



ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Рекомендовано в качестве учебного пособия
Редакционно-издательским советом
Томского политехнического университета*

Издательство
Томского политехнического университета
2015

УДК 615:543.4/.5(075.8)

ББК 85.81:24.3я73

И72

Авторы

Г.Б. Слепченко, В.И. Дерябина, Т.М. Гиндуллина,
Н.П. Пикула, А.А. Бакибаев

Инструментальный анализ биологически активных ве-
И72 ществ и лекарственных средств : учебное пособие / Г.Б. Слепчен-
ко, В.И. Дерябина, Т.М. Гиндуллина и др. ; Томский политехниче-
ский университет. – Томск : Изд-во Томского политехнического
университета, 2015. – 198 с.

Пособие подготовлено в соответствии с рабочей программой дисциплины. Представлены практически все физико-химические методы анализа: экстракционные, хроматографические, оптические и электрохимические. Показано современное развитие этих методов в контроле лекарственных средств и биологически активных веществ.

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению «Химическая технология» по профилям «Инжиниринг в биотехнологических и фармацевтических производствах» и «Химическая технология синтетических биологически активных веществ, химико-фармацевтических препаратов и косметических средств».

УДК 615:543.4/.5(075.8)

ББК 85.81:24.3я73

Рецензенты

Доктор технических наук, профессор ТГУ
В.И. Отмахов

Доктор химических наук, профессор ТГПУ
С.В. Ковалева

© ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2015

© Авторы, 2015

© Оформление. Издательство Томского
политехнического университета, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1	
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ	9
Глава 2	
СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	16
2.1. Основы спектроскопии	16
2.2. Методы атомной спектроскопии	22
2.2.1. Атомно-абсорбционная спектроскопия	23
2.2.2. Атомно-эмиссионная спектроскопия	27
2.2.3. Рентгеновская и электронная спектроскопия	29
2.3. Методы оптической молекулярной спектроскопии	33
2.3.1. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния	33
2.3.2. УФ-видимая спектроскопия	36
2.3.3. Флуоресцентная и фосфоресцентная спектроскопия	41
2.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	44
2.5. Масс-спектрометрия	49
2.6. Методы анализа, основанные на радиоактивности	54
Литература	58
Вопросы для самоконтроля	59
Глава 3	
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	60
3.1. Потенциометрия с ион-селективными электродами (Ионометрия)	61
3.1.1. Индикаторные электроды	61
3.1.2. Электроды сравнения	63
3.1.3. Способы определения концентрации ионов с ИСЭ	65
3.1.4. Потенциометрическое титрование	66
3.2. Амперометрия	68
3.2.1. Амперометрическое титрование	68
3.2.2. Титрование с использованием реакций комплексообразования	71
3.2.3. Титрование с использованием реакций окисления-восстановления	72

3.2.4. Титрование с образованием малорастворимых соединений	73
3.3. Кондуктометрия	76
3.4. Инверсионная вольтамперометрия	80
Литература	91
Вопросы для самоконтроля	92
Глава 4	
ХРОМАТОГРАФИЯ	93
4.1. Теоретические основы хроматографических методов	93
4.2. Варианты газовой хроматографии	101
4.3. Жидкостная хроматография	106
4.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография	106
4.3.2. Ионная хроматография	113
4.3.3. Гель-хроматография	115
4.3.4. Тонкослойная хроматография	117
4.4. Сверхкритическая флюидная хроматография и электрофорез	119
4.4.1. Сверхкритическая флюидная хроматография	119
4.4.2. Электрофорез	120
4.5. Сочетание хроматографии и спектроскопии	124
Литература	127
Вопросы для самоконтроля	128
Глава 5	
АНАЛИЗ РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ	129
5.1. Результаты применения ИК-спектроскопии в фармацевтическом анализе	129
5.2. Экстракционно-фотометрическое определение лекарственных веществ в органических и водно-органических средах	136
5.3. Фотометрическое определение лекарственных веществ	139
5.4. Современные методы определения антибиотиков	143
5.5. Аналитические возможности иммуносенсоров в определении лекарственных веществ	146
5.6. Методы спектроскопии в определении биологически активных соединений	147
5.6.1. Флуориметрическое определение охратоксина А в мицеллярных средах	147
5.6.2. Рентгенофлуоресцентный анализ молока и молочных продуктов	149
5.6.3. ЯМР-спектроскопия в анализе биологически активных веществ	150

5.6.4. Определение пуриновых алкалоидов в пищевых продуктах методом спектрофотометрии	152
5.6.5. Фотометрическое определение аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье	154
5.6.6. Циклическое инъекционное спектрофотометрическое определение флавоноидов в лекарственном растительном сырье	155
5.6.7. Экстракционное разделение и определение витаминов группы В методом Фирорда	157
5.6.8. Применение ИК-спектроскопии для анализа белков	158
5.6.9. Изучение влияния некоторых факторов на элементарный состав клеток цианобактерий с использованием атомно-спектральных методов	159
5.7. Электрохимические методы в определении биологически активных соединений	160
5.7.1. Новые потенциометрические сенсоры для определения β -лактамных антибиотиков	160
5.7.2. Cu-селективный электрод в ионометрии α -аминокислот	163
5.7.3. Новый экспрессный амперометрический способ определения антиоксидантной активности растительных лекарственных препаратов, биологически активных добавок и напитков	164
5.7.4. Определение витамина Е методом кулонометрии	167
5.7.5. Оценка биодоступности полифенолов по данным гальваностатической кулонометрии	167
5.7.6. Вольтамперометрическое определение серосодержащих аминокислот на электродах, модифицированных полимерными пленками	168
5.7.7. Вольтамперометрическое исследование морина	169
5.7.8. Инверсионно-вольтамперометрическое определение антибиотиков	171
5.7.9. Инверсионно-вольтамперометрическое определение витаминов	173
5.7.10. Инверсионно-вольтамперометрическое определение флавоноидов	177
5.8. Хроматографические методы в определении биологически активных веществ	179
5.8.1. Одновременное определение водо- и жирорастворимых витаминов методом жидкостной хроматографии	179
5.8.2. Разделение биологически активных веществ методом тонкослойной хроматографии	183
5.8.3. Определение сахаров и аминокислот методом ВЭЖХ	185

5.8.4. Идентификация и количественное определение флавоноидов в лекарственных препаратах растительного происхождения	186
5.8.5. Определение витамина Е методом ВЭЖХ с косвенным спектрофотометрическим детектированием	187
5.8.6. Определение микотоксинов методом ВЭЖХ	192
5.8.7. Электрофорез. Анализ аминокислот	194
Литература	195
Контрольные вопросы	196

ВВЕДЕНИЕ

Пособие является теоретической основой дисциплины «Современные методы исследований и контроля лекарственных средств». Оно подготовлено в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначено для обучения студентов по направлению «Химическая технология» по профилям: «Инжиниринг в биотехнологических и фармацевтических производствах» и «Химическая технология синтетических биологически активных веществ, химико-фармацевтических препаратов и косметических средств».

Материал в пособии представлен в виде пяти тематических разделов, которые, в свою очередь, делятся на подразделы. Содержание разделов является актуальным с точки зрения современного состояния научного направления. Контекст учебного пособия соответствует контексту профилю и направлению обучения, что без сомнения может способствовать повышению заинтересованности студентов и повышению мотивации к профессиональному изучению инструментальных методов исследований и контроля лекарственных средств и биологически активных веществ.

В пособии изложены особенности основных физико-химических методов исследований и контроля лекарственных средств, рассмотрены теоретические положения спектроскопических, хроматографических и электрохимических методов анализа, а также дальнейшие перспективы развития их в анализе реальных объектов на содержание биологически активных веществ и лекарственных средств. В пособии представлено большое количество материала, заимствованного из оригинальных источников научно-популярного жанра. В области развития инструментальных методов наблюдается такой прогресс, что учебная литература практически не успевает за изменениями в сфере применения и использования методов исследования и контроля. Материал, представленный в учебном пособии по обсуждаемой проблеме, является актуальным и своевременным для освоения данной дисциплины студентами в полном объеме.

Источники информации по применению физико-химических методов исследования и контроля лекарственных средств и биологически активных веществ датируются не позднее 2008 года.

Пособие состоит из пяти разделов, описывающих свойства исследуемых веществ и материалов, экстракционные, хроматографические, оптические и электрохимические методы. В последней главе представлены

результаты развития физико-химических методов контроля лекарственных средств и биологически активных веществ с привлечением современных идей и новейших методик работы. Показано, что в последнее время наибольшее практическое значение для контроля биологически активных веществ приобретают экстракционные, хроматографические, оптические и электрохимические методы. Интенсивно развивается атомно – абсорбционная спектроскопия, рентгено-флуоресцентные методы анализа и некоторые другие. Современные инструментальные методы более экспрессны, точны, автоматизированы, позволяют проводить анализ без разрушения и на расстоянии.

В конце каждой главы пособия содержатся вопросы для контроля и самоконтроля, а в конце пособия – список рекомендованной литературы.

Пособие соответствует требованиям ФГОС ВПО и ООП ТПУ для студентов по направлению «Химическая технология» по профилям «Инжиниринг в биотехнологических и фармацевтических производствах» и «Химическая технология синтетических биологически активных веществ, химико-фармацевтических препаратов и косметических средств», изучающих аналитическую химию. Может быть полезно также аспирантам, преподавателям химических, фармацевтических и других направлений.

Глава 1

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

Лекарственные средства – вещества, применяемые для лечения, диагностики и профилактики заболеваний. В РФ лекарственные средства считаются фармакологические средства (препараты), разрешенные Министерством здравоохранения РФ к применению в медицинской практике. Перечень разрешенных к применению и производству лекарственных средств изложен в Государственном реестре лекарственных средств. В древности в качестве лекарственных средств применяли главным образом растения в разных видах, высушенных насекомых, пресмыкающихся, органы животных. Описание этих средств дано в так называемом папирусе Эберса (XVI в. до н. э.). Первые попытки систематизации лекарственных средств растительного и животного происхождения, а также методы их частичной очистки были предприняты К. Галеном (II в. н. э.). Впоследствии Парацельс ввел термин «галеновы препараты», к которым относят настойки, экстракты, линименты, горчичники и т. д. В арсенале современных лекарственных средств эти препараты занимают значительное место. С к. XVIII в. благодаря бурному развитию естествознания начался новый научный этап развития лекарственных средств. Большое значение для создания лекарственных средств имели методы экспериментальной терапии, позволяющие изучать действие препаратов на животных, и методы экспериментальной химиотерапии, изучающие воздействие лекарственных средств на инфекционные процессы. Практически развитие экспериментальной химиотерапии началось после того, как П. Эрлих показал плодотворность биологических испытаний различных химических соединений. Это позволило внедрить в медицинскую практику ряд сульфамидных, противомаларийных и других препаратов, а также антибиотики. Созданием и исследованием лекарственных средств занимается ряд медицинских и фармацевтических дисциплин: фармакология (экспериментальная и клиническая), изучающая особенности и механизмы действия новых и традиционных лекарственных средств на здоровый и больной организм с применением медицинских, физиологических, биохимических и других методов исследования; фармацевтическая химия, изучающая способы получения лекарственных средств, их строение и физико-химические свойства; фармацевтическая технология – наука о методах и способах про-

мышленного приготовления лекарственных средств; лекарственная токсикология, изучающая токсичность лекарственных средств и способы ее предупреждения; фармакогнозия, исследующая сырье растительного и животного происхождения с целью получения лекарственных средств; фармакокинетика, изучающая вопросы всасывания, распределения, метаболизма и выведения лекарственных средств; аналитическая и органическая химия и др. В настоящее время известно 5 тыс. лекарственных средств, выпускаемых в виде более 50 тыс. однокомпонентных и комбинированных лекарственных форм (см. ниже) под непатентованными (международными) и патентными (торговыми) названиями.

Все современные лекарственные средства группируются по следующим принципам:

- Терапевтическому применению. Например, препараты для лечения опухолей, снижения артериального давления, противомикробные.
- Фармакологическому действию, т. е. вызываемому эффекту (вазодилататоры – расширяющие сосуды, спазмолитики – устраняющие спазм сосудов, анальгетики – снижающие болевое раздражение).
- Химическому строению. Группы лекарственных препаратов, сходных по своему строению. Таковы все салицилаты, полученные на основе ацетилсалициловой кислоты – аспирин, салициламид, метилсалицилат и т. д.
- Нозологическому принципу. Ряд различных лекарств, применяемых для лечения строго определенной болезни (например, средства для лечения инфаркта миокарда, бронхиальной астмы и т. д.).

