	OH ⁻	NaOH, 4	2,5
Сильноосновный анионит	Cl ⁻	NaCl, 6	2,5
	OH ⁻	NaOH, 4	2,0

Таблица 2.1.3/4. Порядок регенерации ионитов на основе целлюлозы и сефадекса *

Тип ионита	Первый рабочий раствор	Промежуточное значение, pH	Второй рабочий раствор **
DEAE и QAE CM и SP	0,1—0,5 н. HCl	4	0,1—0,5 н. NaOH
	0,1—0,5 н. NaOH	8	0,1—0,5 н. HCl

* Часто достаточно промыть ионит раствором хлороводородной кислоты (вплоть до 2 н.).
** После второй промывки ионит необходимо сразу же промывать водой до нейтральной реакции фильтрата и лишь затем уравнивать соответствующим буфером.

Нанесение образца. Наибольшие объемы наносят при помощи шприца (см. рис. 2.3.1/9). Если объем пробы составляет несколько литров, то раствор подается на колонку при помощи адаптера (см. рис. 2.3.1/9) или перекачивается при помощи насоса.

Элюирование. Если разделение проводят в изократическом режиме, то перед новым циклом регенерации ионита не обязательно. В большинстве случаев разделение в изократическом режиме занимает много времени; кроме того, многие компоненты часто остаются сорбированными на ионите. Решением проблемы является градиентное элюирование.

Линейный градиент pH формируют при помощи градиентного смесителя, однако в колонке протекают настолько сложные процессы, что в слое ионита линейность градиента не достигается.

Проще сформировать линейный градиент ионной силы. Его формируют при помощи градиентного смесителя. Суммарный объем элюента приблизительно должен быть равен пяти объемам колонки. Слишком пологий градиент ионной силы приводит к уширению зон, крутой градиент отрицательно влияет на разрешающую способность колонки. В сложных случаях рекомендуется использовать градиент переменного профиля (см. разд. гл. 2.3.1). При изменении параметров колонки должна быть изменена форма градиента. Если хроматографию проводят в препаративных целях, полученные фракции перед последующим циклом предварительно обессоливают. Эту операцию осуществляют методом мембранной фильтрации (см. разд. 1.5) или при помощи диализа (см. разд. 1.6). Также можно использовать гель-хроматографию (см. разд. 2.1.5) или вести разделение в летучих буферах, например в гидрокарбонате или ацетате аммония или триэтиламмония (см. табл. 2.2.7/1). Общая схема проведения ионообменной хроматографии приведена на рис. 2.1.3/2.

Оформление результатов

В наиболее простых случаях в рабочем журнале приводят хроматограмму, на которой штриховой линией отмечают форму градиента ионной силы (рис. 2.1.3/3); на левой ординате отклады-

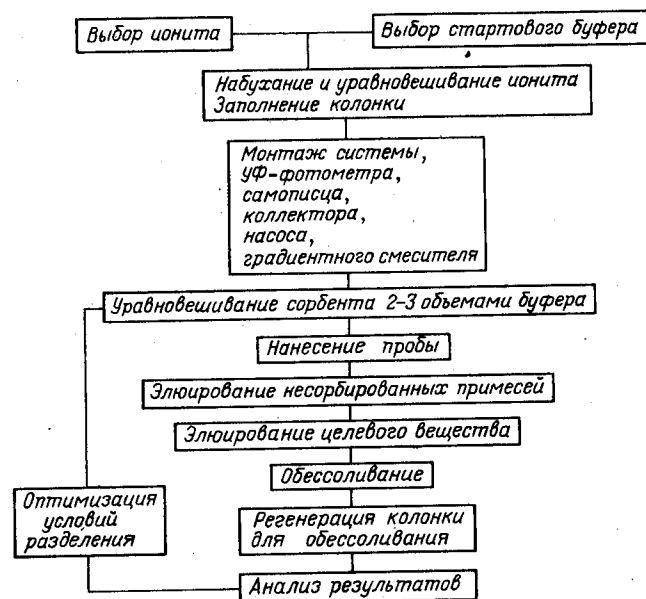


Рис. 2.1.3/2. Порядок выполнения операций в ионообменной хроматографии

вают измеряемый параметр (величина экстинкции или оптической плотности и в делениях шкалы самописца) (см. разд. 3.2.3 и 3.4.1), на правой ординате — концентрацию соли в элюенте, на абсциссе — объем элюата или время удерживания. Далее в журнале приводят следующие сведения: размеры колонки (диаметр, высота); данные об ионитах; данные о буферных растворах (порядок приготовления буферов приводится в экспериментальной части); в случае градиентного элюирования — объем буфера в смесителе и резервуаре; скорость подачи элюента; температура колонки (если не совпадает с комнатной); объем фракций (при препаративном разделении).

Например (см. рис. 2.1.3/3): образец — сыворотка крови (человека); колонка — $1,6 \times 15$ см; ионит — DEAE-сефароза CL-6B (Pharmacia); буферный раствор — линейный градиент NaCl

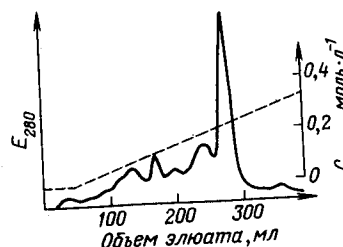


Рис. 2.1.3/3. Хроматограмма разделения методом ионообменной хроматографии (способ регистрации — поглощение при 280 нм — E_{280})

(0—0,5 М) в 0,05 М трис-HCl, pH 8,6; объем смесителя — 250 мл, объем резервуара — 250 мл; скорость подачи элюента — 38 мл/ч.

Область применения

В области анализа при помощи синтетических ионитов решаются следующие задачи:

определение общего содержания солей в растворе (путем ионообмена и последующего определения концентрации ионов водорода);

удаление посторонних ионов при неорганическом анализе (например, Fe^{3+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , F^- и др.);

анализ гидролизатов белков, олигонуклеотидов, полисахаридов;

определение уровня загрязнения окружающей среды.

В препаративном масштабе при помощи синтетических ионитов решаются следующие задачи:

деионизация воды (деминерализованную воду часто ошибочно называют дистиллированной);

удаление ионогенных примесей, присутствующих в органических растворителях;

очистка биополимеров, например отделение детергентов (см. разд. 2.5.1.2) и амфолитов (см. разд. 2.5.2), присутствующих в растворах белковых препаратов;

замена противоионов в буферных растворах;

получение препаратов радиоактивных изотопов;

использование в качестве катализаторов многих технологических процессов — этерификации, омыления, дегидратации, гидратации, альдольной конденсации, полимеризации, инверсии сахаров, перегруппировки, алкилирования, циангидринного синтеза, образования ацетатов, нитрования, эпексидирования.

Иониты на основе сефадекса и целлюлозы применяются для решения следующих задач: препаративного выделения белков, пептидов, олигонуклеотидов; выделения полисахаридов и липидов, несущих заряженные группы; иммобилизации ферментов.

Иониты на основе агарозы применяются в тех же целях, что и сефадексы; кроме того, на них можно фракционировать вещества с молекулярной массой до 10^6 г·моль $^{-1}$.

Модифицированные силикагели используются в режиме ВЭЖХ для разделения всех классов заряженных веществ в аналитическом и препаративном масштабе.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- T. G. Cooper, Biochemische Arbeitsmethoden, de Gruyter, Berlin 1981
H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer, Berlin 1975
K. Dorfner, Ionenaustauscher, 3. Aufl., de Gruyter, Berlin 1970

Firmenschrift, Ion Exchange Chromatography — Principle and Methods, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala 1980
 J. S. Fritz, D. T. Gjerde, C. Pohlandt, Ion Chromatography, Hüthig, Heidelberg 1984
 J. X. Khym, Analytical Ion-Exchange Procedures in Chemistry and Biology, Prentice Hall, Englewood Cliffs 1974
 H. G. Maier, Lebensmittelanalytik 2: Chromatographische Methoden einschließlich Ionenaustausch, UTB, Steinkopff, Stuttgart 1975
 R. Paterson, An Introduction to Ion Exchange, Heyden, London 1970
 W. Rieman, H. F. Walton, Ion Exchange in Analytical Chemistry, Pergamon Press, Oxford 1970
 L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New York 1974

2.1.4. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Аффинная хроматография — метод разделения биологически активных веществ, основанный на их специфическом взаимодействии с лигандами, ковалентно связанными с нерастворимым носителем (матрицей). В качестве лигандов используют соединения, взаимодействие которых с разделяемыми соединениями основано на биологической функции последних.

Физические основы метода

Схематически механизм разделения в аффинной хроматографии представлен на рис. 2.1.4/1. Лиганд L фиксирован на матрице, целевое вещество S связывается лигандом и вследствие этого извлекается из раствора. На стадии элюирования комплекс разрушается и целевое вещество вновь переходит в раствор. Разде-

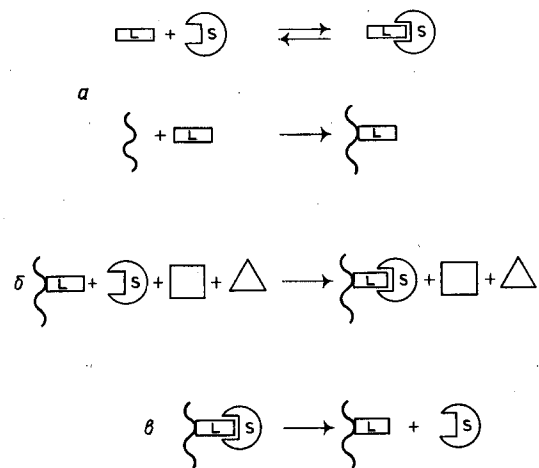
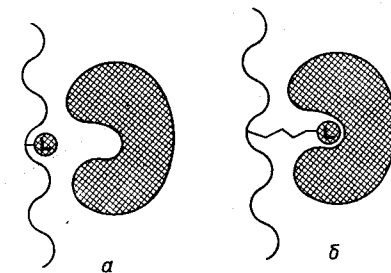


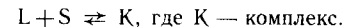
Рис. 2.1.4/1. Механизм разделения веществ в аффинной хроматографии:
 а — иммобилизация лиганда (ковалентно); б — связывание целевого вещества (нековалентно) и удаление сопутствующих примесей; в — десорбция целевого вещества

Рис. 2.1.4/2. Иллюстрация роли «спейсера»:

а — лиганд фиксирован непосредственно на матрице и недоступен для целевого вещества; б — лиганд фиксирован через промежуточный «спейсер» и способен взаимодействовать с молекулой целевого вещества



ление основано на равновесной реакции:



Взаимодействие (вещество — лиганд) должно быть специфическим и обратимым. Характеристикой обратимости процесса является константа диссоциации, причем в большинстве случаев можно использовать литературные данные.

Лиганд должен иметь реакционноспособные функциональные группы, при помощи которых осуществляется его связь с матрицей, при этом должна сохраняться биоспецифическая активность лиганда. Если лиганд имеет несколько таких групп, его иммобилизация должна проводиться с участием той из них, которая не входит в участок, взаимодействующий с целевым веществом. Активные центры многих биологически активных веществ (например, ферментов) часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших молекул лигандов, непосредственно связанных с матрицей. Поэтому между матрицей и лигандом обычно встраивают дополнительный блок — «спейсер» (рис. 2.1.4.2). В качестве матрицы используются гели агарозы или полиакриламида. Выпускаются материалы с различными реакционноспособными группами, предназначенными для взаимодействия с лигандом. Строение агарозы (см. разд. 2.1.5) и схема реакции активации с помощью бромциана представлены на рис. 2.1.4/3, а. На рис. 2.1.4/3, б приведена структурная формула активированной молекулы, готовой для связывания с лигандом. Выбор типа геля определяется типами функциональных групп лиганда. В табл. 2.1.4/1 приведены сочетания функциональных групп лигандов и матриц, по которым проводят реакцию иммобилизации. Кроме того, известны матрицы, на которых лиганды могут быть иммобилизованы только с помощью конденсирующих агентов* (рис. 2.1.4/4 и см. рис. 2.1.4/3, в). Аффинную хроматографию проводят в водных буферных растворах, подбирая оптимальные условия для каждого конкретного случая. Можно создать такие

* В качестве конденсирующих агентов используются водорастворимые производные карбодимида, например, *N*-этил-*N'*-(3-диметиламинопропил)-карбодимидгидрохлорид и др.

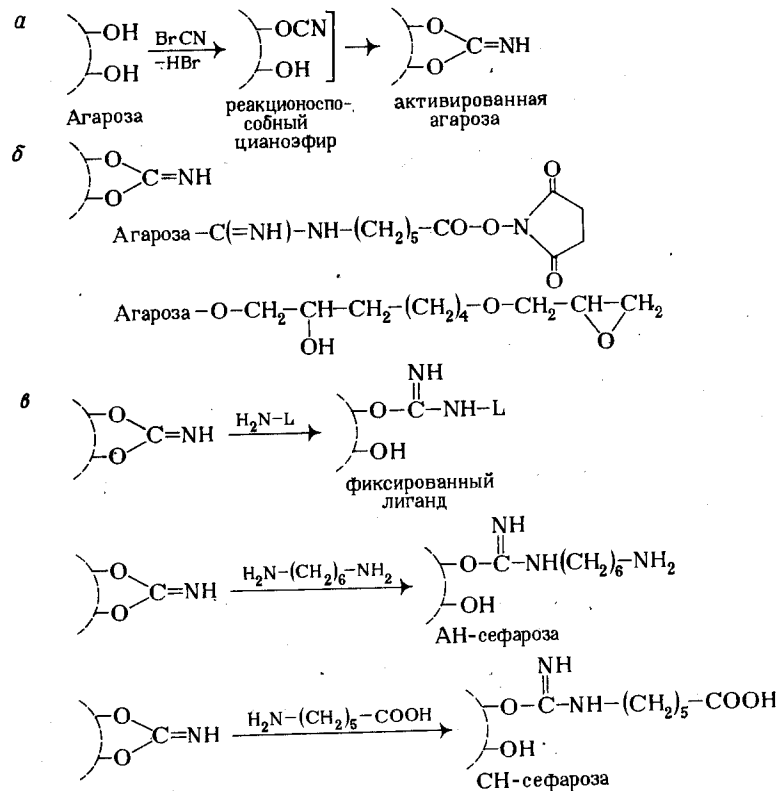


Рис. 2.1.4/3. Активация молекулы агарозы и конденсация ее с лигандами:

a — получение активированной молекулы агарозы; *б* — молекула агарозы, подготовленная для непосредственной конденсации с лигандом; *в* — конденсация активированной агарозы с лигандом или «спейсером», несущим amino- или карбоксигруппу

условия (значение pH раствора и концентрация соли), при которых взаимодействие целевого вещества с лигандом будет наиболее сильным.

Среди других методов выделения веществ аффинная хроматография занимает особое место, поскольку процесс идет крайне специфически с использованием биологической активности целевого вещества. Эта особенность позволяет концентрировать целевые вещества из больших объемов раствора.

Материалы

Из гелей на основе агарозы часто применяется *сефароза 4В* (см. разд. 2.1.5). Благодаря крупным порам внутренняя поверхность гранул доступна как для молекул лигандов, так и для моле-

Таблица 2.1.4/1. Возможные сочетания функциональных групп лигандов и матриц

Лиганды	Функциональные группы модифицированного	
	лиганда	носителя
Белки, пептиды	Амино-	Карбокси-, имидокарбонатная, эпокси-
Аминокислоты	Карбокси-	Амино-
Полисахариды	Меркапто- Гидрокси-	Пропил-тио, эпокси- Эпокси-
Полинуклеотиды	Карбокси-	Амино-
Коферменты, кофакторы	Амино-	Имидокарбонатная, пропил-тио
Антибиотики, стероиды	Амино-, карбокси-	Карбокси-, amino-, имидокарбонатная
	Меркапто-, гидрокси-	Пропил-тио, эпокси-

кул целевых веществ. Матрица агарозы имеет незначительную неспецифическую сорбцию. Частицы сефарозы мало сжимаемы, вследствие чего обеспечиваются хорошие гидродинамические свойства колонки.

Сефароза CL (Pharmacia) представляет собой ковалентно сшитые молекулы агарозы, устойчивые в органических растворителях (что существенно, например, при последующей иммобилизации лиганда). Сорбент устойчив при повышенной температуре (например, в автоклаве) и в присутствии денатурирующих агентов (мочевина, гуанидин-гидрохлорид). По сравнению с сефарозой 4В считая агароза обладает меньшей емкостью.

Аффи-гель (Affi-Gel, Bio Rad Lab.) — агарозный и полиакриламидный гель, модифицированный разнообразными функциональными группами. По сравнению с агарозными гелями материалы на основе полиакриламида имеют следующие преимущества: крайне незначительную неспецифическую сорбцию; биологическую инертность (устойчивы к действию ферментов); повышенную химическую и термоустойчивость.

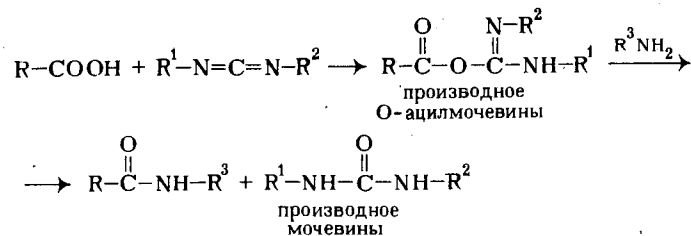


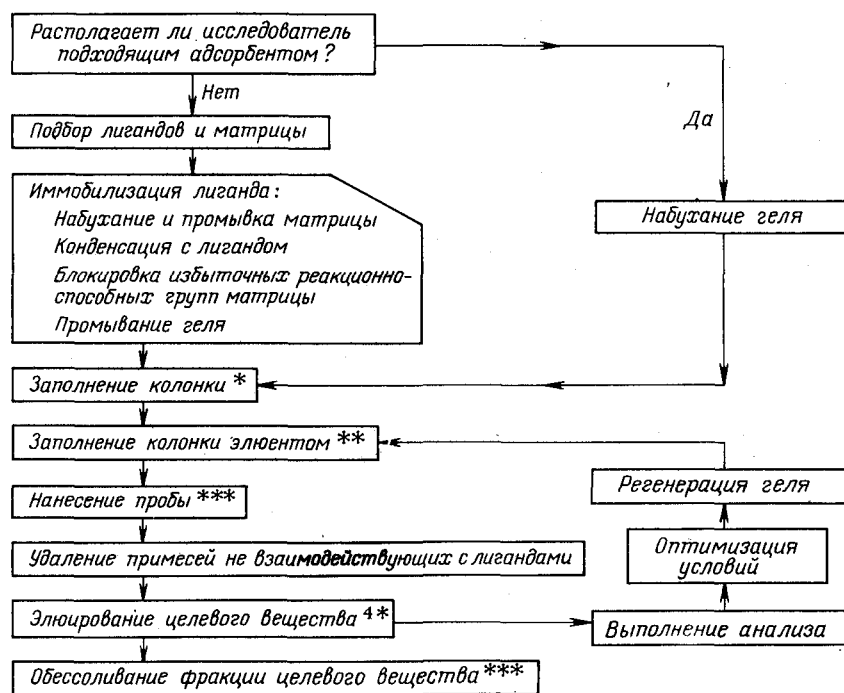
Рис. 2.1.4/4. Механизм конденсации лиганда с матрицей с образованием пептидной связи (Pharmacia, Uppsala/Schmeden):

R — молекула агарозы, R³ — лиганд или R — лиганд, R³ — аминогруппа молекулы агарозы

Общая схема выполнения операций приведена в табл. 2.1.4/2.

Элюирование. Если целевое вещество слишком прочно связано с лигандом, рекомендуется прервать процесс элюирования в тот момент, когда элюент полностью вытеснен буферным раствором (см. разд. 2.1.3). Спустя некоторое время (от 20 мин до 2 ч) целевое вещество будет десорбировано и может быть элюировано с колонки. Заряженные вещества элюируют в градиенте ионной силы (см. разд. 2.1.3 и 2.3.1). При очень высоком сродстве в состав буфера вводят анионы, разрушающие водородные связи ($\text{ClO}_4^- < \text{CF}_3\text{COO}^- < \text{SCN}^- < \text{CCl}_3\text{COO}^-$).

Таблица 2.1.4/2. Порядок выполнения операций в аффинной хроматографии



* Заполнение колонки 2—10 мл влажного геля описано в разд. 2.3.1.

** Колонку промывают 3-х кратным объемом буфера до постоянного значения pH (процесс уравнивания).

*** Если проба растворена не в элюенте, необходимо провести операцию замены буфера методом геля-фильтрации (см. разд. 2.1.5). Если анализируемые вещества прочно связаны с лигандом, объем пробы не столь важен. Вещества, слабо удерживаемые лигандом, следует наносить в небольшом объеме (примерно 5% от объема колонки).

** Элюирование можно проводить в градиенте (см. разд. 2.3.1).

Выделение целевых веществ из элюата. Поскольку элюирование проводят в солевых буферах, фракции вначале обессоливают, например методом геля-хроматографии (см. разд. 2.1.5), а затем высушивают лиофильно (см. разд. 1.7).

Регенерация сорбента. После завершения эксперимента сорбент промывают буферным раствором 0,1 М трис-HCl, pH 8,5 (10 объемов колонки), содержащим 0,5 моль·л⁻¹ NaCl, а затем стартовым буфером.

Хранение. Готовый гель хранят на холоду в присутствии консервантов (0,02%-й мертиолят).

Оформление результатов — см. разд. 2.1.3.

Область применения

Аффинная хроматография применяется для выделения следующих классов веществ: аналогов субстратов, ингибиторов, кофакторов (при этом роль лигандов играют ферменты); антигенов, вирусов, клеток (лиганды — антитела); полисахаридов, гликопротеинов, клеток (лиганды — лектины); гистонов, полимераз (лиганды — нуклеиновые кислоты); рецепторов, белков-переносчиков (гормоны, витамины); белков специфически взаимодействующих с мембраной клетки, лектинов (лиганды — клетки).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Firmenschrift, Affinity Chromatography — Principles & Methods, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala 1979
 T. C. J. Gribnau, J. Visser, R. J. F. Nivard (Hrsg.), Affinity Chromatography and Related Techniques, Analytical Chemistry Symposia Series, Vol. 9, Elsevier, Amsterdam 1981
 C. R. Lowe, R. D. G. Dean, Affinity Chromatography, Wiley, London 1974
 O. Mikes (Hrsg.), Laboratory Handbook of Chromatography and Allied Methods, S. 385—420, Ellis Horwood, Chichester 1979
 W. H. Scouten, Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices, Vol. 59, Chemical Analysis, P. J. Elving und J. B. Wineforder (Hrsg.), Wiley, New York 1981
 T. S. Work, E. Work, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 7, Part II, North-Holland, Amsterdam 1979

2.1.5. ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ *

Гель-хроматография (молекулярно-ситовая хроматография) — метод, основанный на различной способности молекул разного размера проникать в поры нейтрального геля, который служит неподвижной фазой.

* В литературе используют также термины геля-фильтрация и геля-проникающая хроматография (для хроматографии в органических растворителях).

Схематично принцип работы молекулярных сит представлен на рис. 2.1.5/1. В качестве неподвижной фазы используется пористый гель, имеющий поры определенного диаметра. Крупные молекулы не диффундируют в поры гранул и элюируются быстрее, молекулы небольшого размера удерживаются в порах гранул и элюируются позднее. На рис. 2.1.5/2 схематически изображено соотношение объемов подвижной и неподвижной фаз в колонке.

Общий объем колонки V складывается из объема растворителя между гранулами геля V_0 , объема растворителя в гранулах геля (объема пор) V_n и объема матрицы V_m :

$$V = V_0 + V_n + V_m$$

Молекулы, не проникающие в гранулы геля, элюируются в объеме V_0 . Молекулы, свободно проникающие в гранулы, элюируются в объеме $V_0 + V_n$. Молекулы, для которых доступна лишь часть пор гранул, элюируются в объеме $V_0 < V_x < V_0 + V_n^*$. Величина V_x не полностью отражает свойства того или иного вещества, так как в значительной степени зависит от общего объема V . По аналогии с распределительной хроматографией (см. разд. 2.1.2) поведение вещества на колонке можно охарактеризовать коэффициентом распределения K_p :

$$K_p = (V_x - V_0) / V_n$$

где K_p — соответствует доле неподвижной жидкой фазы, в которой находится данное вещество.

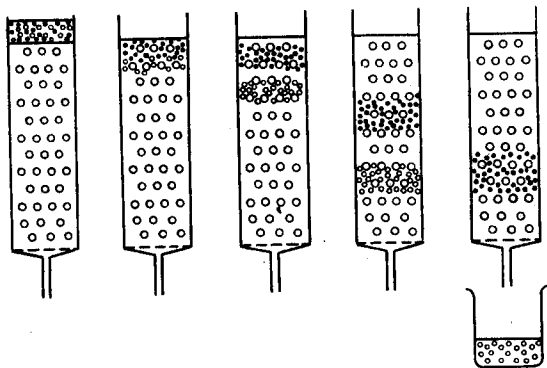
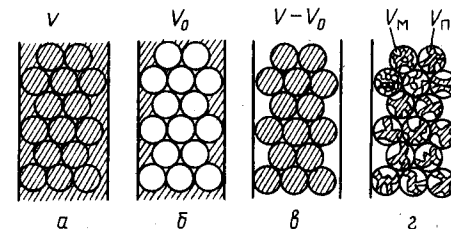


Рис. 2.1.5/1. Разделение методом гель-хроматографии

* В литературе используют также обозначения: V_t (total volume) вместо V , V_0 (outer volume) вместо V_0 , V_i (inner volume) вместо V_n , V_m (matrix volume) вместо V_m и V_e (elution volume) вместо V_x — Прим. ред.

Рис. 2.1.5/2. Соотношение объемов в колонке с гелем:

a — общий объем V ; b — объем подвижной фазы между гранулами геля V_0 ; $в$ — объем неподвижной фазы $V - V_0$; $г$ — объем матрицы V_m и общий объем пор матрицы V_n



На практике этим параметром пользоваться затруднительно, поскольку нелегко определить точное значение V_n . Легче рассчитать величину $V - V_0$ (см. рис. 2.1.5/2, в). Эта разность превышает V_n на объем матрицы V_m и вместе с тем пропорциональна общему объему колонки V . Таким образом можно ввести константу K_x^* , также соответствующую доле неподвижной фазы, в которой находится данное вещество:

$$K_x = (V_x - V_0) / (V - V_0)$$

Хотя K_x не идентична коэффициенту распределения, с ее помощью можно описать результаты эксперимента независимо от размеров колонки и, таким образом, сопоставить результаты многих опытов. Результаты экспериментов можно нормировать при помощи величин V_x/V и V_x/V_0 . Однако в отличие от K_x эти величины зависят от свойств геля.

Материалы

Хроматографические свойства геля определяются природой матрицы и прежде всего пористостью ее структуры, в то время как химическое строение каркаса имеет второстепенное значение. В зависимости от способности набухать в воде или в органических растворителях материалы для гель-хроматографии подразделяются на гидрофильные и органофильные (гидрофобные).

Гидрофильные гели

Декстрановые гели или сефадексы (Pharmacia). Представляют собой полисахаридные цепи, сшитые эпихлоргидрином. Вследствие наличия множества гидроксильных групп такая матрица хорошо удерживает воду. Степень набухания геля уменьшается по мере возрастания степени сшитости. По мере уменьшения размеров пор в объем элюирования попадают вещества все с меньшей молекулярной массой. В табл. 2.1.5/1 приведены свойства и указаны области применения различных сефадексов.

* В литературе используют также обозначения K_d вместо K_p и K_{av} вместо K_x — Прим. ред.

Таблица 2.1.5/1. Свойства сефадексов

Тип сефадекса	Размеры частиц в сухом состоянии, мкм	Область применения (мольная масса $\cdot 10^{-3}$)		Объем матрицы (сухой гель), мл \cdot г $^{-1}$	Время набухания, ч	
		пептиды и глобулярные белки	декстран		при 20 °C	при 90 °C
G-10	40—120	0,7	0,7	2—3	3	1
G-15	40—120	1,5	1,5	2,5—3,5	3	1
G-25 крупный	100—300	1—5	0,1—5	4—6	3	1
средний	50—100					
мелкий	20—80					
супермелкий	10—40					
G-50 крупный	100—300	1,5—30	0,5—10	9—11	3	1
средний	50—150					
мелкий	20—80					
супермелкий	10—40					
G-75	40—120	3—80	1—50	12—15	24	3
супермелкий	10—40	3—70				
G-100	40—120	4—150	1—100	15—20	72	5
супермелкий	10—40	4—100				
G-150	40—120	5—300	1—150	20—30	72	5
супермелкий	10—40	5—150		18—22		
G-200	40—120	5—600	1—200	30—40	72	5
супермелкий	10—40	5—250		20—25		

Чем меньше степень сшитости, тем мягче гель, и, следовательно, тем меньше рабочее давление в колонках, а значит, и скорость подачи элюента. Так, сефадекс G-10 выдерживает давление до 10^5 Па (например, ускоренный процесс обессоливания белков), а сефадекс G-200 выдерживает давление до $5 \cdot 10^3$ Па. Как и полиакриламидные гели, декстрановые гели применяются для выделения и очистки ферментов, так как их матрица не обладает денатурирующими свойствами (в отличие от полистирольных гелей и пористых стекол).

Полиакриламидные гели получают сополимеризацией акриламида и сшивающего агента N,N'-метилден-бис-акриламида. Полярные амидные группы ($-\text{CO}-\text{NH}_2$) способствуют сольватации его в водной среде. В зависимости от условий полимеризации (соотношения мономеров, концентрации) получают сферические гранулы полимера с различными диаметрами пор. При высокой концентрации сшивающего агента образуется высокопористый гель, обладающий вместе с тем высокой механической прочностью (макропористый гель). Такой материал выпускается фирмой Био-Рад под названием био-гель Р (Bio-Gel P). В табл. 2.1.5/2 приведены рабочие характеристики гелей этого типа.

Агарозные гели получают из линейного полисахарида — агарозы, построенного из остатков молекул D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы. Гель образуется самопроизвольно при охлаждении горячего раствора агарозы. При этом происходит продоль-

Таблица 2.1.5/2. Свойства био-гелей Р *

Тип геля	Размер частиц в набухом состоянии, мкм	Область применения (мольная масса $\cdot 10^{-3}$) для пептидов и глобулярных белков	Объем матрицы в сухом состоянии, мл \cdot г $^{-1}$
P-2	150—300 80—150 40—80, < 40	0,1—1,8	3,5
P-4	150—300 80—150 40—80, < 40	0,8—4	5
P-6	150—300 80—150 40—80, < 40	1—6	8
P-10	150—300 80—150 40—80, < 40	1,5—20	9
P-30	150—300 80—150, < 40	2,5—40	11
P-60	150—300 80—150, < 40	3—60	14
P-100	150—300 80—150, < 40	5—100	15
P-150	150—300 80—150, < 40	15—150	18
P-200	150—300 80—150, < 40	30—200	25
P-300	150—300 80—150, < 40	60—400	30

* В сухом состоянии.

ная агрегация цепей агарозы, вследствие чего образуется гель с очень большими порами. Так как структура геля формируется главным образом за счет водородных связей, область применения геля ограничена: при повышенной температуре или воздействии реагентов, разрушающих водородные связи (например, мочевины), структура геля нарушается. Другим недостатком этих гелей является чувствительность к микроорганизмам. Агарозные гели находят применение при разделении высокомолекулярных биополимеров и в качестве матриц для сорбентов в аффинной хроматографии (см. разд. 2.1.4). Гели выпускаются под торговыми названиями сефароза (Pharmacia) и био-гель А (Bio-Rad Lab.). Рабочие характеристики гелей агарозы приведены в табл. 2.1.5/3.

Сравнительно новым является гель, основой которого служит каркас из полиакриламида, а промежуточное пространство заполнено гелем агарозы. Благодаря небольшим размерам гранул и их высокой механической прочности эти материалы можно использовать при более высокой скорости подачи элюента, чем принято для сефадексов и био-гелей. Этот тип геля выпускается

Таблица 2.1.5/3. Свойства агарозных гелей сефарозы (Pharmacia) и био-геля А (Bio-Rad Lab.)

Тип геля	Концентрация агарозы, %	Размеры частиц в набухшем состоянии, мкм	Область применения (молекулярная масса) для глобулярных белков
Сефароза 2В	2	60—200	$7 \cdot 10^4$ — $4 \cdot 10^7$
Сефароза 4В	4	60—140	$6 \cdot 10^4$ — $2 \cdot 10^7$
Сефароза 6В	6	45—165	10^4 — $10 \cdot 10^6$
Био-гель А-150m *	1	150—300	10^6 — $> 1,5 \cdot 10^8$
		80—150	
Био-гель А-50m	2	150—300	10^5 — $5 \cdot 10^7$
		150—300	
Био-гель А-15m	4	80—150	$4 \cdot 10^4$ — $15 \cdot 10^6$
		40—80	
Био-гель А-5m	6	80—150	10^4 — $5 \cdot 10^6$
		40—80	
Био-гель А-1,5m	8	80—150	$< 10^4$ — $1,5 \cdot 10^6$
		40—80	
Био-гель А-0,5m	10	80—150	$< 10^4$ — $5 \cdot 10^5$
		40—80	

* У био-гелей А пределы эксклюзии (исключения) отражены в маркировке, например био-гель А-5m имеет предел эксклюзии $5\,000\,000\text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$.

под торговым названием ультрогель [Ultrogel (LKB)]. Сшитая эпихлоргидрином агароза выпускается под торговой маркой сефароза CL (Pharmacia). Маркировка и области применения гелей этого типа приведены на рис. 2.1.5/3.

Сефакрил (Sephacryl, Pharmacia) является сополимером декстрана, несущего аллильные группы, и N,N'-метилден-акриламида. Гранулы геля обладают высокой механической прочностью, химически устойчивы (стабильны в области pH 3—11, выдерживают стерилизацию в автоклаве при pH 7 и температуре до 120°C); вследствие жесткой структуры устойчивы к действию органических растворителей. При переходе от воды к полярным

Таблица 2.1.5/4. Свойства сефакрилов (Pharmacia)

Тип сорбента	Размеры частиц во влажном состоянии, мкм	Область применения (молекулярная масса)		Объем набухшего в воде геля в 100 мл указанного растворителя			
		глобулярные белки	полисахариды	DMF	AcOEt	CHCl ₃	n-Геп-тай
S-200 супер-мелкий	40—105	$5 \cdot 10^3$ — $2,5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$ — $8 \cdot 10^4$	100	70	70	65
S-300 супер-мелкий	40—105	$1 \cdot 10^4$ — $1,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$ — $4 \cdot 10^5$	100	90	85	70

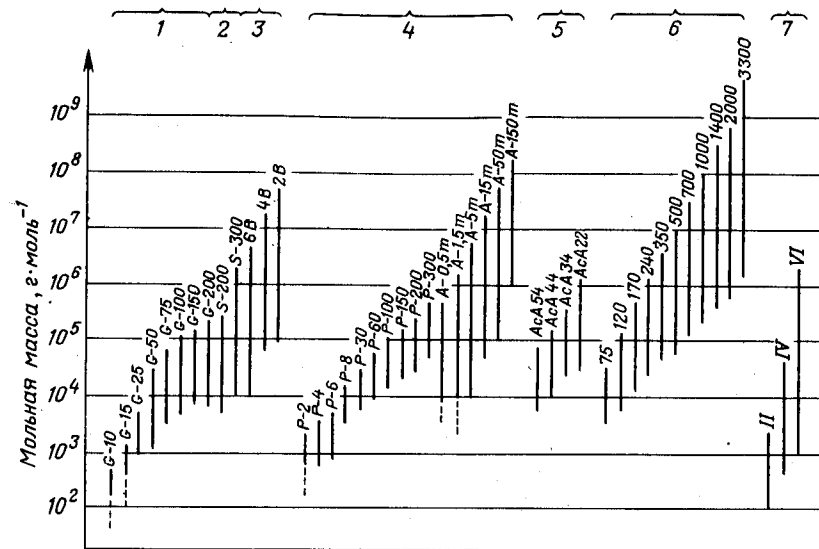


Рис. 2.1.5/3. Области применения гелей и пористых стекол в водной среде:

1 — сефакрил; 2 — сефадекс; 3 — сефароза (CL) (Pharmacia); 4 — био-гель (Bio-Rad); 5 — ультрогель (LKB); 6 — пористое стекло CPG-10 (Serva); 7 — гидрогель (Waters)

органическим растворителям объем геля изменяется незначительно (табл. 2.1.5/4). Схематично перевод сефакрила из водной среды в органический растворитель и обратно изображен на рис. 2.1.5/4. Этот процесс осуществляется одинаково для всех хроматографических материалов. Маркировка и области применения сефакрила приведены на рис. 2.1.5/3.

Гидрогель (Hydrogele, Waters) — сильносшитый полимер, хорошо удерживающий воду, может быть использован при давлении до $2,5 \cdot 10^7$ Па. В кислой или щелочной средах на гидрогеле возможна адсорбция заряженных веществ. Области применения гидрогеля указаны на рис. 2.1.5/3. Более подробная информация о свойствах гидрогеля в литературе отсутствует.

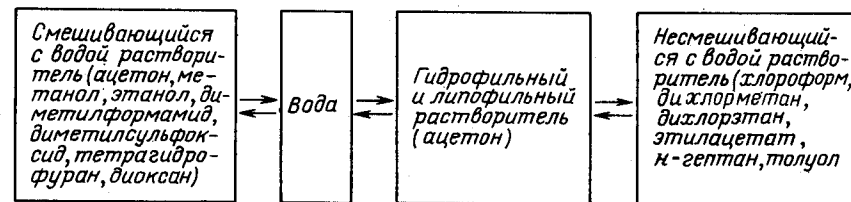


Рис. 2.1.5/4. Схема перевода гелей из водного растворителя в органический и обратно

Производные декстрана — сефадекс LH-20 и сефадекс LH-60. Это, в сущности, сефадексы G-25 и G-50, у которых гидроксильные группы этерифицированы (образуют простые эфиры) гидроксипропильной группой. Вследствие этого гели обладают как гидрофильными, так и липофильными свойствами. Из смеси полярных и неполярных растворителей (хлороформ — метанол, бутанол — вода) гель избирательно впитывает полярные компоненты, т. е. возникает положение, характерное для распределительной хроматографии (см. разд. 2.1.2). Поэтому характер взаимодействия разделяемых веществ с сорбентом в значительной степени зависит от состава элюента. Регулируя состав элюента, можно либо подавить адсорбционные свойства геля, т. е. провести разделение в режиме гель-хроматографии, либо разделять вещества с близкими молекулярными массами, т. е. работать в режиме распределительной или адсорбционной хроматографии.

Полистирольные гели используют для работы в режиме гель-хроматографии, а также для адсорбции (извлечения, отделения) неполярных веществ и детергентов. Эти материалы выпускают под торговыми названиями био-бедс S и био-бедс SM (Bio-Beads, Bio-Rad. Lab.). Являются сополимерами стирола и дивинилбензола; диаметр пор геля в значительной степени зависит от природы растворителя. Полистирольные гели сильно набухают в неполярных растворителях (толуол, четыреххлористый углерод), которые по этой причине часто используются в качестве элюентов. Поскольку гель легко деформируется, удовлетворительные результаты достигаются лишь при небольших скоростях потока. Данные об области применения этих гелей приведены на рис. 2.1.5/5.

Био-бедс S применяются для разделения и определения молекулярных масс алканов, жиров, жирных кислот и полистиролов. Био-бедс SM-2 [идентичен амберлиту XAD-2 (Amberlite XAD-2)] — механически прочный макропористый гель, степень набухания которого в различных растворителях изменяется незначительно. Особенно удачно гель применяют при извлечении детергентов и других неполярных веществ из водных растворов (Holloway, 1973).

Стирагель (Styragel, Waters) — сильносшитый макропористый полистирольный гель, вследствие высокой механической прочности применяется при работе в режиме ВЭЖХ. В качестве растворителей рекомендуется использовать тетрагидрофуран, диметилформамид, дихлорметан и ароматические углеводороды. Гель поставляется в набухом состоянии; не рекомендуется высушивание геля, а также его контакт с полярными растворителями, например водой, метанолом. Данные об области применения геля приведены на рис. 2.1.5/5.

Пористые стекла [Controlled Pore Glasses (CPG) Serva]

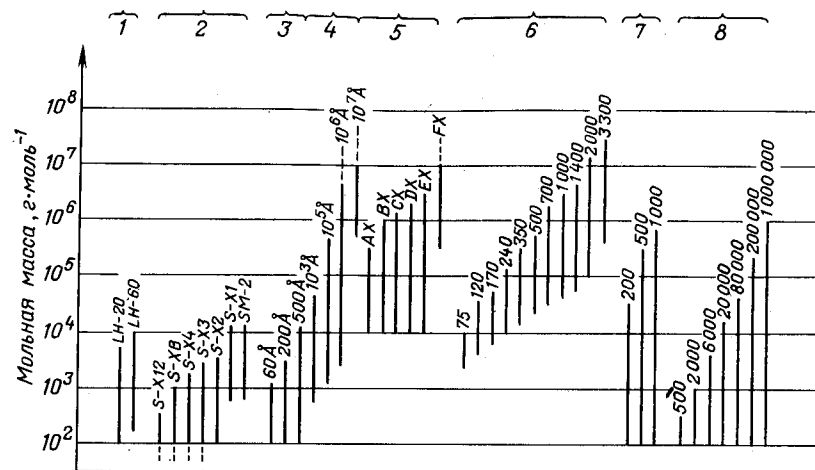


Рис. 2.1.5/5. Области применения гелей и пористых стекол в органических растворителях:

1 — сефадекс (Pharmacia); 2 — био-бедс (Bio-Rad); 3 — поргель (Poragel); 4 — стиригель (инактивированный); 5 — порасил (Waters); 6 — пористое стекло CPG-10 (Serva); 7 — фрактосил; 8 — фрактогель PVA (Merck)

стойки ко всем типам растворителей, применяются в жидкостной хроматографии при высоком давлении. Адсорбционные свойства, характерные для обыкновенных кремнезёмов, у пористых стекол незначительны и могут быть сведены к минимуму при помощи дополнительной обработки. Тем не менее для работы с легко денатурирующими белками их надо применять с известной долей осторожности. К тому же растворы белков с изоэлектрическими точками выше pH 7 заметно адсорбируются кислыми функциональными группами пористого стекла. Для исключения денатурации и адсорбции белков на пористом стекле рекомендуется: изменить ионную силу элюента; заменить тип соли или буфера; уменьшить значение pH; добавить в элюент 5%-й этанол, 0,4%-й полиэтиленгликоль 20 000 или детергент (например, 0,1%-й додецилсульфат натрия); использовать модифицированное пористое стекло (амино- или глицерил-производные). Области применения пористых стекол CPG-10 (Serva) и фрактосила (Fractosil, Merck) приведены на рис. 2.1.5/5.

Подготовка эксперимента

Выбор геля. При этом руководствуются данными о свойствах разделяемых веществ и характером решаемой задачи. В зависимости от растворимости целевого вещества в воде (см. рис. 2.1.5/3) или органическом растворителе (см. рис. 2.1.5/5) используют гель, рабочая область которого соответствует значению молеку-

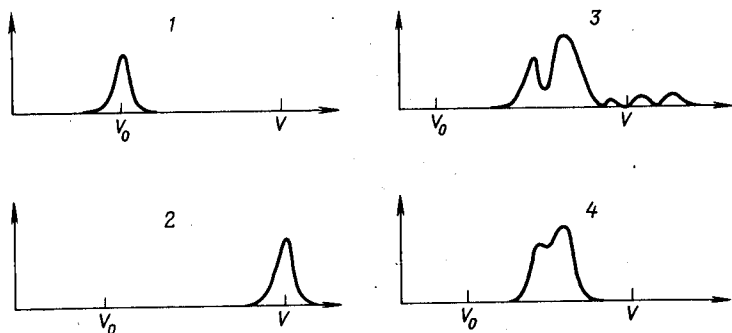


Рис. 2.1.5/6. Оптимизация условий разделения в гель-хроматографии:

1 — все компоненты анализируемой смеси элюируются с фронтом растворителя (рекомендуется использовать гель с большим диаметром пор); 2 — все компоненты анализируемой смеси элюируются в общем объеме V (рекомендуется использовать гель с меньшим диаметром пор); 3 — некоторые компоненты смеси элюируются в объеме, большем V , т. е. наблюдается заметная адсорбция на матрице (рекомендуется сменить элюент, использовать элюент, исключающий адсорбцию); 4 — компоненты смеси неудовлетворительно разделяются (рекомендуется увеличить высоту колонки, соединить несколько колонок, работать в режиме рециркуляции)

лярной массы целевого вещества. Если молекулярная масса целевого вещества неизвестна, выбор производится по данным о нижнем пределе исключения, так как в этом случае результат эксперимента служит основой для оптимизации процесса (рис. 2.1.5/6). Если же, несмотря на тщательность выбора геля, получают неудовлетворительные результаты, то с целью оптимизации рекомендуется (см. разд. 2.3.4): использовать более мелкую фракцию геля; использовать более длинную колонку, уменьшить скорость подачи элюента; вести разделение в режиме рецикла.

Выбор размеров колонки в первую очередь зависит от количества разделяемой смеси. При разделении с высоким разрешением объем образца не должен превышать 1—2% рабочего объема геля. При хроматографии в препаративном масштабе качество разделения пренебрегают ради высокой нагрузки (см. разд. 2.3.4). Колонки высотой более 1 м трудно упаковать равномерно из-за действия эффекта седиментации, поэтому рекомендуется соединять последовательно несколько более коротких колонок. Если образец растворен в большом объеме, увеличивают диаметр колонки. При этом облегчается упаковка колонки и становится возможным элюирование с высокой скоростью подачи элюента. На колонках размером $2,5 \times 100$ см предельная нагрузка составляет 1 г, на колонках 4×100 см — 10 г.

Порядок выполнения операций

Заполнение колонок (см. разд. 2.3.1).

Нанесение образца. Образец наносят при помощи шприца

(см. рис. 2.3.1/9 и рис. 2.3.1/11). Порядок ввода больших объемов пробы описан в разд. 2.3.1 и на рис. 2.3.1/9.

Элюирование. Скорость подачи элюента регулируют посредством изменения перепада гидростатического давления или задают при помощи насоса. Скорость потока поддерживают минимальной: в этих условиях уменьшается расширение зон высокомолекулярных компонентов за счет продольной диффузии (см. разд. 2.3).

В гель-хроматографии эффективность разделения слабо зависит от типа элюента, тем не менее иногда возникают следующие осложнения:

адсорбция материала из-за наличия на матрице заряженных групп; адсорбцию можно исключить, если вести процесс в кислой среде (1%-я AsOH) в растворе с низкой ионной силой (0,02);

адсорбция веществ с ароматическими группировками; адсорбцию можно исключить, добавив в элюент детергенты или 5—8 М раствор мочевины.

Хранение геля. Набухшие гели, (в воде или буферном растворе) являются хорошей питательной средой для микроорганизмов. При эксплуатации колонки вероятность размножения микроорганизмов незначительна, однако при длительном хранении заполненных колонок или набухшего геля рекомендуется принимать следующие меры предосторожности:

хранить упакованные колонки в холодной комнате или специальной камере (при $+4^\circ\text{C}$);

добавить в элюент консерванты: 0,5%-й раствор трихлорбутанола (действует в слабокислой среде), 0,005%-й раствор тиомерзала (или мертиолята, Pharmacia), 0,002%-й раствор хлоргексидина (не для агарозных гелей). Азид натрия вследствие его токсичности и канцерогенности применять не рекомендуется. Органические растворители не применяются в качестве консервантов готовых колонок, так как в их присутствии гель сильно сжимается (например, в присутствии этанола) или же консервант (например, толуол) с трудом вымывается из колонки. Перед началом работы следует полностью отмыть все консерванты, поскольку они мешают детектированию разделяемых веществ или затрудняют их последующую идентификацию.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят хроматограмму: на оси ординат указывают концентрацию вещества в элюате (в делениях шкалы самописца), поглощение в УФ-свете E_{264} или оптическую плотность D_{280} (см. разд. 3.2.3) при определенных длинах волн*; на

* В английской научной литературе вместо термина «extinction» — «поглощение» (E) применяют термин «absorption» или «absorbancy» — «адсорбция» (A), а оптическую плотность — D — обозначают OD («optical density») (см. разд. 3.4.1.1).

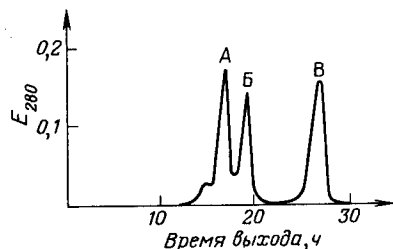


Рис. 2.1.5/7. Разделение на сефакриле S-200 (супермелкий) смеси белков: IgG (A), трансферрина (Б), α -химоитрипсин-огена (В)

оси абсцисс указывают время выхода (в часах или минутах), или же объем выхода (в миллилитрах или приведенных величинах V_x/V_0 или K_x). Далее указывают: размеры колонки (диаметр, высота); тип элюента; скорость подачи элюента, $\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ или $\text{мл} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$. Пример оформления результатов (рис. 2.1.5/7): колонка — $2,6 \times 85$ см; элюент — $0,1$ м трис- $\text{HCl}/0,5$ М NaCl , рН 8; скорость потока — $2 \text{ мл} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$.

В случае препаративного разделения в экспериментальной части приводят данные об объеме фракций и о последующей обработке фракций, содержащих целевое вещество.

Область применения

Фракционирование и выделение в водной среде и органических растворителях белков, липидов, стероидов, нуклеиновых кислот и полимеров.

Разделение в препаративном масштабе (например, биотехнологическое производство).

Определение молярных масс биополимеров, в том числе в составе сложных смесей. Анализ основан на том, что в определенных пределах значений молярной массы сохраняется зависимость:

$$V_x \sim \lg M,$$

где M — молярная масса.

Определение степени полимеризации синтетических полимеров. Фракционирование субклеточных частиц, вирусов.

Замена буфера: образец переводят в стартовый буфер, прежде чем подвергнуть последующей очистке (при помощи ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии или электрофореза).

Обессоливание: на небольших готовых колонках (PD-10) $2,5$ мл раствора образца можно обессолить в течение 5 мин.

Отделение низкомолекулярных радиоактивных веществ при введении изотопной метки в биополимеры.

Остановка реакции (в случае химической модификации белков).

Определение констант равновесия: при медленном течении реакции можно через определенные промежутки времени отбирать

пробу, отделять на колонке реагенты от конечного продукта и проводить количественный анализ элюата.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- K. H. Altgelt, L. Segal, Gel Permeation Chromatography, Marcel Dekker, New York 1971
T. G. Cooper, Biochemische Arbeitsmethoden, de Gruyter, Berlin, 1981
H. Determann, Gelchromatographie, Springer, Berlin 1967
Firmschriften, Gel Filtration — Theory and Practice; Sephadex LH-20-Chromatography in Organic Solvents; Sephadex LH-60-Chromatography in Organic Solvents. Alle von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala 1980, 1978
L. Fischer, Gel Filtration Chromatography, T. S. Work, R. H. Burdon (Ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1980
P. W. Holloway, Anal. Biochem. 53, 304 (1973)
W. W. Yan, J. J. Kirkland, D. D. Bly, Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, Wiley, New York 1979

2.2. ТОНКОСЛОЙНАЯ (ТСХ) И БУМАЖНАЯ (БХ) ХРОМАТОГРАФИЯ

Оба метода основаны на различии скоростей перемещения компонентов анализируемой смеси в плоском тонком слое сорбента при движении по нему растворителя (элюента). Растворитель перемещается по сорбенту под действием капиллярных или гравитационных сил.

Физические основы метода

В сущности оба метода, ТСХ и БХ, представляют собой процесс разделения в тонком слое сорбента. Разница между ними заключается лишь в способе формирования рабочего слоя. В ТСХ слой сорбента наносят на поддерживающую подложку (пластинку, пленку). В БХ роль рабочего слоя выполняет лист специальной бумаги (для хроматографии). Преимущество ТСХ заключается в том, что при небольших затратах можно быстро и эффективно проводить разделение различных сложных смесей. Пластины для хроматографии производятся промышленным способом. Методики для самостоятельного приготовления пластинок можно найти в монографиях [8, 9, см. разд. 2.2.8].

Разделение в ТСХ осуществляется вследствие многократного пересечения молекулами веществ границы фаз Т — Ж или Ж — Ж, т. е. вследствие многократного процесса распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами. Неподвижной фазой служит либо сухой сорбент (адсорбционная хроматография), либо сорбент, покрытый жидкой фазой, например слоем воды (распределительная хроматография). Систему растворителей подбирают в соответствии со свойствами разделяемых веществ.

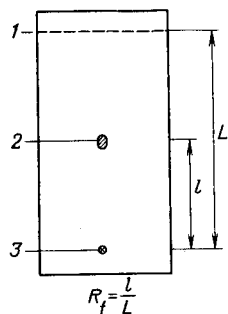


Рис. 2.2/1. Пластика ТСХ:

1 — фронт растворителя; 2 — пятно целевого вещества; 3 — стартовая точка; L — расстояние от стартовой точки до фронта; l — расстояние от стартовой точки до пятна целевого вещества

Следует запомнить, что полярные вещества следует разделять в полярных растворителях, малополярные — в менее полярных или неполярных растворителях.

В различных системах растворителей вещества обладают различной подвижностью. Количественно подвижность выражается величиной R_f , иначе называемой фактором удерживания (рис. 2.2/1). R_f равно отношению расстояний от стартовой линии до середины пятна вещества и от стартовой линии до линии фронта растворителя. Значение R_f практически не зависит от длительности проявления, но зависит от множества других факторов (в том числе и от влажности воздуха) и, следовательно, может служить лишь предварительным ориентиром. Большинство химических соединений лишено окраски, и для их обнаружения на пластине используют различные физические и химические методы.

Флуоресценция. Многие ароматические вещества имеют собственную флуоресценцию при 360 нм; при этой длине волны они обнаруживаются в виде желтых флуоресцирующих пятен на темном фоне.

Абсорбция. Большинство готовых ТСХ-пластин содержит люминофоры (такие пластинки помечены индексом Φ_{254}); при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм они светятся равномерным желто-зеленым фоном. Вещества, поглощающие в УФ-области, обнаруживаются в виде темных пятен на светлом фоне.

Химические реакции. Функциональные группы веществ способны вступать в реакции со специфическими реагентами с образованием хромофоров (аминогруппы белков и пептидов проявляются с помощью нингидрина).

Область применения

Разделение веществ на аналитическом (нг, мкг) и полупрепаративном уровне (мг, г) в органической и неорганической химии, биохимии, клинической химии, фармацевтике, при контроле продуктов питания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.2.8.

2.2.1. СОРБЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ТСХ

На ТСХ-пластинках сорбенты закрепляют при помощи органических связующих материалов. Такой слой держится достаточно прочно, на нем можно даже делать пометки мягким карандашом. Результаты разделения хорошо воспроизводятся. Высокое качество пластинок гарантируется лишь при условии правильного хранения (так как слой сорбирует летучие вещества из воздуха). Для большинства экспериментов вполне подходят стандартные пластинки. Пластинки высшего качества (высокоэффективные ТСХ-пластинки или ВЭТСХ-пластинки) используются лишь при количественном анализе. Данные о свойствах наиболее важных сорбентов для ТСХ приведены в табл. 2.2.1/1, свойства реже применяемых сорбентов перечислены в табл. 2.2.1/2.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.2.8.

2.2.2. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ТСХ

Основы метода

ТСХ позволяет проводить анализ веществ в пределах 1—10 мкг, а на ВЭТСХ-пластинках — в пределах нескольких нанограммов. Стартовое пятно должно иметь минимальные размеры при оптимальной нагрузке (см. разд. 2.2.8), так как при проявлении пластинки пятна размываются вследствие броуновского движения молекул вещества. Если пробу предполагается хроматографировать на силикагеле или оксиде алюминия (адсорбционная хроматография), то образец следует растворять в наименее по-

Таблица 2.2.1/1. Сорбенты для ТСХ

Сорбент	Область применения	Примечания
Силикагель	Разделение неполярных веществ; выделение веществ, обладающих основными свойствами; рекомендуется использовать элюенты с основными свойствами	Поверхность сорбента сильно-полярная; неполярные вещества разделяют методом распределительной хроматографии (см. разд. 2.1.2)
Оксид алюминия	Разделение слабополярных основных веществ	Поверхность сорбента сильно-полярная
Модифицированный силикагель	Разделение полярных веществ в условиях ОФХ	Поверхность покрыта химически связанными углеводородными группами (см. разд. 2.1.1)
Полиамид	Разделение веществ, образующих с амидными группами сорбента водородные связи	Элюирующие свойства растворителей возрастают в следующем ряду: вода < метанол < < ацетон < формамид < диметилформамид

Таблица 2.2.1/2. Свойства сорбентов для ТСХ

Сорбенты	Свойства и область применения	Примечания
Ацелированная целлюлоза	Разделение липофильных веществ (полициклических ароматических углеводородов, антрахиноновых красителей)	Распределительная хроматография в условиях ОФХ; сорбент частично растворим в обычных растворителях (диоксане, ацетоне, эфире)
СМ-целлюлоза	Слабый катионит	Содержит карбоксиметильную группу: $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{O}^-$
DEAE-целлюлоза	Слабый анионит	Содержит диэтиламиноэтильную (DEAE)-группу: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
PEI-целлюлоза	Анионит, применяется для разделения ферментов и нуклеотидов	Содержит функциональную группу — фрагмент полиэтиленамина (PEI): $\begin{array}{c} + \\ (\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}) \\ \\ \text{H} \end{array}$
ЕСТЕОЛА-целлюлоза	Анионит	Более слабый анионит по сравнению с DEAE-целлюлозой
IONEX-смешанный ионит	Смесь кислого и основного ионообменника на основе силикагеля	

лярном растворителе, например гексане (рис. 2.2.2/1). В этом случае вещество сорбируется на носителе сразу после выхода из капилляра и формирует точечное стартовое пятно. Если образец растворяется в неполярном растворителе не полностью, то плохо растворимые компоненты смеси зарегистрировать не удастся и данные о составе смеси недостоверны.

Прежде чем начать проявление, необходимо полностью удалить с пластинки растворитель, в котором наносили пробу. Для этого при анализе термостабильных веществ используют фен или помещают пластинку на короткое время в сушильный шкаф, а при анализе нестабильных веществ пластинку высушивают в вакуум-эксикаторе. Последовательность операций при нанесении пробы показана на рис. 2.2.2/2. При нанесении пробы рекомендуется: наносить минимальный объем (примерно 1 мкл); при хроматографии на силикагеле или оксиде алюминия растворять образец в наименее полярном растворителе (см. рис. 2.2.2/1); пробу наносить узким капилляром (внутренний диаметр не более 0,5 мм) или подавать ее небольшими порциями при помощи шприца;

при разделении на ВЭТСХ-пластинках для точного дозирования пробы применять микродозаторы — аппликаторы (см. разд. 2.2.4), рассчитанные на несколько нанолитров.

Рис. 2.2.2/1. Зависимость формы и размера стартового пятна малополярного вещества от полярности растворителя (сорбент — силикагель или оксид алюминия):

1 — растворитель — н-гексан; 2 — растворитель — бензол; 3 — растворитель — хлороформ; 4 — растворитель — ацетон [Götz, Sachs und Wimmer, Dünnschichtchromatographic, Gustav Fischer, Stuttgart 1978, S. 14, Abb. 6]

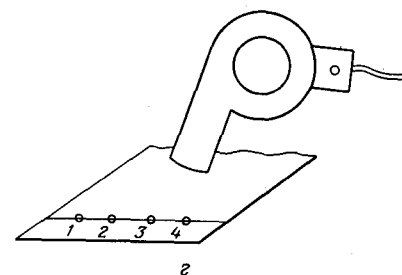
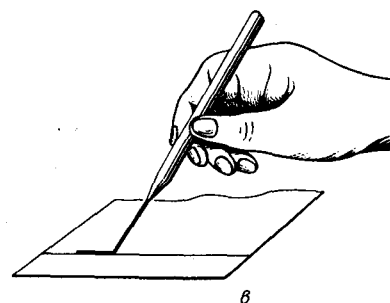
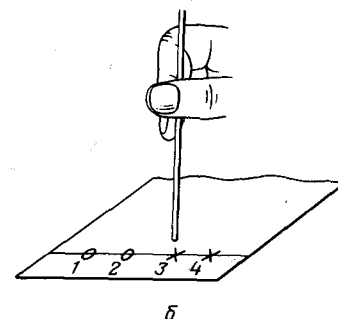
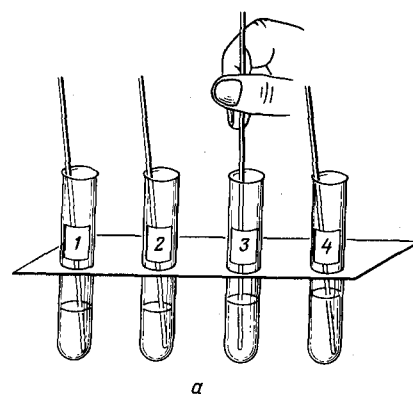
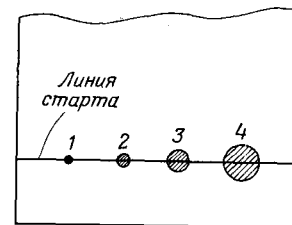


Рис. 2.2.2/2. Последовательность операций при нанесении пробы на пластинку для ТСХ:

а — отбор пробы (для каждого образца необходим отдельный капилляр); б — нанесение в точку; в — нанесение полосой; г — высушивание стартовой зоны [D. Abbott, R. S. Andrews, An Introduction to Chromatography, Longmans, Green and Co., London, Fig. 6, p. 10]

В большинстве случаев вполне достаточно использовать обычные калиброванные капилляры на 1—5 мкл. Поскольку аппликаторы довольно дороги и их применение имеет смысл только при рутинных массовых анализах, были созданы новые типы пластинок, у которых функцию аппликатора выполняет «концентрирующая зона». Пластины с концентрирующей зоной состоят из двух зон: концентрирующей и рабочей. Первая состоит из синтетического диоксида кремния, обладающего слабыми адсорбционными свойствами; ширина зоны составляет около 25 мм, толщина слоя зоны — 0,15 мм; зона в виде полосы расположена вдоль нижнего края пластинки. Вторая зона имеет толщину слоя 0,25 мм. При нанесении пробы в концентрирующую зону образуются вытянутые эллипсообразные пятна, которые при переходе в рабочую (сильно адсорбирующую) зону концентрируются в виде очень узких полосок.

Непосредственно после концентрирования проводят хроматографическое разделение пробы.

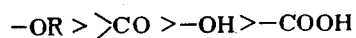
Применение таких пластинок позволяет: исключить экстракцию образца; исключить применение аппликаторов; упростить процедуру нанесения образца (форма стартового пятна не имеет значения); равномерно распределять нагрузку на пластинку (полупрепаративное разделение).

Выбор элюирующих систем

Выбор элюента служит предметом обсуждения только при работе на полярных сорбентах, таких как силикагель или оксид алюминия. В ОФХ выбор элюента не составляет проблемы. В элютронном ряду (см. разд. гл. 4) растворители располагаются в порядке возрастания элюирующих свойств. При этом соблюдаются следующие закономерности:

вещество характеризуется большим значением R_f в более полярных растворителях;

менее полярное вещество характеризуется большим значением R_f ; для веществ со сходными свойствами или соединений одного гомологического ряда R_f возрастает при увеличении числа неполярных групп ($-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$); R_f уменьшается при увеличении числа полярных групп или по мере увеличения полярности функциональных групп:



При элюировании в одном растворителе редко удается достичь удовлетворительного разделения. Более эффективными являются системы, составленные из двух или более растворителей. Поскольку силикагель обладает сродством к полярным веществам, т. е. избирательно удерживает полярные компоненты (из системы растворителей), в рабочем слое наряду с адсорбцией

наблюдается и эффект распределения. По мере продвижения элюирующей смеси по пластинке изменяется ее состав, т. е. формируется градиент полярности растворителя; кроме того, при взаимодействии твердой и жидкой фазы в слое происходят очень сложные процессы, однако эти обстоятельства практически не влияют на конечные результаты, и разделение методом ТСХ дает хорошо воспроизводимые результаты.

Вещества с заряженными группами (амины, карбоновые кислоты) не удается разделить на силикагеле и оксиде алюминия, поскольку оба сорбента имеют собственные ионогенные группы (силикагель получает путем осаждения золя кремневой кислоты). Поэтому при составлении систем растворителей руководствуются общими правилами.

На силикагеле (слабокислотный сорбент) разделяют: соединения с кислотными свойствами в системах, содержащих кислоты (чаще органические — уксусную, муравьиную); соединения с основными свойствами — в системах, содержащих основания (аммиак).

На оксиде алюминия (слабоосновный сорбент) разделяют как соединения с кислотными свойствами в очень кислых системах, так и основные соединения, поскольку на силикагеле они, как правило, необратимо сорбируются.

Условия проведения эксперимента

Воспроизводимость результатов зависит от условий проявления. Разделение проводят в атмосфере, насыщенной парами элюента (в этом случае стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, которую незадолго до эксперимента пропитывают растворителем), или в отсутствие паров элюента. В последнем случае значение R_f больше, поскольку на фронте элюента происходит постепенное испарение растворителя за счет теплоты адсорбции. Поэтому процесс проявления занимает больше времени, а величины пробега разделяемых веществ несколько увеличиваются. Этот метод применяется в том случае, когда вещества в камере, насыщенной парами элюента, имеют очень низкие R_f . Относительно того, какой способ проявления считать оптимальным, мнения специалистов расходятся. Более подробно этот вопрос разбирается в специальной литературе (см. разд. 2.2.8).

В ТСХ практически невозможно обеспечить абсолютную воспроизводимость условий проявления. Слой сорбента обязательно сорбирует пары воды, количество которых зависит от влажности среды. Следы воды особенно мешают при разделении липофильных веществ в неполярных растворителях. Следовательно, сравнивать величины R_f , полученные в различных экспериментах, по крайней мере некорректно и скорее всего нецелесообразно.

Самыми распространенными являются *пластинки* размером 20×20 , 10×20 , 5×20 и 5×10 см. Пластины для ВЭТСХ выпускаются размером 10×10 и 20×10 см. На пластинках размером 20×10 см разделение проводят в поперечном направлении, они предназначены для одновременного анализа множества проб. Синтетические пленки со слоем сорбента выпускаются в виде пластинок квадратной формы и в виде рулонов шириной 20 см.

В зависимости от назначения (анализ или препаративное разделение) применяют пластины со слоями сорбента различной толщины. Пленки для анализа имеют слой толщиной 0,1 и 0,3 мм, пленки для препаративных целей — 0,5 и 2 мм. Для обнаружения веществ, поглощающих в УФ-области спектра, в состав сорбента включают люминофоры (см. разд. 2.2).

Для *нанесения образцов* используют: тонкие капилляры (с внутренним диаметром 0,5 мм); микрошприцы объемом 5—10 мкл; дозирующие шприцы с фиксированным объемом; аппликаторы.

Элюирование проводят в *камерах*, изображенных на рис. 2.2.2/3. Они просты в изготовлении, дешевы и удобны в работе. Иногда используют сэндвич-камеры (рис. 2.2.2/4), которые представляют собой рабочую и покровную пластины, отделенные промежуточной рамкой и помещенные в обычную камеру или специальную кювету. В сэндвич-камерах процесс идет в отсутствие паров элюента. Результаты воспроизводятся лучше, чем в обычных камерах. Иногда используют камеры для радиальной хроматографии.

При обнаружении анализируемых веществ используют пульверизаторы (рис. 2.2.2/5).

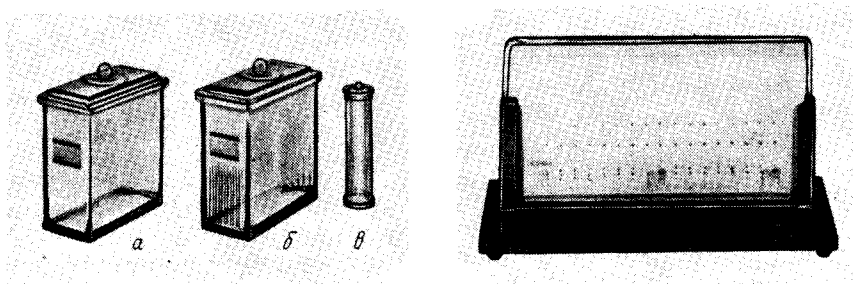


Рис. 2.2.2/3. Камеры для ТСХ (Desaga GmbH, Heidelberg):

а — стандартная камера для пластинок размером 20×20 см; б — камера для пяти пластинок; в — камера для пластинок размером 5×20 см

Рис. 2.2.2/4. Сэндвич-камера (Desaga GmbH, Heidelberg)

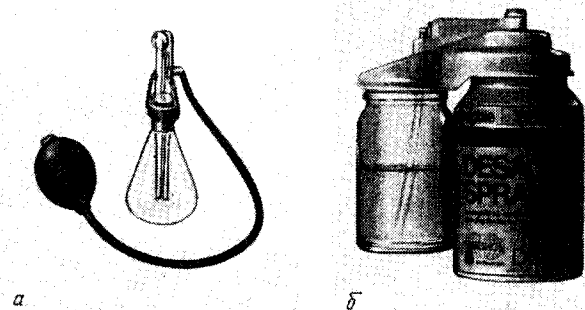


Рис. 2.2.2/5. Пульверизаторы для обнаружения зон целевых веществ в ТСХ и БХ:

а — простейший лабораторный пульверизатор; б — пульверизатор фирмы Desaga GmbH (Heidelberg)

Порядок выполнения операций

Нанесение пробы и проявление пластинки. Для отбора необходимого объема пробы (1—5 мкл) капилляр погружают в раствор образца, который под действием капиллярных сил заполняет часть капилляра.

Избыток раствора отбирают при помощи фильтровальной бумаги; более точно необходимый объем можно отмерить с помощью шприца.

Капилляром осторожно касаются слоя сорбента на стартовой линии, при контакте образуется круглое пятно, диаметр которого не должен превышать 2 мм.

Остаток раствора из капилляра отбирают фильтровальной бумагой.

В камеру, выложенную по стенкам фильтровальной бумагой, помещают элюент (высота слоя 1 см) и, покачивая камеру, смачивают листы бумаги. В случае легколетучих растворителей время насыщения составляет 10—15 мин.

В камеру помещают пластинку, причем стартовая линия не должна быть погружена в растворитель.

Если растворимость пробы недостаточно высокая, то ее растворяют в большем объеме, разбавленный раствор наносят порциями по 1—2 мкл, высушивая каждый раз стартовое пятно при помощи фена (см. рис. 2.2.2/2).

По достижении фронтом растворителя высоты 10—15 см пластинку извлекают, отмечают положение фронта и высушивают.

Обнаружение. Наряду с ранее упомянутыми физико-химическими методами (см. разд. 2.2) для обнаружения применяются разнообразные реагенты, образующие с анализируемыми веществами окрашенные продукты. Пластинку равномерно опрыски-

Рис. 2.2.2/6. Бокс для опрыскивания пластинок (Desaga GmbH, Heidelberg)



вают раствором реагента, а затем выдерживают при комнатной или повышенной температуре. Флакон с готовым к употреблению проявителем изображен на рис. 2.2.2/5. Опрыскивание хроматограмм проводят в хорошо вентилируемом шкафу. При этом исключается попадание токсичных или канцерогенных аэрозолей в

дыхательные пути или на кожу. В вытяжном шкафу желательно иметь специальный бокс, в котором можно опрыскивать пластинку с расстояния 30 см, перемещая пульверизатор круговыми движениями. Бокс предохранит вытяжной шкаф от воздействия агрессивных реагентов (рис. 2.2.2/6). При количественном анализе методом ТСХ необходимо обеспечивать равномерное распределение реагента по поверхности пластинки. Для этого готовые пластинки с надежно закрепленным слоем можно погружать в раствор реагента. Часто реакция окрашивания протекает лишь при повышенной температуре. При качественном анализе пластинку нагревают в сушильном шкафу; при количественном анализе нагрев проводят в строго контролируемых условиях, на специальных нагревателях. За изменением окраски следят визуально и по достижении оптимальной интенсивности прекращают нагрев.

Идентификация анализируемых веществ. Уже на основании собственной флуоресценции веществ в УФ-свете можно сделать предварительное заключение о классе веществ. Дополнительные сведения о типе функциональных групп получают при обработке пластинки специфическими реагентами (см. библиографический список к разд. 2.2.8). Иногда связующие компоненты уменьшают интенсивность окраски. В этом случае рекомендуется использовать другой тип пластинок.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят хроматограммы, срисованные на кальку или фотокопированные. Далее записывают следующие сведения: тип сорбента, название фирмы-изготовителя; состав элюента (включая режим насыщения камеры); положение стартовой линии, положение пятен (по возможности тип и интенсивность окраски), положение фронта растворителя; способ обнаружения (тип реагента).

В научных публикациях результаты анализа методом ТСХ приводятся в следующем виде: вещество X гомогенно при ТСХ

[R_f 0,5, хлороформ — метанол 7:3 (V:V), силикагель]. V:V означает, что растворитель смешивали в указанном объемном соотношении.

В экспериментальной части работы указывают тип пластинки и способ обнаружения пятен. Если условия проявления не указаны, то считают, что пластинку проявляли в камере, насыщенной парами элюента. Для регистрации окрашенных пятен удобно использовать поляроид-камеру. Подобное описание приемов снятия фотокопий с хроматограмм можно найти в работе [6, см. разд. 2.2.8].

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.2.8.

2.2.3. ПРЕПАРАТИВНАЯ ТСХ

Физические основы метода

Прежде чем приступить к препаративному разделению методом ТСХ, необходимо оптимизировать процесс на аналитическом уровне. В частности, важно исключить перекрывание зон с близкими значениями R_f из-за различной скорости миграции веществ в глубинном и поверхностном слое сорбента (толщина его может достигать 2 мм), что в свою очередь может быть вызвано более интенсивным испарением растворителя с поверхности рабочего слоя. Следовательно, важным направлением оптимизации процесса является достижение полного насыщения объема рабочей камеры парами растворителя. Вторым направлением оптимизации процесса является подбор системы растворителей таким образом, чтобы разница в значениях R_f целевых веществ и примесей была максимальной. Целесообразно оптимизировать нагрузку, способ нанесения и другие параметры процесса.

Существенным преимуществом метода ТСХ по сравнению с колоночной хроматографией является то, что образец не требует никакой предварительной подготовки, т. е. анализу могут подвергаться смеси природных или синтетических соединений, включая первичные экстракты.

Материалы и приборы

Чаще всего используют пластинки размером 20×20 см с нанесенным слоем силикагеля, реже — оксида алюминия (толщина слоя до 2 мм) или целлюлозы (толщина слоя до 0,5 мм). В опытных производствах применяют пластинки размером 20×100 см.

Образец наносят, используя следующие приспособления: пипетки и линейки; микроаппликаторы и аппликаторы (рис. 2.2.3/1); автоматические аппликаторы (рис. 2.2.3/2). Образец объемом до нескольких миллилитров наносят в виде штриховой линии, больший объем — в виде сплошной линии. Нанесение образца при

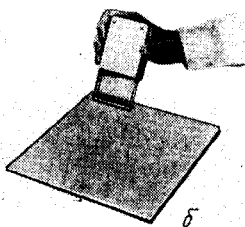
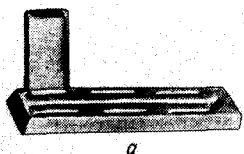
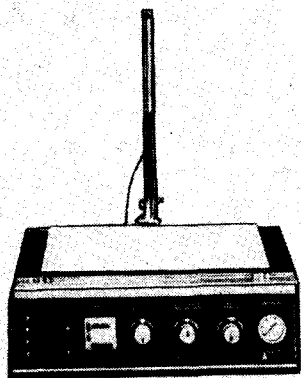


Рис. 2.2.3/1. Аппликаторы для нанесения образца полосой (Desaga GmbH, Heidelberg):

а — микроаппликатор для нанесения 10—50 мкл водного или органического раствора пробы; б — аппликатор для нанесения более 40 мкл раствора полосой длиной 60 мм

Рис. 2.2.3/2. Автоматический аппликатор (Autoliner 75, Desaga GmbH, Heidelberg)



помощи пипетки и линейки требует определенных навыков. Проще и быстрее наносить пробу при помощи микроаппликаторов и аппликаторов (особенно в случае разбавленных растворов), а также автоматических аппликаторов (объем пробы 1—5 мл) для нанесения в точку или полосой.

Пластины проявляют в камерах соответствующих размеров: в стандартных камерах для пластинок размером 20×20 см (рис. 2.2.3/3, а, б), в специальных камерах для пластинок размером 20×100 см.

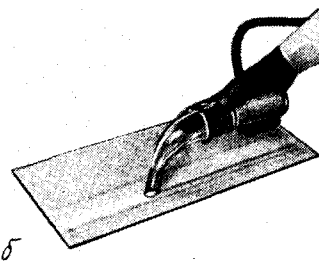
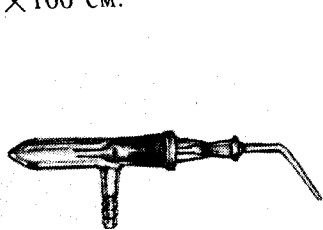


Рис. 2.2.3/3. Вакуумный сборник (Desaga GmbH, Heidelberg): а — сборник для извлечения пятен; б — сборник для извлечения зон

Для извлечения сорбента с веществом используют обычный шпатель (если препаративное разделение проводят редко) или вакуумный сборник (см. рис. 2.2.3/3), в котором сорбент с целым веществом практически без потерь увлекается потоком воздуха непосредственно на нутч-фильтр. Отделенный сорбент с веществом переносят в небольшую хроматографическую колонку и элюируют подходящим растворителем.

Порядок выполнения операций

Последовательность выполнения операций аналогична последовательности, описанной в разд. 2.2.2. Исключение составляет процесс нанесения путем погружения пластинки в раствор пробы.

Нижний край пластинки погружают в раствор разделяемой смеси на глубину 1 мм. По достижении фронтом раствора высоты 2 см пластинку извлекают и высушивают феном. Операцию повторяют до тех пор, пока не будет нанесено необходимое количество вещества, распределенного в виде зоны шириной 2 см.

Пластинку устанавливают вертикально в камеру, содержащую полярный растворитель (в случае полярного сорбента), например метанол, ацетон. В результате кратковременного элюирования образец концентрируется в виде узкой полоски на фронте растворителя. В случае необходимости процесс повторяют.

Растворитель удаляют (например, феном), а затем проявляют пластинку в подходящей системе растворителей.

Обнаружение проводят, исходя из свойств целевого вещества: в УФ-области спектра (при 254 нм при наличии в сорбенте люминофора, при 365 нм при наличии у целевого вещества собственной флуоресценции) или при помощи химических реакций. В случае опрыскивания реагентами пластинку предварительно покрывают стеклом, оставляя свободными краевые контрольные полоски. Краевые полоски опрыскивают реагентом (иногда несколькими реагентами) и отмечают положение зон. Зоны, соответствующие целевому веществу, извлекают.

Область применения

Выделение всех классов веществ (от 1 мг до 10 г).

Выделение небольших количеств веществ из реакционной смеси для последующего анализа при помощи физико-химических методов (УФ-, ИК-спектроскопии, или ЯМР-спектроскопии).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.2.8.

2.2.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ ТСХ

Количественная ТСХ включает в себя два одинаково важных этапа работы: разделение смеси веществ и их количественное определение.

Количественное определение химически чистых веществ в общем достаточно несложно. Смеси предварительно разделяют на составляющие компоненты, причем количественно, или по крайней мере воспроизводимо, и после разделения проводят количественный анализ. В ТСХ эти операции удачным образом совмещаются в едином процессе, поэтому для анализа требуется от нескольких микрограмм до нескольких наногрмм образца. Хроматографию на пластинках проводят в очень мягких условиях, что позволяет анализировать нестойкие вещества, не переносящие длительных манипуляций.

Полуколичественный анализ может быть выполнен сравнительно быстро с использованием простых процессов и несложных приборов. Для строгого количественного анализа необходимы дорогостоящие аппликаторы и точная измерительная аппаратура. Необходимость использования аппликаторов связана с тем, что в количественной ТСХ ошибки при нанесении пробы сказываются на абсолютных результатах измерения. Размывание стартовых пятен снижает разрешение (качество разделения), а также чувствительность при обнаружении. Необходимо строго следовать рекомендациям, приведенным в разд. 2.2.2. Для стандартных пластинок объем пробы должен составлять 0,5—2 мкл, для ВЭТСХ-пластинок — не превышать 0,1 мкл.

Количество вещества в одном пятне должно быть минимальным, поскольку при местной перегрузке разрешение снижается (см. разд. 2.2.8). Для стандартных пластинок верхний предел нагрузки на пятно должен составлять 0,5—2 мкг, для ВЭТСХ-пластинок 0,1—0,5 мкг.

Расстояние старт — фронт для стандартных пластинок должно составлять 10—15 см, для ВЭТСХ-пластинок — 3—5 см. Превышение указанного расстояния снижает качество разделения, так как выгода от увеличения числа теоретических тарелок сводится на нет за счет диффузии.

Методы ТСХ позволяют анализировать одновременно несколько образцов.

Приборы

Для нанесения пробы необходимо иметь шприцы с регулируемым объемом от 100 нл до 1 мкл, или же располагать аппликаторами. В случае ВЭТСХ-пластинок при условии воспроизводимого нанесения точных объемов пробы можно обойтись и без аппликаторов.

Для оценки хроматограмм необходим денситометр (сканер) по возможности в блоке с ЭВМ. Обычно пластинку сканируют в продольном направлении (рис. 2.2.4/1, а) узким пучком света, вытянутым параллельно стартовой линии (длина щели) и сжатым

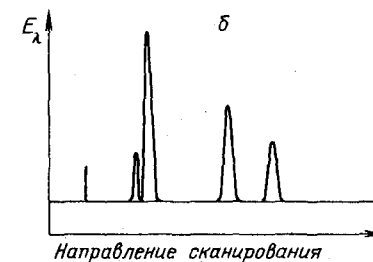
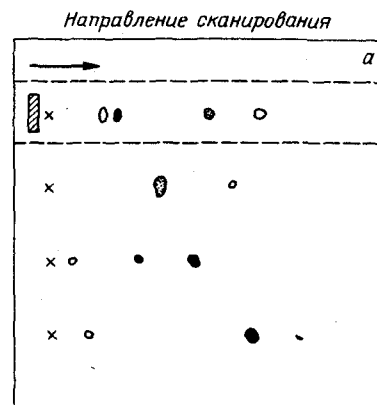


Рис. 2.2.4/1. Сканирование пластинок ТСХ:

а — линейное сканирование; б — хроматограмма на ленте самописца

в направлении сканирования (ширина щели). Длина волны источника света должна соответствовать области поглощения анализируемых веществ. По длине щель должна быть сопоставима с размерами сканируемых пятен с тем, чтобы не захватывать пятна соседних участков. Результаты сканирования более стабильны, если длина щели меньше диаметра пятна. Стартовые зоны должны быть компактными, а пробег — минимальным. Этим условиям вполне удовлетворяет разделение на ВЭТСХ-пластинках. Кроме того, стартовые зоны должны располагаться на достаточном расстоянии друг от друга. Ширина щели также должна быть мини-

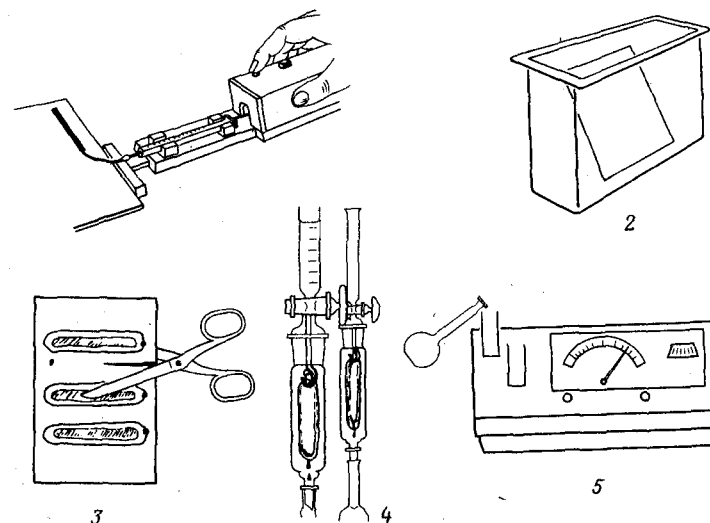


Рис. 2.2.4/2. Порядок выполнения операций (Desaga GmbH, Heidelberg):

1 — нанесение пробы; 2 — разделение; 3 — вырезание зон; 4 — элюирование; 5 — анализ

мальной: сигнал при этом уменьшается, однако результаты анализа улучшаются. В особенности это относится к сканированию ВЭТСХ-пластинок с концентрирующими зонами, на которых пятна располагаются вдоль участка очень плотно.

Работу в ТСХ можно проводить также при помощи *простейших приемов* (рис. 2.2.4/2).

Порядок выполнения операций

Полуколичественный анализ

Метод сравнения. Готовят серию стандартных растворов различной концентрации (например, с концентрациями 1, 2, 4, 8... мг·мл⁻¹). Наносят их с определенными интервалами на пластинку (по 2 мкл), в промежутки между ними наносят пробу (раствор определенной концентрации). После проявления хроматограммы сравнивают интенсивность окраски и размеры пятен и на этом основании оценивают концентрацию анализируемого вещества.

Метод определения размеров пятен. Существует зависимость при одинаковых размерах стартовых пятен (после проведения разделения методом ТСХ): корень квадратный из площади пятна F пропорционален логарифму концентрации вещества в пятне C , т. е. $\sqrt{F} \sim \lg C$.

На основании этой зависимости строят калибровочную кривую для серии стандартных растворов. На оси абсцисс откладывают значение корня квадратного из площади пятен стандартных растворов, на оси ординат — значение $\lg C$. Определяют площадь пятна анализируемого образца и по калибровочному графику находят количество целевого вещества в пятне. Определение площади пятна целевого вещества проводят следующим образом: после проявления на пластинку помещают лист прозрачной миллиметровой бумаги и определяют площадь пятна в мм². Точное значение находят, обводя пятно при помощи планиметра.

Погрешность метода составляет 4—10%. Она может быть уменьшена путем усреднения результатов многократных замеров.

Количественный анализ

Метод экстракции пятен. Пластинку с пятном целевого вещества помещают под УФ-лампу (254 нм) и пятно обводят по периметру мягким карандашом. Сорбент в пределах отмеченной области извлекают шпателем и при помощи воронки переносят в центрифужную пробирку. Добавляют точный объем полярного растворителя, тщательно перемешивают и центрифугируют. Жидкость над осадком переносят пипеткой в кювету и фотометрируют (см. разд. 3.4.1).

Более точные результаты получаются при извлечении сорбента при помощи вакуумного сборника (см. рис. 2.2.3/3, а), или пу-

тем прямого элюирования с пластинки (см. рис. 2.2.4/2): пробу наносят аппликатором количественно в виде сплошной линии (используют сорбент на фольге); пластинку проявляют; хроматограмму помещают под УФ-лампу (254 или 360 нм) и зоны обводят мягким карандашом; несколько больший, чем зона целевого вещества, участок фольги вырезают и элюируют в специальной насадке (элюент стекает сверху вниз непосредственно по слою сорбента); элюат анализируют подходящими методами (фотометрия, микротитрование, полярография и т. п.).

Вследствие нанесения пробы в виде сплошной линии удается провести разделение в пределах нескольких миллиграмм. Этого количества вполне достаточно для проведения спектрофотометрического анализа.

При работе с ультрамикроколичествами веществ дополнительно извлекают участок сорбента, расположенный вблизи анализируемого пятна. Этот ненагруженный сорбент промывают и элюат используют в качестве фона.

При высушивании пластинок возможна частичная необратимая сорбция материала, вследствие чего выход целевого вещества при экстракции составляет менее 90%. Погрешность метода составляет около 5%.

Оптические (прямые) методы анализа. Существенное значение наряду с точностью дозирования пробы имеет качество пластинок. Пластины должны иметь однородный слой на всей площади сканирования (у фирменных пластинок это качество гарантируется), возможно более равномерную поверхность, что снижает уровень фона (это качество гарантировано у ВЭТСХ-пластинок). В слое сорбента должны отсутствовать посторонние примеси (обычно пластинки сорбируют примеси из воздуха). Для очистки сорбента пластинку промывают метанолом и собирают примеси, которые проявляются в виде узкой зоны на фронте растворителя (в некоторых случаях промывание повторяют многократно). Затем пластинку высушивают в вакуум-эксихаторе и хранят в нем до употребления. Для экспериментов используют только очищенные растворители (в случае необходимости растворитель пропускают через оксид алюминия, см. разд. 4.1).