Принята классификация медикаментов, предложенная академиком М.Д. Машковским:

1. Лекарственные препараты, действующие преимущественно на центральную нервную систему: средства для наркоза, снотворные, психотропные препараты (транквилизаторы, нейролептические, седативные средства, антидепрессанты, стимуляторы); противосудорожные (противоэпилептические медикаменты); лекарства для лечения паркинсонизма, анальгетики, жаропонижающие, противовоспалительные препараты, противокашлевые.

2. Лекарственные средства с действием в области окончания эфферентных (центробежных) нервов: холинолитики, ганглиоблокирующие, курареподобные и др.

3. Лекарственные средства, действующие преимущественно на чувствительные нервные окончания, в том числе слизистой оболочки и кожи: местноанестезирующие препараты, обволакивающие и адсорбирующие средства, вяжущие, рвотные, отхаркивающие и слабительные.

4. Лекарства, действующие на сердечнососудистую систему.

5. Лекарства, усиливающие выделительную функцию почек.
6. Желчегонные медикаменты.
7. Препараты, влияющие на мускулатуру матки.
8. Средства, влияющие на процессы обмена веществ: гормоны, витамины и их аналоги, ферменты, гистамин и антигистаминные препараты, биогенные и пр.
9. Противомикробные: антибиотики, сульфаниламиды, производные нитрофурана, противотуберкулезные, противосифилитические, противовирусные препараты и т. д., антисептики (группа галогенов, окислители, кислоты и щелочи, спирты, фенолы, красители, дегти, смолы и т. д.).
10. Препараты для лечения злокачественных новообразований.
11. Диагностические средства.
12. Прочие препараты различных фармакологических групп.

Биологически активные вещества (БАВ) – (от греч. *bios* – жизнь, что означает связь с жизненными процессами и соответствует слову «биологический» + от лат. *activus* – активный, то есть вещество, которое имеет биологическую активность) – это соединение, которое вследствие своих физико-химических свойств имеет определенную специфическую активность и выполняет или влияет, меняет каталитическую (ферменты, витамины, коферменты), энергетическую (углеводы, липиды), пластичную (углеводы, липиды, белки), регуляторную (гормоны, пептиды) или иную функцию в организме.

Биологически активные вещества – химические вещества, необходимые для поддержания жизнедеятельности живых организмов, обладающие высокой физиологической активностью при небольших концентрациях по отношению к определенным группам живых организмов или их клеткам, злокачественным опухолям, избирательно задерживая (или ускоряя) их рост или полностью подавляя их развитие.

За единицу биологической активности химического вещества принимают минимальное количество этого вещества, способное подавлять развитие или задерживать рост определенного числа клеток, тканей стандартного штамма (биотеста) в единице питательной среды.

В настоящее время известен широкий спектр биологически активных веществ различного назначения, которые могут быть либо получены из природных живых организмов, либо синтезированы с помощью различных химических превращений.

Природные БАВ образуются в процессе жизнедеятельности живых организмов. Они могут образовываться в процессе обмена веществ, выделяясь в окружающую среду (экзогенные) или накапливаться внутри организма (эндогенные). Эффективность синтеза БАВ зависит от физиологических особенностей живых организмов, экологических факторов.

Общая классификация биологически активных веществ

В целях классификации все БАВ разделяют:

- на эндогенные;
- экзогенные.

Эндогенные БАВ

К эндогенным БАВ можно отнести: белки, жиры, углеводы, аминокислоты, витамины, ферменты, гормоны, красители.

Белки – природные полимеры, молекулы которых построены из остатков аминокислот. По своему строению белки делятся на простые и сложные.

Протеины (от греч. *protas* – первый, важный) представляют собой простые белки. К ним относятся альбумины, глобулины, глютемины.

Протеиды относятся к сложным белкам, которые кроме белковых макромолекул содержат в своем составе небелковые молекулы. К ним относятся нуклепротеиды (кроме белка содержат нуклеиновые кислоты), липопротеиды (кроме белка содержат липиды), фосфолипиды (кроме белка содержат фосфорную кислоту).

Липиды – это сложная смесь органических соединений с близкими физико-химическими свойствами, которые участвуют в построении клеточных мембран. Являются обязательным компонентом клетки. Их общий признак – наличие в молекуле длинноцепочечных углеводородных радикалов и сложноэфирных группировок.

Углеводы образуются в растениях в пластидах в процессе фотосинтеза под действием квантов солнечной энергии из углекислого газа, воды, минеральных солей благодаря ассимиляции хлорофилла. По химическому строению углеводы делятся на моносахариды и полисахариды.

Витамины – низкомолекулярные органические вещества, обладающие высокой биологической активностью и выполняющие роль биорегуляторов. Биологическая активность витаминов определяется тем, что они в качестве активных групп входят в состав каталитических центров ферментов или являются переносчиками функциональных групп. Жирорастворимые витамины хорошо растворяются в органических растворителях. К ним относятся витамины групп А, D, E, F. Для таких витаминов характерно наличие в молекуле гидрофобных заместителей. Водорастворимые витамины хорошо растворимы в воде. К ним относятся витамины групп С, В и др.

Ферменты (от лат. *fermentum* – закваска), или энзимы (от лат. *enzime* – дрожжи) – биокатализаторы белковой природы, ускоряющие обмен веществ в клетках и имеющие молекулярную массу от 15 000 до 1 000 000.

Фитогормоны – вещества, которые синтезируются в растениях в процессе обмена веществ, транспортируются по ним и способны вызывать ростовые или формативные эффекты (деформации), так называемые регуляторы роста и развития растений, или фиторегуляторы.

Лекарственные препараты являются биологически активными веществами эндо- или экзогенной природы, законодательно разрешенные для профилактики и лечения заболеваний человека. Эти вещества при определенных концентрациях должны оказывать четко выраженные бактерицидное, антисептическое, наркотическое, дезинфицирующее и другие действия.

Терапевтический эффект лекарственных препаратов определяется дозой. При определенных дозах лекарственные препараты могут привести к отравлению или смерти. Терапевтическое действие оказывают и БАВ, образующиеся в организме растений, животных и человека (алкалоиды, гормоны, витамины, антибиотики).

Экзогенные БАВ

К экзогенным можно отнести:

- колины – органические соединения, выделяемые высшими растениями через корневую систему, вызывающие угнетение низших растений;
- фитонциды – летучие органические соединения, выделяемые высшими растениями в атмосферный воздух, вызывающие гибель патогенных микроорганизмов;
- антибиотики – органические вещества – продукты жизнедеятельности микроорганизмов в процессе обмена веществ, выделяющиеся в окружающую среду или накапливающиеся внутри клетки, подавляющие или угнетающие другие виды микроорганизмов;
- маразмины – органические вещества, выделяемые микроорганизмами, вызывающие угнетение низших растений.

Воздействие одних живых организмов на другие за счет продуцирования БАВ называется аллелопатией (рис. 1.1).

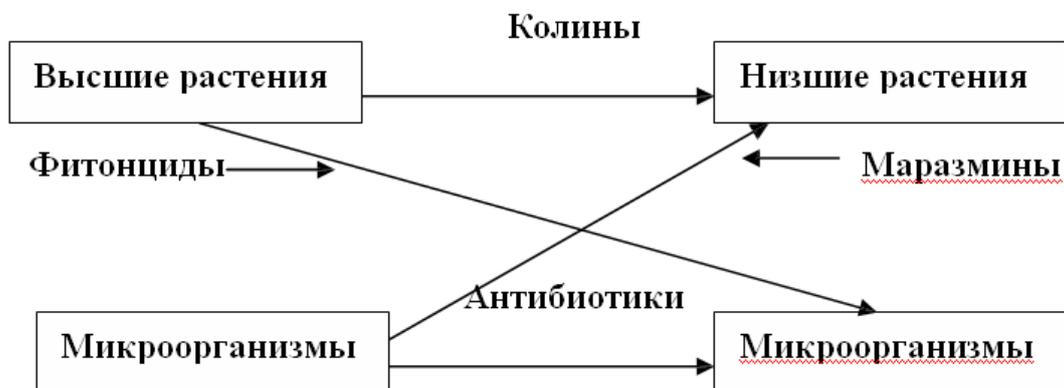


Рис. 1.1. Схема аллелопатических взаимоотношений живых организмов

Микотоксины – биологически активные вещества, вырабатываемые грибами (рода *Fusarium*, *Aspergillus* и др.) в процессе обмена веществ, которые выделяются в организм высших растений (злаковых) при их совместном развитии, и вызывающие заболевание последних. Опасность микотоксинов связана с их устойчивостью при хранении, термической обработке, способностью быстро распространяться в органах и тканях организма, вызывая ингибирование синтеза белка, поражение сердечно-сосудистой системы, клеток костного мозга, лимфатических узлов. Многие микотоксины обладают канцерогенными свойствами.

Душистые вещества – органические вещества, обладающие характерным приятным запахом.

Природные душистые вещества представляют сложные смеси различных веществ, чаще всего представлены эфирными маслами (розовое, гераниевое, лавандовое), экстрагированные из цветков растений. Душистые вещества используют для получения косметических и парфюмерных композиций. Как правило, эти экстракты содержат сложные смеси различных веществ. Для получения стойких парфюмерных композиций необходимы стабилизаторы запаха. К природным стабилизаторам запаха относятся мускусные препараты.

Наряду с общей БАВы классифицируют:

1. По действию на организм.

С учетом взаимодействия с организмом БАВ разделяют как

- биоинертные, которые не усваиваются организмом (целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнин, кремнийорганические полимеры, поликарбонат и др.);
- биосовместимые, которые медленно растворяются или ферментируются в организме (спирт, полиэтиленоксид, водорастворимые эфиры целлюлозы и др.);
- бионесовместимые, которые вызывают поражение ткани организма (полиантрацены, некоторые полиамиды и многие др.);
- биоактивные направленного действия (винилин, полимеры в сочетании с лекарственными веществами).

Биоинертные и биосовместимые вещества широко используются в производстве лекарств как вспомогательные вещества, а также для получения тары, упаковочных и конструкционных материалов и др.

2. По токсичности.

В зависимости от степени токсичности БАВ разделяют на: обычные вещества, сильнодействующие и ядовитые.

Проявление токсичности зависит от концентрации (дозы) БАВ, путей поступления в организм, чувствительности последнего, поведения БАВ в организме и других факторов (например, ядовитые вещества используются как лекарство в определенных дозах).

3. По происхождению.

БАВ бывают природные и синтетические.

Природные БАВ образуются в процессе жизнедеятельности живых организмов. Они могут образовываться в процессе обмена веществ, выделяться в окружающую среду (экзогенные) или накапливаться внутри организма (эндогенные).

Вопросы для самоконтроля

1. Что понимают под лекарственными средствами?
2. Какие принципы положены в основу классификации лекарственных средств?
3. Какие медицинские и фармацевтические дисциплины занимаются созданием и исследованием лекарственных средств?
4. Что понимают под биологически активными веществами?
5. Что принимают за критерий биологической активности веществ?
6. Все ли продукты жизнедеятельности, образующиеся в результате обмена веществ живых организмов, являются биологически активными?
7. Какие принципы положены в основу классификации БАВ?

Глава 2 СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

2.1. Основы спектроскопии

Спектроскопическими методами анализа называются методы, основанные на *взаимодействии вещества* (анализируемого образца) с электромагнитным излучением.

Электромагнитное излучение – вид энергии, которая распространяется в вакууме со скоростью около 300 000 км/с и может выступать в форме света, теплового и ультрафиолетового излучения, микро- и радиоволн, гамма- и рентгеновских лучей.

В табл. 2.1 показана связь спектроскопических методов анализа с электромагнитным спектром.

Таблица 2.1

*Взаимосвязь электромагнитного спектра
со спектроскопическими методами*

Спектроскопические методы	Спектральная область	Изменяют свою энергию
Ядерно-физические	0,005–1,4 Å	Ядра
Рентгеновские	0,1–100 Å	Внутренние электроны
Оптический диапазон		
Вакуумная УФ-спектроскопия	10–180 нм	Валентные электроны
УФ-спектроскопия	180–400 нм	Валентные электроны
Спектроскопия в видимой области	400–780 нм	Валентные электроны
Ближняя инфракрасная спектроскопия	780–2500 нм	Молекулы (колебательная энергия)
Инфракрасная спектроскопия	4000–400 см ⁻¹	Молекулы (колебательная, вращательная энергия)
Радиочастотный диапазон		
Микроволновая спектроскопия	0,75–3,75 мм	Молекулы (вращательная энергия)
Электронный парамагнитный резонанс	~ 3 см	Неспаренные электроны (в магнитном поле)
Ядерный магнитный резонанс	0,6–10 м	Ядерные спины (в магнитном поле)

Свойства электромагнитного излучения удобнее описывать исходя из его волновой и корпускулярной природы.

Длина волны λ и частота ν – волновые характеристики электромагнитного излучения. Соотношение $c = \nu\lambda$ описывает связь скорости распространения электромагнитных волн, частоты излучения и длины волны. Отметим, что c и λ зависит от природы источника излучения и свойств среды.

Именно периодической *поляризацией* объясняется снижение c при прохождении потока света, через какую-либо среду. При этом результирующего поглощения энергии не наблюдается, т. к. количества энергии излучения и поглощения одинаковы.

Абсолютный показатель преломления – это мера степени взаимодействия излучения с материальной средой:

$$n = \frac{c}{\nu}, \quad (2.1)$$

где c – скорость света в вакууме; ν – скорость излучения в среде.

Разложение света или *дисперсия* – зависимость показателя преломления от частоты (ν) или длины волны (λ).

При нормальной дисперсии зависимость n от λ имеет линейный характер. Если в узком диапазоне длин волн показатель преломления резко изменяется, то такая дисперсия называется *аномальной*.

Материалы, обладающие нормальной дисперсией, используют для создания линз оптических приборов, а с аномальной – для призм.

Относительный показатель преломления чаще применяют на практике – это отношение скоростей распространения излучения в воздухе и в среде:

$$n = \frac{\nu_{\text{возд}}}{\nu}. \quad (2.2)$$

Направление распространения света характеризуют *законом преломления Снеллиуса*: отношение показателей преломления более плотной среды n_2 к менее плотной:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1} = n, \quad (2.3)$$

для воздуха $n_1 = 1$.

При переходе света из оптически менее плотной среды (I_0) в более плотную (рис. 2.1), происходит частичное отражение света ($I_{\text{отр}}$), доля которого зависит от угла его падения:

$$\frac{I_{\text{отр}}}{I_0} = \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2}. \quad (2.4)$$

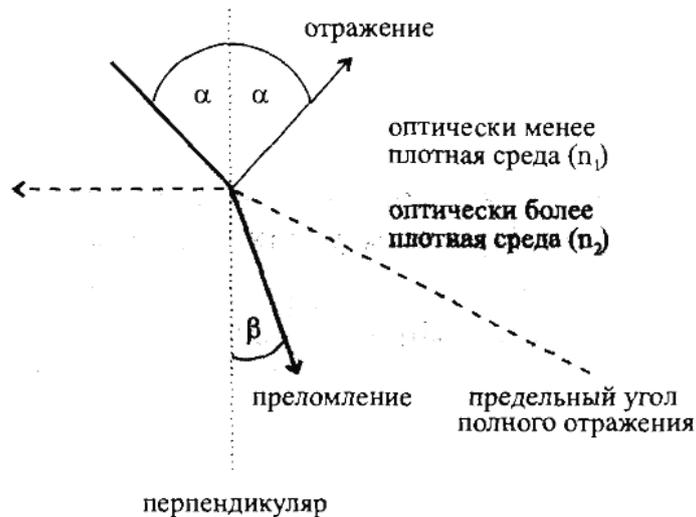


Рис. 2.1. Схема преломления света

Если угол падения $\sin\beta > 1/n_2$, то происходит полное отражение. Значение *предельного угла полного отражения* не зависит от λ .

При прохождении луча света через какое-либо вещество происходит частичное поглощение, что, соответственно, приводит к изменению скорости. Энергия, которая при этом высвобождается, распространяется во всех направлениях.

Если частицы, составляющие среду, меньше λ , то часть света рассеивается, такое рассеяние света называют *релеевским*. Если среда состоит из крупных частиц, то рассеяние носит название *тиндалевское*. *Комбинационное или рамановское* рассеяние происходит за счет изменения колебательной энергии рассеивающих частиц. Метод, в основе которого лежит данное явление, называют спектроскопией Рамана, или рамановской спектроскопией.

Соотношение *Эйнштейна* описывает электромагнитное излучение с точки зрения корпускулярной теории:

$$E = h\nu \text{ или } E = \frac{hc}{\lambda}, \quad (2.5)$$

где $h = 6,6262 \cdot 10^{-34}$ Дж·с – постоянная Планка или квант действия.

За счет поглощения излучения частица (атом, ион, молекула) взаимодействует с фотоном, увеличивает свою энергию на величину, равную энергии фотона и переходит в возбужденное состояние. Обратный процесс сопровождается *испусканием излучения*.

Для возбуждения частиц используют нагрев в пламени или плазме, бомбардировку электронами или ионами, поглощение излучения от внешнего источника и т. д.

На сегодняшний день *оптическая спектроскопия* объединяет методы, которые основаны на видимом диапазоне, ультрафиолетовой (УФ) и инфракрасной (ИК) областях излучения.

Схема оптических приборов, за редким исключением, состоит из: источника излучения, отделения для пробы, монохроматора для разложения светового потока или диспергирующего устройства, детектора.

В табл. 2.2 представлены примеры источников излучения, которые используются в оптической спектроскопии.

Таблица 2.2

Примеры источников излучения для оптической спектроскопии

Область спектра	Источник излучения
<i>Непрерывный спектр</i>	
Вакуумная УФ	Аргоновые, ксеноновые лампы
УФ	Ксеноновые, водородные, дейтериевые лампы
Видимая	Вольфрамовые, галогенные лампы
Ближняя ИК	Вольфрамовые лампы, штифты Нернста, нихромовые излучатели, глобары
ИК	Штифты Нернста ($ZrO_2 + Y_2O_3$), нихромовые излучатели ($Ni + Cr$), глобары (SiC)
<i>Полосатый спектр</i>	
УФ-видимая	Светодиоды
<i>Линейчатый спектр</i>	
УФ-видимая	Лампы с полым катодом, безэлектродные разрядные лампы

Начиная с 1960 г., в качестве источника излучения стали использовать лазер (табл. 2.3).

В спектроскопическом анализе стараются работать с *монохроматическим* излучением, т. к. чаще всего это необходимое условие получения в широком интервале линейных зависимостей концентрация-сигнал. В абсорбционной и эмиссионной спектроскопии монохроматическое излучение улучшает селективность, а в абсорбционной – чувствительность.

Получают узкие полосы световых потоков с помощью *светофильтров* или *монохроматоров*.

По степени пропускания и спектральной ширины **светофильтры** подразделяют на *абсорбционные* и *интерференционные*. На рис. 2.2 показано сравнение их возможностей в видимой области спектра.

Наиболее эффективная спектральная ширина пропускания абсорбционного светофильтра составляет примерно 50 нм, интерференционного – 10 нм.

Таблица 2.3

Наиболее распространенные типы лазеров

Тип лазера, активная среда	λ , нм	Относительная интенсивность, %
Газовые		
He/Ne	632,82 (красная)	
Ar	514,53 (зеленая)	100
	501,72	17
	496,51	38
	487,99 (синяя)	88
Kr	476,49	38
	676,44	24
	647,09 (красная)	100
	568,19 (желтая)	30
	530,87	40
Твердотельные		
Рубин	694,33 (красная)	
Неодим-иттрий-алюминеневый гранат	1064,8 (ближняя ИК)	
На красителях		
Натрий-флуоресцеин	530–590	
Родамин 6Ж	570–650	

По сравнению с интерференционными, абсорбционные светофильтры обладают и меньшей степенью пропускания.

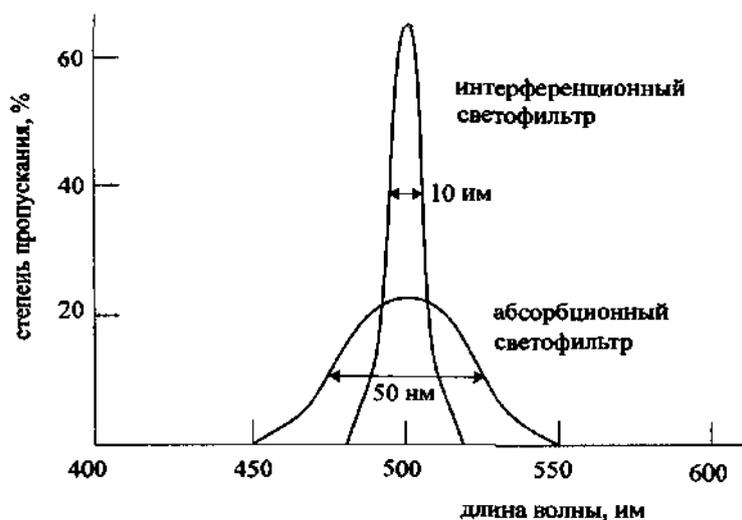


Рис. 2.2. Зависимость степени пропускания от длины волны различных светофильтров

Монохроматоры состоят из следующих частей: входная щель, система линз или вогнутых зеркал для получения параллельного светового потока, диспергирующий элемент (дифракционная решетка или призма), фокусирующее устройство, выходная щель.

Ранее основным типом диспергирующих элементов были призмы. Сейчас же спектрометры оснащены отражательными дифракционными решетками.

По сравнению с призмами *дифракционные решетки* обладают лучшим спектральным разрешением, но меньшей светосилой. Что касается дисперсии призм, то в области коротких волн она выше, чем в области длинных.

Для разделения отдельных спектральных полос используют понятия:

- линейной дисперсии:

$$D = \frac{dy}{d\lambda}; \quad (2.6)$$

- обратной линейной дисперсии, нм/мм ($\text{\AA}/\text{мм}$):

$$\frac{1}{D} = \frac{d\lambda}{dy}. \quad (2.7)$$

Возможность раздельного определения двух близких по длинам волн спектральных линий характеризует *разрешающая способность*:

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda}, \quad (2.8)$$

где λ – средняя длина волны двух линий; $\Delta\lambda$ – разность длин волн.

Для *призмы*:

$$R = b \frac{dn}{d\lambda}, \quad (2.9)$$

где b – ширина ее основания, n – показатель преломления.

Для *дифракционных решеток*:

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN, \quad (2.10)$$

где N – число штрихов решетки; m – порядок отражения.

На практике же на выходе из монохроматора наблюдают область длин волн – *эффективную спектральную ширину*:

$$D^{-1} = \frac{\Delta\lambda}{\Delta y}, \quad (2.11)$$

или
$$\Delta\lambda_{\text{эфф}} = \omega D^{-1}, \quad (2.12)$$

Выражение (2.12) справедливо при условии, если расстояние между линиями в фокальной плоскости Δ_y равно ширине щели ω .

Чем меньше D^{-1} монохроматора, тем лучше можно разделить спектральные линии.

Призмы, линзы, оптические окошки и кюветы изготавливают из кварца, стекла и солей (NaCl, KBr), выбор материала зависит от области исследования.

Действие приемников излучения (детектирующих устройств) основано на термо- или фотоэлектрических явлениях.

Действие фотоэлементов или фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) основано на явлении *внешнего фотоэффекта*, т. е. возникновении электрического поля за счет электронов, которые получают путем бомбардировки катода фотонами.

Катод изготавливают из сплавов щелочных металлов или многокомпонентных материалов: K/Cs, Na/K/Cs/Sb, Ag/O/Cs. Особенно популярны фотокатоды из Ga/As.

Для одновременного измерения интенсивностей используют многоканальные детекторы (массивы фотодиодов, диодные линейки).

Одновременная регистрация всего спектра возможна и с использованием многоканальных детекторов: массивы фотодиодов, диодные линейки, элементы-видиконы и приборов с переносом заряда (ППЗ).

В ИК-области интенсивность излучения и потоки энергии ниже, поэтому регистрировать ИК-излучение сложнее, чем видимое или УФ-излучение. Фотоэффект ИК-области не наблюдается, поэтому и использовать фотоэлектрические детекторы нельзя. В данной области применяют термодетекторы, но их характеристики хуже, чем у ФЭУ.

2.2. Методы атомной спектроскопии

Методы атомной спектроскопии основаны на поглощении (испускании) света свободными атомами и их люминесценции. В видимой и УФ-областях спектра возбуждаются валентные, а в рентгеновской – внутренние электроны атомов.

В основу *спектрального анализа* легли выводы исследований поведения паров солей в пламени (1859–1861 гг. Кирхгоф и Бунзен):

- линии в спектре обусловлены наличием *свободных атомов*, а не их соединениями;
- атом, поглощающий свет определенной длины волны, испускает свет той же длины;
- для элемента характерна своя линия в спектре.

В 1960-е годы были разработаны методы атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) и атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с индуктивной или емкостной связанной плазмой.

Возникновение непрерывных, полосатых и линейчатых спектров обусловлено воздействием на вещество высокой температуры.

Непрерывный спектр испускается раскаленными твердыми телами, а также отдельными молекулами в плазме. Такие спектры зависят только от условий термического возбуждения и не являются характеристическими.