При нанесении пробы не следует повреждать слой сорбента (повреждение слоя приводит к деформации пятен); необходимо следить за тем, чтобы размеры пятен были одинаковыми.

При обнаружении с помощью химических методов необходимо равномерно наносить реагент (лучше всего погружать пластинку в раствор реагента).

Количественную оценку хроматограмм проводят при помощи денситометров. Различают два способа регистрации пятен — по интенсивности проходящего света и по интенсивности отраженного света. Из-за сильного рассеивания УФ-света подложкой пластины сканирование в проходящем свете проводят только в

видимой части спектра. При измерении интенсивности проходящего света сравнивают ослабление света в зоне, содержащей вещество, с ослаблением света в зоне ненагруженного слоя сорбента (рис. 2.2.4/3, а). При измерении интенсивности отраженного света на фотоумножителе регистрируют интенсивность отраженного света. Для зон с целевым веществом она уменьшается пропорционально концентрации (рис. 2.2.4/3, б). Такой способ регистрации целесообразно применять при сканировании в УФ-свете (до 200 нм).

При наличии соответствующих приборов (рис. 2.2.4/3, в) оба способа можно объединить. При этом сигналы, получаемые за счет неравномерности слоя сорбента (фоновые сигналы), компенсируются, а сигналы, относящиеся к целевым веществам, суммируются. Таким образом достигается отчетливый сигнал измерения на практически незаметном фоне.

При облучении УФ-светом определенной длины волны вещества, имеющие флуоресцирующие группы (собственные или введенные дополнительно), флуоресцируют. Существует метод ана-

лиза, основанный на измерении интенсивности флуоресценции. Интенсивность флуоресценции регистрируют при помощи прибора, схема которого приведена на рис. 2.2.4/4. Этот метод определения прямой флуоресценции является чувствительным и не так сильно зависит от других факторов, как рассмотренные ранее оптические методы.

Существует метод анализа, основанный на регистрации тушения.

Флуоресценции. Измерение ведется при помощи того же прибора, что и в случае прямой флуоресценции. Однако пластинка должна содержать люминофор (длина волны возбуждения 254 нм), а анализируемые вещества должны иметь максимум поглощения при этой длине волны. По чувствительности метод уступает прямой флуоресценции, большое значение здесь имеет равномерное распределение люминофора по площади пластинки.

Анализ результатов

Поскольку зависимость между количеством вещества и сигналом детектора не является линейной, то предварительным этапом работы является построение калибровочного графика. Для этого готовят серию растворов анализируемого вещества различной концентрации, пробы этих растворов наносят на пластинку, проявляют, сканируют, в результате чего получают хроматограм-

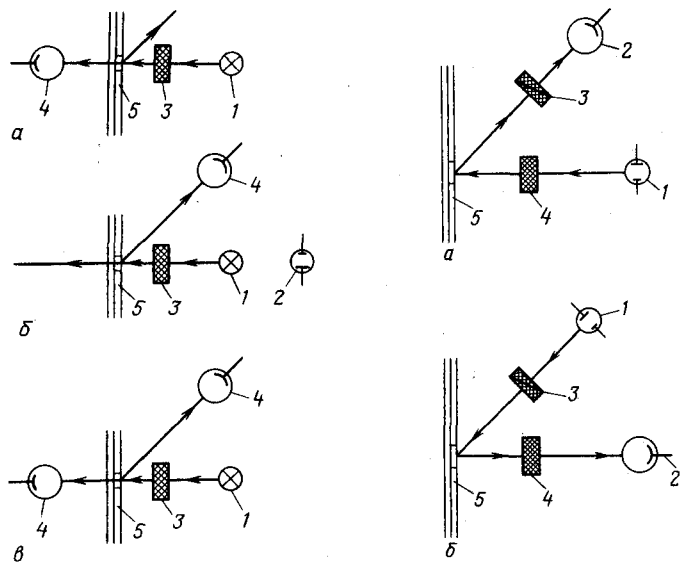


Рис. 2.2.4/3. Схема работы денситометра:

а — определение по интенсивности пропускания; б — определение по интенсивности отражения; в — сочетание способов а и б; 1 — вольфрамовая лампа; 2 — ртутная или дейтериевая лампа; 3 — монохроматор; 4 — фотоумножитель; 5 — слой сорбента

Рис. 2.2.4/4. Схема измерения интенсивности флуоресценции (а) и тушения флуоресценции (б):

1 — ртутная или ксеноновая лампа; 2 — фотоумножитель; 3 — светофильтр; 4 — монохроматор; 5 — слой сорбента

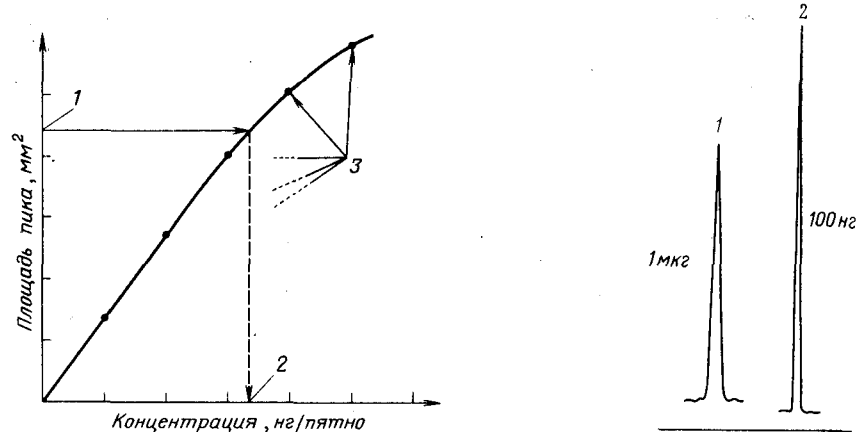


Рис. 2.2.4/5. Калибровочный график:

1 — площадь пика анализируемого вещества; 2 — концентрация анализируемого вещества в пятне; 3 — опорные точки на калибровочном графике

Рис. 2.2.4/6. Сравнение сигналов при сканировании стандартных и ВЭТСХ-пластинок с нанесенным образцом кофеина (отражение при 285 нм) (Merck, Darmstadt):

1 — ТСХ-пластинка, нагрузка 1 мкг; 2 — ВЭТСХ-пластинка, нагрузка 100 нг

му, площади пиков которой определенным образом зависят от концентрации вещества в растворе. Строят калибровочный график (рис. 2.2.4/5): на оси ординат откладывают значения площадей пиков (их определяют методами взвешивания, планиметрии или расчета по геометрическим параметрам), на оси абсцисс — значение концентраций. По калибровочному графику можно определить концентрацию анализируемого вещества в пробе, исходя из результатов сканирования пластинки с образцом.

Наряду с денситометрами, где сканирующий луч формируется при помощи щели, используются спектрофотометры с точечным (лазерным) световым пучком.

При анализе пробы оптическими методами (рис. 2.2.4/6) ВЭТСХ-пластинки наиболее предпочтительны. Хорошо видно, что при 10-кратном снижении нагрузки интенсивность сигнала при сканировании высокоэффективных пластинок несколько выше, чем при сканировании стандартных пластинок. Кроме того, ВЭТСХ-пластинки дают низкий фон.

Область применения

Количественное определение отдельных компонентов в составе сложных смесей в следующих областях: клинической химии; производстве продуктов питания; производстве химических продуктов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.2.8.

2.2.5. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ТСХ

Радиальная хроматография

Пробы и стандарты наносят вдоль окружности небольшого диаметра в середине ВЭТСХ-пластинки размером 5×5 или 10×10 см. Проявление проводят в специальной камере, схематически изображенной на рис. 2.2.5/1. Растворитель при помощи наноса подается на сорбент в центр пластинки. В отличие от линейного элюирования, когда пятна по мере продвижения по слою размываются (разрешение невысокого качества), в этом случае зоны по мере отдаления от центра становятся уже и, наконец, превращаются в тонкие дуги и слегка выпрямляются (разрешение высокое). При этом высокое разрешение зон достигается для веществ с небольшими значениями R_f . Как следует из диаграммы (рис. 2.2.5/2), нагрузки здесь выше по сравнению с линейной хроматографией. Вместо R_f в качестве характеристики вещества используется величина RR_f . Для проведения количественного анализа здесь также применяются аппликаторы и денситометры.

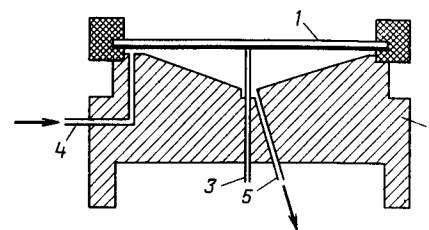


Рис. 2.2.5/1. Схема U-камеры (Fa. Camag, Muttentz Schweiz):

1 — ВЭТСХ-пластинка (слой сорбента обращен вниз); 2 — камера; 3 — центральный капилляр для подачи элюента; 4 — капилляр для подачи воздуха, насыщенного парами элюента; 5 — вывод паров элюента

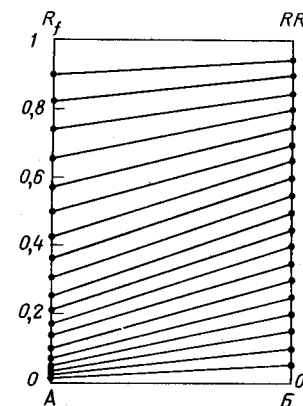


Рис. 2.2.5/2. Сравнение эффективности ТСХ при линейном и радиальном элюировании:

A — проявление линейное; B — проявление радиальное [Blome J., High Performance Thin Layer, Chromatography, цитировано по Zlatkis A. and Kaier A. E., in J. of Chromatography Library 9, 63 (1977)]

Сочетание ТСХ с ИК-спектроскопией

Сочетание этих двух методов позволяет идентифицировать вещества на микроуровне, а также определять природу функциональных групп веществ (см. разд. 3.2.2.1). Разработана методика приготовления препарата для снятия ИК-спектра:

с помощью пинцета пирамидку бромид калия устанавливают в стеклянную ювету;

сорбент с анализируемым веществом распределяют у основания пирамидки;

прибавляют 2—3 капли подходящего растворителя (квалификации для спектрального анализа);

ювету накрывают колпачком из нержавеющей стали с отверстием посередине; растворитель, поднимаясь по пирамидке, увлекает растворенное вещество к вершине, откуда испаряется спустя 20—30 мин; все низкомолекулярные примеси и коллоидные частицы удерживаются материалом пирамидки;

после полного испарения растворителя вершину пирамидки высотой примерно 1—2 мм отламывают и тщательно растирают в агатовой ступке;

в заключение пробу подсушивают в вакуум-эксикаторе или под ИК-лампой и вновь прессуют в виде таблетки (см. разд. 3.2.2.1).

Во избежание ошибок необходимо соблюдать принятые в аналитической химии правила. Бромид калия является реакционно-способным веществом, поэтому он чувствителен к действию растворителей, аммиака, влаги; хранить его следует в эксикаторе.

Недопустим контакт бромида калия с синтетическими материалами и пылью, манипулировать с пирамидкой можно только при помощи пинцета.

Проточная ТСХ

Метод применяют в том случае, если расстояния старт — фронт растворителя, равного 17 см, недостаточно для разделения смеси. Пластинку сорбентом вниз помещают горизонтально в плоскую камеру (BV-камера, Desaga). Система растворителей подается из кюветы с помощью полосок фильтровальной бумаги к одному концу пластинки. Противоположный конец пластинки слегка сдвинут по отношению к покровному стеклу, за счет чего растворитель непрерывно испаряется. Процесс испарения можно ускорить с помощью легкого нагрева. Таким способом удается разделить зоны с очень низкими значениями R_f .

ТСХ на пластинках с переменными свойствами

С помощью специальных аппликаторов можно приготовить пластинки с переменными свойствами рабочего слоя сорбента. Это может быть плавная смена типа сорбента (кизельгур — силикагель), состава пропитки или величины pH. Такие пластинки можно проявлять вдоль градиента и во встречном направлении по отношению к градиенту. При движении растворителя навстречу градиенту (T -градиент) в ходе эксперимента можно определить оптимальный состав сорбента, концентрацию пропитки или величину pH.

В градиентном сорбенте можно разделять смеси веществ с различной полярностью, что обычно удается только с помощью двумерного проявления или ступенчатой элюции. Как правило, полярные вещества с низкими R_f занимают нижнюю часть пластинки. На слое переменного состава (кизельгур — силикагель) полярные вещества могут быть разделены в зоне неактивного сорбента (при разделении пятна будут постепенно сжиматься в узкие зоны).

Градиентное элюирование

Пластинку помещают в камеру на перфорированную подставку, расположенную под углом к плоскости дна камеры. На дне камеры формируется система растворителей переменного состава: при постоянном перемешивании полярный растворитель подают с помощью насоса к менее полярному. Уровень растворителя поддерживается постоянным при помощи сливной трубки, которая находится под стартовым пятном.

Ступенчатое элюирование

Пластинку проявляют различными растворителями в определенной последовательности, причем в промежутках между циклами слой высушивают. Таким способом удается более четко разделять вещества с различной полярностью.

ТСХ с использованием термопереноса

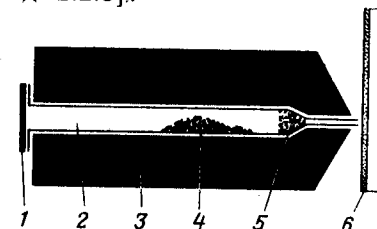
Метод, названный Шталем термопереносом, применяют для формирования стартового пятна на ТСХ-пластинке при работе с летучими и термически устойчивыми веществами. Образец помещают в стеклянный патрон, сужающийся с одного конца, и нагревают в нагревательном шкафу (рис. 2.2.5/3). Летучие вещества испаряются, а затем адсорбируются на пластинке для ТСХ, образуя стартовое пятно. Этот прием заменяет общепринятые способы подготовки пробы: экстракцию, фильтрование, концентрирование и др.

ПРП-метод

Многие вещества в адсорбированном состоянии более реакционноспособны, чем в твердом состоянии или в растворе. Этим можно воспользоваться с целью повышения эффективности ТСХ. Анализируемую смесь наносят в угол пластинки и хроматографируют обычным образом. Затем пластинку за исключением полоски с разделяемой смесью накрывают стеклом. На открытой части слоя проводят химическую реакцию, обрабатывая слой парами реагента или опрыскивая из пульверизатора. В заключение — и это главное отличие от двухмерной хроматографии — проявляют в первоначальном растворителе, но в направлении, перпендикулярном первоначальному. Отсюда сокращенное название метода: проявление — реакция — проявление (ПРП). После второго проявления модифицированные вещества мигрируют в соответствии с их полярностью, а не вступившие в реакцию компоненты смеси располагаются по диагонали. В принципе для этого метода можно применять любые реагенты. Однако предпочтение отдают высокоизбирательным (например, используют фотохимические реакции в УФ-свете, гидролиз, ацетилирование, галогенирование или озонолиз) [7, см. разд. 2.2.8].

Рис. 2.2.5/3. Схема прибора для разделения веществ методом термопереноса (Desaga GmbH, Heidelberg):

1 — заглушка; 2 — стеклянный патрон; 3 — блок нагревательный; 4 — проба; 5 — стеклянная вата; 6 — пластинка для ТСХ



Метод двумерного проявления, обычно применяемый в бумажной хроматографии [см. разд. 2.2.7], может использоваться и в ТСХ. Проявление проводят в двух системах растворителей, причем второй раз в направлении, перпендикулярном первому. Вместо второго проявления можно проводить электрофорез (см. разд. 2.5). Таким способом удастся разделять очень сложные смеси.

2.2.6. ПЕРЕХОД ОТ ТСХ К ХРОМАТОГРАФИИ НА КОЛОНКЕ

Переход от ТСХ к хроматографии на колонке не удастся осуществить путем непосредственного воспроизведения условий эксперимента (тип сорбента, система растворителей и др.). При проявлении на пластинке растворитель частично испаряется, т. е. устанавливается очень сложный градиент растворителей, причем полярные компоненты системы накапливаются в нижней части пластинки, а в верхней ее части преобладают менее полярные компоненты. В колонке сорбент находится в равновесной системе постоянного состава, причем неподвижная фаза состоит преимущественно из полярных компонентов. Тем не менее для силикагеля и оксида алюминия удастся проследить некоторые закономерности.

ТСХ можно моделировать на колонке, заполненной сухим сорбентом, при условии, что образец также наносит на сухой сорбент. Селективность сорбента в ТСХ отчасти объясняется наличием в нем связующих компонентов, в то время как сорбент в колонке их не содержит.

ТСХ в принципе можно моделировать на колонке, если элюирование проводится в одном растворителе, а значение R_f целевого компонента смеси составляет около 0,3. Вещества с большими R_f слабо удерживаются на сорбенте колонки, вещества с меньшими R_f удерживаются слишком прочно. Соответственно требуется больше растворителя, происходит уширение и уплощение пиков.

ТСХ в системе растворителей не удастся моделировать на колонке непосредственно. При переходе к колоночной хроматографии рекомендуется уменьшить на несколько процентов содержание в системе полярного растворителя.

Так как колонка является открытой системой (в отличие от ТСХ-камер), то часть растворителя в процессе работы улетучивается. Если растворитель содержит некоторое количество нелетучего компонента (например, хлороформ содержит 1% этанола, который выполняет роль стабилизатора при транспортировке), то с течением времени нелетучий компонент накапливается, при этом

изменяются свойства растворителя. В связи с этим рекомендуется использовать тщательно очищенные растворители (см. разд. 4.1).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.2.8.

2.2.7. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Бумажная хроматография — метод разделения веществ на листах специальной (хроматографической) бумаги.

Физические основы метода

В бумажной хроматографии разделение происходит по принципу распределительной хроматографии. В качестве неподвижной фазы используется гидратированная целлюлоза, поэтому элюент должен содержать определенное количество воды. Хроматографическая подвижность многих веществ в таком элюенте довольно низкая. Однако ее можно увеличить, включая в состав элюента другие полярные растворители — кислоты (уксусную, муравьиную, хлороводородную) или основания (пиридин, аммиак). Перечень стандартных систем растворителей приведен в табл. 2.2.7/1.

Органический растворитель и вода при смешивании часто образуют двухфазную систему. Водный слой обычно не используют, слой органического растворителя используют в качестве элюента. Этот способ гарантирует насыщение элюента водой. Приготовление однофазных систем является более практичным. Однако при этом следует выдерживать указанные пропорции компонен-

Таблица 2.2.7/1. Системы растворителей, применяемые в БХ и ТСХ (для пластинок с целлюлозой)

Системы растворителей	Объемные соотношения
Основные системы	
н-бутанол — этанол — 2 н. раствор аммиака	3:1:1
пиридин — вода	9:1
Кислотные системы	
н-бутанол — уксусная кислота — вода	6:1:2
этилацетат — уксусная кислота — вода	9:2:2
изомасляная кислота — концентрированный раствор аммиака — вода	66:1:33
метилэтилкетон — уксусная кислота — изопропанол	2:2:1
ацетон — концентрированная хлороводородная кислота — вода	17:2:1
фенол — вода	9:1
Нейтральные системы	
этанол — вода — насыщенный раствор сульфата аммония	3:15:2
этанол — 1 М раствор ацетата аммония	7:3
толуол — диоксан	6:1

тов и тщательно перемешивать раствор. В настоящее время метод БХ все больше вытесняется методом ВЭЖХ.

Способы элюирования

Нисходящая хроматография (рис. 2.2.7/1). Лист бумаги подвешивают в камере, погрузив верхний край в кювету с элюентом. Под действием силы тяжести и капиллярных сил растворитель продвигается сверху вниз и по достижении края листа стекает на дно камеры. Чтобы поток был равномерным, нижний край листа нарезан зубцами (рис. 2.2.7/1, б).

Восходящая хроматография (рис. 2.2.7/2). Этот способ элюирования более напоминает ТСХ (см. разд. 2.2.2). Вследствие слабой механической прочности бумаги лист подвешивают на специальных держателях. Растворитель поднимается до верхнего края листа бумаги за счет капиллярных сил. При этом все компоненты анализируемой смеси остаются в пределах листа. Это особенно важно в том случае, когда разделяют вещества с неизвестной подвижностью. Тогда по полученной хроматограмме можно определить значение R_f всех компонентов смеси (см. рис. 2.2/1). К недостаткам метода относится низкое разрешение малоподвижных компонентов. Проблему в этом случае решают, применяя метод нисходящей хроматографии в режиме потока, когда процесс продолжается сколь угодно долго. В результате вещества даже с очень низкими R_f имеют достаточный для хорошего разделения пробег. Для стандартизации результатов одновременно хромо-

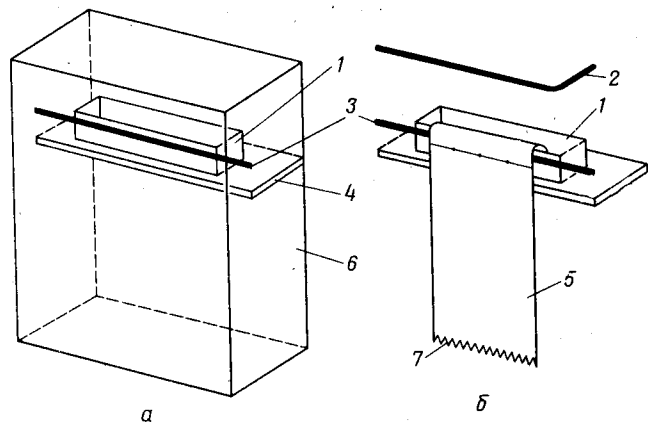
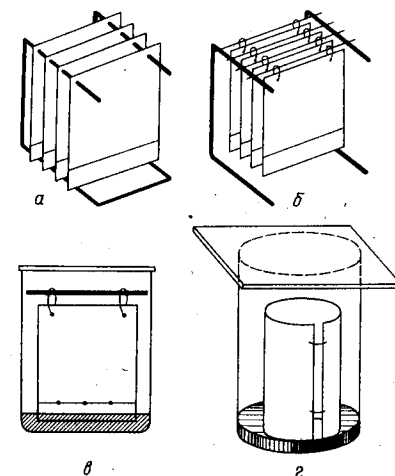


Рис. 2.2.7/1. Камера для нисходящей хроматографии:

а — общий вид камеры; б — расположение листа бумаги; 1 — кювета для элюента; 2 — стеклянная палочка для фиксации листа бумаги в лодочке; 3 — антисифонная палочка; 4 — подставка; 5 — лист бумаги; 6 — камера; 7 — зубцы на бумаге [D. Abbott, Andrews R. S., An Introduction to Chromatography, Longmans, Green and Co., London 1965, Fig. 7 and 8]

Рис. 2.2.7/2. Виды камер для восходящей хроматографии:

а и б — способы фиксации бумаги в держателе; в и г — способы размещения бумаги в камере [Abbott D., Andrews R. S., An Introduction to Chromatography, Longmans, Green and Co., London 1965, Fig. 9]



графируют контрольную смесь или окрашенные вещества с известными R_f .

Обнаружение

Как только растворитель достигает намеченного рубежа, лист извлекают из камеры, отмечают положение фронта растворителя и высушивают. Поскольку большинство веществ лишены окраски, их положение на хроматограмме выявляют подходящим способом. Например, вещества, несущие радиоактивную метку, выявляют при помощи счетчиков импульсов; вещества, имеющие собственную флуоресценцию, выявляют при облучении УФ-светом (365 нм). Остальные вещества обычно обнаруживают по окрашенным продуктам, которые образуются под действием специфических реагентов. Так, аминокислоты и полипептиды образуют с нингидрином хромофор, имеющий фиолетовую окраску (см. разд. 2.2.2).

Препаративная бумажная хроматография

Препаративное разделение методом БХ проводят на более плотной бумаге. После проявления и обнаружения зоны вещества ее можно вырезать и сохранить, или же элюировать целевое вещество подходящим растворителем.

Материалы и приборы

Для БХ выпускаются специальные сорта бумаги различной плотности: обезжиренная бумага для препаративной БХ; ацелированный бумага для проведения распределительной хроматографии на менее полярной неподвижной фазе.

Проявление проводят в *камерах*, так называемых «танках». Камера для нисходящей хроматографии изображена на рис. 2.2.7/1, а системы для восходящей хроматографии — на рис. 2.2.7/2.

Подготовка пробы

Образец растворяют в минимальном объеме подходящего растворителя, после чего проводят деионизацию, так как наличие в образце посторонних ионов часто приводит к появлению на хроматограмме полос. Деионизацию пробы проводят путем осаждения (SO_4^{2-} в виде BaSO_4); путем ионообмена на ионитах (см. разд. 2.1.3); методом гель-хроматографии (при анализе веществ с молярной массой более $500 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$) (см. разд. 2.1.5).

Порядок выполнения операций

Нанесение пробы

На расстоянии 3—5 см от края листа проводят карандашом стартовую линию (см. рис. 2.2.2/2), противоположный край нарезают зубчиками (см. рис. 2.2.7/1, б).

Стартовая линия должна располагаться горизонтально и не иметь перегибов.

Вдоль стартовой линии через каждые 3 см наносят необходимое число проб.

10—20 мкл пробы наносят при помощи пипетки (или капилляра), причем длина стартовой зоны должна быть не более 1 см. В случае разбавленных растворов операцию нанесения повторяют до полного переноса намеченного объема раствора. В промежутках стартовые зоны высушивают феном. После нанесения образца лист готов к проявлению.

Проявление

В направлении сверху вниз (см. рис. 2.2.7/1): растворитель помещают в кювету и на дно камеры (для насыщения камеры парами растворителя); край листа бумаги прижимают в кювете стеклянным стержнем (см. рис. 2.2.7/1, б); лист перегибают через дополнительный стержень так, чтоб исключить контакт влажной бумаги со стенкой кюветы;

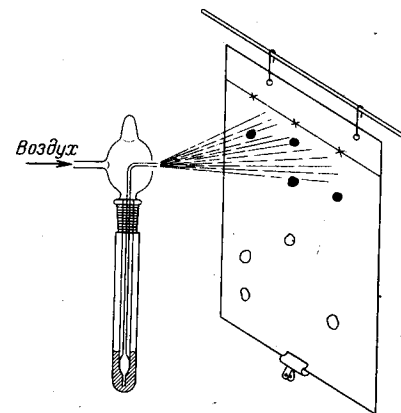
камеру плотно закрывают.

В направлении снизу вверх (см. рис. 2.2.7/2):

растворитель помещают на дно камеры;

лист бумаги закрепляют в держателе (см. рис. 2.2.7/2, а — в) или свертывают в цилиндр (см. рис. 2.2.7/2, г) и помещают в камеру, причем нижний край листа должен быть погружен в растворитель на достаточную глубину; камеру плотно закрывают.

Рис. 2.2.7/3. Опрыскивание хроматограммы реагентом



По окончании процесса проявления лист извлекают из камеры и высушивают. Для обнаружения пятен веществ при помощи химических реагентов лист подвешивают вертикально (рис. 2.2.7/3) и равномерно опрыскивают реагентом из пульверизатора с расстояния 30 см до достижения умеренной степени увлажнения бумаги.

На препаративном уровне

Последовательность выполнения операций при препаративной БХ схематически изображена на рис. 2.2.7/4. После проведения операций проявления и обнаружения зоны, соответствующие целевым веществам, вырезают и элюируют подходящим растворителем.

При нисходящем элюировании элюат собирают в маленький стаканчик (рис. 2.2.7/5, а).

При элюировании с предварительным концентрированием сначала накапливают вещество на конце бумажной полоски (рис. 2.2.7/5, б), пропуская элюент в восходящем направлении, затем полоску сворачивают и подвешивают заостренным концом вниз в центрифужной пробирке. Выступающий над краем пробирки слой бумаги оборачивают вокруг горла пробирки и фиксируют при помощи резинового кольца. При центрифугировании раство-

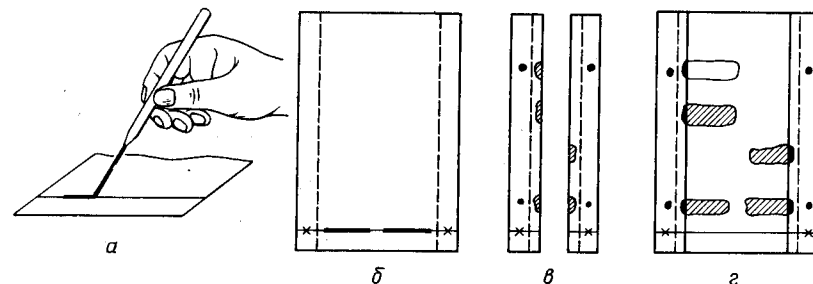


Рис. 2.2.7/4. Порядок выполнения операций в препаративной БХ:

а — нанесение образца полосой; б — расположение стартовых зон (в центре — зоны разделяемых веществ, по краям — пятна контрольных веществ); в — обнаружение пятен веществ на контрольных полосах; г — маркировка зон целевых веществ [Abbott D., Andrews R. S., An Introduction to Chromatography, Longmans, Green and Co., London 1965, Fig. 6, c and 14—16]

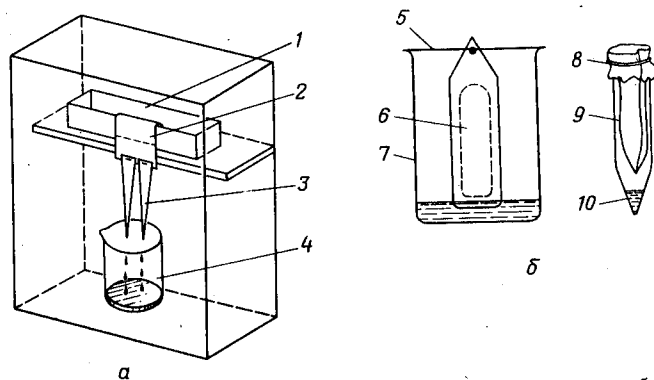


Рис. 2.2.7/5. Способы элюирования целевого вещества с полосок бумаги [3]:
а — нисходящее элюирование; б — элюирование с предварительным концентрированием;
1 — кювета с элюентом; 2 — зона целевого вещества; 3 — зубцы, подшитые к листу;
4 — стакан для сбора элюата; 5 — стеклянная палочка; 6 — зона целевого вещества;
7 — стакан; 8 — резиновое кольцо; 9 — свернутая полоска бумаги; 10 — элюат на дне пробирки после центрифугирования

ритель с целевым веществом собирается на дне пробирки. Элюат хранят в замороженном виде или высушивают лиофильно (см. разд. 1.7).

Двумерная хроматография

Это метод разделения сложных смесей, при котором разделение проводят дважды, причем второй раз в направлении, перпендикулярном первому. В левом верхнем углу квадратного листа бумаги наносят в виде небольшого пятна анализируемый образец (рис. 2.2.7/6). Проводят хроматографию в направлении I, а затем после промежуточного высушивания — в направлении II, перпендикулярном первому, во второй системе растворителей. По сравнению с одномерной хроматографией нагрузка в этом случае гораздо выше. Соответственно стараются подбирать системы растворителей с различной селективностью. По эффективности разделения метод превосходит обычную одномерную хроматографию. Двумерную хроматографию называют фингер-принтом (методом отпечатков пальцев). Тем самым хотят подчеркнуть, что каждая смесь может быть идентифицирована по характерному набору пятен, подобно тому как каждый человек может быть идентифицирован по отпечаткам пальцев.

Оформление результатов

В большинстве случаев сохраняют хроматограмму, при этом на обратной стороне листа указывают сорт бумаги, систему растворителей, способ обнаружения, сведения об анализируемом об-

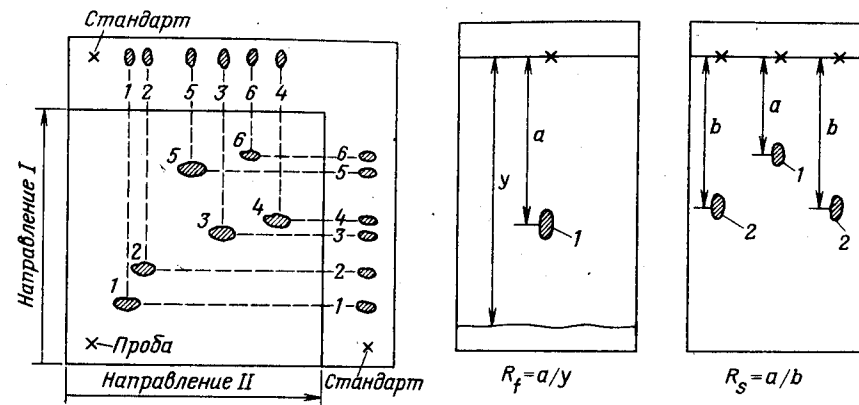


Рис. 2.2.7/6. Проведение двумерной хроматографии с набором контрольных веществ [Götz, Sachs und Wimmer, Dünnschichtchromatographie, Gustav Fischer, Stuttgart 1978, Abb. 8, S. 17]

Рис. 2.2.7/7. Определение величин R_f и R_s :

1 — пятно целевого вещества; 2 — контрольное вещество; а — расстояние старт — пятно целевого вещества; б — расстояние старт — пятно контрольного вещества; у — расстояние старт — фронт растворителя (Abbott D., Andrews R. S., An Introduction to Chromatography, Longmans, Green and Co., London 1965, Fig. 12)

разце. При оформлении результатов эксперимента вещества характеризуют величинами R_f (при условии, что фронт растворителя не покинул пределы листа) (рис. 2.2.7/7, а). В случае нисходящей хроматографии в проточном режиме подвижность целевого вещества сопоставляют с подвижностью стандартных веществ (как правило, окрашенных). При этом вводят понятие относительной подвижности R_s (рис. 2.2.7/7, б), которая представляет собой отношение расстояния старт — пятно целевого вещества к расстоянию старт — пятно стандартного вещества. Если по подвижности целевое вещество превосходит вещества-свидетели, то значение R_s может быть больше единицы. На хроматограмме также приводят сведения о веществах, используемых в качестве стандартов. При определенных допущениях величины R_f и R_s служат характеристикой вещества.

Область применения

Разделение полярных, главным образом растворимых в воде веществ, а также препаративное выделение природных веществ, таких как пептиды и нуклеотиды.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

I. M. Hais, K. Macek, Handbuch der Papier-Chromatographie, Bd. 1—3, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963

F. Cramer, Papier-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1965
D. Abbott, R. S. Andrews, An Introduction to Chromatography, Longmans, London 1965
J. Smith, J. W. T. Seakins, Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. 1, Heinemann, 4. Aufl., London 1976
O. Mikes, Hrsg., Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods, S. 64—146, Ellis Horwood, Chichester 1979

2.2.8. ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Часто уже при беглом осмотре хроматограммы становится ясно, что разделение прошло неудачно: низкое разрешение, зоны перекрываются; пятна имеют вытянутую форму (и кометообразные хвосты); при обнаружении при помощи химических реагентов неправильная тональность окраски. Затруднений не возникает, если известны возможные источники ошибок.

Стадия подготовки пробы

Изменение состава пробы из-за побочных химических реакций (гидролиза, окисления). Рекомендуется: каждый раз заново готовить раствор пробы.

Изменение концентрации вещества в пробе за счет потери летучих компонентов смеси. Рекомендуется: хранить пробу в бюксе (ампуле) с притертой пробкой.

Появление посторонних примесей при хранении (ворсинки, смазка шлифов). Рекомендуется: хранить пробу в бюксе с притертой пробкой.

Воздействие микрофлоры, ферментов на образец (в случае биополимеров). Рекомендуется: хранить пробу при 4 °С и даже при —18 °С, добавлять консерванты.

В общем путь от отбора пробы до проявления хроматограммы должен быть предельно коротким. Здесь методики Extrelut и Sep-Pak могут заменить общепринятые методы экстракции (см. разд. 2.1.1).

Слишком высокое содержание белка (рис. 2.2.8/1)

Белки (например, при анализе биологических жидкостей) осаждают при помощи кислот (пикриновой, трихлоруксусной, сульфосалициловой). После осаждения удаляют избыток кислоты, так как ее наличие отрицательно влияет на эффективность разделения или приводит к гидролизу целевых веществ.

Белок осаждают при помощи органических растворителей (ацетона, этанола). Следы растворителя обычно не мешают при последующей хроматографии, однако недостатком этого способа является плохая растворимость основных аминокислот. Процесс осаждения примесей всегда сопровождается частичной потерей целевого вещества.

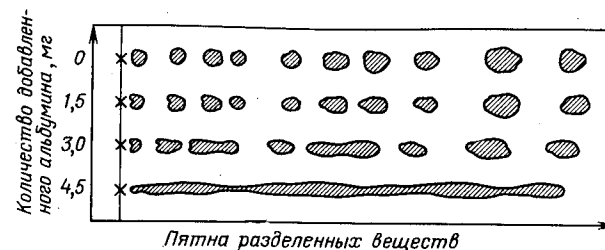


Рис. 2.2.8/1. Эффективность разделения моно- и дисахаридов в зависимости от содержания в пробе белка [Smith I., Seakins G. W. T., Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. 1, Heinemann, London, 4. Auflage 1976, Fig. 4.7, p. 67]

Мембранная фильтрация (см. разд. 1.5): эффективный метод, не требует времени. Преимущественно применяется при работе с большими объемами. Фильтрат, представляющий собой разбавленный раствор низкомолекулярных компонентов, концентрируют.

Гель-хроматография (см. разд. 2.1.5): быстрый и довольно простой метод.

Высокое содержание солей в пробе

Обессоливание путем электродиализа: особенно эффективно при работе с нейтральными веществами (например, углеводами).

Ионообмен: нейтральные вещества обессоливают на смешанных ионообменниках.

Гель-хроматография: например, на сефадексе G-10 обессоливание образца проводят за 10—20 мин.

При количественной оценке результатов ТСХ следует использовать внутренний стандарт.

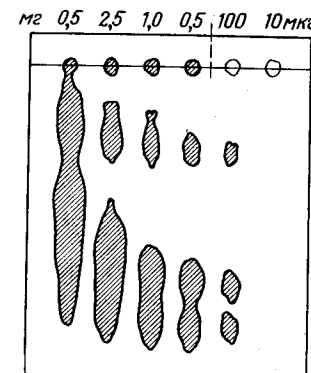


Рис. 2.2.8/2. Эффективность разделения при перегрузке пятна (стартовые пятна имеют одинаковые размеры) [Smith I., Seakins G. W. T., Fig. 4. 5, p. 65]

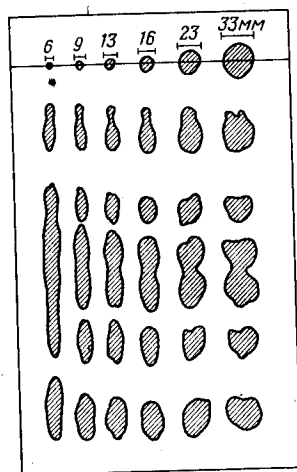
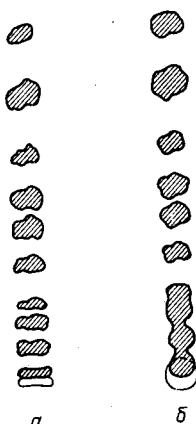


Рис. 2.2.8/3. Зависимость эффективности разделения от локальной перегрузки стартового пятна (нагрузка одинаковая, но размеры пятен различны) [Smith I., Seakins G. W. T., Fig. 4.6, p. 66]

Рис. 2.2.8/4. Зависимость эффективности разделения от формы стартового пятна [нагрузка во всех пятнах одинакова]:

а — нанесение полосой (лучше разделяются вещества с небольшими R_f); б — нанесение в точку (приводит к локальной перегрузке (см. рис. 2.2.8/3)) [Smith I., Seakins G. W. T., Fig. 4.7, p. 67]



Неудачное нанесение пробы

Слишком большое пятно. Рекомендуется: наносить образец по частям с промежуточным высушиванием феном.

Пластика перегружена (рис. 2.2.8/2) или имеет место локальная перегрузка стартового пятна (рис. 2.2.8/3). Рекомендуется: уменьшить нагрузку; уменьшать размеры пятен целесообразно с одновременным снижением нагрузки.

Вещество не выявляется при обнаружении (нагрузка мала) или плохое разрешение веществ с небольшими R_f . Рекомендуется: наносить образец в виде вытянутой зоны или тонкой линии (рис. 2.2.8/4).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- F. Geiss, Die Parameter der Dünnschichtchromatographie, Vieweg, Braunschweig 1972
 W. Götz, A. Sachs, H. Wimmer, Dünnschichtchromatographie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1978
 O. Mikes, Hrsg., Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods, Ellis Horwood, Chichester 1979
 G. Pataki, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, de Gruyter, Berlin 1966
 K. Randerath, Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962
 K. H. Scholtz, Zur Verfahrenstechnik der photographischen Dokumentation von Dünnschichtchromatogrammen, Dt. Apoth.-Ztg. 114, 589—592 (1974)
 H. Schütz, S. Ebel, Reaktionen auf der Dünnschichtplatte, Pharmazie in unserer Zeit 9, 139—151 (1980)
 I. Smith, J. W. T. Seakins, Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. 1, 4 Aufl., Heinemann, London 1976
 E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Springer, Berlin 1967
 A. Zlatkis, R. E. Kaiser, Hrsg., HPTLC High Performance Thin Layer Chromatographie, Journal.

2.3. КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Методом колоночной хроматографии (впервые предложенным Цветов в 1906 г.) можно разделять смеси веществ как на микро-уровне, так и в препаративном масштабе. Неподвижную фазу помещают в колонку, затем вносят в нее анализируемую смесь и элюируют подходящим растворителем. При продвижении по колонке компоненты смеси удерживаются сорбентом в соответствии с их физико-химическими свойствами и, следовательно, мигрируют с разной скоростью. На выходе колонки разделяемые вещества появляются в определенной последовательности и могут быть собраны в виде отдельных фракций.

Физические основы метода

В колоночной хроматографии конечный результат зависит не только от того, насколько принцип разделения (адсорбция, распределение, ионообмен или молекулярно-ситовое распределение, гель-хроматография) соответствует свойствам анализируемых веществ, но и от множества других факторов, таких, например, как свойства системы сорбент — элюент; условия элюирования (скорость потока, температура, вязкость элюента), конструкция и размеры колонки; нагрузка колонки (количество пробы); качество упаковки колонки; размеры частиц; средний диаметр пор частиц сорбента; конструкция основных элементов хроматографической системы (блок ввода пробы, мертвый объем в соединительных шлангах и ячейке детектора); качество подготовки пробы. Качество разделения (эффективность колонки) зависит также от равномерности упаковки колонки и от скорости установления равновесия адсорбция — десорбция вещества. Мерой эффективности колонки служит число теоретических тарелок N . Эта величина удобна при сопоставлении колонок, заполненных одним типом сорбента, однако при помощи этой величины сопоставить разделяющую способность различных колонок не представляется возможным. Более удобным параметром, характеризующим качество колонки, является уже упоминавшаяся в разд. 2.1 высота, эквивалентная теоретической тарелке H . Чем меньше H , тем выше эффективность колонки. На качество разделения решающее влияние оказывает так же селективность системы сорбент — элюент.

На рис. 2.3/1 указаны основные параметры, необходимые для описания процесса жидкостной хроматографии (параметры удерживания). Мерой оценки качества разделения служит разрешение R между двумя соседними пиками. В ВЭЖХ и газовой хроматографии используют понятие времени удерживания $t_{уд}$, в жидкостной хроматографии низкого давления — понятие объем элюции V_x^* , однако между ними нет принципиальной разницы.

* В литературе используют также обозначения t_R (retention) вместо $t_{уд}$ и V_e (elution volume) вместо V_x^* — Прим. ред.

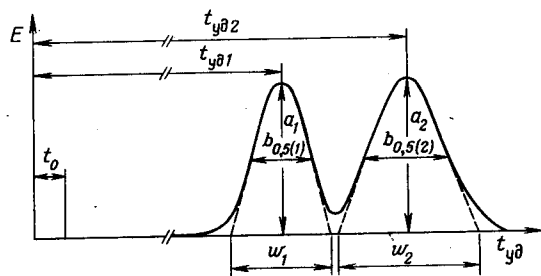


Рис. 2.3/1. Разрешение пиков и параметры удерживания:

t_0 — время удерживания несорбируемого компонента; t_{y0} — полное время удерживания; t_{y01} и t_{y02} — время удерживания компонентов 1 и 2; a — высота пика; $b_{0,5}$ — ширина пика на половине высоты; w — ширина пика у основания

Обозначим символами w_1 и w_2 (см. рис. 2.3/1) отрезок между точками пересечения двух касательных каждого пика с осью абсцисс; тогда разрешение R определяется по формуле:

$$R = R_{2,1} = 2(t_{y02} - t_{y01}) / (w_1 + w_2).$$

Разрешение R — величина безразмерная. Если два пика соприкасаются на базовой линии лишь в одной точке, то разрешение равно единице. Поскольку, как правило, зоны веществ разные, разрешения, равного единице, недостаточно для удовлетворительного разделения. Однако этого вполне достаточно для определения площади пика F_i , если вместо базовой ширины пика использовать при расчете ширину пика на половине высоты $b_{0,5(i)}$:

$$F_i = a_i b_{0,5(i)}.$$

Величина R тесно связана с величиной $N_{эфф}$, где $N_{эфф}$ — это эффективное число теоретических тарелок, рассчитанное по хроматограмме:

$$N_{эфф} = 16(t'_{y0}/w)^2,$$

где t'_{y0} — истинное время удерживания вещества; w — ширина пика у основания.

Истинное время удерживания вещества t' определяют вычитанием времени удерживания полностью несорбируемого вещества t_0 из полного времени удерживания t_{y0} :

$$t'_{y0} = t_{y0} - t_0.$$

Селективность $r_{2,1}$, которую также называют относительным удерживанием (или фактором разделения), определяют по формуле:

$$\alpha = r_{2,1} = t'_{y02}/t'_{y01} = (t_{y02} - t_0) / (t_{y01} - t_0).$$

Эта величина характеризует относительное положение соседних пиков. Взаимосвязь селективности и числа теоретических тарелок при заданном разрешении показана в табл. 2.3/1. Разрешение $R=1$, т. е. почти полное разделение двух соседних пиков может быть достигнуто в зависимости от селективности системы при различном числе теоретических тарелок. При низкой селективности ($\alpha=1,01$) необходима колонка на 165 тыс. теоретических тарелок. Если селективность системы увеличивают за счет оптимизации

Таблица 2.3/1. Число теоретических тарелок, необходимое для достижения разрешения $R=1$ при различной селективности колонки α

α	$N_{эфф}$	α	$N_{эфф}$
1,01	163 216	1,25	400
1,02	41 056	1,50	144
1,05	7 056	2,00	64
1,10	1 036		

условий до $\alpha=1,25$, то для достижения аналогичной эффективности достаточно всего 400 теоретических тарелок. Следовательно, для эффективности разделения более важной величиной является не число теоретических тарелок, а селективность системы. Численное значение ВЭТТ зависит от условий элюирования и свойств разделяемых веществ.

Отношение времен удерживания вещества i в неподвижной и подвижной фазах называется коэффициентом емкости данного вещества в данной хроматографической системе, или, согласно английской транскрипции, «capacity factor» k'_i :

$$k'_i = (t_{y0i} - t_0) / t_0.$$

Аналогичное положение наблюдается в гель-хроматографии, где для сопоставления результатов различных экспериментов используют не коэффициент распределения K_r , который включает трудное определяемое соотношение V_0/V_n , а отношение коэффициентов емкости. Являясь величиной относительной, коэффициент емкости практически не зависит от размеров колонки и скорости подачи элюента. Отношение коэффициентов емкости двух соседних пиков 1 и 2 приводит к уравнению селективности:

$$k'_2/k'_1 = (t_{y02} - t_0) / (t_{y01} - t_0) = \alpha.$$

Считают, что t_0 — это время удерживания вещества, не взаимодействующего с сорбентом и не проникающего внутрь гранул. Это предположение выполняется не всегда. В табл. 2.3/2 перечислены важнейшие хроматографические параметры.

Колонки для ВЭЖХ имеют 10—40 тыс. теоретических тарелок, в то время как колонки для хроматографии низкого давления — несколько сотен теоретических тарелок (табл. 2.3/3).

Для каждого хроматографического процесса характерно явление размытия зон. По мере возрастания времени элюирования зоны уширяются. Главной причиной этого явления являются процессы диффузии в колонке. Масштабы диффузии зависят от скорости потока элюента U и диаметра частиц сорбента d_c *. Мерой размытия зон в колонке является ВЭТТ.

* В литературе используют также обозначение d_p (particle) вместо d_c — Прим. ред.

Таблица 2.3/2. Основные хроматографические параметры

Параметр	Единицы измерения	Обозначения		
		Kirkland *	ASTM E-19 **	Хроматография **
Время удерживания вещества, не сорбирующегося на колонке	с	t_0	t_M	t_m
Полное время удерживания (с момента ввода пробы)	с	t_{yA}	t_R	t_{m+s}
Истинное время удерживания	с	$t'_{yA} = t_{yA} - t_0$	$t'_R = t_R - t_M$	$t_s = t_{m+s} - t_m$
Ширина пика у основания	с	w	y_i	w_b
Разрешение	—	R^{***}	R_{ii}^{4*}	R_s^{5*}
Селективность, фактор разделения или относительное удерживание	—	$\alpha = k'_2/k'_1 = t'_{yA2}/t'_{yA1}$	$r_{ji} = t'_{R(j)}/t'_{R(i)}$	$r = t'_s/t'_s$
Коэффициент емкости	—	$k' = t'_{yA}/t_0$	$k = t'_R/t_M$	$k = t_s/t_m$
Число теоретических тарелок	—	$N = 16(t_{yA}/w)^2$	$n = 16(t_R/y_i)^2$	$n = 16(t_{m+s}/w_b)^2$
Эффективное число теоретических тарелок	—	$N_{эфф} = 16(t'_{yA}/w)^2$	$n_{эфф} = 16(t'_R/y_i)^2$	$n_{эфф} = 16(t_s/w_b)^2$
Высота колонки	см	L	L	L
Высота, эквивалентная теоретической тарелке	см или мм	$H = L/N$	$H = L/n$	$h = L/n$
Высота эффективной теоретической тарелки	см или мм	$H_{эфф} = L/N_{эфф}$	$H_{эфф} = L/n_{эфф}$	$h_{эфф} = L/c_{эфф}$
Диаметр частиц сорбента	мкм	d_c	—	—

* Kirkland J. J. (Hrsg.), Modern Practice of Liquid Chromatography, Wiley, New York, 1971.

** Yersino B., Geib F., Chromatographia, 3, 1970.

*** $R = 2(t'_{yA2} - t'_{yA1}) / (w_2 + w_1)$.

4* $R_{ji} = 2(t'_{R(j)} - t'_{R(i)}) / (y_i + y_{i(i)})$.

5* $R_s = 2(t'_{m+s} - t'_m) / (w'_s + w'_b)$.

1. **Вихревая диффузия.** Она вызвана различием в длинах пробега молекул разделяемых веществ в пространстве между частицами сорбента. В большой степени вклад вихревой диффузии в ВЭТТ зависит от качества упаковки колонки и пропорционален диаметру частиц сорбента.

2. **Массопередача в неподвижной фазе.** В порах частиц сорбента жидкость практически неподвижна. Поэтому часть веще-

Таблица 2.3/3. Условия и результаты разделения на колонках I—III

Селективность α	Возможность разделения	Масса разделяемого (мг) вещества на колонках		
		I	II	III
4	Разделение возможно	< 100	< 500	< 10 000
2	Разделение возможно	50—100	200—400	5 000—10 000
1,5	Разделение неудовлетворительное (возможно методом ТСХ)	12—25	50—100	1 200—2 500
1,2	Разделение неудовлетворительное (только в режиме ВЭЖХ)	2—5	8—20	200—400
1,1	Разделение неудовлетворительное (лучше использовать ВЭЖХ)	1—2	4—10	—

Примечание

Колонка	I	II	III
Диаметр частиц, мкм	10	10	37—75
Диаметр × высота, мм	4 × 300	8 × 300	8 × 2 400
Объем колонки, мл	3	12	96

ства, попадающая в поры, несколько отстает от основной доли вещества, которая продвигается по колонке в подвижной фазе. Поскольку время удерживания молекул вещества в порах различно, это приводит к размыванию зон. Влияние этих факторов становится особенно заметным при возрастании скорости потока. Время удерживания в неподвижной фазе зависит и от размеров частиц сорбента, т. е. от глубины пор. Общее влияние этого эффекта пропорционально величине $d_c^2 U$.

3. **Массопередача в подвижной фазе.** У поверхности частиц сорбента скорость потока практически равна нулю, она возрастает по мере удаления от поверхности гранулы, формируется градиент скорости. Общий вклад в ВЭТТ пропорционален величине $d_c^2 U$.

4. **Продольная диффузия (в подвижной фазе).** Находясь в состоянии броуновского движения, молекулы разделяемого вещества передвигаются по различным направлениям. К размыванию зон приводит только движение их вдоль колонки. Чем продолжительнее время пребывания вещества в колонке, чем ниже скорость потока при данной длине колонки, тем больше вклад продольной диффузии в размывание зон. В целом этот вклад пропорционален $1/U$.

Общая ВЭТТ колонки получается суммированием вкладов этих факторов и выражается уравнением Ван-Деемтера:

$$H = \underbrace{1/(1/(c_1 d_c) - D/(c_2 d_c^2 U))}_1 + \underbrace{(c_2 d_c^2 U)/D}_2 + \underbrace{(c_3 D)/U}_3 + \underbrace{(c_4 D)/U}_4,$$

где H — высота, эквивалентная теоретической тарелке; d_c — диаметр частиц

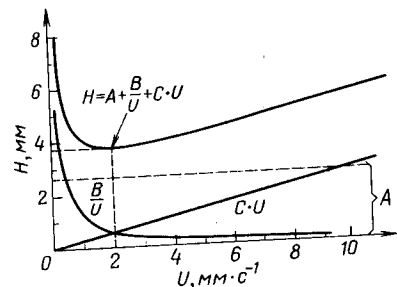


Рис. 2.3/2. Кривая Ван-Деемтера:
 H — ВЭТТ; A — член, учитывающий вихревую диффузию; B — член, учитывающий продольную диффузию; C — член, учитывающий массоперенос; стрелка на суммарном графике указывает минимальное значение ВЭТТ (число теоретических тарелок при этом максимально) [Engelhard H., Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer, Berlin 1975, Abb. 11. 3, S. 18]

сорбента; U — линейная скорость элюента в колонке; D , C_1 , C_2 , C_3 — константы; 1 — вклад вихревой диффузии; 2 — вклад массопереноса в неподвижной фазе; 3 — вклад массопереноса в подвижной фазе; 4 — вклад продольной диффузии.

Общая зависимость ВЭТТ от размеров частиц: чем меньше размеры частиц и чем более однородны они по составу, тем меньше высота тарелки и тем выше разделяющая способность колонки. При этом распределение частиц по размерам (однородность фракции) столь же существенный фактор, что и абсолютные размеры частиц.

Если размеры частиц известны, уравнению можно придать более простой вид, дающий наглядное представление о зависимости ВЭТТ от скорости потока:

$$H = A + C_1 U + C_2 U + B/U.$$

Изображенная графически, эта зависимость носит название кривой Ван-Деемтера (рис. 2.3/2).

Анализ кривой Ван-Деемтера позволяет сделать вывод, что существует оптимальная скорость потока элюента, при которой достигается наиболее эффективное разделение (значение H минимально). В жидкостной хроматографии вследствие сравнительно небольшого значения коэффициента B по сравнению со значениями других коэффициентов вклад продольной диффузии можно не учитывать (по крайней мере для веществ с молекулярной массой менее 1000). В газовой хроматографии вклад продольной диффузии возрастает, а вклады прочих факторов уменьшаются. Вязкость элюента столь же важна как в жидкостной, так и в газовой хроматографии. Вклад факторов 2 и 3 может быть незначительным, если подобрать элюент с минимальной вязкостью (см. разд. 4.1).

В заключение еще раз перечислим те факторы, которые обеспечивают оптимальное разрешение в жидкостной хроматографии: небольшие размеры частиц сорбента, возможно более узкий фракционный состав; небольшая скорость подачи элюента; небольшая вязкость элюента (вследствие чего быстро устанавливается диффузионное равновесие); возможно более высокая температура.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.1.

2.3.1. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НИЗКОГО ДАВЛЕНИЯ

В жидкостной хроматографии низкого давления компоненты смеси разделяют на хроматографической колонке при нормальном (гидростатическом) или несколько повышенном давлении.

Особенности метода

Хроматографию на мягких сорбентах, таких как сефадексы, био-гели, агарозы и многие полистирольные гели, проводят при атмосферном давлении. Этот вид хроматографии применяют для переработки больших объемов жидкости при условии, что не ставится задача достижения высокого разрешения, свойственного ВЭЖХ. Во многих случаях удовлетворительное разрешение обеспечивается вследствие высокой селективности системы сорбент — элюент (см. разд. 2.3). Скорость подачи элюента здесь достаточно высока, следовательно, частицы сорбента должны иметь достаточно крупные размеры. В лабораториях хроматографию проводят на сорбентах с диаметром частиц 40—60 мкм, на производстве — с диаметром 100—200 мкм и более. При использовании частиц диаметром более 40 мкм достаточно высокая скорость подачи элюента обеспечивается гидростатическим давлением, равным высоте вертикального столба жидкости. Для этого типа хроматографии используют более простую аппаратуру, чем для ВЭЖХ, поэтому разрешение здесь несколько ниже, а продолжительность эксперимента несколько больше.

Приборы

Хроматографическая система для жидкостной хроматографии низкого давления включает резервуар или градиентный смеситель; насос; устройство ввода пробы; колонку; детектор для обнаружения веществ в элюате; самописец; автоматизированный коллектор для сбора фракций.

Резервуар для элюента и градиентный смеситель

В качестве резервуара используют градуированную колбу Эрленмейера достаточного большого объема, чтобы исключить вероятность высыхания сорбента колонки в процессе хроматографии. Резервуар укрепляют на штативе достаточно высоко, чтобы обеспечить необходимую скорость подачи элюента. В процессе работы уровень растворителя в резервуаре уменьшается, вследствие чего гидростатическое давление, а следовательно, и скорость подачи элюента изменяются (в большинстве случаев этим пренебрегают). Для создания небольшого рабочего давления в условиях, когда

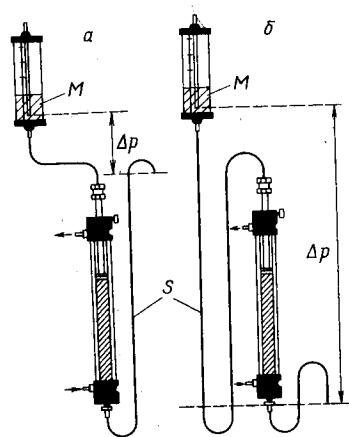


Рис. 2.3.1/1. Хроматография при постоянном давлении (Pharmacia, Uppsala/Schweden): а — схема обеспечения низкого гидростатического давления; б — схема обеспечения высокого гидростатического давления; М — склянка Мариотта; S — предохранительная петля; Δp — гидростатическое давление

перепад уровней (колонки и сосуда с элюентом) незначителен, пользуются склянкой Мариотта (рис. 2.3.1/1). Рабочее гидростатическое давление в этом случае соответствует перепаду давлений между нижним окончанием капилляра на выходе колонки, вне зависимости от направления подачи элюента в колонку, снизу или сверху. Если при элюировании в изократическом режиме (т. е. при постоянном составе элюента) наблюдается заметное перекрытие пиков на хроматограмме, то проводят градиентное элюирование (см. разд. 2.1.3). Обычные градиентные смесители используют для работы с водными системами небольших объемов (рис. 2.3.1/2). Более подробно принцип работы подобных смесителей рассматривается в разд. 2.1.3.

Соединительные шланги

В качестве соединительных шлангов между отдельными блоками хроматографической системы используют тефлоновые капилляры внешним диаметром 1,6 мм и внутренним диаметром 0,3—

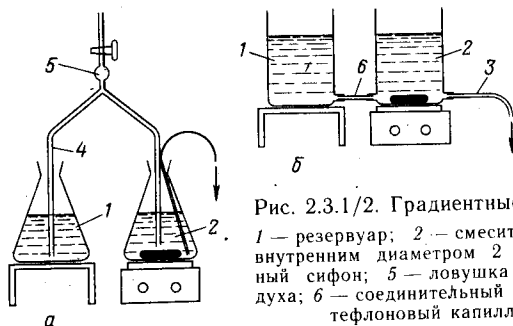
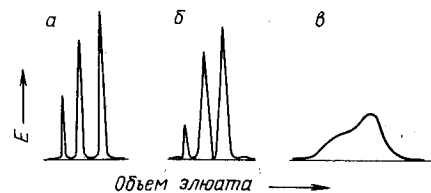


Рис. 2.3.1/2. Градиентные смесители (а и б): 1 — резервуар; 2 — смеситель; 3 — капилляр с внутренним диаметром 2 мм; 4 — соединительный сифон; 5 — ловушка для пузырьков воздуха; 6 — соединительный шланг — тонкостенный тефлоновый капилляр; 7 — зажим

Рис. 2.3.1/3. Зависимость разрешения от диаметра и длины соединительных шлангов:

а — колонка непосредственно соединена с детектором; б и в — колонка и детектор соединены шлангом длиной 2 м и диаметром 0,3 и 0,8 мм соответственно



0,5 мм. Если соединительные шланги выбраны неудачно, отдельные фракции вновь перемешиваются на выходе из колонки (рис. 2.3.1/3). На рис. 2.3.1/4 изображены различные способы соединения шлангов. Наиболее простые из них показаны на рис. 2.3.1/4, а, б: тефлоновые капилляры соединяют при помощи

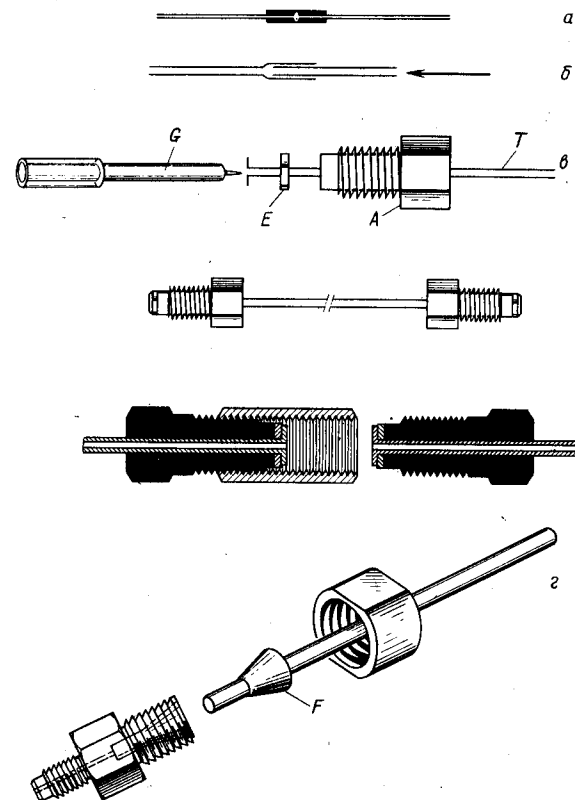


Рис. 2.3.1/4. Различные способы соединения шлангов:

а — два тефлоновых капилляра соединены отрезком силиконового шланга; б — два тефлоновых капилляра соединены непосредственно (направление потока раствора указано стрелкой); в — тефлоновый капилляр Т развальцован при помощи нагретой развертки G (Е — стальное кольцо, А — шайба); г — соединение толстостенных капилляров при помощи конической муфты F

короткого отрезка силиконового шланга *а* или просто вставляют один из капилляров в предварительно расширенный при помощи развертки конец второго капилляра *б*. Соединение *а* пригодно для работы с водными растворами и органическими растворителями при нормальном давлении. Соединение *б* пригодно для работы с любыми растворителями при умеренном давлении (до 1 МПа), однако оно ненадежно при подаче элюента в направлении, противоположном стрелке. Высокой надежностью отличается соединение *в*. Если шайба *А* изготовлена из делдрина, полипропилена или тефлона, узел будет устойчив при работе с органическими растворителями. Толстостенный тефлоновый капилляр (соединение *г*) не развальцовывают. На нем плотно фиксируют коническую муфту *Е*. Соединения, изображенные на рис. 2.3.1/4, *в*, *г*, устойчивы при давлении до 4 МПа.

Насосы

В хроматографии насосы используют при упаковке колонок и подаче в колонку элюента (в том числе при регенерации).

Перистальтические насосы (рис. 2.3.1/5) широко применяются при биохимических исследованиях, так как в насосах этого типа исключается контакт элюента с металлом. В устаревших и дешевых моделях насосов подача жидкости производится путем прокатывания роликов по мягкому шлангу. Вследствие вальцевания шланг быстро изнашивается. При первых признаках износа шланг должен быть заменен. Определенным достоинством обладают насосы с планетарным механизмом, где ролики воздействуют на шланг, прижатый к покрытому тефлоном желобу. Эластичный шланг *1* прижимается роликом *2* к желобу *3*. Жидкость в шланге перемещается в направлении движения ролика (см. рис. 2.3.1/5). Здесь исключается принудительное растяжение и последующее сокращение шланга, в результате чего механический износ существенно меньше. Шланговые насосы имеют определенные недостатки: шланги требуют частой замены. Кроме того, работа насосов ограничена давлением 200 кПа.

Мембранные насосы обладают достаточной мощностью, они безынерционны, сравнительно дешевы. Корпус насоса выполнен из нержавеющей стали, поэтому в целом насос долговечен и пригоден для

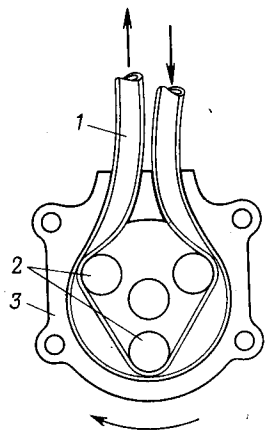


Рис. 2.3.1/5. Шланговый (перистальтический) насос (Reichelt Chemietechnik, Heidelberg):

1 — эластичный шланг; 2 — ролик; 3 — желоб

работы с разнообразными растворителями. Если присутствие ионов металлов в растворе нежелательно, корпус насоса изготавливают из инертных материалов (керамики или тефлона). В насосах этого типа ход поршня и частота перемещения регулируются отдельно. Следует отметить, что плавность потока (пульсация минимальна) достигается небольшим ходом поршня и высокой частотой перемещения. В зависимости от особенностей конструкции насосы этого типа создают давление до 3,5 МПа. Пульсацию потока также компенсируют при помощи демпфирующего устройства. Изображенный на рис. 2.3.1/6 насос включает демпфирующее устройство и может создавать давление до 600 кПа. При каждом электрическом импульсе стальной стержень *1* притягивается магнитом (на рисунке не приведен). Связанная со стержнем мембрана вытесняет жидкость из дозирующей головки *2* в камеру демпфирующего устройства *3* (направление указано стрелкой). В камере гидравлический импульс сглаживается за счет подвижной диафрагмы, соединенной с пружиной, расположенной за диафрагмой. Затем жидкость поступает через шаровой клапан в змеевик *5* и далее в камеру *6* манометра *7*. Отсюда жидкость подается в тефлоновый капилляр, связывающий насос с хроматографической колонкой. Клапан *4* предназначен для удаления воздуха из дозирующей головки и быстрой смены растворителя. Во всех узлах насоса жидкость перемещается в направлении снизу вверх, вследствие чего исключается образование в системе воздушных карманов и застойных зон.

При работе с водными системами при давлениях несколько выше 100 кПа используют небольшие дешевые мембранные насосы без демпфирующего устройства. Подводящие шланги в них стыкуют в соответствии со схемой, приведенной на рис. 2.3.1/7. На выходе насоса на стальном капилляре *2* фиксируется толстостенный шланг из силиконовой резины *3*, который для увеличения прочности крепления снаружи обжимается коротким отрез-

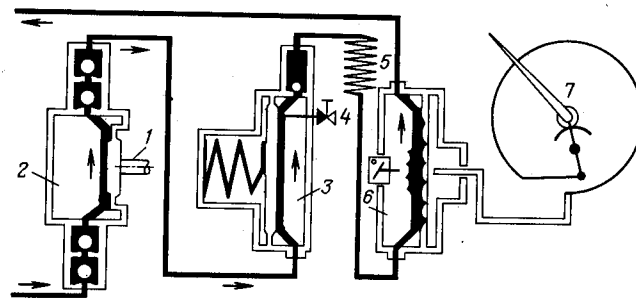


Рис. 2.3.1/6. Схема мембранного насоса (Chemie and Filter GmbH, Heidelberg):

1 — стальной стержень; 2 — дозирующая головка; 3 — камера демпфирующего устройства; 4 — клапан; 5 — змеевик; 6 — камера; 7 — манометр

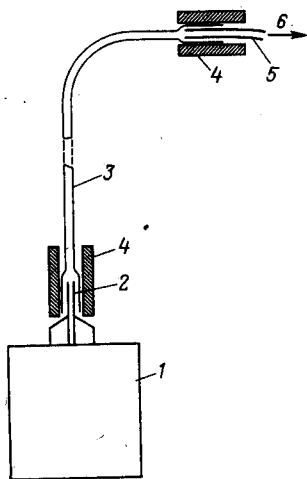


Рис. 2.3.1/7. Простое демпфирующее устройство для работы с водными системами: 1 — насос; 2 — стальной капилляр; 3 — толстостенный шланг из силиконовой резины (внешний диаметр 1,5 мм; внутренний диаметр 0,3 мм, длина 1 м); 4 — толстостенный полиэтиленовый шланг; 5 — тефлоновый капилляр (внешний диаметр 1,5 мм, внутренний диаметр 0,3 мм); 6 — к системе ввода пробы

ком толстостенного полиэтиленового шланга 4. На противоположном конце силиконовый шланг стыкуется с толстостенным тефлоновым капилляром 5, а место стыковки (длиной 5 см) также обжимается отрезком полиэтиленового шланга 4.

Данное устройство позволяет погашать гидравлические импульсы, вызванные ходом поршня. При этом обеспечивается вполне достаточное рабочее давление. Недостатком мембранных насосов является падение производительности при увеличении давления.

Устройства ввода пробы

Непосредственное нанесение пробы осуществляют при помощи пипетки или тефлонового капилляра, окончание которого (длиной примерно 3 мм) изогнуто под углом 90°. Использование этого простого устройства (рис. 2.3.1/8) требует определенного навыка и больших затрат времени.

Пробу с высоким удельным весом помещают под слой растворителя на столбик сорбента при помощи адаптера — поршня, который ограничивает высоту слоя сорбента в колонке. Это требует определенного опыта, однако затраты времени не столь значительны. Существенно, что в этом случае исключается возможность пересыхания колонки. Схема нанесения пробы изображена на рис. 2.3.1/9. После того как адаптер 1 плотно прижимается к

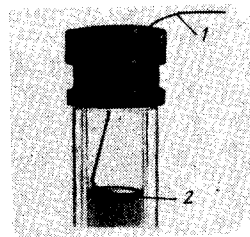


Рис. 2.3.1/8. Нанесение пробы при помощи изогнутого капилляра 1, пружинное кольцо 2 фиксирует сетку, препятствующую взмучиванию геля (Pharmacia, Uppsala/Schweden)

слою геля 2, его положение фиксируют вращением шайбы 3. Фиксация достаточно плотная, но некоторая подвижность адаптера все же сохраняется. Содержимое шприца 4 через кран 5 подается в колонку (при закрытом выходе). При этом уровень жидкости повышается, и адаптер выдавливается из колонки. Слой пробы 6 теперь располагается между адаптером и слоем геля. Переключением крана 5 соединяют колонку с резервуаром. Более легкий элюент вдавливают раствор пробы в слой геля (при открытом выходе колонки). По завершении нанесения образца адаптер вновь устанавливается вплотную к слою геля. При слишком быстром введении пробы поверхностный слой геля может сжиматься. Если сопротивление колонки возросло (сорбент уплотнился), используют шприц меньшего диаметра. При высоком сопротивлении диаметр шприца не должен превышать 5 мм. Такая система ввода образца наиболее удобна, если не требуется высокая воспроизводимость.

Большие объемы жидкости подают на колонку из специальных резервуаров следующим образом: к крану (рис. 2.3.1/9, а)

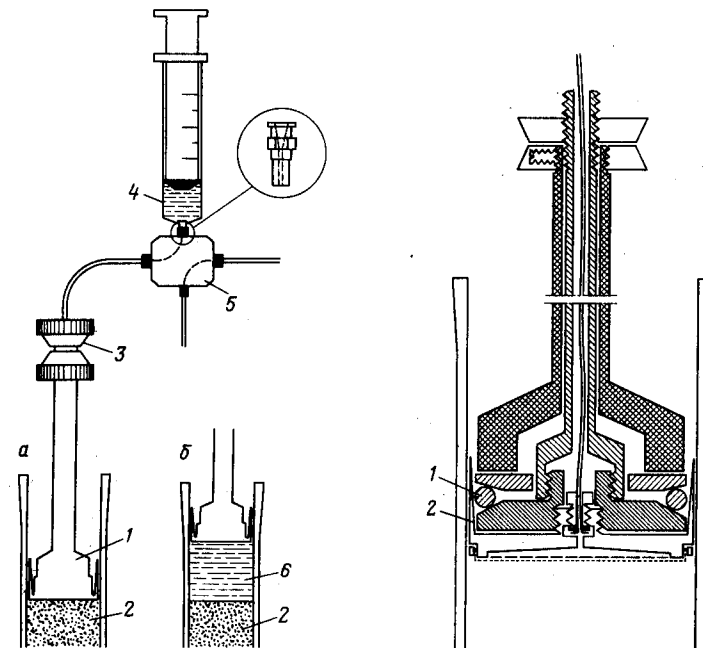


Рис. 2.3.1/9. Нанесение больших объемов пробы при помощи адаптера: а — начальное положение адаптера; б — положение адаптера при вводе пробы и элюента; 1 — адаптер; 2 — слой геля; 3 — регулирующая шайба; 4 — шприц; 5 — кран; 6 — проба

Рис. 2.3.1/10. Схема устройства подвижного адаптера:

1 — кольцо; 2 — тефлоновый ободок

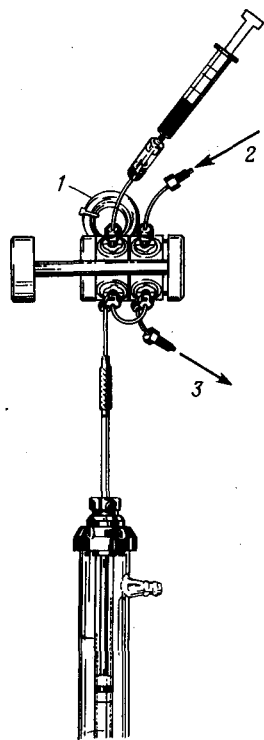


Рис. 2.3.1/11. Нанесение пробы при помощи дозирующей петли (Latek Labortechnik-Geräte GmbH, Heidelberg):

1 — дозирующая петля; 2 — подача элюента; 3 — сброс; 4 — насос; 5 — проба; 6 — положение переключателя «ввод пробы в дозирующую петлю»; 7 — положение переключателя «ввод пробы в колонку»; 8 — колонка

присоединяют шприц большого объема без поршня и пробу подают в колонку. Затем простым переключением крана в колонку подают элюент. Этот способ применяется при работе с мягкими гелями. Переключение крана надо делать своевременно, не допуская пересыхания колонки.

При работе с более жесткими гелями образец также наносят при помощи подвижного адаптера.

Схема устройства подвижного адаптера изображена на рис. 2.3.1/10. Герметичность системы обеспечивается следующим образом: кольцо 1 плотно прижимает тефлоновый ободок 2 к стенкам колонки. Вращением регулирующей шайбы может устанавливаться жесткая фиксация адаптера (адаптер неподвижен) или подвижная фиксация (адаптер может передвигаться). Однако герметичность обеспечивается в обоих случаях. Пробу наносят следующим образом: адаптер слегка вытягивают вверх, при этом проба за счет разрежения втягивается в колонку (рис. 2.3.1/9, б). При подаче растворителя более легкого удельного веса проба вымывается в слой сорбента. Вследствие высокого качества адаптеров и колонок эта система герметична при

давлении до 500 кПа. Подвижные адаптеры удобны при работе в препаративных масштабах, например при обессоливании белков и нуклеиновых кислот.

Иногда пробу наносят при помощи *дозировочной петли* (рис. 2.3.1/11). Дозировочную петлю при нормальном давлении заполняют раствором пробы, после чего переключатель устанавливают в положение «ввод пробы в колонку» и переносят пробу в колонку. Этот способ применяют в хроматографии при высоком давлении (до 3,5 МПа), а также при нанесении небольших объемов пробы. Воспроизводимость нанесения достаточно высока, поэтому краны с дозирующей петлей применяют при выполнении точных аналитических экспериментов, а также при работе в режиме ВЭЖХ (см. разд. 2.3.2).

Колонки

Конструкция колонки имеет первостепенное значение для эффективности разделения. Колонки, снабженные адаптером и краном для ввода пробы, являются более современными по сравнению со стеклянными колонками, имеющими стеклянную пористую перегородку и тефлоновый шланг на выходе. Для изготовления деталей, контактирующих с органическими растворителями, используют инертные материалы, такие как стекло, тефлон и нержавеющая сталь.

На рис. 2.3.1/12 изображены *стеклянные колонки* для разделения в аналитическом и препаративном масштабах.

Колонка, изображенная на рис. 2.3.1/13, предназначена для работы в *производственном масштабе*. Колонка закреплена в штативе на шарнире, что существенно упрощает извлечение сорбента.

Большинство ионообменников набухают или сжимаются при смене буфера. В этом случае адаптеры не применяются, и гель беспрепятственно увеличивается в объеме.

Для проведения *адсорбционной и ОФХ* выпускаются готовые колонки. Они чрезвычайно удобны для тех исследователей, которые не располагают специальными системами для упаковки колонки. На рис. 2.3.1/14 схематически изображена колонка Lobar (Merck, Darmstadt) для препаративной хроматографии при нормальном давлении. В табл. 2.3.1/1 приведены основные параметры хроматографических колонок и указаны их допустимые нагрузки. Анализируемый образец предварительно фильтруют или центрифугируют для того, чтобы отделить коллоидные частицы и механические примеси (поскольку фильтр на входе в колонку может забиваться уже при вводе образца). В случае увеличения сопротивления колонки (из-за уплотнения слоя сорбента) ее промывают в режиме противотока. Побочным результатом этой операции может быть частичная потеря целевого вещества. Готовые колонки предназначены для проведения аналитического и препара-

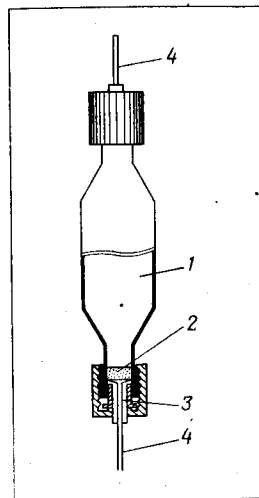
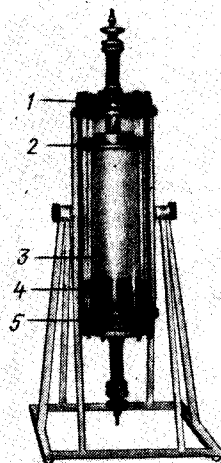
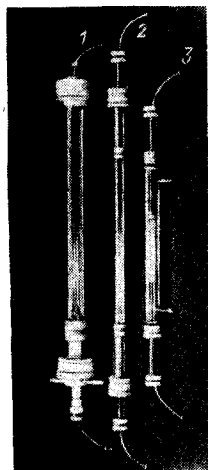


Рис. 2.3.1/12. Стеклонные колонки (Latek Labortechnik-Geräte GmbH, Heidelberg):
1 — с адаптером из тефлона; 2 — с адаптером из нержавеющей стали; 3 — с адаптером из нержавеющей стали и термостатирующим кожухом

Рис. 2.3.1/13. Колонка для разделения в производственном масштабе:
1 — верхняя насадка, закрепленная на фланце колонки; 2 — верхний адаптер; 3 — колонка; 4 — нижний адаптер; 5 — нижняя насадка, закрепленная на фланце колонки

Рис. 2.3.1/14. Колонка Lobar (Merck, Darmstadt):
1 — стеклянная колонка, плавно сужающаяся с обоих концов; 2 — фильтрующий распределитель из керамики; 3 — капилляр из тефлона; 4 — капилляр из нержавеющей стали (внешний диаметр 1,5 мм, длина 20 мм)

тивного разделения при давлении до 600 кПа. По качеству разрешения и сроку использования они превосходят колонки, приготовленные самостоятельно. Единственным обязательным условием применения готовых колонок является тщательная подготовка пробы.

Таблица 2.3.1/1. Параметры колонок Lobar (Merck, Darmstadt), заполненных силикагелем 60 (разные фракции). Колонки типа А и В также могут быть заполнены сорбентами RP 8

Тип колонки	Общая длина, мм	Внутренний диаметр, мм	Внешний диаметр, мм	Фракция сорбента, мкм	Масса вещества (приблизительно)	
					г	мл
A	240	10	13	40—63	0,2	0,3—1
B	310	25	28	40—63	1	1—5
C	440	37	42	63—125	3	2—10

Хроматографический детектор — это прибор, позволяющий регистрировать целевые вещества в потоке элюата по характерным физико-химическим свойствам (окраске, флуоресценции, поглощению в УФ-области спектра и др.). Классификация детекторов по назначению — для хроматографии низкого давления или ВЭЖХ — нецелесообразна. Более подробно конструкции детекторов рассматриваются в разд. 2.3.3.

Фракционный коллектор

При проведении хроматографии на препаративном уровне элюат собирают по фракциям на фракционном коллекторе, причем смена фракций может происходить по истечении заданного промежутка времени, при достижении заданного объема фракции или сбора заданного числа капель. Коллекторы все время совершенствуют и в настоящее время в лабораториях можно встретить образцы трех поколений этого прибора.

К первому поколению относятся довольно громоздкие коллекторы с круглым штативом. Смена фракций осуществляется по кругу или зигзагообразно (по меандру) и происходит «по времени» или «по объему».

Коллекторы второго поколения более компактны, они имеют прямоугольный штатив, составленный из отдельных блоков на 10 пробирок каждый. По мере заполнения пробирок штативы с пробирками могут заменяться. Смена фракций происходит «по времени», «по объему», «по числу капель». После заполнения заданного количества штативов коллектор отключается автоматически. Многие коллекторы этого поколения имеют блок управления периферийными устройствами: насосами, магнитными переключателями и т. п.

К третьему поколению относятся коллекторы, снабженные микропроцессорами. Такие коллекторы можно запрограммировать на сбор фракций разного объема и в разные приемники. Такие коллекторы приспособлены для работы с веществами, несущими радиоактивные метки, поскольку они снабжены сигнальными устройствами. Кроме того, при переполнении пробирок избыток элюата направляется в поддон и не загрязняет управляющее устройство. Система имеет также магнитный переключатель — прерыватель (между выходом колонки и ячейкой детектора), который при каждой смене фракции прерывает поток элюата. Благодаря такому устройству практически исключаются потери вещества. В современных коллекторах сборники (пробирки или кюветы) снабжены счетчиками радиоактивных импульсов. Если вещества, несущие радиоактивную метку, собирают в кювету со счетчиком, то смену фракций задают по уровню сигнала детек-

тора. В этом случае элюат, не содержащий целевых веществ, собирают в общий сборник, и число фракций, подлежащих анализу, минимально.

Автоматизация процесса разделения

Даже ограниченная автоматизация процесса хроматографического разделения существенно облегчает работу исследователя.

Автоматическое отключение колонки с помощью магнитного клапана, управляемого сигналом от фракционного коллектора; перекрывание потока на выходе, что предохраняет колонку от высыхания. Таким же надежным «сторожем» колонки является более простое устройство — предохранительная петля — на входе или на выходе колонки (см. рис. 2.3.1/1).

Автоматическое переключение чувствительности детектора, осуществляемое путем расширения шкалы. При достижении пером самописца предела полной шкалы чувствительность детектора автоматически уменьшается (например, на порядок). Этот прием полезен при работе с образцами неизвестного состава или при определении компонентов, содержание которых в смеси минимально по сравнению с содержанием других веществ.

Автоматическое управление периферийными устройствами, связанными с подачей элюента (насос, магнитная мешалка, кран и др.).

Управление режимом работы фракционного коллектора.

1. Смена приемника при достижении заданного уровня сигнала детектора, т. е. отбор фракций небольшого объема начинается лишь при появлении очередного пика на хроматограмме (рис. 2.3.1/15, а). Таким способом удается увеличить долю фракций, содержащих чистые компоненты, в случае неполного разделения веществ. В промежутках между сбором целевых веществ элюат собирают в пробирки большего объема.

2. Смена приемника при прохождении точки перегиба на хроматограмме. Этот прием позволяет разделять плохо разделяющиеся вещества, при регистрации которых сигнал не доходит до порогового значения (например, пики 2 и 3, или 5, 6 и 7, или 8 и 9; рис. 2.3.1/15, б). Сочетание двух принципов отбора — по крутизне кривой и заданному времени — позволяет собирать по фракциям только целевые вещества, а промежуточный элюат направлять в общий сборник или на слив. Оба приема полезны при многократном повторении стандартной операции, например обессоливании белков или нуклеиновых кислот или хроматографическом разделении одной и той же смеси.

3. Регистрация при двух длинах волн с последующей идентификацией компонентов смеси по соотношению E_{280}/E_{254} (см. разд. 3.4.1/1).

Полностью автоматизированы сложные и дорогостоящие при-

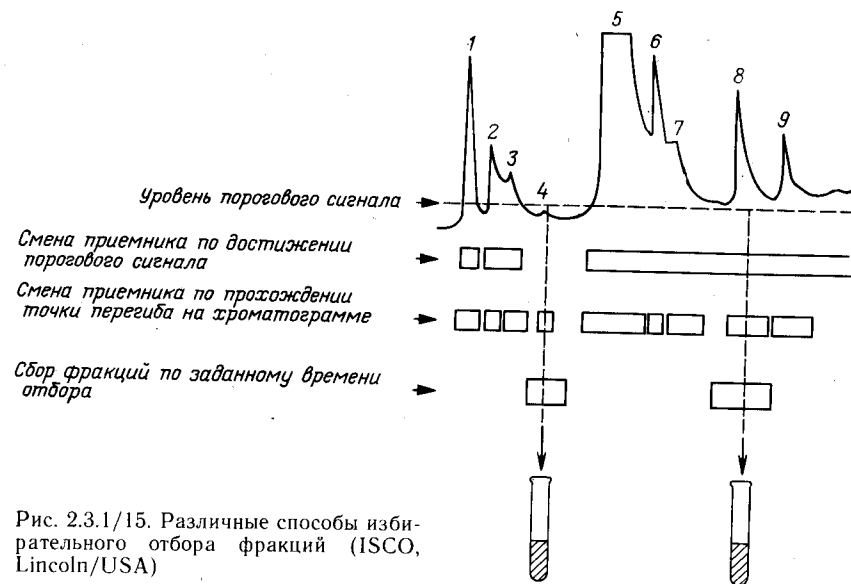


Рис. 2.3.1/15. Различные способы избирательного отбора фракций (ISCO, Lincoln/USA)

боры, предназначенные для ВЭЖХ. Естественно, отдельные узлы этих приборов могут применяться и в хроматографии низкого давления.

Порядок выполнения операций

Упаковка колонки

Способ упаковки колонки зависит от размеров частиц сорбента и его предварительной подготовки. Целью любого из способов упаковки является сведение к минимуму продолжительности седиментации частиц сорбента и быстрое формирование плотного и однородного слоя.