Полосатые спектры отражают процессы, связанные колебательной и вращательной и электронной энергиями молекул CN, N₂⁺, CN, C₂, SrOH.

Линейчатые спектры возникают в результате процессов возбуждения электронов свободных атомов и одноатомных ионов. Расположение спектральных линий используют для *качественного анализа*.

Линии в спектре имеют различную интенсивность.

При тепловом равновесии количества частиц в возбужденном N^* и основном N_0 состояниях относятся как

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^*}{g_0} e^{-\frac{\Delta E}{kT}}, \quad (2.13)$$

где g^* , g_0 – вес частиц в возбужденном и основном состояниях; Δ – разность энергий возбужденного и основного состояний; k – константа Больцмана ($1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж·К⁻¹).

Для низкотемпературной плазмы (пламя) справедливы утверждения:

- большинство атомов находятся в *основном электронном состоянии*. (N_0 равно общему числу атомов.) Вероятность поглощения света атомами выше испускания;
- повышение температуры на 1000 К изменяет число возбужденных частиц, число невозбужденных почти не изменяется. На практике в ААС зависимость сигнала от температуры, конечно же, наблюдается, но данное изменение основано на степени атомизации вещества;
- эмиссионные спектры богаче линиями, чем абсорбционные, т. к. на практике наблюдаются линии поглощения.

2.2.1. Атомно-абсорбционная спектроскопия

Метод ААС предложен Аланом Уолшем в 1955 г. Пробу помещают в пламя (*атомизатор*), где она распадается до свободных атомов. Атомы возбуждаются потоком света УФ-видимой области от *лампы с полым катодом*. Детектируют монохроматором и ФЭУ, соединенными с устройством отображения информации.

Для измерения степени поглощения света, проводят сравнение интенсивности света, падающего на образец и прошедшего через него.

Спектры молекул имеют широкие полосы поглощения. Поэтому с помощью монохроматора из непрерывного спектра выделяют спектральную полосу, лежащую в требуемом диапазоне.

В ААС используют источники света, дающие линейчатый спектр. Это связано с тем, что источники непрерывного спектра дают узкие атомные линии поглощения (ширина 10^{-3} – 10^{-2} нм). При использовании монохроматического источника большая часть светового потока пройдет через образец без поглощения.

Ширина атомных спектральных линий зависит от *естественного уширения* спектральной линии (порядка 10^{-5} нм), дополнительного уширения, которое вызвано эффектом Доплера; от давления в атомизаторе, интенсивностей электрического и магнитного полей.

Эффект Доплера заключается в *изменении частоты излучения* при движении излучателя и приемника относительно друг друга. Уширение спектральной линии (доплеровское уширение) возникает из-за поглощения излучения атомами, движущимися в направлении распространения излучения при низких частотах, и при высоких частотах – при движении атомов навстречу излучению. Зависимость доплеровского уширения от температуры (T), длины волны излучения (λ) и массы атома (M) описывается уравнением:

$$\Delta\lambda = \frac{2\lambda}{c} \left(\frac{2kT}{M} \ln 2 \right)^{1/2}, \quad (2.14)$$

где k – постоянная Больцмана; c – скорость света.

Расщепление энергетических уровней атомов при повышении давления в атомизаторе приводит к **лоренцевскому** уширению линий. Величина лоренцевского уширения выше естественного на два-три порядка, линии спектра испускания лампы более узкие, чем линии спектра поглощения атомов в атомизаторе.

Таким образом, в ААС используют источники излучения с шириной линий менее 10^{-3} – 10^{-2} нм, например лампы с полым катодом (ЛПК) или безэлектродные разрядные лампы.

Пламя и *электротермический* способ атомизации с использованием графитовых печей – основные способы перевода в атомарное состояние растворенной пробы.

При пламенном способе атомизации пробу распыляют в пламя в виде мелких капель. Пламя поддерживают смесью из *горючего газа* и *газа-окислителя*. В табл. 2.4 представлены наиболее распространенные сочетания газов.

Таблица 2.4

Примеры состава смесей газа для пламенной ААС

Газовая смесь (горючий газ – окислитель)	Температура, К	Определяемые элементы
ацетилен–воздух	до 2500	большинство
ацетилен – закись азота	до 3100	B, Al, Si, Be, элементы (III-V)Б
водород–воздух	до 2300	As, Se
метан–воздух	до 2000	щелочные металлы

В атомизаторе происходит *испарение* пробы, *диссоциация* на свободные атомы, их *возбуждение* и *ионизация*.

Электротермический способ атомизации состоит в использовании графитовых кювет (рис. 2.3). Размер графитовой трубки: длина 30–50 мм, внутренний диаметр – около 10 мм. Около 10 мкл пробы вводят в кювету и нагревают. Сначала раствор *высушивают* в защитной атмосфере инертного газа при 105–110 °С, затем *озоляют* при 500–700 °С. При *озолении* протекают реакции разложения, дегидратации кристаллогидратов, гидроксидов, нитратов, удаление летучих компонентов и, к сожалению, могут образоваться термически устойчивые карбиды или труднолетучие оксиды (бора или фосфора).

Под действием графита происходит восстановление сульфатов до сульфидов, некоторых ионов металлов – до металлов.

Процессы диссоциации, восстановления и ионизации идут при более высокой температуре (2000–3000 К).

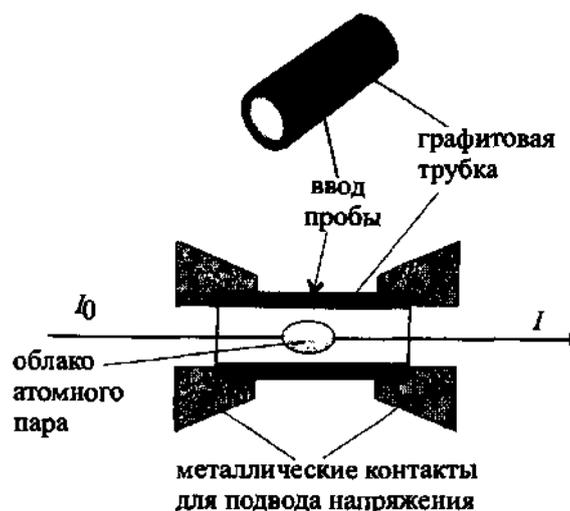


Рис. 2.3. Схема графитовой кюветы для электротермической атомизации. (I_0 , I – интенсивности падающего и прошедшего света соответственно)

При определении As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn их переводят в летучие гидриды восстановлением NaBH_4 .

Поскольку пребывание пробы в электротермическом атомизаторе намного дольше (проба в полном объеме вводится в атомизатор), чем в пламенном (при распылении в пламя попадает не более 10 % пробы), то пределы обнаружения при электротермической атомизации ниже на несколько порядков. Мешающие влияния примесей при электротермической атомизации существенно ниже, чем при пламенной. Применение графитовых *печей с платформами* позволяет избежать образования в ходе анализа труднолетучих карбидов металлов. При использовании электротермической атомизации можно анализировать твердые образцы.

Однако электротермический способ атомизации более дорогостоящий, чем пламенный, т. к. требует наличия специальных устройств быстрого нагрева печи, применения защитного инертного газа, графитовых кювет из сверхчистого графита.

Монохроматоры и детекторы. Как уже отмечалось, в ААС использование светофильтров невозможно, т. к. они дают широкие спектральные полосы пропускания. Для удаления лишних линий и молекулярных полос постороннего излучения обычно используют дифракционные решетки (500–3000 штрихов на миллиметр).

Интенсивность светового потока, прошедшего через атомизатор, зависит от концентрации поглощающих частиц и выражается законом Ламберта–Бера:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda lc}, \text{ или } A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda lc, \quad (2.15)$$

где A – оптическая плотность; I_0 – интенсивность падающего излучения; I – интенсивность прошедшего излучения; l – длина оптического пути; ε_λ – коэффициент поглощения при длине волны λ .

Факторы, влияющие на величину абсорбционного сигнала. Такие явления, как излучение и флуоресценция атомов или неспецифическое излучение самого атомизатора, снижают светопоглощение, чувствительность определения и повышают предел обнаружения.

Помехи, вызванные испусканием света, устраняют частотной и фазовой фильтрацией. Для этого приемник настраивают на определенную частоту, убирающую помехи.

Рассеяние света и фоновое поглощение излучения молекулами увеличивают величину поглощения. Такое явление происходит на не испарившихся или твердых частицах пробы. Интенсивность рассеянного излучения можно выразить уравнением (закон Релея):

$$\frac{I_s}{I_0} = 24\pi r^3 \frac{N\nu^2}{X^4}, \quad (2.16)$$

где I_s – интенсивность рассеянного излучения; N – число частиц; r – радиус частицы; ν – объем частицы.

При работе в коротковолновой области необходима тщательная пробоподготовка, так как при переходе от 800 к 200 нм интенсивность рассеянного света при прочих равных условиях значительно возрастает.

Широкие молекулярные спектры поглощения устраняют с помощью источника непрерывного спектра излучения, методом «двух линий» или эффектом Зеемана.

Несмотря на то, что ААС можно определять более 60 элементов, неметаллы, как правило, непосредственно не определяют. ААС – *одноэлементный* метод анализа и для каждого элемента необходимо использовать свою лампу с полым катодом. Определенные трудности возникают и при определении сверхмалых количеств элементов в матрицах сложного состава.

2.2.2. Атомно-эмиссионная спектроскопия

Отличие в устройстве **атомно-эмиссионного** спектрометра от атомно-абсорбционного состоит в том, что отсутствует внешний источник излучения: сама проба служит источником излучения. В атомизаторе одновременно происходит и атомизация, и возбуждение атомов.

При температурах до 3000 К возбуждаются только атомы щелочных и щелочноземельных металлов. Более высокие температуры достигаются с помощью атомизаторов на основе дугового, искрового разряда, с индуктивной или емкостной связью (плазменные).

Дуговой и искровой разряды возникают в промежутке между двумя электродами. На нижний электрод помещается проба, либо проба сама служит электродом. Верхний электрод представляет собой стержень из углерода или железа (рис. 2.4).

В настоящее время дуговой и искровой источник атомизации применяют только для анализа твердых образцов.

Плазменные атомизаторы – индуктивно связанная плазма (ИСП, ICP), плазма постоянного тока (DCP), микроволновая плазма с емкостной (CMP) или индуктивной (MIP) связью.

При использовании источника ИСП проба довольно долго находится в плазме, поэтому условия атомизации и возбуждения близки к оптимальным. При этом отсутствуют химические матричные эффекты, что снижает пределы обнаружения элементов.

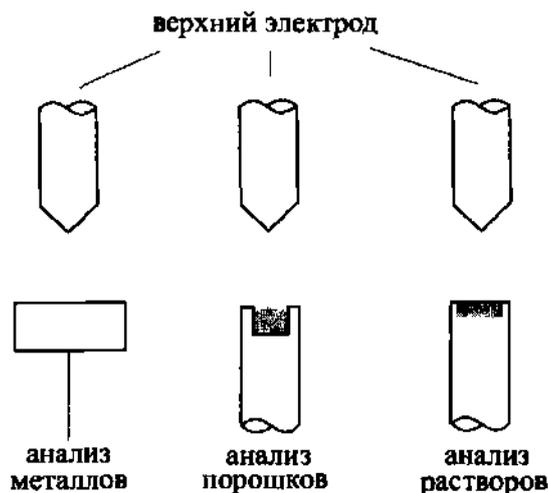


Рис. 2.4. Конструкции электродов для атомно-эмиссионного анализа с дуговым или искровым возбуждением

Возможность плавного регулирования условий атомизации и возбуждения является дополнительным достоинством применения ИСП. Также при анализе методом ИСП можно подобрать условия, которые обеспечат одновременное определение нескольких элементов. К недостаткам метода можно отнести большой расход аргона.

Для анализа растворов используют атомизатор на основе плазмы постоянного тока (ДСР). В полученном спектре преобладают линии атомов, а не ионов.

В качестве специфических детекторов отдельных элементов получили распространение источники микроволновой плазмы – с индуктивной (МIP) или емкостной (СМР) связью, которые работают при атмосферном давлении на основе ионизированного гелия.

При **атомизации в тлеющем разряде** катодом служит сама проба. В результате разряда возникающие ионы бомбардируют катод и выбивают из него атомы, которые и испускают излучение. Послойное травление поверхности катода-пробы позволяет использовать этот метод для *распределительного анализа*. Этим методом можно определять неметаллы. Необходимость вакуумирования пространства, в которое помещается проба – недостаток метода.

Рабочий диапазон спектрометров составляет 170–800 нм. При работе в области менее 200 нм необходимо вакуумирование или создание атмосферы азота. Для *детектирования* в основном используют *фотоэлектрический* способ регистрации. В некоторых спектрометрах – детекторы на основе приборов с зарядовой связью (ПЗС) или камеры-поляриды, которые позволяют одновременно регистрировать несколько спектральных линий, как фотопластинки.

Все методы АЭС требуют градуировки с использованием стандартов. Для этого достаточно измерить сигналы стандарта и фона.

При определении концентрации элемента для сравнения следует использовать линию *внутреннего стандарта*. Отношение интенсивности линий определяемого элемента I и внутреннего стандарта I_B связано зависит от концентраций (c, c_B):

$$\frac{I}{I_B} = a \left(\frac{c}{c_B b} \right)^b, \quad (2.17)$$

где a и b – константы.

2.2.3. Рентгеновская и электронная спектроскопия

Использование рентгеновского излучения лежит в основе методов рентгенофлуоресцентной спектроскопии, рентгеновской дифракции, оже- и фотоэлектронной спектроскопии.

На рис. 2.5 в виде схемы показано взаимодействие рентгеновского излучения с веществом. При облучении образца интенсивность первичного рентгеновского излучения $I_0(\lambda_0)$ уменьшается, т. к. зависит от *толщины* образца x , *плотности* материала ρ и *массового* коэффициента поглощения μ .

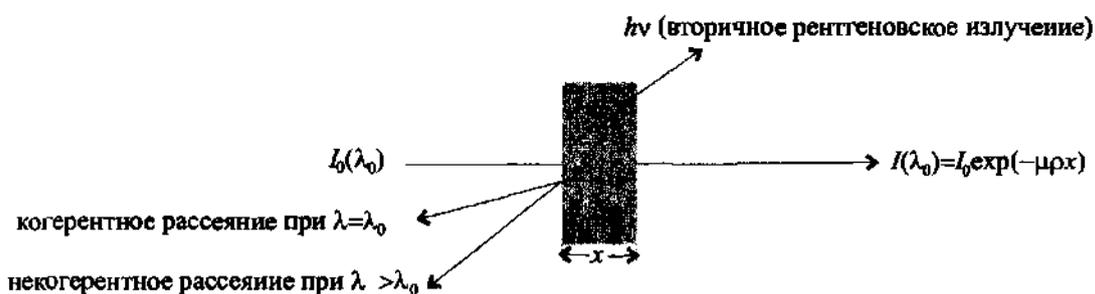


Рис. 2.5. Общая схема взаимодействия рентгеновского излучения с образцом

Часть рентгеновского излучения рассеивается. Если *рассеянное* рентгеновское излучение имеет ту же длину волны, что и первичное, то такое рассеяние называется *когерентным*, если более высокую – *некогерентным* *рассеянием*. Кроме того, возникает *вторичное* рентгеновское излучение самого образца.

Механизм возбуждения внутренних электронов схематично изображен на рис. 2.6.

При взаимодействии рентгеновского излучения с атомом происходит выбивание электрона, который обладает кинетической энергией:

$$E_{kin} = h\nu - E_b, \quad (2.18)$$

где $h\nu$ – энергии падающего кванта первичного излучения; E_b – энергия связи электрона с ядром.

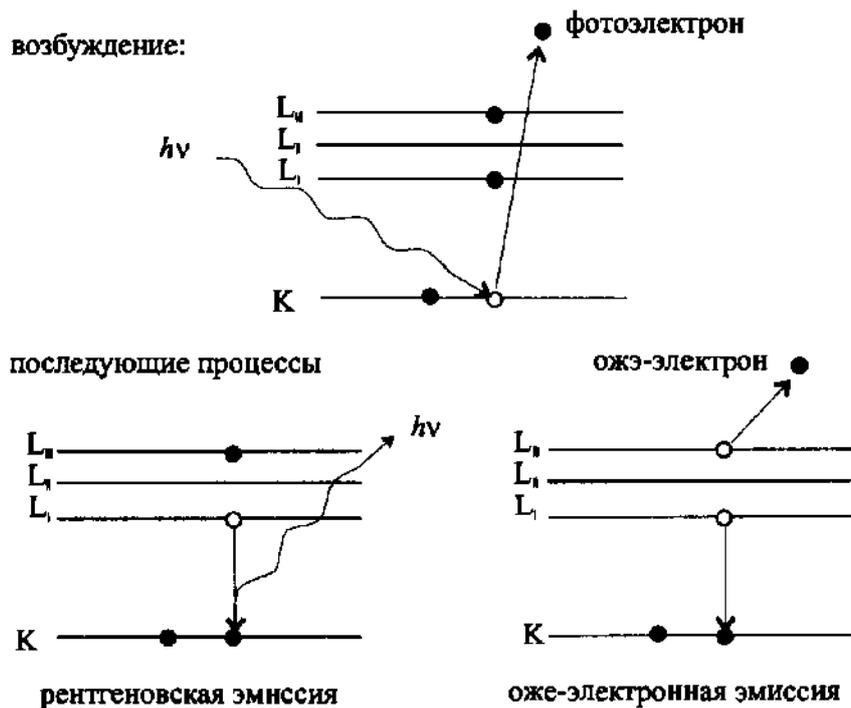


Рис. 2.6. Механизм электронного возбуждения в рентгеновской спектроскопии (черные кружки – электроны, светлые – вакансии)

Рентгеновская флуоресценция наблюдается том в случае, когда при переходе электрона на более низкий энергетический уровень высвобождается квант вторичного рентгеновского излучения.

Если в возбуждении атомов участвуют электроны более высоких энергий, то процесс называется *рентгеновской эмиссией*.

Оже-эффект – переход внутреннего электрона на нижний уровень без излучения. Энергия, которая высвобождается в результате такого перехода, может пойти на выбивание одного из электронов на более высоких энергетических уровнях. Оже-эффект протекает одновременно с рентгеновским излучением.

Рентгенофлуоресцентный анализ – (РФА) основан на измерении интенсивности вторичного рентгеновского излучения. На рис. 2.7, показаны основные узлы рентгеновского спектрометра.

Связь длины волны излучения λ (Å) и его энергии E (кэВ) выражается формулой:

$$\lambda(\text{Å}) = \frac{12,398}{E[\text{кэВ}]} \quad (2.19)$$

Все линии в РФА группируются в серии. Чем дальше электрон отстоит от ядра, тем меньше интенсивность линии. Поэтому наибольшую интенсивность имеют линии К-серии.

В классической модели рентгеновского спектрометра с волновой дисперсией используют рентгеновские трубки, в состав которых входят катод и анод. Чаще всего анод изготавливают из Cr, Rh, W, Mo, Ag, Au. Электроны, вылетающие из катода, бомбардируют анод, при этом примерно 1 % кинетической энергии идет на излучение, а остальное на нагрев анода.

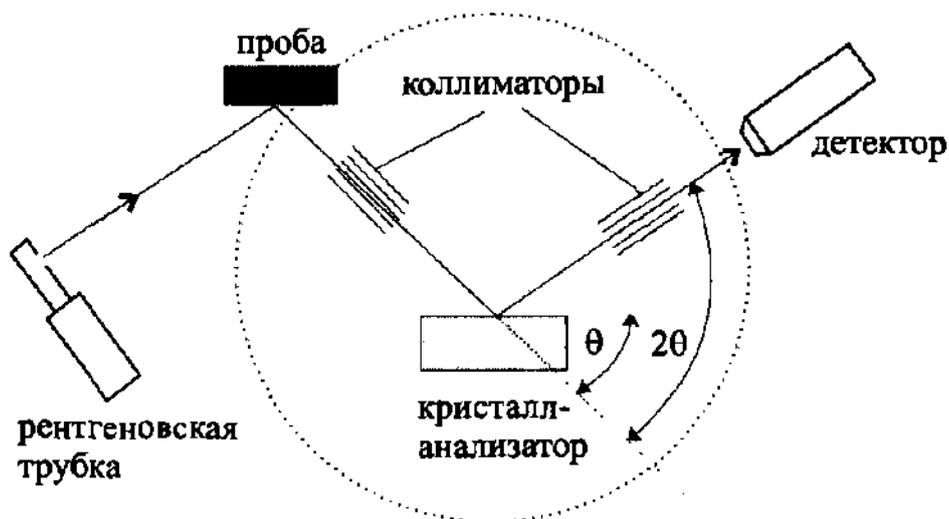


Рис. 2.7. Основные узлы рентгенофлуоресцентного спектрометра с волновой дисперсией

В спектр излучения рентгеновской трубки входит *тормозное излучение*, которое возникает в результате торможения электронов и представляет собой непрерывное распределение по энергиям. Другая часть спектра – характеристическое излучение материала анода. Его длина волны определяется энергиями связей электронов и природой материала анода.

Соотношение длины волны характеристического излучения и атомным номером элемента описывается законом Мозли.

$$\frac{1}{\sqrt{\lambda}} = K[Z - \sigma], \quad (2.20)$$

где Z – атомный номер; σ – поправки на экранирование; K – коэффициент пропорциональности.

Другой источник излучения – радиоактивные изотопы, например Fe^{55} , Am^{241} или Cd^{109} . Такие источники удобны для создания портативных РФА-спектрометров.

Для обеспечения высокого разрешения используют кристаллы-анализаторы (табл. 2.5).

Рентгеновское излучение регистрируют с помощью газоразрядных трубок, сцинтилляционных или полупроводниковых детекторов.

При идентификации элемента руководствуются положением его линии в спектре. При этом необходимо учитывать возможные изменения аналитического сигнала наличием матричных эффектов, вызванных физическими причинами.

Таблица 2.5

Кристаллы-анализаторы для РФА-спектрометров с волновой дисперсией

Кристалл	$2d, \text{ \AA}$	Определяемые элементы (порядковые номера)
LiF (420)	1,802	обеспечивает высокое разрешение
LiF (220)	2,848	
LiF (200)	4,028	≥ 20
PG	6,715	P(15), S(16), Cl(17)
PE	8,742	от Al(13) до K (19)

В настоящее время разработано несколько способов коррекции матричных эффектов.

Например, использование *внешнего стандарта*, где концентрацию элемента C_A рассчитывают из соотношения интенсивностей пробы (I_A) и внешнего стандарта (I_{st}):

$$C_A = C_{st} \frac{I_A}{I_{st}}. \quad (2.21)$$

Подобным образом используют метод внутреннего стандарта. Пробоподготовка также способствует снижению матричного эффекта. Возможна коррекция матричных эффектов *расчетным путем*.

Среди **методов рентгеновской дифракции** в первую очередь отметим метод *рентгеноструктурного анализа (РСА) монокристаллов*. Каждое вещество имеет свою уникальную картину рентгеновской дифракции.

С помощью данного метода исследуют структуру стероидов, антибиотиков, витаминов и других биологически активных веществ.

Порошковая рентгенография дает информацию о природе отдельных кристаллических фаз и позволяет определять как элементный, так и вещественный состав образца.

Для идентификации веществ используют интенсивность и положение линий дифракционных максимумов, выраженные в виде значений углов дифракции θ :

$$n\lambda = 2d \sin \theta, \quad (2.22)$$

где θ – угол падения лучей; d – межплоскостное расстояние в кристалле.

2.3. Методы оптической молекулярной спектроскопии

2.3.1. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния

Методы, основанные на поглощении веществом ИК-излучения, являются *абсорбционными*. Для характеристики энергии фотонов в области ИК пользуются понятием волнового числа ($\bar{\nu}$, см⁻¹), которое представляет собой число длин волн, укладываемых на отрезке 1 см.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}. \quad (2.23)$$

Эффект комбинационного рассеяния (рамановский эффект) – изменение длины волны света при рассеянии. Если рассеяние света происходит на отдельных молекулах, такой эффект называют *эффектом Релея*, а рассеяние света на макрочастицах – *эффектом Тундаля*.

В спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) используются только монохроматоры, дающие световые потоки с длиной волны, которые не поглощаются образцом. Условием проявления КР является изменение в ходе колебаний поляризуемости молекулы:

$$\frac{\partial a}{\partial(\Delta r)} \neq 0. \quad (2.24)$$

В спектрах КР всегда наблюдается полоса с волновым числом света источника излучения $\bar{\nu}_0$ и полосы с волновыми числами $\bar{\nu}_{ram} = \bar{\nu}_0 \mp \bar{\nu}_{vib}$, где $\bar{\nu}_{vib}$ – волновое число колебательной полосы (рис. 2.8). Полосы, смещенные в низкочастотную область, называются *стоксовыми* ($\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_{vib}$), а в высокочастотную ($\bar{\nu}_0 + \bar{\nu}_{vib}$) – *антистоксовыми*.

Степень деполяризации излучения – одна из характеристик КР. Деполяризация наблюдается в случае облучения образца поляризованным светом. Если молекулы образца обладают *изотропной* (одинаковой по всем направлениям) поляризацией, то рассеянный свет полностью поляризован. В случае *анизотропной* поляризуемости рассеянный свет частично деполяризован.