Заполнение колонки гелем (в гель-хроматографии):

рассчитанное количество сухого сорбента помещают в колбу для вакуумирования (или колбу Бунзена);

добавляют такое количество растворителя, чтобы после набухания геля его вязкость была умеренной, т. е. гель свободно пропускал пузырьки воздуха при деаэрации; как правило, набухание ведется в растворителе, в котором предполагается проводить элюирование; силикагель и оксид алюминия перемешивают с растворителем в течение 15 мин, продолжительность набухания ионообменников и мягких гелей указана в рекомендациях фирм-изготовителей;

колбу с набухшим гелем закрывают резиновой пробкой и ва-

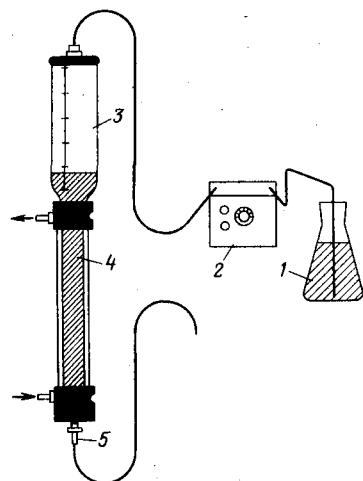


Рис. 2.3.1/16. Схема заполнения колонки гелем (Pharmacia, Uppsala/Schweden):
1 — сосуд с элюентом; 2 — перистальтический насос; 3 — резервуар с гелем; 4 — слой геля; 5 — капилляр на выходе колонки

куумируют; при длительном вакуумировании гель несколько охлаждается, поэтому перед внесением в колонку его выдерживают при комнатной температуре;

колонку промывают детергентом, высушивают, присоединяют насадку или резервуар с гелем (рис. 2.3.1/16), закрепляют в строго вертикальном положении на длинном штативе и устанавливают в месте, защищенном от солнечного света и сквозняка;

снизу в колонку при помощи шприца вводят небольшое количество растворителя, который вытесняет воздух из опорной сетки или стеклянной пористой перегородки, после чего выход колонки перекрывают;

гель тщательно перемешивают и переносят в колонку, стараясь не допустить захвата пузырьков воздуха; в резервуар или колонку гель переносят в один прием; упаковка колонки получается неоднородной, если гель слишком разбавлен или его вносят по частям;

по завершении заполнения колонки открывают выход, необходимое количество элюента подают в резервуар при помощи перистальтического насоса; легким постукиванием резиновым молотком (или вакуумным шлангом) по колонке удаляют из нее пузырьки воздуха;

перекрывают выход колонки, отсоединяют резервуар, осторожно заполняют верхнюю часть колонки растворителем, формируя выпуклый мениск (рис. 2.3.1/17, а);

адаптер в наклонном положении вставляют в колонку, исключая тем самым захват пузырьков воздуха (рис. 2.3.1/17, б), и вдвигают в колонку на 1 см;

соединяют адаптер с насосом или резервуаром, вдвигают адаптер глубже до соприкосновения с гелем, вытесняя тем самым остатки воздуха из соединительных шлангов;



Рис. 2.3.1/17. Установка адаптера (Pharmacia, Uppsala/Schweden):
а — заполнение колонки элюентом (формирование выпуклого мениска элюента); б — введение адаптера в наклонном положении; в — фиксация адаптера при вращении верхней шайбы

надежно фиксируют адаптер (рис. 2.3.1/17, в), открывают выход колонки и включают насос; при изменении высоты столба геля ослабляют фиксацию и слегка смещают адаптер вдоль колонки.

Сухая упаковка методом «вибрации и постукивания» (для жестких сорбентов, например, силикагеля, оксида алюминия, с диаметром частиц 20—40 мкм):

колонку промывают горячим детергентом, ополаскивают водой, ацетоном, высушивают; выход колонки перекрывают;

колонку устанавливают вертикально и вносят небольшое количество сорбента, формируя слой толщиной 1 см;

слой уплотняют путем постукивания по стенкам колонки в зоне формирования слоя, при этом колонку медленно вращают; иногда используют прокладку с отверстием, чтобы не повредить капилляр на выходе;

продолжают легкое постукивание колонкой по поверхности стола, уплотняя слой сорбента;

вносят очередную порцию сорбента и повторяют операции, формируя столбик сорбента подходящей высоты;

в заключение легким постукиванием уплотняют уже сформированный слой;

устанавливают адаптер, чтобы он соприкасался со слоем сорбента, адаптер фиксируют;

подают в колонку деаэрированный элюент.

Вибраторы, используемые для упаковки ГХ-колонок, применять не рекомендуется, так как боковая вибрация приводит к расслоению сорбента по размерам частиц (боковая вибрация необходима при упаковке узких колонок, так как в заполненной колонке сорбент уплотняется с трудом).

Проверка качества упаковки

Качество упаковки проверяют с помощью окрашенных и несорбирующихся веществ — маркеров. Существуют маркеры для адсорбционной хроматографии, гель-хроматографии [2%-й рас-

твор синего декстрана 2000 (Pharmacia)]. Качество ионообменных колонок таким способом не контролируют, поскольку окрашенные вещества почти всегда необратимо сорбируются на ионитах.

Нанесение пробы

Известны два способа нанесения пробы.

Нанесение пробы на поверхность геля:

избыток растворителя над слоем геля отбирают пипеткой, выжидают некоторое время, чтобы остаток растворителя впитался в гель, и перекрывают выход колонки;

при помощи пипетки или изогнутого капилляра осторожно накладывают пробу на слой геля, стараясь не допустить взмучивания (следует потренироваться заранее);

открывают выход колонки; после впитывания пробы его вновь перекрывают;

небольшим количеством растворителя смывают остатки пробы со стенок колонки, выжидают, пока растворитель впитается; повторяют операцию несколько раз;

осторожно наносят слой растворителя (высотой 5 см) и подсоединяют колонку к резервуару.

При всех операциях стараются не допускать пересыхания и взмучивания слоя геля. Сверху на слой геля иногда помещают сетку, препятствующую взмучиванию (см. рис. 2.3.1/8).

Нанесение пробы под слой растворителя:

пробу растворяют в небольшом объеме растворителя;

в раствор пробы добавляют 1—2%-й раствор сахарозы, NaCl или несколько капель CCl_4 (если элюирование проводится органическим растворителем);

на поверхности сорбента создают слой растворителя высотой около 5 см;

пробу при помощи шприца медленно наносят на слой сорбента (с расстояния 5 мм); при этом формируется четкая зона пробы (так как проба имеет более высокую удельную плотность);

открывают выход колонки, после впитывания пробы колонку соединяют с резервуаром.

Нанесение пробы с помощью шприца применяется как в сочетании с устройством ввода пробы, так и в сочетании с адаптером.

Элюирование

После того как проба внесена в колонку, необходимо убедиться в том, что целевое вещество сорбируется обратимо. Для этого пробу элюируют подходящим элюентом (см. разд. 2.1.1—2.1.5) и анализируют состав элюата. Состав элюента изменяют до тех пор, пока не будет достигнуто удовлетворительное разделение целевого вещества и сопутствующих примесей.

Если при работе в изократическом режиме хроматограмма получается растянутой (пики слишком удалены друг от друга), то элюирование ведут в градиенте состава растворителя (см. разд. 2.1.3).

Скорость элюента устанавливают в зависимости от типа сорбента и свойств разделяемых веществ. В адсорбционной (см. разд. 2.1.1) и ионообменной хроматографии (см. разд. 2.1.3) удовлетворительное разделение получают при высокой скорости элюирования, в гель-хроматографии скорость элюирования не должна превышать $10 \text{ см} \cdot \text{ч}^{-1}$ (фронт элюента перемещается по колонке на расстояние 10 см за 1 ч). Эта так называемая линейная скорость подачи элюента не зависит от размеров колонки. Для колонки с внутренним диаметром 1 см она соответствует скорости $30 \text{ мл} \cdot \text{ч}^{-1}$. При анализе высокомолекулярных веществ скорость подачи элюента на порядок меньше. В хроматографии при нормальном давлении действует правило: чем меньше скорость элюирования, тем выше качество разделения (см. разд. 2.3).

Источники ошибок — см. разд. 2.3.5.

Оформление результатов

Примеры оформления результатов приводятся в разд. 2.1.1, 2.1.3 и 2.1.5.

Область применения

Применяется для препаративного разделения неорганических (ионообменная хроматография), органических (адсорбционная и распределительная хроматография) веществ и биополимеров (ионообменная, гель-хроматография).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.1.

2.3.2. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЭЖХ)

ВЭЖХ — метод разделения веществ на мелкозернистых сорбентах (с размерами частиц менее 15 мкм) при повышенном давлении. Метод характеризуется высокой эффективностью разделения в сочетании с высокой скоростью процесса.

Физические основы метода

ВЭЖХ в принципе мало чем отличается от хроматографии низкого давления. Однако вследствие небольших размеров частиц сорбента и их однородности разделяющая способность ВЭЖХ ко-

лонок существенно выше. Из-за высокого рабочего давления (до $4 \cdot 10^7$ Па) приборы для ВЭЖХ отличаются от приборов для классической колоночной хроматографии.

Уравнение Ван-Деемтера отражает зависимость ВЭТТ (H) от размеров частиц и скорости потока элюента (см. разд. 2.3). Наиболее важный вывод из этого уравнения заключается в следующем: чем меньше размеры частиц, тем меньше ВЭТТ и тем выше разрешение. Сорбент с частицами диаметром 5 ± 1 мкм обладает более высокой разделяющей способностью, чем сорбент с более крупными и менее однородными частицами. Минимальный размер частиц равен приблизительно 3 мкм, поскольку более мелкие частицы образуют довольно стойкие конгломераты. Приготовление стабильных суспензий из частиц диаметром менее 20 мкм удается только при обработке ультразвуком, работа с более мелкими частицами является еще более сложной.

Все же применение мелких и однородных фракций оказывается полезным во многих отношениях. Чем меньше размер частиц, тем слабее зависимость ВЭТТ от скорости потока элюента (рис. 2.3.2/1). Поэтому, в отличие от классической колоночной хроматографии, скорость элюирования в ВЭЖХ существенно выше. На рис. 2.3.2/1 изображены кривые, каждая из которых представляет собой правую часть кривой Ван-Деемтера (см. рис. 2.3/2, правее точки минимального значения H). Левая часть на данном рисунке не изображается, так как практически совпадает с осью ординат. Кривые на рис. 2.3.2/1 иллюстрируют зависимость H от скорости потока U при элюировании на сорбентах с частицами различных диаметров. В случае применения сорбентов, у которых размер частиц минимален (3 и 4 на рис. 2.3.2/1), увеличение скорости потока несущественно влияет на изменение значения H . Чем частицы крупнее, тем изменение значений ВЭТТ становится все более заметным.

Высокое разрешение, а следовательно, возможность использования коротких колонок позволяют сократить продолжительность процесса и уменьшить расход растворителей. Высокой эффективности разделения достигают при применении высококачественной аппаратуры. Обязательными являются высокое качество устрой-

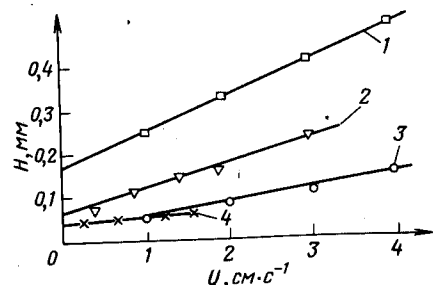


Рис. 2.3.2/1. Зависимость ВЭТТ (H) от скорости элюирования (U) при элюировании на сорбентах с различными размерами частиц (d):

1 — зипакс (Zipax), $d=37$ мкм; 2 — силкагель, $d=10$ мкм; 3 — зорбакс (Zorbax), $d=5$ мкм; 4 — микросорб, $d=5$ мкм [Kirkland I. I., J. Chrom. Sci. 10, 539 (1972); Cassidy R. M. et al., Anal. Chem. 46, 340 (1974)]

ства ввода пробы, минимальный «мертвый» объем в капиллярах и минимальный объем измерительной ячейки детектора.

К растворителям для ВЭЖХ также предъявляются высокие требования: качество очистки (особо чистые растворители); отсутствие взвешенных частиц (фильтрация на входе колонки на металлическом фильтре с диаметром пор менее 4 мкм); обеспечение максимальной селективности разделения; минимальная вязкость (см. разд. 4.1); учет условий работы детектора [растворитель не должен поглощать при рабочей длине волны (см. разд. 4.1)]; отсутствие комплексообразующих ионов (галогены или ацетат-ионы высокой концентрации), способных вызвать коррозию металлических частей насоса.

Приборы и материалы

Хроматографы для ВЭЖХ состоят из следующих составных частей (рис. 2.3.2/2):

насоса, обеспечивающего рабочее давление до $200 \cdot 10^5$ Па; манометра, рассчитанного на $400 \cdot 10^5$ Па; капилляров, изготовленных из нержавеющей стали (внешний диаметр 1,5 мм, внутренний диаметр 0,3 мм); высококачественных устройства ввода пробы и колонки; детектора (УФ-детектор или рефрактометр, см. разд. 2.3.3) с ячейкой небольшого объема (не более 8 мкл), имеющего высокую чувствительность;

безынерционного самописца с переменной скоростью протяжки ленты ($11-200$ см·ч⁻¹; задержка ответа не более 0,5 с).

«Мертвый» объем во всех элементах системы должен быть минимальным.

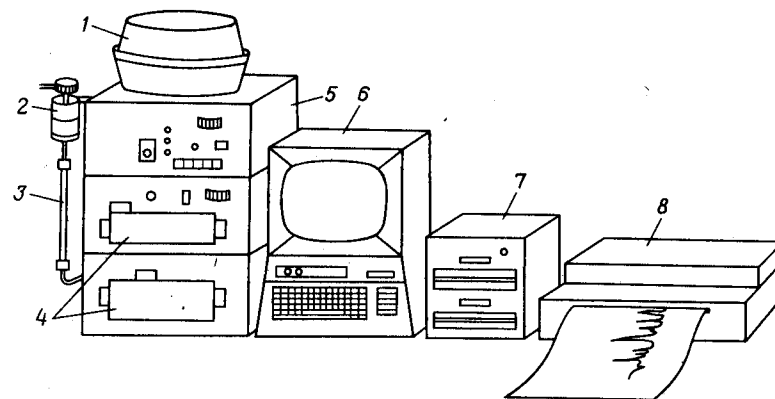


Рис. 2.3.2/2. Схема хроматографа для ВЭЖХ:

1 — блок хранения пробы; 2 — блок ввода пробы; 3 — колонка; 4 — насос; 5 — детектор; 6 — микропроцессор; 7 — дисковод; 8 — принтер

Градиентный смеситель

Наиболее простой моделью градиентного смесителя является система из двух сообщающихся сосудов, применяемая в хроматографии низкого давления (см. рис. 2.3.1/2). Более современные модели градиентных смесителей снабжены клапанами, управляемыми при помощи микропроцессоров. Преимущество таких моделей заключается в том, что для создания градиента концентрации достаточно одного насоса. Иногда используют модель с двумя насосами в едином блоке с микропроцессором. В этом случае градиент формируют в области высоких давлений, т. е. на входе в колонку, причем изменение градиента получается гораздо точнее. В большинстве случаев вполне достаточно однократной деаэрации растворов путем выдерживания их в вакууме.

Устройства ввода пробы

Ввод пробы можно осуществлять при помощи шприца (рис. 2.3.2/3). Шприцем, изображенным на рис. 2.3.2/3, а, можно вводить пробу любого объема с хорошей воспроизводимостью в колонку, находящуюся под давлением до 1,5 МПа.

Однако в настоящее время редко пользуются шприцами для ввода образца, так как к ним предъявляются высокие требования по герметичности. Чаще всего используют *петлевые дозаторы* (рис. 2.3.2/4), которые позволяют вводить пробу при рабочем давлении. Применяют дозаторы фирмы Rheodyne (длина канала петли 5 см, диаметр 0,56 мм, отмеряемый объем пробы от 1 до 2000 мкл).

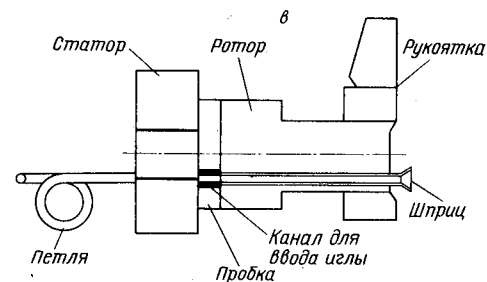
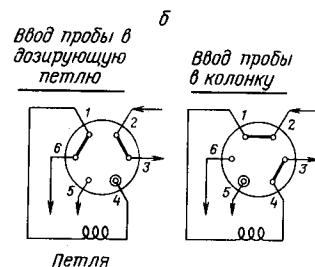
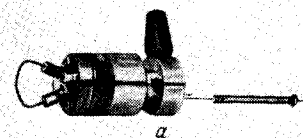
Колонки

Колонки представляют собой трубки из нержавеющей стали с хорошо отполированной внутренней поверхностью. Наиболее распространенными являются колонки следующих типов:

колонки для аналитического разделения (рис. 2.3.2/5) размером 4×250 или 4×125 мм; применение коротких колонок и новых сорбентов (с диаметром частиц

Рис. 2.3.2/4. Петлевой дозатор (Latek Labortechnik-Geräte GmbH, Heidelberg):

а — общий вид блока с дозирующей петлей и шприцем; б — положения крана-переключателя; в — схема крана-переключателя; 1 — дозирующая петля; 2 — насос; 3 — колонка; 4 — шприц; 5, 6 — на выход



5 мкм и менее) позволяет достигнуть очень высокого разрешения при небольших затратах;

колонки для препаративного разделения с внутренним диаметром 8, 10, 16 мм и длиной 250 и 500 мм.

Сорбенты

Для всех вариантов ВЭЖХ, за исключением аффинной хроматографии, выпускаются специальные сорбенты. Некоторые из них рассматриваются в разд. 2.1.1—2.1.3 и 2.1.5. Нерегулярные и сферические сорбенты с диаметром частиц 5—10 мкм упаковывают с достаточно высокой воспроизводимостью. Трудности появляются при работе с мелкими фракциями, в частности сложной проблемой является приготовление стабильных суспензий. Высокой воспроизводимости упаковки достигают также при использовании поверхностно-пористых сорбентов (непористое ядро и пористый поверхностный слой) с частицами диаметром 20—30 мкм, особенно при сухом способе набивки (см. разд. 2.3.1). Эти сорбенты обладают небольшой емкостью и используются главным образом для аналитических целей.

Рис. 2.3.2/3. Шприцы для ВЭЖХ (Latek Labortechnik-Geräte, Heidelberg):

а — микрошприц с тефлоновым поршнем; б — микрошприц с адаптером

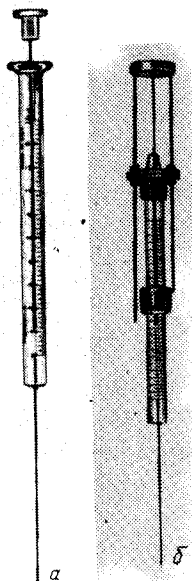


Рис. 2.3.2/5. Колонка для ВЭЖХ (Merck, Darmstadt): 1 — капилляр на входе (нержавеющая сталь 1/16); 2 — переходник (нержавеющая сталь); 3 — уплотнительное кольцо (тефлон); 4 — пористый фильтр; 5 — трубка (нержавеющая сталь, внутренний диаметр 4 мм) с внешней резьбой; 6 — выход колонки (детали 1—5 в сборе)

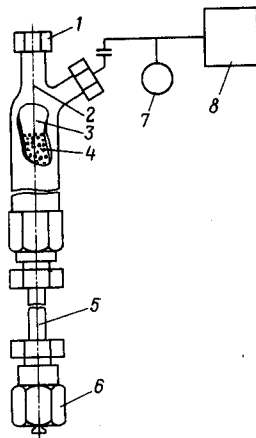
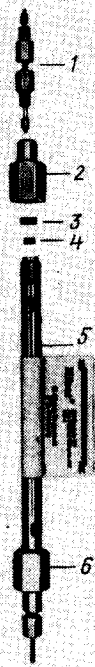


Рис. 2.3.2/6. Устройство для упаковки колонки по методу «равновесной плотности» (Siemens, München):

1 — накидная гайка; 2 — патрубок для подачи суспензии; 3 — слой гептана; 4 — суспензия сорбента; 5 — колонка; 6 — выход колонки; 7 — манометр; 8 — насос

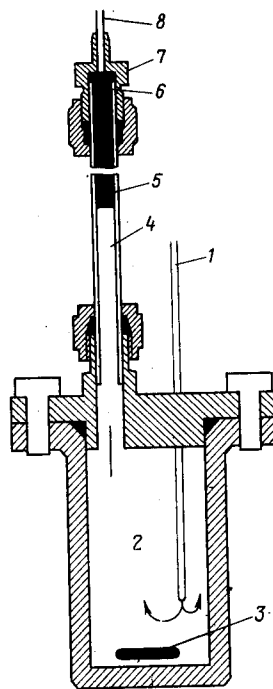


Рис. 2.3.2/7. Схема прибора для упаковки колонки сорбентами, чувствительными к кислороду воздуха и деформирующимися под давлением (Micrometrics, Norcross GA 30093, USA):

1 — от насоса; 2 — суспензия сорбента; 3 — магнит; 4 — колонка; 5 — слой сорбента; 6 — фильтр; 7 — блок на выходе; 8 — капилляр на выходе

Стабилизацию суспензий осуществляют методами «равновесной плотности» и «вязкой среды» (см. ниже). В первом случае используют цилиндрический сосуд — резервуар 4 (рис. 2.3.2/6), объем которого превышает объем колонки (это необходимо, чтобы поместить в него рассчитанное количество суспензии сорбента). Колонка 6 заполнена растворителем высокой плотности, резервуар 4 — суспензией сорбента низкой плотности (гептан). Насос 8 подает суспензию в колонку. Окончание процесса характеризуется падением давления в системе, которое регистрируется манометром 7.

При работе с сорбентами, чувствительными к кислороду воздуха или деформирующимися под давлением, используют прибор, изображенный на рис. 2.3.2/7. Прибор состоит из емкости типа автоклава. При упаковке суспензию перемешивают при помощи магнитной мешалки и постепенно передавливают в колонку, где сорбент уплотняется, формируя рабочий слой. Перемешивание исключает нежелательный процесс седиментации, при этом плотность и вязкость растворителя уже не имеют решающего значения.

Подготовка пробы

Образец растворяют в рабочем растворителе и перед вводом в колонку фильтруют на фильтре с диаметром пор менее 4 мкм или центрифугируют для удаления механических примесей. Если этой операцией пренебречь, колонка быстро забивается и выходит из строя.

Порядок выполнения операций

Упаковка колонки

При упаковке колонки главная задача заключается в том, чтобы свести к минимуму нежелательный процесс седиментации. Этого достигают правильным выбором смеси растворителей для приготовления суспензий: смесь либо имеет плотность, близкую к плотности сорбента, либо достаточно высокую вязкость. Стабилизации суспензии достигают перемешиванием (см. рис. 2.3.2/7).

Метод равновесной плотности применяют при работе с сорбентами, нечувствительными к действию кислот (кислота, например НВг, может появиться вследствие разложения тетрабромэтана). Например, силикагель суспендируют в системе тетрабромэтан — диоксан — четыреххлористый углерод 20:15:15.

Метод вязких растворителей основан на уменьшении седи-

ментации за счет высокой вязкости растворителя (изопропанол, диоксан).

Упаковку колонки производят следующим образом:

колонку промывают дихлорметаном (хлористым метиленом), ополаскивают водой, горячим 5%-м раствором детергента и одновременно протирают ершом, стараясь не повредить внутреннюю поверхность; в заключение колонку промывают водой, метанолом и высушивают, исключая возможность попадания внутрь частиц пыли и капелек масла;

пористую пластинку или фильтр, делитель потока, уплотнительные кольца монтируют на выходе в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя; после упаковки колонки на выходе подсоединяют капиллярный наконечник;

на входе в колонку монтируют прибор для упаковки;

сорбент суспендируют в системе растворителей, диспергируют в течение 10 мин при помощи ультразвука, проводят деаэрацию;

суспензию переносят в прибор для упаковки и плотно его закрывают, не допуская попадания пузырьков воздуха; прибор подсоединяют к насосу;

запасной сосуд заполняют гептаном (в случае метода равновесной плотности) или вязким растворителем (в случае метода вязких растворителей) (применение гептана сопряжено с резким падением рабочего давления по окончании упаковки);

суспензию при максимальном давлении перекачивают в колонку;

по завершении процесса упаковки отключают насос и демонтируют устройство для упаковки;

избыток сорбента извлекают шпателем, на входе помещают пористый фильтр, делитель потока, уплотнительные кольца, капилляр;

перед началом работы колонку выводят на рабочий режим, причем предварительно элюент подвергают деаэрации, чтобы исключить возможность попадания пузырьков воздуха в ячейку детектора.

Источники ошибок

Плохая упаковка: седimentация сорбента при упаковке ведет к несимметричности пиков. Рекомендуется: ускорить процесс упаковки (производительность насоса установить $1000 \text{ мл} \cdot \text{ч}^{-1}$, рабочее давление $5 \cdot 10^7 \text{ Па}$); при недостаточной механической прочности частиц сорбента упаковывать при перемешивании (см. рис. 2.3.2/7).

Плохое качество сорбента или растворителя ведет к плохой воспроизводимости результатов. Рекомендуется: между насосом и блоком ввода пробы поместить предколонку большого объема с крупнозернистым сорбентом.

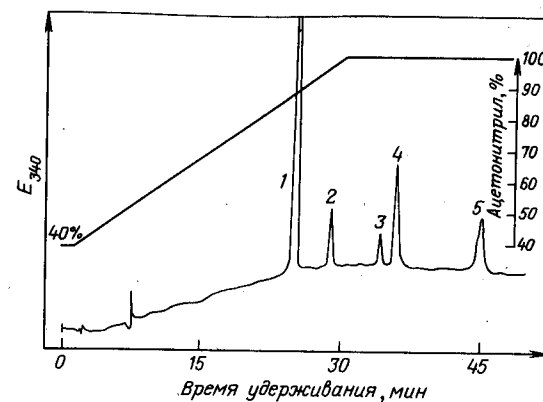


Рис. 2.3.2/8. Хроматограмма разделения методом ВЭЖХ полициклических ароматических соединений на нуклеосиле С 18 (5 мкм):

1 — коронен; 2 — бензо[а]коронен; 3 — неидентифицированный компонент; 4 — антрацен; 5 — неидентифицированный компонент [Thomas R., Zahnder M., Z. Anal. Chem. 282, 443 (1976)]

Засорение фильтра на входе в колонку увеличивает сопротивление колонки. Рекомендуется: сменить фильтр или промыть колонку в режиме противотока; тщательнее фильтровать раствор пробы и растворителя.

При градиентном элюировании присутствие в растворителях незначительных примесей ведет к появлению на графике фантомных пиков: примеси сорбируются на входе в колонку, а затем десорбируются по мере изменения состава элюента; получаемые пики могут быть ошибочно приняты за компоненты анализируемой смеси. Рекомендуется: использовать только тщательно очищенные растворители.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят хроматограмму (рис. 2.3.2/8). Измеряемые параметры элюата (экстинкция при поглощении в УФ-свете в делениях шкалы самописца в зависимости от чувствительности детектора) откладывают на оси ординат. Например, если чувствительность детектора установлена на 0,02 единицы экстинкции, то это значение соответствует максимальной высоте шкалы самописца.

Далее в рабочем журнале приводят следующие данные: колонка — $4 \times 200 \text{ мм}$, подвижная фаза — изменение концентрации от 40%-го водного раствора ацетонитрила до 100%-го ацетонитрила за 30 мин; скорость подачи элюента — $1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$; давление — 11,6 МПа; способ регистрации — поглощение при 340 нм; температура — 50°C ; объем пробы — 10 мкл.

Ускоренный анализ разнообразных смесей при высоком разрешении, высокой чувствительности и хорошей воспроизводимости.

Препаративное разделение веществ в количестве от нескольких миллиграмм до нескольких грамм.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer, Berlin 1975
 J. F. K. Huber, Hrsg., Instrumentation for High Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library, Bd. 13, Elsevier, Amsterdam 1978
 O. Mikes, Hrsg., Chromatographic and Allied Methods, Ellis Horwood, Chichester 1979
 L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New York 1974

2.3.3. ДЕТЕКТОРЫ

Хроматографические детекторы представляют собой приборы, позволяющие выявлять целевые вещества в потоке элюента по характерным свойствам (окраске, флуоресценции, поглощению в УФ-области спектра и др.).

Основы процесса

В жидкостной хроматографии применение детекторов позволяет решать следующие задачи: обнаружение и идентификацию анализируемых веществ по объему элюата или времени удерживания; количественную оценку анализируемых веществ (по площади пиков на хроматограмме).

Детекторы для жидкостной хроматографии должны обладать ячейками небольшого объема (в ВЭЖХ не более 8 мкл), а работа их должна характеризоваться высокой чувствительностью при незначительном шуме, широким диапазоном измерения при сохранении по возможности линейного ответа, нечувствительностью к колебаниям давления, скорости потока, температуры в измерительной ячейке, стабильностью во времени.

В жидкостной хроматографии низкого давления к детектору предъявляются не столь высокие требования. Он может быть проще в конструктивном отношении и дешевле в изготовлении. В препаративной хроматографии высокая чувствительность детектора также не обязательна.

Для анализа многих классов веществ наиболее всего подходят два типа детекторов:

спектрофотометрический — регистрирует поглощение в УФ- и видимой области спектра;

рефрактометрический (дифференциальный рефрактометр) — измеряет разность показателей преломления в сравнительной

(подвижная фаза) и рабочей (подвижная фаза с анализируемым веществом) кюветках.

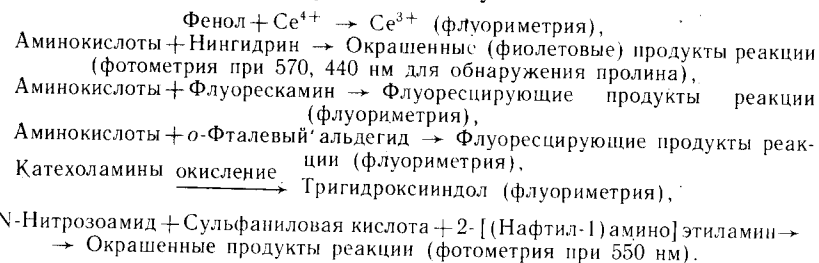
Гораздо реже применяются другие типы детекторов.

Флуориметр — регистрирует флуоресценцию веществ. В целом этот детектор характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению со спектрофотометрическим детектором.

Разнообразные **электрохимические** детекторы, например: проточные рН-детекторы; ион-селективные электроды для обнаружения некоторых видов ионов; проточные детекторы по электропроводности; вольтамперометрические детекторы, амперометрические детекторы, иногда их называют электрохимическими. В последнее время эти недорогие детекторы находят все более широкое применение.

Радиоактивационные детекторы — регистрируют интенсивность β - и γ -излучения радиоактивных изотопов.

Разнообразные детекторы (обычно **фотометры**) для обнаружения продуктов реакции анализируемых веществ со специфическими реагентами. В этом случае элюат смешивают с раствором реагента и затем подают в реактор — свернутый в спираль тефлоновый капилляр определенной длины. Окрашенный или флуоресцирующий продукт реакции регистрируется количественно в расположенном вслед за реактором УФ-детекторе или фотометре. В качестве примера реакций, используемых для обнаружения веществ в потоке, можно указать следующие:



Приборы

УФ-детекторы

В настоящее время наиболее широкое применение получили УФ-спектрофотометры. Они бывают одно- и двухлучевые.

УФ-фотометры с оптическими фильтрами или с дифракционной решеткой позволяют вести регистрацию при 254 или 280 нм. При подборе соответствующих фильтров можно вести измерения и при других длинах волн. Детекторы, работающие при длинах волн 200—220 нм, предназначены для обнаружения веществ, не поглощающих при 254 и 280 нм (например, аминокислот, сахаров). Однако в этом случае пригодны лишь немногие растворители (вода, ацетонитрил), не поглощающие при 210 нм (см. разд. 4.1).

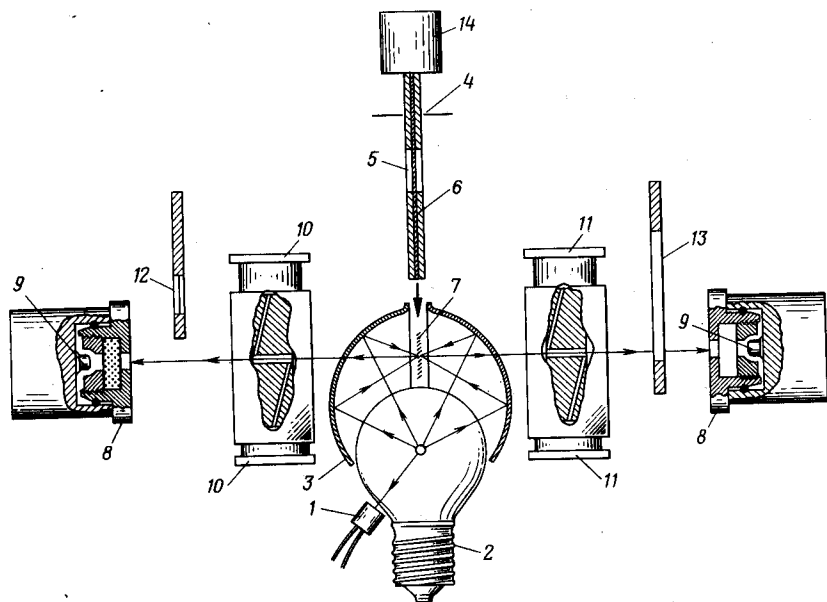


Рис. 2.3.3/1. Оптическая схема двухлучевого УФ-детектора (ISCO, Lincoln, NE/USA):

1 — регулирующая фоточайка; 2 — ртутная лампа низкого давления; 3 — отражатель; 4 — фильтр-отсекатель (входит в состав сменного фильтра); 5 — фосфоресцирующий или люминесцирующий экран-усилитель (входит в состав сменного фильтра); 6 — алюминиевая фольга (входит в состав сменного фильтра); 7 — рабочее положение сменного фильтра; 8 — фильтр с флуоресцирующим слоем; 9 — фотоумножитель; 10 — измерительная кювета; 11 — сравнительная кювета; 12 — калибровочный стандарт; 13 — диафрагма; 14 — рукоятка

Спектрофотометр с переменной длиной волны (200—600 нм) используют для количественного анализа. Регистрация ведется при длине волны, соответствующей максимуму поглощения анализируемых веществ, или же при длине волны, при которой не поглощают сопутствующие примеси.

Детекторы с автоматически регулируемой чувствительностью применяют в препаративной жидкостной хроматографии низкого давления.

Сканирующий спектрофотометр применяют для снятия полного спектра поглощения веществ в потоке элюата и проведения количественного анализа даже при весьма условном разделении анализируемой смеси. Для обработки получаемого при этом огромного объема информации требуется применение вычислительной техники.

На рис. 2.3.3/1 изображена оптическая схема УФ-детектора. Большинство приборов позволяют проводить детектирование при двух длинах волн. В этом случае анализируемые вещества (например, нуклеотиды) идентифицируют по соотношению коэффи-

циентов экстинкции (см. разд. 3.4.1/1). Для препаративного выделения вполне достаточно однолучевого УФ-детектора, работающего при одной длине волны.

Рефрактометрические детекторы

Принцип действия дифференциального рефрактометра основан на том, что при прохождении луча света через две кюветы, заполненные жидкостями с различными показателями преломления (обыкновенно измерительная кювета заполнена элюатом из колонки, а сравнительная кювета — чистым растворителем), луч отклоняется на угол, пропорциональный разности показателей преломления. Отраженный луч фокусируется на фотосопротивлении, которое вырабатывает электрический сигнал, регистрируемый самописцем.

Эти детекторы применяют для обнаружения веществ, не поглощающих свет в видимой и УФ-области спектра.

Затруднения возникают при градиентном элюировании (см. разд. 2.1.3), так как растворители для хроматографии, как правило, имеют различные показатели преломления. В этом случае стараются использовать растворители с близкими показателями преломления (см. разд. 4.1). Существенным недостатком рефрактометрических детекторов является недостаточно высокая чувствительность по сравнению с УФ-детекторами.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.3.2.

2.3.4. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Основы метода

Перед проведением хроматографического анализа необходимо ясно очертить круг решаемых проблем:

предстоит выделять лишь один компонент или все компоненты анализируемой смеси;

предстоит препаративное разделение или анализ;

необходим единственный эксперимент или серия экспериментов;

достаточно получить хроматограмму или необходимо выделить вещества для последующего изучения;

насколько глубоки различия в свойствах разделяемых веществ (молекулярная масса, наличие функциональных групп, структурной изомерии и др.).

Выбор принципа разделения

Чем полнее информация о свойствах анализируемых веществ, тем проще решается проблема разделения. Так, например, только данные о растворимости целевых веществ позволяют сделать достаточно серьезные выводы (табл. 2.3.4/1) о возможной схеме проведения эксперимента. Если имеется какая-либо предварительная информация о свойствах анализируемых веществ, то, руководствуясь данными, приведенными на рис. 2.3.4/1, можно выбрать подходящий принцип разделения.

Анализируемые вещества распределены по полярности функциональных групп (возрастает слева направо) и по числу функциональных групп в молекуле (возрастает сверху вниз). Неполарные вещества разделяют при помощи НФХ. Соединения, содержащие, например, больше двух амидных групп, разделяют методом ОФХ. Вещества с двумя амидными группами разделяют методом распределительной хроматографии. Вещества с ионогенными группами разделяют как при помощи распределительной, так и при помощи ионообменной хроматографии. По мере увеличения

Таблица 2.3.4/1. Выбор принципа разделения и типа сорбента в зависимости от растворимости целевого вещества

Растворимость целевого вещества	Принцип разделения	Сорбент	
		хроматография низкого давления	хроматография высокого давления
Только в воде	Ионообмен	Дауэкс (Dowex), сефадекс, ионообменная целлюлоза	Ионообменники на основе силикагеля
	Гель-хроматография *	Сефадекс G, биогель, гидрогель, сефакрил, агароза	Пористое стекло (CPG), TSK-гель
В воде и этаноле	Адсорбция (ОФХ)	RP 8	RP 2, RP 8, RP 18
	Распределение	Целлюлоза или модифицированный декстран (сефадекс LH), элюент: малополярный + сильнополярный растворитель)	Силикагель
	Гель-хроматография *	Сефадекс LH	Порагель, порасил, пористое стекло (CPG)
В этаноле и дихлорметане (хлористом метиле)	Адсорбция или распределение	Силикагель, Сефадекс LH	Модифицированный кизельгель ($-\text{OH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, RP 18)
	Гель-хроматография *	Сефадекс LH	Полистирагель (например, стирагель)
В дихлорметане и гептане	Адсорбция или гель-хроматография *	Силикагель, оксид алюминия	Силикагель
		Полистирагель (например, био-бедс)	Полистирагель (например, стирагель)

* В случае молярных масс более $500 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$.

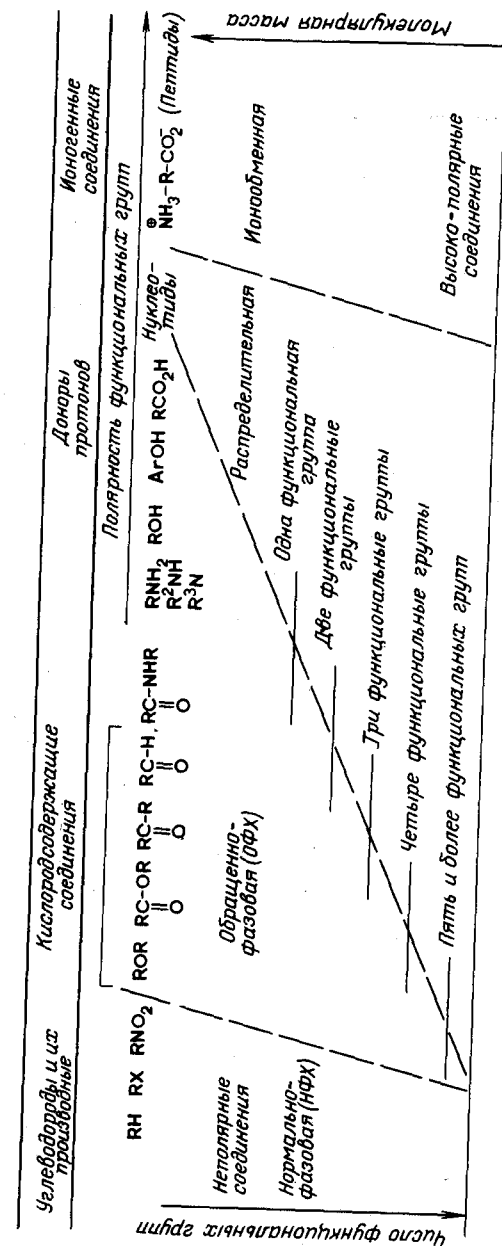


Рис. 2.3.4/1. Выбор принципа разделения

числа заряженных групп, а также общей полярности соединений предпочтительным методом становится ионообменная хроматография. С увеличением молекулярной массы (возрастает снизу вверх) возрастает роль полярных групп и ионных взаимодействий. Такие вещества скорее всего будут располагаться в правой части диаграммы.

Выбор системы элюентов

Гель-хроматография. Здесь руководствуются простым правилом: вещества должны хорошо растворяться в элюенте, а вязкость элюента и раствора пробы должна быть минимальной. Нежелательную адсорбцию сводят к минимуму при помощи добавок к элюенту (см. разд. 2.1.5).

Ионообменная хроматография. Влияние величины pH и ионной силы раствора на селективность ионообменников рассматривается в разд. 2.1.3. Следует еще раз напомнить, что селективность зависит не только от ионной силы буфера, но и от природы противоионов буфера.

Адсорбционная хроматография (см. разд. 2.1.1). Выбрать систему для хроматографии на неполярных сорбентах (ОФХ) в целом проще, чем для хроматографии на полярных сорбентах (НФХ). Во многих случаях вполне подходят системы метанол — вода или ацетонитрил — вода. Вторая система является предпочтительной, так как вязкость элюента по мере возрастания концентрации ацетонитрила убывает, тогда как в системе метанол — вода вязкость выше, чем в чистых растворителях. Сопротивление колонки для системы метанол — вода выше, чем для системы ацетонитрил — вода. В НФХ можно увеличить селективность процесса и скорректировать форму пика, если использовать не очень полярный растворитель, содержащий 1—2% полярного растворителя (например, метанола, уксусной кислоты и др.). Важно использовать тщательно очищенные растворители. Наличие влаги существенно влияет на селективность неполярной системы растворителей. На рис. 2.3.4/2 проиллюстрирована зависимость качества разделения от содержания в элюенте воды. Данные приведены для следующей хроматографической системы: колонка размером 2×500 мм; давление 5,6 МПа; скорость потока $300 \text{ мл} \cdot \text{ч}^{-1}$; сорбент Перисорб А; элюент — *n*-гептан. В случае б и в чувствительность детектора выше, соответственно выше и пики. В целом хроматография в абсолютированных растворителях не обеспечивает наилучшего разделения. Следует напомнить, что товарный хлороформ содержит в качестве стабилизатора 1% этанола, что оказывает заметное влияние на качество разделения. Органические растворители вначале очищают на оксиде алюминия и (или) силикагеле (см. разд. 4.1). Не следует использовать в качестве осушителей молекулярные сита, так как в них

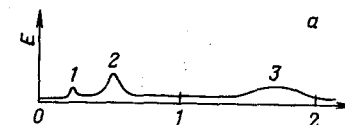


Рис. 2.3.4/2. Зависимость качества разделения смеси от содержания в элюенте — *n*-гептане — воды:

а — *n*-гептан обезвожен; б — *n*-гептан на 30% насыщенный водой; в — *n*-гептан сильно насыщен водой; 1 — бензол; 2 — бифенил; 3 — *m*-трифенил; 4 — *m*-тетрафенил; 5 — *m*-пентафенил

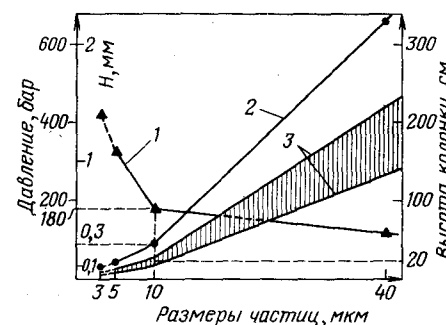
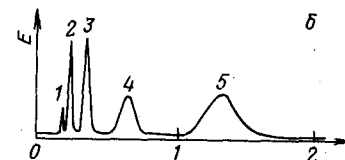


Рис. 2.3.4/3. Зависимость качества разделения от размеров частиц сорбента при высокой линейной скорости потока элюента (Merck, Darmstadt):

а — диаметр частиц 30 мкм; б — диаметр частиц 5 мкм (колонка размером 3×190 мм; сорбент Лихросорб Si-100; элюент — *n*-гептан; скорость потока $2 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$)

Рис. 2.3.4/4. Взаимозависимость высоты колонки, размеров частиц и рабочего давления (число теоретических тарелок 3000, скорость подачи элюента $1 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$):

1 — кривая давления; 2 — кривая ВЭТТ; 3 — кривая высоты колонки (при диаметре частиц 10 мкм высота колонки должна быть 20 см, рабочее давление составляет 180 бар, а ВЭТТ 0,3 мм)

всегда присутствуют механические примеси (пыль), забивающие колонку. Элюенты необходимой степени влажности готовят смешиванием с насыщенными водой растворителями.

Распределительная хроматография. Здесь возможно огромное число сочетаний подвижной и неподвижной фаз (см. разд. 2.1.2). Однако вследствие получения силикагелей, модифицированных разнообразными функциональными группами, распределительная хроматография в значительной степени утрачивает свое значение.

Выбор размеров частиц сорбента

В этом вопросе руководствуются следующими правилами: чем меньше размеры частиц сорбента, тем выше разрешение (рис. 2.3.4/3), однако тем выше и рабочее давление (сопротивление колонки) (рис. 2.3.4/4);

чем однороднее частицы, тем выше качество упаковки колонки, тем выше разрешение.

Использование сорбентов, размер зерен которых менее 10 мкм, ведет к увеличению рабочего давления при сохранении постоянной скорости подачи элюента (см. рис. 2.3.4/4). Для единичных экспериментов, а также для серийных анализов оптимальными являются материалы с частицами размером 7 или 10 мкм.

Выбор условий разделения

После того как определен принцип разделения, подобраны элюент и размеры частиц сорбента, необходимо дать ответ на следующие вопросы:

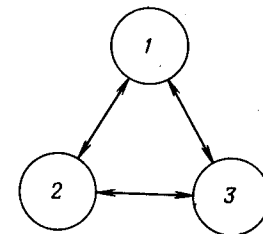
- какое разрешение должно быть достигнуто;
- какое количество вещества необходимо разделить;
- насколько важен фактор времени.

На практике все параметры взаимосвязаны, и условия хроматографического разделения могут быть оптимизированы только по одному из трех параметров. Взаимосвязь этих основных параметров может быть представлена в виде «магического» треугольника (рис. 2.3.4/5).

В общем случае предельное разрешение оказывается не обязательным. В аналитике достаточно умеренного разрешения ($R < 1$, сигнал самописца не достигает базовой линии) между пиками (ср. разд. 2.3). На рис. 2.3.4/2 представлена хроматограмма разделения полифенилов в различных условиях. Вариант *a* иллюстрирует наиболее высокое разрешение. Через 1 мин после начала элюирования на графике появляются первые два пика, спустя некоторое время — остальные. Пики узкие и достаточно высокие. При постоянной чувствительности детектора объем пробы можно уменьшить, что несколько повышает степень разрешения. Более того, можно вдвое уменьшить объем колонки (при

Рис. 2.3.4/5. «Магический» треугольник хроматографии — взаимосвязь параметров:

1 — разрешение; 2 — время; 3 — нагрузка



этом уменьшается объем пробы и расход растворителей), но хроматограмма все еще будет пригодна для количественной оценки). Однако при слишком короткой колонке на качество разделения все большее влияние будет оказывать общий мертвый объем системы, в особенности объем ячейки детектора.

Оптимизация условий препаративного разделения

Предварительно оптимизируют условия разделения на аналитическом уровне, растворимость пробы при этом должна быть достаточно высокой. Это условие, в общем-то не существенное при аналитическом разделении, облегчает переход к препаративному разделению. Все варианты препаративного разделения можно свести к трем типовым случаям (рис. 2.3.4/6—2.3.4/9), по Снайдеру и Киркланду.

1. *Целевому веществу соответствует основной пик на хроматограмме.* В этом случае переход от аналитического разделения к препаративному осуществляют в соответствии со схемой, представленной на рис. 2.3.4/7:

- проводят аналитическое разделение;
- повышают качество разделения за счет увеличения селективности;
- увеличивают пределы нагрузки колонки (ведут разделение до начала перекрывания соседних пиков);
- перегрузка колонки приводит к проскоку вещества, при этом колонка теряет разделяющую способность.

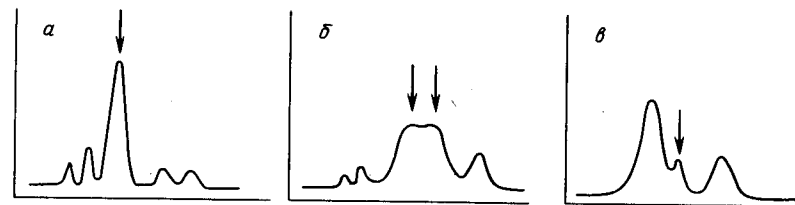


Рис. 2.3.4/6. Типовые случаи препаративного разделения:

a — целевому веществу соответствует главный пик; *б* — целевым веществам соответствуют два плохо разделившихся пика; *в* — целевому веществу соответствует небольшой пик на фоне больших пиков побочных веществ

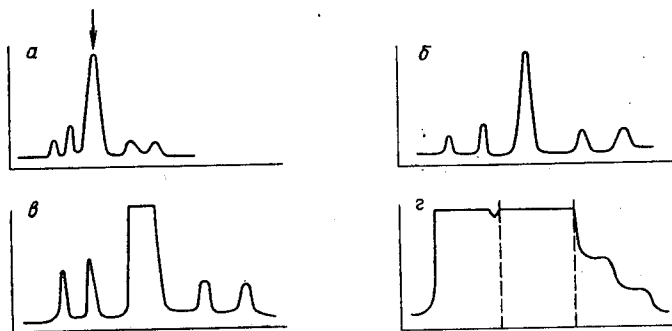


Рис. 2.3.4/7. Схема переноса условий аналитического разделения на preparативный уровень:

a — разделение на аналитическом уровне (целевое вещество содержится в главном пике); *б* — оптимизация условий разделения — увеличение селективности; *в* — увеличение пределов нагрузки; *г* — колонка перегружена

2. Два целевых вещества плохо разделяются. Если исчерпаны все возможности повышения качества разделения, прибегают к рециркуляционной хроматографии (рис. 2.3.4/8):

наносят на колонку пробу и отделяют целевые вещества от примесей (рис. 2.3.4/8, *a*);

чистые целевые вещества (соответствуют крайним областям пиков компонентов А и Б) собирают отдельно;

смесь целевых веществ А и Б (соответствует внутренней области сдвоенных пиков) концентрируют и хроматографируют повторно, т. е. при помощи переключателя непосредственно направляют на вход колонки и продолжают работу в непрерывном режиме.

На колонку наносят большую порцию пробы, что предпочтительнее, чем многократная загрузка колонки небольшими порциями. После отделения сопутствующих примесей на первой стадии главной целью является разделение двух целевых веществ. Рабочий цикл сокращают, нанося последующую порцию разделяемой смеси, содержащую целевые компоненты, очищенные от

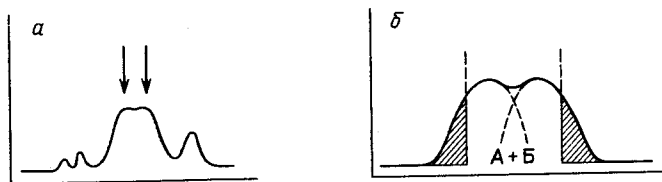


Рис. 2.3.4/8. Preparative разделение двух плохо разделяющихся целевых веществ рециркуляционной хроматографией:

a — отделение примесей; *б* — получение части компонентов А и Б в очищенном виде

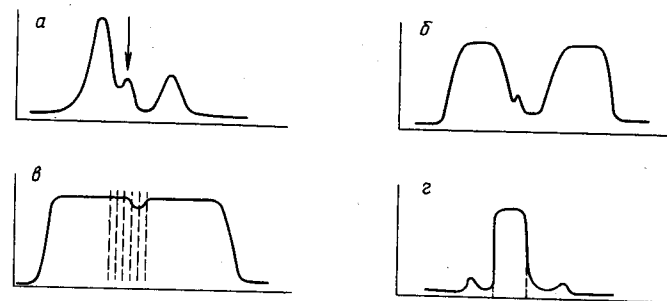


Рис. 2.3.4/9. Preparative выделение небольшого количества целевого вещества на фоне высокого содержания примесей:

a — аналитическое разделение; *б* — определение пределов нагрузки колонки; *в* — перегрузка колонки и отбор небольших фракций в зоне, соответствующей целевому компоненту; *г* — хроматографирование объединенных фракций, содержащих целевое вещество

сопутствующих примесей уже при появлении на выходе колонки второго компонента.

3. Целевое вещество составляет небольшую часть исходной смеси на фоне большого количества сопутствующих примесей (рис. 2.3.4/9, *a*):

колонку перегружают, но не за счет повышения концентрации вещества в пробе (рис. 2.3.4/9, *б*);

в области выхода целевого вещества элюат собирают в виде отдельных фракций (рис. 2.3.4/9, *в*);

фракции, содержащие целевое вещество, объединяют и вновь наносят на колонку (рис. 2.3.4/9, *г*), после чего разделение ведется как в первом из трех типовых вариантов.

Наносимая проба не должна быть слишком концентрированной. Как видно из рис. 2.3.4/10, до определенной концентрации эффективность колонки остается постоянной, однако при достижении предельной концентрации разрешение резко падает. Различают два типа перегрузки колонки: за счет большого объема пробы оптимальной концентрации и за счет высокой концентрации вещества в пробе. В первом случае разрешающая способность

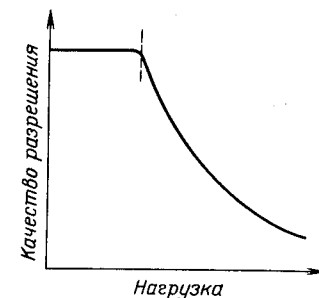


Рис. 2.3.4/10. Влияние нагрузки колонки на эффективность разделения (пунктиром обозначен предел нагрузки)

колонки остается неизменной (на хроматограмме наблюдаются крутые пики) или происходит уширение пиков. Во втором случае разрешение уменьшается, так как все компоненты размыты в широкой области (пики на хроматограмме не наблюдаются). Поэтому предпочитают наносить пробу оптимальной концентрации в большом объеме, чем пробу высокой концентрации в малом объеме.

Специальные методы хроматографии

Рециркуляционная хроматография. Этот вариант применяют в случае крайне низкого разрешения целевых веществ (см. рис. 2.3.4/8, а). Схема установки для рециркуляционной хроматографии приведена на рис. 2.3.4/11.

Вначале целевые компоненты А и Б отделяют от сопутствующих примесей (см. рис. 2.3.4/8, а). При этом переключатели V_1 и V_2 установлены в соответствии со стрелками на рисунке, а насос P подает на колонку элюент из резервуара L (рис. 2.3.4/11, б, 1, 2). Фракции, содержащие целевые вещества, объединяют, концентрируют и вновь наносят на колонку.

Как только целевое вещество начинает поступать в кювету детектора D , что регистрирует самописец, четырехходовой кран V_2 переключают, направляя элюат на вход колонки (рис. 2.3.4/11, б, 3). При таком положении крана хроматографию продолжают до достижения удовлетворительного разрешения (рис. 2.3.4/12).

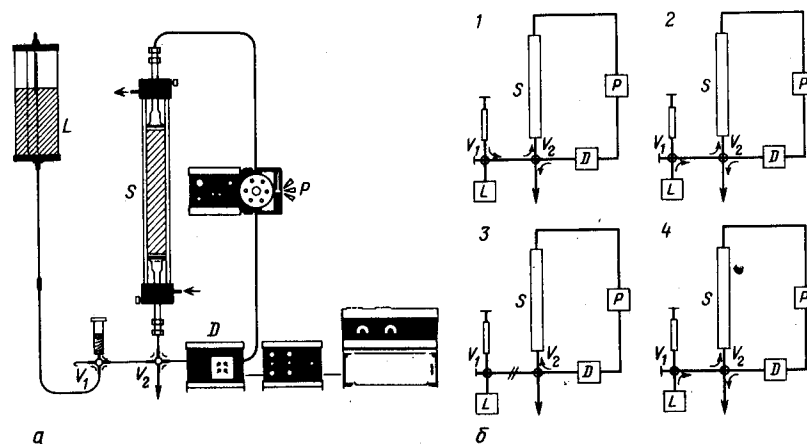


Рис. 2.3.4/11. Рециркуляционная хроматография:

а — общая схема установки для рециркуляционной хроматографии; б — схема переключения установок в ходе процесса; 1 — подача образца в колонку; 2, 4 — элюирование; 3 — рециркуляция; L — резервуар; S — колонка; D — детектор; P — насос; V_1 и V_2 — переключатели потоков

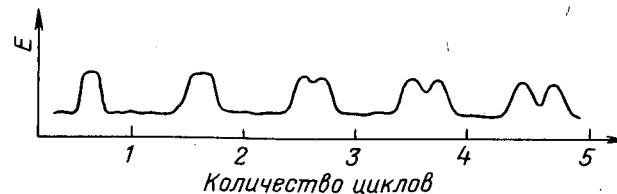


Рис. 2.3.4/12. Препаративное разделение двух веществ при помощи рециркуляционной хроматографии (удовлетворительное разрешение достигается лишь на пятом цикле)

Кран устанавливают в первоначальное положение и элюат собирают по фракциям (см. рис. 2.3.4/11, б, 4).

На промежуточных циклах чистое целевое вещество (соответствует крайним областям сдвоенного пика) направляют на коллектор, а для последующего разделения используют лишь промежуточные фракции со смесью веществ А и Б. Такой прием называется рециркуляционной хроматографией с отбором.

К установкам для рециркуляционной хроматографии предъявляются специальные требования:

насос должен быть небольшого рабочего объема (в классической жидкостной хроматографии это обычно перистальтический насос), что препятствует нежелательному размыванию пиков;

ячейка детектора должна выдерживать рабочее давление (и высокое давление при ВЭЖХ) и иметь минимальный объем; в препаративной хроматографии достаточно иметь кювету небольшой толщины, так как обычно работают с растворами целевых веществ достаточно высоких концентраций;

желательно применение разнообразных средств автоматизации (например, порогового переключателя).

В заключение следует указать на следующие преимущества рециркуляционной хроматографии:

при работе на нескольких коротких колонках достигается большое число теоретических тарелок; кроме того, более короткие колонки проще упаковать по сравнению с длинными;

на коротких колонках можно работать при небольшом рабочем давлении;

при рецикле используется меньше сорбента, что экономит средства при применении дорогостоящих сорбентов.

Каскадная хроматография. Наилучшее разрешение возможно только при элюировании в изократическом режиме. Однако если в анализируемой смеси присутствуют вещества с сильно различающимися коэффициентами емкости k' , разделение в изократическом режиме лишено смысла (из-за большой продолжительности процесса и чрезмерного расхода элюента). В этом случае целесообразно проводить разделение в градиенте состава

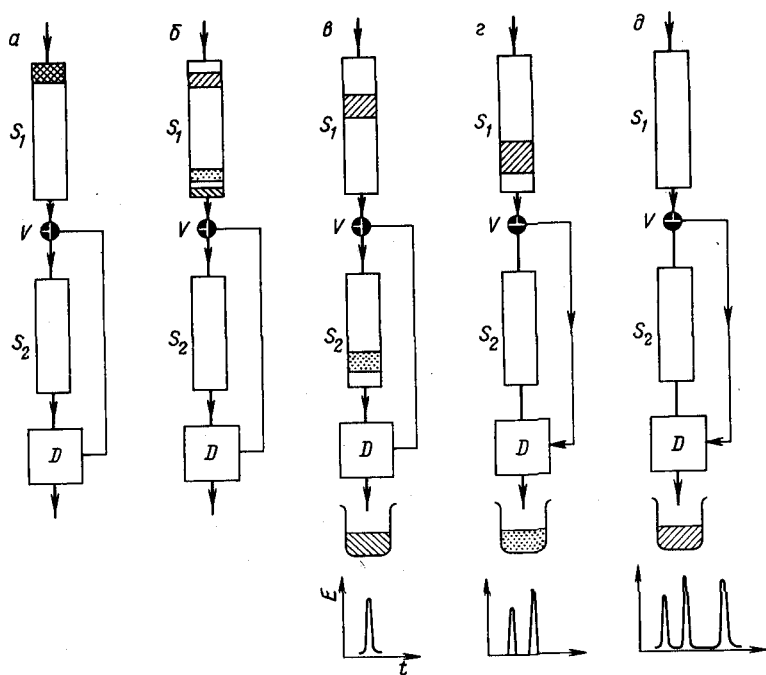


Рис. 2.3.4/13. Схема каскадной хроматографии:

а — ввод смеси трех компонентов (два с низкими k' и одно с высоким k') на колонку S_1 ; б — перемещение компонентов с низкими k' на колонку S_2 для более полного разделения; в — разделение веществ на колонке S_2 ; г — переключение крана V и направление потока компонента с высоким k' непосредственно в детектор D ; д — регистрация последнего компонента

растворителя. Проблему воспроизводимости результатов решают при помощи остроумного приема переключения колонок. Для разделения используют две или более колонок, соединенных последовательно. На длинных колонках вещества с высоким k' ($k' > 10$) элюируются с большой задержкой (широкие и низкие пики), что ведет к большим ошибкам при количественном анализе. Соединение нескольких коротких колонок с помощью трехходовых кранов позволяет легко изменять общую длину колонки в процессе хроматографии (рис. 2.3.4/13), в результате чего существенно сокращается продолжительность анализа при сохранении возможности обнаружения сильно удерживаемых на колонке веществ.

Область применения

Рециркуляционная хроматография применяется: при затруднениях в случае препаративного разделения; при синтезе природных соединений, когда синтез приводит к

образованию смеси стереоизомеров или диастереомеров с близкими хроматографическими свойствами;

при выделении биополимеров с близкими молекулярными массами методом гель-хроматографии.

Метод переключения колонок применяется с целью препаративного выделения целевых веществ из сложных природных или синтетических препаратов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

R. E. Kaiser, E. Oelrich, Optimization in HPLC, Hüthig, Heidelberg 1981
L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New York 1974

2.3.5. ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Ошибки со стороны оператора при использовании жидкостной хроматографии возможны буквально на всех этапах работы. Необходимо знать наиболее типичные ошибки, их причины и способы устранения.

Уширение пиков. Причины: плохая упаковка колонки, слишком высокая скорость элюирования.

Широкие, сильно асимметричные пики. Причины: колонка перегружена из-за высокой концентрации вещества в пробе, высокое сопротивление в соединительных шлангах или в кювете детектора, большой мертвый объем в верхней части колонки из-за уплотнившегося слоя геля (в качестве временной меры рекомендуется заполнить пространство над гелем стеклянными шариками), неправильный выбор элюента — наличие в элюенте кислот, неправильный выбор значения pH.

Фантомные пики или неожиданно высокий уровень базовой линии. Причины: выброс пузырьков газа в кювете детектора (рекомендуется установить капилляры после детектора или провести деаэрацию элюента); примеси в элюенте при градиентном элюировании, которые вначале сорбируются на колонке, а при определенной полярности или ионной силе элюируются (рекомендуется использовать очищенные растворители).

Дрейф базовой линии. Причины: медленное вымывание из детектора пузырьков воздуха; при высокой чувствительности детектора и смене элюента — остатки предыдущего растворителя, удерживаемого колонкой, температурные колебания в детекторе или нестабильность работы лампы детектора вследствие недостаточного времени отжига лампы.

Плохая воспроизводимость. Причины: неудовлетворительное качество сорбента или элюента (рекомендуется тщательно приготовить достаточный запас элюента).

Низкая чувствительность детектора. Причины: элюент поглощает в УФ-области спектра, окошко кюветы загрязнено отложе-

ниями мелких частиц сорбента в случае свежеприготовленной колонки.

Насос не подает элюент в колонку. Причины: наличие воздуха в клапанах насоса (рекомендуется выдавить пузырьки воздуха при помощи гидравлического импульса, подаваемого поршнем насоса, воздух из линии высокого давления удалить шприцем), блокировка крана-переключателя, например из-за наличия кристаллического осадка (рекомендуется растворить кристаллические отложения в кране), блокировка капиллярных соединений (рекомендуется проверить линию подачи элюента).

Нет протока элюента через колонку или слишком высокое сопротивление. Причины: пористый фильтр колонки засорен механическими примесями из элюента или раствора пробы (рекомендуется работать только при наличии фильтрующего элемента на насосе, обязательно фильтровать или центрифугировать пробу, в необходимых случаях встраивать в систему небольшую предколонку и своевременно ее заменять), кристаллические отложения в колонке из-за высокой концентрации материала в пробе или неправильного порядка смены элюентов, например последовательность солевой буфер — органический растворитель вместо последовательности солевой буфер — вода — метанол — органический растворитель.

2.4. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Газовая хроматография (ГХ) — метод разделения летучих веществ: газов (при нормальной температуре) или паров (при повышенной температуре). В качестве неподвижной фазы в ГХ используют твердые материалы (насадочные или набивные колонки), твердые материалы, покрытые слоем жидкости, или же капилляры с нанесенным на внутреннюю поверхность слоем жидкости (капиллярные колонки). В качестве подвижной фазы используют газ-носитель, переносающий разделяемые вещества через колонку. Разделение анализируемой смеси осуществляется за счет различного времени удерживания веществ в неподвижной фазе.

Особенности метода

Между жидкостной и газовой хроматографией не существует принципиальной разницы, для ГХ сохраняются зависимости, приведенные в разд. 2.3. ГХ отличается лишь свойствами подвижной фазы: высокой скоростью диффузии газа-носителя и его свойством сжиматься. На рис. 2.3/2 приведено упрощенное уравнение Ван-Деемтера для описания высоты теоретической тарелки, сохраняющее свое значение и в газовой хроматографии:

$$H = A + B/U + CU,$$

где H — высота, эквивалентная теоретической тарелке; U — линейная скорость

газа-носителя в колонке; A — член, учитывающий турбулентную диффузию; B — член, учитывающий продольную диффузию; C — член, учитывающий массо-передачу.

Слагаемое A учитывает турбулентную диффузию, возникающую за счет многообразия путей, по которым молекулы разделяемых веществ проходят между частицами сорбента. При расчете капиллярных колонок, где удерживание происходит только в пленке жидкости на стенке колонки, этим слагаемым пренебрегают. Слагаемое B/U в ГХ приобретает существенно больший вес по сравнению с ЖХ. Положение минимума на графике Ван-Деемтера, а следовательно, максимальная разделяющая способность колонки в ГХ зависят от следующих параметров: количества неподвижной фазы (качество упаковки, толщина слоя); размера частиц или диапазона размеров частиц материала-носителя; размеров колонки; вязкости газа-носителя (а следовательно, и температуры колонки).

В зависимости от состояния фаз различают ГАХ (газотвердо-фазную или газоадсорбционную хроматографию) и ГЖХ (газо-жидкостную или распределительную хроматографию). Тип неподвижной фазы, механизм разделения и возможности обоих методов сопоставлены в табл. 2.4/1. При количественной оценке результатов разделения методом ГХ (см. разд. 2.4.1) большое значение имеет форма пика. Симметричность пика зависит от растворимости анализируемых веществ в жидкой (неподвижной) фазе. В свою очередь растворимость определяется зависимостью давления паров растворенного вещества от его концентрации в жидкой фазе. При постоянной температуре эта зависимость представлена в виде изотермы (рис. 2.4/1). Если давление пара вещества, растворенного в жидкой фазе, растет с повышением температуры линейно, имеем линейную изотерму (рис. 2.4/1, а). В этом случае на графике элюирования получают симметричный пик. Пик обычно симметричен, если разделяемые вещества и жидкости, применяемые в качестве неподвижной фазы, принадлежат к одному классу (пример идеальной смешиваемости). Отклонения от случая идеальной смешиваемости приводят к искривлению изотермы и образованию несимметричных пиков (рис. 2.4/1, б, в) с размытой восходящей («фронт») или нисходящей («хвост») ветвью. Этот

Таблица 2.4/1. Варианты газовой хроматографии

Название метода	Неподвижная фаза	Принцип разделения	Область применения метода
Газоадсорбционная хроматография (ГАХ)	Адсорбент	Адсорбция	Анализ газов и паров жидкостей
Газожидкостная (распределительная) хроматография (ГЖХ)	Жидкая фаза, нанесенная на инертный материал-носитель	Распределение	Анализ газов и паров жидкостей; методические возможности выше, чем для ГАХ

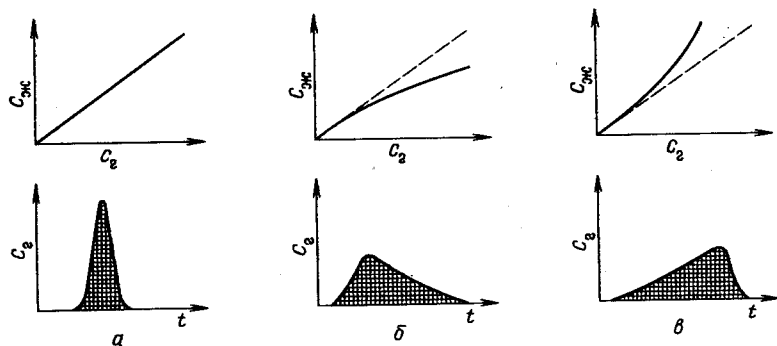


Рис. 2.4/1. Влияние формы изотермы распределения на форму пика: а — изотерма линейная, пик симметричен; б — изотерма выпуклая, пик имеет «хвост»; в — изотерма вогнутая, пик имеет «фронт» [Schomburg G., Gaschromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1977, Abb. 4, p. 9]

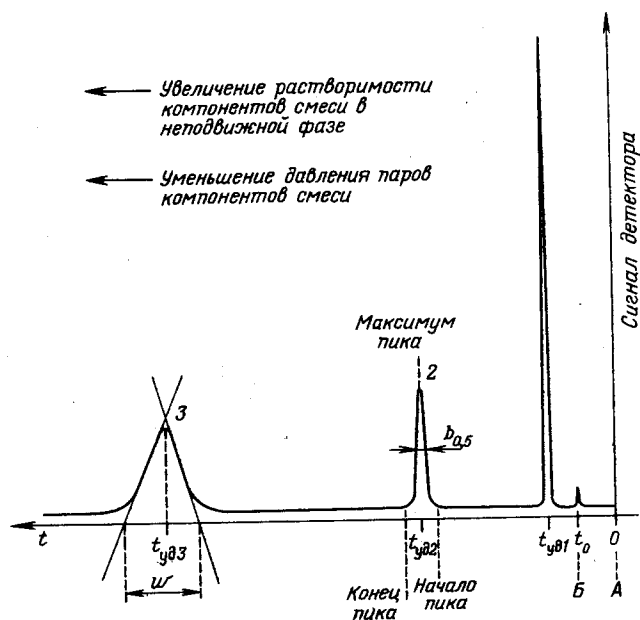


Рис. 2.4/2. Хроматограмма, полученная в изотермических условиях: А — момент ввода пробы; Б — пик несорбируемого компонента; t_0 — время удерживания несорбируемого компонента; $t_{уд1}$, $t_{уд2}$, $t_{уд3}$ — время удерживания компонентов 1, 2, 3; w — ширина пика (расстояние между точками пересечения двух касательных линий с нулевой линией) [Schomburg G., Gaschromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1977, Abb. 6, p. 13]

эффект становится особенно заметным при увеличении нагрузки на колонку.

Время удерживания зависит от вероятности попадания молекул вещества в подвижную фазу. При этом компоненты с высоким давлением паров и соответственно низкой растворимостью в неподвижной фазе удерживаются слабее. Напротив, вещества с низким давлением пара и высокой растворимостью элюируются позднее.

На рис. 2.4/2 приведена хроматограмма, полученная при постоянной температуре, на примере которой демонстрируются основные понятия газовой хроматографии. Если в процессе разделения температуру повышают, то говорят о газовой хроматографии при программируемой температуре. Основные величины, которыми оперируют в ГХ, приведены в табл. 2.3/2 (последний столбец справа).

Порядок работы. Область применения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.4.1 и 2.4.2.

2.4.1. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Приборы и материалы

В конструктивном отношении приборы для ГХ проще по сравнению с приборами для ВЭЖХ хотя бы потому, что вместо дорогостоящего насоса высокого давления в ГХ применяют обычный баллон с газом-носителем. Схема прибора для ГХ приведена на рис. 2.4.1/1.

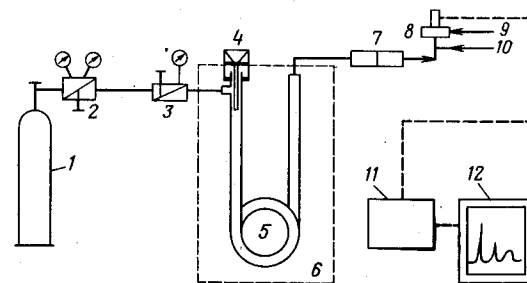
Колонки

В ГХ применяют три типа колонок (рис. 2.4.1/2).

Насадочные колонки (рис. 2.4.1/2, а). Изготовлены из стеклянных или металлических трубок (нержавеющая сталь) U-об-

Рис. 2.4.1/1. Схема газового хроматографа:

1 — баллон с газом-носителем; 2 — игольчатый вентиль баллона; 3 — регулятор потока газа-носителя (дроссель); 4 — дозирующее устройство (блок ввода пробы); 5 — колонка; 6 — термостат; 7 — ротаметр; 8 — детектор (пламенно-ионизационный); 9 и 10 — система для подачи газов в детектор (водород и воздух в случае ПИД); 11 — электронный блок обработки сигнала (интегратор); 12 — самописец



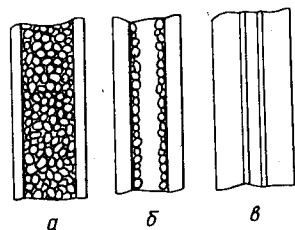


Рис. 2.4.1/2. Типы колонок:

а — насадочная колонка; б — тонкослойная капиллярная колонка (SCOT-колонка); в — классическая капиллярная колонка

разной формы или спиралевидных. Металлические колонки более устойчивы к механическим воздействиям, однако на поверхности металла возможно протекание каталитических реакций. Стекланные колонки обладают нежелательными адсорбционными эффектами, однако их можно уменьшить при помощи специальной обработки колонок (силанизирование). Насадочные колонки характеризуются большой поверхностью и высокой разделяющей способностью. Однако эти колонки обладают большим сопротивлением, что ведет к формированию неравномерного потока газа (вследствие того что газ хорошо сжимаем). Согласно уравнению Ван-Деемтера, существует оптимальное значение потока газа-носителя, при котором значение ВЭТТ минимально. Чем длиннее колонка, тем дальше от оптимального значения скорости потока газа-носителя. Хотя теоретически число тарелок растет линейно с увеличением длины колонки, на практике преимущество длинных колонок сводится «на нет» из-за увеличения сопротивления. Наиболее распространены насадочные колонки длиной 0,5—10 м при внутреннем диаметре 1—5 мм.

Тонкослойные капиллярные колонки (рис. 2.4.1/2, б). Сокращенно их называют SCOT-колонки (support coated open tubular column). Они занимают промежуточное место между насадочными и капиллярными колонками. Внутренняя поверхность колонок покрыта тонким слоем мелкодисперсного сорбента, пропитанного жидкой фазой. Возможная нагрузка на этих колонках выше, чем на капиллярных, однако число теоретических тарелок в расчете на 1 м длины колонки невелико.

По числу тарелок колонки этого типа превосходят насадочные колонки, так как обладают меньшим сопротивлением. Колонки имеют длину до 200 м, внутренний диаметр составляет 0,3—0,5 мм.

Капиллярные колонки из стекла или нержавеющей стали (рис. 2.4.1/2, в). При равной с насадочными колонками длине обладают существенно меньшим сопротивлением. Колонки имеют длину до 200 м при внутреннем диаметре 0,3—0,5 мм. Колонки вследствие достаточной длины имеют большое число теоретических тарелок, однако для них характерна низкая нагрузка. Ввод пробы небольшого объема осуществляют при помощи устройства ввода пробы с делителем потока. Детектирование осуществляют

при помощи чувствительного детектора с небольшим мертвым объемом (пламенно-ионизационный детектор).

Устройства ввода пробы

Способ ввода пробы зависит от вида пробы (жидкая или газообразная) и типа колонки (насадочная или капиллярная).

Пробу вводят *шприцем* при разделении жидкостей в насадочных колонках (рис. 2.4.1/3). Иглой шприца прокалывают мембрану (пробку из силиконовой резины) и вводят пробу. Поток газа-носителя проба уносится непосредственно в колонку.

Пробу вводят при помощи *делителя потока* (рис. 2.4.1/4) при работе на капиллярных колонках. Шприцем через мембрану пробу вводят в канал испарения пробы. После испарения проба разбавляется газом-носителем. Большая часть газовой смеси через игольчатый клапан направляется на сброс, меньшая часть — в колонку.

Пробу вводят при помощи *дозировочной петли* при автоматизированном анализе газовых смесей. В зависимости от вида дозирующего устройства петлю вначале вакуумируют, а затем заполняют пробой газа в процессе промывки или после нее.

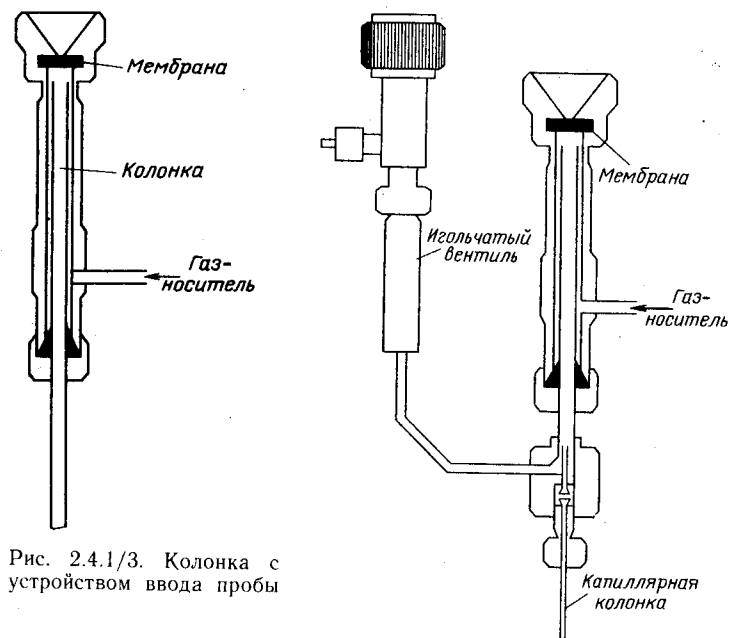


Рис. 2.4.1/3. Колонка с устройством ввода пробы

Рис. 2.4.1/4. Капиллярная колонка с делителем потока

На практике наиболее широкое применение получили детекторы двух типов.

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД). Схема детектора представлена на рис. 2.4.1/5. На выходе колонки поток газа-носителя смешивается с водородом и воздухом, после чего смесь сжигается в пламени горелки детектора. Появление в пламени заряженных частиц ведет к возникновению ионного тока, величина которого регистрируется. Если в пламени сгорает только газ-носитель, ток детектора незначителен и равен фоновому. При появлении в пламени углеродсодержащих веществ величина тока возрастает. Преимуществами ПИД являются: высокая чувствительность; безынерционность; широкая область линейного отклика (на 6—7 порядков); небольшой мертвый объем. Кроме того, детектор не требует термостатирования.

Детектор по теплопроводности (ДТП). Схема детектора приведена на рис. 2.4.1/6. При омывании нагретой металлической спирали потоком газа-носителя ее сопротивление меняется в зависимости от теплопроводности окружающей среды. Изменение сопротивления измеряется с помощью моста Уитстона и регистрируется на самописце. Если в качестве газа-носителя используется водород или гелий, обладающие высокой теплопроводностью, то все вещества, захваченные потоком газа-носителя, снижают уровень теплопроводности в потоке, что регистрируется, и таким путем вещества обнаруживаются в элюате на выходе колонки.

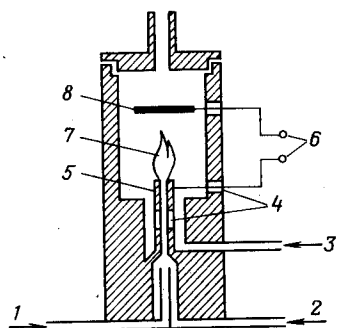


Рис. 2.4.1/5. Схема пламенно-ионизационного детектора (ПИД):

1 — газ-носитель; 2 — водород; 3 — воздух; 4 — изоляторы; 5 — горелка; 6 — подача питания на электроды; 7 — пламя горелки; 8 — электрод-коллектор [Schomburg G., Gaschromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1977, Abb. 20, p. 44]

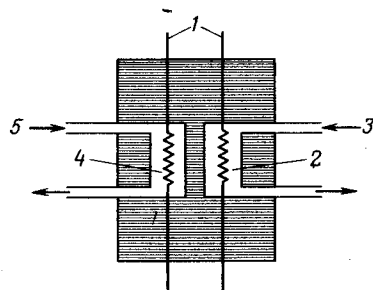


Рис. 2.4.1/6. Схема ячейки детектора по теплопроводности (ДТП):

1 — спиральные нити; 2 — измерительная камера; 3 — поток газа из хроматографической колонки (элюат); 4 — сравнительная камера; 5 — чистый газ-носитель [Schomburg G., Gaschromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1977, Abb. 18, p. 42]

Преимуществом ДТП является его универсальность. Недостатками ДТП являются: низкая чувствительность по сравнению с ПИД; высокая инерционность и большой мертвый объем (вследствие чего детектор невозможно использовать при работе на капиллярных колонках); необходимость тщательного термостатирования.

Сигналы обоих детекторов пропорциональны массе введенного органического соединения, и поэтому эти детекторы могут применяться при количественном анализе.

Кроме ПИД и ДТП существует ряд *селективных детекторов*: пламенно-ионизационные детекторы для определения галогенсодержащих соединений, азот- и фосфорсодержащих веществ; пламенно-фотометрический детектор для определения соединений фосфора и серы;

электрозахватные детекторы для обнаружения веществ с электроноакцепторными группами;

масс-спектрометрический детектор (см. разд. 3.2.9), позволяющий по характеристическим величинам m/e в масс-спектре идентифицировать анализируемые вещества.

Детекторы, предназначенные для количественного анализа, должны обеспечивать:

воспроизводимость результатов, что возможно лишь при высокой стабильности основных рабочих параметров (величины тока в мостике Уитстона, температуры в случае ДТП, потоков водорода и газа-носителя, величины фонового тока в случае ПИД);

достоверность показаний прибора, что достигается за счет жесткой зависимости сигнала детектора от «отклика» измерительной ячейки.

Под понятием «отклик» понимают зависимость показаний детектора от структуры анализируемых веществ. Так, например, с помощью ПИД регистрируют содержание углерода в пробе органических соединений. С увеличением в молекуле числа гетероатомов процентное содержание углерода уменьшается, соответственно уменьшается сигнал детектора. Эту зависимость учитывают с помощью коэффициента коррекции.

Материалы-носители

ГАХ применяют с целью разделения газов или низкокипящих веществ и обнаружения газообразных примесей в воздухе. В качестве адсорбентов в ГАХ применяют: активированные угли или графитированные сажи [карбопак С (Carbopack C)], пористые синтетические полимеры [тенакс (Tenax), порапак (Porapak), хромосорб (Chromosorb)], пористые неорганические материалы (молекулярные сита). Нанесенная жидкая фаза в колонках для ГАХ не применяется.

В ГЖХ сорбенты выполняют функцию носителей неподвиж-

Таблица 2.4.1/1. Носители для ГЖХ

Носители	Физические свойства	Степень пропитки жидкой фазой	Область применения
На основе силикагеля			
хромосорб G	Механически прочный, устойчив к истиранию, не-большая поверхность светло-желтого цвета	Низкая	Анализ
хромосорб Р	Механически прочный, большая поверхность белого цвета	До 30%	Анализ и препаративное разделение полярных веществ
хромосорб W	Механически прочный, белого цвета	До 15%	Анализ веществ средней полярности
хромосорб А	Большая поверхность	Высокая	Препаративное разделение
газ-хром Q (Gas-Chrom Q)	Сильно инактивированный	Нулевая	Анализ лабильных веществ (стероиды, алкалоиды)
На основе тефлона			
хромосорб Т	Тонкие тефлоновые волокна, устойчивы до 220 °С	До 20%	Разделение высокополярных и реакционноспособных веществ (гидразин, SO ₂ , галогены)
На основе углерода			
карбопак С	Графитированная сажа, лабилен	До 1%	Разделение полярных веществ (H ₂ S, SO ₂ , спирты, фенолы)

ной жидкой фазы и не оказывают влияния на процесс разделения. Наиболее важные из этих материалов приведены в табл. 2.4.1/1.

Жидкая фаза

В литературе описаны около 1000 наименований материалов, используемых в качестве жидкой фазы. Подавляющее большинство возникающих на практике проблем по разделению сложных смесей решают при помощи небольшого набора стандартных колонок. При подборе подходящей жидкой фазы руководствуются единственным правилом: неполярные вещества фракционируют на неполярной фазе, полярные вещества — на полярной фазе. В настоящее время это правило существенно усовершенствовано благодаря константам Роршнайдера и Мак-Рейнольдса, позволяющим рассчитать величины удерживания.

Подготовка пробы

Неправильная методика отбора пробы и ошибки при подготовке пробы могут сильно повлиять на результаты анализа.

Сжиженный газ отбирают из редуктора баллона, испаряют в подходящей емкости и анализируют. Надежнее отбирать пробу в процессе испарения жидкости, поскольку по составу газ в баллоне может отличаться от жидкой фазы.

Для анализа паров над жидкой или твердой фазой (например, при определении спирта в пробе крови) разработана специальная методика Head-Space-Analyse («из объема над жидкостью»). Необходимое количество пробы газа отбирают с помощью прободборника непосредственно из емкости для хранения (например, из консервной банки). По другой методике пробу потоком воздуха направляют в охлаждаемую ловушку и замораживают. Третий вариант заключается в том, что газ при пониженной температуре адсорбируют на короткой колонке, затем при повышении температуры десорбируют и направляют в хроматографическую колонку.

При анализе влажных проб не допускают конденсации воды в колонке; для этого пробу осушают.

Твердые частицы в аэрозолях отделяют с помощью бумажных салфеток или фильтрующих патронов.

При анализе жидких проб, содержащих компоненты с различной температурой кипения, исключают возможность конденсации компонентов в дозирующем шприце, для этого шприц нагревают, не допуская разложения образца.

Порядок выполнения операций

Подготовка колонки

Колонку промывают хлористым метилом и ацетоном (стеклянную колонку дополнительно промывают хлороводородной кислотой). Затем колонку высушивают в потоке воздуха, очищенного от пыли и капель масла. Внутреннюю поверхность стеклянных колонок инактивируют (силанизированием).

Нанесение неподвижной жидкой фазы на твердый носитель

Приготовление колонок требует определенного опыта, однако грубых ошибок удастся избежать, если придерживаться следующих правил:

распределять неподвижную фазу на твердом носителе равномерно;

избегать повреждения (истирания) частиц носителя при нанесении неподвижной фазы;

избегать окисления, гидролиза или испарения жидкой фазы в процессе нанесения.

Материал-носитель взмучивают в растворе жидкой фазы в лег-

кокипящем растворителе (например, ацетоне) так, чтобы твердый носитель был полностью покрыт слоем жидкости. После тщательного перемешивания растворитель упаривают на роторном испарителе (по возможности без доступа кислорода воздуха). В заключение материал досушивают в термостате и отсеивают от комков.

Заполнение колонки

Нижний конец колонки закрывают тампоном из стекловаты и через склянку Вульфа присоединяют к водоструйному насосу.

Насадку вносят небольшими порциями через воронку, постукивая при этом по колонке деревянным брусом. Применение вибраторов не всегда бывает эффективным.

После заполнения колонки ее верхний конец закрывают тампоном из стекловаты (силанизированной).

Колонку устанавливают в термостате, не соединяя с детектором, и продувают при нагревании газом-носителем (аргон, гелий, азот), не превышая температуры, допустимой для данной неподвижной фазы.

Колонку соединяют с детектором, не извлекая ее из термостата хроматографа (из-за опасности окисления насадки).