Степень деполяризации ρ равна:

$$\rho = I_{\perp} / I_{\parallel}, \quad (2.25)$$

где I_{\parallel} – интенсивность поляризованной составляющей света; I_{\perp} – интенсивность деполяризованной составляющей.

Справедливы следующие условия:

- если $I_{\perp} = 0$ и $p = 0$, то свет полностью поляризованный;
- при $I_{\perp} = I_{\parallel}$ и $p = 1$ свет полностью деполаризованный;
- и частично поляризованный свет при $0 < p < 1$.

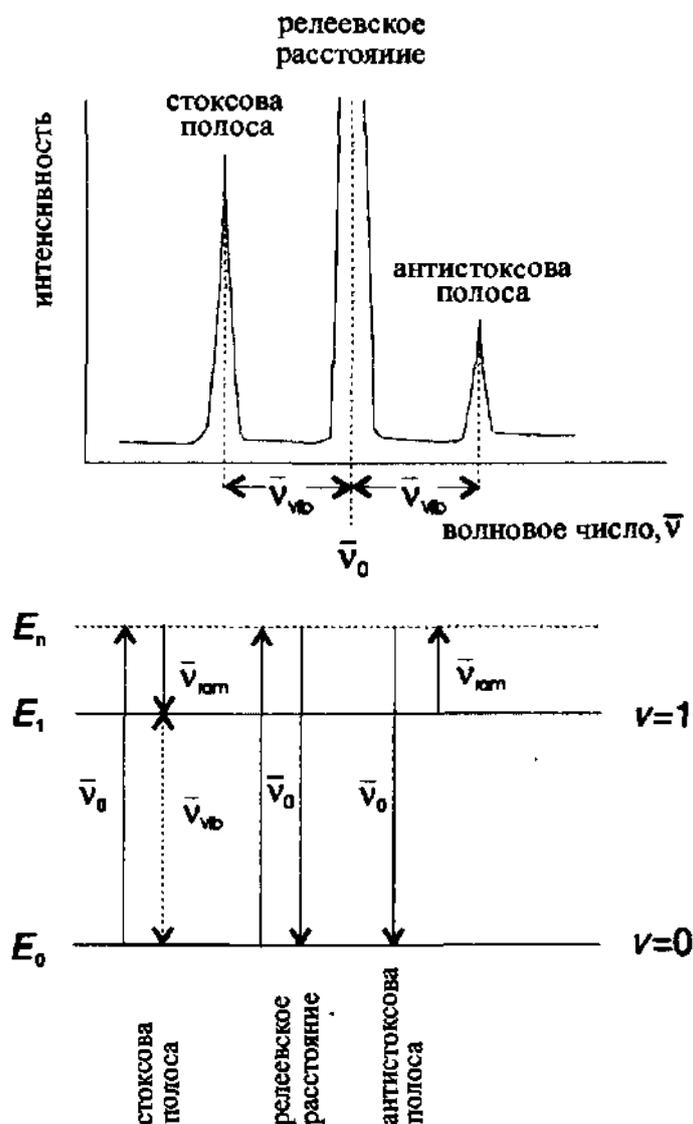


Рис. 2.8. Энергетические переходы и соответствующие полосы спектра КР

Положение молекул в пространстве связано с поступательным, колебательным и вращательным движениями.

Если колебания атомов происходит независимо друг от друга, то такие колебания называют нормальными.

Валентные колебания (ν) происходят в направлении химических связей с изменением межатомных расстояний. Деформационные колебания (δ) изменяют валентные углы, но межатомные расстояния постоянны.

При поглощении ИК-излучения возбуждаются только те колебания, которые связаны с изменением дипольного момента молекулы. Остальные колебания в ИК-спектрах не проявляются. В спектрах КР проявляются колебания, связанные с изменением поляризуемости молекулы.

Схема ИК-спектрометра не отличается от схемы оптического спектрометра. В качестве источников излучения в ИК-области используют раскаленные твердые тела, глобары и штифты Нернста. В дальней ИК-области применяют *ртутные разрядные лампы высокого давления*. В ближней – вольфрамовые лампы накаливания.

Пробоподготовка в ИК-спектроскопии более трудоемка, чем в спектроскопии видимого диапазона.

В качестве монохроматоров в ИК-спектроскопии используют и призмы, и дифракционные решетки.

В качестве детекторов (приемников) ИК-излучения – термопары и болометры.

Наличие *теплового шума* окружающей среды – общая проблема измерения интенсивности ИК-излучения. Поэтому детекторы ИК-излучения изолируют от окружающей среды. Иногда для выделения полезного сигнала используют модуляцию.

На рис. 2.9. показано устройство ИК-спектрометра, который работает по двухлучевой схеме.

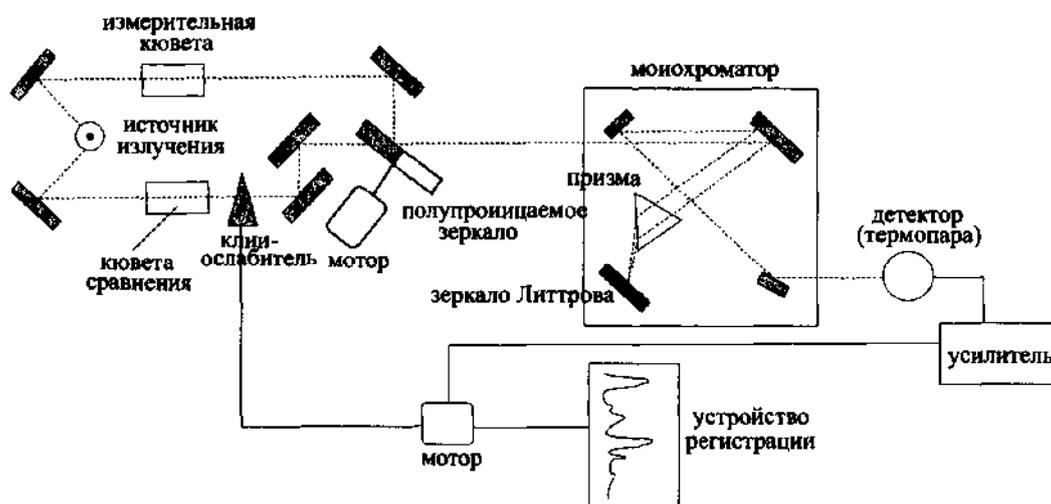


Рис. 2.9. Устройство ИК-спектрометра с призмным монохроматором конструкции Литтрова

Свет от источника излучения делится на два потока, один из которых проходит через *измерительную кювету*, а другой – через *кювету сравнения*. Затем потоки падают на вращающееся зеркало, которое разделено на равные сектора. Два сектора – прозрачные, а два других – отра-

жающие. Световые потоки поочередно попадают на монохроматор, отражаются зеркалом и дважды проходят через призму. Затем их направляют на выходную щель монохроматора. Сканируют спектр при помощи зеркала Литтрова или призмы. В обычных ИК-спектрометрах (с волновой дисперсией) спектр регистрируется последовательно.

Спектрометры с фурье-преобразованием позволяют сразу получить всю информацию о спектре в форме интерферограммы. Путем специального преобразования Фурье из интерферограммы можно получить спектр источника излучения.

КР-спектрометр напоминает спектрометр УФ-видимой области. Для наблюдения КР-спектров необходим интенсивный источник *монохроматического излучения*, а также обладающий высокой светосилой монохроматор и высокочувствительный детектор (поскольку интенсивность комбинационного рассеяния крайне мала). Первоначально для получения интенсивного монохроматического излучения использовали ртутные лампы высокого давления, выделяя из ее спектра линию 435, 8 нм. В настоящее время используют *лазеры*.

Излучение комбинационного рассеяния наблюдают под прямым углом к падающему световому лучу. Его разлагают с помощью монохроматора и регистрируют при помощи ФЭУ. Существенным техническим упрощением является то обстоятельство, что в спектрометрах комбинационного рассеяния, в отличие от ИК-спектрометров, можно в качестве оптического материала (для линз, кювет, оптических окошек) использовать стекло вместо непрочных галогенидов щелочных металлов.

На основании ИК-спектра можно установить не только природу вещества, но и его формулу. Для этого экспериментальный спектр сравнивают с уже известными спектрами. Для расшифровки молекулярной структуры используют таблицы положений характеристических частот (таблицы Колтупа). Очень часто КР- и ИК-спектры взаимно дополняют друг друга.

2.3.2. УФ-видимая спектроскопия

Для возбуждения валентных электронов достаточно излучения, которое соответствует УФ-видимой области. Однако в диапазоне 100–200 нм происходит интенсивное поглощение кислорода и все работы необходимо проводить под вакуумом. Поэтому диапазон называют вакуумной УФ-областью. Метод фотоэлектронной спектроскопии основан на явлении «выбивания» электрона энергией УФ-излучения вакуумной области.

Светопоглощение молекул в УФ-видимой области связано с возбуждением валентных электронов, находящихся в различных состояниях: n -, σ -, π -электронов для органических соединений; d -, f -электронов

для ионов металлов и с электронными переходами с переносом заряда в комплексных соединениях.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ -переходы наблюдаются в вакуумной УФ-области и для аналитической практики не интересны.

$n \rightarrow \sigma^*$ -переходы наблюдаются в более длинноволновой области спектра. Значение длины волны в максимуме поглощения зависит от характера связи гетероатома и его электроотрицательности.

Для аналитической практики наибольшее значение имеют $n \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы, т. к. находятся в длинноволновой области и имеют наибольшую интенсивность. Отметим, что электроны π -связей более возбудимы, чем электроны σ -связей. Полосы $n \rightarrow \pi^*$ -переходов находятся в более длинноволновой области, чем $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов, но менее интенсивны. Для $n \rightarrow \pi^*$ -переходов с ростом полярности растворителя наблюдается сдвиг полосы поглощения в коротковолновую область (гипсохромный сдвиг), а с уменьшением полярности – батохромный сдвиг.

Для этих хромофорных групп (рис. 2.10) переходы обусловлены наличием свободных электронных пар на атомах кислорода, азота и серы.

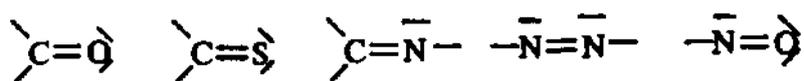


Рис. 2.10. Хромофорные группы, обуславливающие $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходы

С помощью сочетания хромофорных групп можно достичь значительного батохромного сдвига, так что поглощение будет наблюдаться в видимой области.

Дополнительный батохромный сдвиг возникает и при сопряжении хромофорных групп с электронодонорными (*ауксохромы*) или электроноакцепторными (*антиауксохромы*) группировками.

Значения λ и молярных коэффициентов поглощения зависят от заместителей и природы растворителя. Влияние заместителя проявляется не просто в изменении электронной плотности на отдельных атомах, но в удлинении цепочки сопряжения.

В УФ-видимой области можно наблюдать и полосы перехода *d*- и *f*-электронов.

Для аналитической химии особенно важны соединения, имеющие в своем спектре *полосы переноса заряда*. Комплексы с переносом заряда целесообразно использовать для фотометрического определения металлов.

Аппаратура для спектроскопии в УФ-видимой области соответствует общей блок-схеме. В качестве источников излучения в УФ-области

используют дейтериевые, а в видимой – вольфрамовые или галогеновые лампы. Для монохроматизации – светофильтр. В высококачественных регистрирующих спектрофотометрах преобладают дифракционные решетки. В качестве детектора используют ФЭУ, фотоэлементы. Аппаратурные погрешности измерений могут сильно различаться для приборов разных классов качества. Относительная погрешность измерения концентрации, выраженная в форме относительного стандартного отклонения s_c/c связана с величиной пропускания T и его стандартным отклонением s_T :

$$\frac{s_c}{c} = \frac{0,434s_T}{T \lg T} \quad (2.26)$$

При исследовании непрозрачных образцов вместо кюветы используют устройство для измерения *отраженного света*. На рис. 2.11 показаны два таких устройства.

В УФ-видимой области наблюдаются те же процессы ослабления светового потока при прохождении его через поглощающую среду, что и в ИК-области.

Некоторая часть света (I_A) поглощается образцом, другая (I_R) – отражается на границах раздела сред. Возможны также потери света за счет рассеяния (I_S) и поглощения материалом кюветы (I_{AK}). В результате интенсивность света, прошедшего через кювету (I), меньше, чем интенсивность падающего света (I_0).