Ввод пробы

Жидкую пробу вводят в колонку непосредственно, твердую пробу перед вводом переводят в раствор. Газообразную пробу вводят в колонку при помощи пробоотборной петли. Объем пробы зависит от типа колонки (насадочная или капиллярная), свойств насадки и ряда других факторов: количества неподвижной фазы; растворимости анализируемых веществ в неподвижной фазе; температуры термостата.

При перегрузке колонки наблюдается появление несимметричных пиков (см. рис. 2.4/1, б). Для насадочных колонок оптимальной является нагрузка 0,1—1 мкл каждого компонента в пробе, т. е. при пяти компонентах нагрузка составляет 0,5—5 мкл. При нанесении микрошприцем ошибка составляет менее 10%. Для капиллярных колонок оптимальной является нагрузка в 20—1000 раз меньше, чем для насадочных колонок. Соответственно делитель потока в системе ввода сконструирован таким образом, что только небольшая часть пробы попадает в колонку.

Перед вводом пробы стабилизируют нулевую линию. Затем при вводе пробы шприцем выполняют следующие операции: промывают микрошприц ацетоном и высушивают;

отбирают пробу;

через мембрану полностью вводят иглу шприца в устройство ввода пробы;

вводят пробу и одновременно на ленте самописца делают пометку;

спустя несколько секунд иглу извлекают из мембраны.

Пробку из силиконовой резины заменяют после 30—40 вводов, при температуре устройства ввода более 150 °С пробку меняют чаще.

Специальные варианты газовой хроматографии

Пиролиз. Разлагающиеся при испарении вещества идентифицируют на газовом хроматографе в виде продуктов пиролиза. Пиролиз проводят в пиролитической приставке на нагретой платиновой проволоке, или в керамической лодочке. При этом исходят из того, что большинство структурных группировок дает стандартные и воспроизводимые пириграммы.

Сочетание газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Сочетание двух методов используют при анализе сложных смесей. Пробу вначале фракционируют на газовом хроматографе. Отдельные фракции в режиме «on-line», т. е. без промежуточного выделения компонентов, направляют в масс-спектрометр, где вещества идентифицируют по масс-спектрам. Масс-спектрометр можно настраивать на определенную массу и использовать его как чрезвычайно селективный детектор (масс-фрагментография).

Оценка результатов анализа

Площадь пика рассчитывают вручную при условии, что сигнал детектора пропорционален концентрации вещества, а пик симметричен. При оценке асимметричных пиков возникают большие ошибки. При электронном интегрировании форма пика не столь важна. Во всех случаях необходимо ввести коэффициенты коррекции, специфические для каждой группы веществ. Коэффициенты коррекции приводятся в таблицах.

Расчет площади пика по произведению его высоты на полуширину. При идеальной форме пика (гауссова кривая) таким путем учитывается 94% фактической площади. При идеальной форме всех пиков хроматограммы ошибкой можно пренебречь. Данным способом нельзя определять площадь низких пиков с большим основанием.

Планиметрия. Преимущество данного способа заключается в том, что он позволяет определять площади несимметричных пиков.

Метод вырезания и взвешивания пиков. С хроматограммы снимают копию, из нее вырезают пики, а затем взвешивают их на аналитических весах. Относительная ошибка определения зависит от абсолютной площади пика. Абсолютную площадь пика уменьшают за счет скорости подачи ленты самописца и интенсивности отклонения пера самописца.

Электронное интегрирование. Способ имеет ряд преимуществ: удобен при анализе сложного профиля элюирования (серийные

анализы); исключает субъективную оценку; позволяет не проводить коррекцию базовой линии. При помощи электронного интегрирования пиков автоматизируют следующие операции: определение начала пика, окончания пика, положения максимума, площади пика; коррекцию базовой линии (дрейф); получение сведений о положении пика на профиле элюирования.

К недостаткам приведенных способов относится неудовлетворительное определение площадей частично перекрывающихся или небольших пиков на нисходящей ветви основного пика — случай, часто встречающийся на практике при определении следов примесей. Эта проблема решается при помощи компьютерного обеспечения: пики регистрируются в виде пунктирной линии (точки или штрихи), а затем обсчитываются числовым интегратором. При этом ЭВМ определяет положение и площади пиков, в том числе и несимметричных, производит коррекцию базовой линии, вводит факторы коррекции, сохраняет в памяти результаты анализов.

Источники ошибок

Появление ложных пиков за счет работы колонки в градиентном температурном режиме. Причиной является появление в образце высококипящих примесей из силиконовой пробки: вначале они осаждаются на холодной колонке, а затем при рабочей температуре элюируются как компоненты анализируемой смеси. Рекомендуется: вымочить пробку в гексане при частой смене растворителя, просушить ее при 100 °С и затем в течение 2 ч при 200 °С; очистить систему ввода.

Колебания базовой линии за счет нестабильности тока и температуры детектора в ДТП, нестабильности работы усилителя в ПИД, вследствие элюирования компонентов или продуктов разложения предшествующего образца (рекомендуется перед началом работы прогреть колонку), вследствие наличия примесей в газе-носителе при программировании температуры.

Возникновение фоновых или очень острых пиков. За счет неудовлетворительной работы электроники или наличия примесей в газе-носителе.

Асимметрия пиков (см. рис. 2.4/1, б, в) за счет:

адсорбции (рекомендуется использовать более полярную неподвижную фазу, инактивированный материал-носитель, использовать стеклянную колонку);

погрешностей в работе — недостаточного нагрева системы ввода и адсорбции вещества на мембране, слишком высокой нагрузки при определении примесей, плохой техники ввода и загрязнения пробы, слишком большого мертвого объема или плотной набивки колонки, особенно в случае капиллярных колонок;

высокой нагрузки (рекомендуется уменьшить нагрузку, ис-

пользовать колонку с большим количеством неподвижной фазы или более плотно упакованную, повысить температуру колонки);

термической или каталитической трансформации анализируемых веществ со скоростью, сопоставимой с продолжительностью хроматографического цикла, но не быстрого разложения в блоке ввода (рекомендуется установить минимальную рабочую температуру, использовать предельно короткие колонки).

Образование отдельных широких пиков на хроматограмме за счет перекрывания пиков различных компонентов из-за неудовлетворительной разделяющей способности колонки (рекомендуется заменить неподвижную фазу, изменить параметры колонки) или за счет элюирования веществ предшествующего эксперимента (при повторении опыта такая хроматограмма не воспроизводится).

Образование низких пиков (разрешение неудовлетворительное) за счет:

недостаточного количества неподвижной фазы или неправильно выбранной неподвижной фазы;

слишком короткой колонки;

слишком высокой температуры или слишком большой скорости потока газа-носителя;

слишком крутого градиента температуры.

Образование слишком широких пиков за счет:

низкой скорости потока газа-носителя, возможно за счет неплотностей в соединениях при правильно заданном давлении; неомогенности пробы.

Плохая воспроизводимость за счет:

непостоянства температуры или скорости потока;

изменения неподвижной фазы вследствие испарения (рекомендуется снизить рабочую температуру), разложения неподвижной фазы, адсорбции продуктов разложения пробы в неподвижной фазе;

слишком высокого содержания отдельных компонентов.

Оформление результатов

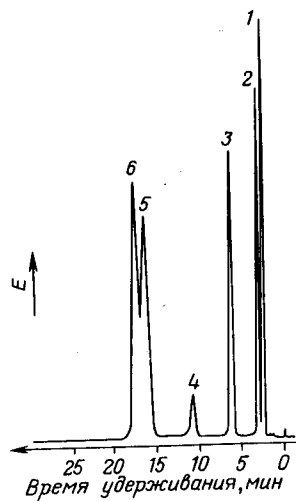
В рабочем журнале приводят хроматограмму (рис. 2.4.1/7), снабженную исчерпывающей информацией об условиях опыта: колонка размером 3 мм×2 м; неподвижная фаза — 2,5% силикона ХЕ 60 (Silicon ХЕ 60) на хромосорбе G, AW-DCMS, 0,15—0,18 мм; газ-носитель — азот, скорость подачи — 25 мл·мин⁻¹; температура в режиме программирования от 130 до 140 °С со скоростью 3 °С в 1 мин; скорость движения диаграммной ленты — 10 мм·мин⁻¹; детектор — ПИД.

Область применения

Анализ всех классов веществ, термически стабильных и способных испаряться, не разлагаясь (в большинстве случаев не-

Рис. 2.4.1/7. Хроматограмма, полученная методом ГЖХ:

1 — транс-декалин; 2 — цис-декалин; 3 — тетралин; 4 — неидентифицированный компонент; 5 — 1-метилнафталин; 6 — 2-метилнафталин



летучие вещества могут быть получены в виде летучих производных).

Разделение и идентификация неорганических и органических веществ.

Исследование продуктов пиролиза высокомолекулярных веществ.

Анализ энантиомеров:

на оптически активных фазах (присутствующие в смеси энантиомеры образуют с оптически активной фазой, нанесенной на капиллярную колонку, комплексы различной степени прочности и вследствие этого могут быть выделены в виде отдельных фракций);

путем дериватизации (смесь энантиомеров обрабатывают оптически активными реагентами, образующиеся диастереомеры различаются по физико-химическим свойствам, что позволяет разделить их обычным способом).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- V. G. Berezkin, V. R. Alishoev, I. B. Nemirovskaya, Gas Chromatography of Polymers, Elsevier, Amsterdam 1977
G. J. Dickes, P. V. Nicholas, Gas Chromatography in Food Analysis, Butterworths, London 1962
L. S. Ettre, A. Zlatkis, The Practice of Gas chromatography, Wiley, New York 1968
L. R. Grob (Hrsg.), Modern Practice of Gaschromatography, Wiley, New York 1977
W. Jennings, Gas Chromatography with Glass Capillary Columns, Academic Press, New York 1978
E. Leibnitz, H. G. Struppe, Handbuch der Gas-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1984
G. Schomburg, Gaschromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1977
H. Schulte, Praxis der Kapillar-Gas-Chromatographie, Springer, Berlin 1983
H. A. Szymanski (Hrsg.), Biomedical Applications of Gas Chromatography, Plenum Press, New York 1964

2.4.2. ПРЕПАРАТИВНАЯ ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Отличительной особенностью препаративной газовой хроматографии является то, что последовательность операций (ввод пробы, испарение пробы, разделение и накопление целевого вещества в охлаждаемом сборнике) повторяют до получения необходимого количества продукта.

При всех преимуществах современной жидкостной хроматографии (многие вещества проще и удобнее выделять именно таким образом) приоритет газовой хроматографии остается неоспоримым. Газовую хроматографию наряду с жидкостной используют с целью препаративного выделения. Основной проблемой является отделение небольших количеств целевого вещества от больших объемов газа-носителя. Препаративное разделение проводят на газовом хроматографе, способном работать в непрерывном режиме в течение многих суток и недель. Как правило, газовые хроматографы автоматизированы, надежность систем хроматографа и качество колонок отвечают высоким требованиям.

Как и в жидкостной, в газовой хроматографии существует свой «магический» треугольник (см. рис. 2.3.4/5), отражающий взаимосвязь основных параметров — разрешения, скорости и нагрузки. Оптимизация процесса по одному из трех параметров неизбежно снижает уровень двух других параметров. При подборе условий препаративного разделения в газовой хроматографии целью является не только разделение за один цикл возможно большего количества исходной смеси, но также обеспечение максимальной производительности процесса, т. е. наиболее высокого съема целевого вещества в единицу времени.

В отличие от аналитической в препаративной газовой хроматографии жидкие образцы вводят в колонку только после перевода их в газообразное состояние. Для количества вещества, при котором ширина пика еще зависит от величины пробы, справедливо уравнение Ван-Деемтера:

$$V < V_{уд} / (2\sqrt{n}),$$

где V — объем газа-носителя, необходимого для переноса вещества в колонку (этот объем равен объему пробы в парообразном состоянии, так как проба вытесняется газом-носителем в колонку); $V_{уд}$ — объем удерживания; n — число теоретических тарелок.

В стандартных для ГХ условиях на колонке длиной 2 м и внутренним диаметром 20 мм может быть разделено 100—200 мг вещества, однако на практике колонки нагружают настолько, что разрешение пиков едва заметно. Для достижения высокой эффективности разделения необходимо, чтобы испаряемая проба не разбавлялась потоком газа-носителя: в этом случае, в соответствии с законом Генри, растворимость в неподвижной фазе максимальна.

При проведении препаративной ГХ руководствуются следующими рекомендациями:

не следует превышать предельной величины нагрузки на колонку [при превышении предела нагрузки эффективность разделения быстро падает (см. рис. 2.3.4/10)];

проба, предназначенная для введения в колонку, должна испаряться в течение 5—10 с; перед введением в колонку пробу не следует разбавлять газом-носителем;

способ введения пробы не имеет большого значения (он важен в случае быстро элюирующихся веществ, для удерживаемых компонентов этот фактор не столь важен).

Чем меньше растворимость разделяемой смеси в неподвижной фазе, тем точнее следует придерживаться первых трех рекомендаций.

Приборы

Колонки

В отличие от жидкостной в газовой хроматографии широкие колонки заполнять сложнее, чем узкие. Вследствие этого необходимо обязательно оптимизировать условия эксперимента (т. е. добиваться максимальной производительности процесса) за счет выбора материала-носителя (см. табл. 2.4.1/1), жидкой неподвижной фазы, условий эксплуатации колонки. Необходимо, чтобы неподвижная фаза прочно удерживалась на материале-носителе при повышенной температуре. Колонки, теряющие неподвижную фазу («истощения» колонки), непригодны для препаративной ГХ, поскольку целевое вещество будет содержать следы жидкой фазы. Разделение стремятся проводить при возможно более низкой температуре (на 200 К ниже точки кипения жидкой фазы).

Детекторы

Для целей препаративной ГХ более всего подходят пламенно-ионизационный детектор (ПИД) и детектор по теплопроводности (ДТП), причем ПИД предпочтительнее. Поскольку детектирование в ПИД основано на сжигании элюата, в ячейку направляют только часть потока. Когда показания детектора начинают свидетельствовать о присутствии в элюате целевого вещества, основной поток направляют в охлаждаемый сборник на конденсацию. В случае ДТП деление потока также обязательно, так как сигнал детектора нелинеен при высокой концентрации вещества.

Порядок выполнения операций

Ввод пробы

Небольшие количества вещества вводят вручную шприцем. Для ввода больших количеств веществ используют автоматизированные системы ввода пробы.

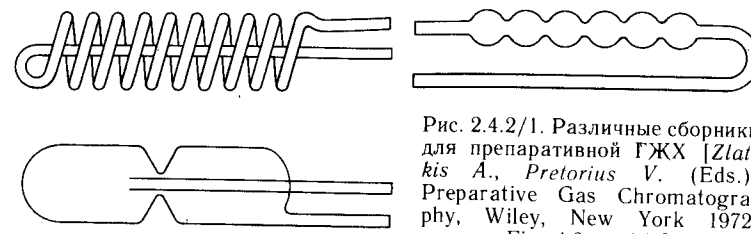


Рис. 2.4.2/1. Различные сборники для препаративной ГЖХ [Zlatkis A., Pretorius V. (Eds.), Preparative Gas Chromatography, Wiley, New York 1972, Fig. 4.6, p. 150]

Сбор разделяемых веществ

Помимо проблемы разделения анализируемой смеси существует проблема удерживания целевых веществ. Вначале поток направляют в сборник при помощи крана-переключателя, который в зависимости от сложности хроматограммы управляется вручную или автоматически. При конденсации паров в охлаждаемой ловушке образуется аэрозоль. Высокое поверхностное натяжение и электростатический заряд препятствуют образованию капель. Образование стойкого аэрозоля сводят к минимуму или исключают при помощи следующих приемов:

оптимизации геометрической формы сборника, обеспечения большей поверхности (рис. 2.4.2/1);

возможно более глубокого охлаждения (ацетон — сухой лед, жидкий азот);

применения адсорбентов, например оксида алюминия, силикагеля, молекулярных сит, активированного угля (целевые вещества могут быть вновь десорбированы при повышенной температуре);

применения жидких поглотителей, которые затем легко отделяются при помощи перегонки;

конденсации целевых веществ вместе с газом-носителем (аргон, диоксид углерода) при помощи жидкого азота; электростатической разрядки аэрозолей.

Область применения

Получение чистых веществ для проведения физико-химических исследований.

Выделение веществ, концентрация которых в смеси мала.

Выделение метаболитов в биохимии и клинической химии. В этой области ГХ все более вытесняется методом ВЭЖХ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

A. Zlatkis, V. Pretorius, (Hrsg.), Preparative Gas Chromatography, Wiley, New York 1971

2.5. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Электрофорез — метод разделения веществ, основанный на явлении миграции заряженных микрочастиц в жидкой среде под действием внешнего электрического поля.

Физические основы метода

Существуют три различных электрофоретических метода (рис. 2.5/1). Под собственно электрофорезом обычно понимают зональный электрофорез (ЗЭ), два других метода носят название изоэлектрофокусирования (ИЭФ) и изотахофореза (ИТФ).

Электрофорез применяют главным образом для разделения веществ, молекулы которых в соответствующих условиях заряжены и различаются по электрофоретической подвижности. Путем изменения внешних условий (например, pH среды, температуры, силы тока, состава и концентрации буферного раствора или носителя) подбирают подходящие условия для разделения. Вследствие того что при разделении на молекулы действуют только электростатические силы, электрофорез считают мягким методом и поэтому часто применяют для работы с лабильными веществами.

Электрофорез можно проводить в растворе, но из-за неизбежного выделения тепла и возникающей в связи с этим тепловой конвекции процесс, как правило, проводят на носителе, что пре-

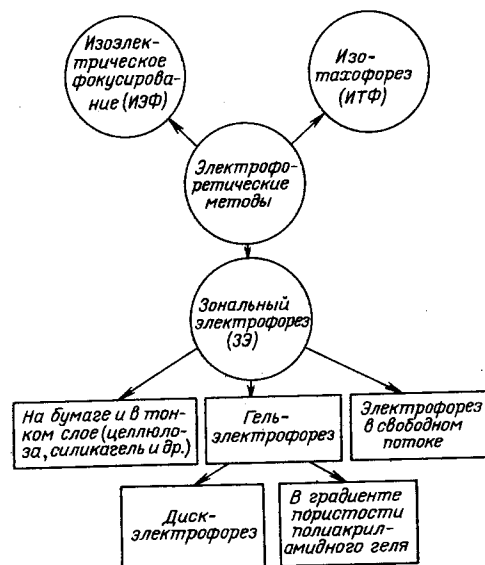


Рис. 2.5/1. Электрофоретические методы

пятствует перемешиванию. Вследствие ряда сопутствующих явлений (адсорбция, несоизмеримость размеров высокомолекулярных соединений и пор носителя) введение носителя ограничивает область применения метода. С другой стороны, свойства носителя иногда используют для повышения эффективности разделения: например, при электрофорезе в градиенте полиакриламидного геля фракционирование осуществляется не столько за счет различной электрофоретической подвижности веществ, сколько за счет различия в их молекулярных массах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.5.1—2.5.3.

2.5.1. ЗОНАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (ЗЭ)

Зональный электрофорез — это метод разделения заряженных частиц в электрическом поле, основанный на том, что частицы с различными соотношениями заряд/масса мигрируют с различными скоростями в виде отдельных зон.

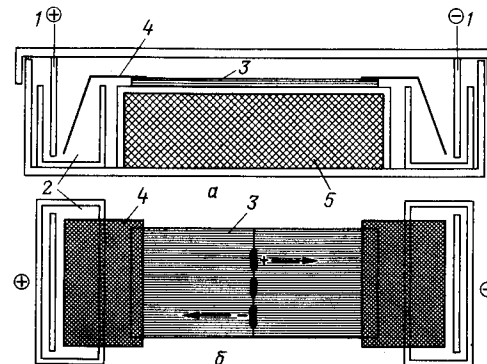
Физические основы метода

В зависимости от знака заряда молекулы вещества мигрируют в электрическом поле по направлению к аноду или к катоду (рис. 2.5.1/1). Результатом регистрации этого процесса является электрофореграмма (по аналогии с хроматографией).

Ранее использовали один и тот же буфер в слое носителя и в электродных камерах, т. е. разделение вели в непрерывной буферной системе. В настоящее время этот прием все еще применяют при электрофорезе на бумаге и пластинках. Однако было показано, что при электрофорезе в прерывистой буферной системе (различные буферы в слое носителя и в электродных камерах) быстро мигрирующие вещества образуют более узкие зоны. Электрофорез в прерывистой буферной системе используют главным обра-

Рис. 2.5.1/1. Камера для зонального электрофореза:

а — вид сбоку; б — вид сверху;
1 — электроды (анод и катод);
2 — буферный раствор в кювете;
3 — слой геля на пластинке (в центре пластинки показаны стартовые зоны анализируемой смеси);
4 — мостики из фильтровальной бумаги;
5 — охлаждаемая проточной водой металлическая пластина для отвода избыточного тепла



збм в гель-электрофорезе. ЗЭ обычно проводят на бумаге, пластинках и гелях в водных буферных растворах.

При электрофорезе в электродных камерах происходит электролиз раствора и вследствие этого — изменение состава буфера. Поэтому электроды располагают так, чтобы они не касались носителя, а контакт между ними осуществляется при помощи полосок фильтровальной бумаги (см. рис. 2.5.1/1). Электродная камера разделена на два отсека, которые соединяются дополнительным мостиком из фильтровальной бумаги. Подбирая соответствующий объем электродных камер или перекачивая буфер насосом от анода к катоду, поддерживают постоянными концентрацию и значение pH буфера в двухкамерной системе. Рекомендуется также проводить деполяризацию электродов после каждого электрофоретического разделения.

Материалы-носители

Материалы-носители подразделяются на две группы: бумага, целлюлоза, ацетилованная целлюлоза, агароза и материалы для ТСХ (например, силикагель); крахмал и полиакриламид.

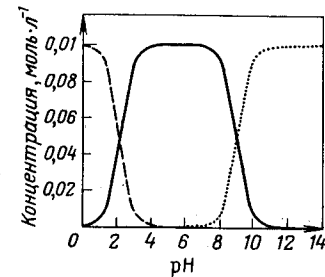
Эффективность разделения зависит не только от суммарного заряда молекул анализируемых веществ, но и от размеров молекул. Так, вполне возможно, что крупные молекулы с высоким суммарным зарядом могут мигрировать на то же расстояние, что и небольшие молекулы с низким суммарным зарядом. Определяющим параметром является соотношение заряд/масса.

Носители первой группы относительно инертны и слабо влияют на эффективность разделения. Материалы второй группы обладают пористой структурой, что существенно влияет на качество разделения. Поскольку размеры пор соизмеримы с размером макромолекул, то возможно разделение веществ с одинаковыми суммарными зарядами, но различными молекулярными массами (как, например, при ионообменной хроматографии).

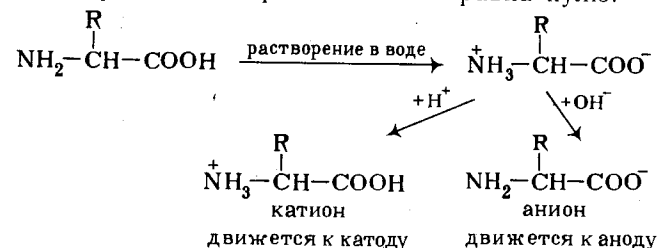
Величина pH

Наибольший интерес вызывает разделение амфотерных веществ (например, аминокислот, белков). Амфотерные вещества в кислой среде присоединяют протон и ведут себя как катионы. В щелочной среде они депротонируются и приобретают свойства анионов. В изоэлектрической точке (pI) они становятся цвиттер-ионами с нулевым суммарным зарядом, т. е. нейтральными молекулами, в которых противоположные заряды пространственно разделены (величина pI является характеристической константой для определенного вида молекул). Суммарный заряд таких веществ зависит от pH среды в широком диапазоне. При электро-

Рис. 2.5.1/2. Изменение концентраций в 0,1 М растворе глицина в зависимости от pH среды: $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COOH}$ — штриховая линия; $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ — сплошная линия; $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ — точечная линия



форезе они могут менять направление и скорость миграции. Ниже изображен цвиттер-ион с нулевым суммарным зарядом, скорость миграции которого в электрическом поле равна нулю.



На рис. 2.5.1/2 представлен график изменения концентрации ионов глицина (0,1 М раствор) в широком диапазоне pH. При pH 2,34 и 9,60 концентрации $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COOH}$ и $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ или же $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ и $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^{2-}$ соответственно равны. Эти значения pH обозначают как pK'_a и соответственно pK'_b . Суммарный заряд аминокислот и пептидов ориентировочно оценивают следующим образом:

pH = 9,5 — пептид заряжен отрицательно и мигрирует к аноду;
pH = 3 — пептид заряжен положительно и мигрирует к катоду;
 $3 < \text{pH} < 9,5$ — в соответствии со значением pI пептид мигрирует к катоду или аноду. При pH, равном pI, суммарный заряд равен нулю и пептид остается на стартовой линии.

Буферные растворы

Чем выше концентрация буферного электролита, тем меньше электрофоретическая подвижность разделяемых веществ. Это объясняется тем, что электрический ток переносится всеми присутствующими в растворе ионами. Чем выше концентрация буферного электролита, тем большая доля электрического тока переносится его ионами, тем медленнее мигрируют молекулы образца. К тому же следует учесть, что ионы разделяемых веществ окружены противоионами буферного электролита, при увеличении концентрации буфера ионы образца экранируются слоем противоионов и их электрофоретическая подвижность падает.

Если два материала-носителя, в данном случае целлюлоза и вода, с различными диэлектрическими свойствами вступают в контакт, то относительно друг друга они приобретают заряд. В данном случае молекулы воды заряжены положительно относительно целлюлозы. В электрическом поле молекулы воды медленно мигрируют к катоду, а вместе с ними увлекаются все растворенные вещества. С некоторыми допущениями считают, что все отрицательно заряженные ионы также смещаются к катоду, т. е. движутся в «неправильном» направлении. При определении абсолютной электрофоретической подвижности вещества вместе с образцом вносят нейтральные соединения, например мочевины или глюкозу. По завершении электрофореза зону нейтрального соединения принимают за «истинную» стартовую линию. Явление переноса нейтральных веществ в электрическом поле называется электроосмосом.

Приборы

Требования, предъявляемые к источникам питания, зависят от типа электрофореза. Иногда используют источник с регулируемым напряжением до 500 В, но чаще — до 1200 В.

Для достижения оптимального разделения необходимо обеспечить равномерное распределение тепла в носителе (особенно в слое геля при геле-электрофорезе). Это обеспечивается либо эффективным отводом тепла с помощью внешнего теплоносителя, либо применением источника, стабилизируемого по току или по напряжению. В процессе электрофореза меняется сопротивление носителей за счет испарения воды, и сила тока увеличивается. Это влечет за собой еще более интенсивное испарение воды и в случае электрофореза на бумаге приводит к ее пересыханию и обугливанию. При электрофорезе на бумаге или пластинках при напряжении до 300 В перегрева не наблюдается. При высоком напряжении или электрофорезе в геле рекомендуется поддерживать постоянную силу тока и тем самым стабилизировать выделение тепла.

Оформление результатов

В рабочем журнале фиксируют относительную скорость миграции, а также приводят срисованную или сфотографированную пластину, как при тонкослойной хроматографии (см. разд. 2.2).

Область применения — см. разд. 2.5.1.2—2.5.1.4.

- T. G. Cooper, Biochemische Arbeitsmethoden, de Gruyter, Berlin 1981
Firmenschrift, Polyacrylamide Gel Electrophoresis — Laboratory Techniques, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala 1980
B. Hames, R. Rickwood, Hrsg., Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, IRL Press Ltd., Oxford 1981
O. Mikes, Chromatographic and Allied Methods, Ellis Horwood, Chichester 1979
D. Rickwood, B. Hames, Hrsg., Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach, IRL Press, Oxford 1981
I. Smith, Hrsg., Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Bd. II, Heinemann, London 1976

2.5.1.1. Электрофорез на бумаге

Физические основы метода

Для электрофореза на бумаге используют специальные сорта бумаги, характеризующиеся следующими свойствами: достаточной механической прочностью; удовлетворительным удерживанием достаточного количества электролита и образца.

Применяя специальные сорта бумаги, можно: экстрагировать вещества из соответствующих зон или пятен и использовать для дальнейшей работы; применять простые способы обнаружения веществ, используемые в бумажной хроматографии (см. разд. 2.2.7); проводить фракционирование в двух направлениях.

При электрофорезе происходит расширение зон за счет диффузии, которая особенно характерна для низкомолекулярных соединений. Однако диффузию можно уменьшить за счет повышения напряжения электрического поля, предусмотрев возможность отвода избыточного тепла. При высоковольтном электрофорезе эту роль выполняют жидкие теплообменники, которые одновременно служат изолирующим материалом.

Приборы и материалы

Схематично камеры для электрофореза на бумаге изображены на рис. 2.5.1.1/1.

Камера для высоковольтного электрофореза по Михлю является практичной и удобной (рис. 2.5.1.1/2). В такой камере проводят электрофорез при напряжении до 3 кВ и силе тока до 200 мА. В качестве теплоносителя и изолирующей среды в камеру помещают гептан, толуол, хлорбензол. Так как эти растворители токсичны и горючи, необходимо соблюдать меры противопожарной безопасности — размещать стеклянные камеры (танки) только в вытяжном шкафу в поддоне достаточной емкости.

Наряду с камерами погружного типа применяют камеры для электрофореза в тонком слое с охлаждаемыми пластинами (рис. 2.5.1.1/3), в которых лист бумаги помещают между двумя изолирующими пленками. Как показано на рис. 2.5.1.1/4, изоли-

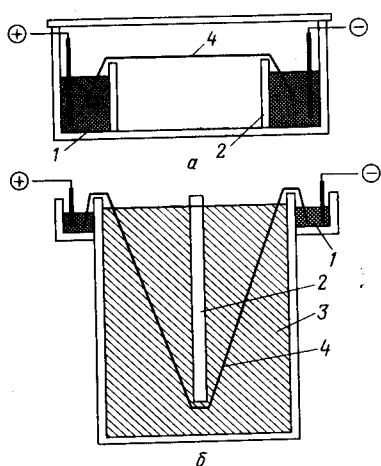


Рис. 2.5.1.1/1. Схема камер для электрофореза на бумаге:

a — низковольтного, с горизонтальным расположением электрофореза; *b* — высоковольтного, с градиентом потенциала 20–35 В·см⁻¹; 1 — электродный буфер; 2 — стеклянная перегородка; 3 — теплоноситель; 4 — лист бумаги

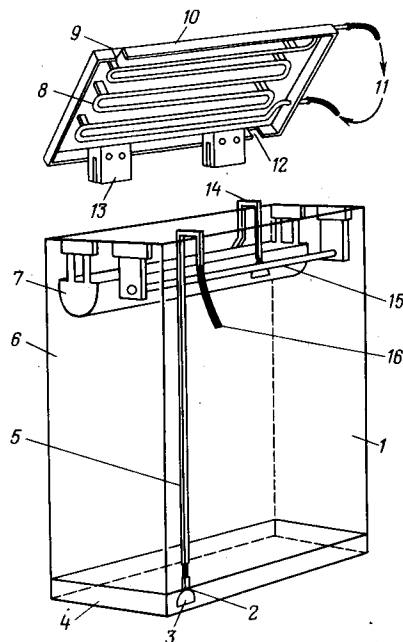


Рис. 2.5.1.1/2. Камера для высоковольтного электрофореза по Михлю (рабочее напряжение до 5 кВ):

1 — камера; 2 — вольфрамовая составляющая электрода; 3 — нижний электрод (платиновая часть); 4 — нижний электродный буфер; 5 — стеклянная трубка; 6 — теплоноситель (толуол); 7 — ювета для верхнего электродного буфера; 8 — змеевик для подачи хладагента (воды); 9 — выемка в крышке для нижнего электрода; 10 — крышка; 11 — вода; 12 — выемка в крышке для верхнего электрода; 13 — контакт-предохранитель; 14 — верхний электрод; 15 — стеклянный стержень для подвешивания бумаги; 16 — клемма электрода [Smith I., Ed., Chromatographie and Electrophoretic Techniques, Vol. II, Heinemann, London 1976, Fig. 3.6, p. 40]

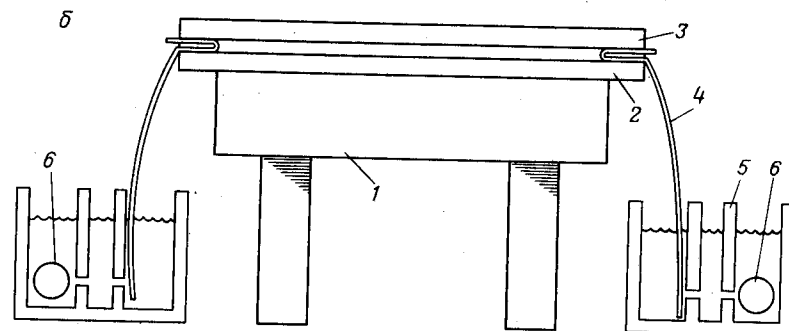
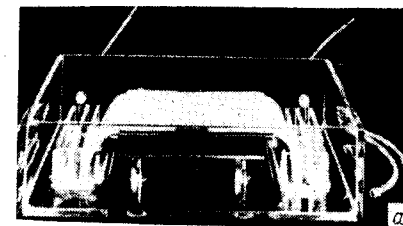
рующую пленку помещают вдоль всей площади пластины вплоть до электродных камер. В большинстве случаев используют полиэтиленовую пленку толщиной 0,03 мм. Перед каждым опытом пленку тщательно очищают от электролита, оставшегося от предыдущего опыта.

Буферные растворы

Для проведения электрофореза на бумаге рекомендован ряд буферных растворов (табл. 2.5.1.1/1). Летучие буферы (табл. 2.5.1.1/2) являются более предпочтительными, так как они легко удаляются с бумаги (испарением) и поэтому не препятствуют обнаружению веществ методом окрашивания или выделению элюированием. Кроме того, летучие буферы удобны для проведения двухмерного разделения.

Рис. 2.5.1.1/3. Горизонтальная камера для электрофореза в тонком слое:

a — общий вид; *b* — принципиальная схема; 1 — охлаждаемая пластина; 2 — лист бумаги; 3 — крышка; 4 — электродные мостики; 5 — юветы с электролитом; 6 — электроды [Smith I., Ed., Chromatographie and Electrophoretic Techniques, Vol. II, Heinemann, London 1976, Fig. 3.3, p. 36]



Порядок выполнения операций

Для электрофореза используют специальные сорта бумаги, которые нарезают полосками шириной 4 см.

При проведении горизонтального электрофореза на бумаге пробу наносят следующим образом:

полоски бумаги погружают в буферный раствор, избыток раствора снимают фильтровальной бумагой, полоски помещают в камеру;

образец (примерно 4 мкл) наносят в виде полосы, на электроды подают напряжение;

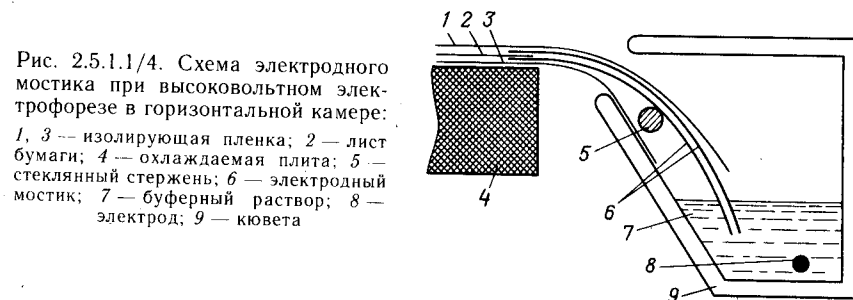


Рис. 2.5.1.1/4. Схема электродного мостика при высоковольтном электрофорезе в горизонтальной камере: 1, 3 — изолирующая пленка; 2 — лист бумаги; 4 — охлаждаемая плита; 5 — стеклянный стержень; 6 — электродный мостик; 7 — буферный раствор; 8 — электрод; 9 — ювета

Таблица 2.5.1.1/1. Буферы для проведения электрофореза на бумаге (компоненты буферной системы растворяются в воде и доводят объем раствора до 1000 мл)

Значение pH	Название буфера	Компоненты системы	Масса вещества, г
4,0	Ацетатный	Ацетат натрия · 3H ₂ O	13,61
		Уксусная кислота	
7,0	Фосфатный	KH ₂ PO ₄	363
	(по Сёренсону)	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	143
8,6	Верональный	Диэтилбарбитурат натрия	10,3
		Барбитуровая кислота	
8,9	Трис-буфер	Трис-гидроксиметиламинотетраацетат (ЭДТА)	60,5
		(трис)	
		Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)	6,0
		Борная кислота	4,6

подходящую концентрацию вещества в образце подбирают предварительно.

Для проверки эффективности разделения методом электрофореза в стартовую зону наносят такое количество образца, чтобы проявились сопутствующие примесные компоненты.

Для контроля процесса электрофореза в образце добавляют окрашенные вещества, которые выполняют роль внутреннего стандарта [например, при анализе аминокислот и пептидов — N^e-(динитрофенил)лизин; при анализе белков сыворотки крови — бромфеноловый синий].

В качестве предварительного опыта проводят электрофорез при небольшом напряжении поля в течение 1 ч или меньшего времени, а затем проверяют эффективность разделения. При слишком продолжительном опыте компоненты с высокой электрофоретической подвижностью переходят в электродный буфер и не могут быть обнаружены при детектировании. Если подвижность относительно окрашенного стандарта известна, подбирают оптималь-

Таблица 2.5.1.1/2. Летучие буферные системы для электрофореза на бумаге аминокислот и пептидов (компоненты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1000 мл)

Значение pH	Компоненты системы	мл	Значение pH	Компоненты системы	мл
1,0	Муравьиная кислота	26	7,0	Коллидин	18,8
	Уксусная кислота	58		Уксусная кислота	5,5
3,1	Муравьиная кислота (90%-я)	40	10,0	Триэтиламин	13,2
	Раствор аммиака (плотность 0,88)	16	10,4	Уксусная кислота	4,5
5,3	Пиридин	20		Триэтиламин	14,0
	Уксусная кислота	8		Уксусная кислота	3,7
6,5	Пиридин	100			
	Уксусная кислота	4			

ную напряженность электрического поля и продолжительность опыта.

По завершении эксперимента полоску бумаги извлекают из камеры и быстро высушивают, чтобы свести к минимуму влияние диффузии.

Детектирование

В большинстве случаев при детектировании используют обычные реагенты для опрыскивания (по аналогии с тонкослойной хроматографией и хроматографией на бумаге (см. разд. 2.2.2 и 2.2.7). Однако для многих классов веществ разработаны специальные методы окрашивания.

Особые приемы работы

Высокую степень разрешения обеспечивает сочетание двух различных принципов разделения, например электрофореза и хроматографии. В особенности хорошие результаты дает сочетание электрофореза и хроматографии на бумаге. Такой процесс называют *двумерным разделением*. Образец наносят в виде точки в левом верхнем углу листа бумаги и проводят электрофорез (в первом направлении). Затем лист высушивают, поворачивают на 90° и проводят хроматографию в направлении, перпендикулярном первому направлению. Компоненты смеси распределяются теперь по всей площади листа. При правильном выборе условий многокомпонентная смесь может быть разделена со значительно более высокой степенью разрешения, чем при разделении в одном направлении.

Специальным методом двумерного разделения является метод «отпечатков пальцев», или «фингер-принт». Этим методом разделяют частичные ферментативные гидролизаты белков или нуклеиновых кислот. Полученный набор пятен является специфичным для каждого белка или полинуклеотида, подобно тому как для каждого человека характерны только ему присущие отпечатки пальцев («фингер-принт»).

Область применения — см. разд. 2.5.1.2.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.5.1.

2.5.1.2. Электрофорез в тонком слое

Основы метода

Электрофорез в тонком слое проводят на стеклянных пластинках, покрытых слоем носителя. По сравнению с полосками бумаги пластинки более удобны в обращении. Если в качестве носи-

теля используют силикагель, детектирование разделенных веществ проводят при помощи более реакционноспособных реагентов.

Приборы

Для проведения электрофореза используют прибор с охлаждаемыми пластинами, аналогичный приборам, изображенным на рис. 2.5.1/1 и 2.5.1.1/3. Источник питания позволяет повышать напряжение от 0 до 1000 В (сила тока до 200 мА). Пластинку с носителем помещают на изолированный блок (алюминиевый), охлаждаемый проточной водой. Чтобы исключить высушивание слоя носителя в процессе электрофореза, его покрывают стеклянной пластинкой. Мостики, соединяющие носитель с электродными камерами, одновременно служат прокладками между слоем носителя и верхним стеклом. Наиболее часто используют пластинки размерами 10×20 и 20×20 см. Обычно используют готовые пластинки, покрытые силикагелем, кизельгуром, целлюлозой (аналогично пластинкам для ТСХ). В некоторых случаях применяют носители с примесью люминофора. При проведении электрофореза предпочитают использовать летучие буферы (см. табл. 2.5.1.1/2). В этом случае при последующем детектировании не наблюдается каких-либо побочных реакций; кроме того, становится возможным выделение микроколичеств не содержащих солей веществ путем экстракции из пятна или зоны.

Порядок выполнения операций

Нанесение образца

Образцы наносят капилляром (1—5 мкл) на сухую пластинку в виде пятна диаметром не более 12 мм. Для увеличения нагрузки на стартовую зону нанесение проводят многократно, причем растворитель между нанесениями испаряют при помощи фена (сухой остаток анализируемых веществ перегревать не следует).

Равномерно опрыскивают пластинку рабочим буфером из пульверизатора (см. рис. 2.2.2/5) до почти прозрачного состояния.

Влажная пластинка должна иметь вид матового стекла.

Проведение электрофореза

Полоски фильтровальной бумаги погружают в буфер, избыток раствора промокают фильтровальной бумагой, после чего полоски, как показано на рис. 2.5.1.1/3, б, фиксируют в камере, прижимая верхней пластинкой и соединяя тем самым слой носителя с кюветой.

Прибор накрывают крышкой, включают охлаждение и проводят электрофорез при напряжении 900—1000 В в течение 15 мин.

Отключают напряжение, пластинку быстро высушивают и слой обрабатывают соответствующим проявителем.

На основании полученных результатов определяют оптимальное напряжение и продолжительность разделения. Если анализируемые компоненты мигрируют в одном направлении, то стартовую линию целесообразно располагать у противоположного электрода.

При работе с термолабильными веществами по завершении электрофореза пластинку охлаждают в низкотемпературном шкафу (сухое замораживание), а затем высушивают в вакуумном эксикаторе (при помощи масляного насоса, присоединенного к эксикатору коротким вакуумным шлангом с большим внутренним диаметром). Такой метод сушки препятствует расширению зон за счет диффузии (другие способы сушки не исключают возможности диффузии).

Область применения

Анализ фракций, полученных при колоночной хроматографии.

Анализ ферментативных гидролизатов белков.

Исследование метаболитов.

Разделение аминов, аминокислот, пептидов и белков, нуклеотидов, фенолов, нафтолов, фенолкарбоновых кислот, красителей, а также неорганических соединений.

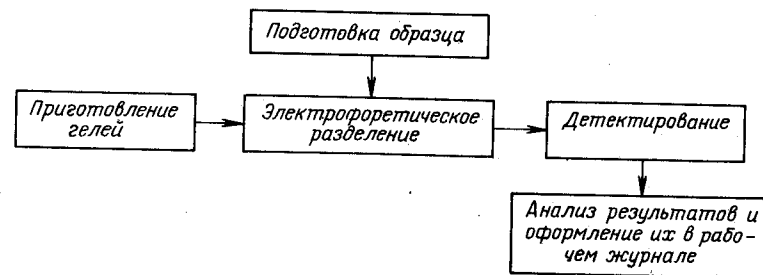
Оформление результатов — см. разд. 2.5.1.1.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.5.1.

2.5.1.3. Гель-электрофорез

Основы метода

Вместо целлюлозы и силикагеля можно использовать мягкие гели. Ниже приведены основные рабочие стадии проведения электрофореза в слое геля:



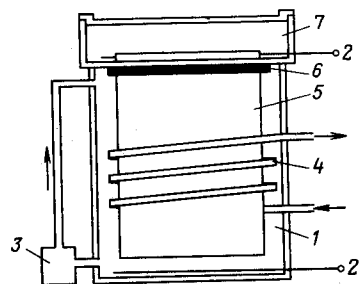


Рис. 2.5.1.3/1. Камера для электрофореза в вертикальном блоке геля:

1 — камера; 2 — электроды; 3 — перистальтический насос; 4 — змеевик для подачи теплоносителя (хладоагента); 5 — слой геля между двумя стеклянными пластинами; 6 — изолирующая прокладка; 7 — верхняя электродная камера

Из множества гелей на практике используют только два — гели агарозы и полиакриламида. Использование агарозы существенно расширяет область применения метода: становится возможным анализ сложных биополимеров, например ферментных комплексов, липопротеидов, ДНК и РНК. Несмотря на небольшую концентрацию агарозы (не более 0,2%), необходимую для получения крупнопористого геля, гели агарозы характеризуются достаточно высокой механической прочностью.

В зависимости от способа приготовления геля и типа буферной системы различают несколько вариантов метода:

электрофорез в геле полиакриламида (ПААГ);

диск-электрофорез (диск-ПААГ) в прерывистой буферной системе;

электрофорез в геле полиакриламида в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ);

электрофорез в градиенте пористого полиакриламидного геля.

Электрофорез в геле полиакриламида (ПААГ)

Этот вариант электрофореза используют для эффективного разделения и идентификации биополимеров (полипептидов, белков, нуклеиновых кислот). Гель формируют в виде блоков или столбиков, которые располагают в электрофоретической камере вертикально (рис. 2.5.1.3/1). В последнее время все большее применение получает электрофорез в блоке, так как в блоке можно проводить непосредственное сопоставление множества образцов.

Диск-электрофорез в ПААГ (диск-ПААГ)

В этом случае гель также формируют в виде блока (пластинки) или столбиков, однако составляют из двух слоев различной пористости — крупнопористого (концентрирующего) и мелкопористого (разделяющего) геля. Формирование геля проводят в две стадии. Вначале деаэрируют и полимеризуют разделяющий гель, затем наслаивают разбавленный раствор мономеров (слой высотой 1 см) с большим значением pH и еще раз полимеризуют. Бу-

фер в электродных камерах по значению pH примерно соответствует рабочему гелю, но содержит более слабую по сравнению с HCl кислоту (например, глицин).

После нанесения пробы на электроды подают напряжение. При этом все анионы (Cl^-) начинают двигаться к аноду. Ионы глицина мигрируют в слой концентрирующего геля, и раствор в этой области приобретает pH, близкое по значению к его изоэлектрической точке, т. е. ионы глицина практически теряют заряд. Зона, где находится образец, становится почти нейтральной, электропроводность резко падает, возникает высокий градиент напряженности поля, что в свою очередь вызывает ускорение миграции молекул белка.

Скорость миграции ионов хлора намного превышает скорость миграции белков. Вследствие этого дополнительно увеличивается градиент напряженности поля, еще более возрастает скорость миграции молекул белка. Через некоторое время молекулы белка попадают в область высокой концентрации ионов хлора, т. е. в область с небольшим градиентом напряженности поля, и их подвижность резко падает. В итоге белки концентрируются на границе между двумя зонами — иона хлора и иона глицина. Поскольку в рабочем (разделяющем) геле среда более кислая, равновесие глицин — глицин H^+ сильно сминуто вправо, что компенсирует нехватку ионов слабой кислоты. Дальнейшее разделение идет в обычных условиях.

Электрофорез ДСН-ПААГ

Критерием степени очистки белков является наличие одной зоны при электрофорезе в ДСН-ПААГ. При этом белки разделяются строго по молекулярной массе. Предварительно белки в образце денатурируют (растворяют в детергенте). В ходе денатурации молекулы белков приобретают одинаковую вторичную структуру. Наиболее удобным детергентом является ДСН. При взаимодействии ДСН с полипептидными цепями образуется комплекс ДСН-белок, характеризующийся постоянным зарядом на единицу молекулярной массы. Этот метод позволяет с достаточной точностью и небольшими затратами определять молекулярную массу белков. Для облегчения задачи выпускаются разнообразные наборы белков-маркеров с известными молекулярными массами. Стандартную смесь вносят по обе стороны от точки нанесения исследуемого белка. После проведения электрофоретического разделения, по электрофоретической подвижности комплекса путем экстраполяции определяют молекулярную массу исследуемого белка.

Электрофорез в градиенте пористости ПААГ

В первом приближении величина пор в ПААГ зависит от абсолютной концентрации мономеров в рабочем растворе. Градиент пористости геля формируют путем подачи в рабочую камеру раствора мономеров, концентрация которых плавно уменьшается. При этом пористость геля возрастает в направлении снизу вверх (в случае белков — от анода к катоду).

В градиенте ПААГ разделяют вещества по молекулярным массам в области $5 \cdot 10^4$ — $5 \cdot 10^6$ г·моль⁻¹. Электрофоретическая подвижность разделяемых веществ при этом имеет второстепенное значение. Особенно узкие зоны формируются при высоком напряжении, так как в этом случае заряженные вещества под действием высокого поля буквально вдавливаются в мелкопористую сетку геля. Этим самым исключается возможность расширения зон вследствие броуновского движения.

Этот метод применяют для разделения нативных и денатурированных биополимеров. Единственным условием его применения является одноименный заряд разделяемых веществ.

Приборы

Для приготовления геля кроме штатива для фиксации электрофоретической камеры необходимы пластинки или трубочки. Для получения градиентных гелей необходимы также перистальтический насос и градиентный смеситель. Получать гели самостоятельно необязательно, можно пользоваться готовыми пластинками.

Камера для электрофореза

Для проведения электрофореза используют камеру с охлаждаемой горизонтальной пластиной (см. рис. 2.5.1.1/3) или вертикальную камеру (рис. 2.5.1.3/1). Вертикальная камера для электрофореза состоит из следующих деталей:

нижней электродной камеры (выравнивание температуры в камере проводится за счет принудительной циркуляции жидкости);

теплообменника из инертного материала;

верхней камеры (в ней обычно фиксируют верхнюю часть пластинки с рабочим гелем).

Источник питания

Чаще всего используют источник питания, обеспечивающий напряжение до 500 В и силу тока до 400 мА.

Кювета для окрашивания и обесцвечивания гелей

Для обнаружения веществ гель окрашивают соответствующим красителем. Так как молекулы красителя заряжены, гель можно обесцвечивать электрофоретически при 50 В (см. рис. 2.5.1.3/5). Вещества выявляются в виде окрашенных пятен в прозрачном геле. Количественную оценку проводят спектрофотометрически при помощи сканирующего денситометра.

Устройство для высушивания гелей

После усадки гелей в водном этаноле или ацетоне их высушивают между двумя листами целлофана в вакууме при слабом нагреве.

Подготовка образца

Наилучшие результаты получают в том случае, если образец растворен в рабочем буфере. Для того, чтобы увеличить плотность раствора в образец добавляют 40%-ю сахарозу или глицерин.

Порядок выполнения операций

Нанесение образца

На слой геля в кассете помещают аппликатор и кассету устанавливают в кювету (рис. 2.5.1.3/2).

Как готовый, так и приготовленный самостоятельно гель перед началом работы уравнивают рабочим буфером. С этой целью проводят кратковременный электрофорез (20 мин, 70 В).

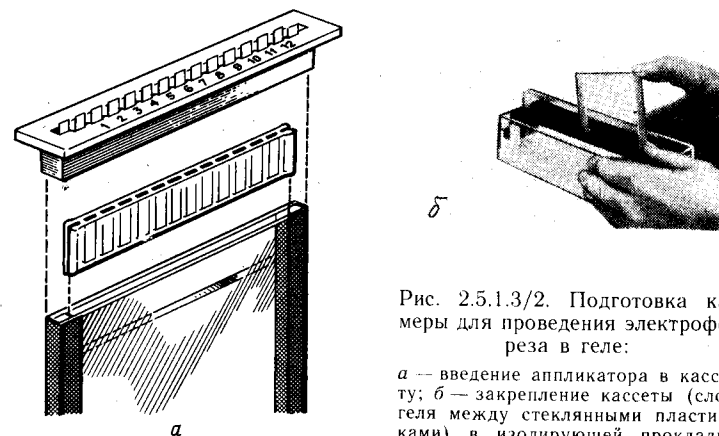


Рис. 2.5.1.3/2. Подготовка камеры для проведения электрофореза в геле:

а — введение аппликатора в кассету; б — закрепление кассеты (слой геля между стеклянными пластинками) в изолирующей прокладке

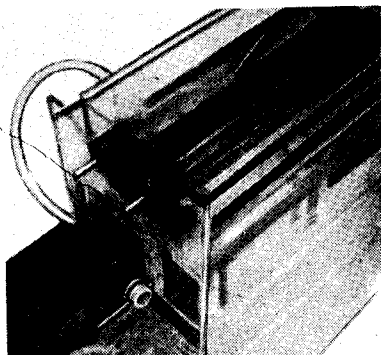


Рис. 2.5.1.3/3. Внесение пробы в лунки аппликатора (Pharmacia, Uppsala/Schweden)

Образец вносят с помощью пипетки в лунки аппликатора (рис. 2.5.1.3/3).

Проведение электрофореза

Сначала проводят предварительный электрофорез при 70 В в течение 15—20 мин до тех пор, пока проба не впитается в гель.

Устанавливают рабочее напряжение. При электрофорезе в градиентном геле продолжительность опыта составляет 15 ч при 150 В.

При проведении ускоренного электрофореза (4—5 ч при напряжении до 500 В) буфер охлаждают до 4 °С и во время опыта поддерживают температуру 10 °С.

Обнаружение

Извлекают пластинку геля (рис. 2.5.1.3/4), выдерживают 30 мин в 10%-й сульфосалициловой кислоте и затем в растворе красителя (рис. 2.5.1.3/4, в).

Способ окрашивания зависит от природы разделяемых веществ. В большинстве случаев применяют неспецифические реагенты, такие как кумасси голубой, амидовый черный или бромфеноловый синий (0,1—0,5%-й раствор красителя в 7%-й уксус-

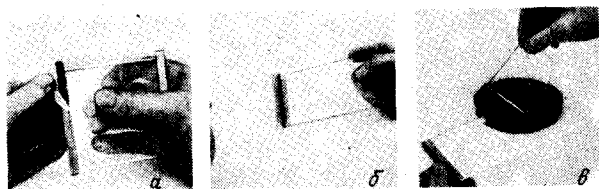


Рис. 2.5.1.3/4. Извлечение слоя геля по завершении электрофореза (Pharmacia, Uppsala/Schweden):

а — липкую ленту с одной стороны кассеты снимают; б — кассету раскрывают и гель отделяют; в — блок геля помещают в фиксирующий раствор красителя

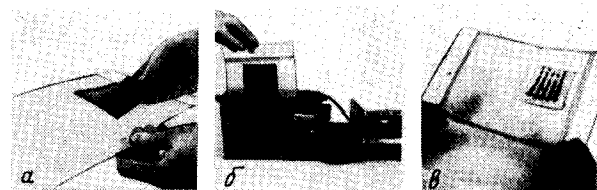


Рис. 2.5.1.3/5. Обесцвечивание геля (Pharmacia, Uppsala/Schweden):

а — пластинку помещают в держатель; б — пластинку в держателе помещают в сосуд с обесцвечивающим раствором; в — после обесцвечивания фона гель высушивают и хранят в конверте из прозрачной пленки

ной кислоте), продолжительность обработки составляет 1—2 ч. Белки и нуклеиновые кислоты проявляют реагентом, содержащим соли серебра. Этот метод в 10—20 раз чувствительнее по сравнению с проявлением при помощи кумасси.

Обесцвечивание геля (рис. 2.5.1.3/5). Избыток красителя отмывают растворителем. Обесцвечивание проводят также методом электрофореза в специальной камере (рис. 2.5.1.3/5, б).

Консервация

Пластинку геля выдерживают в водном ацетоне или метаноле, а затем высушивают (в вакууме при слабом нагреве) в специальной установке.

Анализ результатов

Количественную оценку пятен проводят с помощью денситометра.

Область применения

Разделение всех классов заряженных веществ, например белков, ферментных комплексов, вирусов, олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Определение молекулярных масс биополимеров.

Анализ белков на микроуровне (антигенов при количественном иммуноэлектрофорезе).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.5.1.

2.5.1.4. Электрофорез в свободном потоке

При электрофорезе в свободном потоке электролит (буфер) перемещается в вертикальном направлении (перпендикулярно направлению электрического поля). Заряженные частицы под дей-

ствием электрического поля мигрируют в горизонтальном направлении и одновременно увлекаются потоком буфера. В итоге разделенные вещества распределяются в потоке в соответствии с их электрофоретической подвижностью и элюируются из прибора в различных фракциях.

Основы метода

В основе метода лежат те же принципы, что и для непрерывного зонального электрофореза, однако здесь поток электролита передвигается перпендикулярно электрическому полю (рис. 2.5.1.4/1). Зоны стабилизируются при помощи потока достаточно разбавленного электролита.

Приборы

Электрофорез в свободном потоке проводят в *приборе Ханнига*, изображенного на рис. 2.5.1.4/2. Смесь разделяемых веществ и рабочий буфер непрерывно подают в верхнюю часть камеры между двумя охлаждаемыми стеклянными пластинками, расстояние между которыми 0,6 мм. Компоненты смеси мигрируют под действием электрического поля в соответствии с их суммарным зарядом в направлении электродов, одновременно они передвигаются под действием потока электролита в направлении сверху

Рис. 2.5.1.4/2. Установка Ханнига для проточного электрофореза (Desaga GmbH, Heidelberg)

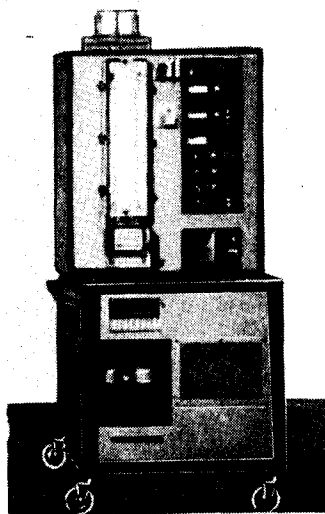


Рис. 2.5.1.4/1. Электрофорез в свободном потоке:

1 — градиент электрического поля; 2 — буферный раствор; 3 — разделяемая смесь; 4 — направление потока электролита; 5 — электрод; 6 — коллектор для сбора фракций

вниз. В нижней части поток разделяется на 48 отдельных потоков. В стандартных условиях компоненты смеси элюируются в одних и тех же зонах, поэтому можно работать в непрерывном режиме, накапливая вещества в сборниках коллектора.

Область применения

Препаративное разделение заряженных частиц, в том числе коллоидных, субклеточных частиц и клеток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.5.1.

2.5.2. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ (ИЭФ)

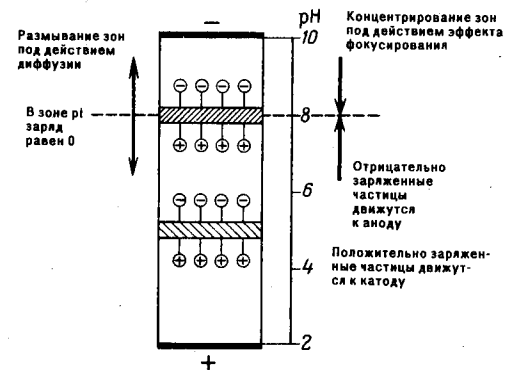
С помощью изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) разделяют амфотерные вещества, в частности белки, по их изоэлектрическим точкам (ИЭТ). Сущность метода заключается в том, что молекулы белков мигрируют под действием электрического поля в среде с линейным и стабильным градиентом pH до достижения области pH, соответствующей их ИЭТ.

Физические основы метода

Изоэлектрическое фокусирование отличается от зонального электрофореза тем, что разделение осуществляется не в буфере с постоянным значением pH, а в среде с линейным градиентом pH. Значение pH минимально вблизи анода, максимально — вблизи катода.

В области высоких значений pH аминокислоты и белки заряжены отрицательно и мигрируют в электрическом поле в направлении к аноду, т. е. в область низких значений pH. В этой области происходит перезарядка молекул белка за счет протонирования, вследствие чего направление движения изменяется на противополо-

Рис. 2.5.2/1. Демонстрация эффекта концентрирования при изоэлектрофокусировании (белки с изоточками pI 5 и 8 сфокусированы в узкие зоны; эффект фокусирования действует в направлении, противоположном явлению диффузии)



ложное. В конечном счете молекулы попадают в область, где их суммарный заряд равен нулю, вследствие чего они утрачивают электрофоретическую подвижность. Молекулы, находившиеся в начале процесса в кислой области значений рН, мигрируют по направлению к катоду. При увеличении рН среды они также попадают в зону, где утрачивают заряд и электрофоретическую подвижность. Когда же молекулы белков покидают область ИЭТ вследствие диффузии, они вновь приобретают заряд и начинают передвигаться под действием электрического поля до достижения ими прежнего положения (рис. 2.5.2/1). Чем выше напряженность поля, тем меньше влияние диффузии, тем уже зоны разделяемых веществ.

Эффект концентрирования (фокусирования) является важнейшей отличительной чертой этого метода.

Формирование стабильных градиентов рН

Главным условием эффективного разделения белков является наличие стабильного градиента рН среды. В связи с тем, что белки обладают амфотерными свойствами, необходимо, чтобы амфолиты-носители — вещества, с помощью которых формируется градиент рН, обладали высокой буферной емкостью. Амфолиты-носители представляют собой многокомпонентную смесь изомеров и гомологов алифатических полиаминополикарбоновых кислот, сульфокислот и фосфоновых кислот, изоэлектрические точки которых располагаются в широкой области значений рН. Промышленные амфолиты-носители приведены в табл. 2.5.2/1.

В отсутствие электрического поля раствор амфолитов-носителей имеет значение рН равное 7. В электрическом поле амфолиты распределяются в соответствии со значениями их изоэлектрических точек. Например, вещества с минимальными значениями рI (высокий отрицательный заряд) располагаются в кислой

Таблица 2.5.2/1. Амфолиты-носители для изоэлектрического фокусирования

Название	Общие сведения о химическом строении	Фирма-изготовитель
Амфолины (Ampholine)	Полиаминополикарбоновые кислоты	LKB Peoducter, Bromma, Schweden
Фармалиты (Pharmalyte)	Сополимеры глицина, глицил-глицина, аминов и эпихлоргидрина	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Сервалиты (Servalyte)	Сополимеры, содержащие амин-, сульфо-, фосфо-, карбокси- и гуанидильные группы	Serva, Heidelberg, Deutschland
Био-литы (Bio-Lyte)	Полиаминополисульфоновые кислоты	Bio-Rad Laboratoria, Richmond, Gál. USA

области вблизи анодного раствора. При попадании в зону электролита (вследствие диффузии) молекулы амфолитов приобретают положительный заряд и под действием поля вновь возвращаются в исходную область, где таким образом формируется рН близкое их изоэлектрической точке. По аналогичному механизму в прилегающем слое концентрируются амфолиты-носители с более высокими рI, формируя тем самым область с более высоким значением рН. Этот процесс распространяется вдоль рабочей камеры вплоть до катодного электролита. Каждый раз, когда молекулы амфолитов-носителей диффундируют в соседнюю зону, они вновь под действием поля возвращаются в исходное положение. В результате в системе формируется плавный градиент рН, который остается устойчивым до тех пор пока находится в электрическом поле.

Для правильного выбора рабочей области рН-градиента значения изоэлектрических точек разделяемых белков знать важно, но вовсе не обязательно. При отсутствии необходимой информации разделение проводят в широком диапазоне значений рН — от 2 до 11, не ставя задачу достижения высокой степени разрешения. Таким образом определяют рI отдельных компонентов смеси. Затем в зависимости от распределения изоэлектрических точек выбирают минимальный диапазон рН для последующего опыта. При благоприятных обстоятельствах удастся разделить вещества с разницей в значениях рI около 0,01.

Влияние рН-градиента на качество разрешения показано на рис. 2.5.2/2. При ИЭФ в широкой области изменения значений рН (рис. 2.5.2/2, а) — от 3 до 10 — все компоненты смеси остаются в пределах пластинки, однако разрешение компонентов А, Б, В неудовлетворительное. При ИЭФ в узкой области изменения значений рН (рис. 2.5.2/2, б) — от 5 до 8 — разрешение компонентов А, Б, В удовлетворительное.

Однако эффект фокусирования при этом несколько меньше, чем при разделении в широком диапазоне значений рН, поскольку зоны сильно размываются за счет диффузии. Наблюдающийся недостаток — уширение зон разделяемых веществ — частично

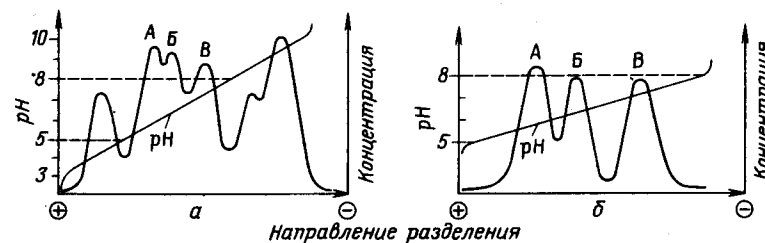


Рис. 2.5.2/2. Разрешение при изоэлектрическом фокусировании: а — в диапазоне изменения значений рН от 3 до 10; б — в диапазоне изменения значений рН от 5 до 8

компенсируется возможностью увеличения нагрузки по белку, т. е. проведения препаративного ИЭФ.

Стабилизация рН градиентов

При изоэлектрофокусировании наблюдается выделение тепла. Возникающая тепловая конвекция нарушает линейность сформированного рН-градиента. Для уменьшения перемешивания используют различные стабилизирующие материалы:

- гели (агароза и полиакриламид);
- гранулированные гели (сефадекс ИЭФ, ультрадекс, электрофокусирующий гель — био-лит, агароза);
- раствор с градиентом плотности (сахароза, глицерин, этиленгликоль).

Для препаративного изоэлектрофокусирования преимущественно используют два последних метода.

В настоящее время разработаны специальные полиакриламидные гели с фиксированными рН-градиентами.

Электролиты

Катодные и анодные электролиты (католиты и анолиты) применяют для выполнения следующих задач:

- подавления электролитических окислительно-восстановительных реакций амфолитов и разделяемых веществ;
- придания заряда молекулам амфолитов с низкими и высокими pI .

Материалы

Для проведения ИЭФ в основном требуются специальные материалы.

Блоки геля из: *а* — полиакриламида (при анализе веществ с молекулярной массой до 10^5 г·моль⁻¹); *б* — агарозы (при анализе веществ с молекулярной массой 10^5 г·моль⁻¹); *в* — гранулированного геля (для препаративного изоэлектрофокусирования).

Растворы с градиентом плотности (сахароза, глицерин или этиленгликоль) (для изоэлектрофокусирования в колонках).

Амфолиты-носители (см. табл. 2.5.2/1).

Электродные растворы, реагенты для фиксации и окрашивания белков (разд. 2.5.2.1 и 2.5.2.2).

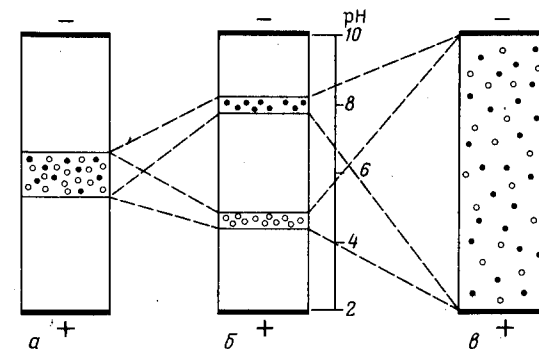
Электроды.

Приборы

Пластинки (верхняя и нижняя) для изоэлектрофокусирования в слое геля.

Рис. 2.5.2/3. Способы нанесения пробы при ИЭФ:

а — нанесение пробы в виде отдельной зоны; *б* — результаты ИЭФ (они одинаковы независимо от способа внесения пробы); *в* — равномерное распределение пробы в геле



Прибор для электрофореза с охлаждаемой пластиной.

Стеклообразные колонки для изоэлектрофокусирования в градиенте плотности (см. разд. 2.5.2.2).

Источник питания (до 2000 В, стабилизация по мощности).

Контактный стеклынный электрод (для определения рН в слое геля).

Фирмы-изготовители производят гели различной толщины, пропитанные амфолитами-носителями с различными значениями рН.

Нанесение пробы

Известно несколько способов нанесения пробы (рис. 2.5.2/3): в виде зоны перед формированием рН-градиента (рис. 2.5.2/3, *а*); в виде зоны после формирования рН-градиента, по возможности вблизи конечного положения зоны белка;

в раствор для пропитки геля (обычного или градиентного) (рис. 2.5.2/3, *в*) перед формированием рН-градиента (в особенности в случае препаративного изоэлектрофокусирования).

Независимо от способа внесения пробы вещества по завершении эксперимента располагаются в зонах, соответствующих их изоточкам (рис. 2.5.2/3, *б*).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- I. P. Arbutnot, J. A. Beeley, Hrsg., Isoelectric Focussing, Butterworth 1975
- Firmenschriften: Electrofocusing Seminar Notes (Teil 1: Basic Principles, Teil 2: Analytical, Teil 3: Preparative), LKB Produkter AB, Bromma, Schweden 1979
- Polyacrylamide Gel Electrophoresis — Laboratory Techniques, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden 1980
- I. Smith, Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Bd. 2, Heinemann, London 1976

2.5.2.1. Аналитическое изоэлектрическое фокусирование

Аналитическое изоэлектрофокусирование — метод разделения амфотерных веществ, прежде всего белков, по их изоэлектрическим точкам в тонком слое геля полиакриламида или агарозы в рН-градиенте.

Физические основы метода

Необходимым условием проведения ИЭФ является наличие высокого напряжения при низкой ионной силе раствора. Однако именно в этих условиях усиливается электроосмос. Отрицательное воздействие оказывают также примеси солей, занесенные вместе с реактивами (гели для ИЭФ следует готовить из особо чистых реактивов). Наиболее подходящим для проведения ИЭФ является полиакриламидный гель, обладающий низкими электроосмотическими свойствами.

Продолжительность эксперимента зависит от напряженности поля и крутизны рН-градиента.

При крутом наклоне градиента белок, находящийся в области значения рН близкого к его электрической точке, еще сохраняет заряд и достаточно высокую подвижность. При пологом градиенте белки имеют небольшой суммарный заряд даже в области рН, далекой от изоэлектрической точки. Следовательно, скорость их миграции в конечную зону невысока. По этой причине для проведения эксперимента в пологом градиенте рН требуется вдвое больше времени (3 ч) по сравнению с разделением в крутом градиенте (1,5 ч).

Подготовка пробы

Нагрузка зависит от свойств анализируемого белка, чувствительности метода обнаружения, толщины слоя геля. Приблизительно нагрузка составляет 0,1 мг белка при слое геля толщиной 1 мм и обнаружении при помощи красителя кумасси голубого.

Порядок выполнения операций

Приготовление пластинок

Ранее применялись гели толщиной 1—3 мм, в настоящее время используют более тонкие пластины геля толщиной 0,05—0,25 мм (ИЭФ в ультратонком слое). Приготовление пластинок наглядно изображено на рис. 2.5.2.1/1 и 2.5.2.1/2. Главным при формировании слоя является сохранение целостности полимеризованного слоя при снятии верхней пластинки. Это возможно,

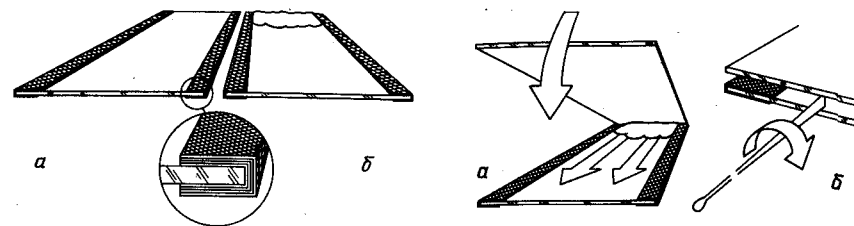


Рис. 2.5.2.1/1. Приготовление пластинок для ИЭФ:

a — оклеивание несиланизированной стеклянной пластинки по краям несколькими слоями водостойкой липкой ленты (50 мкм); *б* — нанесение порции готового к полимеризации раствора мономеров (Pharmacia, Uppsala/Schweden)

Рис. 2.5.2.1/2. Приготовление пластинок для ИЭФ:

a — размещение на слое мономеров силанизированной пластинки; *б* — разделение пластинок при помощи шпателя по окончании полимеризации (Pharmacia, Uppsala/Schweden)

если верхнюю пластинку предварительно гидрофобизировать силаном А 174 (Silan A 174, Pharmacia) или полификсом-1000 (Polyfix-1000, Desaga).

Пластинку из стекла или полиэфирного пластика промывают сильной щелочью, а затем силанизируют.

По краям другой, необработанной, пластинки наклеивают полоски липкой ленты (рис. 2.5.2.1/1, *a*).

Полимеризуют гель: запасной раствор готовят, растворяя 24,3 г акриламида и 0,75 г бисакриламида в 250 мл дистиллированной воды и добавляя 2,5 г амберлита МВ-6 при перемешивании в течение 1 ч (раствор может храниться на холоду в течение недели). Смешивают 4,5 мл запасного раствора, 0,6 мл амфолитов-носителей, 11,2 г глицерина, 9 мл дистиллированной воды, деаэрируют в вакууме, добавляют 60 мкм раствора персульфата аммония (22,8 г·л⁻¹).

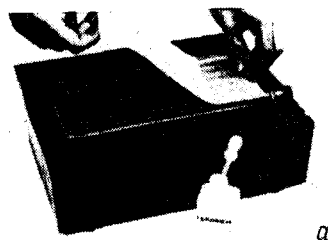
Готовый раствор выливают на край пластинки размером 230×115×0,2 мм (рис. 2.5.2.1/1, *б*) и медленно накрывают второй (силанизированной) пластинкой, вытесняя пузырьки воздуха (см. рис. 2.5.2.1/2).

Пластины удерживают некоторое время в сложенном положении с помощью зажимов, причем герметизация торцов пластинок не обязательна.

По завершении полимеризации (примерно 1 ч) зажимы удаляют, разъединяют пластины, при этом слой геля остается на верхней (силанизированной) пластинке.

Гелевые пластины используют непосредственно после приготовления или их заворачивают в пленку, например парафильм (Parafilm, American Can Company, Greenwich, СТ 06830), и хранят в течение недели в холодильнике.

Для электрофокусирования в ультратонких гелях и в гелях толщиной 1 мм производятся готовые пластины.



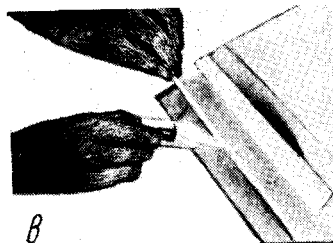
а

Рис. 2.5.2.1/3. Подготовка гелевых пластинок для ИЭФ (LKB Producter AB, Bromma/Schweden):

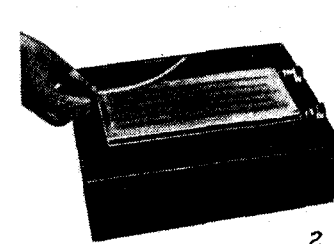
а — пластиковую пленку с тонким слоем геля помещают на тонкий слой керосина или парафинового масла на термостатирующей плите, удаляя при этом пузырьки воздуха; б — удаляют защитную пленку; в — смачивают электролитом электродные полоски (шириной 2 см); г — помещают электродные полоски на слой геля и плотно их прижимают, чтобы обеспечить хороший контакт; д — отрезают электродные полоски на 1 мм короче слоя геля



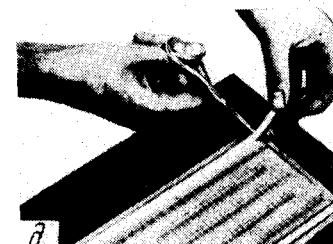
б



в



г



д

Подготовка пластинки к работе

На рис. 2.5.2.1/3 показана последовательность операций при подготовке пластинок. В табл. 2.5.2.1/1 приведен перечень электролитов для анодной и катодной камер.

Нанесение пробы

Образец наносят не обязательно в виде узкой зоны, так как эффект фокусирования действует в любом случае (этим ИЭФ отличается от других методов разделения в тонком слое). Известно несколько способов нанесения пробы (рис. 2.5.2.1/4):

при помощи прямоугольных листов фильтровальной бумаги, несущих пробу (не рекомендуется в случае ультратонких слоев геля);

Таблица 2.5.2.1/1. Электродные буферные системы для ИЭФ

Область значений pH амфолита	Анодный электролит (—)	Катодный электролит (+)
2,5—5,0	0,1 М Н ₂ SO ₄	0,3 М гистидин или 0,1 М NaOH
4,0—6,5	0,04 М глутаминовая кислота	0,2 М гистидин
5,0—8,0	То же	1 М NaOH или 0,1 М NaOH для пластинок геля длиной 230 мм
6,5—10,5	0,25 М 2-[4-(2-гидроксиэтил)-пиперазинил-1]этансульфокислота (HEPES)	1 М NaOH
3,0—10,0	0,04 М аспарагиновая кислота	То же

при помощи рамок из пластика, помещаемых на слой геля (внутри рамки вносят разбавленные растворы с пробой (до 0,3 мл); образцы можно вносить в гель как до, так и после формирования pH-градиентов; последний вариант удобен в случае фокусирования лабильных белков, так как при этом сокращается время пребывания белков в денатурирующей среде;

при помощи микропипетки в виде пятен, содержащих 10—15 мкл пробы (рекомендуется для ультратонких гелей толщиной 0,2 мм — 4 мкл).

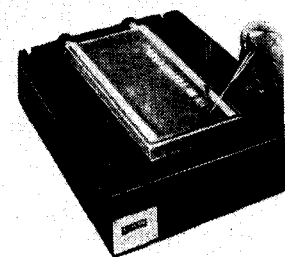
При работе с ультратонкими гелями сначала формируют pH-градиент (500 В, 3 Вт), а затем наносят образец.

Фокусирование

Подвижные электроды устанавливают таким образом, чтобы они касались электродных полосок. Напряжение поля должно соответствовать производительности системы охлаждения. В случае толстых гелей (1 мм) мощность составляет 30 Вт, в случае тонких (0,2 мм) — 6 Вт. Продолжительность разделения составляет в случае коротких пластинок (до 9 см) 1,5—2 ч.

На ультратонких гелях работают при относительно высокой мощности, что позволяет сократить продолжительность эксперимента.

Рис. 2.5.2.1/4. Способы нанесения пробы [показано три способа: при помощи прямоугольных листов бумаги, предварительно смоченных в растворе пробы, нанесение раствора в рамку (указано стрелкой) и при помощи микропипетки в виде пятен] (LKB Producter AB, Bromma/Schweden)



Положение зон отдельных белков после ИЭФ в значительной степени зависит не только от крутизны, но и от линейности рН-градиентов. Если значение рН в зоне белка известно, удается получить достоверные данные относительно значения pI белка и тем самым однозначно его охарактеризовать. Для измерения рН используют два метода:

измерение значения рН поверхностным стеклянным электродом; после измерения продолжают фокусирование, чтобы устранить действие диффузии;

применение контрольных веществ с известными значениями pI ; изоточки белков определяют путем линейной экстраполяции на основании значений pI наиболее близко расположенных контрольных веществ.

Детектирование

Фиксация белков. В качестве фиксирующих растворов применяют:

а) в обычных гелях — 5%-ю трихлоруксусную кислоту; после пятикратной замены фиксирующего раствора полностью отмываются амфолиты-носители, чье присутствие может мешать обнаружению;

б) в ультратонких гелях — 5%-ю сульфосалициловую или 10%-ю трихлоруксусную кислоту (20 мин).

Окрашивание геля (табл. 2.5.2.1/2). Известны методы окрашивания в присутствии амфолитов-носителей. Обнаружение всех белковых компонентов смеси достигают при помощи метода неспецифического окрашивания. Кроме того, используют специфические химические или иммунологические методы обнаружения.

Обесцвечивание геля проводят до полного удаления избыточного красителя (достижения прозрачного фона).

Оценка результатов анализа

Качественную оценку полученных результатов проводят визуально, количественную — при помощи сканирующего денситометра (см. разд. 2.2.4).

Источники ошибок

Наличие в образце высоких концентраций хлористого натрия или фосфатов (приводит к сильному искажению зон); присутствие трис-буфера (мешает в меньшей степени). Рекомендуется наносить образец вблизи катода или предварительно обессоливать образец (см. разд. 1.5, 1.7, и 2.1.5).

Таблица 2.5.2.1/2. Реактивы для окрашивания белков в слое геля (Smith J., *Chromatographic and Electrophoretic Technic*, Vol. 2, Heinemann, London 1976)

Краситель (концентрация)	Масса красителя на пластинку геля толщиной 1 мм	Раствор для разбавления красителя	Условия окрашивания	Раствор для обесцвечивания геля, мл
Бромфеноловый синий (0,2%-й)	0,5 г	Этанол — 125 мл Вода — 112 мл Уксусная кислота — 12 мл	1 ч, 20 °С	Этанол — 300 Вода — 650 Уксусная кислота — 50
Зеленый быстрый FCF (0,2%-й)	0,5 г	Этанол — 100 мл Вода — 100 мл Глицерин — 40 мл	3 ч, 20 °С	Этанол — 250 Вода — 700 Уксусная кислота — 50
Кумасси голубой R 250 (0,1%-й)	0,3 г	Уксусная кислота — 2 мл Метанол — 75 мл Вода — 180 мл Сульфосалициловая кислота — 9 г Трихлоруксусная кислота 30 г	15 мин, 60 °С	Этанол — 250 Вода — 650 Уксусная кислота — 80
Кумасси голубой R 250		Метанол — 65 мл Вода — 160 мл	4 ч, 20 °С	Этанол — 100 Вода — 800
1) 0,5%-й	10 мл 1%-го раствора	Уксусная кислота — 25 мл		Уксусная кислота — 100
2) 0,01%-й	2 мл 1%-го водного раствора	Сульфат меди — 250 мг		

Частичная необратимая адсорбция материала в зоне нанесения (препятствует последующему обнаружению). Рекомендуется: наносить образец в области, в которой после завершения эксперимента заведомо не образуется ни одной зоны; наносить образец в различные точки пластинки, а затем проводить фокусирование (в этом случае получают дополнительную информацию о стабильности белков в той или иной области значений рН).

Плохая растворимость образца (большинство белков растворимы при высоких концентрациях солей). Рекомендуется: добавить 1%-й глицин, так как, являясь цвиттер-ионом он повышает ионную силу, но не влияет на профиль рН-градиента.

Выпадение белков в осадок в процессе фокусирования (вследствие низкой растворимости белков в области рН, соответствующей их изоэлектрической точке). Рекомендуется: добавить в гель неионный детергент, например мочевины.

Оформление результатов

Пластинки фотокопируют во влажном или сухом состоянии. Для длительного хранения гель консервируют.

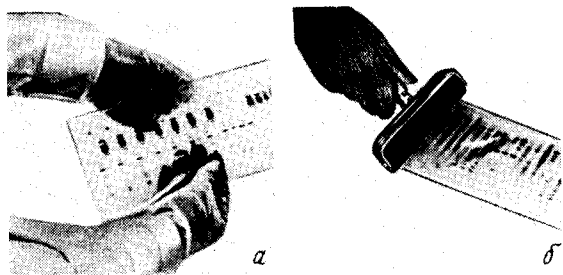


Рис. 2.5.2.1/5. Консервация готовых пластинок геля (LKB Producter AB, Bromma/Schweden):

a — гель на полимерной пленке заворачивают в прозрачную пленку; *б* — гель на стеклянной пластинке заворачивают в прозрачную пленку и высушивают

Если гель обработан правильно, он может храниться неограниченно долго. Гели на полимерной пленке консервируют следующим образом:

выдерживают в течение 1 ч в 5%-м глицерине и медленно высушивают в течение 12 ч;

заворачивают в целлофановую пленку и так хранят.

Готовые пластинки с гелем на несколько минут погружают в раствор консерванта, а затем оборачивают целлофановой пленкой (рис. 2.5.2.1/5, *a*). Самостоятельно приготовленные пластинки с гелем также заворачивают в целлофан (рис. 2.5.2.1/5, *б*). При этом пленку прижимают (прикапывают) к гелю валиком для удаления пузырьков воздуха. Упакованный гель высушивают при комнатной температуре или при 50 °С в хорошо вентилируемом сушильном шкафу.

Область применения

Анализ заряженных амфотерных веществ (главным образом белков), прежде всего в клинической химии, судебной патологии, пищевой промышленности, биохимии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.5.2.

2.5.2.2. Препаративное изоэлектрическое фокусирование

Основы метода

Препаративное изоэлектрическое фокусирование проводят в вертикальных колонках (в градиенте плотности сахарозы, глицерина, этиленгликоля) или в слое инертного материала-носителя. В качестве таких материалов используются гранулированные

гели (градиент рН формируют с помощью амфолитов-носителей). ИЭФ в гранулированных гелях характеризуется небольшой продолжительностью эксперимента; высокой нагрузкой (до нескольких граммов целевого вещества); сравнительно низкой стоимостью приборов. Кроме того, выпавший в геле осадок не мешает процессу разделения и последующего анализа. ИЭФ в колонках, хотя и сложнее в исполнении, привлекателен тем, что по завершении процесса из соответствующих фракций можно выделить целевое вещество с достаточно высоким выходом. Продолжительность процесса ИЭФ в значительной степени зависит от эффективности теплообмена. Поскольку электропроводность электролита в процессе формирования рН-градиента существенно уменьшается (по окончании процесса амфолиты-носители становятся цвиттер-ионами и уже не принимают участия в переносе заряда), охлаждение должно быть достаточно эффективным. Так как проводимость в различных областях значений рН различна, в зонах с небольшой проводимостью возможен перегрев системы и появление так называемых «тепловых пятен». Для исключения локального перегрева необходимо уменьшить напряжение на электродах. Это возможно при использовании современных источников питания, позволяющих, после того как опасность перегрева минует, проводить процесс в интенсивном режиме (при условии стабилизации напряжения).

Приборы

В колонках для ИЭФ должно быть предусмотрено выполнение следующих операций:

поддержание пониженной температуры по всей области рН-градиента;

отвод газообразных продуктов, выделяющихся на электродах; извлечение анализируемых веществ из колонки при сохранении размеров сформированных зон.

ИЭФ проводят в U-образных колонках (рис. 2.5.2.2/1).

Вначале оба колена колонки наполовину заполняют 1%-м раствором этаноламина (катодный электролит), содержащим 40% сахарозы и 1,5% амфолитов-носителей с диапазоном значений рН 3—10.

Левое колено заполняют 11-ю порциями раствора с убывающей концентрацией сахарозы (также содержащих 1,5% амфолитов-носителей). Образец (1—3 мг) растворяют в одной из промежуточных порций и вносят в систему. Суммарный объем рассчитывают таким образом, чтобы в итоге были заполнены оба колена U-образной трубки.

В левом колене сверху наносят слой (1—2 мл) 2%-й серной кислоты (анодный электролит).

Подсоединяют электроды к источнику питания и подают напряжение. С целью демонстрации эффекта разделения исполь-

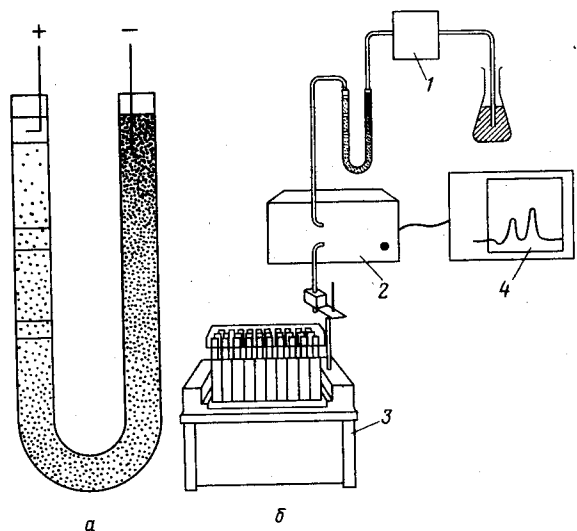


Рис. 2.5.2.2/1. Схема установки для ИЭФ в градиенте плотности в U-образной колонке (результаты эксперимента регистрируются самописцем):

a — U-образная колонка (распределение компонентов анализируемой смеси осуществляется в соответствии со значениями их изоэлектрических точек); *б* — схема установки; 1 — перистальтический насос; 2 — детектор; 3 — коллектор; 4 — самописец

зуют окрашенные белки, например гемоглобин, миоглобин и цитохром *c*.

Разделение также проводят в колонках Вестерберга и Свенсона (LKB). Схема упрощенной колонки приведена на рис. 2.5.2.2/2, *a*, схема реальной колонки — на рис. 2.5.2.2/2, *б*. Линейный градиент плотности формируют при помощи градиентного смесителя (рис. 2.5.2.2/2, *в*) путем смешения двух растворов равных объемов, но различных плотностей (разница плотностей составляет $0,1\text{--}0,2\text{ г}\cdot\text{мл}^{-1}$). По мере того как более тяжелый раствор поступает в колонку, смеситель заполняется разбавленным раствором. Поэтому общая плотность подаваемого в систему раствора постепенно уменьшается и, наконец, сравнивается с плотностью запасного раствора в резервуаре.

При ИЭФ в гранулированных гелях используют главным образом два вида материалов: гели на основе декстрана; гели на основе агарозы (для фракционирования веществ с большими молекулярными массами или клеток). Остальные материалы и приборы приведены в разд. 2.5.2.1.

Подготовка образца

Наличие в образце солей препятствует формированию рН-градиента и увеличивает продолжительность процесса. Содерж-

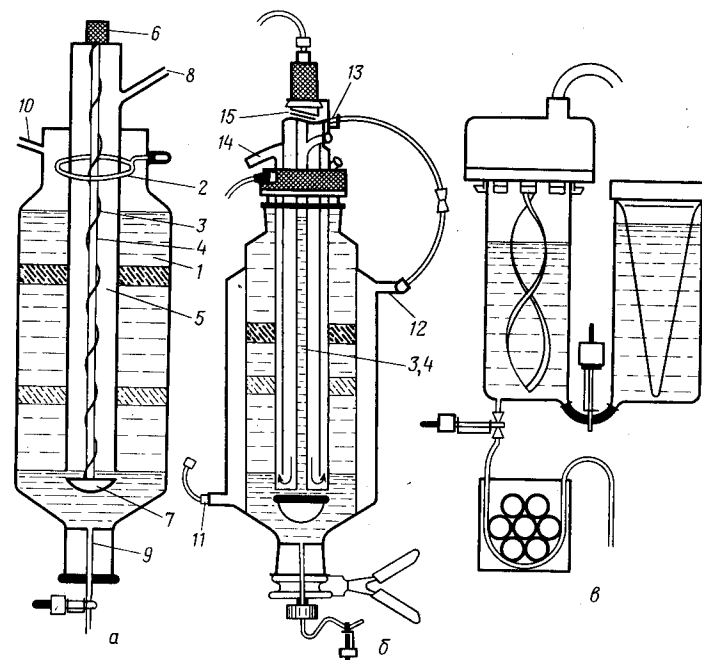


Рис. 2.5.2.2/2. Колонки для ИЭФ в градиенте плотности (LKB Producter AB, Bromma/Sweden):

a — схема упрощенной модели колонки; *б* — схема реальной колонки; *в* — градиентный смеситель для формирования в колонке градиента плотности (слева — смеситель, справа — резервуар); 1 — внешний цилиндр; 2 — верхний электрод; 3 — центральный электрод; 4 — платиновая проволока; 5 — внутренний цилиндр; 6 — верхняя клемма; 7 — уплотнитель с эластичной прокладкой; 8 — патрубок для заполнения внутреннего цилиндра; 9 — капилляр на выходе колонки; 10 — патрубок для заполнения внешнего цилиндра; 11 — отверстие для подачи охлаждающей жидкости; 12 и 13 — шланг для подачи охлаждающей жидкости в кожух внутреннего цилиндра; 14 — отверстие для выхода из системы охлаждающей жидкости; 15 — пружина, регулирующая положение уплотнителя 7

жание солей в образце не должно превышать $0,5\text{ М}$ (при работе на колонке объемом 110 мл) и $1,5\text{ М}$ (при работе на колонке объемом 440 мл). В случае необходимости образец обессоливают при помощи мембранной фильтрации (см. разд. 1.5); диализа (см. разд. 1.6); гель-хроматографии (см. разд. 2.1.5).

Порядок выполнения операций

ИЭФ в колонке

Заполнение колонки (рис. 2.5.2.2/3). Стекланный шлиф внутренней колонки и клапан 7 смазывают силиконовой смазкой. Колонку устанавливают вертикально, подключают систему охлаждения ($+4^\circ\text{C}$). При открытом клапане 7 через капилляр 9

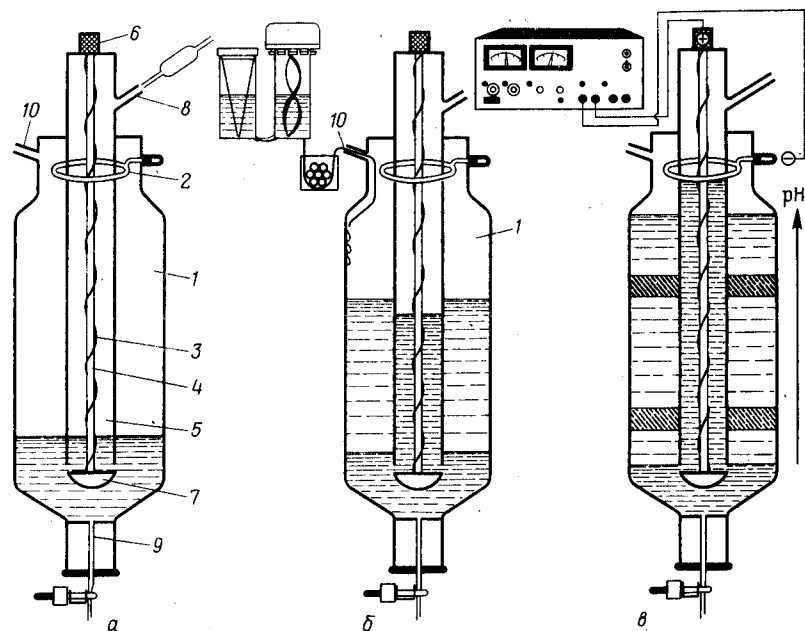


Рис. 2.5.2.2/3. Заполнение колонки (LKB, Bromma/Schweden):

а — введение электролита с высокой плотностью; *б* — формирование градиента плотности; *в* — формирование pH-градиента под действием электрического поля; 1—10 — см. рис. 2.5.2.2/2

пипеткой вводят электролит с высокой плотностью до уровня, указанного на рис. 2.5.2.2/3, *а*. Затем выполняют следующие операции:

соединяют градиентный смеситель с перистальтическим насосом;

полиэтиленовый шланг на выходе перистальтического насоса вводят через трубку 10 в колонку с тем, чтобы рабочий раствор стекал по стенке колонки (рис. 2.5.2.2/3, *б*);

смеситель и резервуар градиентного смесителя заполняют рабочими растворами с высокой и низкой плотностью; оба рабочих раствора содержат амфолиты-носители;

включают мешалку и насос; постепенно заполняют рабочим раствором (со скоростью подачи 60—120 мл·мин⁻¹) внешний цилиндр колонки 1;

наносит слой легкого электролита (в данном случае 1%-го этаноламина);

в емкость 5 помещают (подслаиванием) тяжелый электролит (0,5%-ю серную кислоту);

соединяют электроды с источником питания (рис. 2.5.2.2/3, *в*). В электрическом поле формируют рабочий pH-градиент. В ко-

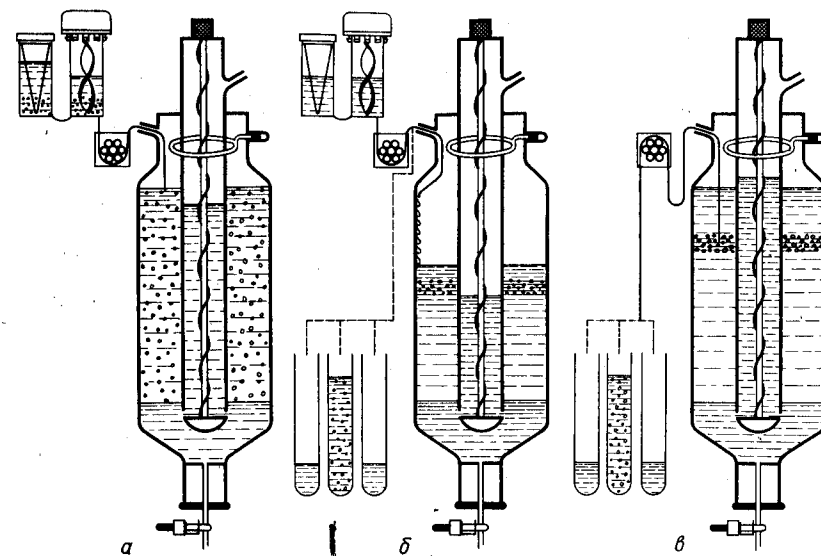


Рис. 2.5.2.2/4. Способы внесения образца (LKB, Bromma/Schweden)

лонке указанной конструкции величина pH возрастает в направлении снизу вверх.

Внесение образца. На рис. 2.5.2.2/4 схематически изображены три наиболее распространенных способа внесения образца:

образец распределяют в общем объеме рабочего раствора;

образец вносят в определенную область колонки (растворив его предварительно в соответствующей фракции рабочего раствора);

образец вносят в колонку после формирования pH-градиента.

Наиболее простым из перечисленных способов является первый (рис. 2.5.2.2/4, *а*). Этот способ используют при большой нагрузке колонки. На практике образец растворяют в тяжелом и легком растворе перед заполнением градиентного смесителя. При втором способе образец вносят в виде узкой зоны (рис. 2.5.2.2/4, *б*):

колонку частично заполняют рабочим раствором;

из шланга насоса отбирают три фракции объемом 0,5, 3 и 0,5 мл;

образец вносят в среднюю фракцию;

добавляют небольшое количество сахарозы с целью коррекции плотности в средней фракции (капля раствора средней фракции должна удерживаться на поверхности раствора в первой фракции, но опускаться на дно в третьей фракции);

содержимое средней фракции вносят в колонку;

продолжают заполнение колонки.

Способ используют в том случае, когда компоненты анализируемой смеси денатурируются в определенной области значений pH. Образец вносят в оптимальной области pH.

При третьем способе вначале формируют градиент pH, а затем вносят образец по возможности в область, соответствующую изоэлектрической точке целевого вещества (рис. 2.5.2.2/4, в): отключают источник питания;

вводят полиэтиленовый шланг в соответствующую область колонки и отбирают в три пробирки небольшие порции рабочего раствора;

образец помещают в среднюю пробирку;

проводят коррекцию плотности в средней пробирке;

содержимое средней пробирки вносят в соответствующую область колонки (скорость подачи 10—20 мл·ч⁻¹);

вновь подают напряжение и продолжают процесс до формирования узких зон разделяемых белков.

Этот способ используют при работе с неустойчивыми белками.

Проведение ИЭФ. Процесс начинают при пониженном напряжении, поскольку проводимость рабочего раствора достаточно высока. С течением времени проводимость постепенно уменьшается, напряжение в колонке постепенно возрастает. Необходимо следить за тем, чтобы в каждый момент общая мощность не превышала определенного значения. В колонках объемом 110 и 440 мл предел подаваемой мощности составляет 15 и 30 Вт, соответственно предел напряжения 1600 и 2000 В. В этих условиях продолжительность процесса составляет 10—20 ч. При ИЭФ в узком диапазоне значений pH для завершения процесса требуется больше времени.

Слив содержимого колонки (рис. 2.5.2.2/5) проводят следующим образом:

отключают источник питания, закрывают клапан 7, пипеткой отбирают электролит из внешнего цилиндра (см. рис. 2.5.2.2/5, а);

при помощи перистальтического насоса поверх раствора во внешнем цилиндре 1 помещают слой дистиллированной воды, при этом следят, чтобы в приборе не осталось пузырьков воздуха;

подсоединяют перистальтический насос к верхнему вводу 10, снимают зажим с капилляра 9;

включают насос и вытесняют рабочий раствор из колонки дистиллированной водой (скорость подачи 60—80 мл·ч⁻¹);

элюат, пропущенный через детектор 11, собирают по фракциям объемом 0,5—3 мл на коллекторе 13 (детектором может служить проточный денситометр);

при помощи стеклянного электрода определяют значения pH в каждой фракции, по полученным результатам строят график.

Детектирование. Большинство белков поглощают в УФ-области спектра, что позволяет использовать для детектирования

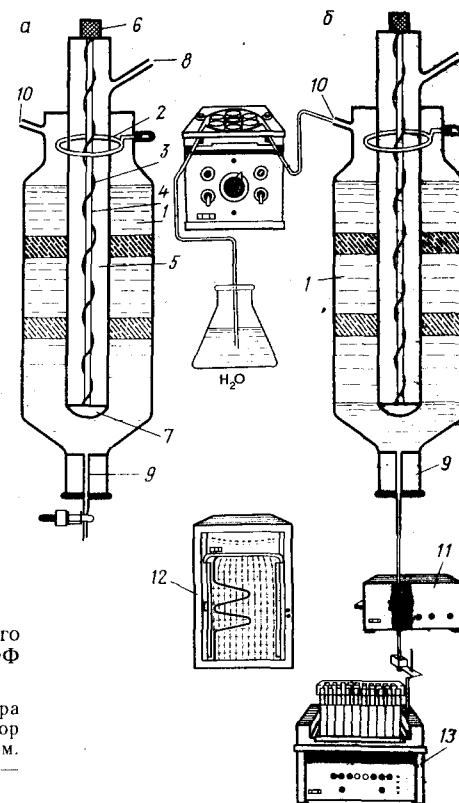


Рис. 2.5.2.2/5. Слив содержимого колонки по завершении ИЭФ (LKB, Bromma/Schweden):

а — заполнение внешнего цилиндра дистиллированной водой; б — сбор фракций на коллекторе; 1—10 см. рис. 2.5.2.2/2; 11 — детектор; 12 — самописец; 13 — коллектор

УФ-денситометр. Дополнительные сведения о составе фракций получают с помощью иммуноэлектрофореза.

Обработка фракций. Раствор целевых веществ после фракционирования содержит амфолиты-носители и вещества для поддержания высокой плотности (сахарозу, глицерин, этиленгликоль). Эти компоненты удаляют с помощью следующих методов: фракционированием по молекулярной массе — диализом (см. разд. 1.6) или гель-фильтрацией (см. разд. 2.1.5);

разделением по величине заряда — ионообменной хроматографией (см. разд. 2.1.3);

осаждением белков при помощи сульфата аммония.

ИЭФ в гранулированных гелях

Подготовка слоя геля и нанесение пробы (в соответствии с методикой фирмы LKB) показаны на рис. 2.5.2.2/6:

амфолиты-носители подбирают таким образом, чтобы значе-

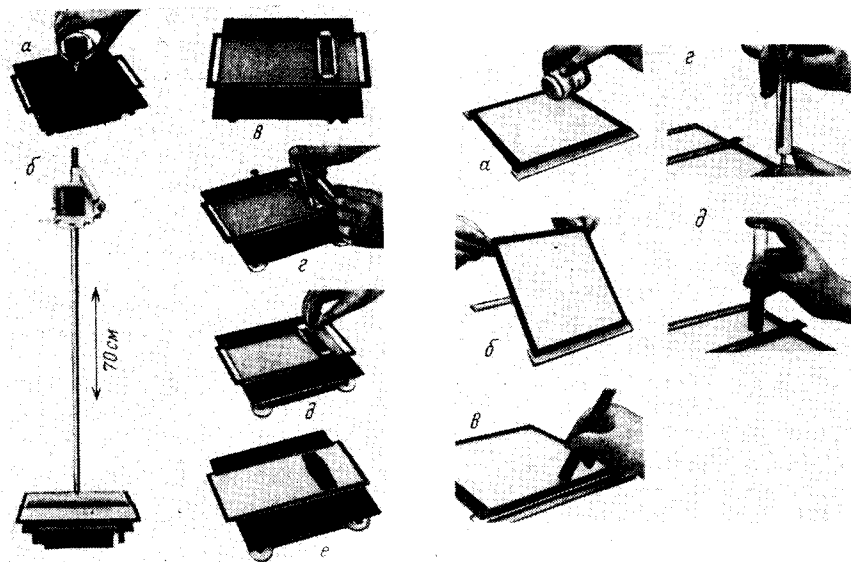


Рис. 2.5.2.2/6. Приготовление слоя геля и нанесение пробы (LKB, Bromma/Schweden):

a — суспензию выливают на пластинку; образец равномерно распределяют в общем объеме суспензии геля; *б* — слой геля слегка подсушивают феном; *в* — накладывают аппликатор; *г* — извлекают слой геля под аппликатором; *д* — смешивают порцию извлеченного геля с пробой и вновь помещают на пластинку; *е* — зона нанесения белка после удаления аппликатора

Рис. 2.5.2.2/7. Приготовление слоя геля и нанесение пробы (Pharmacia, Uppsala/Schweden):

a — суспензию геля выливают на пластинку (см. рис. 2.5.2.2/6, *a*), через тонкое сито «припудривают» влажный слой сухим сефадексом; *б* — проверяют консистенцию слоя, наклоняя пластинку под углом 45°; *в* — с противоположных сторон пластинки снимают слои геля шириной 1 см каждый (место для электродов); *г* — устанавливают аппликатор, из-под него извлекают гель и смешивают его с пробой; *д* — приготовленную смесь помещают в аппликатор

ния рН целевых веществ были равны значениям рН в середине рабочего диапазона рН;

вырезают шесть полосок бумаги по длине электродов и смачивают их раствором амфолитов-носителей; по три полоски располагают вдоль противоположных сторон слоя геля, позже на них помещают электроды;

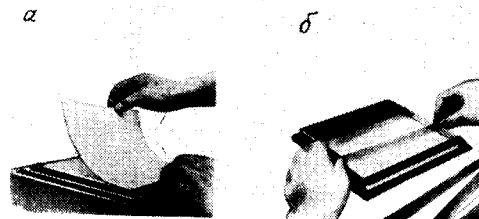
для приготовления суспензии 4 г ультрадекса (Ultradox) медленно прибавляют к 100 мл раствора амфолитов-носителей и тщательно перемешивают;

образец вносят непосредственно в суспензию геля (рис. 2.5.2.2/6, *a*); суспензию выливают на подготовленную пластинку и распределяют равномерно с помощью легкого постукивания;

слой подсушивают феном (рис. 2.5.2.2/6, *б*), доводя содержание воды в слое геля до величины, указанной фирмой- изгото-

Рис. 2.5.2.2/8. Выделение белков:

a — наложение листа фильтровальной бумаги с целью обнаружения белковых зон; *б* — разделение геля на соответствующие зоны при помощи перегородок (Pharmacia, Uppsala/Schweden)



вителем (изменение веса пластинки определяют взвешиванием). В виде узкой зоны наносят образец (рис. 2.5.2.2/6, *в—e*). Простая методика, включающая подсушивание геля, предложена фирмой Фармация. Методика предусматривает применение специального сефадекса IEF для ИЭФ (рис. 2.5.2.2/7).

Проведение ИЭФ. Электродные полосы смачивают соответствующим электролитом (см. табл. 2.5.2.1/1) и помещают на ранее подготовленную пластинку. При стабилизированной мощности 8 Вт продолжительность процесса составляет 14—16 ч, при мощности 30—60 Вт — 4—6 ч.

Детектирование. После завершения процесса анализируемые вещества обнаруживают в слое геля методом «реплики» (рис. 2.5.2.2/8, *a*). Лист фильтровальной бумаги, соответствующий размерам пластинки геля, накладывают на гель, вытесняя пузырьки воздуха между слоями. Спустя 2 мин лист бумаги осторожно снимают, высушивают и окрашивают по одной из методик обнаружения белков. Значение рН в зоне целевого белка определяют при помощи контактного электрода.

Выделение белков осуществляют следующим образом:

полоски пластика закрепляют в шаблоне (рис. 2.5.2.2/8, *б*), разделяя зоны отдельных белков (по результатам анализа методом «реплик»);

порции геля, соответствующие отдельным зонам, извлекают и помещают в колонку (небольшие количества геля помещают в шприцы с кусочком стекловаты каждый);

гели суспендируют в подходящем буфере, отделяют раствор и обрабатывают подходящим способом;

гель в колонке промывают подходящим буфером;

содержание белка в отдельных зонах определяют спектрофотометрически;

примеси (главным образом амфолиты-носители) отделяют подходящим способом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 2.5.2.

2.5.3. ИЗОТАХОФОРЕЗ (ИТФ)

Изотахореф — метод разделения различных типов ионов по их подвижности в электрическом поле. При ИТФ все виды

ионов мигрируют в одном направлении, образуя набор зон, находящихся в равновесном состоянии и перемещающихся с одинаковыми скоростями (изо — равный, тахо — скорость).

Основы метода

Методом ИТФ разделяют как катионы, так и анионы (в этом разделе речь будет идти об анионах).

Система для ИТФ состоит из трех различных электролитов, объединенных общим противоионом:

ведущий электролит, содержащий анионы с наиболее высокой электрофоретической подвижностью ($U_{\text{макс}}$), располагается в анодной области;

закрывающий электролит, содержащий анионы с минимальной подвижностью ($U_{\text{мин}}$), располагается в катодной области;

смесь электролитов анализируемой смеси, содержащая анионы с промежуточной подвижностью ($U_{\text{макс}} > U > U_{\text{мин}}$).

Как уже упоминалось, все электролиты имеют общий противоион. Если через такую систему пропустить электрический ток, то анионы расположатся последовательно в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Причем ведущий электролит — в области анода, закрывающий — в области катода, остальные — между ними в виде узких зон с четкими концентрационными границами. Этот процесс разделения ионов по подвижности идет в соответствии с законом Кольрауша:

$$\sum_i (C_i/U_i) = \text{const},$$

где C_i — концентрация ионов; U_i — электрофоретическая подвижность этих ионов.

В соответствии с законом Кольрауша сумма отношений концентрация/скорость — величина постоянная. Поскольку зоны анионов мигрируют к аноду с одинаковой скоростью, противоионы будут мигрировать в противоположном направлении, к катоду, с такой скоростью, чтобы суммарный перенос заряда через поперечное сечение капилляра в каждой точке был равен нулю (соблюдение принципа электронейтральности). Вследствие действия принципа электронейтральности в пределах каждой зоны проявляется эффект концентрирования. По мере достижения равновесного состояния концентрация анионов в зонах возрастает (зоны сжимаются).

Ширина отдельных зон (по завершении процесса) соответствует абсолютному количеству в смеси того или иного аниона (рис. 2.5.3/1).

Поскольку отдельные зоны располагаются последовательно, они фактически соприкасаются (рис. 2.5.3/2, а). Если в образец вносят буфер, содержащий анион E^- , с промежуточной (отно-

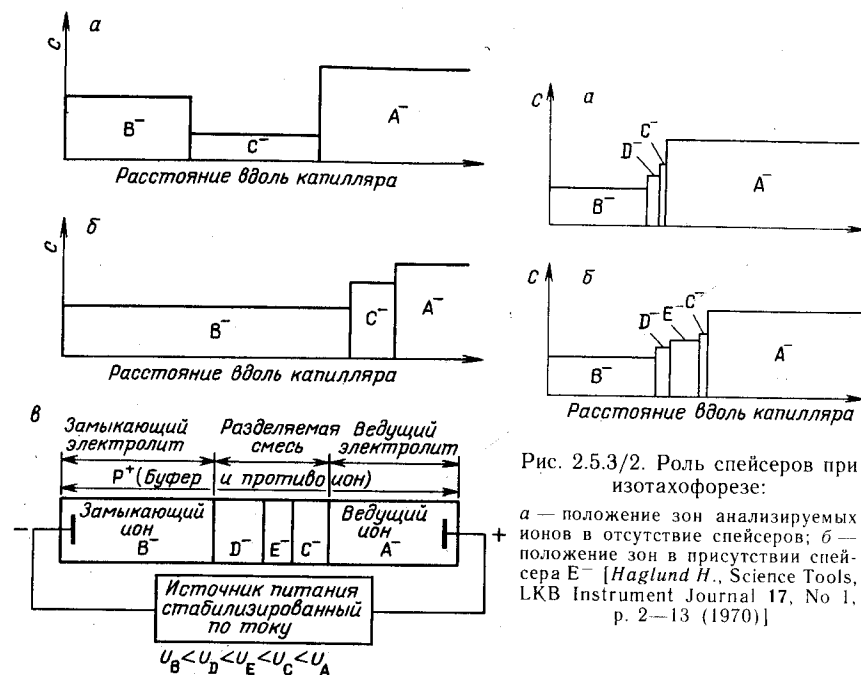


Рис. 2.5.3/2. Роль спейсеров при изотахоферезе:

а — положение зон анализируемых ионов в отсутствие спейсеров; б — положение зон в присутствии спейсера E^- [Haglund H., Science Tools, LKB Instrument Journal 17, No 1, p. 2—13 (1970)]

Рис. 2.5.3/1. Принцип изотахофереза:

а — начальное положение (проба C^- помещена в капилляр в большом объеме с низкой концентрацией между лидирующим A^- и закрывающим B^- электролитами); б — концентрирование зон; в — конечное положение зон (состояние равновесия)

сительно подвижностей D^- и C^-) подвижностью, то его зона встроится в приведенную последовательность и раздвинет зоны D^- и C^- . Такие вспомогательные ионы называют «разделителями» (спейсерами). Функции универсальных спейсеров могут выполнять амфолиты-носители, применяемые в методе ИЭФ (см. разд. 2.5.2). Особенность метода ИТФ заключается в том, что процесс сопровождается концентрированием зон, т. е. эффектом, противоположным действию диффузии. Например, когда ионы C^- попадают в зону, соответствующую ионам A^- , они попадают в область низкого градиента напряжения поля, замедляют движение, отстают и вновь попадают в зону C^- с более высоким градиентом напряжения. Напротив, когда ионы A^- диффундируют в зону C^- , они попадают в область сильного поля, движение ускоряется до тех пор, пока они не догонят зону A^- . Действие эффекта концентрирования приводит к разрешению, равному или даже превосходящему разделению при ИЭФ. Результаты разделения методом ИТФ фиксируются на ленте самописца в виде графика изменения трех параметров (рис. 2.5.3/3).

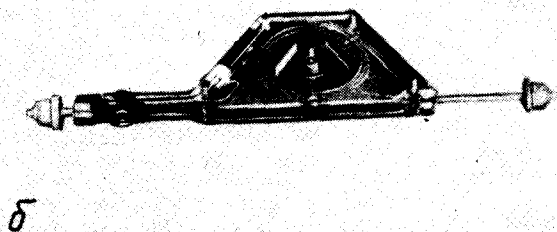
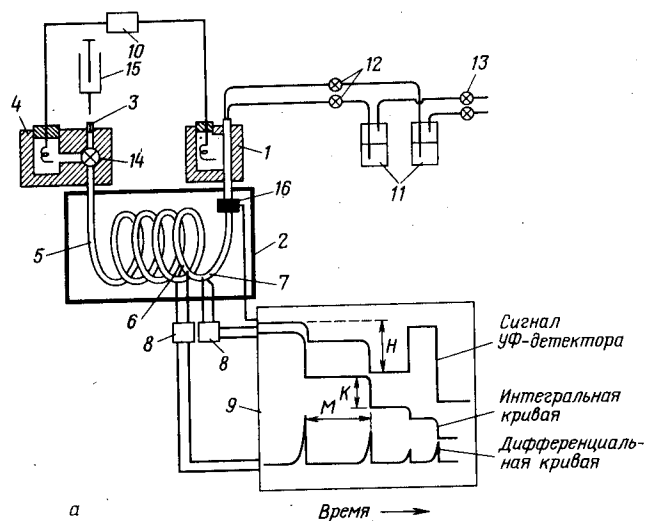


Рис. 2.5.3/3. Схема капиллярного прибора для аналитического изотахофореза: а — общая схема прибора; б — кассета с тefлоновым капилляром (внутренний диаметр 0,5 мм, длиной до 1 м), в котором осуществляется процесс разделения; 1 — электродная камера с вращающимся электродом; 2 — термостат; 3 — узел ввода пробы; 4 — камера с электродом и замыкающим электролитом; 5 — рабочий капилляр; 6 — дифференциальный термодетектор (оба конца контактируют со стенкой капилляра); 7 — интегральный термодетектор (один конец контактирует со стенкой капилляра); 8 — лента самописца; 9 — блок питания; 10 — блок питания (стабилизация по току); 11 — сосуды с запасным вращающимся электродом; 12 — кран; 13 — кран подачи воздуха под давлением (для промывания капилляра); 14 — шприц с пробой; 15 — УФ-детектор [Haglund H., Science Tools Instrument Journal 17, No. 1, p. 2—13 (1970)]

Интегральная кривая тепловыделения. Длина отрезка K соответствует разнице температур между двумя соседними зонами и служит мерой градиента напряженности поля, а значит, разницы электрофоретических подвижностей двух ионов.

Дифференциальная кривая тепловыделения. Длина отрезка M соответствует ширине зоны вещества, более того, служит мерой абсолютного количества вещества в пробе.

Кривая поглощения в УФ-свете. Длина отрезка H соответствует значению экстинкции того или иного вещества. Зная коэффициент молярной экстинкции, можно определить абсолютное содержание вещества в пробе, а следовательно, и его концентрацию в зоне.

Приборы

Аналитический ИТФ проводят в капиллярном приборе для изотахофореза, схема которого приведена на рис. 2.5.3/3. Процесс проводят в тefлоновом капилляре (с внутренним диаметром 0,5 мм). В отличие от метода ИЭФ здесь нет необходимости в наличии стабилизирующей среды.

Препаративный ИТФ проводят в колонке с полиакриламидным гелем (рис. 2.5.3/4). Компоненты анализируемой смеси под действием электрического поля мигрируют вдоль колонки 6 с полиакриламидным гелем (в направлении сверху вниз). Зоны отдельных веществ 9 разделены спейсерами. В конце процесса

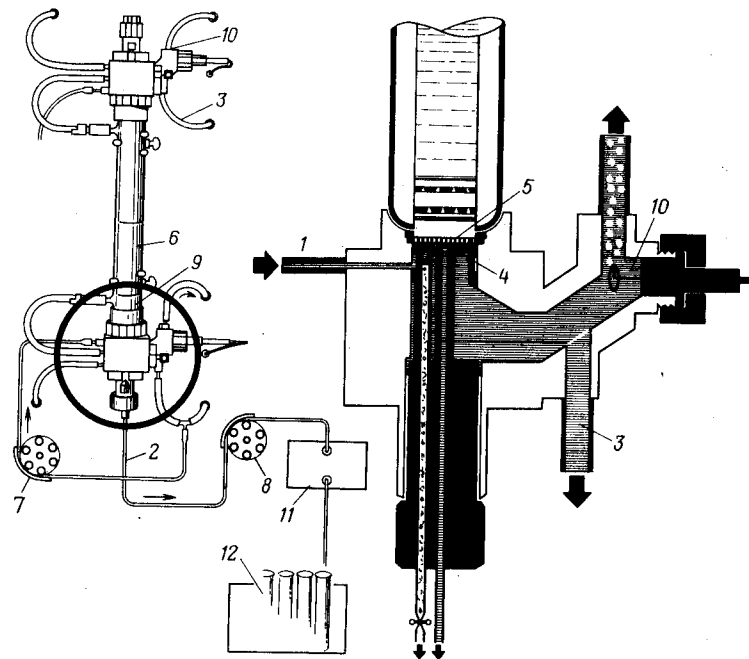


Рис. 2.5.3/4. Колонка для препаративного изотахофореза (LKB Producter AB, Bromma/Schweden):

1, 2, 3 — капилляры; 4, 5 — мембраны; 6 — колонка с полиакриламидным гелем; 7, 8 — перистальтические насосы; 9 — зоны анализируемых веществ; 10 — верхняя электродная камера; 11 — УФ-фотометр; 12 — коллектор

зоны достигают камеры элюирования (между мембранами 4 и 5). Перистальтический насос 7 через капилляр 1 подает в камеру электродный буфер со скоростью 5 мл·мин⁻¹. Второй насос 8 отбирает электродный буфер из камеры через капилляр 2 со скоростью 15 мл·мин⁻¹. Дополнительный объем буфера поступает в камеру через мембрану 4 со скоростью 10 мл·мин⁻¹. Компоненты смеси из камеры через капилляр 2 поступают в кювету УФ-фотометра 11, а затем на коллектор 12. Сигнал детектора регистрируется самописцем. При разделении электродный буфер перекачивается насосом и циркулирует через электродные камеры и резервуар с запасным раствором. Для проведения ИТФ используются высоковольтные источники питания — напряжением до 30 кВ при аналитическом ИТФ и 1,6 кВ при препаративном ИТФ, со стабилизацией по силе тока.

Подготовка образца

Образец (до 250 мг) растворяют в электролите с замыкающим ионом (или диализуют его против электролита с замыкающим ионом).

Добавляют в качестве спейсеров амфолиты-носители, например, 1 мл 40%-го раствора амфолита (рН 6—8), содержащего 3%-ю сахарозу.

В случае препаративного ИТФ слой образца помещают на поверхность геля.

Порядок выполнения операций

Подготовка препаративной колонки

Готовят раствор, содержащий 3,4%-й акриламид, 2,9%-й бисакриламид, 0,03 М уксусную кислоту.

С помощью буфера — трис-(гидроксиметил)аминометана — устанавливают в растворе рН 4.

Добавляют рибофлавин в качестве инициатора полимеризации.

Раствор заливают в колонку на мембранную прокладку (5 на рис. 2.5.3/4) и полимеризуют на свету.

Нанесение образца

На поверхность геля наносят раствор образца.

Сверху наносят слой замыкающего электролита, например 0,22 М трис-глициновый буфер, рН 8,5.

Проведение разделения

После подачи напряжения ионы разделяемой смеси (например, белки) и молекулы амфолитов-носителей располагаются в колонке в соответствии с их электрофоретической подвижностью и в такой последовательности мигрируют по колонке. На выходе колонки анализируемые вещества попадают в камеру для элюирования, откуда они вымываются буфером и направляются в детектор. Аналитическое разделение завершается в течение 40 мин (при 30 кВ), препаративное разделение начинают при 500 В и заканчивают при напряжении не более 1600 В. Сила тока при этом возрастает от 7 до 10 мА. Продолжительность препаративного разделения составляет 15—20 ч.

Выделение компонентов смеси

Полученные фракции содержат в качестве примесей ионы спейсеров и ионы буфера. Посторонние ионы отделяют методом гель-фильтрации (см. разд. 2.1.5). Фракции, содержащие целевые компоненты (белки), высушивают лиофильно (см. разд. 1.7).

Оформление результатов

Профиль ИТФ может быть получен в виде интегральной кривой тепловыделений (рис. 2.5.3/5), совмещенной с дифференциальной кривой (см. рис. 2.5.3/3, а) или в виде кривой поглощения в УФ-свете (см. рис. 2.5.3/3, а и 2.5.3/5). Кроме того, в рабочем журнале отмечают: условия полимеризации геля (при препаративном разделении); состав буфера; напряжение поля и силу тока; объем образца и тип спейсера. Например, образец — 1 мкл 4%-го раствора гемоглобина + 4 мкл разбавленного (1:50) раствора амфолитов (рН 6—8); капилляр длиной 43 см; температура 20 °С; сила тока — начальная 40 мкА, конечная 20 мкА; напряжение 21 кВ; детектирование при 254 нм; смещение сигналов термо- и УФ-детектора составляет 1 мин.

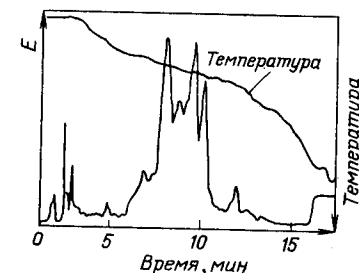


Рис. 2.5.3/5. Профиль ИТФ [Haglund H., Science Tools, LKB Instrument Journal 17, No 1, p. 2—13 (1970)]

Аналитическое разделение (мкг) пептидов, белков, нуклеотидов, органических кислот, ионов металлов (частично — изотопов) с высоким разрешением.

Препаративное разделение белков (г).

Накопление в виде узкой зоны следовых количества веществ (мкг) из больших объемов пробы — вследствие эффекта концентрирования.

Определение электрофоретической подвижности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- H. Haglund*, Science Tools, LBK Instrument Journal 17, No. 1, S. 2—13 (1970)
O. Mikes, Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods, Ellis Horwood, Chichester 1979
I. Smith, Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Bd. II, 4. Aufl., Heinemann, London 1976

2.6. ПЛАНИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА ПРИ РАЗДЕЛЕНИИ ВЕЩЕСТВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (НАПРИМЕР, БЕЛКОВ)

Процесс выделения биологически активных веществ начинается, как правило, с проведения экстракции. Последующие операции по выделению и очистке должны удовлетворять следующим требованиям:

обеспечивать быстрое отделение целевого белка от сопутствующих примесей (например, протеаз, гидролаз и др.);

обеспечивать высокую степень очистки;

допускать обработку больших объемов жидкостей.

Указанным требованиям удовлетворяют два основных технологических приема.

Осаждение целевого вещества в области его изоэлектрической точки при высокой ионной силе (например, сульфатом аммония). При этом низкомолекулярные примеси остаются в растворе.

Адсорбция на ионообменниках. При этом ионообменники используют в статическом режиме (Batch-методика), т. е. ионит в активированной форме суспендируют в растворе, содержащем целевое вещество, после достижения равновесия отделяют (фильтрованием), тщательно промывают, а затем десорбируют целевое вещество (вместе с сопутствующими белками) буфером с вы-

сокой ионной силой (или при подходящем значении рН) (см. разд. 2.1.3). На этой стадии помимо частичной очистки, в том числе и от солей, достигается также и концентрирование целевого вещества. Далее раствор белка обессоливают.

Многие белки адсорбируются (при высокой ионной силе) на гидрофобных гелях (например, октил- или фенил-сефарозе), откуда они могут быть десорбированы дистиллированной водой (см. разд. 2.1.1). Этот метод также позволяет достигнуть значительного обогащения смеси целевым веществом. Большую часть сопутствующих примесей обычно отделяют методом гель-хроматографии (см. разд. 2.1.5). Условия разделения удается оптимизировать, если известна молекулярная масса целевого вещества. После гель-хроматографии получают разбавленный раствор целевого вещества в буфере с низкой ионной силой. Следующей стадией является очистка методом ионообменной хроматографии. Условия фракционирования удается оптимизировать, если известна изоэлектрическая точка целевого вещества. При нанесении препарата на ионит компоненты смеси удерживаются матрицей, затем их элюируют избирательно в градиенте ионной силы или значений рН. Операцию замены буферного раствора (что необходимо для последующей обработки или операций контроля) осуществляют методами мембранной фильтрации (см. разд. 1.5), диализа (см. разд. 1.6) или гель-хроматографии (см.

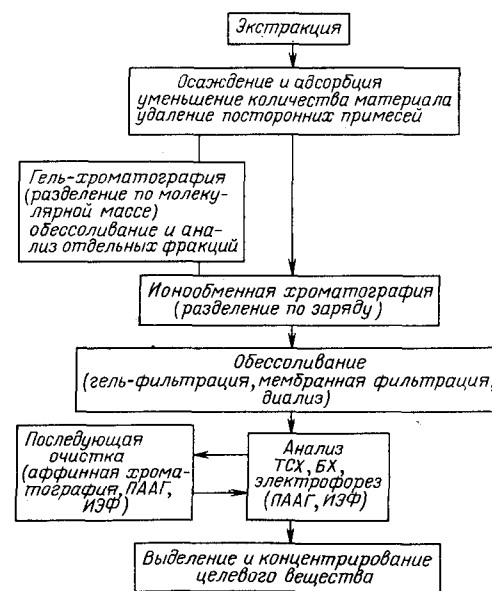


Рис. 2.6/1. Схема выделения целевого вещества из сырья биологического происхождения

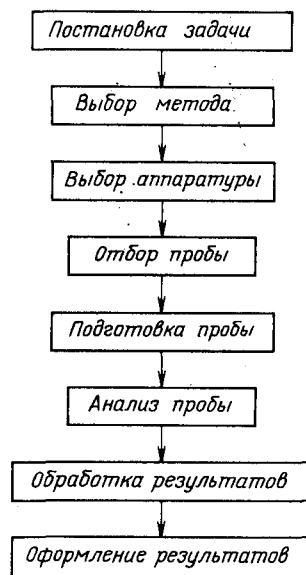
разд. 2.1.5). Способы последующей обработки или методы контроля зависят от значения молекулярной массы целевого вещества. При молекулярной массе до 3000 используют методы ТСХ или БХ, электрофоретические методы, при молекулярной массе более 3000 — электрофорез в ПААГ (см. разд. 2.5.1.3), или электрофическое фокусирование (см. разд. 2.5.2). В процессе выделения целевые вещества следует растворять преимущественно в летучих буферных растворах. Образцы хранят в замороженном состоянии (при -30°C) до последующей обработки или высушивают лиофильно (если предстоит длительное хранение (см. разд. 1.7)). Рассмотренная последовательность операций схематично представлена на рис. 2.6.1. Наряду с перечисленными методами используется и аффинная хроматография (см. разд. 2.1.4), главным образом на завершающей стадии очистки. В последнее время все более широкое применение находит метод ВЭЖХ высокого давления, главным образом для очистки низкомолекулярных веществ. При очистке и анализе биополимеров предпочтение отдается электрофоретическим методам.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Анализ органических веществ проводят при помощи качественных и количественных методов.

При идентификации веществ выбор методов анализа зависит от свойств вещества, его количества и от цели анализа.

Общая схема анализа включает следующие стадии:



Масштаб анализа определяется количеством вещества, имеющимся в распоряжении исследователя:

Масштаб метода	Масса пробы, г
Макро-	0,5—100
Полумикро-	0,01—0,5
Микро-	10^{-3} — 10^{-2}
Ультрамикро-	10^{-3}

Чувствительность метода определяется пределами обнаружения, т. е. минимальным количеством вещества, которое может быть обнаружено с достаточно высокой достоверностью.

3.1. КОНТРОЛЬ ЧИСТОТЫ ВЕЩЕСТВА

Препарат считается чистым, если он состоит из молекул одного вещества и не содержит примесей, которые могут быть обнаружены при помощи известных аналитических методов.

В органической химии вещество считается чистым, если его физические характеристики (точки плавления и кипения, показатель преломления и др.) не изменяются после повторной очистки перекристаллизацией или перегонкой. В настоящее время даже при существовании современных спектроскопических и хроматографических методов определение физических констант все еще сохраняет свое значение. В лабораторной практике контроль чистоты препаратов необходим для оценки эффективности методов выделения и очистки. Выбор методов анализа зависит от свойств целевого вещества и технических возможностей исследователя. Если примеси невозможно обнаружить химическими методами, то такой препарат относят к «химически чистым» (примеси составляют до $10^{-1}\%$), если отсутствие примесей подтверждается спектроскопическими методами, препарат относят к «спектроскопически чистым» (примеси составляют до $10^{-7}\%$).

Методы определения степени чистоты многих препаратов медицинского назначения приведены в перечне требований к фармакологическим препаратам. Химические реактивы для лабораторного применения имеют следующие квалификации: чистый (ч); чистый для анализа (чда); химически чистый (хч); особо чистый (осч).

3.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ

Температурой плавления вещества называют температуру, при которой твердая фаза переходит в жидкую, причем обе фазы находятся в равновесии и характеризуются одинаковым давлением пара. Определение точки плавления является одним из способов контроля чистоты и идентификации вещества.

При плавлении вещества, сопровождающемся разрушением кристаллической структуры, температура остается постоянной (рис. 3.1.1/1). Однако необходимо учитывать зависимость температуры плавления от давления. Определение точки плавления рекомендуется проводить при давлении 101 кПа (760 мм рт. ст.). Вместе с тем можно считать, что температура плавления не зависит от давления, так как объем образца в процессе плавления меняется незначительно (см. разд. 1.3.2, уравнение Клаузиуса — Клапейрона). Температура плавления характеризует фазовый переход от твердого состояния в жидкое. Обратный процесс характеризуется температурой затвердевания или замерзания.

Каждое чистое вещество характеризуется определенной точкой плавления. Точность определения точки плавления в обычных условиях составляет $\pm 0,5$ К. Более точное определение точки плавления проводят, как правило, при помощи графиков плавления ($\pm 10^{-2}$ К).

Смеси различных веществ по-разному ведут себя при плавлении или кристаллизации в зависимости от растворимости этих веществ или способности смешиваться. Смеси, образующие твердые растворы, не имеют резко выраженной точки плавления. Такие смеси плавятся (кристаллизуются) в интервале температур. Начальная температура интервала плавления твердого раствора находится ниже точки плавления самого легкоплавкого из компонентов этой смеси. Системы, компоненты которых, находясь в твердом состоянии, нерастворимы, называются неизомерфными смесями. В отличие от чистых компонентов большинство таких смесей плавится не при постоянной температуре, а в определенном интервале температур, который определяется составом системы. Нижний предел температуры, при которой начинается плавление системы, называется эвтектической температурой. Неизоморфная смесь кристаллов, образующихся из расплава такой смеси при эвтектической температуре, называется эвтектической смесью.

При плавлении многих органических веществ наблюдается окрашивание расплава или выделение газа. Температура, при

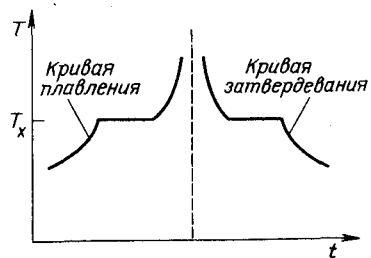


Рис. 3.1.1/1. Кривые плавления и затвердевания чистого вещества:

T — температура; T_x — температура плавления или затвердевания; t — время

которой происходят эти процессы, называется точкой разложения. Аморфные вещества и полимеры, в отличие от кристаллических веществ, не характеризуются конкретной температурой плавления, но характеризуются областью размягчения.

Существует определенная зависимость между температурой плавления вещества и его молекулярной массой. При увеличении молекулярной массы вещества его температура плавления повышается. Кроме того, существует зависимость температуры плавления от молекулярного строения вещества (например, *н*- и *изо*-алканы, *цис*- и *транс*-стереоизомеры, наличие водородных связей).

Температура плавления смешанной пробы

Определение температуры плавления смешанной пробы (исследуемого вещества и вещества с известной температурой плавления) является простым и наиболее распространенным методом проверки чистоты вещества. Этот метод применяют также для идентификации веществ (см. в разд. «Порядок выполнения операций», «Проба смешанного плавления»). В связи с тем, что данная температура плавления может соответствовать большому числу соединений, анализируемое вещество смешивают с веществом аналогичного строения в соотношении 1:1 и определяют точку плавления полученной смеси. Если смесь состоит из одного и того же вещества, то проба будет иметь резко выраженную точку плавления. Если система состоит из двух различных соединений в соотношении 1:1, то образуется эвтектика и образец будет плавиться при более низкой температуре (рис. 3.1.1/2).

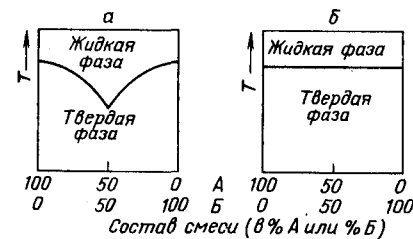
Различные вещества могут иметь одинаковые температуры плавления, однако маловероятно, что при их смешении она останется неизменной. Если температура плавления смеси ниже температуры плавления исходных веществ, то, следовательно, это два различных вещества.

Поправка на показания термометра

Поскольку температуры окружающей среды и выступающего из жидкости столбика термометра несколько различаются, необходимо внести поправку на показания термометра. Если тер-

Рис. 3.1.1/2. Диаграммы температура — состав смеси:

a — вещества А и Б различны (например, в данном случае эвтектическая точка соответствует 50%-му составу смеси); b — оба вещества идентичны



мометр заранее откалиброван, то такую поправку вводить не следует. В этом случае на термометре должна быть указана средняя температура столбика термометра, при которой проводилась калибровка. Истинную температуру рассчитывают по формуле:

$$T = T_1 + K n (T_1 - T_2),$$

где T — истинная температура; T_1 — наблюдаемая температура; T_2 — средняя температура выступающего столбика (определяют вторым термометром); K — коэффициент расширения (для ртутного термометра из иенского стекла $K = 1,6 \cdot 10^{-4}$); n — число градусов на шкале выступающего из жидкости столбика.

Более подробные данные можно найти в таблицах (см. разд. «Библиографический список»). Ниже приведены возможные ошибки в показаниях термометра в двух интервалах температур: $0,5^\circ\text{C}$ в интервале до 100°C ; $3\text{—}5^\circ\text{C}$ в интервале от 100°C до 200°C .

Приборы

Для определения точки плавления используют ряд приборов. Детальное описание некоторых из них приводится ниже.

Простые приборы

Самый *простой прибор* для определения точки плавления состоит из капилляра, закрепленного на термометре, который погружен в нагревательную баню (рис. 3.1.1/3). Равномерный нагрев осуществляется путем перемешивания теплоносителя магнитной мешалкой.

Чаще применяют *прибор Тиле*, в котором обеспечивается более равномерное распределение тепла в нагревательной бане (более эффективное перемешивание теплоносителя за счет циркуляции жидкости (рис. 3.1.1/4). В качестве теплоносителей используют прежде всего силиконовое масло, парафин или концентрированную серную кислоту.

Стандартный прибор

В *приборе Тоттоли* использованы основные элементы конструкции Тиле. Однако этот прибор обладает значительными преимуществами вследствие регулируемого электрообогрева и механического встряхивания. Прибор Тоттоли обеспечивает высокую воспроизводимость результатов и используется во многих лабораториях. Прибор применяют для определения температур плавления до 190°C . Для работы в диапазоне до 500°C применяют металлический блок (его можно использовать и при более низких температурах) (рис. 3.1.1/5). Блок состоит из медного

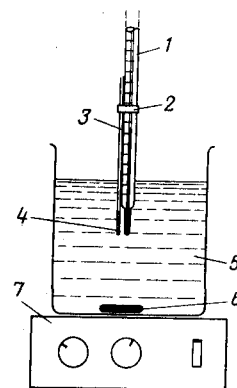


Рис. 3.1.1/3. Определение точки плавления вещества в капилляре:

1 — термометр; 2 — зажимное кольцо; 3 — капилляр; 4 — образец; 5 — нагревательная баня; 6 — магнит; 7 — магнитная мешалка

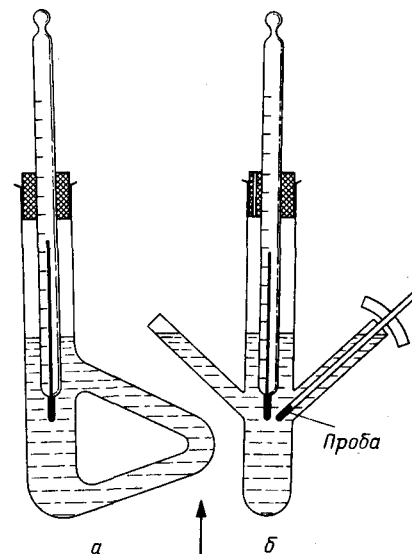


Рис. 3.1.1/4. Прибор Тиле (нагревают при помощи горелки Бунзена):

а — вид сбоку; б — вид спереди

или алюминиевого цилиндра с электрообогревом. Температура плавления, определенная в приборе Тоттоли, всегда несколько выше, чем температура, определенная в приборе с нагревательной баней. Такое несоответствие результатов объясняют тем, что скорость подвода тепла к образцу в металлическом блоке выше, чем в приборе с нагревательной баней.

Автоматические приборы

В современных приборах определение температуры плавления осуществляется автоматически с использованием светового потока в течение 10 мин. Преимуществом таких приборов является простота и удобство работы. Кроме того, регулировка скорости обогрева позволяет получить высокую воспроизводимость результатов. Прибор работает следующим образом (рис. 3.1.1/6): луч проходит через образец и попадает на фотозлемент; при плавлении образца интенсивность регистрируемого фотоэлемента светового потока возрастает; температура плавления регистрируется на цифровом табло. Перед началом измерения задают исходную температуру и устанавливают определенную скорость нагрева (например, $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ — для ориентировочного и $0,2^\circ\text{C}/\text{мин}$ — для точного измерения). Существуют также приборы, измеряющие температуру плавления и одновременно записывающие

Рис. 3.1.1/5. Металлический блок для определения точки плавления

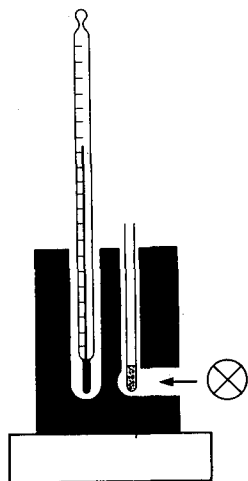
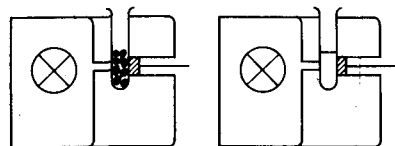


Рис. 3.1.1/6. Автоматический прибор для определения точки плавления



кривую плавления. Автоматические приборы позволяют измерять температуры плавления в диапазоне от -20 до $+300^{\circ}\text{C}$, однако они не пригодны для определения интервала плавления. Для более точного определения точки плавления используют способ погружения термоэлемента в пробу, так как при этом отсутствуют инерционные потери при теплопередаче. Но для определения точки плавления этим способом требуется значительно большее количество вещества, чем при плавлении в капилляре.

Нагревательные столы

Стол Кофлера (рис. 3.1.1/7) служит для быстрого ориентировочного определения точек плавления. Вещество равномерно распределяют на поверхности нагревательного стола, на кото-

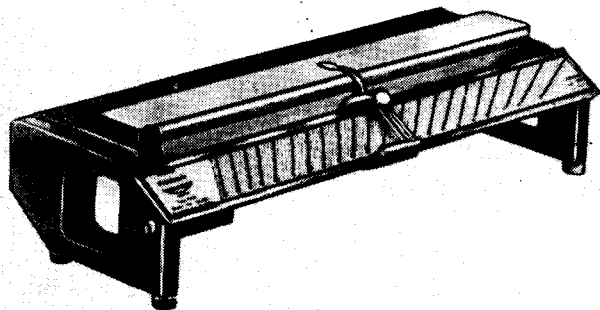


Рис. 3.1.1/7. Нагревательный стол Кофлера для определения точки плавления [Kuhnert-Brandstetter M., Sci. Pharm. 34, 147 (1966)]

рой при помощи электрообогрева устанавливают почти линейный градиент температуры. Точность определения точки плавления этим методом составляет приблизительно 2 K для диапазона температур от 50 до 250°C .

Для плавления милли- и микроколичеств веществ используют *нагревательный микростол* (до 250°C) с микроскопом. Кристалл помещают в углубление предметного стекла и закрывают покровным стеклом. Затем предметное стекло устанавливают на металлический стол с электрообогревом и в микроскоп наблюдают за процессом изменения образца.

Подготовка образца

Для определения температуры плавления при помощи капилляра требуется не более 1 мг образца, а при использовании нагревательного микростола — еще меньше.

Высушенный образец измельчают в ступке и заполняют им капилляр, который представляет собой запаянную с одного конца стеклянную трубку диаметром 1 мм и длиной $7\text{—}10\text{ см}$; открытый конец капилляра погружают в образец и кристаллы, попавшие в капилляр, стряхивают к запаянному концу. Капилляр заполняют на высоту $1\text{—}3\text{ мм}$.

Перенос вещества к запаянному концу капилляра осуществляют несколькими способами: постукивают рукой, большой и указательный пальцы которой держат капилляр, о поверхность стола, уплотняют вещество при помощи металлического стержня. Осторожно бросают капилляр в стеклянную трубку диаметром 5 мм и длиной $30\text{—}50\text{ см}$, установленную вертикально на жесткой подставке.

Порядок выполнения операций

Капилляр с образцом закрепляют при помощи резинового кольца на термометре и помещают в нагревательную баню или в соответствующее углубление прибора. В некоторых приборах предусмотрено место для трех капилляров, что позволяет проводить одновременный анализ образца и проб сравнения.

Для вещества с неизвестной точкой плавления проводят ориентировочное определение (при быстром нагреве).

В зависимости от температуры плавления скорость нагрева устанавливают $5\text{—}10\text{ K/мин}$. Незадолго до достижения температуры плавления (ниже ее на $10\text{—}20\text{ K}$) скорость нагрева соответственно понижают до $2\text{—}0,2\text{ K/мин}$ с целью уменьшения тепловой инерции системы. Таким образом достигается более точное определение точки плавления.

Температуру плавления определяют в тот момент, когда вещество начинает плавиться и образуется прозрачный расплав (рис. 3.1.1/8).

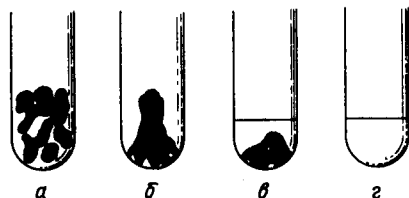


Рис. 3.1.1/8. Стадии процесса плавления:

а — нерасплавленный образец; *б* — агломерация; *в* — начало плавления; *г* — расплавленный образец

При определении области плавления измеряют температуры начала и конца плавления. При этом учитывают, что в большинстве случаев сначала наблюдается усадка вещества и образование агломерата, и только после этого начинается процесс плавления.

После окончания плавления отключают обогрев прибора. Теплоноситель перемешивают до полного охлаждения прибора.

Температуру плавления гигроскопических или сублимирующихся веществ определяют в запаянных капиллярах.

При определении точки плавления веществ, плавящихся с разложением, капилляр с веществом вносят в предварительно нагретую баню (на 10 К ниже ожидаемой точки плавления).

Определение точки замерзания

Точку замерзания или затвердевания жидкостей определяют при помощи тех же приборов, что для определения точки плавления, но при этом используют охлаждающие смеси. Для быстрого определения точки замерзания используют капилляр, закрепленный на термометре (см. разд. 4.1). Температура охлаждающей смеси должна быть на несколько градусов ниже ожидаемой точки замерзания.

«Проба смешанного плавления»

Несколько миллиграмм известного вещества смешивают с равным количеством исследуемого образца, тонко измельчают и переносят в капилляр. Затем проводят одновременное определение точек плавления всех образцов: образцов обоих чистых веществ по отдельности и образца смеси этих веществ.

Источники ошибок

Быстрый и неравномерный нагрев (плохо воспроизводимые результаты).

Процессы агломерации и разложения принимаются за плавление (ошибка в определении начала плавления).

Вещество плохо измельчено и недостаточно высушено.

При плавлении следует обращать внимание на выделение воды из гидратированных соединений.

Таблица 3.1.1/1. Температуры плавления стандартных веществ, применяемых для калибровки термометра (тройная точка плавления бензойной кислоты является базовой в международной практике при калибровке и составляет точно 122,37 °С)

Соединение	Температура плавления, °С	Соединение	Температура плавления, °С
Лед	0	Салициловая кислота	160
Бензофенон	48	3,5-Динитробензойная кислота	205
Нафталин	80	Сахарин	228
Бензойная кислота	122		

В некоторых случаях необходимо учитывать полиморфные превращения кристаллов. Разница между точками плавления различных кристаллических модификаций достигает 20 К.

Использование неотградуированного термометра (необходимо периодически проверять градуировку термометра; для этого используют соединения, приведенные в табл. 3.1.1/1).

Оформление результатов

В рабочем журнале температуру плавления, как правило, приводят в конце описания синтеза соединения, она может служить характеристикой степени чистоты исходных соединений. В случае уточнения температуры плавления в журнале отмечают новое значение (его сопровождают словом «исправлено» в скобках; также в скобках приводят данные о растворителях для перекристаллизации или о возможности разложения вещества при плавлении). В литературе используют сокращенное обозначение точки плавления $T_{пл}$, например $T_{пл} = 145\text{ °С}$ (ацетон).

Область применения

Определение точки плавления является простым и удобным приемом по сравнению с другими методами идентификации веществ. Одним из преимуществ метода является возможность использования небольшого количества вещества.

Метод используют для:

идентификации твердого вещества и получения характеристики твердого вещества для сопоставления ее с литературными данными;

проверки степени чистоты (четко выраженная точка плавления);

изучения термостабильности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

G. M. Barrow, Physical Chemistry, 3. Auflage, S. 605, McGraw-Hill, New York 1973. Deutsche Ausgabe: G. M. Barrow, Physikalische Chemie, 6. Auflage, Bohmann, Wien, und Vieweg, Braunschweig 1984

L. Kofler, W. Kofler. Thermo-Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, Verlag Chemie, Weinheim 1954
 E. L. Skau, J. C. Arthur, in: A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, Bd. 1/1, S. 287, Wiley-Interscience, New York 1959
 R. Kempf, F. Kutter, Schmelzpunkttabellen zur organischen Molekularanalyse, Vieweg, Braunschweig 1928
 W. Utermark, W. Schicke, Schmelzpunkttabellen organischer Verbindungen, Vieweg, Braunschweig 1963

3.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ КИПЕНИЯ

Температурой кипения вещества называется температура, при которой давление паров над жидкой фазой становится равным атмосферному давлению и при которой вещество из жидкого переходит в газообразное состояние. Температура кипения зависит от давления. Она является характерной константой вещества.

Физические основы метода

Зависимость температуры кипения от давления описывается уравнением Клаузиуса — Клапейрона (см. разд. 1.3.2). Если точка кипения определена при нормальном давлении (101 кПа, или 760 мм рт. ст.), то полученное значение приводят без дополнительных данных о давлении. Определение поправок температур кипения при различных давлениях для приведения их к 760 мм рт. ст. осуществляют с помощью таблиц и интерполяционных кривых (см. разд. 1.3.2).

Для чистых соединений и смесей определенного состава температура кипения является константой. Для растворов, содержащих нелетучие вещества, характерно повышение точки кипения по сравнению с чистым растворителем. Это свойство растворов находит применение в эбулиоскопии (см. разд. 3.3.1).

Точка кипения не может служить таким же надежным критерием чистоты вещества, как точка плавления, особенно для низкокипящих соединений. В связи с этим для жидких веществ рекомендуется определять показатель преломления (см. разд. 3.1.3). Для азеотропных смесей, у которых давление паров является величиной аддитивной, характерно понижение точки кипения (см. разд. 1.3.1), по сравнению с чистым веществом.

Размеры молекул и наличие межмолекулярных взаимодействий (силы Ван-дер-Ваальса, диполь-дипольные взаимодействия, водородные связи) в значительной степени обуславливают значение температуры кипения. Так, температура кипения нормальных спиртов увеличивается с ростом молекулярной массы (этанол 78 °С, *n*-пропанол 97 °С, *n*-бутанол 117 °С). Для соединений с разветвленной структурой характерны более низкие температуры кипения (например, *n*-бутанол 117 °С, *втор*-бутанол 99 °С, *трет*-бутанол 82 °С). Для простых эфиров и спиртов при одина-

ковом числе атомов углерода спирты имеют более высокую температуру кипения (например, диметиловый эфир 25 °С, этанол 78 °С). Это связано с увеличением межмолекулярных взаимодействий за счет водородных связей.

Приборы

В большинстве случаев температуру кипения определяют при очистке вещества перегонкой (при перегонке при пониженном давлении одновременно измеряют давление) (см. разд. 1.3).

Для определения температуры кипения используют *эбулиометр* (см. разд. 3.3.1). Существует ряд специальных приборов, с помощью которых можно измерить как температуру кипения, так и температуру плавления. Наряду с простыми, изготовленными собственноручно приборами, как правило, применяют приборы двух типов, описание их устройства приведено ниже.

Автоматический прибор (рис. 3.1.2/1) состоит из источника тепла и системы управления, позволяет проводить измерения в диапазоне температур от -20 до $+300$ °С. Измерение проводят следующим образом: пробирку заполняют жидкостью, помещают в нее капилляр (способствует равномерному перемешиванию при кипении); пробирку освещают снизу источником света и начинают нагревать; возникающие при кипении жидкости пузырьки отражают свет; доля отраженного света регистрируется фотоэлементом; в результате преобразований на цифровом табло высвечивается значение температуры кипения. Точность прибора в диапазоне температур 20—100 °С составляет 0,3 °С. Регулируемая скорость нагрева позволяет получить высокую воспроизводимость результатов.

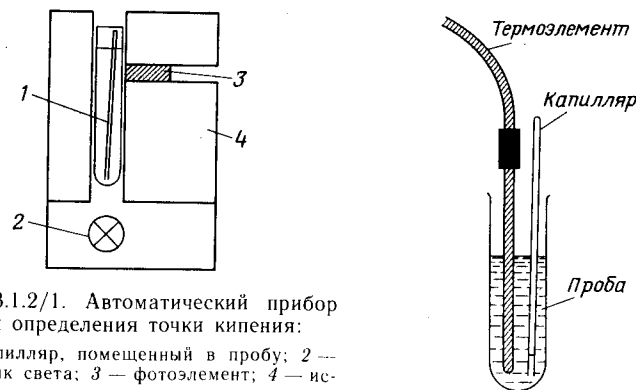


Рис. 3.1.2/1. Автоматический прибор для определения точки кипения:

1 — капилляр, помещенный в пробу; 2 — источник света; 3 — фотоэлемент; 4 — источник тепла

Рис. 3.1.2/2. Прибор с термозлементом для определения температуры кипения

В приборах других типов применяют *термоэлементы* (рис. 3.1.2/2). В жидкую пробу вносят термоэлемент, с помощью которого измеряют расход тепла при эндотермическом фазовом переходе в процессе кипения.

Порядок выполнения операций

Метод Сиволобова (необходимо более 1 мл пробы)

Пробу (2—3 капли вещества) помещают в стеклянную трубку (трубка для сжигания) размером 3—5×100 мм.

Капилляр для определения температуры плавления, заплавленный на расстоянии 5 мм от открытого конца, опускают открытым концом в пробу (для предотвращения депрессии температуры кипения).

При помощи резинового кольца трубку с капилляром закрепляют на термометре и погружают в нагревательную баню. В некоторых случаях применяют прибор Тоттоли (см. разд. 3.1.1).

Включают нагрев, нагревают до образования равномерного потока пузырьков пара из капиллярной трубки.

Температура кипения определяется по термометру в тот момент, когда при охлаждении прибора равномерная цепочка пузырьков пара обрывается.

Точность метода при повторном измерении составляет 1 К.

Метод Эмиха (необходимо менее 1 мл пробы)

Один из концов капилляра для определения точки плавления вытягивают приблизительно на 2 см (рис. 3.1.2/3, а).

Прикасаются капилляром к поверхности жидкости и засасывают капельку анализируемого вещества (рис. 3.1.2/3, б).

Осторожно заплавляют тонкий конец капилляра таким образом, чтобы в конце его под жидкостью остался пузырек воздуха (рис. 3.1.2/3, в).

Нагревают капилляр в приборе для определения точки плавления (см. разд. 3.1.1), при этом пузырек расширяется и поднимает каплю исследуемой жидкости. По достижении температуры кипения капля находится на уровне жидкости в нагревательной бане.

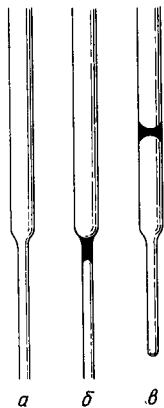


Рис. 3.1.2/3. Определение точки кипения в капилляре по Эмиху

Источник ошибок

Быстрый нагрев и перегрев.

Использование неотградуированного термометра (см. разд. 3.1.1).

Неточность при измерении давления.

Для точного определения высококипящих соединений требуется значительно больший отрезок времени. Это связано с тем, что из-за инерционности системы равновесие устанавливается медленно.

При работе с приборами для перегонки следует обращать внимание на то, чтобы шарик термометра полностью омывался парами жидкости.

Оценка результатов анализа

Критерием чистоты вещества является величина отклонения полученных результатов от литературных данных (например, более высокая температура кипения). Зависимость температуры кипения от состава смеси обсуждается в разд. 1.3.1. Другой причиной отклонений экспериментально полученных данных могут быть трудновоспроизводимые условия анализа.

Оформление результатов

В литературе используют обозначение точки кипения $T_{\text{кип}}$: найдено — $T_{\text{кип}}^2 = 124^\circ\text{C}$; лит. — $T_{\text{кип}}^2 = 122^\circ\text{C}$.

Это означает, что экспериментально полученная температура кипения 124°C и температура кипения, указанная в литературных источниках, 122°C измерены при давлении 2 кПа. Данные о давлении не приводят, если измерение проводили при нормальном давлении (101 кПа, или 760 мм рт. ст.).

Область применения

Определение константы жидкого вещества.

Идентификация жидкостей.

Постоянный контроль за процессом перегонки. Несмотря на значительную зависимость температуры кипения от давления, она является важной физико-химической характеристикой вещества.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

G. M. Barrow, Physical Chemistry, S. 512, McGraw-Hill, New York 1973.— Deutsche Ausgabe: G. M. Barrow, Physikalische Chemie, Bohmann, Wien und Vieweg, Braunschweig, 6. Auflage 1984

3.1.3. РЕФРАКТОМЕТРИЯ

При прохождении светового луча через поверхность раздела двух сред он отклоняется от первоначального направления, т. е. преломляется. Величина угла отклонения зависит от концентрации и температуры вещества. Угол падения и преломления связаны соотношением, которое называется показателем преломления. Метод измерения показателя преломления называется рефрактометрией.

Физические основы метода

Если монохроматический луч проходит через поверхность раздела двух сред, то одна часть света отражается от поверхности раздела, а другая часть проходит через вторую среду, изменяя при этом скорость и направление. Эту часть монохроматического света называют «преломленным» светом. Отношение скоростей распространения света в обеих средах называют относительным показателем преломления n_{12} . Преломление луча света описывается законом Снеллиуса (рис. 3.1.3/1):

$$\sin \alpha_1 / \sin \alpha_2 = n_{12} = c_1 / c_2 = n_1 / n_2,$$

где α_1 — угол падения; α_2 — угол преломления; n_{12} — относительный показатель преломления (для перехода световой волны из среды 1 в среду 2); n_1 — абсолютный показатель преломления среды 1; n_2 — абсолютный показатель преломления среды 2; c_1 — скорость распространения света в среде 1; c_2 — скорость распространения света в среде 2.

В большинстве случаев при измерении показателей преломления в качестве стандартной среды используют вакуум. Отношение скорости света в вакууме к скорости света в данной среде называют абсолютным показателем преломления этой среды. Абсолютный показатель преломления среды 1 находят по формуле:

$$n_1 = c / c_1.$$

В некоторых случаях абсолютным считают показатель преломления, рассчитанный по отношению к воздуху, что не является большой ошибкой, так как нет существенной разницы при распространении электромагнитной волны в воздухе и в вакууме (в некоторых источниках эту

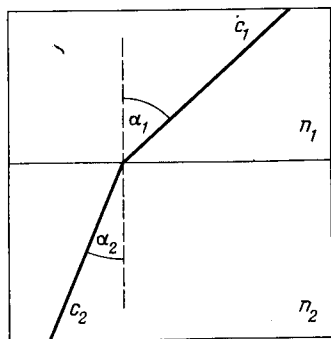


Рис. 3.1.3/1. Графическое изображение закона Снеллиуса

величину называют относительным показателем преломления, отнесенным к воздуху). Показатель преломления среды по отношению к воздуху на 0,03% меньше абсолютного показателя преломления по отношению к вакууму. Измерение показателя преломления проводят в монохроматическом свете с известной длиной волны, например выбирают спектральную линию желтого натриевого пламени (D-линия, $\lambda = 589,3$ нм) или три спектральные линии водорода (H_α , $\lambda = 656,3$ нм; H_β , $\lambda = 486,1$ нм; H_γ , $\lambda = 434,1$ нм). Длину волны или спектральную линию, при которой был измерен показатель преломления, обозначают соответствующим индексом, например: n_D , n_α , n_β , n_γ .

Значение показателя преломления практически не зависит от давления, и, следовательно этим параметром можно пренебречь. В то же время показатель преломления в значительной степени зависит от температуры. Показатель преломления органических жидкостей уменьшается при увеличении температуры. При необходимости измерения показателя преломления с высокой точностью (до четвертого знака после запятой) следует поддерживать температуру среды с точностью до $\pm 0,2^\circ\text{C}$ при помощи термостатирования.

Мольная рефракция

Для вычисления мольной рефракции R по измеренному показателю преломления и известным плотности и молекулярной массе вещества применяют уравнение Лоренца — Лоренца (размерность $R = \text{м}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$):

$$R = (n^2 - 1) M / [(n^2 + 2) \rho].$$

Электронная поляризация возникает в результате упругого смещения электронных облаков относительно поля ядер, она является частью общей поляризации молекулы. Мольная рефракция прямо пропорциональна поляризуемости электронного облака молекулы α_E :

$$R = (4\pi/3) N_0 \alpha_E,$$

где R — мольная рефракция; N_0 — число Авогадро ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$); α_E — поляризуемость электронного облака, м^3 .

Мольная рефракция является аддитивной величиной, складывающейся из атомных или ионных рефракций, а также инкрементов кратных связей. Эти величины можно найти в таблицах. Сравнение рассчитанной и полученной с помощью показателя преломления мольных рефракций позволяет сделать ряд предположений о стереохимическом строении вещества.

Определение концентрации веществ в растворе

Показатель преломления зависит от концентрации вещества в растворе, и поэтому рефрактометрию используют также для

определения концентрации компонентов бинарной смеси по уравнению:

$$P_1 = 100[(n-1)/\rho - (n_2-1)/\rho_2] / [(n_1-1)/\rho_1 - (n_2-1)/\rho_2],$$

где n — весовой процент компонента 1; n_1, n_2 — показатели преломления чистых соединений 1 и 2; ρ_1, ρ_2 — плотности чистых соединений 1 и 2; n — показатель преломления смеси; ρ — плотность смеси.

Приборы

Показатели преломления измеряют при помощи рефрактометров. Стандартным рефрактометром является *прибор Аббе*. Основные элементы такого прибора — измерительная и освещающая призмы, элементы микроскопа, термостат и источник света (рис. 3.1.3/2). Приборы, используемые в лаборатории, позволяющие измерять показатели преломления в интервале температур от 0 до 80 °С. Рефрактометры специального назначения работают в интервале от 0 до 200 °С. Эти приборы находят широкое применение в промышленности.

Для определения непрерывно изменяющегося показателя преломления движущегося потока жидкости разработаны *проточные рефрактометры*. Такие приборы позволяют производить измерение, не нарушая хода реакции, например при повышенном

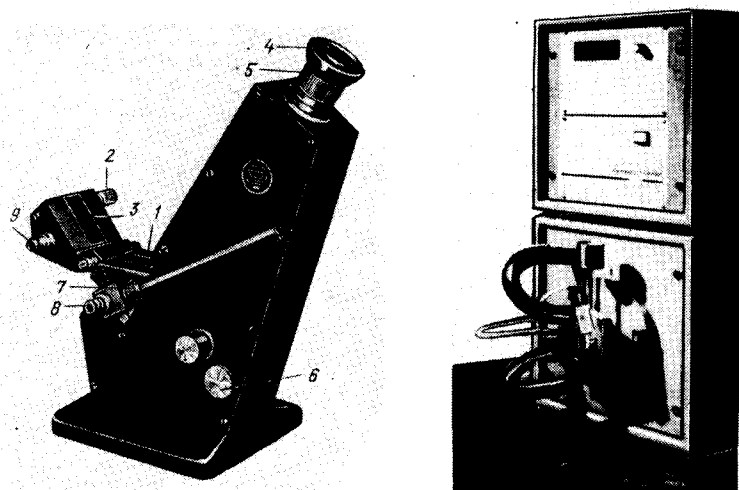


Рис. 3.1.3/2. Рефрактометр Аббе:

1 — измерительная призма; 2 — регулировочная ручка; 3 — освещающая призма; 4 — окуляр; 5 — рифленое кольцо для регулировки резкости; 6 — осушительный патрон; 7 — патрон с резьбой для термометра; 8, 9 — патрубки для присоединения термостата

Рис. 3.1.3/3. Автоматический рефрактометр с цифровой индикацией (позволяет регистрировать показатель преломления как одного, так и нескольких соединений)

или пониженном давлении. При помощи рефрактометра Аббе определяют показатели преломления в интервале 1,2—1,8. Значения показателей преломления большинства органических жидкостей лежат в интервале 1,3—1,7.

В современных приборах (рис. 3.1.3/3) измерение показателя преломления осуществляется *автоматически с использованием электронного блока управления*. Значение показателя преломления регистрируется на цифровом табло с одновременным пересчетом на нормальные условия ($t=20\text{ °С}$, $p=101,32\text{ кПа}$). Для контроля качества пищевых продуктов применяются специальные погружные рефрактометры.

Широкое применение получили *рефрактометры с источником монохроматического света*. Для ахроматизации* границы полного внутреннего отражения в таких приборах используется компенсатор дисперсии, устраняющий разложение границы на цветовые полосы, мешающие наблюдению. Компенсатор сводит все лучи в одну полосу поля зрения, соответствующую границе преломления для D-линии натрия.

Порядок выполнения операций

Чаще всего определение показателя преломления проводят с помощью рефрактометра Аббе:

с помощью термостата устанавливают требуемую температуру (например, 20 °С);

источник дневного или электрического света направляют на светоприемник;

поднимают освещающую призму и наносят с помощью стеклянной палочки 2—3 капли анализируемой жидкости на горизонтальную поверхность измерительной призмы; толщина слоя анализируемой жидкости между призмами должна составлять 0,1 мм (для равномерного распределения пробы по всей поверхности рекомендуется несколько раз поднять и опустить освещающую призму) (рис. 3.1.3/4);

опускают освещающую призму, систему термостатируют, вращают регулятор до тех пор, пока граница полного внутреннего отражения в поле зрения не станет резкой; границу, освобожденную от цветового ореола, совмещают с точкой крестообразного пересечения линий (рис. 3.1.3/5) и считывают результат измерения со шкалы прибора;

показатель преломления определяют по верхней шкале с точностью до четвертого знака после запятой; содержание сахара в растворах определяют по дополнительной шкале, расположенной в нижней части прибора;

* Ахроматизацией называют преломление светового луча без разложения на цвета.

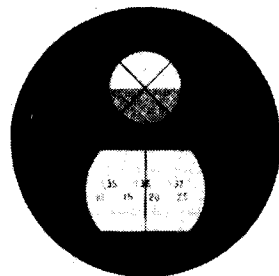
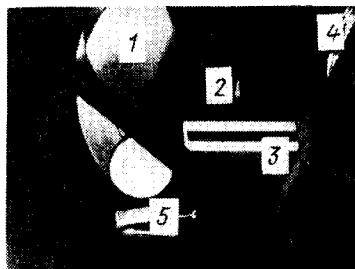


Рис. 3.1.3/4. Нанесение образца в рефрактометр Аббе:

1 — освещающая призма; 2 — анализируемая жидкая проба; 3 — измерительная призма; 4 — ручка компенсатора; 5 — щиток измерительной призмы

Рис. 3.1.3/5. Поле зрения рефрактометра Аббе (показатель преломления равен 1,3610)

после завершения измерений тщательно очищают поверхность призм мягкой бумажной салфеткой, смоченной в эфире или ацетоне.

Показатель преломления летучих и легкоокисляющихся жидкостей измеряют с помощью проточных кювет, объем которых составляет приблизительно 1,5 мл.

Показатель преломления твердых веществ и синтетических смол определяют в отраженном свете. В этом случае контрастность значительно хуже, чем при измерении в проходящем свете. Для измерения показателя преломления прозрачных тел на поверхность измерительной призмы рефрактометра наносят каплю жидкости с показателем преломления, большим, чем у измеряемого тела (как правило, монобромнафталин). Затем плотно прикладывают полированную плоскую поверхность измеряемого тела, причем освещающая призма остается открытой. Показатель преломления сильноокрашенных жидкостей определяют также в отраженном свете, нанося вещество прямо на поверхность измерительной призмы. Если температура плавления вещества находится в диапазоне температур, регулируемых термостатом, то измеряют показатель преломления вещества в расплавленном состоянии.

Источники ошибок

Испарение жидкости. Рекомендуется: измерение проводить быстро; пробу вводить пипеткой в предусмотренный в приборе канал без подъема осветительной призмы; применять проточную кювету.

Количество пробы меньше требуемого, вещество легколетучее (граница в поле зрения размыта).

Таблица 3.1.3/1. Показатель преломления дистиллированной воды при различных температурах

Температура, °C	n_D	Температура, °C	n_D
15,0	1,33339	25,0	1,33250
20,0	1,33299	30,0	1,33194

Прибор плохо отрегулирован. Рекомендуется: отградуировать прибор по дистиллированной воде (табл. 3.1.3/1) или по прилагаемой к прибору градуировочной пластинке.

Оформление результатов

Ориентировочное определение показателя преломления проводят при комнатной температуре без термостатирования. Точное измерение проводят при термостатировании. Если в литературе при показателе преломления не указана температура, при которой проводили измерение, то, значит, измерение проводили при 20 °C. Полученные результаты записывают следующим образом: $n_D^{\text{температура, } ^\circ\text{C}}$ для длины волны, нм. Например, для хлороформа: $n_D^{20} = 1,4486$, $n_a^{20} = 1,4459$, $n_g^{20} = 1,4509$, $n_v^{20} = 1,4601$.

Область применения

Для анализа и исследования твердых веществ, но особенно часто при изучении жидких и растворимых соединений (в большинстве случаев для жидких веществ наряду с точкой кипения в качестве константы приводят показатель преломления; определение показателя преломления является простым и удобным методом анализа небольших количеств вещества. Точность метода составляет $\pm 10^{-4}$).

Для идентификации веществ.

Для контроля чистоты веществ.

Для количественного анализа бинарных смесей (при работе на специальных рефрактометрах результат измерения считывают со шкалы прибора, кроме того, используют калибровочную кривую).

Для определения растворимости.

Для рефрактометрического детектирования веществ в жидкостной хроматографии (см. разд. 2.3.3).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- E. Asmus, in: Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 3/2, S. 407, Thieme, Stuttgart 1955
 Firmenschrift, Abbe-Refraktometer, Fa. Zeiss, Oberkochen 1978
 H. J. Höfert, in: Ullmann, Enzyklopädie der technischen Chemie, Bd. 2/1, S. 480, Urban Schwarzenberg, München 1961
 W. A. Roth, F. Eisenlohr, F. Löwe, Refraktometrisches Hilfsbuch, de Gruyter, Berlin 1952

3.2. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРОЕНИЯ ВЕЩЕСТВА

3.2.1. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Спектроскопия — это раздел оптики, в котором исследуется зависимость интенсивности (или энергии) поглощения, испускания и рассеяния или иного преобразования света (излучаемого или поглощаемого возбужденными электронами, целыми молекулами или ее частями) от длины волны.

Физические основы метода

Химическое соединение, подвергаемое воздействию электромагнитного излучения, может вступать во взаимодействие с излучением. При этом излучение различных длин волн поглощается этим веществом в большей или меньшей степени. Это явление используется в абсорбционной спектроскопии. На практике применяют различные области электромагнитного спектра. В зависимости от практического применения каждая спектральная область получила свое название. Общая схема областей электромагнитного спектра приведена на рис. 3.2.1/1.

Основные понятия и соотношения:

$$\bar{\nu} = 1/\lambda,$$

где $\bar{\nu}$ — волновое число, м^{-1} ; λ — длина волны, м.

$$\nu = C/\lambda = C\bar{\nu},$$

где ν — частота, с^{-1} , Гц; C — скорость света ($3 \cdot 10^8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$).

Частота полосы спектра поглощения связана с разностью энергий ΔE возбужденного и основного состояний:

$$\Delta E = h\nu = E_{\text{возб}} - E_{\text{осн}},$$

где $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Дж} \cdot \text{с}$ (квант действия Планка).

Следовательно, чем меньше частота и, соответственно, разность энергий, тем больше длина волны. Общая характеристика раз-



Рис. 3.2.1/1. Области электромагнитного спектра

Таблица 3.2.1/1. Взаимосвязь между видом возбуждения, длиной волны и энергией для некоторых спектроскопических методов

Длина волны	Энергия, кДж	Название метода	Вид возбуждения
200—350 нм	600—340	Ультрафиолетовая (УФ) спектроскопия	Возбуждение валентных электронов
350—800 нм	340—150	Спектроскопия видимого света	То же
1—300 мкм	150—0,4	Инфракрасная (ИК) спектроскопия	Колебания молекул
см — м	$1 \cdot 10^{-6}$	Ядерный магнитный и электронный парамагнитный резонансы (ЯМР и ЭПР)	Взаимодействие спинов ядер и электронов с внешним магнитным полем

личных спектроскопических методов приведена в табл. 3.2.1/1. Спектр поглощения получают путем графического изображения зависимости степени поглощения от частоты, волнового числа или длины волны излучения.

Масс-спектрометрия занимает особое положение среди спектрометрических методов. В некотором смысле этот метод не является спектроскопическим, так как вещество при анализе не подвергается воздействию электромагнитного излучения. Однако из-за сходства графического изображения масс-спектров с другими спектрами этот метод получил свое название.

Приборы

В настоящее время для получения спектров поглощения применяют, как правило, *двухлучевые спектрометры*. Пучки монохроматического излучения проходят параллельно через кюветы, заполненные чистым растворителем и исследуемым веществом. Оба луча попадают в приемник, где сравниваются их интенсивности излучения. Общая схема устройства абсорбционного спектрометра приведена на рис. 3.2.1/2.

Область применения

Области применения наиболее важных спектроскопических методов:

инфракрасная спектроскопия (ИК) — исследование функциональных групп, структурные исследования основной цепи молекулы;

ультрафиолетовая (УФ) и видимая спектроскопия — исследование соединений с ненасыщенными связями или поляризуемыми группами;

спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) — исследование строения молекул, содержащих определенные атомы (Н, С, Р, F и т. д.);

3.2.2.1. Инфракрасная спектроскопия (ИК)

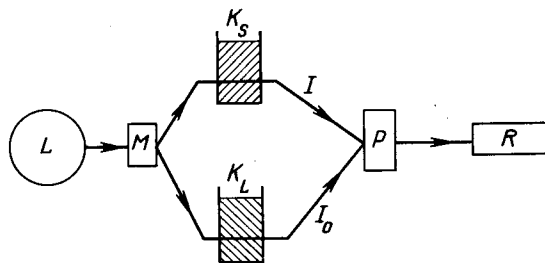


Рис. 3.2.1/2. Схема двухлучевого спектрометра:

L — источник излучения (штифт Нернста или ртутная лампа для инфракрасного излучения, лампа накаливания с вольфрамовой нитью для видимого излучения, водородная газоразрядная лампа для УФ-излучения); M — монохроматор (дифракционная решетка или призма) с щелью для регулирования интенсивности излучения, генерирует монохроматический свет с длиной волны λ с интенсивностью I_0 ; K_S — кювета с исследуемым раствором (поглощение энергии исследуемым раствором приводит к уменьшению интенсивности излучения I); K_L — кювета сравнения, заполненная чистым растворителем; P — фотоэлементы сравнения; R — блок регистрации (графической, оптической и цифровой)

спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) — определение радикалов;

дисперсия оптического вращения (ДОВ) и круговой дихроизм (КД) — стереохимические исследования молекул;

масс-спектрометрия — структурные исследования, определение молекулярной массы.

Современные спектроскопические методы являются основными при установлении строения вещества. Преимуществом спектроскопии является возможность проведения анализа за относительно короткий промежуток времени на небольшом количестве вещества.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- C. N. Banwell, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw-Hill, New York 1973
 R. Borsdorf, M. Scholz, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Vieweg, Braunschweig 1974
 C. J. Cresswell, *Spectral Analysis of Organic Compounds*, Burgers, Minneapolis 1972
 E. Fahr, M. Mitschke, *Spektren und Strukturen organischer Verbindungen*, Verlag Chemie, Weinheim 1979
 G. Gauglitz, *Praktische Spektroskopie*, Attempto Verlag, Tübingen 1983
 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart 1984
 A. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Wiley, New York 1974
 G. H. Schenk, *Absorption of Light and Ultraviolet Radiation, Fluorescence and Phosphorescence Emission*, Allyn and Bacon, Boston 1973
 D. H. Williams, F. Fleming, *Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung*, Thieme, Stuttgart 1979

Когда электромагнитное излучение с волновыми числами от 5000 до 200 см^{-1} (инфракрасный свет, тепловое излучение) поглощается химическим соединением, происходят изменения колебательных и вращательных движений молекулы. Поглощенная энергия вызывает изменение длины связей и величины валентного угла молекулы при наличии в этой молекуле поляризованных связей. Поскольку молекулы состоят из атомов различной электроотрицательности, в них возникает неравномерность распределения электронной плотности, вследствие чего в отдельных структурных элементах молекулы возникают дипольные моменты. При поглощении ИК-излучения каждое возбужденное колебание ведет к периодическому изменению диполя.