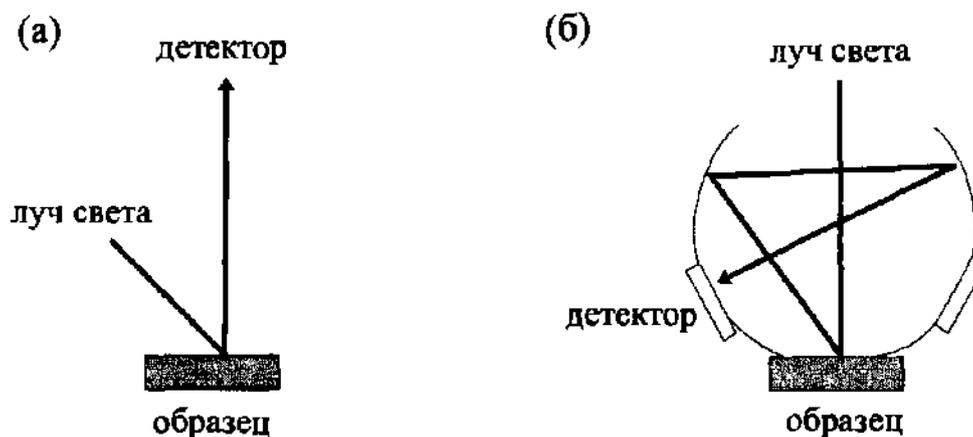


Рис. 2.11. Устройства для спектроскопических измерений в отраженном свете:

- (а) – облучение пробы под углом 45° , измерение – под углом θ° к вертикали,
 (б) – измерение с помощью фотометрической сферы

Потери света за счет рассеяния, отражения и поглощения материалом кюветы (а также растворителем) компенсируют, проводя измерения

относительно раствора сравнения. В качестве образца сравнения используют сильно рассеивающий непоглощающий материал (сульфат бария, оксид магния).

Мерой светопоглощения служат величины пропускания:

$$T = \frac{I}{I_0}, \text{ или } T[\%] = \frac{I}{I_0} \cdot 100, \quad (2.27)$$

и оптической плотности:

$$A = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I}. \quad (2.28)$$

Если раствор образца не поглощает свет, пропускание равно 100 %, оптическая плотность – нулю. При полном поглощении света пропускание равно нулю, а оптическая плотность – бесконечности. Закон, объединяющий зависимость оптической плотности от толщины кюветы и его молярной концентрации, называется *законом Ламберта–Бера* или *Бугера–Ламберта–Бера*. Применительно к спектрофотометрии в УФ-видимой области спектра его записывают следующим образом:

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c, \quad (2.29)$$

где ε_λ – молярный коэффициент поглощения ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) при длине волны λ ; l – толщина кюветы (см); c – концентрация поглощающих частиц (моль/л).

Причины отклонения от закона Ламберта–Бера:

- Электростатические взаимодействия при высоких концентрациях поглощающих частиц.
- Побочные реакции.
- Использование недостаточно монохроматичного света.

При определении «бесцветных» веществ вначале определяемый компонент переводят в окрашенный продукт. Для этого используют как неорганические, так и органические реагенты. Неорганические реагенты применяют для определения ионов металлов. Для количественного анализа в ряде случаев используют цветные реакции.

На сегодняшний день предложено более 7000 органических реагентов для фотометрического анализа. Высокая *устойчивость* образующегося комплекса и контрастность – необходимое условие применимости органического реагента.

Существует много способов, позволяющих улучшить селективность фотометрических определений: выбор значения pH, применение маскирующих реагентов, сочетание фотометрического анализа с методами разделения, применение математических методов анализа многокомпонентных систем.

Отражательная спектроскопия. Говоря о явлении отражения света, следует различать зеркальное и диффузное отражение.

Зеркальное отражение происходит при освещении зеркальных поверхностей. При отражении света, падающего из воздуха ($n_1 = 1$) под прямым углом на поверхность твердого тела с коэффициентом преломления n_2 , доля неполяризованного отраженного света (R) равна:

$$R = \left(\frac{n_2 - 1}{n_2 + 1} \right)^2. \quad (2.30)$$

Если тело поглощает свет, интенсивность отраженного света увеличивается. В этом случае она зависит от коэффициента поглощения ε_λ и длины волны света:

$$R = \frac{(n_2 - 1)^2 + \left(\frac{\varepsilon_\lambda \cdot \lambda}{4\pi} \right)^2}{(n_2 + 1)^2 + \left(\frac{\varepsilon_\lambda \cdot \lambda}{4\pi} \right)^2}. \quad (2.31)$$

Увеличение интенсивности отраженного света становится заметным лишь в том случае, если коэффициент поглощения достигает достаточно больших величин. Так, для видимого света ($\lambda \sim 500 \text{ нм} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ см}$) значение ε_λ должно быть не меньше, чем 10^4 см^{-1} . Такими значениями коэффициентов поглощения обладают металлы или некоторые органические вещества в кристаллическом состоянии.

Если размер частиц меньше, чем длина волны света, то явления отражения, преломления и рассеяния света становятся неразличимыми. Единственным наблюдаемым явлением в этом случае будет *рассеяние* света – распространение излучения от поверхности непрозрачного тела во всех направлениях.

Рассеяние света будет равномерным, если частицы рассеивающих центров находятся близко друг к другу, как в случае тонкодисперсных порошков. Возникающее при этом явление называется *диффузным отражением*. Его мерой служит отношение интенсивностей рассеянного (I) и падающего (I_0) излучения:

$$R = \frac{I}{I_0}. \quad (2.32)$$

При одновременном протекании процессов поглощения и рассеяния света величина диффузного отражения R зависит от концентрации поглощающего компонента в образце. Ее можно привести к виду, похожему на уравнение Ламберта–Бера:

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{K}{S} = \frac{\varepsilon_\lambda c}{S}. \quad (2.33)$$

Таким образом, величина $F(R)$ прямо пропорциональна концентрации. Значение коэффициента поглощения ε_λ находят путем градуировки.

В результате измерения диффузного отражения получают *спектр диффузного отражения*, подобный спектру поглощения вещества в растворе. Эти спектры можно непосредственно использовать для идентификации твердых непрозрачных окрашенных образцов – пигментов, порошков, слоев краски, поверхностей металлов.

Нефелометрия. Одним из важных показателей качества воды является *мутность*. Для измерения мутности можно использовать фотометрию. С этой целью измеряют интенсивность света, рассеянного под прямым углом к падающему лучу. Стандарты мутности готовят на основе формазина – смеси сульфата гидразина и гексаметилентетрамина (уротропина).

В сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) спектроскопия в УФ-видимой области применяется для *идентификации и оценки степени чистоты* органических веществ. В частности, с помощью этих спектров можно:

- различать предельные и непредельные соединения, цис- и трансконфигурации, отдельные таутомерные формы (кетонную, енольную), изолированные и сопряженные системы хромофорных группировок;
- идентифицировать полосы поглощения карбонильных групп
- распознавать ароматические системы;
- обнаруживать электронные эффекты, вызванные наличием различных заместителей.

На практике для структурного анализа спектроскопию в УФ-видимой области практически не применяют.

2.3.3. Флуоресцентная и фосфоресцентная спектроскопия

Метод молекулярной люминесценции подразделяется на методы флуоресцентной, фосфоресцентной и хемилюминесцентной спектроскопии. Первые два основаны на измерении интенсивности излучения, испускаемого в результате поглощения фотонов (*фотолюминесценция*). *Хемилюминесценция* – это процесс испускания света молекулами, возбужденными в ходе химической реакции. Такими молекулами являются не частицы определяемого компонента, а продукты их химических превращений (например, окисления).

Явление флуоресценции наблюдают и для атомов, и для молекул.

Каждое энергетическое состояние валентных электронов дополнительно характеризуется набором уровней колебательной энергии. Взаимное расположение электронных и колебательных уровней показано в виде диаграммы (рис. 2.12). Электронные уровни изображены более жирными, а колебательные (с колебательным квантовым числом ν) – более тонкими линиями.

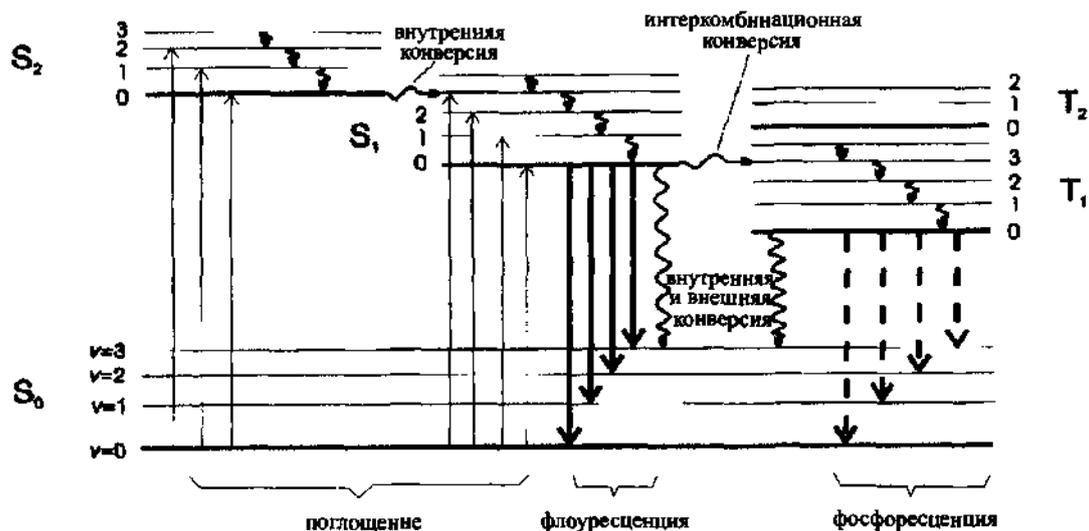


Рис. 2.12. Диаграмма Яблонского

Рассматривая электронные переходы в молекуле, следует различать синглетные (S_0 , S_1 , S_2) и триплетные (T_1 , T_2) электронные состояния. В синглетных состояниях – основном (S_0) и возбужденных (S_1 , S_2) – все спины электронов ориентированы антипараллельно, неспаренные электроны отсутствуют. В триплетных состояниях спины электронов ориентированы параллельно. Поэтому в синглетном состоянии молекула диамагнитна, в триплетном – парамагнитна.

Вероятность перехода между двумя синглетными состояниями намного выше, чем между синглетным и триплетным. Прямой переход из основного состояний S_0 в триплетное в результате поглощения фотона невозможен. Молекула может оказаться в триплетном состоянии только в результате переходов электронов с возбужденных синглетных состояний.

Механизмы возвращения молекулы из возбужденного состояния в основное:

- *Безызлучательные переходы* – дезактивация (отдача энергии, затраченной на возбуждение) молекулы происходит без излучения.
- *Излучательная дезактивация.* Среди процессов дезактивации с излучением света различают флуоресценцию и фосфоресценцию.

Флуоресценция – процесс излучательного перехода с низшего возбужденного синглетного состояния в основное ($S_1 \rightarrow S_0$) в одну стадию.

Фосфоресценция обусловлена переходом из триплетного состояния. Длительность процесса фосфоресценции составляет от 10^{-3} до 10 с. Особенно длительное свечение наблюдается в случае биолюминесценции.

В люминесцентном методе анализа зависимость аналитического сигнала (интенсивности люминесценции) от концентрации вещества зависит от квантового выхода люминесценции Q .

$$Q = \frac{\text{число испущенных фотонов}}{\text{число поглощенных фотонов}}. \quad (2.34)$$

Для очень разбавленных растворов зависимость между интенсивностью люминесценции I и концентрацией c приближенно выражается как

$$I = QI_0 \varepsilon l c, \quad (2.35)$$

где I_0 – интенсивность внешнего источника света, а ε , l и c имеют те же значения, что и в выражении закона Ламберта–Бера.

Важно отметить, что, в отличие от оптической плотности, интенсивность люминесценции прямо пропорциональна интенсивности источника света. Чем выше интенсивность источника, тем больше и аналитический сигнал.

Тушение люминесценции происходит в результате столкновения возбужденной молекулы с другими молекулами – особенно парамагнитными (растворенный кислород), которые стимулируют процессы интеркомбинационной конверсии. *Самопоглощение* состоит в поглощении части испускаемого света слоем люминесцирующего вещества.

Прибор для измерения интенсивности флуоресценции отличается от абсорбционного спектрофотометра тем, что измерение происходит под углом (обычно прямым) к падающему лучу света. Поэтому кюветы должны быть прозрачными во всех направлениях.

Флуоресцентный спектрометр включает в себя два монохроматора, что позволяет регистрировать и спектр возбуждения и спектр флуоресценции.