Известно, что в молекуле с N атомами возможно $(3N-6)$ колебательных степеней свободы. Колебания молекулы, сопровождающиеся изменением длины связи, называются валентными колебаниями, а сопровождающиеся изменением величин валентных углов — деформационными (рис. 3.2.2.1/1).

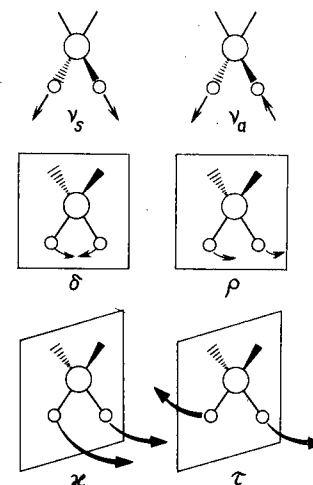


Рис. 3.2.2.1/1. Валентные колебания (v_s — симметричные, v_a — антисимметричные) и деформационные колебания метильной группы в плоскости (in plane) [δ — ножничные (scissoring), ρ — маятниковые (rocking)], вне плоскости (out of plane) [χ — веерные (wagging); τ — крутильные (twisting)] [Scheinmann F., Ed., *An Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds*, Vol. 1., Pergamon Press, Oxford 1974, Fig. 6, p. 116]

Значения волновых чисел собственных или нормальных колебаний молекулы зависят главным образом от двух факторов, а именно — массы колеблющихся атомов и силы взаимодействия между ними. При определении строения вещества чаще всего исследуют поглощение излучения с волновыми числами от 3000 до 400 см^{-1} (длина волны 2,5—25 $\mu\text{м}$). Весь диапазон ИК-излучения подразделяют на три области: близкая ИК-область лежит между 13000 и 4000 см^{-1} ; средняя ИК-область — между 4000 и 200 см^{-1} ; далекая ИК-область — между 200 и 10 см^{-1} .

В ИК-спектроскопии, в отличие от других спектроскопических методов, при построении графика на оси ординат откладывают не степень поглощения, а степень пропускания в процентах. Следовательно, минимум на графике соответствует максимуму поглощения.

В современной органической химии часто используют сочетание ИК-спектроскопии с различными хроматографическими методами (подобно хромато-масс-спектрометрии). В качестве примера можно привести применение ИК-спектроскопии в газовой и тонкослойной хроматографии (см. разд. 2.2 и 2.4).

Приборы

Наиболее распространены *двухлучевые спектрометры с дифракционным монохроматором* (см. разд. 3.2.1). Прибор устроен так, что поглощение, общее для обоих каналов, не регистрируется в результате компенсации лучей.

Наряду с простыми спектрометрами используются также регистрирующие *автоматизированные ИК-спектрометры с компьютерным управлением*. Применение компьютерной техники в современных приборах значительно упрощает проведение анализов в ИК-спектроскопии.

В настоящее время все большее применение находят *Фурье-спектрометры*. Работа этих приборов основана на интерференционном принципе. Снятие спектра с помощью Фурье-спектрометра осуществляют в два приема: сначала регистрируют интерферограмму излучения, а затем после Фурье-преобразования интерферограммы вычисляют спектр.

Материалы, используемые для изготовления кювет, должны обладать высокой пропускающей способностью в ИК-области. Такими материалами являются соли: хлорид натрия, бромид калия, нитрид цезия и фторид кальция. Наиболее широко используется хлорид натрия. Ввиду высокой гигроскопичности указанных материалов кюветы хранят в герметичных контейнерах. Кристаллический кварц, непрозрачный в области от 4,5 до 45 $\mu\text{м}$, не используют.

Приготовление образцов

В ИК-спектроскопии используют различные методики подготовки образцов для анализа, выбор которых в первую очередь зависит от агрегатного состояния и растворимости пробы. Необходимое для анализа количество вещества зависит от способа подготовки образца и составляет в среднем от 2 мг до 1 мкг. Концентрацию вещества в пробе выбирают таким образом, чтобы наиболее интенсивная полоса поглощения составляла 90% по шкале поглощения или 10% по шкале пропускания.

Твердые вещества

Матричный (стандартный) метод (спрессованные таблетки КВг). 1—2 мг вещества тщательно растирают в ступке с 300 мг бромида калия, помещают в пресс-форму; смесь эвакуируют для удаления абсорбированного воздуха и прессуют под высоким давлением. В результате получают равномерно прозрачную таблетку диаметром до 12 мм и толщиной от 0,5 до 1 мм. Полученная таким образом спрессованная таблетка КВг не искажает вид спектра. Для анализа микроколичеств вещества (до 10 мкг) готовят микротаблетку КВг диаметром 1 мм. В качестве стандарта применяют спрессованную таблетку КВг без исследуемого вещества. Следует обратить внимание на возможную термолабильность, реакционную способность вещества, а также на возможное испарение пробы в процессе приготовления таблетки. Испарения можно избежать, прессуя таблетки при более высоких давлениях. Следует также учитывать, что следовые количества воды из препаратов галогенидов щелочных металлов практически невозможно удалить. Наличие О—Н-связей приводит к возникновению полосы поглощения при 3450 см^{-1} . Преимущество метода прессования заключается в отсутствии полос поглощения, соответствующих растворителю, в ИК-области.

Указанная методика прессования не позволяет получить прозрачные таблетки в тех случаях, когда вещество плохо измельчается или имеет высокую молекулярную массу. Для приготовления таблеток водорастворимых веществ определенные количества вещества и бромида калия растворяют в 30 мл дистиллированной воды и полученный раствор лиофилизируют (см. разд. 1.8). Сухой остаток используют для изготовления спрессованных таблеток по указанной выше методике.

Метод растворов (необходимое для анализа количество раствора — 300 мкл). Для приготовления 2—10%-го раствора исследуемого вещества используют мерную колбу. Измерительную кювету (рис. 3.2.2.1/2) заполняют полученным раствором, а кювету сравнения — растворителем. Для исследования в ИК-области чаще всего используют следующие растворители: четы-

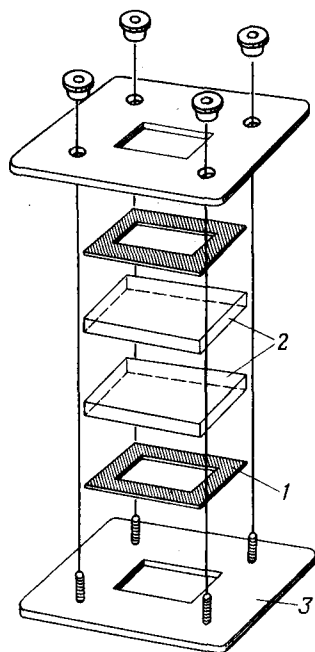


Рис. 3.2.2.1/2. Кювета для жидких проб в ИК-спектроскопии:

1 — резиновая прокладка; 2 — солевое окно; 3 — задняя пластина

рехлористый углерод, хлороформ без стабилизатора (этанол), сероуглерод с квалификацией «для спектрального анализа». Растворители предварительно осушают, так как даже следовые количества воды разрушают солевые окна кювет. Выбор растворителей для проведения анализа весьма ограничен. Это связано с тем, что во многих случаях наблюдается перекрывание полос поглощения исследуемого вещества и растворителя. Если анализируемое вещество не растворяется в указанных растворителях, то используют другие растворители: ацетон, ацетонитрил, циклогексан, дихлорметан, диоксан (Осторожно! Относится к среднетоксичным веществам.). При выборе растворителя необходимо учитывать области поглощения растворителей (рис. 3.2.2.1/3).

Метод пленок (прежде всего применяют для анализа полимеров). Твердое вещество растворяют в небольшом количестве органического растворителя и 1—2 капли полученного раствора наносят непосредственно на пластинку, изготовленную из NaCl. Раствор равномерно распределяют на пластинке. После испарения растворителя на пластинке образуется пленка вещества. Для ускорения удаления высококипящего растворителя применяют вакуумный эксикатор или сушильный шкаф. Пластинку помещают в держатель прибора и снимают спектр поглощения. Для калибровки приборов по волновым числам используют полосы поглощения полистирола (прилагаемые к прибору стан-

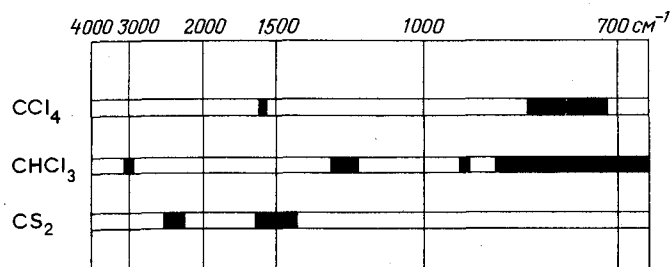


Рис. 3.2.2.1/3. Области поглощения ИК-излучения некоторыми растворителями

дартные пленки). О разрешающей способности прибора судят по степени разрешения двух полос полистирола в области 1603 см^{-1} .

Суспензии

Суспензию готовят (для веществ, для которых нет подходящего растворителя), тщательно растирая 5—20 мг анализируемого вещества с 1—2 каплями высококипящего углеводорода (чаще всего используют нуйол, также применяют парафиновое масло, перфторированный керосин или гексахлорбутадиен). Слой пасты спрессовывают между двумя солевыми пластинами. При формировании слоя стараются не допустить образования в нем пузырьков воздуха. Недостатком этого метода является перекрывание полос поглощения C—H-связей и нуйола (см. рис. 3.2.2.1/3).

Жидкости

Высококипящие жидкости анализируют в виде тонких пленок, которые получают, сжимая капли жидкости между двумя солевыми пластинами или заполняя специальные кюветы. Для снятия спектра в микрокюветах требуется относительно небольшое количество вещества (10—50 мкг). Если в анализируемом образце содержится более 1% воды, его необходимо тщательно высушить. В некоторых случаях окна кювет изготавливают из фторида кальция, характеризующегося меньшей гигроскопичностью по сравнению с хлоридом натрия. Однако область пропускания хлорида натрия (до 600 см^{-1}) значительно шире, чем у фторида кальция. Жидкости можно анализировать также в растворе (см. разд. «Метод растворов»).

Газы

Для анализа газообразных веществ используют специальные кюветы (стеклянный цилиндр с солевыми окнами; толщина слоя газа 5—10 см) (рис. 3.2.2.1/4).

Порядок выполнения операций

Включают прибор и закрепляют измерительную и сравнительную кюветы или спрессованную таблетку в держатели прибора.

Совмещают перо самописца с линией регистрационного бланка, соответствующей максимальному волновому числу (чаще всего 4000 см^{-1}). В современных приборах используют диаграммную ленту.

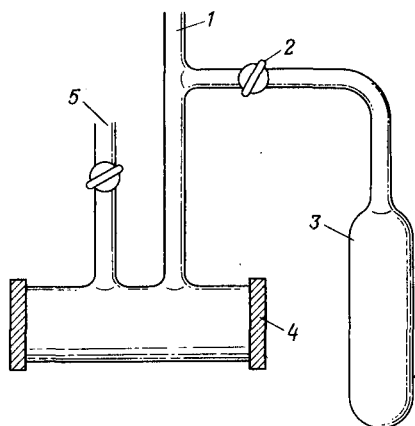


Рис. 3.2.2.1/4. Кювета для газообразных проб в ИК-спектроскопии:

1 — к манометру; 2 — кран; 3 — низкотемпературная ловушка; 4 — окно из NaCl; 5 — ввод газообразного вещества

Усиление регулируют таким образом, чтобы перо самописца останавливалось на линии, соответствующей 95%-му пропусканию, причем регулировку проводят без кювет.

Снимают спектр.

По окончании записи спектра окна кювет очищают соответствующими растворителями (сухой дихлорэтан, четыреххлористый углерод). Кюветы высушивают в токе азота и хранят в эксикаторе.

Анализ результатов

Качественную оценку спектра проводят по положению полос поглощения, а количественную — по их интенсивности. В спектре

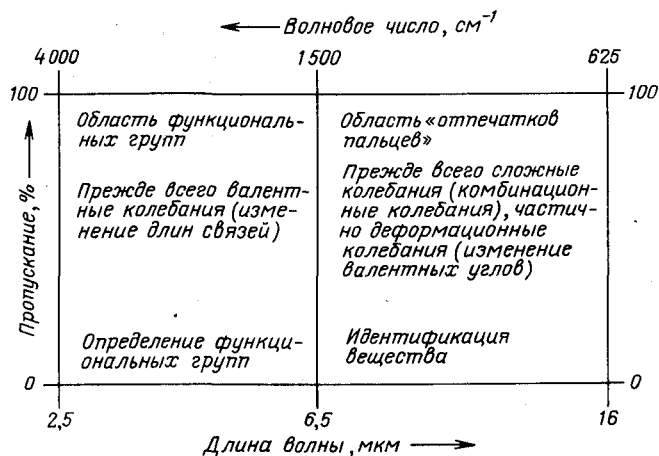
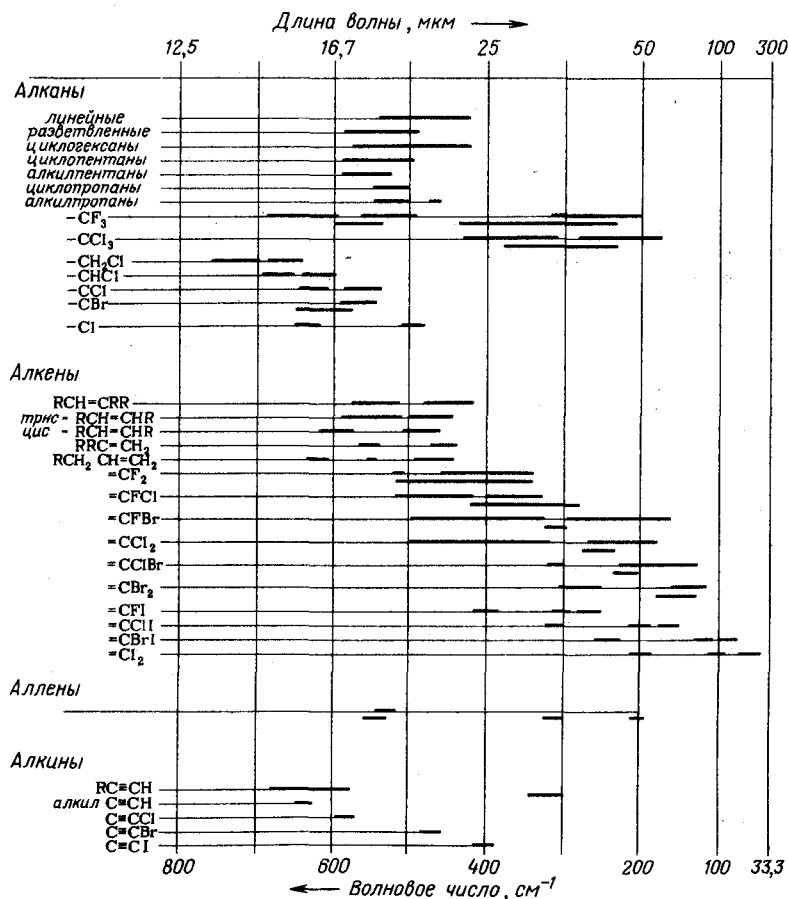


Рис. 3.2.2.1/5. Области основных колебаний в средней ИК-области

различают две основные области (рис. 3.2.2.1/5): область функциональных групп (от 4000 до 1500 см⁻¹) и область «отпечатков пальцев» (от 1500 до 625 см⁻¹). В области «отпечатков пальцев» проявляются многочисленные полосы поглощения «скелетных» колебаний. Как правило, полосы поглощения в этой области невозможно отнести к отдельным элементам структуры. Спектр в области «отпечатков пальцев» характеризует индивидуальные особенности структуры молекулы и применяется для идентификации веществ. Два вещества считаются идентичными, если их спектры в этой области полностью совпадают во всех деталях. Если в литературе отсутствуют данные о спектре известного вещества, то идентификацию проводят по полосам

Таблица 3.2.2.1/1. Частоты поглощения некоторых функциональных групп в далекой ИК-области (заряды неорганических ионов не приводятся) (Beckman Instruments, Fullerton, California/USA)



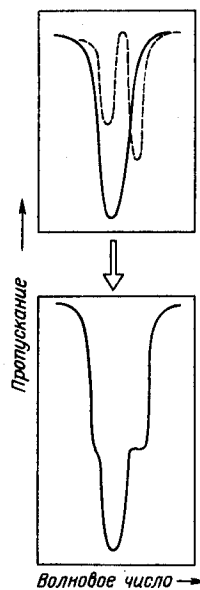


Рис. 3.2.2.1/6. Перекрывание полос поглощения в ИК-спектрах [две слабые полосы (верхняя диаграмма, пунктирная линия) перекрываются с сильной полосой (сплошная линия), в результате такого перекрывания наблюдается суммарная полоса поглощения (нижняя диаграмма)]

ствие примесей вызывает появление дополнительных полос поглощения или перекрывание с основными полосами.

Существует несколько методов анализа ИК-спектра. Один из них заключается в следующем:

анализируя спектр, основное внимание обращают на интенсивность полос поглощения в двух главных областях спектра;

выявляют характеристические полосы поглощения (ОН, NH, C=O и т. д.) функциональных групп;

устанавливают, каким функциональным группам соответствуют полосы поглощения в области «отпечатков пальцев»;

суммируют всю первичную информацию, полученную в результате анализа наиболее интенсивных полос поглощения, и подтверждают предполагаемое строение вещества, анализируя остальные полосы спектра.

Количественный анализ

Если в спектре данного вещества присутствуют характеристические полосы поглощения, не перекрывающиеся с полосами других компонентов, то можно проводить количественный анализ — определение концентрации этого вещества в многокомпонентной смеси. Несмотря на то что в большинстве случаев ИК-спектр характеризуется большим числом полос поглощения, как правило, можно выбрать неперекрывающуюся полосу. Необходимым условием успешного проведения количественного анализа является точная навеска вещества.

Зависимость интенсивности поглощения от концентрации выражается законом Ламберта — Бера (см. разд. 3.2.3):

$$E = \lg(I_0/I).$$

Определение концентрации анализируемого вещества проводят на основании данных о значении молярного коэффициента поглощения, либо применяют стандартный раствор с определенной концентрацией. В последнем случае измеряют поглощение E_X вещества X с неизвестной концентрацией C_X и поглощение стандартной смеси E_S с известной концентрацией C_S . Оба

измерения проводят в одинаковых кюветах при излучении с одним и тем же волновым числом. Концентрацию C_X рассчитывают по уравнению:

$$C_X = C_S E_X / E_S.$$

Строят калибровочную кривую — график зависимости интенсивности поглощения от концентрации вещества в процентах (рис. 3.2.2.1/7). Аналогичную кривую также получают при нанесении на ось ординат значений логарифма пропускания (рис. 3.2.2.1/8). При определении интенсивности поглощения используют, как правило, максимум характеристической полосы поглощения. Для определения концентрации при недостаточно разделенных или перекрывающихся полосах поглощения используют специальные методы.

Метод базисной линии. Базисной линией называется касательная, проведенная через два минимума поглощения (рис. 3.2.2.1/9). Если касательная параллельна оси абсцисс, то расчет интенсивности данной полосы поглощения достаточно прост (рис. 3.2.2.1/9, а). В том случае, если касательная не параллельна оси абсцисс, значение интенсивности I_0 равно расстоянию от точки пересечения базисной линии с прямой, проведенной из максимума полосы поглощения параллельно оси ординат, до линии, соответствующей 100%-му поглощению (рис. 3.2.2.1/9, б).

Интегральный метод. Строго говоря, при количественных расчетах учитывают интегральную интенсивность полосы поглощения спектра, определяемую как максимальное или интегральное поглощение. В связи с тем, что в большинстве случаев в ИК-спектроскопии измеряют процент пропускания, полученные результаты пересчитывают в единицы поглощения. В современ-

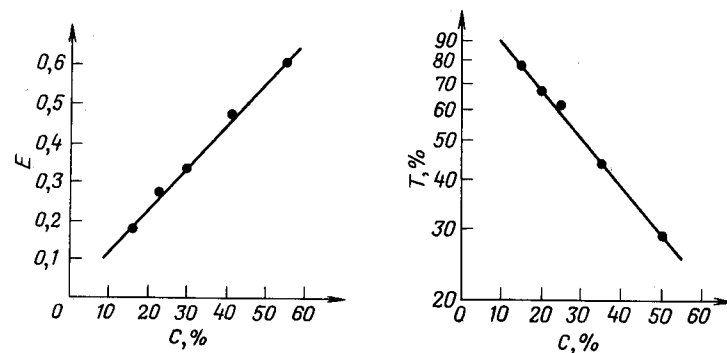


Рис. 3.2.2.1/7. Калибровочная кривая зависимости поглощения (ось ординат) от концентрации (ось абсцисс) при определенной длине волны

Рис. 3.2.2.1/8. Калибровочная кривая зависимости логарифма пропускания (ось ординат) от концентрации (ось абсцисс)

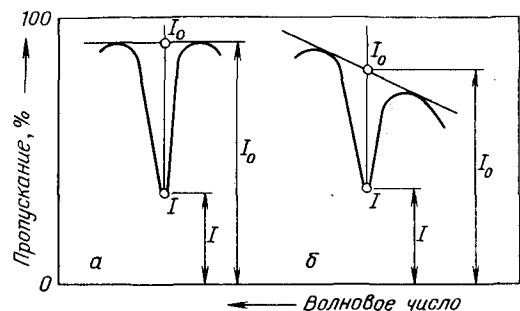


Рис. 3.2.2.1/9. Метод базисной линии (определение значений I_0 и I для расчета поглощения)

ных приборах учитывается необходимость такого преобразования.

Для повышения точности анализа проводят несколько измерений и рассчитывают среднее арифметическое значение.

Источники ошибок

Образец влажный (ОН-полосы воды).

Помутнение солевых окон. Происходит вследствие попадания на них влаги: прикосновений пальцами, дыхания, капель растворителя. Рекомендуется: очистить и отполировать.

Размер и распределение частиц в матрице (влияют на качество спектра, например, за счет межмолекулярного взаимодействия; при анализе вещества в растворе в некоторых случаях наблюдаются более отчетливые полосы в спектре).

Изменение концентрации вещества или растворителя, например, за счет возникновения водородных связей.

Смещение и перекрывание полос поглощения (рис. 3.2.2.1/10 и см. рис. 3.2.2.1/6).

Спектры могут быть сняты на разных приборах и в различных условиях (важно при идентификации веществ).

При количественном анализе спектра принимают во внимание только те значения поглощения, которые находятся в интервале от 20 до 85%.

Для получения воспроизводимых результатов необходимо периодически контролировать работу прибора с помощью стандартной пленки полистирола.

Оформление результатов

Результаты анализа спектра приводят в следующем порядке: способ приготовления образца для снятия спектра ИК (KBr), ИК (CCl_4), положение и интенсивность полос поглощения (в см^{-1}), приписываемые им структурные элементы. Сам спектр

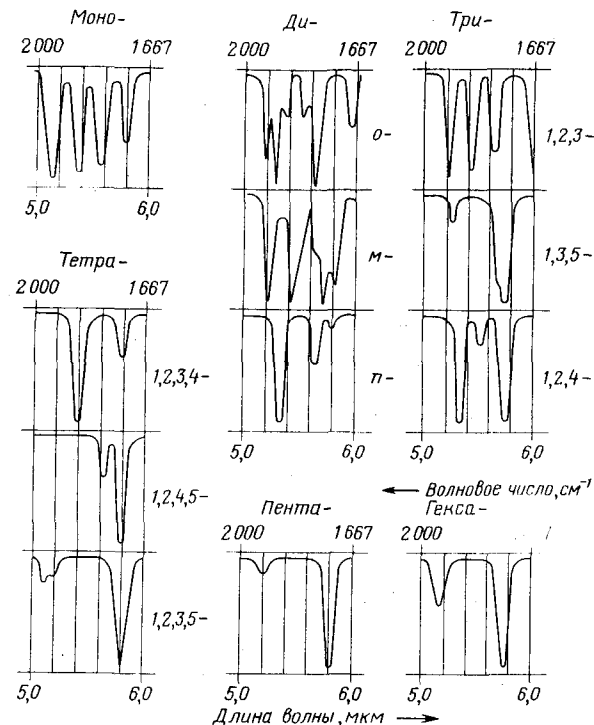


Рис. 3.2.2.1/10. Полосы поглощения для ароматических углеводородов различной степени замещения в диапазоне от 2000 до 1670 см^{-1} [Pasto D. J., Johnson C., Laboratory Text for Organic Chemistry, Prentice-Hall, Englewood Cliffs/NG 1979, p. 139]

приводят только в исключительных случаях, например при описании синтеза нового соединения в качестве основного доказательства его строения (рис. 3.2.2.1/11).

Например: ИК (CCl_4) — 3300 (с.; ОН), 1606, 1582, 1500 (с.; $\text{C}=\text{C}_{\text{аром}}$), 1380 (ср.; CH_3), 1185 (с.; $\text{C}-\text{O}$), 780, 692 (с.; метадизамещенный арен) см^{-1} .

Область применения

Метод ИК-спектроскопии получил широкое распространение вследствие относительной простоты проведения анализа и высокой воспроизводимости результатов. Его применяют для:

идентификации функциональных групп и структуры молекулы (см. табл. 3.2.2.1/1);

определения концентрации вещества в смеси и качественного анализа продуктов реакции;

изучения кинетики реакций;

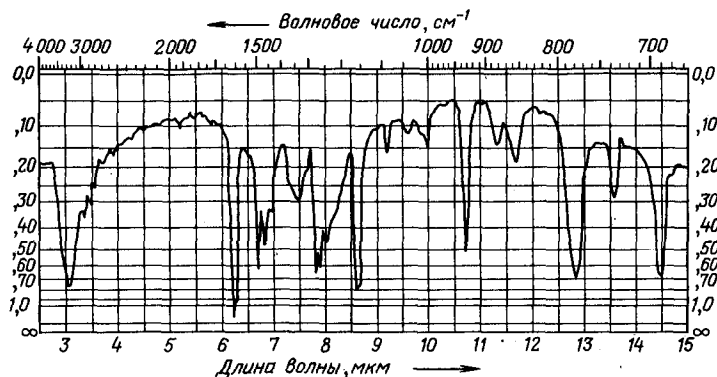


Рис. 3.2.2.1/11. ИК-спектр мета-крезола

идентификации вещества по известному спектру;
идентификации веществ методом ИК-спектроскопии в сочетании с ТСХ (см. разд. 2.2.4).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- L. J. Bellamy, *Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution*, Steinkopff, Darmstadt 1966
 R. Borsdorf, M. Scholz, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Vieweg, Braunschweig 1968
 W. Brugel, *Einführung in die Ultrarotspektroskopie*, Steinkopff, Darmstadt 1969
 N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Academic Press, London 1975
 A. D. Cross, R. A. Jones, *Introduction to Practical Infrared Spectroscopy*, Plenum Press, New York 1969
 H. Günzler, H. Böck, *IR-Spektroskopie*, Verlag Chemie, Weinheim 1983
 H. J. Hediger, *Infrarotspektroskopie*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1971
 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart 1984
 R. R. Hill, D. A. Rendell, *The Interpretation of Infrared Spectra*, Heyden, London 1975
 G. Kemmner, *Infrarot-Spektroskopie, Grundlagen, Anwendung, Methoden*, Francksche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart 1968
 I. Kössler, *Methoden der Infrarot-Spektroskopie in der chemischen Analyse*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1961
 F. S. Parker, *Applications of Infrared Absorption Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine*, Hilger, London 1971
 J. E. Stewart, *Infrared Spectroscopy, Experimental Methods and Techniques*, Marcel Dekker, New York 1970
 H. Volkmann, *Handbuch der Infrarot-Spektroskopie*, Verlag Chemie, Weinheim 1972
 H. Weitkamp, R. Barth, *Einführung in die quantitative Infrarot-Spektrophotometrie*, Thieme, Stuttgart 1976
 DMS-Arbeitsatlas der Infrarot-Spektroskopie, Verlag Chemie und Butterworths, London 1972
 H. M. Hersenson, *Infrared Absorption Spectra*, Academic Press, New York 1959 und 1964

W. Otting, *Spektrale Zuordnungstabellen der Infrarot-Absorptionsbanden*, Springer, Berlin 1963
 C. J. Pouchert, *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, Aldrich Chemical Company, Milwaukee 1978
 Sadtler Standard Spectra, Sadtler Research Laboratories, Philadelphia, wird laufend ergänzt (Loseblattsammlung)
 A. Schrader, W. Meier (Hrsg.), *Raman/IR-Atlas*, Verlag Chemie, Weinheim 1976
 G. Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies*, Wiley, New York 1980
 H. A. Szymanski, *Interpreted Spectra*, Bd. 1—3, Plenum Press, New York 1964—1967

3.2.2.2. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР)

КР-спектроскопия — это метод исследования структуры молекул, основанный на изменении колебательного и вращательного движения молекул, сопровождающегося изменением поляризуемости молекул, в поле электромагнитного излучения. КР-спектроскопия находит широкое применение при анализе соединений с неполярными группами. При исследованиях веществ КР- и ИК-методы дополняют друг друга.

Физические основы метода

КР-спектроскопия является более сложным методом анализа по сравнению с ИК-спектроскопией (см. разд. 3.2.2.1). Колебательные и вращательные переходы молекул наблюдаются в двух типах спектров: КР- и ИК-спектрах. Появление полос поглощения в ИК-спектрах связано с поглощением излучения, а в КР-спектрах — с рассеиванием. При воздействии на молекулы электромагнитного излучения часть поглощенного света рассеивается веществом беспорядочно по отношению к направлению входящего луча. Если падающий луч является монохроматическим, то большая часть рассеянного света (упругое рэлеевское рассеяние) характеризуется частотой падающего света, а небольшая часть излучения — частотами, отличными от первоначальной (Раман-эффект). Мерой энергии, необходимой для возникновения измене-

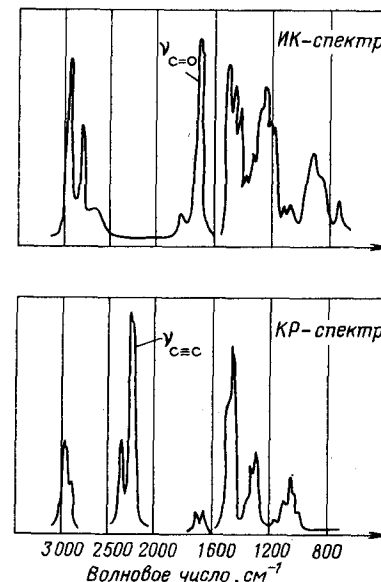
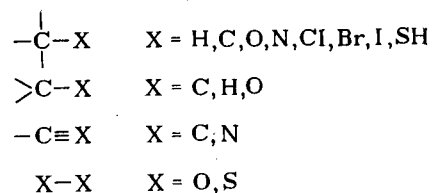


Рис. 3.2.2.2/1. Сравнение ИК- и КР-спектров стеариновой кислоты в жидкой фазе

ний колебательного и вращательного состояния молекул, является разность частот падающего излучения и линии КР-спектра. В отличие от ИК-спектров, в которых проявляются колебательные переходы, связанные с изменением дипольных моментов молекул, в КР-спектрах проявляются лишь те линии, которые соответствуют колебаниям, сопровождающимся изменением поляризуемости молекулы (мера изменения электронного состояния молекулы). Как правило, полосы, интенсивные в ИК-спектре, не являются интенсивными в КР-спектре, и наоборот, т. е. оба метода дополняют друг друга. На рис. 3.2.2/1 сопоставлены ИК- и КР-спектры. Активными в КР-спектрах являются группы:



Порядок выполнения операций

Метод характеризуется простотой подготовки образца, так как он может быть исследован во всех агрегатных состояниях. В качестве растворителей наряду с водой применяют сероуглерод, четыреххлористый углерод, ацетон, хлороформ и циклогексан. Вещества, влияющие на результаты анализа (флуоресцирующие соединения), перед снятием спектра удаляют (например, при помощи хроматографии, см. разд. 2).

Область применения

Исследование строения вещества.

Обнаружение слабополярных и неполярных групп.

Идентификация изомеров.

Исследование полимеров: длины цепи и стереорегулярности.

Применение лазерной техники существенно упрощает и сокращает время анализа. Следует подчеркнуть, что в отличие от ИК-в КР-спектроскопии можно применять воду в качестве растворителя. Количество вещества, необходимого для проведения анализа, составляет несколько миллиграммов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- A. Anderson, The Raman Effect, Marcel Dekker, New York 1971
J. Brandmüller, H. Moser, Einführung in die Raman-Spektroskopie, Steinkopff, Darmstadt 1962
S. K. Freeman, Applications of Laser Raman Spectroscopy, Wiley New York 1974

- T. R. Gilson, P. J. Hendra, Laser Raman Spectroscopy, Wiley, New York 1970
M. Hesse, H. Meier, B. Zehe, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme, Stuttgart 1984
F. Matossi, Der Raman-Effekt, Vieweg, Braunschweig 1959
H. A. Szymanski, Raman Spectroscopy, Theory and Practice, Plenum, New York 1970
M. C. Tobin, Laser Raman Spectroscopy, Wiley, New York 1971

3.2.3. СПЕКТРОСКОПИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ (УФ) И ВИДИМОМ СВЕТЕ

Спектроскопия в УФ и видимом свете — это раздел оптики, в котором исследуется зависимость интенсивности поглощения электромагнитного излучения, прошедшего через анализируемое вещество, от длины волны (в ультрафиолетовой и видимой областях).

Физические основы метода

При поглощении света молекулой в видимой и ультрафиолетовой областях изменяется энергия определенных электронов, что приводит к их переходу на более высокий энергетический уровень.

Переход электрона из основного состояния S в возбужденное состояние S' сопровождается изменением колебательного и вращательного состояний (рис. 3.2.3/1). Минимальные различия в энергетических состояниях колебательных и вращательных уровней одного и того же энергетического уровня приводят к возникновению тонкой структуры полос спектра. Однако при обычных условиях из-за взаимодействия молекул друг с другом

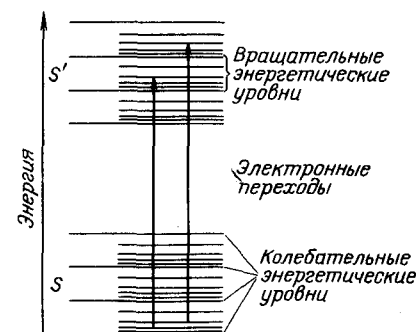


Рис. 3.2.3/1. Диаграмма энергетических уровней молекулы (ось ординат — в условном масштабе)

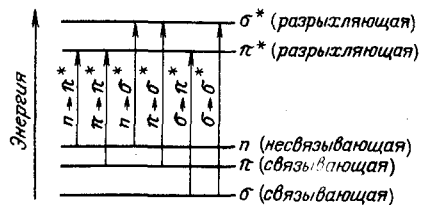


Рис. 3.2.3/2. Энергетическая диаграмма электронных переходов между различными молекулярными орбиталями (энергия, необходимая для возбуждения электронных переходов, увеличивается слева направо) [Roberts I. D., Caserio M. C., Basic Principles of Organic Chemistry, Benjamin, Menlo Park, 2nd edition 1977, p. 290]

и с растворителем в спектре поглощения наблюдаются только сравнительно широкие полосы поглощения*.

Энергия перехода с одного на другой вращательный энергетический уровень составляет от 0,4 до 40 Дж·моль⁻¹, колебательный уровень — от 4 до 40 кДж·моль⁻¹, электронный уровень — от 40 до 4000 кДж·моль⁻¹.

Для многоатомных молекул обычно вместо вышеупомянутого понятия «энергетическое состояние» применяют понятие «молекулярная орбиталь». Это связано с тем, что для отдельных электронов невозможно определить точное положение в пространстве. Считают, что электроны встречаются в определенной области (на определенной орбитали) молекулы с определенной долей вероятности. В зависимости от вида связи в основном состоянии молекулы различают σ-, π- и n-орбитали. Электроны на σ- и π-орбиталях участвуют в образовании σ- и π-связей. Поэтому такие орбитали называют связывающими. На n-орбиталях находятся электроны, не принимающие участия в образовании связей (например, свободные электронные пары атома кислорода). Поэтому такие орбитали называются несвязывающими. Электроны в возбужденном состоянии находятся на разрыхляющих (антисвязывающих) молекулярных орбиталях. На рис. 3.2.3/2 показаны энергетические уровни различных молекулярных орбиталей. В зависимости от вида связи, в которой участвуют электроны, и вида орбитали, на которую они переходят в процессе возбуждения, рассматривают следующие типы переходов:

$n \rightarrow \pi^*$, свободный n-электрон переходит на возбужденную, разрыхляющую орбиталь (π^* -орбиталь);

$n \rightarrow \sigma^*$, свободный n-электрон переходит на разрыхляющую орбиталь σ-связи (σ^* -орбиталь);

$\sigma \rightarrow \sigma^*$, электрон σ-связи переходит на разрыхляющую орбиталь σ-связи (σ^* -орбиталь);

$\pi \rightarrow \pi^*$, электрон π-связи переходит на разрыхляющую орбиталь π-связи (π^* -орбиталь).

Вероятность перехода $\sigma \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ очень мала, и вследствие этого соответствующие полосы поглощения мало интенсивны и практически не наблюдаются в спектрах, снятых в обыч-

ных условиях. Как показано на рис. 3.2.3/2, для возбуждения σ-электронов ($\sigma \rightarrow \sigma^*$) необходимо очень большое количество энергии, и в связи с этим полосы поглощения алканов лежат в коротковолновой (вакуумной) ультрафиолетовой области. Для перехода $n \rightarrow \pi^*$ требуется небольшое количество энергии, и поэтому полосы поглощения, соответствующие этому переходу, расположены в близкой ультрафиолетовой или видимой областях спектра. Анализ спектра позволяет сделать вывод об электронном состоянии молекул. Кроме того, существует правило, по которому можно оценить вероятность перехода и на основании этого — интенсивность соответствующей полосы. Используя эту информацию, можно предсказать расположение полос поглощения в спектре для разрешенных электронных переходов. В табл. 3.2.3/1 приведены электронные переходы простых органических молекул.

Основными величинами в спектроскопии являются поглощение E и молярный коэффициент поглощения ϵ (см. разд. 3.4.1.1). Зависимость между обеими величинами выражается законом

Таблица 3.2.3/1. Характеристика электронных переходов некоторых простых молекул [Roberts J. O., Caserio M. C., Basic Principles of Organic Chemistry, Benjamin, Menlo Park, 2nd edition 1977, p. 289]

Соединение	Переход	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\epsilon_{\text{макс}}$	Растворитель ⁶
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$	$n \rightarrow \pi^*$	280,0	15	Циклогексан
	$\pi \rightarrow \pi^{*\text{в}}$	190,0	1 100	Циклогексан
	$n \rightarrow \sigma^{*\text{в}}$	156,0	Сильный	Циклогексан
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	$\pi \rightarrow \pi^*$	175,0	10 000	е
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$	$\pi \rightarrow \pi^*$	217,0	20 900	Гексан
$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$	$\pi \rightarrow \pi^*$	227,0	22 500	Гексан
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	$\pi \rightarrow \pi^*$	185,0	20 000	Этанол
$\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{CH}$	$\pi \rightarrow \pi^*$	186,5	450	Циклогексан
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}_3$	$n \rightarrow \pi^*$	324,0	24	Этанол
	$\pi \rightarrow \pi^*$	219,0	3 600	Этанол
CH_4	$\sigma \rightarrow \sigma^{*\text{г}}$	121,9	Сильный	е
CH_3-CH_3	$\sigma \rightarrow \sigma^{*\text{г}}$	135,0	Сильный	е
CH_3-Cl	$n \rightarrow \sigma^{*\text{д}}$	172,5	Слабый	е
CH_3-Br	$n \rightarrow \sigma^{*\text{д}}$	204,0	200	е
CH_3-I	$n \rightarrow \sigma^{*\text{д}}$	257,5	365	Пентан
CH_3-OH	$n \rightarrow \sigma^{*\text{д}}$	183,5	150	е
$\text{CH}_3-\text{O}-\text{CH}_3$	$n \rightarrow \sigma^{*\text{д}}$	183,8	2 520	е
$(\text{CH}_3)_3\text{N}$	$n \rightarrow \sigma^{*\text{д}}$	227,3	900	е

^а Молярный коэффициент поглощения при $\lambda_{\text{макс}}$.

^б Необходимо указывать растворитель, так как он влияет на положение максимума поглощения и $\epsilon_{\text{макс}}$.

^в Данные недостоверны.

^г $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -переходы соответствуют переходам со связывающей орбитали на разрыхляющую орбиталь с более высокой энергией.

^д $n \rightarrow \sigma^*$ -переходы соответствуют переходу свободной электронной пары на разрыхляющую молекулярную орбиталь σ-связи.

^е Измерение проводили в паровой фазе.

* Вращательно-колебательная структура электронного спектра наблюдается только в газовой фазе.

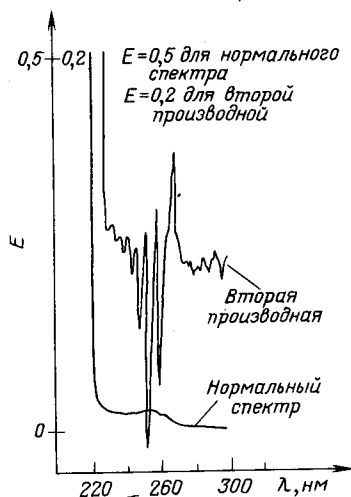


Рис. 3.2.3/3. Различие между обычными и дифференциальными (по 2-й производной) спектрами на примере 0,05%-го раствора сульфата L-амфетамина

Ламберта — Бера (справедлив только для разбавленных растворов):

$$E = \epsilon C d.$$

Абсорбционная спектроскопия изучает зависимость поглощения от длины волны λ или волнового числа $\bar{\nu}^*$.

Полосы поглощения, характерные для отдельного электронного перехода, наблюдаются в спектрах относительно редко. В молекулярных спектрах отдельные линии объединяются в достаточно широкие полосы поглощения. Такое же явление наблюдается при анализе смесей веществ, в спектрах которых максимумы полос находятся на небольшом расстоянии друг от друга. Дифференцирование (предпочтительно двойное) спектра позволяет более точно идентифицировать неясные точки максимумов, минимумов и перегибов (рис. 3.2.3/3). Используя линейную зависимость второй производной сигнала спектра от концентрации вещества, можно проводить количественный анализ — определение концентрации веществ в многокомпонентных смесях с высокой точностью. Причем чувствительность этого метода значительно выше, чем обычного спектроскопического метода.

Приборы

В настоящее время спектроскопические методы совершенствуются вследствие применения новейших технических достижений (голографические решетки, компьютерная обработка результатов эксперимента с использованием микропроцессоров). Прибор, изображенный на рис. 3.2.3/4, существенно не отличается от более ранних конструкций. Применение голографических решеток позволяет уменьшить рассеяние и улучшить монохроматизацию света, что дает возможность более точно оценить измеряемый сигнал. После измерения сигнала осуществляются его

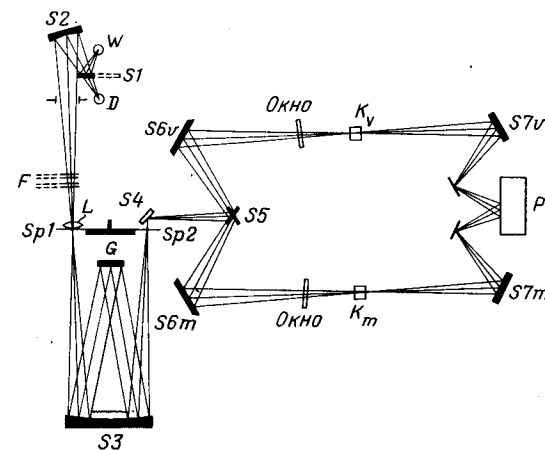


Рис. 3.2.3/4. Оптическая схема регистрирующего двухлучевого спектрофотометра (Pye Unicam Ltd., Cambridge/England):

W — лампа накаливания (видимый свет); D — дейтериевая лампа (УФ-свет); S1—S5 — зеркала; F — фильтр; L — линза; Sp1, Sp2 — щели; G — голографическая решетка; Kv — кювета сравнения; Km — измерительная кювета; P — фотоумножитель; S7v и S7m — зеркала

преобразование при помощи электронной системы и запись в обычном виде [функция $E = f(\lambda)$].

Современные, управляемые микропроцессором спектрофотометры имеют существенные преимущества по сравнению с более ранними конструкциями:

широкий диапазон измерения поглощения (до четырех единиц поглощения); возможность логарифмирования величины поглощения, что позволяет анализировать образцы любой концентрации без переключения чувствительности прибора во время измерения;

возможность записи дифференциальной спектральной кривой первого и второго порядка, что значительно повышает информативность спектра, особенно при анализе многокомпонентных смесей;

автоматический пересчет измеренных сигналов в любые единицы измерения (например, концентрации, поглощения или $\lg \epsilon$); возможность автоматической смены образцов;

возможность периодической записи спектра (через определенные интервалы времени), что находит широкое применение при кинетических исследованиях.

Подготовка образца

Взвешивают приблизительно 25 мг вещества с точностью $\pm 0,1$ мг и растворяют его в подходящем растворителе, который

* В физической химии предпочитают использовать волновое число $\bar{\nu}$, так как оно является мерой энергии при электронном переходе. Взаимный пересчет длины волны и волнового числа проводят по уравнению $\bar{\nu} = 1/\lambda$, причем λ измеряется в сантиметрах.

должен характеризоваться минимальным поглощением в исследуемой области в мерной колбе на 25 мл.

Готовят раствор исследуемого вещества концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$ путем последовательных разбавлений.

Измерительную кювету заполняют полученным раствором, а сравнительную — растворителем (толщина кюветы составляет, например, 1 см). Для измерений в диапазоне от 180 до 400 нм используют кварцевые кюветы, в диапазоне от 400 до 800 нм применяют кварцевые или стеклянные кюветы.

Кюветы закрывают пробками или специальными крышками, так как при работе с открытыми кюветами происходит испарение растворителя, что приводит к появлению концентрационной неоднородности раствора и искажению спектра.

Применение кювет различной толщины, а также разбавление раствора не оказывают существенного влияния на положение максимума полосы поглощения.

Порядок проведения операций

Прибор настраивают при 0 и 100%-м пропускании. Проверку правильной настройки осуществляют, снимая спектр стандартного вещества.

Устанавливают необходимый диапазон длин волн.

Выбирают соответствующий диапазон чувствительности: на некоторых устаревших моделях приборов существует три диапазона: от 0 до 1, от 0,5 до 1,5 и от 1 до 2.

Современные приборы работают в более широком диапазоне чувствительности: от 0 до 0,2 и от 0 до 4. Однако следует учитывать, что точность измерений существенно снижается выше двух единиц оптической плотности.

Количественный анализ результатов

Значение величины, записанной на самописце, называют поглощением. Поглощение, как правило, пропорционально концентрации растворенного вещества (закон Ламберта — Бера):

$$E = \epsilon C d,$$

где E — поглощение; d — толщина поглощающего слоя; C — концентрация растворенного вещества, моль \cdot л $^{-1}$; ϵ — молярный коэффициент поглощения (специфичен для каждого вещества, его значение приводят вместе с данными о максимуме поглощения).

Оформление результатов

В биологии приводят зависимость поглощения от длины волн (рис. 3.2.3/5, а). В химии и прежде всего в физической химии приводят зависимость $\lg \epsilon$ от волнового числа $\bar{\nu}$

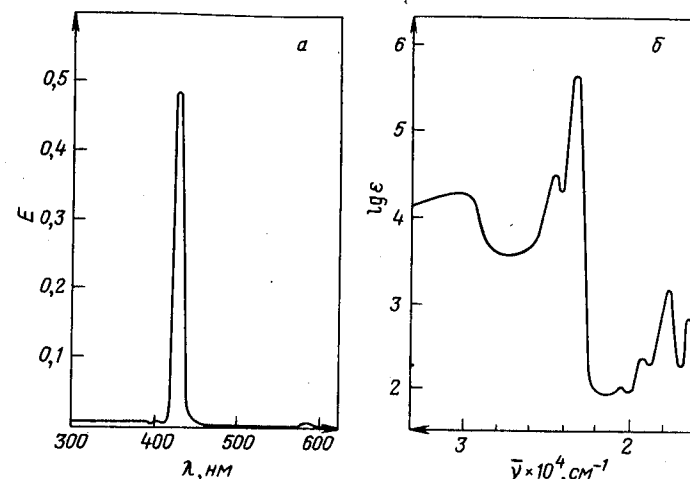


Рис. 3.2.3/5. Способы регистрации спектров поглощения (на примере спектра поглощения дихлортетрафенилпорфирина, концентрация 10^{-6} моль \cdot л $^{-1}$ в хлороформе:

а — зависимость поглощения E от длины волны λ ; б — зависимость логарифма молярного коэффициента ϵ от волнового числа $\bar{\nu}$.

(рис. 3.2.3/5, б). Например, для пересчета величины $E = f(\lambda)$ (см. рис. 3.2.3/5, а) в величину $\lg \epsilon = f(\bar{\nu})$ (см. рис. 3.2.3/5, б) проводят следующие преобразования: максимум поглощения соответствует длине волны $\lambda_{\text{макс}} = 427$ нм; поглощение при этой длине волны $E = 0,49$ ($E_{\text{макс}}$); концентрация вещества равна 10^{-6} моль \cdot л $^{-1}$ (см. рис. 3.2.3/5); так как данные о толщине кюветы не приведены, примем ее равной 1; тогда

$$\epsilon = E / (C d) = 0,49 / (10^{-6} \cdot 1) = 4,9 \cdot 10^5 \rightarrow \lg \epsilon = 5,69;$$

$$\bar{\nu} = 1 / \lambda = 1 / 427 \text{ нм} = 2,34 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}.$$

Таким образом пересчитывают значение точек на кривой поглощения через каждые 5 нм.

Если молярные коэффициенты поглощения, соответствующие различным максимумам полос спектра, различаются на несколько порядков, то целесообразно представить спектр в полулогарифмических координатах в виде графика зависимости $\lg \epsilon$ от $\bar{\nu}$ (см. рис. 3.2.3/5). Из рисунка видно, что при изображении спектра в полулогарифмических координатах (см. рис. 3.2.3/5, б) проявляется более тонкая структура спектра. Такой способ изображения позволяет также сравнивать спектры различных соединений. Это связано с тем, что молярный коэффициент поглощения не зависит от концентрации.

В рабочем журнале приводятся результаты анализа спектра (см. рис. 3.2.3/5, б). Максимумы поглощения при $2,4 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}$

($2,8 \cdot 10^4$), $2,34 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ ($4,9 \cdot 10^5$), $1,79 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ ($1,52 \cdot 10^3$) и $1,67 \cdot 10^{-1} \text{ см}^{-1}$ ($7,6 \cdot 10^2$) ($10^{-6} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$, хлороформ).

С использованием величин поглощения и молярного коэффициента поглощения ϵ , определенных при одной и той же длине волны, можно рассчитать концентрацию данного вещества в растворе (см. разд. 3.4.1.1).

Область применения

Идентификация вещества по известному спектру.

Установление строения вещества (прежде всего применяется для ненасыщенных алифатических и ароматических соединений, а также для соединений, содержащих карбонильные группы).

Оценка степени чистоты вещества.

Определение концентраций веществ в многокомпонентных смесях (запись дифференциальной спектральной кривой второго порядка).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- B. Hampel*, Absorptionsspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich, Vieweg, Braunschweig 1962
K. Hirayama, Handbook of Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Organic Compounds, Plenum Press, New York 1967
H. H. Perkampus, Hrsg., DMS-UV-Atlas, Verlag Chemie, Butterworths, Weinheim — London 1966
E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, 2. Aufl., Springer, Berlin 1981
R. M. Silverstein, G. C. Bassler, Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Wiley, New York 1963
A. J. Scott, Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press, New York 1964
H. A. Staab, Einführung in die theoretische organische Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1970
H. M. Hershenson, Ultraviolet and Visible Absorption Spectra, Academic Press, New York (wird laufend ergänzt)
 Sadtler Standard Spectra (Ultraviolet), Heyden, London (wird laufend ergänzt)
 UV-Atlas organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim 1966—1971

3.2.4. ДИСПЕРСИЯ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ (ДОВ)

Дисперсией оптического вращения называют зависимость оптической активности вещества от длины волны линейно поляризованного луча, проходящего через это вещество.

Физические основы метода

При прохождении линейно поляризованного света через оптически активные среды наблюдается вращение плоскости поляризации (рис. 3.2.4/1). Оптически активными называются вещества, молекулы или элементарные ячейки которых построены

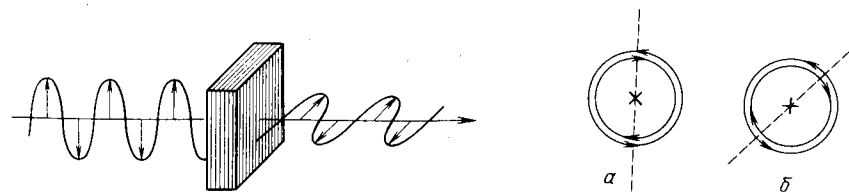


Рис. 3.2.4/1. Вращение плоскости поляризации линейно поляризованного света при прохождении через оптически активную среду

Рис. 3.2.4/2. Сложение составляющих с правой и левой круговой поляризацией (поток излучения распространяется перпендикулярно плоскости чертежа) до (а) и после (б) прохождения линейно поляризованного света через оптически активную среду

асимметрично, т. е. частицы не обладают плоскостью или центром симметрии. Линейно поляризованный пучок можно рассматривать как состоящий из двух составляющих с правой и левой круговой поляризацией (рис. 3.2.4/2, а). Эти составляющие характеризуются одинаковой скоростью распространения, фазами и амплитудами. После прохождения оптически активных сред наблюдается различие скоростей распространения лево- и правополяризованных составляющих, что приводит к возникновению разности фаз с последующим вращением плоскости поляризации (рис. 3.2.4/2, б). Угол поворота плоскости поляризации называют углом вращения α , величиной угла вращения α зависит от длины волны, так как скорость распространения лево- и правополяризованных составляющих также зависит от длины волны. В качестве примера приводятся ДОВ-спектры *D*- и *L*-сульфокамфорной кислот (рис. 3.2.4/3, б). Для сравнения приведены также УФ- и КД-спектры (см. разд. 3.2.5, рис. 3.2.4/3, а и 3.2.4/3, в).

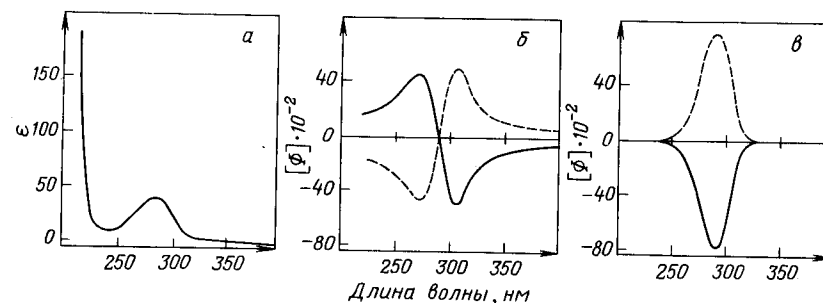


Рис. 3.2.4/3. Спектры *D*-сульфокамфорной (пунктирная линия) и *L*-сульфокамфорной (сплошная линия) кислот (все спектры сняты в водных растворах кислот концентрацией $0,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$):

а — УФ-спектр; б — ДОВ-спектр; в — КД-спектр

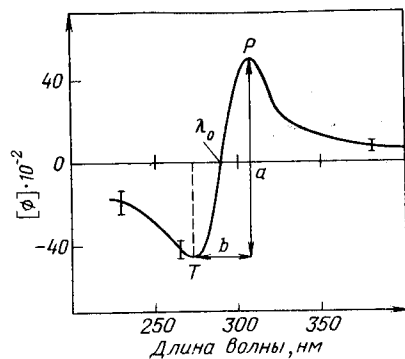


Рис. 3.2.4/4. Характеристики ДОВ-спектра:

P — пик; T — впадина; $[\Phi]$ — вращение, равно нулю при 291 нм; a — молекулярная амплитуда, равна $+96^\circ$; b — ширина амплитуды, равна 34 нм; короткие вертикальные отрезки на кривой обозначают доверительный интервал измеренных значений

Полоса поглощения ДОВ-спектра (см. рис. 3.2.4/3, a) соответствует $n \rightarrow \pi^*$ -переходу $C=O$ -группы (см. разд. 3.2.3). При длине волны, соответствующей максимуму поглощения, наблюдается изменение знака угла вращения. Это явление называют эффектом Коттона. На рис. 3.2.4/3, b приведена кривая положительного эффекта Коттона для D -сульфокамфорной кислоты. Положительное значение угла вращения наблюдается при больших длинах волн, отрицательное — при меньших длинах волн. Пример отрицательного эффекта Коттона для L -сульфокамфорной кислоты также приведен на рис. 3.2.4/3, b .

Величины, характеризующие ДОВ-спектр, приведены на рис. 3.2.4/4.

Приборы

Оптическая схема ДОВ-прибора представлена на рис. 3.2.4/5.

Порядок выполнения операций

Снимают спектр поглощения исследуемого вещества в области от 185 до 700 нм (см. разд. 3.2.3). При этом учитывают, что при высоких концентрациях вещества (поглощение > 2) точность измерения ДОВ-спектра резко снижается. Поэтому для получения удовлетворительных результатов по всей области длин волн используют образцы различных концентраций или кюветы различной толщины (1, 2, 5, 10 или 20 мм).

Перед снятием ДОВ-спектра прибор калибруют (например, по D -сульфокамфорной кислоте, см. разд. 3.2.5) и устанавливают базовую линию, при этом кювета заполнена чистым растворителем.

Монохроматор устанавливают на длину волны, соответствующую максимуму поглощения спектра, и затем определяют точное значение двух экстремумов — пика и впадины (см. рис. 3.2.4/4).

Чувствительность прибора подбирают таким образом, чтобы можно было зафиксировать оба значения экстремумов.

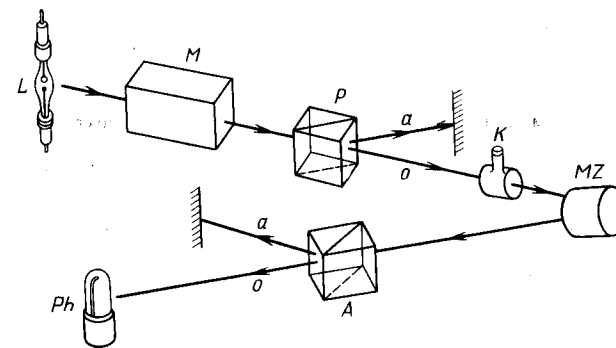


Рис. 3.2.4/5. Оптическая схема ДОВ-прибора:

L — ксеноновая лампа (источник видимого и ультрафиолетового света); M — монохроматор; P — поляризатор (создает два линейно поляризованных луча, плоскости колебаний которых перпендикулярны друг относительно друга, луч a исключается и поглощается); K — кювета с раствором оптически активного вещества; MZ — модулятор (с помощью которого формируется переменный ток в фотоумножителе); A — анализатор (вращением компенсирует вращение линейно поляризованного светового луча, прошедшего через вещество, величина вращения записывается как результат измерения); Ph — фотоумножитель (измеряет преобразованный модулятором световой поток и формирует переменное напряжение, которое после преобразования в электронном устройстве используется в дальнейшем)

Предварительно снимают ДОВ-спектр при небольшой чувствительности прибора и на основании полученных данных для определенных областей спектра устанавливают соответствующую чувствительность или используют кюветы другой толщины.

Анализ результатов

Угол вращения α измеряют в градусах (градус). Предел чувствительности при полном отклонении составляет 0,01—2,0 градуса вращения. Удельное вращение $[\alpha]$ рассчитывают по измеренному вращению α :

$$[\alpha] = \alpha \cdot 100 / (Cd), \quad (1)$$

где $[\alpha]$ — удельное вращение; α — измеренный угол вращения, градус; d — ширина кюветы, дм; C — концентрация исследуемого вещества в растворе, г на 100 мл.

Удельное вращение измеряют в градус·дм²·г⁻¹·10⁻². Часто применяют величину — молекулярное вращение *. Использование этой величины позволяет сравнивать различные ДОВ-спектры. Молекулярное вращение $[\Phi]$ рассчитывают по следующему уравнению:

$$[\Phi] = \alpha M / (IC), \quad (2)$$

* Обозначение $[\Phi]$ предпочтительнее, чем $[\alpha]_{\text{дв}}$, так как при этом более четко выражена разница между молекулярным и удельным вращением.

где $[\Phi]$ — молекулярное вращение; α — измеренный угол вращения, градус; M — молярная масса, г·моль⁻¹; l — толщина кюветы, см; C — концентрация исследуемого вещества в растворе, г·л⁻¹.

Молекулярное вращение измеряют в градус·см⁻²·моль⁻¹. Доведительный интервал значений при записи спектра указывают короткими вертикальными отрезками в нескольких местах кривой спектра.

Эффект Коттона рассчитывают по величине амплитуды a :

$$a = ([\Phi]_{\text{макс}} - [\Phi]_{\text{мин}}) / 100.$$

Оформление результатов

В качестве характеристики спектра, кроме самой ДОВ-кривой, в рабочем журнале приводят следующие данные: количество вещества, его концентрация, растворитель, толщина слоя кюветы и температуры. Наиболее информативным показателем является молекулярное вращение $[\Phi]$. Поэтому измеренное значение α на кривой ДОВ-спектра пересчитывают в молекулярное вращение $[\Phi]$ через каждые 5 нм по уравнению (2).

Если амплитуды пиков данного ДОВ-спектра отличаются более чем на порядок, то на рисунке указывают масштабы измерения (см. рис. 3.2.6/2).

Результаты анализа ДОВ-спектра записывают таким образом (на примере *D*-сульфокамфорной кислоты, см. рис. 3.2.4/4): кривая ДОВ с положительным эффектом Коттона, с пиком при 308 нм, впадиной 274 нм и λ_0 при 291 нм; молекулярная амплитуда $a = +96^\circ$, ширина амплитуды $b = 34$ нм.

Область применения — см. разд. 3.2.5.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК — см. разд. 3.2.5.

3.2.5. КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ (КД)

Право- и левополяризованный свет по-разному поглощаются оптически активным веществом в области оптически активных полос поглощения. Поэтому выходящий из среды свет имеет эллиптическую поляризацию. Этот эффект называется круговым дихроизмом (КД).

Физические основы метода

Лево- и правополяризованные компоненты луча света проходят через оптически активную среду с различными скоростями. При этом их поглощение средой также различно. Измерение кругового дихроизма основано на преобразовании линейно поляризованного света в свет, поляризованный по кругу вправо и

влево, с последующим измерением разности поглощения после прохождения через оптически активную среду.

На рис. 3.2.4/3 приведены УФ-, ДОВ- и КД-спектры *D*- и *L*-сульфокамфорной кислоты. Максимум или минимум КД-спектра в большинстве случаев соответствует максимуму полосы поглощения УФ-спектра (см. рис. 3.2.4/3, в). В связи с тем, что КД- и ДОВ-эффекты взаимосвязаны, измерив один из них, можно преобразовать его в другой с помощью теоремы Кронига — Крамерса. Многие приборы позволяют получить КД-кривую, а затем преобразовать ее в ДОВ-спектр. В настоящее время, как правило, снимают КД-спектры, так как анализ их значительно проще. Так, например, только КД-спектр позволяет анализировать вещества с близко расположенными полосами поглощения в УФ-спектре. Однако, при необходимости проведения анализа в области ниже 180 нм, снимают ДОВ-спектр. Как следует из сравнения спектров, приведенных на рис. 3.2.4/3, а—в, КД-эффект наблюдается только в области полос поглощения, в то время как ДОВ-эффект проявляется в более широкой области спектра. В зависимости от типа прибора данные по КД получают либо в виде величины эллиптичности θ , либо в виде разности поглощений ΔE право- и левополяризованных компонент E_d и E_n :

$$\Delta E = E_d - E_n. \quad (1)$$

При оформлении результатов используют молярную эллиптичность, которую рассчитывают по измеренной эллиптичности:

$$[\theta] = 330 / (lC), \quad (2)$$

где θ — измеренная эллиптичность; l — толщина слоя кюветы, см; C — концентрация, моль·л⁻¹;

или по разности поглощения ΔE по уравнению:

$$[\theta] = 3300 \Delta E M / (lC), \quad (3)$$

где ΔE — измеренная разность поглощения; M — молярная масса, г·моль⁻¹; l — толщина слоя кюветы, см; C — концентрация, моль·л⁻¹.

Приборы

На рис. 3.2.5/1 приведена оптическая схема КД-прибора. В отсутствие образца в кювете *K* модулированный свет при помощи электрооптического модулятора *ЕОМ* преобразуется в фотумножителе *Ph* в постоянный ток. Если в кювету *K* помещают образец, обладающий круговым дихроизмом, то в *Ph* возникает пульсирующий ток (вследствие возникновения переменной составляющей). Преобразование линейно поляризованного света в циркулярно поляризованный проводят с помощью ячейки Покейльса или пьезоэлектрических модуляторов.

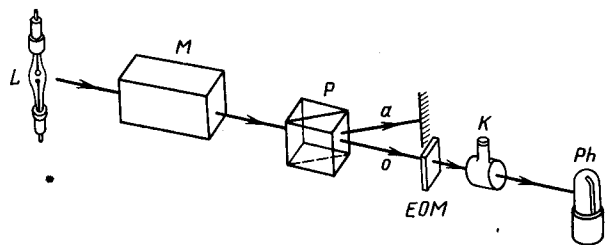


Рис. 3.2.5/1. Оптическая схема КД-прибора:

L — ксеноновая лампа (источник видимого и ультрафиолетового света); *M* — монохроматор; *P* — поляризатор (создает два линейно поляризованных луча, плоскости колебаний которых перпендикулярны друг относительно друга, луч *a* исключается и поглощается); *EOM* — электрооптический модулятор; *K* — измерительная кювета; *Ph* — фотомножитель

Порядок выполнения операций

Выбор материала кювет, растворителя и концентраций анализируемого вещества проводят таким образом, как описано в разд. 3.2.3. Снятие КД-спектров проводят аналогично ДОВ-спектрам (см. разд. 3.2.4). Для калибровки прибора используют раствор *D*-сульфокамфорной кислоты, который не разлагается в течение длительного времени.

Количественный анализ результатов

При сравнении КД-кривых различных веществ целесообразно использовать величину мольной эллиптичности $[\theta]$. Эту величину рассчитывают по измеренной эллиптичности с помощью уравнения (2) или по разности поглощений с помощью уравнения (3). При этом пересчитывают измеренное значение на КД-кривой через каждые 5 нм.

Оформление результатов

В рабочем журнале кроме самой КД-кривой приводят следующие данные: название вещества, концентрация в г·л⁻¹, толщина слоя кюветы, чувствительность прибора, температура. Если в процессе измерения использовались различные кюветы, концентрации вещества и изменялась чувствительность прибора, то различным областям измерения на графике КД-кривой соответствуют несколько различных координат (см. рис. 3.2.6/2).

В качестве примера приведена характеристика КД-кривой *D*-сульфокамфорной кислоты (см. рис. 3.2.4/3, в): КД-кривая с положительным эффектом Коттона при 290 нм.

Область применения

Сtereoхимические исследования соединений с асимметрическими атомами углерода.

Определение относительной и абсолютной конфигурации оптически активных неорганических и органических соединений (например, тритерпенов, стероидов и алкалоидов).

Конформационный анализ: изучение зависимости кругового дихроизма от температуры позволяет получить ценную информацию о конформационном равновесии.

Определение вторичной и четвертичной структуры белков: на основании КД-спектров можно определить процентное содержание α -спиральной, β -складчатой и неупорядоченной структур (структура неупорядоченного клубка).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- E. Charney*, The Molecular Basis of Optical Activity: Optical Rotary Dispersion and Circular Dichroism, Wiley, New York 1979
C. Djerassi, Optical Rotary Dispersion, McGraw Hill, New York 1960
B. Jirgensons, Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules in Molecular Biology, Biochemistry and Physics, Bd. 5, Springer, Berlin 1973
G. Sneath (Ed.), Optical Rotary Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, Heyden, London 1967

3.2.6. МАГНИТНАЯ ДИСПЕРСИЯ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ (МДОВ) И МАГНИТНЫЙ КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ (МКД)

При прохождении света через оптически неактивные соединения в сильном магнитном поле наблюдаются эффекты ДОВ и КД. Эти явления называются МДОВ и МКД.

Физические основы метода

При прохождении линейно поляризованного света через любые оптически неактивные вещества, помещенные в сильное магнитное поле, наблюдается вращение плоскости поляризации. Это явление называется эффектом Фарадея. Магнитное поле индуцирует возникновение ДОВ и КД в оптически неактивных соединениях. Возникновение естественных ДОВ и КД и индуцированных магнитным полем является следствием различных физических свойств веществ. Основным условием возникновения естественного КД является наличие «фактора асимметрии». КД-эффект проявляют только такие соединения, строение которых асимметрично (например, несимметрично замещенные кетоны). Вид КД-кривой зависит от строения молекулы и является характеристикой данного вещества. У оптически неактивных соединений «фактор асимметрии» возникает в результате электронных переходов,

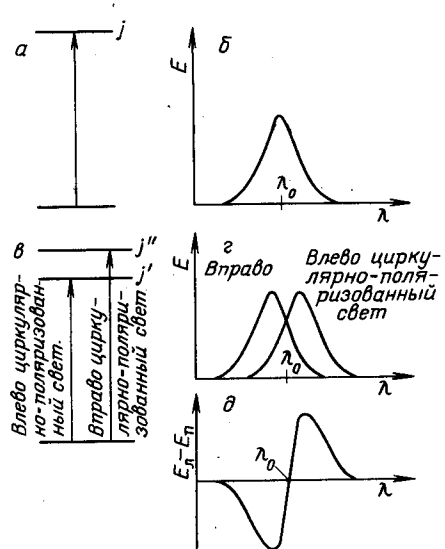


Рис. 3.2.6/1. Схема А-перехода:

а — терм-схема электронного перехода из основного состояния в вырожденное возбужденное состояние j в отсутствие магнитного поля; б — кривая поглощения (переход сопровождается поглощением света с частотами, близкими к резонансным); в — терм-схема перехода при воздействии внешнего магнитного поля (вырожденность устраняется, уровень расщепляется на два подуровня); г — сдвиг кривых поглощений E_d и E_n составляет А-терм МКД-спектра

индуцированных внешним магнитным полем. Величины наведенных эффектов МДОВ и МКД прямо пропорциональны напряженности магнитного поля H . Существуют три вида электронных переходов: А-, В- и С-термы. Учитывая значения этих термов, можно рассчитать значения магнитной мольной эллиптичности:

$$[\theta]_M = 21,3f_1(A) + f_2[B + C/(kT)],$$

где $[\theta]_M$ — мольная магнитная эллиптичность; k — константа Больцмана; T — температура.

На рис. 3.2.6/1 приведены схемы энергетического перехода из основного состояния в возбужденное (А-терм), расщепление возбужденного состояния на два подуровня в магнитном поле и возникновение МКД-спектра. Вклад С-терма можно оценить по температурной зависимости МКД-эффекта, так как только этот терм зависит от температуры.

Приборы

Для измерения МДОВ и МКД используют те же приборы, что и для снятия ДОВ- и КД-спектров, но снабженные магнитом. При работе на более ранних моделях приборов применяют сверхпроводящие магниты, создающие магнитное поле с напряженностью до 5 Т. Современные высокочувствительные приборы позволяют использовать более слабое магнитное поле (до 2 Т), индуцируемое постоянными магнитами или электромагнитами.

Порядок выполнения операций

При выборе растворителя учитывают не только общепринятые ограничения (см. разд. 3.2.3), но также и тот факт, что

практически все вещества, в том числе и растворители, проявляют в магнитном поле оптическую активность. Однако некоторые растворители (например, вода, этанол, толуол) характеризуются слабыми МДОВ- и МКД-эффектами. В тех случаях, когда нельзя пренебречь вкладом растворителя, снимают два спектра: раствора и чистого растворителя, и МДОВ- и МКД-эффекты вещества оценивают по разности этих спектров. Следует также учитывать возможность вклада естественных ДОВ- и КД-эффектов. В этом случае снимают два спектра: в магнитном поле и в нормальных условиях. Съемку спектров проводят так же, как ДОВ и КД (см. разд. 3.2.4).

Количественный анализ результатов

Как правило, применяют лишь МКД-эффект. В зависимости от типа прибора МКД-эффект получают в виде разности поглощений или эллиптичности (см. разд. 3.2.5). Прибор состоит из двух частей: собственно дихрографа и магнита. Учитывая измеренную разность поглощения, рассчитывают вклад, соответствующий мольной магнитной эллиптичности, по уравнению:

$$[\theta]_M = 3300M(\Delta E_M - \Delta E)/(lC),$$

где ΔE_M — разность поглощений, измеренная в магнитном поле; ΔE — разность поглощений, измеренная в нормальных условиях; M — мольная масса, г·моль⁻¹; l — толщина слоя кюветы, см; C — концентрация, г·л⁻¹.

Если измеряется эллиптичность θ , то $[\theta]_M$ рассчитывают по уравнению:

$$[\theta]_M = 33(\theta_M - \theta)/(lC),$$

где θ_M — эллиптичность, измеренная в магнитном поле; θ — эллиптичность, измеренная в нормальных условиях; l — толщина слоя кюветы, см; C — концентрация, моль·л⁻¹.

Высота амплитуды МКД-эффекта прямо пропорциональна напряженности магнитного поля. В связи с этим результаты измерения МКД-эффекта записывают таким образом: строят график зависимости значения мольной магнитной эллиптичности, деленной на значение напряженности магнитного поля ($[\theta]_M H^{-1}$), от длины волны. Только такие спектры можно сравнивать друг с другом. Напряженность магнитного поля измеряют в кГс (килоггаус) или в системе СИ — в единицах тесла (Т) = 10⁴ Гс.

Оформление результатов

МКД-спектр изображен на рис. 3.2.6/2. Порядок оформления результатов приведен в разд. 3.2.4 и 3.2.5.

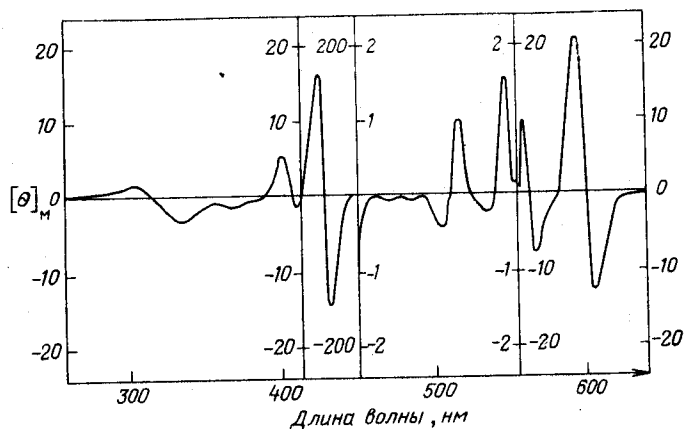


Рис. 3.2.6/2. МКД-спектр дихлоргерманийфенилпорфирина в хлороформе (10^{-6} моль·л $^{-1}$, 4,95 Т)

Область применения

Снятие МКД-спектров комплексов порфиринов с металлами (см. рис. 3.2.6/2) и фталоцианинов для получения ценной информации о магнитном моменте возбужденных электронных состояний.

Снятие МКД-спектров некоторых металлопротеинов (например, гемоглобина, миоглобина и цитохрома С), которые специфически изменяются в зависимости от степени окисления этих веществ, что позволяет проводить кинетические исследования окислительно-восстановительных реакций с использованием небольших количеств вещества. По результатам анализа МКД-спектров можно также судить о типе комплексных связей.

Измерение МКД-эффекта для определения содержания триптофана в белках, так как только этот аминокислотный остаток проявляет выраженный МКД-эффект. Этот метод характеризуется более высокой точностью по сравнению с общепринятым аминокислотным анализом.

Исследование алкалоидов, хлорина, корриновых систем (например, витамина В-12), аннуленов, олефинов и комплексов олефинов с металлами.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- G. Barth, J. H. Dawson, P. M. Dollinger, R. E. Lindner, E. Bunnenberg und C. Djerrassi, Magnetic Circular Dichroism Studies XXXIV — Improved Instrumentation for MCD Measurements, Anal. Biochem. **65**, 100 (1975)
A. J. McCaffery, New Applications for Magnetic Circular Dichroism, Nature Physical Science **232**, 137 (1971)

3.2.7. СПЕКТРОСКОПИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА (ЯМР)

ЯМР — это эффективный метод определения пространственной структуры и идентификации вещества. Этот метод можно использовать для изучения всех ядер, которые обладают собственным моментом количества движения и связанным с ним магнитным моментом.

Физические основы метода

Согласно квантовой механике, собственный момент количества движения (или спин ядра) p принимает строго определенные значения. Так как p является вектором, то он характеризуется величиной и направлением. Различным направлениям p во внешнем магнитном поле соответствуют различные проекции на направление силовых линий магнитного поля (примем, что силовые линии магнитного поля имеют направление вдоль оси z), тогда для проекции момента количества движения на ось z выполняется следующее условие:

$$p_z = mh / (2\pi),$$

где p_z — проекция импульса вращения на ось z (направление магнитного поля); m — магнитное квантовое число; h — постоянная Планка.

Значения p_z определяются магнитным квантовым числом m . Атомным ядрам типа ^1H , ^{13}C и другим соответствуют магнитные квантовые числа $1/2$ и $-1/2$, а атомным ядрам типа ^{14}N — магнитные квантовые числа 1, 0 и -1 . Атомные ядра с нечетным значением массы атомного ядра (например, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P), а также ядра с нечетным порядковым номером, но с четной массой атомного ядра (например, ^2H и ^{14}N) имеют магнитный момент. Из всех вышеперечисленных ядер ^1H и ^{19}F являются самыми удобными для наблюдения ЯМР вследствие их высокого естественного содержания. Исследование ядер с низким естественным содержанием возможно только при помощи Фурье-преобразования.

Во внешнем магнитном поле для спина ядра могут реализовываться две ориентации: вдоль и против направления силовых линий внешнего магнитного поля (рис. 3.2.7/1). Каждому значению спина соответствует определенное значение энергии. Переориентация спина ядра из состояния с меньшей энергией (направление вдоль) в состояние с большей энергией (направление против) сопровождается поглощением энергии ΔE . Такие переходы вызывают воздействия на ядро радиочастотным полем с частотой ν . При этом система поглощает квант энергии при строго фиксированных значениях частоты ν , т. е. наблюдается явление резонанса. Такое поглощение энергии измеряется экспериментально. ΔE прямо пропорционально напряженности магнитного поля

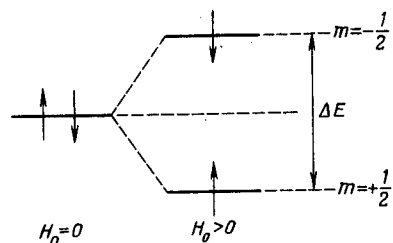


Рис. 3.2.7/1. Подуровни ядра с $I=1/2$

в месте расположения ядра:

$$\Delta E = \gamma \hbar H = h\nu,$$

где $\hbar = h/(2\pi)$; ν — частота; H — напряженность магнитного поля в месте расположения ядра; γ — гиромагнитное отношение (константа ядра).

Значение H обычно отличается от значения внешнего магнитного поля H_0 вследствие влияния соседних ядер и электронов, экранирующих рассматриваемое ядро. Этот эффект используют при структурном анализе молекул методом ЯМР-спектроскопии.

Методы наблюдения ЯМР

В связи с тем, что резонанс различных ядер молекулы происходит при различных частотах, для появления ЯМР плавно изменяют частоту облучения. Для этой цели используют два метода: наблюдение в каждый момент времени только за одной полосой спектра (метод развертки по частоте или по полю); импульсное возбуждение всех ядер образца (Фурье-преобразование).

импульсное возбуждение всех ядер образца (Фурье-преобразование).

Метод развертки. Спектр снимают, плавно изменяя значение радиочастоты или приложенного магнитного поля, вследствие чего последовательно вводится в резонанс каждое ядро молекулы. В результате непрерывной записи интенсивности поглощения в зависимости от частоты или напряженности магнитного поля получают ЯМР-спектр.

Фурье-преобразование. Все ядра одновременно подвергают воздействию радиочастотного импульса продолжительностью $10^{-5} - 10^{-7}$ с, несущего полный набор частот из интересующего экспериментатора диапазона. По окончании действия импульса возбужденные ядра возвращаются в основное состояние, испуская излучение соответствующих частот (больше или меньше несущей частоты ν_0). После Фурье-преобразования полученных результатов с помощью компьютера получают спектр, сопоставимый с ЯМР-спектром, записанным первым методом.

Релаксация

При воздействии радиочастотного поля на ядра атомов наблюдаются переходы атомов с нижнего уровня на верхний. И через некоторое время происходит почти полное выравнива-

ние заселенности уровней. Однако существуют обменные процессы, под действием которых атомы переходят с верхнего уровня на нижний, что сопровождается выделением энергии. Различают два типа обменных процессов:

спин-решеточная релаксация: энергия передается во внешнее окружение (на «решетку»);

спин-спиновая релаксация: энергия передается через систему связей другим электронам.

Химический сдвиг

Для ядер с различным окружением напряженность эффективного магнитного поля $H_{\text{эфф}}$ в месте расположения ядер различна. Это объясняется тем, что значение эффективного магнитного поля зависит от его локального окружения (т. е. от конфигурации электронного облака окружающих ядро групп и спинов соседних ядер). Каждой функциональной группе соответствует характерный ей диапазон значений химических сдвигов, расположенных в более или менее узкой области спектра. Значения химических сдвигов приведены в каталогах и атласах ЯМР-спектров. В табл. 3.2.7/1 приведены значения химических сдвигов для важнейших функциональных групп.

Изменение напряженности эффективного магнитного поля в месте расположения ядра характеризуется константой экранирования σ :

$$H_n = H_0(1 - \sigma),$$

где H_n — напряженность эффективного магнитного поля в месте расположения ядра n .

Так как измерить величину $H_{\text{эфф}}$ практически невозможно, в ЯМР-спектроскопии используют разность резонансных сигналов стандартного и анализируемого веществ. Сдвиг резонансной линии анализируемого вещества относительно стандартного вещества называется химическим сдвигом δ . Значение этой величины строго соответствует строению молекулы. В большинстве случаев в качестве стандарта используют тетраметилсилан (ТМС).

Химический сдвиг зависит от напряженности приложенного магнитного поля H_0 . В связи с этим в зависимости от типа прибора изменяется напряженность и соответственно химический сдвиг одного и того же вещества. Для того чтобы получить независимые от типа прибора результаты, для химических сдвигов ввели величину δ_n :

$$\delta_n = (H_r - H_n)/H_0,$$

где δ_n — химический сдвиг резонансной линии ядра n относительно резонансной линии ядра r .

Резонансные линии сдвигаются в области поля с меньшей или большей напряженностью в зависимости от строения ве-

влево (например, для ароматических соединений). Если ядра расположены в кольце, но выше или ниже плоскости кольца, требуется сильное поле, и сигнал сдвигается вправо (например, для производных ацетиленов и многих ануленов).

Спин-спиновое взаимодействие

Атомы, обладающие магнитным моментом, взаимодействуют друг с другом через связывающие их электроны, а также через пространство. В жидкостях силы взаимодействия взаимно уничтожаются вследствие броуновского движения молекул. В этом случае прямого взаимодействия (через пространство) не наблюдается. Взаимодействие магнитных полей ядер друг с другом через одну или несколько связей называется спин-спиновым взаимодействием. Этот вид взаимодействия проявляется в расщеплении резонансного сигнала в мультиплет, причем число линий, относительные интенсивность и расстояние между линиями в мультиплете поддаются расчету.

На рис. 3.2.7/3 показано, каким образом происходит не прямое взаимодействие между двумя атомами водорода типов А и В, связанными с соседними атомами углерода. Эффективное поле, воздействующее на ядро А, ослаблено либо усилено влиянием локального поля, образованного ядром В, в зависимости от того, ориентировано ли последнее вдоль или против внешнего поля. Вследствие этого резонансная линия для протона А сдвигается в первом случае в сторону меньшей напряженности поля, а во втором — в сторону большей напряженности поля. Поскольку взаимодействие ядер А и В является двухсторонним, резонансный сигнал ядер В также расщепляется на два сигнала (дублет). Поэтому в ЯМР-спектре наблюдаются два дублета, расположен-

Таблица 3.2.7/2. Значения констант взаимодействия

Вид взаимодействия	Фрагмент	Константа взаимодействия, Гц	Вид взаимодействия	Фрагмент	Константа взаимодействия, Гц
Прямое	$C-H$	100—300	Геминальное	$H-C-H$	0—20
Винильное	$H-C=C-H$	2—20	Дальнее	$H-C \equiv C-H$	0—10

ных на расстоянии δ . Расстояние между линиями в дублете называется константой спин-спинового взаимодействия J . Так как взаимодействие между ядрами происходит внутри молекулы, константа взаимодействия не зависит от внешнего магнитного поля. Размерность константы J — Гц. В табл. 3.2.7/2 приведены значения некоторых констант взаимодействия. Если вблизи данного протона находится более одного соседнего протона, то соответственно увеличивается количество статистических возможностей взаимодействия между различными спиновыми состояниями (рис. 3.2.7/4).

Сравнительно просто рассчитывается мультиплетность сигналов при взаимодействии ядер со спиновым квантовым числом $1/2$. Причем эти ядра не обязательно находятся у одного и того же атома углерода. Сигнал ядер А расщепляется под воздействием n ядер В в $(n+1)$ линий. Соотношение интенсивностей линий в мультиплете пропорционально отношению вероятностей дополнительных полей и рассчитывается по правилу треугольника Паскаля:

Синглет	1
Дублет	1 1
Триплет	1 2 1
Квартет	1 3 3 1
Квинтет	1 4 6 4 1

Если соседние ядра в молекуле различаются по своим магнитным свойствам, то ЯМР-спектр усложняется. Приведенную выше формулу для подсчета количества линий в мультиплете и способ определения интенсивностей применяют только для простых спектров, т. е. спектров первого порядка. Такими спектрами называются спектры, у которых разность в химических сдвигах достаточно велика по сравнению с константами взаимодействия. Спектры второго порядка, отличительной чертой которых является равенство значений констант взаимодействия и химических сдвигов, не поддаются анализу по первому порядку.

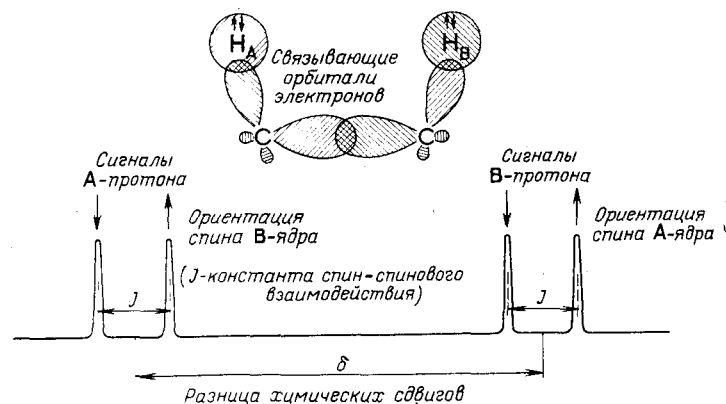


Рис. 3.2.7/3. Схема спин-спинового взаимодействия двух соседних протонов

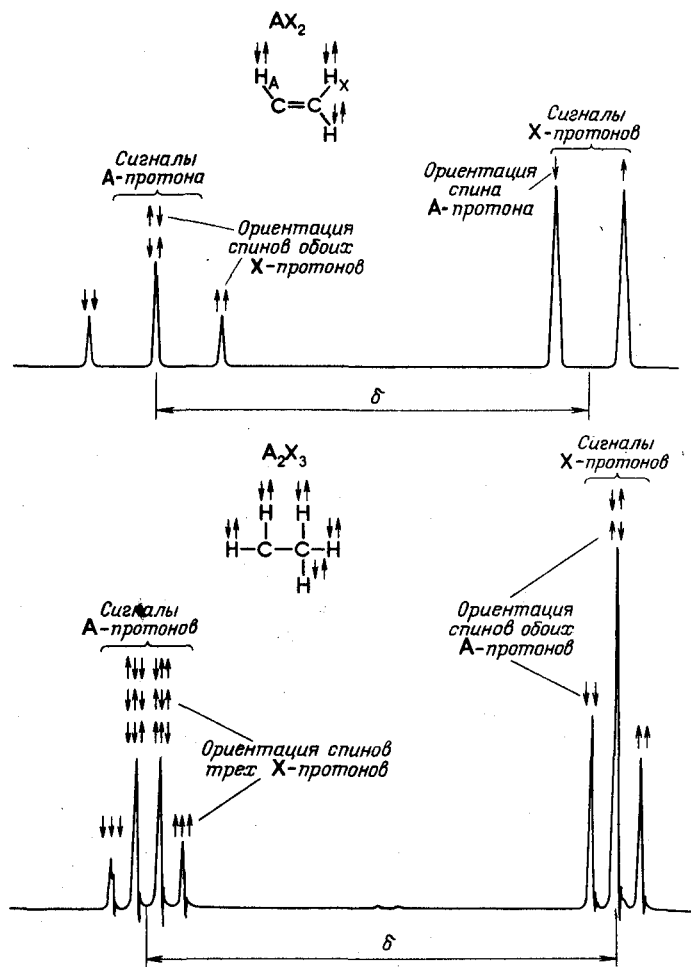


Рис. 3.2.7/4. Схема спин-спинового взаимодействия протонов AX_2 и A_2X_3

Интегрирование

Площадь под линией спектра прямо пропорциональна числу резонирующих протонов. Поэтому соотношение интенсивностей сигналов в ЯМР-спектре пропорционально соотношению числа ядер в чистом веществе. В ряде случаев возможно определение количественного состава смеси.

При количественном анализе смесей методом ЯМР-спектроскопии нет необходимости в чистых образцах анализируемых

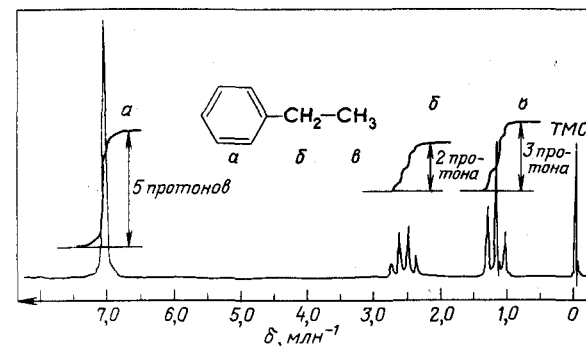


Рис. 3.2.7/5. 1H -ЯМР-спектр 10%-го раствора этилбензола в четыреххлористом углероде при $30^\circ C$ и 60 МГц [Christen H. R., Grundlagen der organischen Chemie, Sauerländer, Aarau und Diesterweg/Salle, Frankfurt 1977, S. 327]

веществ. Это связано с тем, что калибровку прибора проводят не по анализируемому веществу, а по площади сигнала стандарта. В этом случае на интегральной кривой определяют участки, соответствующие площади сигнала одного протона. Поскольку эта площадь известна, то по суммарной площади (интегралу спектра) определяют общее количество протонов в молекуле (рис. 3.2.7/5).

^{13}C -ЯМР-спектры (рис. 3.2.7/6) наблюдают при полном подавлении широкополосного расщепления, обусловленного взаимо-

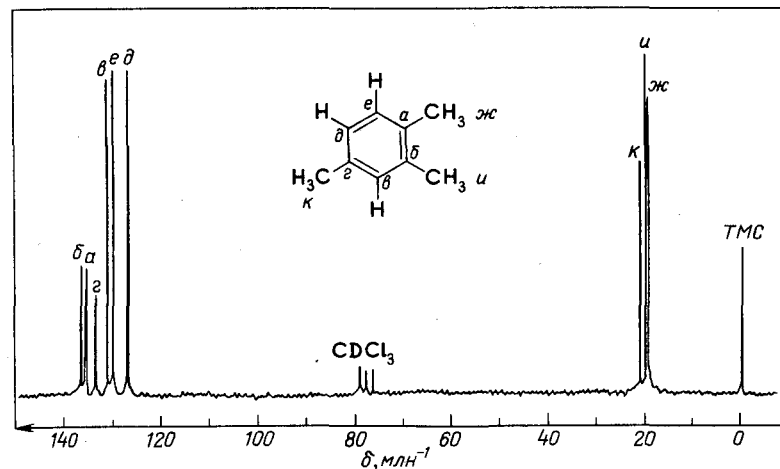


Рис. 3.2.7/6. ^{13}C -ЯМР-спектр 1,2,4-триметилбензола в $CDCl_3$ (широкополосное расщепление подавлено) [Hesse M., Meier H., Zeeh B., Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme, Stuttgart 1979, S. 215, Abb. 3—48b]

действием протонов с ^{13}C -атомами. В соответствии с естественным распределением изотопов вероятность присутствия двух соседних атомов ^{13}C мала, и поэтому взаимодействие между ними не проявляется в спектрах.

^{13}C -ЯМР-спектр с одним сигналом легко анализируется. В отличие от ^1H -ЯМР-спектров, у которых площадь сигнала прямо пропорциональна числу протонов, интенсивность ^{13}C -сигналов зависит от типа атомов углерода, вызывающих появление сигнала в спектре (первичные, вторичные, третичные и четвертичные атомы углерода). В связи с этим интегрирование сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектрах не проводят.

Приборы

На рис. 3.2.7/7 приведена схема ЯМР-спектрометра. Составляющими элементами прибора являются:

- сильный электромагнит (в простых приборах используют постоянный магнит);
- генератор радиочастотного поля;
- свипирующее устройство [позволяет варьировать напряженность магнитного поля (развертка по полю) или частоту высокочастотного генератора (развертка по частоте)];
- датчик, в который помещают ампулу с образцом;
- электронный усилитель и интегратор;
- самописец.

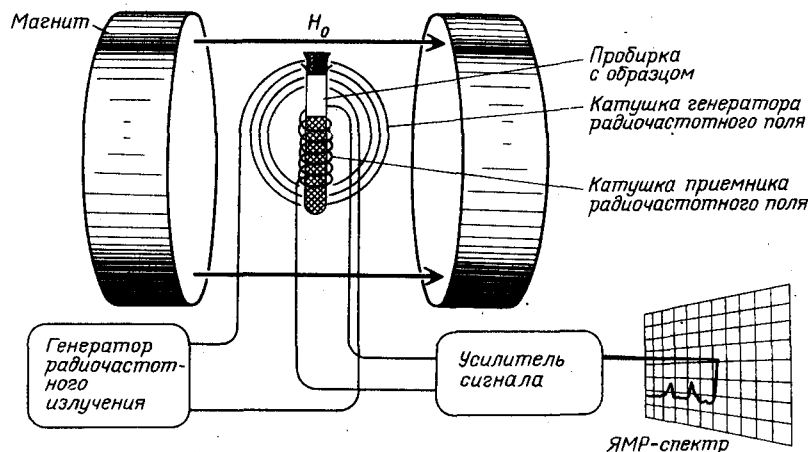


Рис. 3.2.7/7. Принципиальная схема простого ЯМР-спектрометра [Pine S. H., Hendrickson J. B., Cram D. J., Hammond G. S., Organische Chemie, Vieweg, Braunschweig 1987, Bild 5—4]

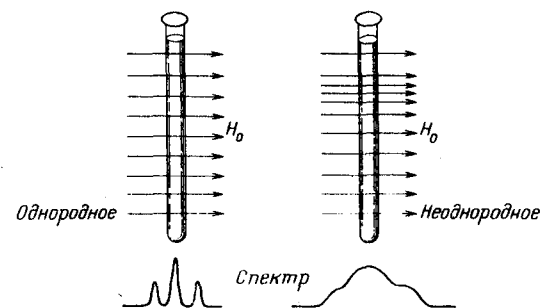


Рис. 3.2.7/8. Влияние неоднородности магнитного поля на разрешение сигналов в ЯМР-спектре

Во многих, прежде всего простых, приборах статическое магнитное поле изменяется с постоянной скоростью, а радиочастотный генератор настроен на 60, 90 или 200 МГц. Радиочастотное поле, излучаемое генератором, передается на катушку передатчика, в которой находится ампула с образцом. При соответствующей силе магнитного поля атомы возбуждаются и переходят с нижнего уровня на верхний, что сопровождается поглощением энергии. При этом сигнал, возникающий в катушке, усиливается электронным усилителем и записывается самописцем (запись зависимости интенсивности резонансных сигналов от напряженности поля). На схеме не обозначены другие катушки, которые позволяют получать более однородное магнитное поле («шиммирующие катушки»).

Влияние неоднородности магнитного поля на разрешение сигналов в ЯМР-спектре показано на рис. 3.2.7/8: в направлении, перпендикулярном оси ампулы, образуется градиент поля, что приводит к уширению сигналов спектра. Это явление связано с увеличением времени релаксации возбужденных ядер. Для предотвращения этого явления ампулу с образцом вместе с закрепленным на ней ротором приводят в движение с помощью воздушного потока. Скорость вращения составляет 30—50 об/с. Таким образом достигается однородность поля. При слишком медленном вращении проявляются так называемые боковые полосы (см. разд. «Источники ошибок»), которые располагаются попарно более или менее симметрично относительно основной полосы. Расстояние от резонансных сигналов и амплитуда боковых полос зависят от скорости вращения образца. Чем выше скорость вращения, тем меньше их интенсивность и тем больше их расстояние от резонансного сигнала. При повышенной скорости вращения в ампуле наблюдается появление завихрений, что также вызывает искажение спектра.

Способ подготовки образцов играет существенную роль при анализе веществ методом ЯМР. Несоблюдение правил подготовки приводит к уменьшению разрешения полос спектра.

Анализируемое вещество растворяют в подходящем растворителе. Использование дейтерированных растворителей ограничивается их высокой стоимостью.

100—300 мг анализируемого вещества растворяют в 0,5—1,0 мл четыреххлористого углерода или, если возможно, в подходящем дейтерированном растворителе [растворители «для ЯМР-спектроскопии», как правило, содержат стандарт — тетраметилсилан (ТМС)]. Если образец растворяют в обычных растворителях, то, как правило, добавляют 1 каплю ТМС. Стандарт хранят в холодильнике из-за его низкой температуры кипения, равной 20 °С. При использовании D₂O в качестве стандарта применяют водорастворимое вещество.

Присутствие в образце частиц во взвешенном состоянии неблагоприятно сказывается на разрешении, поэтому раствор фильтруют с помощью шприца через мембрану. Менее надежным способом является фильтрование с помощью пипетки Пастера, в которую помещен ватный тампон.

В особых случаях (например, при исследовании релаксационных процессов) образец должен быть очищен от растворенного кислорода и следов парамагнитных ионов, которые вызывают значительное уширение линий (влияние растворенного кислорода гораздо слабее).

Порядок выполнения операций

Как правило, ЯМР-спектры снимают при помощи приборов типа ЕМ-360 и ЕМ-390 (описываемый порядок выполнения операций применяют только при работе на приборах аналогичной конструкции).

Ампулу с образцом, на которой закреплен ротор, осторожно вводят в датчик.

Частота вращения ротора составляет 30—50 об/с.

Перо самописца устанавливают таким образом, чтобы сигнал ТМС находился при 0 млн⁻¹. Приводят шкалу самописца в соответствие со шкалой на бланке с помощью ручки «начало отсчета развертки» — «sweep zero».

Устанавливают однородное поле, проводя настройку при помощи шиммирующих катушек по максимуму сигнала ТМС.

Устанавливают соответствующую скорость регистрации (развертки) спектра «sweep time» (см. разд. «Источники ошибок»).

Устанавливают область развертки «sweep range».

Устанавливают начало отсчета «sweep offset» в соответствии

со стандартом (сдвиг области регистрации относительно стандарта).

Устанавливают мощность радиочастотного поля «power» (см. разд. «Источники ошибок»).

RF — фаза радиочастотного поля — устанавливается таким образом, чтобы базовая линия сигнала (например, ТМС) была на одном уровне (см. разд. «Источники ошибок»).

Настраивают амплитуду спектра «spectrum amplitude» (усиление) таким образом, чтобы максимальный сигнал спектра уместился на бланке.

Устанавливают ширину полосы пропускания фильтра «filter bandwidth».

Устанавливают перо самописца в крайнее левое положение. Включают регистрацию спектра «scan».

Интегрирование

Режим интегрирования дает возможность получить информацию об интегралах ЯМР-спектра.

Перо самописца возвращают на нуль ручкой «reset».

В области ЯМР-спектра, свободной от сигналов, устанавливают баланс «balance» таким образом, чтобы перо самописца оставалось неподвижным в течение нескольких секунд (см. разд. «Источники ошибок»).

По значению максимального сигнала устанавливают амплитуду усиления интеграла таким образом, чтобы перо самописца не выходило за пределы бланка (ручка «reset» применяется для возврата самописца в исходное положение). Значение интеграла зависит от скорости развертки.

Настраивают фазу интеграла (см. разд. «Источники ошибок»).

Интегрирование ведут по группам линий, близко расположенных в спектре. После окончания записи одной группы линий базовую линию сбрасывают на нуль ручкой «reset» и проводят запись следующей группы линий. Такой способ позволяет повысить точность записи интеграла.

Установку баланса «balance» и возврат самописца «reset» в исходное положение необходимо проводить перед каждым измерением.

Анализ результатов

При анализе ¹H-ЯМР-спектров:

определяют химические сдвиги и на основании полученных результатов определяют, сколько типов атомов водорода (различающихся химическим окружением) находится в молекуле анализируемого вещества (см. табл. 3.2.7/1);

определяют число линий в мультиплете (мультиплетность сигнала);

определяют константу спин-спинового взаимодействия в одном мультиплете, затем определяют мультиплет соседних протонов с той же самой константой;

по данным интегрирования устанавливают число эквивалентных ядер в молекуле.

Анализ ^{13}C -ЯМР-спектров в большинстве случаев позволяет оценить только химический сдвиг.

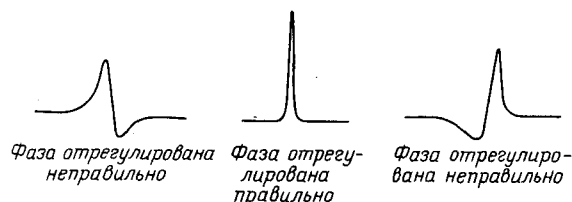
Источники ошибок

При подготовке образца

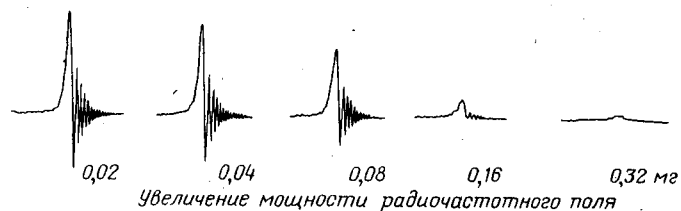
Высокая вязкость анализируемого раствора; наличие в образце парамагнитных соединений: например, не полностью удалены хромовая смесь после промывки ампулы, следы других парамагнитных ионов металлов и кислорода, взвешенных частиц (ведет к появлению широких и плохо разрешенных сигналов).

При работе прибора

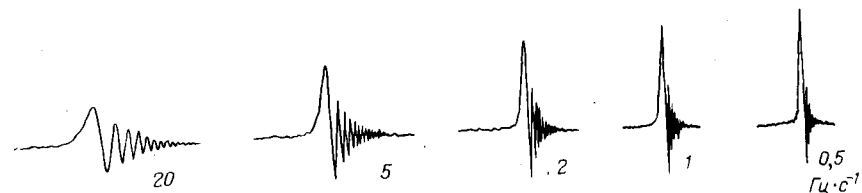
Неправильно отрегулирована фаза.



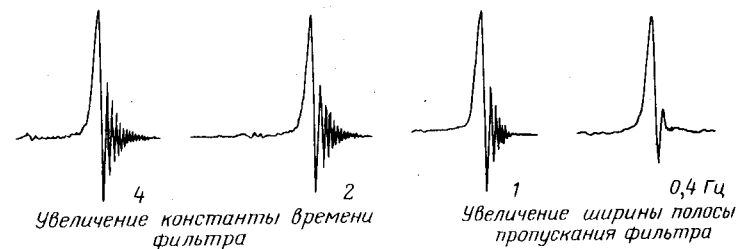
Увеличение интенсивности поля (ведет к возникновению явления насыщения, т. е. уменьшению амплитуды и уширению полосы). Рекомендуется: проводить интегрирование при меньшей интенсивности, так как измерения при насыщении приводят к ошибочным результатам.



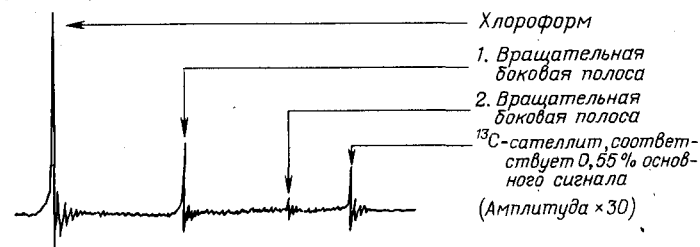
Увеличение скорости развертки (ведет к уширению полосы сигнала, смещению максимума и появлению дополнительных полос, а также перекрыванию сигнала с отклонениями пера; с увеличением времени релаксации эти эффекты усиливаются).



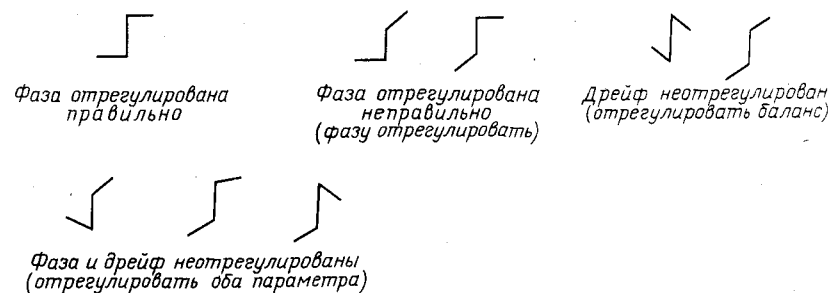
Увеличение константы времени фильтра с одновременным увеличением скорости развертки (ведет к сдвигу максимума и изменению интенсивности сигнала).



Изменение скорости вращения образца [ведет к изменению интенсивности боковых полос и расстояния между ними (боковые полосы должны быть расположены попарно и симметрично относительно основного сигнала); не прямое взаимодействие ^1H - и ^{13}C -ядер ведет к возникновению ^{13}C -сателлитов]. Рекомендуется: поддерживать скорость вращения образца 30—50 об/с.



Проблемы интегрирования.



Затухание сигнала.



Полученное соотношение пиков: 1:2,5:2,5:1
Теоретическое соотношение пиков: 1:3:3:1
Ширина внутренних сигналов больше чем внешних

Более интенсивный сигнал в присутствии слабых сигналов уменьшается и становится шире.

Оформление результатов

Для записи ЯМР-спектра применяют специальные регистрационные бланки. На бланке указывают условия съемки спектра (рис. 3.2.7/9).

Для характеристики структуры ЯМР-спектров применяют следующие сокращения: *s* — синглет, *d* — дублет, *dd* — дублет дублета, *t* — триплет, *q* — квартет, *quint* — квинтет, *sext* — секстет, *sept* — септет, *m* — мультиплет. При характеристике спектра определенного типа (AB, ABX и т. д.) данные о числе линий или мультиплетности не приводят, так как эта информация содержится в обозначении типа спектра. Например, AB-сигнал ($\delta_A = 6,54$; $\delta_B = 5,78$; $J = 110$ Гц).

Пример оформления ^1H -ЯМР-спектра, приведенного на рис. 3.2.7/5: ^1H -ЯМР (CCl_4 , 30°C); $\delta = 1,28$ (*t*, $J = 7$ Гц; 3H , $\text{CH}_2\text{—CH}_3$); $2,5$ (*q*, $J = 7$ Гц; 2H , $\text{CH}_2\text{—CH}_3$); $7,05$ (*s*, 5H , ароматич. H).

Пример записи ^{13}C -ЯМР-спектра, приведенного на рис. 3.2.7/6: ^{13}C -ЯМР (CDCl_3); $\delta = 136,2$; $135,0$; $133,1$ (C—CH_3); $130,5$; $129,5$; $126,5$ (C—H); $20,8$; $19,5$; $19,2$ (CH_3).

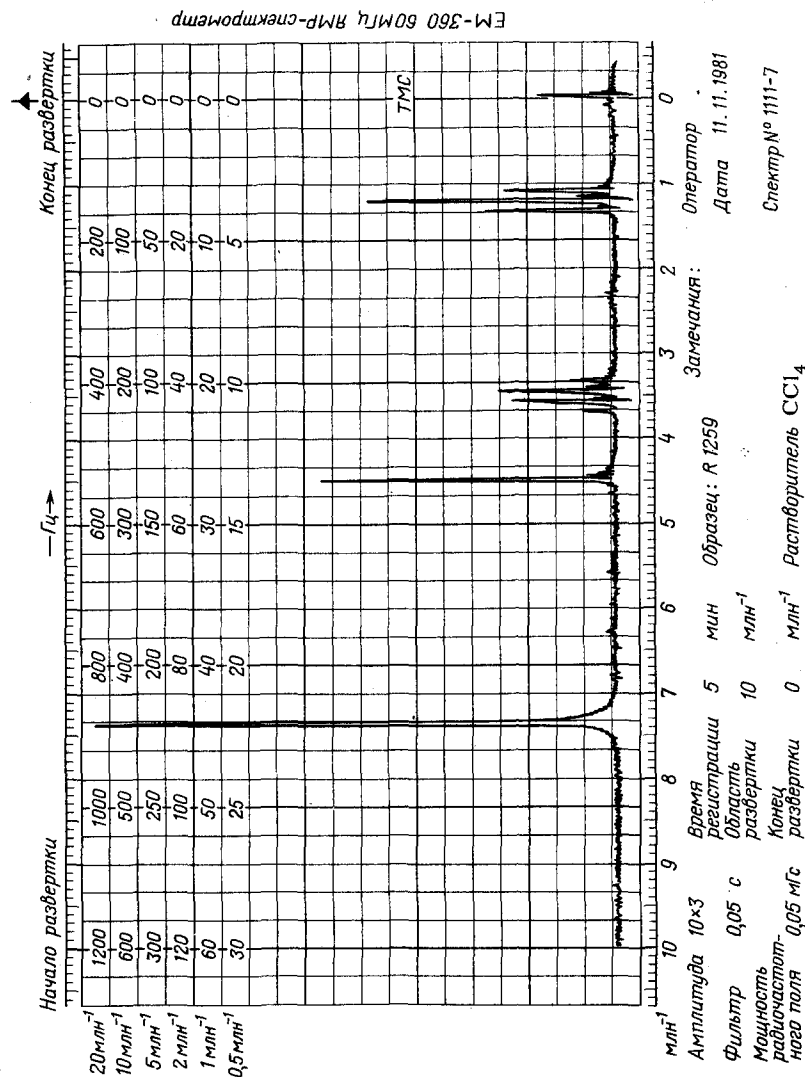
Область применения

Органическая химия, синтез: ЯМР находит широкое применение при установлении структуры органических соединений (стереохимия, конформационный анализ).

Химия природных соединений: определение строения неизвестных соединений. Сочетание ЯМР и масс-спектрометрии позволяет свести к минимуму ошибки в установлении строения вещества. Использование современных ЯМР-спектрометров с сильными магнитами позволяет получить ценную информацию о строении биополимеров.

Химия высокомолекулярных соединений: в большинстве случаев ЯМР является единственным методом решения типичных вопросов химии высокомолекулярных соединений, таких как анализ последовательности и стереорегулярности биополимеров. Осо-

Рис. 3.2.7/9. Заполнение регистрационного бланка ЯМР-спектра



бое значение имеет применение метода ЯМР для исследования твердых веществ.

Кинетические исследования: определение влияния динамических процессов на химические сдвиги (молекулярная подвижность, кинетика реакций, обменные процессы, определение констант равновесия).

Динамические исследования

Определение молекулярной подвижности с помощью измерения релаксационных параметров.

Определение внутримолекулярных расстояний природных соединений по данным зависимости взаимодействия «через пространство» диполей ядер от расстояния между ними.

Изучение кинетики реакций по изменению интенсивности характерных полос реагентов в реакционной смеси. Для быстрых реакций используют струевые методы — остановленной струи и непрерывной струи. Использование этих методов позволяет определить константы равновесия. Однако такие эксперименты требуют значительных затрат.

Исследование обменных процессов в состоянии равновесия (например, кето-енольная таутомерия, H—D-обмен). При медленном обмене, когда время нахождения ядер в одном из положений сопоставимо или больше времени измерения (более 10^{-5} с), наблюдаются отдельные острые сигналы. При ускорении обмена происходит слияние линий и наблюдается усредненный сигнал. На основании температурной зависимости уширения линий в спектре определяют энергию активации обменного процесса.

Шифт-реагенты (сдвигающие реагенты)

Лантанидные комплексы вызывают сильный химический сдвиг при незначительном уширении линий, что приводит к улучшению разрешения спектра. Сдвиги, вызываемые лантанидными реагентами, зависят от их концентрации и вида взаимодействия вещества с реагентом. Применение сдвигающих реагентов дает ценную информацию о стереохимическом строении соединения.

Оптически активные растворители

Определение оптической чистоты и абсолютной конфигурации оптически активных соединений возможно только при определенных условиях. Для этого используют различие во взаимодействии энантиомеров с хиральным растворителем. Наиболее сильный эффект проявляют лантанидные комплексы (см. разд. «Шифт-реагенты»).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- A. Ault, G. O. Dudek, Protonen-Kernresonanz-Spektroskopie, Steinkopff, Darmstadt 1978
E. Breitmaier, G. Bauer, ^{13}C -NMR-Spektroskopie, Thieme, Stuttgart 1977
W. Brügel, Handbook of NMR Spectral Parameters, 3 Bände, Heyden, London 1979
T. Clerc, E. Pretsch, Kernresonanzspektroskopie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1973
H. Günther, NMR-Spektroskopie, Thieme, Stuttgart 1983
M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme, Stuttgart 1984
M.-O. Kaliniowski, S. Berger, S. Braun, ^{13}C -NMR-Spektroskopie, Thieme, Stuttgart 1984
P. F. Knowles, D. March, H. W. E. Rattle, Magnetic Resonance of Biomolecules, Wiley, New York 1976
M. L. Martin, J.-J. Delpuech, G. J. Martin, Practical NMR-Spectroscopy, Heyden, London 1980
D. Michel, Grundlagen und Methoden der Kernmagnetischen Resonanz, Akademie-Verlag, Berlin 1981
D. Shaw, Fourier Transform N. M. R. Spectroscopy, Elsevier, Amsterdam 1984
F. W. Wehrli, T. Wirthlin, Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra, Heyden, London 1980
K. Wüthrich, NMR in Biological Research: Peptides and Proteins, North Holland, Amsterdam 1976
A. Ault, M. R. Ault, Systematic Catalog of NMR Spectra, University Science Books, Mill Valley 1980
E. Breitmaier, G. Haas, W. Voelter, Atlas of Carbon-13 NMR Data, 3 Bände, Heyden, London 1979
W. Bremser, L. Ernst, B. Franke, R. Gerhards, A. Hardt, Carbon-13 NMR Spectral Data, Verlag Chemie, Weinheim 1981 (30 000 Spektren)
C. J. Pouchert, J. R. Campbell, The Aldrich Library of NMR Spectra, Aldrich Chem. Comp., Milwaukee 1974—1979
E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibel, W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer, Berlin 1981
Sadtler Standard NMR Spectra, Sadtler Res. Lab., Philadelphia 1967 (ca. 15 000 Spektren)
Varian High Resolution NMR Spectra Catalog, 2. Bd., Varian Ass., Palo Alto 1963 (7000 Spektren)

3.2.8. СПЕКТРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА (ЭПР)

Метод ЭПР основан на измерении поглощения веществом энергии внешнего магнитного поля. Такое поглощение сопровождается переходами электронов с одного энергетического уровня на другой. Метод ЭПР служит для изучения внутримолекулярного окружения неспаренных электронов.

Физические основы метода

Если электрон поместить в однородное магнитное поле H_0 и воздействовать на него высокочастотным магнитным полем H , направление которого перпендикулярно направлению H_0 , то при определенных соотношениях между напряженностью постоянного

поля H_0 и частотой переменного поля наблюдается резонансное поглощение энергии переменного поля. Такое резонансное поглощение индуцирует переходы электронов между различными уровнями, обусловленные различной пространственной ориентацией спина в магнитном поле (ориентация спинов вдоль и против направления магнитного поля). При количественной оценке спектра в качестве основного параметра используют расстояние между линиями ЭПР-спектра, измеряемое в миллитесла (мТ) (см. разд. «Оформление результатов»). Каждому радикалу соответствует определенный набор линий в ЭПР-спектре. В связи с этим ЭПР-спектр используют для идентификации радикалов. Переход, вызванный поглощением электромагнитной энергии, зависит от частоты переменного магнитного поля H :

$$h\nu = \Delta E = g\mu_B H_0,$$

где h — постоянная Планка; ν — частота; ΔE — разность энергий; g — фактор магнитного расщепления; μ_B — магнетон Бора ($9,27 \cdot 10^{-24}$ Дж/Т); H_0 — напряженность внешнего однородного магнитного поля.

При поглощении энергии высокочастотного излучения индуцируются переходы электронов на более высокие энергетические уровни, причем величину поглощенной энергии можно измерить.

На рис. 3.2.8/1, а схематически изображена беспорядочная ориентация спинов электронов в отсутствие внешнего магнитного поля. При этом их энергии одинаковы. В постоянном магнитном поле для каждого электрона возможны только две спиновые ориентации, которым соответствуют спиновые квантовые числа $m_s = +1/2$ и $m_s = -1/2$. Магнитные моменты электронов ориентированы соответственно направлению внешнего магнитного поля

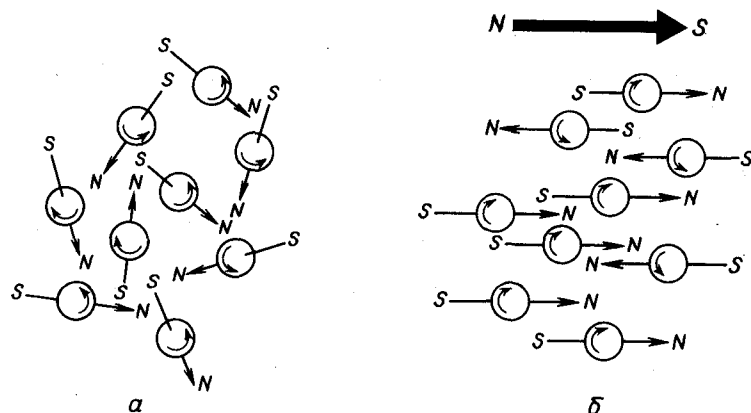
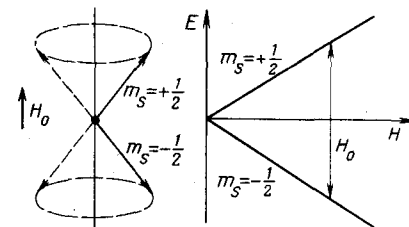


Рис. 3.2.8/1. Ориентация спинов электронов в отсутствие внешнего магнитного поля (а) и под воздействием внешнего магнитного поля (б) [Swartz H. M., Bolton J. R., Borg D. C., Biological Applications of Electron Spin Resonance, Wiley-Interscience, New York 1972, p. 4]

Рис. 3.2.8/2. Диаграмма энергетических уровней электронов с различными спинами во внешнем магнитном поле



(рис. 3.2.8/1, б). Электроны с ориентацией спинов вдоль поля находятся на более высоком энергетическом уровне, электроны с ориентацией против поля — на низком, более стабильном уровне (рис. 3.2.8/2).

В основе ЭПР, как и ЯМР, лежит принцип магнитного резонанса. Однако ЭПР-сигналы, в отличие от ЯМР-сигналов при одном и том же значении напряженности постоянного магнитного поля, расположены в области более высоких частот (микроволновая область). Это объясняется большим значением магнитного момента электрона по сравнению с протоном, что связано с наличием в молекуле одного неспаренного электрона. Из приведенного выше соотношения следует, что частота, при которой происходит резонанс, пропорциональна напряженности внешнего магнитного поля. ЭПР-спектр получают, изменяя как H_0 , так и ν . Однако на практике более удобно сканирование по H_0 . Иногда вместо величин H_0 и ν используют фактор пропорциональности — g -фактор, который рассчитывают по приведенному выше уравнению. Значение g -фактора для свободного электрона составляет 2,002319, для неспаренных электронов в молекулах — от 1 до 6. В связи с тем, что для большинства свободных радикалов значение g -фактора лишь незначительно отличается от значения g -фактора свободного электрона (табл. 3.2.8/1), его измеряют с точностью до четвертого или пятого знака после запятой. Значение g -фактора неспаренного электрона зависит от его химического окружения (аналогично химическому сдвигу в ЯМР-спектроскопии (см. разд. 3.2.7)).

Таблица 3.2.8/1. Значения g -факторов некоторых соединений (Swartz H. M., Bolton J. R., Borg D. C., Biological Applications of Electron Spin Resonance, Wiley-Interscience, New York, 1972, p. 24)

Соединение	g -Фактор	Соединение	g -Фактор
Порфиринкатионы	2,0024—2,0028	Серосодержащие радикалы	2,02—2,06
Флавосемихиноны	2,0030—2,0040	Комплексы меди (II)	2,0—2,06
Бензосемихиноны	2,0040—2,0050	Комплексы железа (III) (low-spin)	1,4—3,1
Оксиды азота	2,0050—2,0060	Комплексы железа (III) (high-spin)	2,0—9,7
Пероксидные радикалы	2,01—2,02		

Сверхтонкая структура возникает в спектрах ЭПР вследствие взаимодействия неспаренного электрона с магнитными моментами ядер. Между электроном и любым ядром, обладающим магнитным моментом, возникает спин-спиновое взаимодействие. Такое взаимодействие, как и в ЯМР-спектроскопии, приводит к расщеплению, называемому сверхтонким. Число линий, возникающих при сверхтонком расщеплении, равно 2^n , где n — число ядер с $I = 1/2$. Такой сверхтонкий спектр используют как «отпечаток пальцев» при идентификации радикалов.

Приборы

Для сравнения на рис. 3.2.8/3 приведены две схемы: спектрофотометра и ЭПР-спектрометра. В качестве источника излучения сверхвысокочастотного поля при ЭПР-спектроскопии используют специальную радиолампу — клистрон. Образец помещают между полюсами электромагнита, где он поглощает энергию высокочастотного поля; измеренная разность энергий усиливается и регистрируется. Ввиду сложности конструкций ЭПР-спектрометров их более подробное описание не приводится.

В современных приборах используют следующие частоты СВЧ-поля: $\nu = 9,5$; 24 и 35 ГГц, при длине волны соответственно $\lambda = 3,2$; 1,25 и 0,85 см. Большинство исследований выполняют при частоте 9,5 ГГц и силе магнитного поля 0,32 Т.

Порядок выполнения операций

Образец помещают в тонкие стеклянные ампулы или плоские кюветы. Для приготовления растворов используют растворители

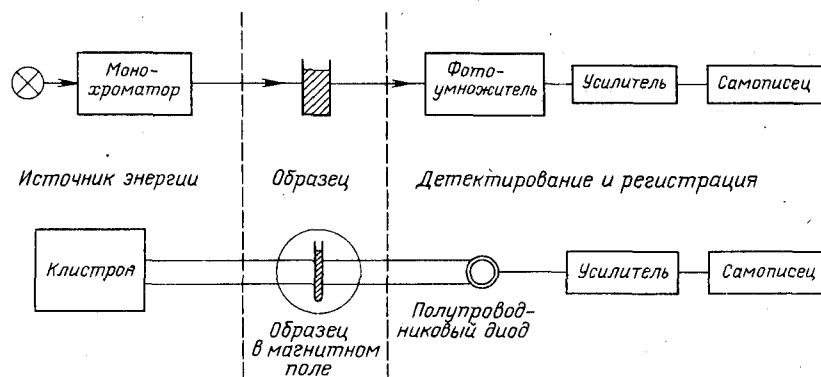


Рис. 3.2.8/3. Сравнение принципиальных схем спектрофотометра и ЭПР-спектрометра [Swartz H. M., Bolton J. R., Borg D. C., Biological Applications of Electron Spin Resonance, Wiley-Interscience, New York 1972, p. 65]

с низкой диэлектрической проницаемостью (например, тетрагидрофуран, циклогексан или толуол). Растворители с высокой диэлектрической проницаемостью (например, вода и спирты) не применяют из-за сильного поглощения ими энергии.

Для проведения анализа требуется очень небольшое количество образца, так как ЭПР-метод весьма чувствителен. Чувствительность метода составляет 10^{-8} моль·л⁻¹ свободных радикалов в диамагнитных веществах. С учетом возможности релаксационных процессов образец разбавляют до концентрации 10^{-5} моль·л⁻¹. Перед анализом предварительно подбирают оптимальные условия его проведения.

Анализ результатов

В большинстве случаев ЭПР-спектр записывают в дифференциальном виде (рис. 3.2.8/4). На рис. 3.2.8/5 изображен спектр соединения с одним неспаренным электроном. Из вида спектра (квинтет триплетов) следует, что в образце содержится один тип радикала. При характеристике спектра указывают следующие параметры: ширину и интенсивность линий; g -фактор; тонкую структуру (приводится прежде всего для неорганических соединений); сверхтонкую структуру.

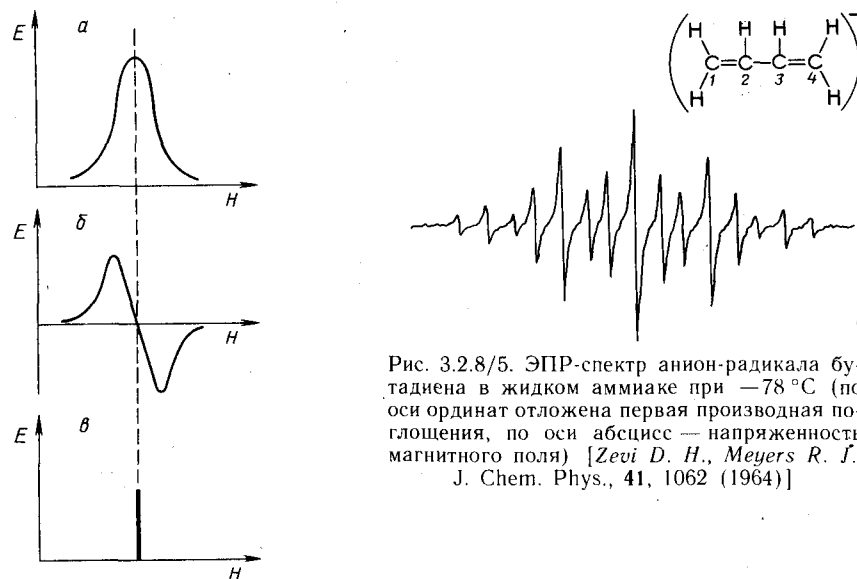


Рис. 3.2.8/5. ЭПР-спектр анион-радикала бутадиена в жидком аммиаке при -78°C (по оси ординат отложена первая производная поглощения, по оси абсцисс — напряженность магнитного поля) [Zevi D. H., Meyers R. J., J. Chem. Phys., 41, 1062 (1964)]

Рис. 3.2.8/4. Формы записи ЭПР-спектра:

а — обычная; б — дифференциальная (по первой производной); в — в виде линий

Площадь под ЭПР-сигналом пропорциональна числу неспаренных электронов, содержащихся в образце. Точное положение сигнала определяют по точке перегиба первой производной кривой поглощения. В большинстве случаев положение сигнала в ЭПР-спектре характеризуют значением g -фактора. Сверхтонкая структура (СТС), возникающая в спектрах в результате взаимодействия спина электрона с магнитными моментами соседних ядер той же самой молекулы, является важной характеристикой. Вид СТС определяется количеством ядер, вступающих во взаимодействие, и силой их взаимодействия. Особое значение имеет расщепление, вызываемое ядрами водорода и фтора. Величина взаимодействия между неспаренным электроном и ядром указывает на характер распределения электронной плотности. Для точной интерпретации ЭПР-спектра необходимы специальные знания и практический опыт.

Источники ошибок

В образце содержатся примеси парамагнитных соединений.
В растворителе присутствует кислород.

Оформление результатов

В качестве характеристики спектров в литературе, как правило, приводят параметр взаимодействия (сверхтонкое расщепление) a . Спектр, приведенный на рис. 3.2.8/5, характеризуется следующими значениями параметров: $a_H^2 = 0,279$ мТ; $a_H^4 = 0,762$ мТ.

Область применения

Метод ЭПР применяют для анализа всех соединений, содержащих неспаренные электроны, независимо от их агрегатного состояния. Область применения определяется конструкцией кюветы. Для проведения кинетических исследований применяют специальные проточные системы. Кроме того, сконструированы кюветы, позволяющие получить радикалы некоторых диамагнитных соединений (непосредственно в образце) с помощью фотолиза, радиолиза и окислительно-восстановительных реакций. ЭПР является одним из самых чувствительных методов, предел чувствительности составляет 10^{-11} моль \cdot л $^{-1}$.

Радикалы: доказательство существования, идентификация, определение концентрации, кинетика, динамика быстрых процессов (время полупревращения до 10^{-8} с).

Получение свободных радикалов непосредственно в образце (окислительно-восстановительные реакции, фотолиз и радиолиз).

Определение строения на основании распределения электронной плотности.

Металлопротеины и комплексные соединения: соединения с высокими и низкими значениями g -фактора.

Радикальная полимеризация олефинов.

Металлы (система резонансных сигналов электронов).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

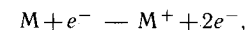
- H. M. Assenheim*, Introduction to Electron Spin Resonance, Plenum Press, New York 1967
N. M. Atherton, Electron Spin Resonance, Wiley, New York 1973
L. A. Bljumenfeld, W. W. Wojewodski, A. G. Semjonow, Die Anwendung der paramagnetischen Elektronenresonanz in der Chemie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1966
G. E. Pake, Paramagnetic Resonance, W. A. Benjamin, New York 1958
K. Scheffler, H. Stegmann, Elektronenspinresonanz, Springer, Berlin 1970
H. M. Swartz, J. R. Bolton, D. C. Borg, Biological Applications of Electron Spin Resonance, Wiley-Interscience, New York 1972

3.2.9. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ (МС)

Масс-спектрометрия основана на получении ионов из нейтральных молекул путем воздействия на них пучком электронов, обладающих энергией, достаточной для ионизации. При этом главным образом образуются положительные ионы, которые могут распадаться на отдельные фрагменты. Регистрируемая зависимость ионных токов от массы отдельных фрагментов называется масс-спектром.

Физические основы метода

Молекула, возбужденная в результате взаимодействия с электроном (с энергией более 10^3 кДж \cdot моль $^{-1}$, или 70 эВ), распадается с образованием положительного молекулярного иона и электрона (ионизация):



где M^+ — молекулярный ион.

В большинстве случаев молекулярный ион обладает значительной внутренней энергией и быстро распадается далее (10^{-8} — 10^{-10} с) с образованием заряженных и незаряженных фрагментов (фрагментация):



Эти осколочные ионы в свою очередь могут распадаться далее с образованием новых фрагментов. В некоторых случаях фрагментация сопровождается перегруппировками. Процесс фрагментации молекулярных ионов происходит до тех пор, пока не обра-

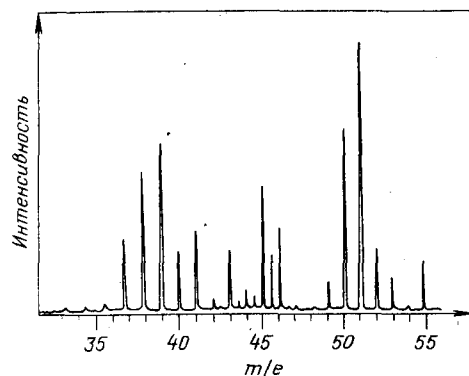


Рис. 3.2.9/1. Масс-спектр

зуются ионы, внутренней энергии которых недостаточно для их дальнейшего превращения. Образующиеся молекулярный ион и его фрагменты детектируются по их массовым числам, представляющим отношение m/e , т. е. массы к заряду. Так как в большинстве случаев образуются однозарядные ионы, то соотношение m/e соответствует массе иона. Масс-спектрометры работают при высоком вакууме, что сводит к минимуму нежелательные межмолекулярные реакции и, кроме того, благоприятствует внутримолекулярной фрагментации.

Масс-спектр представляет собой спектр линий положительно заряженных ионов (ширина пиков на половине высоты в процессе записи остается постоянной) (рис. 3.2.9/1). Этим масс-спектрометрия значительно отличается от других спектрометрических методов, для которых характерно перекрывание полос. Несмотря на то что реальной связи между масс-спектрометрией и оптической спектрометрией не существует, оба метода называются спектрометрическими из-за формального сходства графических изображений спектров.

При получении масс-спектров большое значение имеют три процесса:

- ионизация молекул электронным ударом; ускорение образовавшихся ионов в электрическом поле;
- разделение ионов по величине m/e в электрическом и магнитном полях;
- детектирование и регистрация ионов.

Пики изотопов

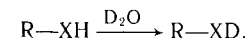
В связи с тем что многие вещества содержат несколько изотопов, в масс-спектре пики молекулярного иона и его фрагментов сопровождаются изотопными линиями: $M+1$, $M+2$ и т. д.

Таблица 3.2.9/1. Относительное естественное содержание изотопов некоторых элементов

Изотоп	Относительное содержание, %	Изотоп	Относительное содержание, %
^1H	99,985	^{29}Si	4,710
$^2\text{H}(\text{D})$	0,015	^{30}Si	3,110
^{12}C	98,892	^{31}P	100,00
^{13}C	1,108	^{32}S	95,018
^{14}N	99,635	^{33}S	0,750
^{15}N	0,365	^{34}S	4,215
^{16}O	99,759	^{35}Cl	75,529
^{17}O	0,037	^{37}Cl	24,471
^{18}O	0,204	^{79}Br	50,520
^{19}F	100,00	^{81}Br	49,480
^{28}Si	92,18	^{127}I	100,00

(M — молекулярная масса). Картина распределения изотопных линий определяется содержанием изотопов каждого элемента в веществе. Учет изотопного состава при анализе спектра значительно упрощает интерпретацию спектра, а также уменьшает число возможных суммарных формул. Три элемента: ^{19}F , ^{31}P и ^{127}I не имеют изотопов (табл. 3.2.9/1).

Для выяснения механизмов фрагментации используют метод включения изотопной метки. Соответствующую молекулярную массу легко определяют масс-спектрометрически. В качестве изотопной метки в большинстве случаев используют дейтерий:



Возникающее при этом смещение спектральных линий в некоторых случаях имеет решающее значение при идентификации фрагментов.

Масс-спектрометрия высокого разрешения

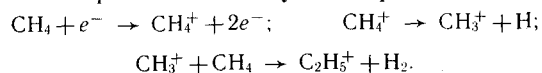
Среди фрагментов, образующихся при электронном ударе, могут появиться ионы, характеризующиеся малым различием масс (в пределах одной единицы атомной массы). Современные приборы позволяют различать ионы с различием масс в пределах 10^{-3} единиц атомной массы. Таким образом, формулу каждого фрагмента устанавливают независимо от относительной интенсивности изотопных линий и с высокой точностью определяют малые различия масс, например различие между $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ ($M=27,9949$) и $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ($M=28,0062$).

В результате дальнейшего развития масс-спектрометрии разработан ряд новых, селективных методов ионизации, позволяющих преодолеть недостатки, свойственные масс-спектрометрии электронного удара. Применение таких методов обеспечивает подавление реакции фрагментации и позволяет исследовать термоблабильные соединения.

При воздействии на молекулу исследуемого вещества сильного электрического поля ($10^8 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$), созданного на точечном электроде (платина или вольфрам), происходит мягкая ионизация с образованием положительных ионов. Основное различие между этим методом и электронным ударом заключается в том, что ионы образуются на твердой поверхности, а не в газовой фазе. При ионизации полем наблюдается низкая степень фрагментации, так как энергии, полученной молекулами образца, достаточно только для их собственной ионизации. В связи с этим метод широко применяют для структурных исследований высокомолекулярных соединений или веществ, не образующих при электронном ударе молекулярного иона, например углеводов, пептидов и других природных соединений. При работе с высокомолекулярными соединениями или термически неустойчивыми веществами используют модифицированный метод полевой ионизации — метод десорбции полем. При этом раствор органического вещества наносят непосредственно на анод. Метод десорбции полем используют, например, для получения молекулярных ионов нуклеотидов и четвертичных аммонийных солей.

Химическая ионизация (ХИ)

Этот метод основан на разбавлении образца избытком газа-«реагента» ($>10^3$) (аммиак или метан). Вероятность столкновения электронов с молекулами образца при электронном ударе слишком мала, так как концентрация образца также мала. В связи с этим в первую очередь ионизируются молекулы газа-«реагента». В случае метана протекают следующие реакции:



Полученные в избытке катионы взаимодействуют с гетероатомами (азот и кислород), входящими в состав анализируемого вещества, путем переноса протона, например:



Интенсивность образующихся квазимолекулярных ионов $(M+1)^+$ относительно высока, в то время как интенсивность молекулярных ионов — мала. Если в образце отсутствуют акцепторы протонов, то образование квазимолекулярных ионов $(M-1)^+$ сопровождается отщеплением гидрид-ионов.

Эта комбинация является более эффективной, чем каждый метод в отдельности. Вначале смесь фракционируют с помощью газовой хроматографии, а затем полученные фракции исследуют масс-спектрометрически (рис. 3.2.9/2 и 3.2.9/3). Без предвари-

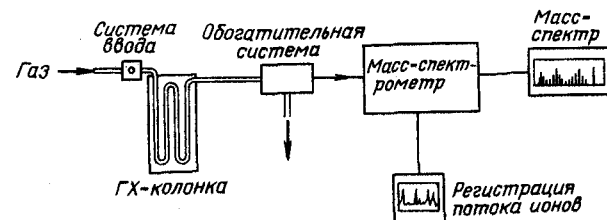


Рис. 3.2.9/2. Блок-схема проведения комбинированного метода ГХ/МС (только часть газа-носителя, выходящего из газохроматографической колонки, после прохождения через обоганительную систему попадает в источник ионов масс-спектрометра; выходящий из ионного источника ионный поток служит для регистрации газохроматографического разделения)

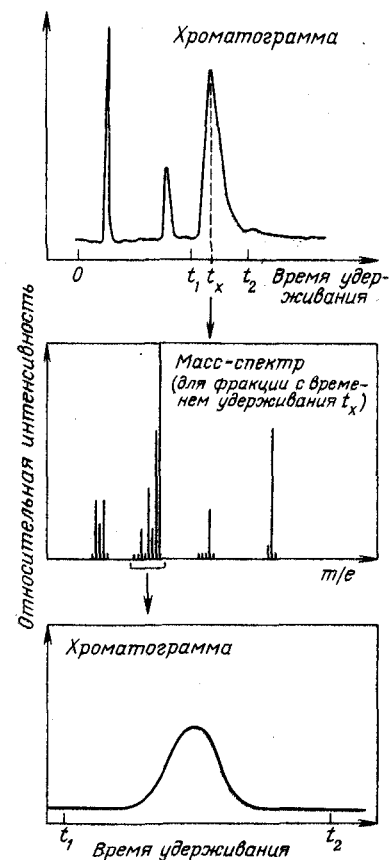


Рис. 3.2.9/3. Результаты анализа комбинированным методом ГХ/МС

тельного разделения исходной смеси получается слишком сложный масс-спектр, что значительно затрудняет его анализ. С другой стороны, непосредственный масс-спектрометрический анализ фракций, полученных в результате газовой хроматографии, невозможен из-за значительного разведения образца газом-носителем. Для концентрирования полученных фракций используют сепараторы, принцип действия которых основан на диффузии газа через пористую стеклянную трубку. Основной трудностью при соединении хроматографической колонки с ионным источником является разность давлений — около 10^5 Па. Для решения этой задачи используют сепараторы различных типов, конструкции которых в этой книге не рассматриваются. Выходящие из колонки фракции подвергаются ионизации в масс-спектрометре с последующей записью масс-спектра полученных фрагментов. При этом достигается высокая чувствительность детекции в интервале 10^{-9} — 10^{-12} моль (см. разд. 2.4).

Разработанные в последнее время новые модификации метода — бомбардировка ускоренными атомами и активация соударениями — в этой книге не рассматриваются.

Приборы

Устройство масс-спектрометра схематично изображено на рис. 3.2.9/4. Схема системы ввода образца представлена на рис. 3.2.9/5. В большинстве случаев для одного и того же образца записывают несколько спектров при различной чувствительности, что позволяет регистрировать с одинаковой точностью сигналы высокой и низкой интенсивности. В настоящее время большое количество измерений обрабатывается с помощью компьютера, присоединенного непосредственно к масс-спектрометру. Существенное преимущество такой обработки спектров заключается в

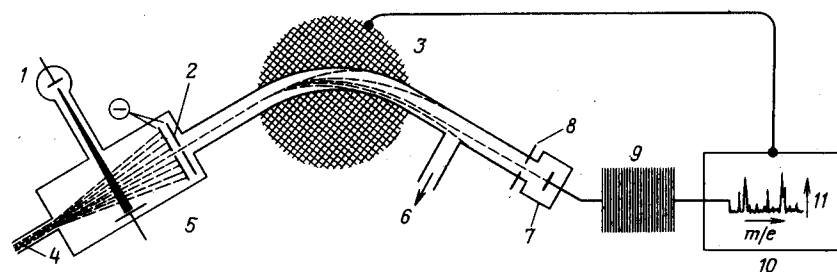


Рис. 3.2.9/4. Схема масс-спектрометра:

1 — источник электронов; 2 — ускоритель (пластины и щель); 3 — переменное магнитное поле; 4 — ввод образца; 5 — ионный источник для ионизации электронным ударом; 6 — к вакуумному насосу; 7 — ионный коллектор; 8 — щель; 9 — усилитель; 10 — масс-спектр; 11 — интенсивность [Pine S. H., Hendrickson J. B., Cram D. J., Hammond G. S., Organische Chemie, Vieweg, Braunschweig 1987, Bild 5—1]

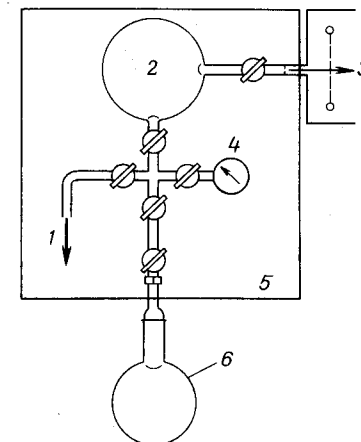


Рис. 3.2.9/5. Система ввода образца в масс-спектрометр:

1 — к насосу; 2 — резервуар; 3 — ионизационная камера; 4 — манометр; 5 — печь; 6 — колба с образцом [Pado D. J., Johnson C., Laboratory Text for Organic Chemistry, Prentice-Hall, Englewood Cliffs/NJ 1979, fig. 7.4, p. 272]

том, что полученные результаты сохраняются в банке данных, вследствие чего всегда существует возможность сравнения спектра неизвестного вещества с известными данными.

Подготовка пробы

При ионизации электронным ударом необходимо, чтобы образец находился в парообразном состоянии. При этом минимальное давление паров образца должно составлять около 10^{-4} Па (это давление легко достигается для большинства органических соединений). Газы и легколетучие жидкости подаются в камеру из стеклянного резервуара через отверстие малого диаметра, твердые образцы и высококипящие жидкости — при помощи системы прямого ввода. Нелетучие соединения переводят в летучие методом модификации по функциональным группам (например, ацелирование, перметилирование). Подготовленную пробу вводят при помощи шприца в систему ввода.

Для проведения масс-спектрометрических исследований рекомендуется применять чистые образцы, однако небольшое количество примесей не мешает анализу спектра. Примеси с более высокой молекулярной массой, чем молекулярный ион, могут быть легко идентифицированы в спектре.

Анализ результатов

При записи спектра на ось абсцисс наносят значения m/e , а на ось ординат — относительные интенсивности ионных токов. Анализ масс-спектра проводят следующим образом: интенсивность самого большого пика принимают равной 100%. Этот пик называют основным, и интенсивность остальных пиков выражают в процентах от основного. Причем подсчет начинают с $m/e=28$ (N_2^+),

Таблица 3.2.9/2. Разность масс и соответствующие структурные фрагменты

Разность масс	Вероятный фрагмент	Вероятный класс соединения
1	H	Альдегиды, ацетали, фенолы, алифатические амины
16	NH ₂	Амиды
17	OH	Спирты, карбоновые кислоты
18	H ₂ O	Спирты, альдегиды
26	C ₂ H ₂	Ароматические углеводороды
28	CO, N ₂	Кислородсодержащие гетероциклы, хиноны
29	CHO	Альдегиды, фенолы
31	CH ₃ O	Метилвые эфиры карбоновых кислот, метилацетали, диметилвый эфир
35	Cl	Алкилхлориды, ацилхлориды
36	HCl	То же
44	CO ₂	Эфиры, ангидриды
45	C ₂ H ₅ O	Этиловые эфиры карбоновых кислот, диэтиловый эфир
46	NO ₂	Нитросоединения

32 (O₂⁺) или 18 (H₂O). Затем рассчитывают пики, соответствующие примесям.

Следующим этапом является идентификация пика молекулярного иона, который, как правило, легко обнаружить. Однако в случае быстрого фрагментирования его обнаружение практически невозможно. Следует также учитывать, что пик молекулярного иона не всегда бывает основным в спектре. Как правило, определение его молекулярной массы проводят с высокой точностью. Следующим этапом является нахождение разницы масс между молекулярным ионом и другими ионами, полученным фрагментацией основного молекулярного иона. Примеры таких фрагментов и соответствующих им разниц масс приведены в табл. 3.2.9/2.

Согласно «правилу азота», молекулярная масса молекулярного иона является четной, если молекула образца не содержит атомов азота или содержит четное число атомов азота.

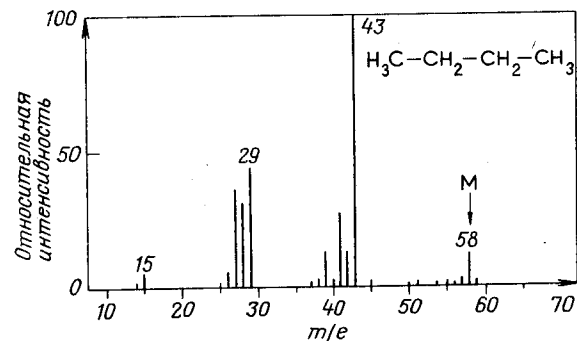
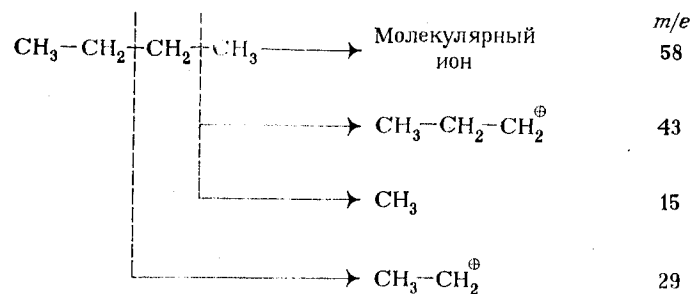


Рис. 3.2.9/6. Масс-спектр *n*-бутана

Таблица 3.2.9/3. Схема фрагментации *n*-бутана



Молекулы с нечетным количеством атомов азота характеризуются нечетной молекулярной массой. Наличие в спектре групп пиков свидетельствует о присутствии изотопов. В спектрах соединений, легко распадающихся при ионизации, пик молекулярного иона имеет низкую интенсивность по сравнению с интенсивностью его фрагментов.

Разницам масс между молекулярным ионом и другими фрагментами приписывают определенные структурные элементы (см. табл. 3.2.9/2 и разд. «Библиографический список») и таким образом устанавливают характеристическую серию фрагментов, называемую схемой фрагментации молекулярного иона. В качестве примера на рис. 3.2.9/6 представлен масс-спектр *n*-бутана. В табл. 3.2.9/3 приведена схема фрагментации *n*-бутана. На первой стадии фрагментации отщепляется метильный радикал (*m/e* = 15) с образованием пропилкарбониевого иона (*m/e* = 43). Возможно также отщепление этильного радикала с образованием этилкарбониевого иона (*m/e* = 29).

Для анализа масс-спектров можно дать только общие рекомендации, так как для более точного анализа необходимо изучение и сопоставление масс-спектров многих соединений известного строения. Это прежде всего относится к анализу спектров сложных молекул с разнообразными механизмами фрагментации. Такой эмпирический подход был широко использован для расшифровки большинства известных в настоящее время схем фрагментации. Эти схемы наряду с табличными данными значительно облегчают анализ спектров неизвестных соединений.

Источники ошибок

При анализе масс-спектров необходимо определять области спектра, соответствующие примесям, содержащимся в образце. Особое внимание следует обращать на проявление в спектре следов растворителя, смазки для шлифов и пластификаторов. Сле-

дует также учитывать, что при повышенных температурах в системе ввода могут происходить химические превращения вещества, усложняющие масс-спектр (необходимо проявлять осторожность при сравнении спектров). При ионизации спиртов в результате реакции дегидратации может происходить образование олефинов, что также усложняет картину спектра. Чтобы исключить побочные реакции, необходимо проводить измерения при более низких температурах или стабилизировать вещество методом модификации.

Оформление результатов

В рабочем журнале масс-спектры приводят в виде графиков или таблиц. В большинстве случаев используют краткую запись, в которой приводятся значения энергии и отдельные значения m/e (см. рис. 3.2.9/6):

МС (70 эВ); $m/e=58$ (12%, M^+), 43 ($M-CH_3$), 29 ($M-C_2H_5$), 15 (CH_3).

Область применения

Минимальным для анализа является количество вещества менее 20 мкг, предел чувствительности составляет 10^{-9} — 10^{-12} г (при использовании сочетания ГХ/МС). Для успешного масс-спектрометрического исследования необходима достаточная летучесть образца ($M < 10^3$) и его термическая устойчивость. Метод масс-спектрометрии широко применяется в повседневной научно-исследовательской практике. В связи с этим в данном разделе приведены только несколько основных областей применения:

- идентификация соединений и установление строения неизвестных веществ;
- точное определение молекулярной массы;
- определение элементного состава и брутто-формулы;
- обнаружение различных изотопов и определение их распределения;
- анализ следовых количеств биологически активных соединений;
- определение аминокислотной последовательности пептидов;
- анализ многокомпонентных смесей с помощью сочетания ГХ/МС.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- R. Budzikiewicz, Massenspektrometrie -- Eine Einführung, Verlag Chemie, Weinheim 1980
H. Hill, Einführung in die Massenspektrometrie, Heyden, London, 1973
J. M. Majer, Mass Spectrometry, Wykeham, London 1977
W. McFadden, Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Wiley, New York 1973

- H. Kienitz, Massenspektrometrie, Verlag, Chemie, Weinheim 1968
F. W. McLafferty, Interpretation of Mass Spectrometry, W. A. Benjamin, New York 1973
J. Seibl, Massenspektrometrie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1970
A. M. Silverstein, G. C. Bassler, and T. C. Morill, Spectrometrie Identification of Organic Compounds, Wiley, New York 1974
G. Spiteller, Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim 1966
G. R. Waller, O. C. Dermer, Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Wiley, New York 1980
J. T. Watson, Introduction to Mass Spectrometry -- Biomedical, Environmental and Forensic Application, Raven Press, New York 1976
ASTM Index of Mass Spectral Data, Heyden, London
Catalog of Mass Spectral Data, Carnegie Institute of Technology, Pittsburgh
Mass Spectral Data Sheets, Mass Spectrometry Data Centre AWRE, Aldermaston
M. Spiteller, G. Spiteller, Massenspektrensammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbelegmaterialien und einfachen aliphatischen Verbindungen, Springer, Wien 1973

3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Молекулярной массой химического соединения называют отношение массы его молекулы к $1/12$ части массы изотопа углерода ^{12}C .

Следует различать молекулярную массу M низкомолекулярных соединений и среднечисленную молекулярную массу высокомолекулярных соединений. Полимеры характеризуются среднечисленной M_n и среднемассовой M_m .

Среднечисленная молекулярная масса:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} n_i M_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} n_i},$$

где n_i — количество молекул с молекулярной массой M_i ; M_i — молекулярная масса молекул типа i .

Среднемассовая молекулярная масса:

$$M_m = \frac{\sum_{i=1}^{i=\infty} m_i M_i}{\sum_{i=1}^{i=\infty} m_i},$$

где

$$m_i = n_i M_i.$$

M_n представляет собой среднеарифметическое значение молекулярной массы и равно отношению массы образца к числу всех молекул в нем. M_m является функцией распределения массы образца по составляющим его фракциям макромолекул данного размера. Значения M_n и M_m равны только в том случае, когда полимер состоит из молекул одной молекулярной массы. Если полимер состоит из молекул различных молекулярных масс, то чем шире распределение по молекулярной массе, тем больше разница между M_n и M_m .

Молекулярную массу можно определить достаточно точно

(молярную массу до 10^6 г·моль⁻¹) при помощи различных методов и приборов. При использовании абсолютных методов (в отличие от относительных) не требуется проводить градуировку вследствие наличия прямой зависимости между размерами молекулы и измеряемыми параметрами. Для измерения молекулярной массы веществ в разбавленных растворах используют четыре свойства, которые изменяются с изменением концентрации растворенного вещества: осмотическое давление; давление пара; точка замерзания; точка кипения.

Измерение одной из этих величин позволяет определить концентрацию или при известной концентрации установить количество частиц с одновременным определением молекулярной массы. Указанные величины в основном не зависят от структуры частиц, а являются коллигативными свойствами раствора, т. е. зависят только от числа частиц.

3.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ПО ПЛОТНОСТИ ПАРА

Метод определения молекулярной массы по плотности пара при помощи измерения объема применяют не только по отношению к газообразным веществам, но и по отношению к соединениям, переходящим при нагревании в парообразное состояние.

Физические основы метода

Зависимость молекулярной массы M вещества в газообразном состоянии от плотности газа представлена следующим уравнением, полученным из уравнения состояния идеального газа $PV = nRT$:

$$M = RTm/(VP),$$

где R — универсальная газовая постоянная; T — температура; m — масса образца (навеска); V — измеренный объем газа; P — давление.

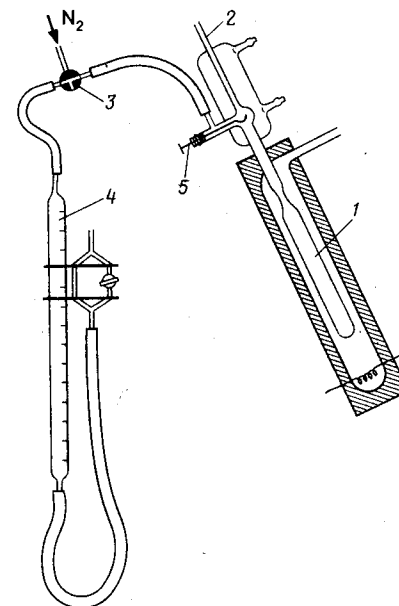
Среди различных методов определения плотности пара наиболее широко применяют метод В. Мейера. Он основан на том, что молекулярная масса пропорциональна плотности пара. При этом предполагается, что температура и давление газа не изменяются в процессе анализа. В настоящее время для определения молекулярных масс жидких веществ применяют также криоскопический и эбулиоскопический методы (см. разд. 3.3.2).

Приборы

На рис. 3.3.1/1 изображена схема прибора, который часто применяют для определения плотности пара. Прибор состоит из сосуда, в котором образуется пар, и колбы с теплоносителем. Температура кипения последнего должна быть значительно выше,

Рис. 3.3.1/1. Определение молекулярной массы по плотности пара (метод В. Мейера, аппарат Вебера) соединений, находящихся в жидком состоянии при нормальных условиях:

1 — сосуд для образования пара; 2 — охлаждаемая водой трубка для ввода навески образца; 3 — трехходовой кран; 4 — газовая бюретка; 5 — устройство для ввода пробы в сосуд



чем температура кипения анализируемого образца. Навеску пробы помещают в устройство для ввода пробы, находящееся в расширенной части внутренней трубки холодильника, которое соединено при помощи шлангов с газовой бюреткой и уравнительным сосудом. Средняя ошибка измерения при работе на этом приборе составляет $\pm 0,3\%$.

Порядок выполнения операций

Вещество взвешивают в тонкостенной микроампуле с оттянутым капиллярным концом (навеска — около 100 мг).

Прибор нагревают до установления постоянного объема воздуха в системе (после этого сосуд с затворной жидкостью нельзя опускать).

Уравнивают уровни в бюретке и уравнительном сосуде.

Вскрывают острый конец микроампулы, быстро помещают ее во внутреннюю трубку холодильника и быстро закрывают трубку. Более точные результаты получают, применяя более сложный способ ввода ампулы с навеской образца: ампулу заранее вводят в прибор и вскрывают с помощью специального устройства.

После установления постоянного уровня в газовой бюретке и выравнивания уровней в бюретке и уравнительном сосуде производят отсчет результата измерения.

Следует избегать возникновения разности температуры между паром и теплоносителем в колбе, так как это обычно приводит к уменьшению скорости испарения (опасность конденсации).

Область применения

Определение молекулярной массы газообразных веществ и устойчивых в парообразном состоянии жидкостей (точка кипения до 200 °C).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 3/1, S. 199, 311, Thieme, Stuttgart 1961
F. Kohlrausch, Praktische Physik, Teubner, Leipzig 1968

3.3.2. ЭБУЛИОСКОПИЯ И КРИОСКОПИЯ

Методы эбулиоскопии и криоскопии основаны на измерении повышения точки кипения и соответственно понижения точки замерзания раствора анализируемого вещества по сравнению с чистым растворителем. Оба явления объясняются понижением давления пара раствора относительно чистого растворителя.

Физические основы метода

Повышение температуры кипения и понижение температуры замерзания растворов зависят от концентрации (так называемые коллигативные эффекты). Для очень разбавленных растворов справедливо следующее уравнение:

$$M_n = K \cdot 10^3 / \Delta T,$$

где $K = RT^2 / (10^3 H_p)$; M_n — среднечисленная молекулярная масса; C — концентрация; ΔT — соответственно повышение температуры кипения или понижение температуры замерзания; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура кипения и замерзания растворителя; H_p — удельная теплота испарения растворителя; K — эбулиоскопическая (или криоскопическая) постоянная.

Молярная эбулиоскопическая постоянная K_z (и соответственно криоскопическая постоянная K_k) равна повышению точки кипения и соответственно понижению точки замерзания раствора, содержащего 1 моль вещества ($= 6,02 \cdot 10^{23}$ недиссоциированных частиц) в 1 кг растворителя. Точки кипения и замерзания наиболее часто применяемых растворителей, а также молярные постоянные приведены в табл. 3.3.2/1.

На рис. 3.3.2/1 изображены графики изменения температуры при охлаждении раствора и чистого растворителя. Криоскопию чаще применяют для определения молекулярной массы, чем эбулиоскопию, вследствие более высоких значений криоскопических постоянных по сравнению с эбулиоскопическими, а также более простых конструкций приборов для криоскопии.

Концентрацию растворов макромолекул, например растворов биологически активных веществ, характеризуют осмоляльностью

Таблица 3.3.2/1. Криоскопические и эбулиоскопические молярные постоянные некоторых растворителей

Растворитель	Температура плавления, °C	Температура кипения, °C	K_k	K_z
			°C · (моль · кг) ⁻¹	
Вода	0	100	1,86	0,52
Ледяная уксусная кислота	17	118	3,90	3,07
Диоксан	12	102	4,80	3,45
Хлороформ	—	61	4,98	3,80
Бензол	5	80	5,49	2,64
Фенол	41	181	7,30	3,60
Камфора	179	204	40	6

или осмоляльностью, т. е. отношением количества растворенных частиц к 1 кг воды (моль · кг⁻¹) или к 1 л раствора (моль · л⁻¹) соответственно. Несмотря на незначительное различие между обеими величинами, чаще используют осмоляльность, так как в этом случае учитывается уменьшение объема раствора за счет макромолекул.

Приборы

Большинство криоскопических приборов работает следующим образом: образец (около 0,2 мл) помещают в охлаждающую смесь и охлаждают до определенной заранее температуры (на 5—7 °C ниже точки замерзания) (см. рис. 3.3.2/1). Затем вызывают мгновенную кристаллизацию при помощи быстрого и эффективного перемешивания. На графике зависимости температуры от времени моменту кристаллизации растворителя соответствует плато, а моменту кристаллизации раствора — точка перегиба. Температура, соответствующая точке перегиба, используется при расчетах.

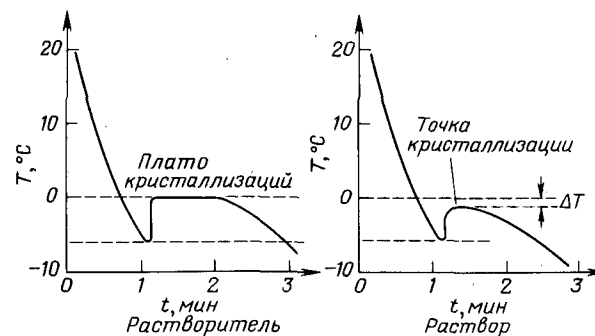


Рис. 3.3.2/1. Изменение температуры в зависимости от времени: (для чистых растворителей — характеристическое плато; для растворов — точка перегиба)

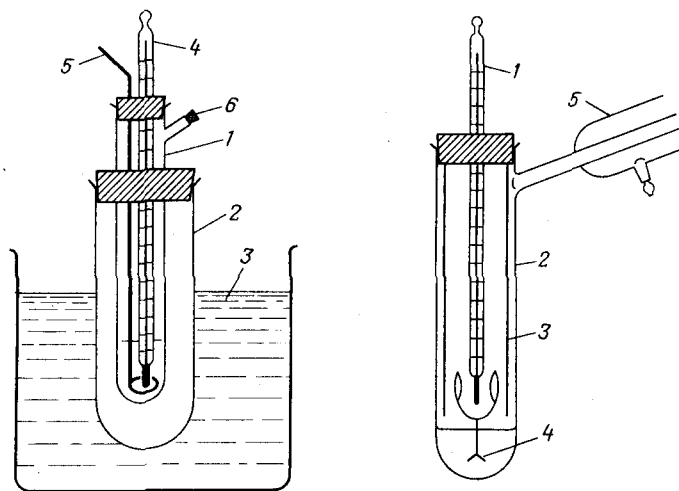


Рис. 3.3.2/2. Прибор Бекмана для определения молекулярной массы криоскопическим методом:

1 — пробирка с пробой; 2 — воздушная рубашка; 3 — ледяная баня; 4 — термометр Бекмана; 5 — мешалка; 6 — отвод для введения пробы

Рис. 3.3.2/3. Прибор для определения молекулярной массы эбулиоскопическим методом:

1 — термометр; 2 — пробирка с пробой; 3 — внутренняя трубка; 4 — насадка для перемешивания; 5 — холодильник

Одним из самых простых криоскопических приборов является аппарат Бекмана и его модификации (рис. 3.3.2/2). Прибор состоит из трубки с боковым отводом для введения образца и термометра Бекмана. Термометр с делением $0,01^\circ\text{C}$ позволяет производить отсчеты температур с точностью $\pm 0,002^\circ\text{C}$. В настоящее время применяют более чувствительные термометры. Для эбулиоскопических измерений используют аналогичные приборы, но оборудованные обратным холодильником (рис. 3.3.2/3).

В последнее время наибольшее распространение получили полностью автоматизированные приборы, позволяющие получить результат измерения в виде цифрового значения или данных на диаграммной ленте в течение 2 мин после начала анализа. Кроме приборов для анализа одной пробы разработаны приборы, обеспечивающие серийный анализ до 50 проб. Такие приборы оборудованы термоэлектрическими холодильными агрегатами с термисторами (температурными зондами). Разрешающая способность таких приборов составляет $0,001\text{ K}$.

Порядок выполнения операций

Перед проведением анализа прибор калибруют при помощи растворов с известной ступенчато возрастающей концентрацией

(калибровочная кривая). Средний объем пробы составляет $0,15\text{--}0,3\text{ мл}$.

Готовят охлаждающую смесь и определяют точку замерзания чистого растворителя с известной криоскопической постоянной.

Расплавляют замерзший растворитель и добавляют взвешенное количество образца.

Определяют точку замерзания раствора и разность обеих точек замерзания.

Микрометод Раста

Метод представляет собой простую модификацию метода, описанного в предыдущем разделе. В качестве растворителя используют камфору (10%-й раствор образца в камфоре). В связи с высоким значением криоскопической постоянной этого растворителя метод Раста более прост и эффективен по сравнению с другими методами. Для проведения анализа требуется не более 10 мг образца, два капилляра для определения точки плавления и термометр (или аппарат для определения точки плавления). Точность метода составляет $\pm 5\%$. При использовании других растворителей, например дициклопентадиеноксида, достаточно $0,5\text{ мг}$ образца.

Анализ результатов

Среднечисленную молекулярную массу образца рассчитывают, используя измеренные значения концентрации, криоскопической или эбулиоскопической постоянной и разности температур. Для получения более точных результатов анализируют образцы нескольких концентраций, а затем полученные данные экстраполируют к бесконечному разведению ($C=0$).

Источники ошибок

Наличие летучих веществ и других примесей в образце.

Наличие ассоциации молекул. Рекомендуется: замена растворителя; в эбулиоскопии вероятность ассоциации меньше вследствие более высоких температур.

Необходимость введения поправки на изменение атмосферного давления при эбулиоскопических измерениях.

Оформление результатов

Рассчитанную молекулярную массу обозначают M_n (криоскопическая или эбулиоскопическая, $\text{г} \cdot \text{моль}^{-1}$). При определении концентрации этим методом полученные значения измеряют в тех же самых единицах.

Применение эбулиоскопии и криоскопии позволяет быстро определить молекулярную массу образца (в течение 2 мин) в пределах до 10^4 г·моль⁻¹. Метод применяют также при анализе легколетучих веществ, молекулярную массу которых нельзя измерить методом паровой осмометрии (см. разд. 3.3.3.2). Криоскопический анализ проводят в диапазоне температур от -10°C до $+20^\circ\text{C}$, эбулиоскопический — в зависимости от возможностей применяемой аппаратуры. В качестве растворителей используют воду и органические растворители (в большинстве случаев — бензол или толуол). Точность определения в зависимости от модификации метода составляет от $\pm 0,5$ до 3%.

Определение концентрации раствора (прежде всего биологических активных соединений).

Определение общей осмольности биологически активных соединений (от 0 до 2000 моль·кг⁻¹).

Определение констант диссоциации и коэффициентов активности.

Определение степени чистоты реагентов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 3/1, S. 362, Thieme, Stuttgart 1955
G. Meyerhoff, in: Kunststoff-Handbuch (hrsg. von R. Vieweg und D. Braun), Bd. 1, Hanser, München 1975
Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, Bd. 2/1, S. 794, Urbach & Schwarzenberg, München 1961

3.3.3. ОСМОМЕТРИЯ

3.3.3.1. Мембранная осмометрия

Если два раствора различных концентраций отделены друг от друга полупроницаемой мембраной, то в результате постепенного перехода растворителя через мембрану в направлении более концентрированного раствора во всей системе через некоторое время концентрация выравнивается. Возникающее при этом давление называют осмотическим, а само явление — мембранной осмометрией.

Физические основы метода

На рис. 3.3.3.1/1 представлена принципиальная схема мембранного осмометра. Движущей силой процесса является различие химических потенциалов растворителя и раствора. Растворитель

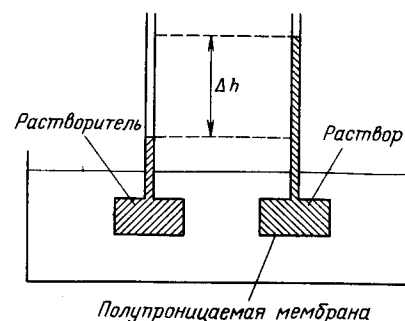


Рис. 3.3.3.1/1. Принципиальная схема мембранного осмометра

проникает в раствор до установления равновесной разности уровней Δh . Равновесное гидростатическое давление называют осмотическим.

Зависимость осмотического давления π от среднечисленной молекулярной массы M_n описывается уравнением Вант-Гоффа:

$$M_n = RTC/\pi,$$

где R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; C — концентрация.

Растворы полимеров, даже очень разбавленные, неидеальны. К ним применяют видоизмененное уравнение Вант-Гоффа, учитывающее взаимодействие между молекулами полимера и растворителя:

$$\pi/C = RT/M_n + AC + BC^2 + \dots$$

Третьим и следующим членами уравнения можно пренебречь ввиду их малой величины. Для определения величины RT/M_n и коэффициента A строят кривую зависимости величины π/C от C (рис. 3.3.3.1/2).

Приборы

В настоящее время существуют полностью автоматизированные приборы, позволяющие проводить анализ в течение 2 мин и получать данные измерения в виде цифрового значения. Стандартный прибор изображен на рис. 3.3.3.1/3. Он состоит из измерительной ячейки с усилителем и термостатом и с блоком электронного управления, что позволяет плавно регулировать температуру от 5 до 130°C . За счет применения емкостной системы измерения давления достигается высокая чувствительность прибора при измерении разности объемов до 1 нл.

Как показано на рис. 3.3.3.1/1, измерительная ячейка разделена полупроницаемой мембраной на две части. При анализе раз-

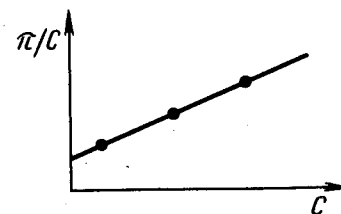


Рис. 3.3.3.1/2. График зависимости π/C от C

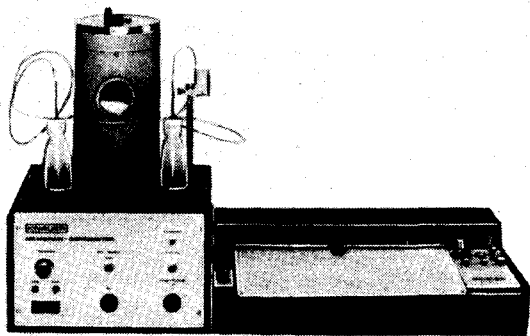


Рис. 3.3.3.1/3. Мембранный осмометр (Fa. Knauer, Bad Homburg v. d. H.)

ность давлений регистрируют при помощи металлической мембраны и электронной записывающей системы. Время, необходимое для установления равновесия, составляет от 2 до 15 мин. В качестве мембран используют пленки из целлюлозы и ее производных.

Порядок выполнения операций

Концентрация анализируемого вещества составляет от 0,2 до 2 г/мл. Для заполнения измерительной ячейки достаточно 400 мкл раствора, однако для получения воспроизводимых данных необходимо около 1,2 мл раствора. Применение специальных вставок позволяет уменьшить объем пробы до 25—50 мкл.

Раствор образца при помощи шприца с длинной иглой вносят в специальное отверстие измерительной ячейки. Калибровку проводят с помощью устройства, находящегося в приборе.

При анализе проводят не менее трех измерений при возрастающей концентрации анализируемого вещества (в качестве растворителя используют воду и совместимые с мембраной органические растворители).

Значение давления регистрируется на диаграммной ленте самописца.

Анализ результатов

Полученные значения давления делят на соответствующие значения концентрации раствора и строят график зависимости π/C от C ; полученную прямую экстраполируют к бесконечному разведению ($C=0$), т. е. прямую продолжают до пересечения с осью ординат. Значение ординаты при $C=0$ подставляют в уравнение (см. рис. 3.3.3.1/2):

$$M_n = RT / [(\pi/C) d],$$

где R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; π/C — значение точки пересечения прямой с осью ординат ($C=0$) (высота столба растворителя — в см); d — плотность растворителя.

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят значения среднечисленной молекулярной массы M_n и указывают метод измерения. Например: $M_n = 45\,000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ (мембранная осмометрия).

Область применения

Определение молекулярной массы полимеров в области от 10^4 до $10^6 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ (быстрый и простой метод).

Определение молекулярной массы веществ, растворимых при температуре выше 100°C .

Определение осмотического давления в коллоидных растворах (биологических жидкостях).

3.3.3.2. Паровая осмометрия

Различие между давлением пара над раствором вещества и над чистым растворителем используют для определения молекулярной массы вещества. Этот метод называется паровой осмометрией.

Физические основы метода

Определение молекулярной массы вещества методом паровой осмометрии основано на измерении термисторами разности температур (рис. 3.3.3.2/1). В термостатированную ячейку, заполненную насыщенными парами растворителя, вводят пару термисторов, измеряющих разность температур. На каждый термистор наносят каплю растворителя, при этом разность температур равна нулю. Если же одну из капель заменяют каплей анализируемого раствора, то на поверхности этого термистора происходит конденсация паров растворителя, так как давление пара растворителя над этой поверхностью меньше. При этом температура капли раствора повышается за счет выделяющейся энтальпии конденсации до тех пор, пока давление пара над каплей раствора и давление чистого растворителя в ячейке не сравняются. Наблюдаемую разность температур измеряют. Разность температур практически пропорциональна осмоляльной концентрации (см. разд. 3.3.2).

Приборы

На рис. 3.3.3.2/1 приведена схема парового осмометра. Измерительная ячейка представляет собой химический стакан, в

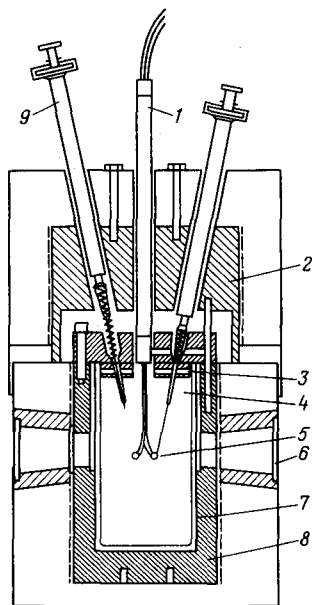


Рис. 3.3.3.2/1. Схема парового осмометра:
1 — измерительный зонд; 2 — алюминиевый блок для термостатирования шприцев; 3 — сальник; 4 — фитиль; 5 — термисторы; 6 — окно; 7 — химический стакан для растворителя; 8 — алюминиевый блок для термостатирования измерительной ячейки; 9 — шприцы

середину которого в качестве измерительного зонда вставлены оба термистора. Измерительная ячейка помещена в алюминиевый блок — термостат. Капли раствора и растворителя наносят шприцами, каналы для шприцев термостатируются. Измеренное значение разности температур несколько ниже теоретического вследствие тепловых потерь, которые можно учесть при калибровке прибора.

Порядок выполнения операций

Устанавливают нулевое значение прибора, введя на оба термистора капли чистого растворителя.

Проводят калибровку прибора по образцам эталонного вещества нескольких концентраций (в большинстве случаев в качестве эталона используют растворы бензила с концентрацией от $1 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-2}$ моль \cdot кг $^{-1}$).

Перед измерением один из термисторов промывают и наносят каплю раствора, эту операцию проделывают перед каждым измерением (для калибровки используют по крайней мере три различных раствора с возрастающей концентрацией).

Результаты измерения считывают на цифровом табло или на диаграммной ленте самописца.

Анализ исследуемого вещества проводят аналогичным образом.

Анализ результатов

Строят график в координатах разность температур — концентрация.

Если полученная зависимость имеет нелинейный характер, то строят новый график в координатах отношение разности температур к концентрации — концентрация.

Полученную на основании данных калибровки прямую проводят до пересечения с осью ординат ($C=0$). Величину отрезка,

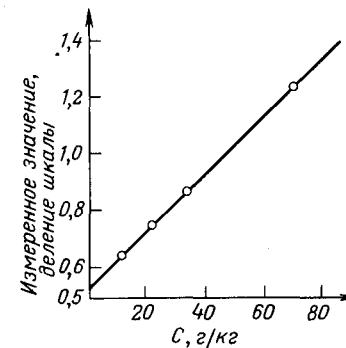


Рис. 3.3.3.2/2. Экспериментальная прямая для определения молекулярной массы методом паровой осмометрии (вещество — полиоксипропиленгликоль; растворитель — бензол; температура 45 °С; $K_{\text{калибр}} = 4,24 \cdot 10^3$)

отсекаемого на оси ординат, считают равным константе $K_{\text{калибр}}$, которая является характеристикой данной системы измерения и данного растворителя.

Аналогичным образом на основании данных, полученных при измерении раствора анализируемого вещества, определяют константу измерения $K_{\text{изм}}$ (рис. 3.3.3.2/2).

Среднечисленную молекулярную массу M_n рассчитывают по уравнению:

$$M_n = K_{\text{калибр}} / K_{\text{изм}}.$$

Источники ошибок

Присутствие примесей (существенно влияет на результаты измерения).

Различный размер капель.

Возможность ассоциации и диссоциации веществ в течение эксперимента.

Оформление результатов

При оформлении результатов приводят значение молекулярной массы M_n с указанием метода ее определения, например: $M_n = 22\,000$ г \cdot моль $^{-1}$ (паровая осмометрия).

Область применения

Определение молекулярных масс до $5 \cdot 10^4$ г \cdot моль $^{-1}$ (быстрый и чувствительный метод).

Анализ растворов с высокой вязкостью (в качестве растворителей применяют воду и органические растворители).

Проведение измерений в широком диапазоне температур — от 25 до 130 °С (для методов эбулиоскопии и криоскопии существуют ограничения).

Проведение измерений в атмосфере инертного газа, например для соединений, чувствительных к присутствию кислорода.

Определение общей осмоляльности растворов биологически активных соединений.

Расчет констант диссоциации и коэффициентов активности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Firmenschriften der Firma Knauer, Wissenschaftliche Geräte, Oberursel 1976
G. Meyerhoff, in: Kunststoffhandbuch (Hrsg.: R. Vieweg und D. Braun), Bd. 1, Hanser Verlag, München 1975
Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, Bd. 2/1, S. 799, Urban & Schwarzenberg, München 1961

3.3.4. ВИСКОЗИМЕТРИЯ

Вязкость характеризует текучесть веществ и рассматривается как параметр, определяемый формой и размерами молекул. Совокупность методов измерения вязкости жидкостей и газов называется вискозиметрией.

Физические основы метода

Способ определения молекулярной массы методом вискозиметрии основан на измерении увеличения вязкости раствора образца по сравнению с чистым растворителем. Так как вязкость раствора зависит от формы молекул и косвенно от молекулярной массы, то оба параметра можно оценить или определить. Сферические макромолекулы (статистический клубок) характеризуют отношением мольного объема к молекулярной массе, а линейные жесткие молекулы — отношением большой и малой осей молекулы (длина и ширина эллипсоида).

Относительная вязкость $\eta_{\text{отн}}$ равна отношению вязкостей раствора η и чистого растворителя η_0 :

$$\eta_{\text{отн}} = \eta / \eta_0.$$

Удельная вязкость $\eta_{\text{уд}}$ определяется следующим образом:

$$\eta_{\text{уд}} = (\eta - \eta_0) / \eta_0.$$

При возрастании концентрации раствора увеличивается возможность межмолекулярных взаимодействий, что существенно сказывается на величинах $\eta_{\text{уд}}$ и $\eta_{\text{отн}}$ и приводит к усложнению уравнения, связывающего вязкость с молекулярными параметрами. В связи с этим рекомендуется проводить измерения только сильно разбавленных растворов. Характеристической вязкостью (показатель Штаудингера) $[\eta]$ называют предельное значение $\eta_{\text{уд}}/C$ при концентрации раствора, стремящейся к нулю:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{\text{уд}}/C).$$

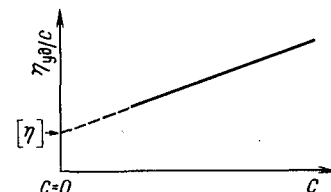


Рис. 3.3.4/1. Экспериментальная прямая для определения характеристической вязкости $[\eta]$

Характеристическую вязкость определяют путем графической экстраполяции экспериментальной кривой, построенной на основании данных для нескольких концентраций, к бесконечному разведению (рис. 3.3.4/1).

Для расчета вязкости жидкости методом капиллярной вискозиметрии используют закон Гагена — Пуазейля:

$$\eta = \pi r^4 P t / (8 l V),$$

где η — вязкость раствора; r — радиус капилляра; P — давление; t — время; l — длина капилляра; V — объем жидкости.

Следует обращать внимание на конструктивные недостатки приборов, которые могут привести к отклонению от закона Гагена — Пуазейля. При их устранении точность определения вязкости этим методом достаточно высока (см. разд. «Библиографический список»). Динамическую вязкость измеряют в единицах Па·с, в большинстве случаев — в мПа·с. Например, вязкость воды при 20 °С равна 1,002 мПа·с. Однако часто используют устаревшую единицу — пуаз (1 спуаз = 1 мПа·с). Кинематическую вязкость определяют как отношение динамической вязкости к плотности. Кинематическую вязкость измеряют в устаревших единицах — стоксах (1 стокс = 10^{-5} м²·с⁻¹).

Таблица 3.3.4/1. Вязкость некоторых веществ при 20 °С

Вещества	Диапазон вязкости, мПа·с	Вещества	Диапазон вязкости, мПа·с
Эмульсии	1—10 ¹³	Мыла	10 ⁸ —10 ¹³
Жиры	10—10 ⁸	Термопласты (при 160 °С)	10 ³ —10 ¹⁰
Газы	10 ⁻² —10 ⁻¹	Воски	10 ¹⁰ —10 ¹³
Лаки	10—10 ⁴	Вода	10 ⁻¹ —10
Масла	10—10 ³		

Согласно своему вязкостному поведению, жидкости делятся на ньютоновские (вода, растворители, растворы) и неньютоновские (растворы полимеров, дисперсии, воски, гели). Обе группы могут быть далее подразделены. Значения вязкостей различных веществ представлены в табл. 3.3.4/1.

Приборы

В связи с тем, что значение вязкости зависит от температуры, измерение вязкости проводят в условиях термостатирования.

Таблица 3.3.4/2. Диапазоны значений вязкости и температуры для различных типов вискозиметров

Тип вискозиметра	Диапазон температур, °С	Диапазон вязкости, мПа·с
Капиллярный	—60—+300	10^4 — 10^{12}
С падающим шариком	—20—+120	1 — 10^5
Ротационный	—30—+300	10^{-1} — 10^8

При обычных измерениях поддерживают постоянную температуру с точностью $\pm 0,1$ °С. При увеличении температуры на 1 °С в области 20 °С значение вязкости уменьшается приблизительно на 2%.

В зависимости от принципа измерения различают три типа вискозиметров: капиллярный вискозиметр (течение жидкости через капилляр); вискозиметр, основанный на измерении скорости падающего шарика (движение твердого тела в исследуемой среде); ротационный вискозиметр (вращение тела).

В настоящее время метод падающего шарика практически не применяется. Главным образом используют различные типы капиллярных и ротационных вискозиметров. Диапазоны измерения вязкости с помощью некоторых приборов приведены в табл. 3.3.4/2.

При измерении вязкости с помощью капиллярных вискозиметров определяют время истечения равных объемов раствора и растворителя. Наиболее широкое распространение нашел вискозиметр Оствальда (рис. 3.3.4/2). Этот простой прибор состоит из вертикального капилляра (длиной 10—20 см; диаметром 0,3—0,4 мм) и градуированного шарообразного измерительного сосуда (объемом ≤ 1 мл).

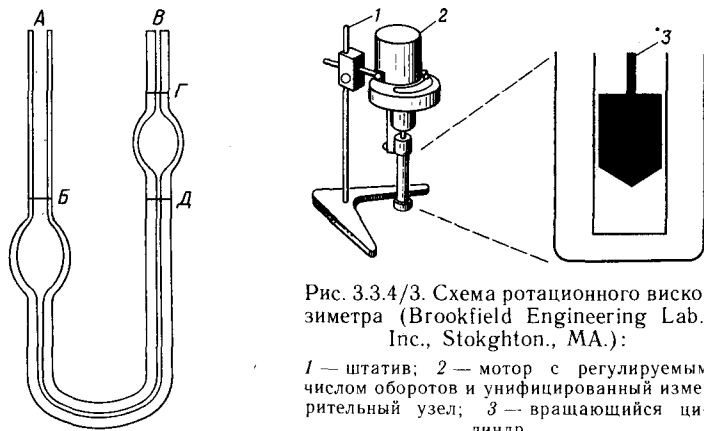


Рис. 3.3.4/3. Схема ротационного вискозиметра (Brookfield Engineering Lab., Inc., Stoughton, MA.):

1 — штатив; 2 — мотор с регулируемым числом оборотов и унифицированный измерительный узел; 3 — вращающийся цилиндр

Рис. 3.3.4/2. Капиллярный вискозиметр Оствальда

Ротационные вискозиметры характеризуются самой сложной конструкцией по сравнению с другими приборами, но при их использовании достигается высокая точность измерения. Исследуемую жидкость помещают между двумя цилиндрами, после чего внутренний цилиндр приводят во вращение. В этом случае мерой вязкости является число оборотов или соответственно крутящий момент (касательное напряжение) (рис. 3.3.4/3).

Порядок выполнения операций

Измерение вязкости методом капиллярной вискозиметрии при помощи вискозиметра Оствальда проводят следующим образом (концентрация образца составляет $0,1$ — 2 г·л $^{-1}$):

анализируемый раствор и растворитель фильтруют или центрифугируют с целью удаления частичек пыли;

устанавливают требуемую температуру в термостате (например, 35 °С);

измерения проводят для ряда растворов (от 3 до 5) с различными концентрациями исследуемого вещества (например, 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0%-е растворы);

левую часть прибора А заполняют раствором образца с помощью пипетки и после термостатирования точно устанавливают мениск на уровне В (см. рис. 3.3.4/2); затем заполняют правую часть прибора через отверстие В до установления мениска выше метки Г;

измеряют время истечения жидкости под действием ее собственного веса при прохождении мениска через метки Д и Г ($\eta_{\text{отн}} \approx t/t_0$; t — время протекания раствора; t_0 — время протекания растворителя).

При необходимости измерения повторяют несколько раз.

Анализ результатов

В связи с тем, что отсутствует прямая зависимость между молекулярной массой и вязкостью, вискозиметры калибруют по соединениям с известной молекулярной массой, определенной при помощи абсолютных методов в одном и том же растворителе. Рассчитывают значения удельной вязкости и строят график в координатах $\eta_{\text{уд}}/C$ — C . Для полученного в результате экстраполяции предельного значения вязкости справедливо следующее отношение:

$$[\eta] = KM^a,$$

где K и a — постоянные для данной системы полимер — растворитель при данной температуре [их значения сведены в таблицы ($a=0,5$ — $1,0$)].

Присутствие пыли в анализируемом образце (засорение капилляра).

Отклонение от вертикали при закреплении вискозиметра.

Испарение легколетучего растворителя.

Свойства полиэлектролитов отличаются от стандартных жидкостей (см. разд. «Библиографический список»).

Изменение структуры молекул (ассоциация, дезагрегация).

Оформление результатов

В рабочем журнале приводят данные о средневязкостной молекулярной массе M_v , в скобках указывают метод определения (капиллярная или ротационная вискозиметрия). Например: $M_v = 8000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ (капиллярная вискозиметрия). В большинстве случаев указывают также температуру измерения.

Область применения

Определение молекулярной массы (M_v).

Получение предварительных данных о форме и гибкости молекул.

Контроль процесса полимеризации.

Оценка степени разветвленности полимеров.

Контроль качества промышленной продукции (технический показатель).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Firmenschriften der Fa. Haake, Karlsruhe, und der Fa. Contraves, Stuttgart
G. V. Schulz und H. J. Cantow, in: Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 3/1, S. 431, Thieme, Stuttgart 1955
J. Schurz, Viskositätsmessungen an Hochpolymeren, Kohlhammer, Stuttgart 1972
E. L. Uhlenhopp und B. H. Zimm, in: Methods of Enzymology, Bd. 21, S. 483, Academic Press, New York 1973

3.3.5. ДРУГИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Большое количество методов определения молекулярной массы связано с тем, что для расчета этой величины можно использовать целый ряд свойств, зависящих от размера молекулы. Однако привести в этой книге подробное описание теории, аппаратуры и оформления результатов всех этих методов не представляется возможным. Поэтому в этом разделе приводится обзор только областей применения и литературных данных наиболее распространенных методов (кроме одного косвенного метода — молекулярно-ситовой хроматографии, остальные методы являются абсолютными):

Методы	Область применения	Библиографические источники
Ультрацентрифугирование	Определение Z-средних молекулярных масс M_z и распределения макромолекул по молекулярным массам Определение размеров частиц Тактичность гомополимеров и отдельные структурные параметры сополимеров Сравнение величин $M_n \leq M_v \leq M_m \leq M_z$	[1—5]
Светорассеяние	Определение молекулярных масс линейных молекул в области от 10^3 до $10^7 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ Определение молекулярных масс привитых сополимеров Определение размеров частиц и структуры твердого тела Определение характеристической вязкости	[5—7]
Малоугловое рентгеновское рассеяние	Определение молекулярных масс до $10^5 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ Преимущественно для определения M_m — до $10^2 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$ Конформационный анализ веществ в области молекулярных масс от 10^2 до $10^4 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$	[8, 9]
Масс-спектрометрия	Точное определение молекулярных масс Для анализа требуется небольшое количество вещества	[10]
Гель-хроматография	Определение молекулярных масс и распределение молекулярных масс полимеров, белков и т. д.	[11—13]

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] H. G. Elias, Ultrazentrifugen-Methoden, Beckmann Instruments, München 1961
- [2] H. Fujita, Foundations of Ultracentrifugal Analysis, Wiley, New York 1975
- [3] G. Meyerhoff, in: Kunststoff-Handbuch (hrsg. von R. Vieweg und D. Braun), Bd. 1, Hanser München 1975
- [4] K. H. Schachmann, Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press, New York 1959
- [5] M. Hofmann, H. Krömer und R. Kuhn, Polymeranalytik, Bd. 1+2, Thieme, Stuttgart 1977
- [6] M. B. Huglin, Light Scattering, Academic Press, New York 1972
- [7] H. A. Stuart, Physik den Hochpolymeren, Bd. 1, Springer, Berlin 1952
- [8] A. Guinier und G. Fournet, Small Angle Scattering of X-Rays, Wiley, New York 1955
- [9] O. Kratky, X-Ray Small Angle Scattering with Substances of Biological Interest in Diluted Solutions, Pergamon Press, New York 1963
- [10] s. Literatur in Kap. 3.2.9
- [11] s. Literatur in Kap. 2.1.5
- [12] H. Determann, Gelchromatographie, Springer, Berlin 1970
- [13] K. H. Altgeld und L. Segal, Gel Permeation Chromatography, Marcel Dekker, New York 1971

3.4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

3.4.1. ФОТОМЕТРИЯ И ФЛУОРИМЕТРИЯ

3.4.1.1. Фотометрия

Фотометрией называют метод анализа, основанный на измерении поглощения светового излучения определенной длины волны. Для определения концентрации вещества используется зависимость сигнала от концентрации.

Физические основы метода

Интенсивность поглощения света с определенной длиной волны характеризуют экстинкцией (поглощением) E , которая равна десятичному логарифму отношения интенсивности падающего света I_0 к интенсивности света, прошедшего через данное вещество, I :

$$E = \lg(I_0/I).$$

Согласно закону Ламберта — Бера, значение экстинкции при данной длине волны E_λ пропорционально концентрации растворенного вещества. При определенной толщине слоя d (диаметре или толщине кюветы) справедливо следующее соотношение:

$$E_\lambda \sim Cd.$$

Введение коэффициента пропорциональности ϵ_λ , который называется молярным коэффициентом поглощения, позволяет получить следующее уравнение:

$$E_\lambda = \lg(I_0/I) = \epsilon_\lambda Cd,$$

где C — концентрация; d — толщина слоя жидкости.

Это соотношение используют для определения концентрации вещества по измеренному поглощению. Частным случаем фотометрии является колориметрия — метод определения концентрации вещества с помощью измерения интенсивности цвета растворов окрашенных веществ.

Если известен коэффициент ϵ (см. разд. 3.2.3), то по измеренному поглощению можно рассчитать концентрацию вещества. Кроме того, закон Ламберта — Бера позволяет проводить количественный анализ смесей двух и более веществ. Такой анализ возможен только при условии расположения полос поглощения этих компонентов на достаточном расстоянии друг от друга в спектре. Если известны коэффициенты поглощения вещества при различных характеристических длинах волн, то можно оценить степень гомогенности вещества. При изменении концентрации чистого вещества отношение поглощения при λ_1 к поглощению при λ_2 должно оставаться постоянным:

$$E_{\lambda_1}/E_{\lambda_2} = K.$$

Особенно часто этот способ применяют в биохимии. Измеряют поглощение раствора образца при 254 и 280 нм и рассчитывают значение E_{254}/E_{280} .

Другим важным параметром в фотометрии является оптическая плотность (D); одной единице оптической плотности соответствует такое количество вещества в 1 мл раствора, поглощение которого в кювете с толщиной 1 см равно 1. Измерение концентрации в оптических единицах используют при работе с ничтожно малыми количествами веществ. Для определения количества вещества в растворе по оптической плотности нет необходимости его выделения.

Эффективность метода продемонстрирована на следующем примере: теоретически поглощение раствора 1 мг вещества (молярный коэффициент поглощения 14 520, молярная масса 330 г·моль⁻¹) должно составлять 44 (при толщине кюветы 1 см), т. е. в растворе находится 44 единицы оптической плотности; если в пробирке находится 7,5 мл раствора с поглощением 0,8, то в данном растворе находится $7,5 \times 0,8 = 6,0$ оптических единиц, или 0,14 мг вещества.

Приборы

Для исследований, не требующих высокой точности, используют *однолучевой фотометр* (рис. 3.4.1.1/1), в котором для измерения применяются различные фильтры (фотоэлектроколориметры). Однако измерения на таком приборе могут проводиться только при определенных длинах волн. Как показано на рис. 3.4.1.1/1, две или более кювет располагают в кюветодержателе и поочередно устанавливают их на пути светового пучка. Первую кювету K_L заполняют чистым растворителем и установ-

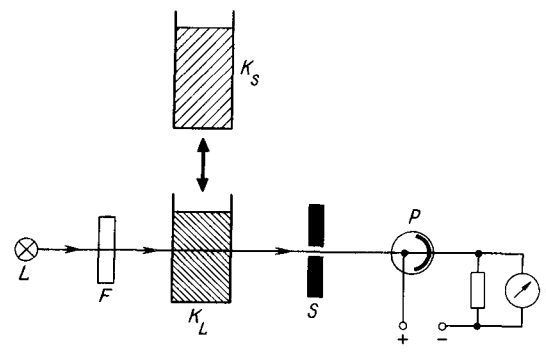


Рис. 3.4.1.1/1. Схема однолучевого фотометра:

L — источник света; F — фильтр (определенная длина волны); K_L — кювета, заполненная чистым растворителем; K_S — кювета, заполненная анализируемым веществом; S — щель; P — фотоземлет; G — гальванометр

ливают на пути светового пучка. Затем регулируют ширину щели S до тех пор, пока стрелка гальванометра G не установится на нулевом делении (нуль поглощения, или 100% пропускания), и устанавливают на пути светового луча кювету с анализируемым веществом K_S . Проводят измерение и снимают отсчет по шкале, отградуированной в единицах оптической плотности и в процентах пропускания.

Замена светофильтров монохроматором значительно увеличивает возможности фотометра. В таких приборах можно установить любую длину волны, в том числе соответствующую максимуму поглощения исследуемого вещества, что позволяет значительно повысить чувствительность и точность измерения, снизить влияние примесей. Источниками света служат в ультрафиолетовой области (УФ) — водородная лампа, в видимой области — лампа накаливания.

Применение *автоматизированного*, управляемого микропроцессором фотометра в еще большей степени расширяет возможности спектрофотометрии: позволяет проводить измерения большого количества образцов (кювет) при различных длинах волн через различные интервалы времени. Такой способ измерения особенно важен при изучении кинетики ферментативных реакций. Непосредственное соединение спектрофотометра с ЭВМ позволяет ввести в запоминающее устройство ряд данных о коэффициентах поглощения и о калибровочных постоянных и в соответствии с этим получать цифровую информацию о поглощении и концентрации исследуемых веществ. Возможность быстрого анализа большого числа образцов также является существенным преимуществом этого метода по сравнению с другими аналитическими методами.

В настоящее время спектрофотометры постоянно совершенствуются, создан ряд новых моделей. В качестве примера на рис. 3.4.1.1/2, *а* показан *автоматический прибор*, позволяющий проводить последовательный анализ до 175 образцов за 1,5 ч. Раствор образца при помощи насоса последовательно отбирается из каждой пробирки и по тонкой тефлоновой трубке подается в проточную кювету фотометра, непрерывно измеряющего поглощение света. Результаты анализа записываются либо в виде таблицы чисел, либо в виде блок-схемы (рис. 3.4.1.1/2, *б*).

Применение светопроводов позволяет проводить измерения вне фотометра при погружении измерительной головки непосредственно в реакционный сосуд. Таким образом исследуют реакции, протекающие в вакууме или агрессивных средах. Этот тип приборов работает в области длин волн от 400 до 750 нм, при необходимости область измерения можно расширить от 240 до 2500 нм.

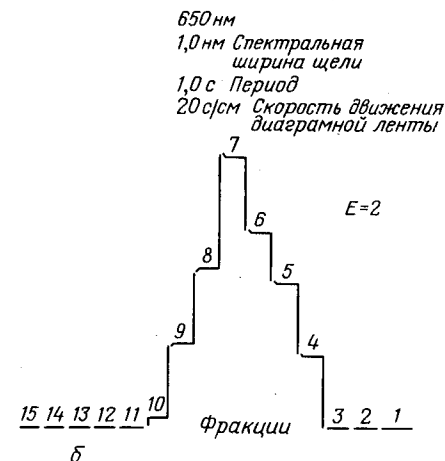
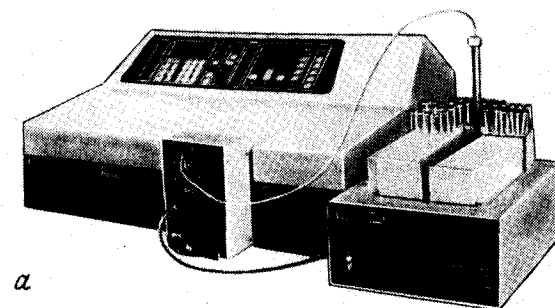


Рис. 3.4.1.1/2. Фотометр с автоматической системой смены проб (DMS90 UV/VIS-фотометр с автоматической системой смены проб, Varian, Stuttgart):

а — общий вид прибора; *б* — запись результатов анализа либо в виде таблицы чисел, либо в виде блок-схемы

Порядок выполнения операций

Включают лампу (УФ-дейтериевая газоразрядная лампа, видимая область — лампа накаливания с вольфрамовой нитью), проверяют правильность установки зеркала.

Готовят кюветы с исследуемым веществом (раствор образца) и эталоном (растворитель). При этом обращают внимание на чистоту внешней поверхности кювет и отсутствие на ней отпечатков пальцев. Кюветы закрывают крышками или пробками и устанавливают в держатель кювет. При проведении измерений в УФ-области используют кварцевые кюветы. Толщина слоя может быть 1, 2, 5 и часто 10 мм. Для небольших объемов проб исполь-

зуют кюветы с вкладышами. В большинстве случаев не требуется проверки поглощения двух кювет относительно друг друга.

Устанавливают кювету с эталоном на пути светового луча.

При данной длине волны устанавливают пропускание, равное 100% («0» поглощения) (внимательно изучить инструкцию по обслуживанию прибора).

Проводят измерение поглощения эталона (так как у некоторых приборов шкала отградуирована на отношение интенсивности света, прошедшего через эталон и образец, то измерение поглощения эталона не проводят).

Устанавливают кювету с образцом на пути светового луча и проводят измерение поглощения. При поглощении выше 1,5 точность измерения значительно уменьшается. В этом случае используют кюветы с меньшей толщиной слоя или разбавляют исследуемый раствор.

Анализ результатов

Расчет концентрации вещества проводят на основании закона Ламберта — Бера. При этом необходимо знать величину молярного коэффициента поглощения данного вещества при данной длине волны. На практике часто наблюдаются отклонения от закона Ламберта — Бера. Среди многочисленных причин таких отклонений могут быть ассоциация молекул или образование комплексов вещества с растворителем. Поэтому прежде всего проверяют линейность зависимости поглощения от концентрации, для чего измеряют поглощение серии разбавленных растворов и строят график $E = f(C)$.

Область применения

Определение концентрации.

Изучение кинетики химических реакций (особенно кинетики ферментативных реакций).

Проверка степени чистоты.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- J. Bartos, M. Presez, *Colorimetric and Fluoremetric Analysis of Steroids*, Academic Press, London 1976
 Firmenschrift, Klinisches Labor, Fa. Merck, Darmstadt 1970
 H. J. Hediger, *Quantitative Photometrie im ultravioletten und infraroten Spektralbereich*, Adademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1984
 B. Kakac, Z. Vejdelek, *Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen*, Bd. 1+2, Verlag Chemie, Weinheim 1984
 G. Kortüm, *Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie*, Springer, Berlin 1955
 M. Pesez, J. Bartos, *Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs*, Marcel Dekker, New York 1974
 E. Sawicki, *Photometric Organic Analysis*, Wiley-Interscience, New York 1970
 H. A. Staab, *Einführung in die theoretische organische Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim 1960

3.4.1.2. Флуориметрия

Метод анализа, основанный на измерении интенсивности флуоресценции, называется флуориметрией. Флуоресценция (испускание света) обусловлена поглощением веществом света определенной длины волны.

Физические основы метода

Поглощение ультрафиолетового света определенными молекулами с легко возбуждаемыми электронами (π -электроны) приводит к флуоресценции в видимой спектральной области. Этот процесс начинается с перехода электронов с σ -орбитали (с основного энергетического уровня s) на более высокие энергетические уровни (s_1 и s_2). Флуоресцентное излучение имеет большую длину волны вследствие меньшей энергии фотонов, чем возбуждающее излучение. Схема процессов, происходящих при флуоресценции, приведена на диаграмме энергетических уровней (рис. 3.4.1.2/1). При нормальных температурах всегда осуществляются абсорбционные переходы с самых низших колебательных уровней основного состояния s на различные уровни возбужденных состояний s_1 и s_2 . Эмиссионные переходы — это излучательные переходы с нулевого уровня состояния s_1 на любой колебательный уровень основного состояния s . Переходы с уровня s_2 (или более высоких уровней) на нулевой уровень s_1 происходит без излучения.

Дезактивация без излучения, т. е. потеря энергии возбужденными молекулами без излучения света, происходит в результате межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий. Так, например, в молекуле дифенила происходит внутримолекулярная дезактивация и флуоресценции не наблюдается. Введение в молекулу дифенила внутримолекулярного мостика — CH_2 — при-

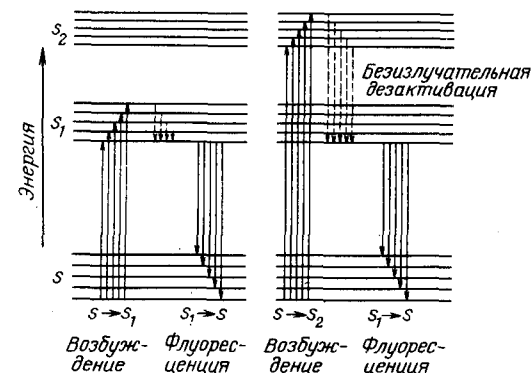
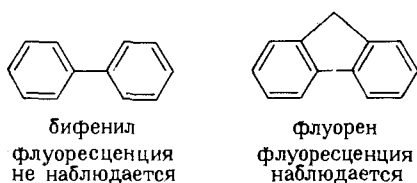


Рис. 3.4.1.2/1. Схема энергетических переходов при флуоресценции

водит к получению флуорена, который флуоресцирует вследствие того, что исключаются торзионные колебания дифенильных колец друг относительно друга (Штааб, 1966).



Флуоресценция свойственна относительно небольшому числу соединений (прежде всего ароматическим соединениям и порфиринам). Ряд соединений можно перевести во флуоресцирующие, введя в молекулу флуоресцирующую группу, т. е. флуорофор. Для получения флуоресцирующих соединений получают производные по определенным функциональным группам молекулы: например, производные соединений по аминогруппе с помощью флуорескамина, *о*-фталевого альдегида или дансилхлорида. Реактивы для получения флуоресцирующих производных различных классов соединений приведены в табл. 3.4.1.2/1.

Таблица 3.4.1.2/1. Реактивы для получения флуоресцирующих производных при флуориметрическом определении некоторых классов соединений

Реактив	Класс соединений
9-Изотиоцианатоакридин	Амины
Антрилдиазометан	Карбоновые кислоты
7-Хлор-4-нитробензофуразан	Амины, аминокислоты, нитрозоамины
Дансилхлорид	Амины, аминокислоты, барбитураты, карбаматы, производные мочевины, оксистероиды
Флуорескамин	Аминокислоты, алкалоиды

Основным преимуществом флуориметрии по сравнению с другими абсорбционными методами является высокая селективность, так как флуоресценцией обладает значительно меньшее число веществ.

Приборы

На рис. 3.4.1.2/2 представлена схема простого флуориметра. При длине волны луча света, выделяемого фильтром F_1 , происходит возбуждение молекул испытуемого вещества. Большая часть энергии теряется в результате перехода без излучения, меньшая — излучается во всех направлениях (флуоресценция). На практике удобнее всего наблюдать излучение под углом 90° к падающему лучу света. Для анализа фракций, полученных при высокоэффек-

Рис. 3.4.1.2/2. Блок-схема флуориметра:
 L — ртутная лампа; F_1 — фильтр для выделения полосы возбуждающего света из спектра ртутной лампы; K — кювета с исследуемым веществом; F_2 — фильтр для пропущенного луча света; P — фотоэлемент; A — записывающее устройство

тивной хроматографии, часто используют *проточные флуориметры* (см. разд. 2.3.3).

Порядок выполнения операций

Флуориметрические измерения проводят аналогично фотометрическим (см. разд. 3.4.1.1). При выборе светофильтров F_1 и F_2 принимают во внимание данные о спектре поглощения раствора, а также о длине волны возбуждения и флуоресценции. Это необходимо при исследовании каждого нового вещества.

Анализ результатов

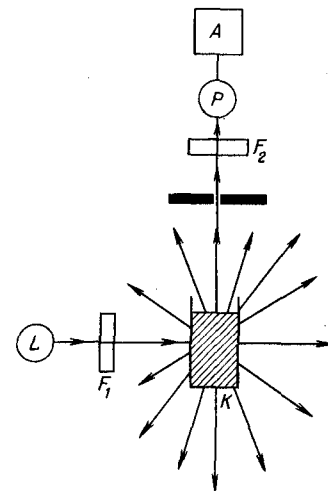
Флуоресценция описывается более сложной зависимостью, чем поглощение, для которого существует закон Ламберта — Бера. В связи с этим для каждого исследуемого вещества строят калибровочную кривую. Разбавленные растворы, как правило, характеризуются линейной зависимостью интенсивности флуоресценции от концентрации. Концентрацию раствора исследуемого вещества определяют, используя калибровочные кривые.

Источники ошибок

При флуориметрических измерениях могут возникать значительные искажения результатов, связанные с тушением флуоресценции. Это явление возникает в результате следующих причин: наличия примесей; высоких температур; высоких концентраций; применения полярных растворителей или растворителей с малой вязкостью.

Оформление результатов

В большинстве случаев в рабочем журнале приводят спектр флуоресценции, а также данные о длинах волн возбуждения флуоресценции. Кроме того, описывают условия получения калибровочной кривой и, если наблюдается линейная зависимость



интенсивности флуоресценции от концентрации, приводят либо график, либо коэффициент пропорциональности.

Область применения

Чаще всего флуориметрию применяют для исследования биологически активных соединений и других веществ, образующих комплексы (см. табл. 3.4.1.2/1).

Особенностью метода флуориметрии является высокая чувствительность: предел чувствительности зависит от флуорофора и находится в диапазоне мкмоль — пмоль.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- J. Bartos, M. Pesez*, Colorimetric and Fluoremetric Analysis of Steroids, Academic Press, London 1976
J. Eisenbrand, Fluorimetrie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1966
 Firmenschrift, Klinisches Labor, Fa. Merck, Darmstadt 1970
G. G. Guibault, Practical Fluorescence — Theory, Methods, and Techniques, Marcel Dekker, New York 1973
M. Pesez, J. Bartos, Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs, Marcel Dekker, New York 1974
G. Schwedt, Fluorimetrische Analyse — Methoden und Anwendungen, Verlag Chemie, Weinheim 1981

3.4.2. АТОМНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (ААС) И АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (АЭС)

Атомно-абсорбционная спектроскопия представляет собой чувствительный и селективный метод определения элементов, в большинстве случаев — металлов. Метод основан на измерении поглощения электромагнитного излучения атомным паром вещества. При этом измеряют фотометрически разность энергий (разность интенсивности света до и после прохождения через образец) образца и стандарта. При атомно-эмиссионной спектроскопии исследуют атомно-эмиссионные спектры, полученные в результате возбуждения атомов в газообразном состоянии.

Физические основы метода

Для возбуждения атомов в атомно-абсорбционной спектроскопии используют тепловую энергию. Перевод соединения в атомный пар (атомизацию) осуществляют путем распыления образца в горелке с последующей термической диссоциацией в пламени. При этом, соответственно распределению Больцмана, большинство атомов возбуждается и на короткие периоды времени (порядка нескольких наносекунд) переходит с низшего уровня на более высокие энергетические уровни. При обратном переходе на один и тот же нижний уровень основного состояния происходит испус-

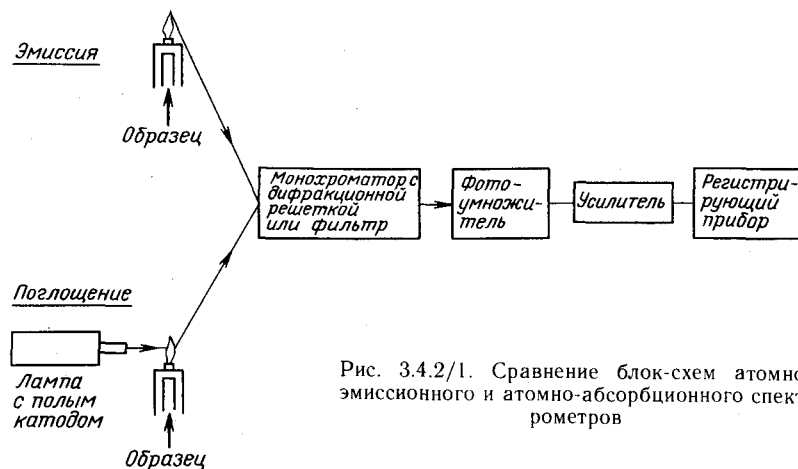


Рис. 3.4.2/1. Сравнение блок-схем атомно-эмиссионного и атомно-абсорбционного спектрометров

кание фотонов с энергией $\Delta E = h\nu$. Каждому элементу соответствует свой набор спектральных линий. Их интенсивность измеряется при помощи специальных приборов (рис. 3.4.2/1).

При облучении свободных атомов образца линейчатым излучением того же самого элемента, находящегося в возбужденном состоянии, наблюдается резонансное поглощение. Этот процесс сопровождается уменьшением интенсивности линейчатого излучения. Измеряемое поглощение является мерой концентрации свободных атомов образца.

Возбуждение в атомно-эмиссионной спектроскопии осуществляют при помощи электрических разрядов. При этом создаются высокие температуры, благодаря которым большинство атомов переходит в возбужденное состояние. Поглощение энергии этими атомами невозможно, поэтому при возвращении в основное состояние происходит эмиссия (испускание) фотонов, интенсивность которой пропорциональна числу возбужденных атомов. Для количественного определения исследуемых веществ проводят калибровку прибора образцами с известной концентрацией элементов в условиях, аналогичных экспериментальным. Определение концентрации элемента осуществляют при помощи калибровочной прямой.

В атомно-абсорбционной спектроскопии, основанной на эффекте Зеемана, используют расщепление спектральных линий в электрическом поле. Наряду с указанными методами наиболее перспективным является метод атомно-флуоресцентной спектроскопии (АФС), характеризующийся высокой чувствительностью. Однако этот метод не нашел широкого применения, так как находится в стадии разработки. Пределы обнаружения отдельных элементов методами ААС, АЭС и АФС приведены в табл. 3.4.2/1.

Таблица 3.4.2/1. Пределы обнаружения ряда элементов методами ААС, АЭС и АФС (горючий газ — ацетилен; газ-окислитель; L — воздух; G — оксид диазота) [Данные по ААС и АЭС: Christian G. D., Feldmann F. J., Appl. Spectr. 25, 660 (1971); данные по АФС: Fassel V. A., Knisley R. N., Anal. Chem. 46, 1110 (1974)]

Элемент	Длина волны, нм	Предел обнаружения, млн ⁻¹		
		ААС (L)	АЭС (G)	АФС
Ag	328,07	0,001	0,008	0,0001
Al	396,15		0,05	0,005
	309,28	0,1 (G)		
As	193,70	0,03	10	0,1
Au	267,60		2	0,05
	242,80	0,02 (G)		
B	518,00		0,05	
	249,68	2,5 (G)		
Ba	553,55	0,02 (G)	0,002	
Be	234,86	0,002 (G)	1	0,01
Bi	306,77		20	
	223,06	0,05		0,05
Ca	422,67	0,002	0,0002	0,000001
Cd	326,11		0,8	
	228,80	0,001		0,00001
Co	345,35		0,03	
	240,72	0,002		0,005
Cr	425,43		0,004	
	357,87	0,002		0,004
Cs	455,3		0,6	
	852,11	0,05		
Cu	324,5	0,004	0,01	0,001
Fe	371,99		0,03	
	248,33	0,004		0,008
Hg	253,65	0,5	10	0,002
K	766,49	0,003	0,00005	
Li	670,78	0,001	0,00002	
Mg	285,21	0,003	0,07	0,001
Mn	403,31		0,008	
	279,48	0,0008	0,002	
Mo	390,30		0,2	
	313,26	0,03 (G)		
Na	589,00	0,0008	0,0005	
Ni	352,45		0,02	
	232,00	0,005		0,003
Pb	405,78		0,1	0,01
	283,31	0,01		
Pf	363,47		0,05	
	247,64	0,01		
Pt	265,94	0,05	4	
Sb	252,85		0,6	
	217,58	0,03		
Sc	196,03	0,1	100	
Si	251,61	0,1 (G)	3	
Sn	284,00		0,1	
	235,48	0,05		
Sr	470,73	0,005	0,0005	0,01
Zn	213,86	0,001	10	0,01

Приборы

В большинстве приборов раствор исследуемого вещества смешивают в распылительной камере с окислителем (кислород, воздух, оксид диазота) и горючим газом (водород, ацетилен, пропан). Затем полученную смесь подают непрерывным потоком в горелку (скорость подачи 1—2 мл·мин⁻¹). В пламени горелки происходит испарение растворителя и образование свободных атомов образца. В качестве источника излучения используют лампу с полым катодом, который изготовлен из того вещества, которое необходимо определить. Спектр излучения источника состоит из большого числа спектральных линий, причем характерная линия для данного элемента может быть не самой интенсивной. Поэтому большое значение имеет правильность выбора соответствующей длины волны измерения. Чувствительность метода зависит как от длины волны измерения, так и от концентрации раствора. Применение одноэлементных ламп обеспечивает необходимую чувствительность и селективность, так как атомы исследуемого элемента поглощают излучение с длиной волны, соответствующей излучению лампы. Как правило, применяют лампы, дающие интенсивное излучение необходимой длины волны.

Для количественного анализа необходимо, чтобы параметры горения были постоянными. Для газовых смесей с соответствующими температурами пламени сконструировано несколько типов газовых горелок (табл. 3.4.2/2). При использовании горелок с предварительным смешением перед сгоранием происходит смешение анализируемого вещества с горючим газом и окислителем, при этом расходуется небольшая часть пробы (10—15%), а остальная часть отделяется в смесительной камере и выводится. При использовании горелок полного сгорания расходуется вся проба (рис. 3.4.2/2). С целью более равномерного распределения исследуемого вещества применяют ультразвуковое распыление. Для атомизации наряду с горелками используют графитовые трубки с электронагревом. В последнем случае предел обнаружения на три порядка ниже по сравнению с пламенной атомизацией.

В АЭС для атомизации и возбуждения образца используют плазму. Существуют два способа получения плазмы. В одном из них возбуждение происходит под действием электрических раз-

Таблица 3.4.2/2. Температуры пламени различных горючих смесей для атомно-абсорбционной спектроскопии

Компоненты горючей смеси	Температура, °C	Компоненты горючей смеси	Температура, °C
Воздух — водород	1725	Кислород — пропан	2900
Воздух — пропан	1825	Кислород — ацетилен	3200
Воздух — ацетилен	2050	Оксид диазота — ацетилен	3400
Кислород — водород	2800		

рядов между электродами — плазма постоянного тока, в другом энергия высокочастотного переменного тока передается газу с помощью магнитной индукции — индуктивно-связанная плазма. В обоих случаях в качестве среды для получения плазмы используют аргон.

Современные, полностью автоматизированные приборы оснащены корректором базовой линии. Время анализа от введения пробы до распечатки результатов анализа составляет около 10 с.

Подготовка пробы

Твердое вещество переводят в раствор (при этом учитывают возможные химические взаимодействия). В качестве растворителя используют воду или подходящие органические растворители (например, диметилформамид). Галогенсодержащие углеводороды не применяют из-за возникновения помех, связанных с перекрыванием спектральных линий. Газообразные соединения анализируют без предварительной подготовки.

Металлы анализируют, формируя их в виде электрода или в виде раствора в кислоте.

Биологически активные соединения высушивают, озоняют для удаления органических компонентов и остаток растворяют в минеральных кислотах [хлороводородная и азотная кислоты, или

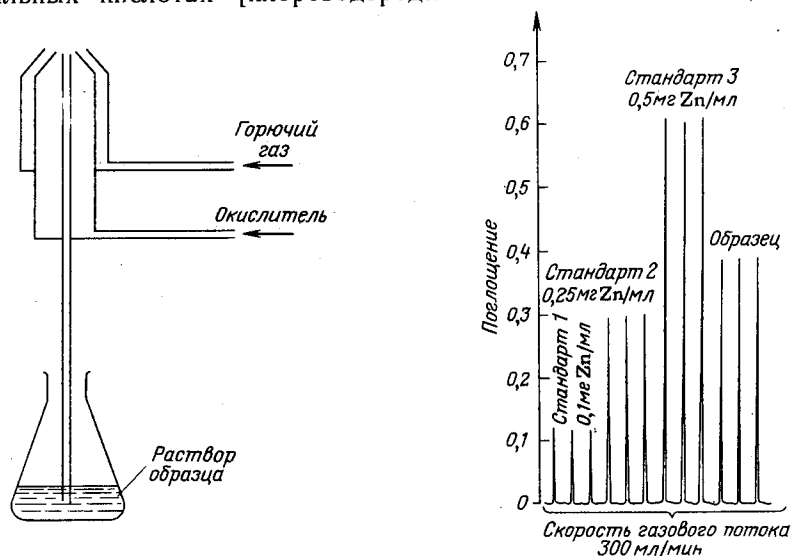


Рис. 3.4.2/2. Схема горелки полного сгорания

Рис. 3.4.2/3. Определение концентрации цинка методом атомно-абсорбционной спектроскопии (измерение каждого образца стандартов и пробы проводят по три раза) (Perkin-Elmer Ltd.)

смесь азотной, серной и хлорной кислот в объемном соотношении 3:1:1 (следует проявлять осторожность!)]

Жидкости анализируют после соответствующего разбавления.

На практике наиболее часто работают в диапазоне концентраций 10^{-3} — 10^{-5} М. Для анализа достаточно менее 1 мл образца. В некоторых случаях необходимо разведение или концентрирование пробы. Для этого применяют осаждение, экстракцию или другие методы. Растворы проб и стандартов хранят в сосудах, изготовленных из полимерных материалов (полиэтилена).

Порядок выполнения операций

Прежде всего готовят ряд стандартных растворов в оптимальном диапазоне концентраций (например, от 0 до 2 млн^{-1}). Шкалу прибора устанавливают на нуль и бесконечность поглощения. Измерение поглощения начинают со стандартного раствора с самой большой концентрацией (аналогично любому спектроскопическому методу).

Определенные количества стандартных растворов смешивают с анализируемой пробой.

Включают горелку и примерно через 5 с зажигают ее.

Из химического стакана в горелку засасывают дистиллированную воду и устанавливают перо прибора на нуль.

Измеряют поглощение самого концентрированного стандартного раствора для определения максимального значения поглощения.

В прибор засасывают раствор пробы и через 10 с измеряют поглощение. Для количественной оценки анализируемого вещества проводят сравнение с поглощением стандартных растворов (рис. 3.4.2/3).

Каждое измерение повторяют по три раза и для расчетов используют среднее значение.

После окончания измерений прибор промывают дистиллированной водой.

Источники ошибок

Область концентраций анализируемого раствора не оптимальна.

Раствор образца плохо перемешан; неудовлетворительная подготовка пробы.

Загрязнение образца в процессе подготовки (реагенты, вода, посуда и другое оборудование).

Оформление результатов

Найденную концентрацию анализируемого элемента в пробе записывают в рабочем журнале в млн^{-1} . Указывают также марку прибора, горючий газ и метод градуировки.

Таблица 3.4.3/1. Аминокислотный гидролиз: условия и реактивы

Реактивы для гидролиза (~1 мл)	Продолжительность, ч	Температура, °C	Примечания
6 н. хлороводородная кислота	24—72	110	Триптофан полностью разрушается. Серин разрушается при увеличении времени гидролиза. Цистин частично окисляется в цистиновую кислоту, его количественное определение возможно лишь после перевода его в цистиновую кислоту
Хлороводородная кислота — пропионовая кислота	0,25	150—160	Используют смесь 1 мл 12 н. хлороводородной кислоты и 1 мл пропионовой кислоты
4 М метансульфокислота с добавкой 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола	18—20	115—125	После окончания гидролиза реакционную смесь нейтрализуют раствором 1 н. едкого натра для получения летучих производных. Триптофан определяют почти количественно. Связи, включающие остатки изолейцина и валина, гидролизуются только при 125 °C
3 М 4-толуолсульфокислота с добавкой 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола	18—20	115—125	Триптофан частично разрушается
3 М меркаптоэтансульфокислота	24—72	110	—

2.2.2), а также электрофорез являются наиболее простыми методами их фракционирования. Однако возможности этих методов при количественном определении весьма ограничены.

В настоящее время разработано несколько способов получения окрашенных или флуоресцирующих производных аминокислот.

Аминокислоты в элюате после ионообменной колонки детектируют по интенсивности окрашенных в фиолетовый цвет производных, которые получаются после взаимодействия аминокислот с нингидрином (см. разд. 3.4.1.1). В первую очередь в реакцию с нингидрином вступают первичные аминокислоты с образованием интенсивно окрашенных продуктов реакции, которые детектируют при 570 нм. Вторичный амин — пролин образует продукт реакции с меньшей интенсивностью окраски, его детектируют при 440 нм. Одновременную регистрацию при двух длинах волн осуществляют с помощью двухканального самописца. Так как интенсивность окрашивания зависит от строения аминокислоты, необходимо проводить калибровку прибора с использованием стандартной смеси. Предел обнаружения — нмоль — пмоль. В зависимости

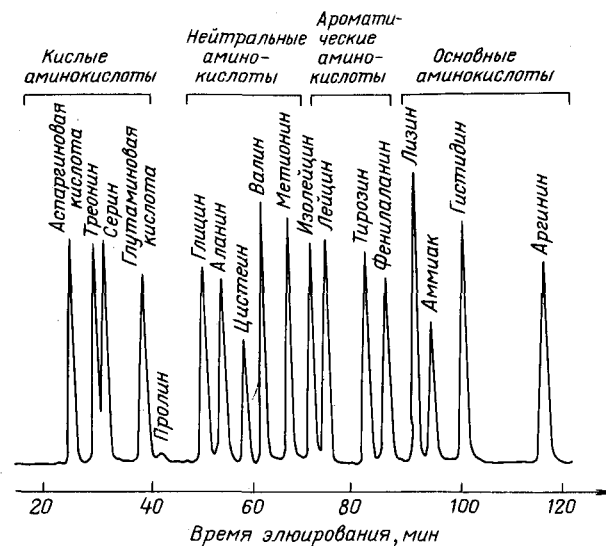


Рис. 3.4.3/1. Хроматограмма, полученная при аминокислотном анализе

от типа прибора и вида определяемых аминокислот продолжительность анализа составляет от 45 мин до 2 ч. На рис. 3.4.3/1 приведена хроматограмма разделения аминокислот гидролизата белка.

Флуорескамин (флуорам) или *о*-фталевый диальдегид взаимодействуют с первичной аминогруппой с образованием флуоресцирующих производных, которые детектируют с помощью флуориметра. Пролин вступает в реакцию только после окислительного декарбоксилирования *N*-хлорсукцинимидом до первичного амина. Предел обнаружения — пмоль.

Приборы

Гидролиз проводят в запаянных стеклянных ампулах в сушильном шкафу или термостате. Перед тем как запаять, ампулу с образцом несколько раз вакуумируют. Кроме стеклянных ампул диаметром 0,5—1 см и длиной 20—25 см используют также сосуд многоразового использования, снабженный краном.

Автоматический аминокислотный анализатор позволяет проводить анализ смеси аминокислот белковых гидролизатов. Блок-схема аминокислотного анализатора представлена на рис. 3.4.3/2. Подача буферных растворов 1—6 на ионообменную колонку 10 осуществляется с помощью соленоидных клапанов и насоса через автоматическое устройство ввода образца 7—9. Колонку заполняют специальной ионообменной смолой, которая должна обла-

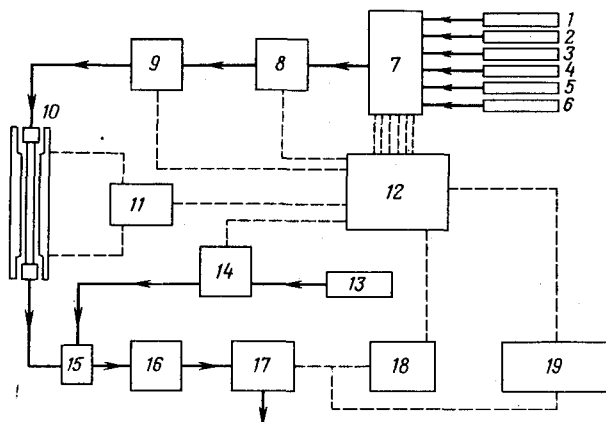


Рис. 3.4.3/2. Блок-схема аминокислотного анализатора (LKB, Bromma, Schweden)

дать высокой разрешающей способностью и устойчивостью к давлению. Нингидрин (или флуорескамин, или *o*-фталевый диальдегид) подается специальным насосом 14 из резервуара 13 и смешивается с элюатом, вытекающим из колонки, в специальном блоке 15. Затем полученная смесь подается в реакционный сосуд 16 для получения производных с последующим детектированием с помощью фотометра или флуориметра 17 по поглощению или флуоресценции и регистрацией на самописце 18. Контроль за процессами осуществляется с помощью программирующего устройства 12. В блоке обработки информации 19 происходит анализ полученных результатов, а также сравнение интенсивности сигналов отдельных аминокислот со стандартной смесью и определение абсолютного количества каждой аминокислоты в данном гидролизате. Идентификацию каждой аминокислоты проводят по соответствующему времени удерживания. После анализа автоматически осуществляется регенерация сорбента в колонке.

Порядок выполнения операций

Гидролиз образца проводят следующим образом:

берут точную навеску высушенного образца (1—5 мг) и растворяют в нескольких миллилитрах гидролизующей смеси; непосредственно для анализа необходимо приблизительно 10 мкмоль пептида или аминокислотной смеси;

гидролиз проводят в специальных ампулах (см. табл. 3.4.3/1);

нижнюю часть ампулы с образцом погружают в охлаждающую смесь и замораживают (см. разд. 4.1);

ампулу вакуумируют при помощи водоструйного насоса, предпочтительнее использовать ротационный масляный насос;

длинный конец ампулы запаивают в остром пламени паяльной лампы (в крайнем случае применяют горелку Бунзена), при запаивании равномерно вращают ампулу в пламени до размягчения стекла, а затем осторожно растягивают до образования разрыва; эту операцию проводят во избежание втягивания размягченного стекла внутрь вакуумированной ампулы; острый стеклянный конец, образующийся в месте разрыва, оплавливают в пламени горелки;

продолжительность гидролиза и обработку образца проводят в соответствии с условиями, указанными в табл. 3.4.3/1.

По окончании гидролиза раствор упаривают досуха на роторном испарителе, затем к остатку добавляют приблизительно 10 мл дистиллированной воды и снова упаривают досуха; остаток растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора в мерной колбе до 10 мл; из полученного раствора отбирают аликвотную часть на анализ (от 10 до 100 нмоль в расчете на каждую аминокислоту).

Превращение цистеина в цистеиновую кислоту (этот прием используют для предотвращения выделения сероводорода при кислотном гидролизе): раствор белка упаривают на роторном испарителе и последовательно добавляют 0,4 мл муравьиной кислоты, 0,2 мл этанола и 0,2 мл надмуравьиной кислоты (последнюю готовят заранее, инкубируя смесь 9,5 мл муравьиной кислоты с 0,5 мл 30%-го пероксида водорода в течение 2 ч в холодильнике); реакцию проводят в течение 24 ч при 0 °С, затем реакционную смесь упаривают в вакууме, к остатку добавляют 20 мл дистиллированной воды и снова упаривают досуха; полученный остаток подвергают соответствующей обработке и определяют его аминокислотный состав.

Оформление результатов

Полученные данные записывают в виде таблицы, в которой указывают условия гидролиза, относительное содержание аминокислот, а также теоретически рассчитанный аминокислотный состав. Относительное содержание аминокислот рассчитывают по отношению к одному из стабильных аминокислотных остатков (например, аланину). Например, аминокислотный анализ (6 н. HCl, 24 ч, 110 °С), найдено (вычислено) относительно аланина: лизин — 6,1 (6), аланин — 3,0 (3), пролин — 1,9 (2), серин — 0,8 (1).

При интерпретации данных следует учитывать, что остатки аспарагина и глутамина в условиях обычного кислотного гидролиза превращаются соответственно в аспарагиновую и глутаминовую кислоты с одновременным выделением аммиака. Для более точного определения серина проводят гидролиз белка в течение различных периодов времени и полученные данные экстраполи-

руют к нулевому времени гидролиза. В этом случае полученные результаты оформляют следующим образом: серин — 0,95 (исправлено).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- S. Blackburn (Hrsg.), Amino Acid Determination, Marcel Dekker, New York, 1978
 T. Devenyi, J. Gergely, Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1968
 Firmenschrift, Bioresearch and Chromatography Products, Pierce Eurochemie, Rotterdam 1981—82
 E. Jäger, in: Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 15/2, S. 681, Thieme, Stuttgart 1974
 J. M. Stewart, J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman, San Francisco 1969

3.4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАЧЕНИЯ pH

Концентрацию гидроксоний-анионов, а следовательно, и значение pH можно определить электрометрическим методом, который основан на измерении разности потенциалов между электродом, потенциал которого зависит от pH, и электродом сравнения.

Физические основы метода

Значение pH раствора определяют как десятичный логарифм концентрации гидроксоний-ионов, взятый с обратным знаком:

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}_3\text{O}^+].$$

Строго говоря, вместо значения концентрации следует использовать значение активности ионов, которая является термодинамической величиной и представляет собой эффективную концентрацию ионов в растворе. Произведение концентраций гидроксоний-ионов и гидроксид-ионов является постоянной величиной и равно $1 \cdot 10^{-14}$ моль²·л⁻²: $[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = K = 1 \cdot 10^{-14}$. Концентрация H_3O^+ (и соответственно значение pH) зависит от температуры; она возрастает с увеличением температуры. В 1 л чистой воды при 22 °C содержится $1 \cdot 10^{-7}$ моль (1,9 мкг) H_3O^+ и $1 \cdot 10^{-7}$ моль (1,7 мкг) OH^- -ионов.

Колориметрический метод определения pH с применением индикаторов в этом разделе не рассматривается. Широко распространенный электрометрический метод характеризуется более высокой точностью измерения (от $\pm 0,1$ до $\pm 0,01$ единиц pH), а также позволяет проводить измерения в мутных и окрашенных растворах.

При электрометрическом определении измеряют разность потенциалов между электродом сравнения с постоянным потенциалом и измерительным электродом, потенциал которого зависит от pH (рис. 3.4.4/1). В большинстве случаев для этого приме-

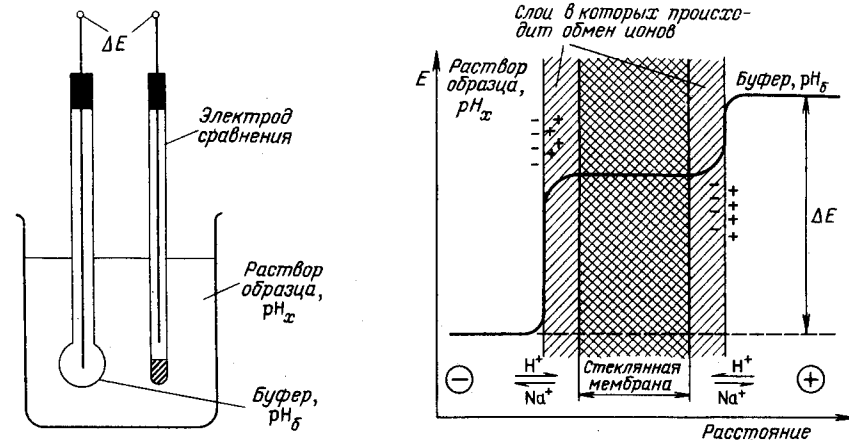


Рис. 3.4.4/1. Схема ячейки для электрометрического измерения значения pH

Рис. 3.4.4/2. Соотношение потенциалов на мембране стеклянного электрода

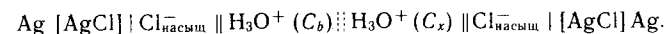
няют комбинированный стеклянный электрод, содержащий оба электрода в одном блоке. Измерительный электрод расположен во внутренней трубке, электрод сравнения — во внешней кожухе.

Основной частью стеклянного электрода является тонкостенная стеклянная мембрана в форме шарика, внутрь которого заливается буфер с определенным значением pH — $\text{pH}_б$, т. е. с известной концентрацией H_3O^+ -ионов (рис. 3.4.4/2). Шарик погружают в анализируемый раствор с неизвестным значением pH — pH_x . При этом по обе стороны мембраны происходит постоянный обмен H_3O^+ -ионов раствора с ионами Na^+ стекла. Если значения $\text{pH}_б$ и pH_x различаются, то значения электрических потенциалов по обе стороны стеклянной мембраны различны. Возникающая разность потенциалов ΔE пропорциональна значению pH в диапазоне от 1,5 до 9,5 и описывается уравнением Нернста (при 25 °C):

$$\Delta E = 0,059 (\text{pH}_б - \text{pH}_x),$$

где $\text{pH}_б = \text{pH}$ буферного раствора; $\text{pH}_x = \text{pH}$ исследуемого раствора.

Комбинированный стеклянный электрод состоит из двух электродов со следующей концентрационной цепью:



При $\text{pH} > 11$ наблюдается отклонение от уравнения Нернста, так как стеклянный электрод постепенно преобразуется в электрод, чувствительный к ионам Na^+ , причем отклонение происходит

в щелочную область и может составлять около 0,2 единиц рН в области рН 14. В этом случае возникает так называемая «щелочная ошибка».

При проведении измерений в широком диапазоне рН следует учитывать характеристическую электродную величину, называемую «крутизной прямой, описывающей зависимость электродного потенциала (мВ) от рН». При подготовке рН-метра к работе сначала проводят калибровку по стандартному буферу с низким значением рН, а затем при помощи регулятора крутизны устанавливают соответствующие показания прибора по стандартному буферу с большим значением рН.

Приборы

Устройство для электрометрического измерения рН состоит из измерительного прибора (рН-метра) и комбинированного стеклянного электрода в виде объединенного блока, содержащего стеклянный электрод и электрод сравнения (рис. 3.4.4/3). Стандартные приборы позволяют проводить измерения рН в области температур от 0 до 70 °С.

Порядок выполнения операций

Калибровку прибора и измерения рекомендуется проводить при одной и той же температуре, так как изменение температуры существенно влияет как на величину электродного потенциала, так и на активность H_3O^+ -ионов. Приборы многих конструкций снабжены температурными компенсаторами.

В области нейтральных значений рН требуется лишь незначительная компенсация, однако в области экстремальных значений наблюдается значительная зависимость значений рН от температуры.

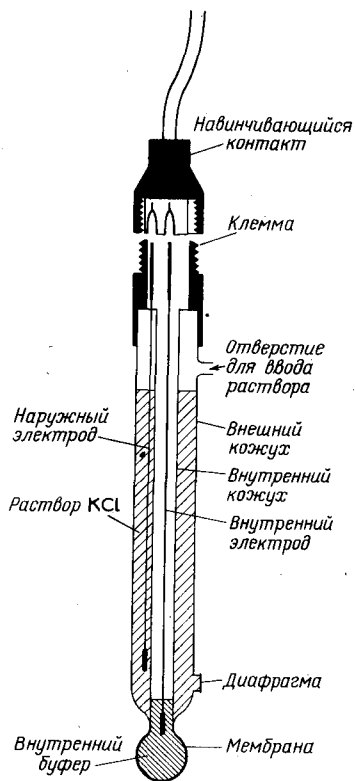


Рис. 3.4.4/3. Комбинированный стеклянный электрод для измерения рН, состоящий из измерительного и сравнительного электродов

Калибровка прибора

Устанавливают переключатель диапазона измерений в положение «stand-by» или «null».

Включают прибор.

Определяют температуру буферного раствора и устанавливают ручку компенсатора температуры на соответствующее значение.

Устанавливают переключатель диапазона измерений в положение «рН».

Устанавливают значение рН стандартного буфера на нуль-потенциометре. При этом учитывают время настройки.

При проведении измерений в широком диапазоне рН контролируют крутизну: регулятор крутизны устанавливают на 100%, затем плавно регулируют правильность показаний прибора по буферным растворам с низким и высоким значением рН.

Устанавливают переключатель в положение «stand-by» или «null».

После окончания калибровки электроды оставляют в буферном растворе.

Измерение рН

Устанавливают переключатель диапазона измерений в положение «stand-by» или «null».

Включают прибор.

Устанавливают температуру раствора на температурном компенсаторе.

Промывают электрод (или электроды) дистиллированной водой и осторожно промокают фильтровальной бумагой (не обтирать!).

Погружают электрод в исследуемый раствор. Устанавливают переключатель диапазона рН в соответствующее положение.

Отсчет значений рН проводят через некоторое время после установления постоянного значения на шкале прибора.

Устанавливают переключатель в положение «stand-by» или «null» и выключают прибор.

Электрод вынимают из исследуемого раствора, промывают дистиллированной водой и погружают в 3 М раствор хлорида калия для хранения.

Хранение стеклянных электродов

Хранят электроды в том же растворе, который находится внутри стеклянной мембраны. Для этой цели используют 3 М раствор хлорида калия, в мембранах более старых конструкций — насыщенный раствор хлорида калия.

При проведении измерений в неводных средах на обычном электроде сравнения возникает высокий диффузионный потенциал. В связи с этим электролит электрода сравнения заменяют на метанольный раствор хлорида калия. При частых измерениях применяют солевой мостик: например, насыщенный раствор тетраэтиламмонийперхлората в смеси 50%-го диметилсульфоксида и 50%-го метанола. При применении стеклянных электродов в неводных средах у них изменяется набухаемость мембраны, что вызывает необходимость проведения частой регенерации электродов в водных растворах.

Измерение значения рН с помощью стеклянного электрода проводят не сразу, а через некоторое время (чаще всего через 1 мин). При увеличении этого периода возможно более точное определение значения рН в неводных средах, так как значение рН устанавливается асимптотически.

Источники ошибок

Большая инерция при установлении показаний или их полное отсутствие

Образование осадка хлорида серебра, что приводит к закупорке диафрагмы. Способ устранения: электрод погружают в концентрированный раствор аммиака, тщательно промывают и выдерживают в буферном растворе, рН 4 в течение 1 ч.

Образование осадка на электроде сравнения (KCl). Способ устранения: электрод погружают в теплую воду и, встряхивая, растворяют осадок или отсасывают электролит капилляром и затем заполняют электрод свежеприготовленным электролитом.

Образование осадка белка на диафрагме при измерении рН белковых растворов. Способ устранения: электрод погружают в раствор пепсина (5%-й раствор пепсина в 0,1 н. хлороводородной кислоте) на 2 ч, а затем тщательно отмывают; эту операцию проводят периодически через каждые 2 недели.

Дрейф измеряемого значения рН

Накопление статического заряда на стеклянной мембране, например при обтирании ее фильтровальной бумагой. Способ устранения: промывают электрод и осторожно его промокают.

Зашкаливание (показания выходят за пределы шкалы)

Разрыв цепи между электродом и рН-метром.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

K. Schwabe, pN-Meßtechnik, Steinkopff, Dresden 1976

4. ПРИЛОЖЕНИЕ

4.1. СПРАВОЧНЫЕ ТАБЛИЦЫ

Таблица 4.1/1. Единицы международной системы (СИ)

Основные единицы СИ			
величина	обозначение величины	наименование единицы	обозначение единицы (русское)
Длина	<i>l</i>	метр	м
Масса	<i>m</i>	килограмм	кг
Время	<i>t</i>	секунда	с
Сила электрического тока	<i>I</i>	ампер	А
Термодинамическая температура	<i>T</i>	кельвин	К
Количество вещества	<i>n</i>	моль	моль
Сила света	<i>J</i>	кандела	кд

Производные единицы СИ, имеющие собственные наименования

величина	наименование единицы	обозначение единицы	выражение производной единицы через основные единицы СИ
Сила	ньютон	Н	$\text{м} \cdot \text{кг} \cdot \text{с}^{-2}$
Давление	паскаль	Па	$\text{кг} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{с}^{-2}$
Энергия	джоуль	Дж	$\text{кг} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-2}$
Мощность	ватт	Вт	$\text{кг} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-3}$
Количество электричества	кулон	Кл	А · с
Напряжение	вольт	В	$\text{кг} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-3} \cdot \text{А}^{-1}$
Сопротивление	ом	Ом	$\text{кг} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-3} \cdot \text{А}^{-2}$
Электропроводность	сименс	См	$\text{кг}^{-1} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^3 \cdot \text{А}^2$
Электрическая емкость	фарад	Ф	$\text{кг}^{-1} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^4 \cdot \text{А}^2$
Индуктивность	генри	Гн	$\text{кг} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-2} \cdot \text{А}^{-2}$
Поток магнитной индукции	вебер	Вб	$\text{кг} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-2} \cdot \text{А}^{-1}$
Магнитная индукция	тесла	Тл	$\text{кг} \cdot \text{с}^{-2} \cdot \text{А}^{-1}$
Частота	герц	Гц	с^{-1}
Доза излучения	грэй	Гр	$\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-2}$

Таблица 4.1/2. Внесистемные единицы и единицы системы СГС и их перевод в систему СИ

Величина	Обозначение величины	Наименование и обозначение единицы (внесистемное или СГС)	Перевод в единицы СИ
Давление	p	бар (бар)	$1 \cdot 10^5$ Па
		атмосфера	
		физическая (атм)	101 325 Па
Энергия	E	техническая (ат)	98 066,5 Па
		торр (торр)	133,322 Па
		эрг (эрг)	$1 \cdot 10^{-7}$ Дж
		электрон-вольт (эВ)	$1,602 \cdot 10^{-19}$ Дж
		киловатт-час (кВт·ч)	$3,6 \cdot 10^6$ Дж
		калория (кал)	4,186 Дж
Сила	F	дина (дин)	$1 \cdot 10^{-5}$ Н
Длина	l	ангстрем (А)	$1 \cdot 10^{-10}$ м
Мощность	P	лошадиная сила (л. с.)	735,499 Вт
Масса	m	тонна (т)	$1 \cdot 10^3$ кг

Таблица 4.1/3. Десятичные приставки

Числовые значения	Произношение	Обозначения		Числовые значения	Произношение	Обозначения	
		русские	международные			русские	международные
10^{18}	Экза	E	E	10^{-1}	Деци	d	d
10^{15}	Пета	P	P	10^{-2}	Санتي	c	c
10^{12}	Тера	T	T	10^{-3}	Милли	m	m
10^9	Гига	G	G	10^{-6}	Микро	μk	μ
10^6	Мега	M	M	10^{-9}	Нано	n	p
10^3	Кило	k	k	10^{-12}	Пико	p	p
10^2	Гекто	g	h	10^{-15}	Фемто	ϕ	i
10	Дека	dk	dc	10^{-18}	Атто	a	a

Таблица 4.1/4. Соотношение между единицами энергии и силы

Соотношение между единицами энергии					
Единица	Дж	кгс·м	кВт·ч	ккал	эВ
Джоуль	1	0,102	$2,778 \cdot 10^{-7}$	$2,388 \cdot 10^{-4}$	$0,624 \cdot 10^{19}$
Килограмм-сила-метр	9,807	1	$2,724 \cdot 10^{-6}$	$2,342 \cdot 10^{-3}$	$0,612 \cdot 10^{20}$
Киловатт-час	$3,600 \cdot 10^6$	$3,671 \cdot 10^5$	1	$8,589 \cdot 10^2$	$2,247 \cdot 10^{25}$
Килокалория	$4,178 \cdot 10^3$	$4,269 \cdot 10^2$	$1,163 \cdot 10^{-3}$	1	$2,613 \cdot 10^{22}$
Электрон-вольт	$1,602 \cdot 10^{-19}$	$1,634 \cdot 10^{-20}$	$4,450 \cdot 10^{-26}$	$3,826 \cdot 10^{-23}$	1
Соотношение между единицами силы					
Единица	Па	бар	торр	атм	ат
Паскаль	1	10^{-5}	$0,750 \cdot 10^{-2}$	$0,987 \cdot 10^{-5}$	$1,0097 \cdot 10^{-5}$
Бар	10^5	1	750,04	0,987	1,0097
Торр	$1,333 \cdot 10^2$	$1,333 \cdot 10^{-3}$	1	$1,316 \cdot 10^{-3}$	$1,3590 \cdot 10^{-3}$
Атмосфера физическая	$1,013 \cdot 10^5$	1,013	760	1	1,0332
Атмосфера техническая	$0,981 \cdot 10^5$	0,981	735,53	0,968	1

Таблица 4.1/5. Физические константы

Название константы	Обозначение	Значение	Единица (СИ)
Атомная единица массы	u	$1,66057 \cdot 10^{-27}$	кг
Постоянная Авогадро	N_A	$6,02205 \cdot 10^{23}$	моль $^{-1}$
Магнетон Бора	μ_B	$9,2741 \cdot 10^{-24}$	А·м 2
Константа Больцмана	k	$1,38066 \cdot 10^{-23}$	Дж·К $^{-1}$
Электрическая постоянная	ϵ_0	$8,85419 \cdot 10^{-12}$	Ф·м $^{-1}$
Масса покоя электрона	m_e	$9,1095 \cdot 10^{-31}$	кг
Элементарный заряд	e	$1,60219 \cdot 10^{-19}$	Кл
Постоянная Фарадея	F	$9,64846 \cdot 10^4$	Кл·моль $^{-1}$
Газовая постоянная	R	8,31411	Дж·К $^{-1}$
Ядерный магнетон	μ	$5,05082 \cdot 10^{-27}$	А·м 2

Таблица 4.1/6. Способы выражения концентраций веществ

Название	Определение	Единица
Массовая	m_i/V	кг·м $^{-3}$ (г·л $^{-1}$)
Объемная	V_i/V	—
Молярная (зависит от температуры)	n_i/V	моль·м $^{-3}$ (моль·л $^{-1}$)
Моляльная (не зависит от температуры)	n_i/m_L	моль·кг $^{-1}$

Таблица 4.1/7. Органические растворители

Растворитель	$T_{кип}, ^\circ C$	$d_{20}^{20}, г \cdot см^{-3}$	n_D^{20}	$T_{воспл}, ^\circ C$	Осушитель
Ацетон	56	0,791	1,359	-18	$CaCl_2$; K_2CO_3 ; молекулярные сита 3 Å
Ацетонитрил	82	0,782	1,344	+6	$CaCl_2$; P_2O_5 ; K_2CO_3 ; молекулярные сита 3 Å
Анизол	154	0,995	1,518	+51	$CaCl_2$; перегонка; Na
Бензол	80	0,879	1,501	-10	Перегонка; $CaCl_2$; Na; Na/Pb; молекулярные сита 4 Å
1-Бутанол	118	0,810	1,399	+29	K_2CO_3 ; перегонка
2-Бутанол	100	0,808	1,398	+24	То же
трет-Бутанол	82	0,786	1,384	+11	CaO ; вымораживание
n-Бутилацетат	126	0,882	1,394	+33	$MgSO_4$; $CaCl_2$; P_2O_5 ; Na/Pb; молекулярные сита 4 Å
Хлороформ	61	1,480	1,448		
Циклогексан	81	0,779	1,426	-17	Na; Na/Pb; молекулярные сита 4 Å
Декагидронафталин (декалин)	190	0,886	1,48	+57	$CaCl_2$; Na; Na/Pb
Дихлорметан	40	1,325	1,424		$CaCl_2$; Na/Pb; молекулярные сита 4 Å
Диэтиловый эфир	35	0,714	1,353	-40	$CaCl_2$; Na; Na/Pb; LiAlH ₄ ; молекулярные сита 4 Å
Диэтилкарбонат	126	0,975	1,385	-	K_2CO_3 ; Na_2SO_4
Диметилловый эфир диэтиленгликоля	162	0,945	1,407	+70	$CaCl_2$; Na
Диизопропиловый эфир	68	0,726	1,368	-23	$CaCl_2$; Na; молекулярные сита 4 Å
Диметилформамид	153	0,950	1,430	+62	Перегонка; молекулярные сита 4 Å
Диметилсульфоксид	189	1,101	1,479	+95	Перегонка
1,4-Диоксан	101	1,034	1,422	+12	$CaCl_2$; Na; молекулярные сита 4 Å
Уксусная кислота	118	1,049	1,372	+40	P_2O_5 ; $Mg(ClO_4)_2$; $CuSO_4$
Уксусный ангидрид	136	1,082	1,390	+49	$CaCl_2$
Этанол	78	0,791	1,361	+12	CaO ; Mg ; MgO ; молекулярные сита 3 Å
Этилацетат	77	0,910	1,372	-4	K_2CO_3 ; P_2O_5 ; Na_2SO_4 ; молекулярные сита 4 Å
Этиленгликоль	197	1,109	1,432	+111	Перегонка; Na_2SO_4
Монометиловый эфир этиленгликоля	124	0,965	1,402	+52	Перегонка
Этилформиат	54	0,924	1,360	-19	$CaCl_2$; $MgSO_4$; Na_2SO_4
Этилметилкетон	80	0,806	1,380	-4	K_2CO_3 ; $CaCl_2$
Глицерин	290	1,260	1,475	+176	Перегонка

Продолжение табл. 4.1/7

Растворитель	$T_{кип}, ^\circ C$	$d_{20}^{20}, г \cdot см^{-3}$	n_D^{20}	$T_{воспл}, ^\circ C$	Осушитель
n-Гексан	69	0,659	1,375	-23	Na; Na/Pb; LiAlH ₄ ; молекулярные сита 4 Å
Метилацетат	57	0,933	1,362	-10	K_2CO_3 ; CaO
Метанол	65	0,792	1,329	+11	Mo; CaO ; молекулярные сита 3 Å
n-Пентан	36	0,626	1,358	-49	Na; Na/Pb
1-Пропанол	97	0,804	1,385	+15	CaO ; Mg
2-Пропанол	82	0,785	1,378	+12	CaO ; Mg ; молекулярные сита 3 Å
Пиридин	115	0,982	1,510	+20	KOH; BaO; молекулярные сита 4 Å
Сероуглерод	46	1,263	1,626	-30	$CaCl_2$; P_2O_5
Четыреххлористый углерод	77	1,594	1,466	He воспламеняется	$CaCl_2$; P_2O_5 ; Na/Pb; молекулярные сита 4 Å
Тetraгидрофуран	66	0,887	1,407	-17	KOH; Na; молекулярные сита 4 Å
Тetraгидронафталин (тетралин)	207	0,973	1,546	+78	$CaCl_2$; Na
Толуол	111	0,867	1,497	+4	Перегонка; Na; $CaCl_2$; молекулярные сита 4 Å
Трихлорэтилен	87	1,462	1,478	-	Перегонка; Na_2SO_4 ; K_2CO_3
Ксилол (изомеры)	137—140	0,86	1,50	+27	Na; $CaCl_2$; молекулярные сита 4 Å

Таблица 4.1/8. Элюотропный ряд растворителей *

Растворитель	Элюирующая способность растворителей («полярность»)	Вязкость η , мПа·с	Показатель преломления n_D	Наименьшая длина волны, нм
n-Пентан	0,00	0,24	1,358	200
n-Гексан	0,01	0,33	1,375	200
n-Гептан	0,01	0,42	1,388	200
Изооктан	0,01	0,50	1,391	200
Циклогексан	0,04	0,98	1,426	210
Четыреххлористый углерод	0,18	0,97	1,466	265
Диизопропиловый эфир	0,28	0,37	1,368	220
Толуол	0,29	0,59	1,496	290
n-Пропилхлорид	0,30	0,35	1,389	225
Бензол	0,32	0,65	1,501	290
Этилбромид	0,37	0,39	1,421	230
Диэтиловый эфир	0,38	0,23	1,353	220

* Все значения измерены при 20 °C; полярность растворителей указана оксида алюминия.

Продолжение табл. 4.1/8

Растворитель	Элюирующая способность растворителей («полярность»)	Вязкость η , мПа·с	Показатель преломления n_D	Наименьшая длина волны, нм
Хлороформ	0,40	0,57	1,443	250
Дихлорметан	0,42	0,44	1,424	250
Тетрагидрофуран	0,45	0,46	1,407	220
Этиленхлорид	0,49	0,79	1,445	230
Ацетон	0,56	0,32	1,359	330
Диоксан	0,56	1,54	1,422	220
Этилацетат	0,58	0,45	1,370	260
Метилацетат	0,60	0,37	1,362	260
Нитрометан	0,64	0,65	1,382	380
Ацетонитрил	0,65	0,37	1,344	210
Пиридин	0,71	0,94	1,510	310
n-Пропанол	0,82	2,30	1,380	200
Этанол	0,88	1,20	1,361	200
Метанол	0,95	1,20	1,361	200
Гликоль	1,11	19,90	1,427	200
Вода	большая	1,00	1,333	—
Формамид	большая	3,76	1,448	—
Уксусная кислота	большая	1,26	1,372	—

Таблица 4.1/9. Взаимная растворимость веществ

	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1 Ацетон	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 Ацетонитрил	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 Бензол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 Бутанол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 Хлороформ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 Циклогексан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 Дихлорметан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 Диметилформамид	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9 Диметилсульфоксид	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 Диоксан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 Диэтиловый эфир	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 Этилацетат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13 Этанол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 Гексан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 Метанол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 Пропанол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17 Четыреххлористый углерод	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18 Тетрагидрофуран	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19 Толуол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20 Вода	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Условные обозначения:
 + — смешиваются; ○ — не смешиваются.

Таблица 4.1/10. Сравнительная высушивающая способность различных веществ

Высушивающее вещество	Количество водяных паров, оставшихся в 1 л воздуха при 25 °С, мг	Высушивающее вещество	Количество водяных паров, оставшихся в 1 л воздуха при 25 °С, мг
Сульфат меди (CuSO_4)	1,4	Серная кислота, 100%-я (H_2SO_4)	0,003
Хлорид кальция (CaCl_2)	0,2	Оксид алюминия (Al_2O_3)	0,003
Оксид кальция (CaO)	0,2	Гидроксид калия (KOH)	0,002
Гидроксид натрия (NaOH)	0,16	Кизельгур ($[\text{SiO}_2]_n$)	0,001
Сульфат кальция (CaSO_4)	0,005	Пентаоксид дифосфора (P_2O_5)	0,00002

Таблица 4.1/11. Высушивание растворителей над оксидом алюминия *

Растворитель	Содержание воды, %	Масса Al_2O_3 в колонке, г	Количество абсолютированного растворителя, мл (максимальное содержание воды, %)
n-Гексан	0,01 **	10	1000 (0,002)
Бензол	0,07 **	25	2500 (0,004)
Хлороформ	0,09 **	25	800 (0,005)
Дихлорметан	0,20 **	25	600 (0,005)
Четыреххлористый углерод	0,01 **	10	1000 (0,003)
Циклогексан	0,01 **	10	1000 (0,003)
Эфир уксусной кислоты	3,25 **	500	700 (0,01)
Диэтиловый эфир	1,28 **	200	1200 (0,01)
Диоксан	0,1 ***	50	700 (0,002)
Тетрагидрофуран	0,1 ***	50	700 (0,002)
Ацетонитрил	0,1 ***	50	600 (0,002)
Пиридин	0,6 ***	50	70 (0,02)

* Высушивание проводят путем хроматографирования на основном оксиде алюминия 1-й степени активности (исключение для эфиров уксусной кислоты составляет нейтральный оксид алюминия 1-й степени активности). Метод пригоден для абсолютирования больших объемов растворителей: особенно для эфиров уксусной кислоты и диэтилового эфира.

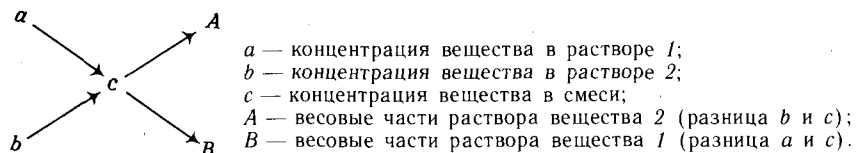
** Растворитель насыщен водой.

*** Растворитель смешивается с водой в любых отношениях.

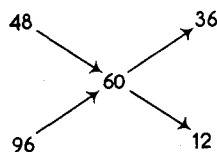
Таблица 4.1/12. Концентрации кислот, выпускаемых промышленностью

Кислота	% (масс.)	Плотность	Нормальность
Муравьиная кислота	98—100	1,22	26
Уксусная кислота	99—100	1,06	18
Фосфорная кислота, концентрированная	89	1,75	48
Хлороводородная кислота, концентрированная	36	1,18	12
Хлороводородная кислота, дымящая	38	1,19	12,5
Азотная кислота, концентрированная	65	1,40	14
Азотная кислота, дымящая	99	1,51	21
Серная кислота, концентрированная	96	1,84	36
Серная кислота, дымящая	(65% SO ₃)	1,99	—

Таблица 4.1/13. Правило смешения («правило креста»)



Пример. Необходимо получить 60%-й раствор азотной кислоты путем смешения 96%-й и 48%-й азотной кислоты.

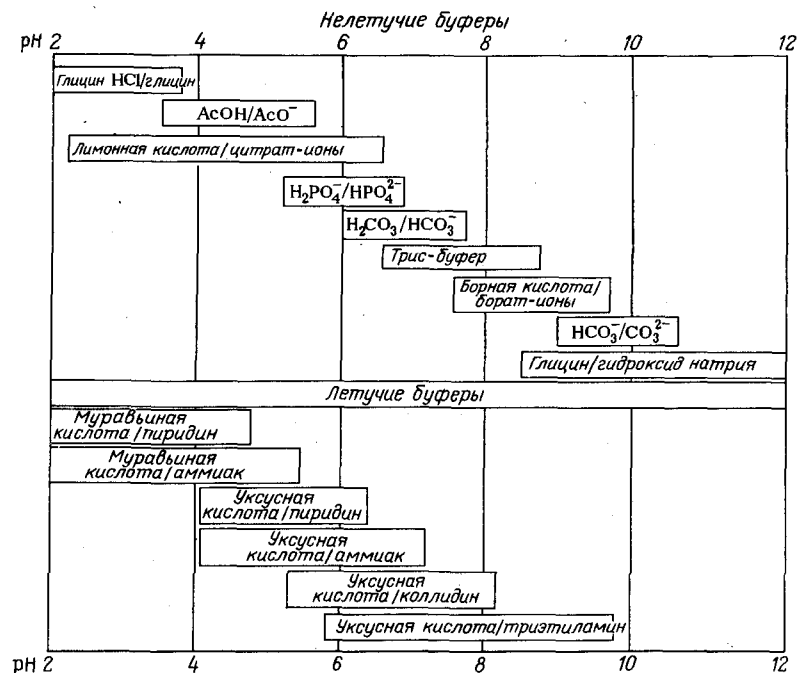


Следовательно, для получения 60%-й азотной кислоты смешивают 36 вес. ч. 48%-й кислоты с 12 вес. ч. 96%-й кислоты.

Таблица 4.1/14. Охлаждающие смеси

Соль	Масса соли, г на 100 г льда	Наименьшая достигаемая температура, °C
Нитрат калия	12	—3
Хлорид калия	24	—11
Хлорид аммония	23	—16
Хлорид натрия	31	—21
Бромид натрия	67	—28
Карбонат калия	65	—37
Хлорид кальция	72	—55
Ацетон + сухой лед		—77

Таблица 4.1/15. Буферные растворы, применяемые для стабилизации значений pH



4.2. ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ НЕСЧАСТНЫХ СЛУЧАЯХ

К обязательным условиям безопасной работы в лаборатории относятся, во-первых, наличие в лаборатории средств безопасности, которые включают аптечку, огнетушитель, одеяло или накидку с негорючей пропиткой, гибкий шланг для принятия экстренного душа и, во-вторых, наличие на видном месте телефонов и адресов ближайших пунктов скорой помощи, поликлиник, пожарных депо.

При несчастном случае рекомендуется принять срочные меры помощи:

при химическом ожоге снять поврежденную одежду, тщательно промыть пораженное место водой;

при ожоге глаз тщательно промыть глаза слабой струей воды при открытых веках, затем срочно обратиться к врачу;

при порезах наложить временную повязку и обратиться к врачу (хирургу);

при повреждении артерии туго перевязать поврежденное место и срочно обратиться в больницу;

при ожоге пламенем небольшой ожог промыть холодной (ледяной) водой, при ожоге большого участка наложить противоожоговую повязку, затем обратиться к врачу;

при потере сознания положить пострадавшего на спину, расстегнуть ворот рубашки, открыть форточку или перенести пострадавшего на свежий воздух, немедленно вызвать врача, не давать пострадавшему пить.

Справочное издание

К. Е. Геккелер, Х. Экштайн

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ПРЕПАРАТИВНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ

Редактор Ю. П. Леонова
Художник И. К. Капралова
Художественный редактор К. К. Федоров
Технический редактор О. В. Тюрина
Корректоры М. А. Ивлиева, Л. В. Лазуткина

ИБ № 2678

Сдано в наб. 10.06.91. Подп. в печать 09.06.93. Формат 60 × 88/16.
Бумага тип. № 2. Гарнитура Литературная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 25,48. Усл. кр.-отг. 25,48. Уч.-изд. л. 26,76.
Тираж 3500 экз. Заказ 48. С. 62.

Ордена «Знак Почета» издательство «Химия»
107076, Москва, Стромынка, 21, корп. 2.

Набрано в типографии № 2 ордена Трудового Красного Знамени
ГП «Техническая книга» Мининформпечати РФ.
198052, г. Санкт-Петербург, Измайловский пр., 29

Диапозитивы изготовлены в фотонаборном цехе ордена Трудового
Красного Знамени ГП «Техническая книга» Мининформпечати РФ.
190068, г. Санкт-Петербург, ул. Садовая, 55/57

Отпечатано с готовых пленок в Московской типографии № 11
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1

ВНИМАНИЕ ПРЕДПРИЯТИЙ И ОРГАНИЗАЦИЙ!

Издательство «Химия» предлагает
публикацию в книгах рекламы:

— новых видов продукции пред-
приятий

— машин и оборудования для хи-
мической промышленности

— научных разработок в области
химии

— новых технологий и т. д.

Стоимость 1 полосы опубликован-
ного рекламного материала 1,5—
3 тыс. руб. в зависимости от тиража
и вида издания.

Адрес издательства «Химия».
107076, Москва, Стромынка, д. 21, корп. 2
Телефон: 268-58-58 «Реклама»
268-29-78