Флуоресцентные микроскопы – это следующее поколение приборов после оптических (где увеличение осуществляется конструкцией из линз) и электронных (где используется световой поток пучка электронов и специальные магнитные линзы). Нобелевская премия 2014 года по химии присуждена Эрику Бетцигу, Штефану Хеллю и Уильяму Мёрнеру за разработку флуоресцентной микроскопии высокого разрешения. Отметим, что премия присуждена не за химию, а за технологию. Также наградой отмечены два метода. Первый – микроскопия на основе подавления спонтанного испускания, разработанная Штефаном Хеллем. Один лазерный пучок заставляет флуоресцирующие молекулы светиться, второй – подавляет все излучение вокруг определенного участка размером в нанометры. Другой метод, разработанный Эриком Бетцигом и Эриком Мёрнером, – микроско-

пия одиночных молекул. Он основан на возможности включать и выключать флуоресцентное излучение отдельных молекул. Снимая интересующую область много раз и накладывая затем полученные снимки, ученые могут добиваться пространственного разрешения в нанометры. Бетциг впервые применил этот метод в 2006 году.

Флуоресцентная микроскопия достигает разрешения 20–25 нм, что позволяет видеть отдельные структуры, не только в фиксированных, но и в живых клетках, их динамику и даже какие-то внутриклеточные процессы. Число флуоресцирующих веществ весьма ограничено.

Для регистрации фосфоресценции необходимы дополнительные устройства. Одно из них – механический или электронный прерыватель, позволяющий облучать пробу очень короткими импульсами и тем самым отделить длительное фосфоресцентное свечение от кратковременного флуоресцентного. Другой – устройство для охлаждения пробы до температуры жидкого азота, т. к. фосфоресценция наблюдается лишь при очень низких температурах

Несмотря на то, что фосфоресцентный метод селективнее флуоресцентного, для количественного анализа его используют очень редко. Известны методики фосфоресцентного определения ряда органических и биологических соединений – пестицидов, аминокислот, нуклеиновых кислот. Для некоторых соединений, содержащих ароматические системы с заместителями – тяжелыми атомами (бром, иод), способность к фосфоресценции выражена даже сильнее, чем к флуоресценции.

Хемилюминесцентное излучение наблюдается тогда, когда в ходе химической реакции образуется возбужденная молекула, способная люминесцировать при переходе в основное состояние. Это явление наблюдается и в биологических системах и называется в этих случаях *биолюминесценцией*.

Для выполнения анализа требуется лишь измерить интенсивность возникающего люминесцентного излучения с помощью ФЭУ. Поскольку единственным источником излучения в этом случае является химическая реакция, разложения света в спектр не требуется.

2.4. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), основан на использовании электромагнитного излучения в радиочастотной области. В отличие от всех рассмотренных ранее спектроскопических методов, здесь происходит возбуждение атомных ядер.

Спектроскопия ЯМР – важнейший метод *определения структуры* органических молекул.

Большинство атомных ядер обладает собственным моментом импульса или ядерным спином p . Он характеризует *магнитный момент* ядра. Ядерный спин квантуется в соответствии с соотношением

$$p = \sqrt{I(I+1)} \cdot \frac{h}{2\pi}, \quad (2.36)$$

где h – постоянная Планка; I – *спиновое квантовое число*.

Наиболее важные для спектроскопии ЯМР ядра ^1H , ^{13}C , ^{19}F и ^{31}P имеют ядерный спин, равный $1/2$. Спины ядер изотопов ^{12}C и ^{16}O равны нулю, не обладают магнитным моментом и непригодны для спектроскопии ЯМР.

Магнитный момент ядра μ пропорционален его моменту импульса:

$$\mu = \gamma p. \quad (2.37)$$

Коэффициент пропорциональности γ называется *гиромагнитным отношением*. Он имеет размерность Тл/с (тесла на секунду) и свое значение для каждого ядра. Без *внешнего магнитного поля* расщепления уровней энергии ядер не наблюдается. В магнитном поле с плотностью магнитного потока B_0 потенциальная энергия ядра равна

$$E = -\frac{\gamma m h}{2\pi} B_0, \quad (2.38)$$

где m – *магнитное квантовое число*, которое может принимать значения $I, I-1, I-2, \dots, -I$. Таким образом, в результате расщепления в магнитном поле всего имеется $(2I+1)$ уровней энергии ядра. Они называются *зеемановскими ядерными уровнями*.

При поглощении или испускании электромагнитного излучения существует соотношение между частотой излучения и плотностью магнитного потока:

$$\nu_0 = -\frac{\gamma B_0}{2\pi}. \quad (2.39)$$

Поведение ядра в магнитном поле можно представить в виде вращающегося *гироскопа*, который отклоняется под действием внешней силы. Такую силу создает магнитное поле, направленное вдоль «оси вращения» ядра. В результате отклонения этой оси происходит *прецессия* (рис. 2.13).

Частота прецессии ядра называется *ларморовой частотой*, ее рассчитывают по уравнению (2.39).

Магнитный момент ядра может располагаться вдоль или противоположно направлению магнитного поля. Разность энергий этих состояний связана с величиной угла прецессии:

$$E = -\mu_z B_0 = -\mu B_0 \cos \theta, \quad (2.40)$$

магнитное поле, B_0

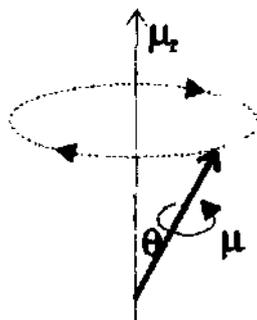


Рис. 2.13. Прецессия вращающегося магнитного ядра под действием магнитного поля

Импульсная ЯМР-спектроскопия. Для увеличения соотношения сигнал–шум в ЯМР-спектрометрах пробу облучают кратковременными импульсами радиочастотного излучения. Длительность импульса τ составляет порядка 10 мкс, а промежуток между импульсами T – от 1 до 10 с. В течение времени T измеряют затухающий сигнал в направлении, перпендикулярном приложенному магнитному полю. Такой метод измерения называют методом *спада свободной индукции*. Для увеличения отношения сигнал-шум регистрацию спектра повторяют многократно, а полученные сигналы суммируют (накапливают). При этом получают спектр ЯМР во временном представлении. Чтобы превратить полученные данные в обычный спектр ЯМР (в частотном представлении), используют *преобразование Фурье*.

Химический сдвиг. Под влиянием химического окружения ядер частоты магнитного резонанса смещаются. Причина этого явления состоит в воздействии дополнительных магнитных полей, индуцируемых в окружающих электронах и ядрах. Эти магнитные поля направлены противоположно внешнему магнитному полю и как бы «экранируют» ядро от него. Таким образом, результирующее магнитное поле B_{eff} отличается от внешнего поля B_0 на величину индуцированного поля σB_0 :

$$B_{eff} = B_0 - \sigma B_0 = (1 - \sigma)B_0. \quad (2.41)$$

Величина σ называется *константой экранирования*. С учетом явления экранирования условие резонанса (см. формулу 2.39) можно записать как

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma). \quad (2.42)$$

Чем больше величина σ , тем сильнее экранировано ядро от внешнего магнитного поля, тем больше при постоянной частоте должно быть

внешнее поле, чтобы наблюдался резонанс. Если же сила магнитного поля постоянна, то чем больше экранировано ядро, тем меньше резонансная частота.

Спектр ЯМР представляют в виде зависимости интенсивности сигнала от значения химического сдвига, выраженного в миллионных долях (м. д.). В соответствии с традицией величины химических сдвигов возрастают справа налево.

Значения химических сдвигов не зависят от используемой частоты и абсолютных значений напряженности магнитного поля. Она является характеристической величиной для данного ядра в данном химическом окружении. В спектроскопии ЯМР ^1H величины химических сдвигов составляют от 0 до 10, а в спектроскопии ЯМР ^{13}C – от 0 до 220 (в отдельных случаях до 400) м. д.

Спектрометр ЯМР состоит из держателя пробы, магнита, одного или нескольких радиочастотных излучателей и приемника радиочастотного излучения (рис. 2.14).

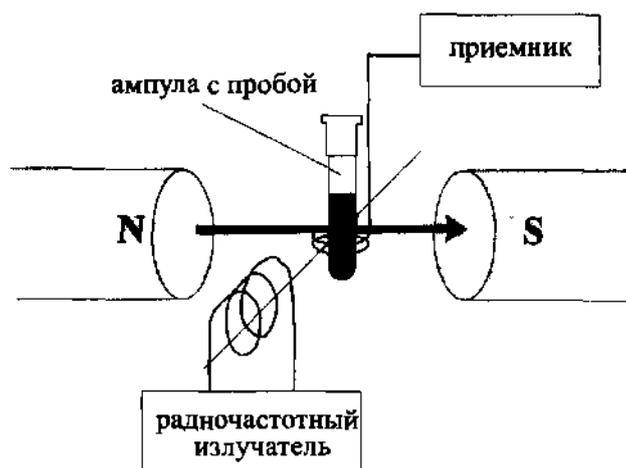


Рис. 2.14. Схема устройства ЯМР-спектрометра

Образец помещают в небольшую пробирку или ампулу и располагают между полюсами магнита. Изучаемое вещество растворяют в растворителе с малой вязкостью. С помощью специальной аппаратуры можно изучать и твердые образцы. В спектрометрах высокого разрешения используют *магниты* с плотностью потока от 1,4 до 14 Тл. Для возбуждения ядер и регистрации сигнала служат излучатель и приемник излучения, работающие в высокочастотном радиоволновом диапазоне.

Наиболее ранний способ регистрации спектров ЯМР состоял в непрерывном изменении частоты излучения или силы магнитного поля. В настоящее время преобладают импульсные спектрометры с фурье-преобразованием.

При обработке спектров ЯМР их обычно интегрируют. При этом помимо обычного спектра (в виде пиков), информацию дополнительно представляют в форме интегрального спектра (ступенчатая кривая). Высота каждой ступени соответствует площади пика. Относительная погрешность измерения площадей пиков составляет обычно $\pm 2\%$.

Самая важная область применения спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H – установление структуры органических, биоорганических и металлоорганических соединений.

Определение концентрации веществ в растворе методом ЯМР основано на наличии прямо пропорциональной зависимости между площадью пика и числом соответствующих ядер. Для построения градуировочной зависимости используют внутренние стандарты. Необходимо, чтобы пики внутреннего стандарта не перекрывались с другими сигналами.

Для определения содержания с использованием внутреннего стандарта используют формулу:

$$m_x = m_{\text{ст}} \frac{N_{\text{ст}}}{N_x} \cdot \frac{M_x}{M_{\text{ст}}} \cdot \frac{A_x}{A_{\text{ст}}}, \quad (2.43)$$

где m – масса вещества; N – число протонов в группе, для которой измерен сигнал; A – площадь пика; M – молярная масса вещества, а индексы x и ст обозначают определяемое вещество и внутренний стандарт.

В качестве внутреннего стандарта можно использовать бензол, воду, кремнийорганические соединения.

Спектроскопию ЯМР ^1H можно использовать для определения содержания отдельных функциональных групп, например спиртовых, фенольных или альдегидных.

Природное содержание изотопа ^{13}C составляет 1,1%. Ядра ^{13}C обладают меньшим гиромагнитным отношением по сравнению с ^1H . В силу этих причин чувствительность в спектроскопии ЯМР ^{13}C в 6000 раз ниже, чем в спектроскопии ^1H . Развитие производства приборов с фурье-преобразованием позволило сделать спектроскопию ЯМР ^{13}C повседневным методом исследования. Особое значение спектроскопии ЯМР ^{13}C состоит в том, что она дает непосредственную информацию о строении углеродного скелета молекулы (а не ее периферии, как спектроскопия ЯМР ^1H). Диапазон химических сдвигов для ядер ^{13}C достигает 200 м. д., что существенно шире, чем для протонов.

В отличие от спектроскопии ЯМР ^1H , в спектроскопии на ядрах ^{13}C гомоядерные спин-спиновые взаимодействия не играют никакой роли, поскольку вероятность одновременного нахождения двух ядер ^{13}C в одной молекуле ничтожно мала. Взаимодействия ядер ^{13}C и ^{12}C невозможны, поскольку ядро ^{12}C не обладает спином.

2.5. Масс-спектрометрия

Метод масс-спектрометрии основан на превращении определяемых компонентов в *ионизированные частицы* и их разделении в газовой фазе в соответствии с их *массовыми числами* – отношениями массы (m) к заряду (q).

Методами масс-спектрометрии можно решить следующие задачи:

- установление структуры органических соединений, включая определение молярной массы;
- качественный и количественный анализ сложных смесей органических и неорганических соединений с высокой чувствительностью и разрешающей способностью;
- определение изотопного состава;
- исследование состава и структуры поверхностей.

Масс-спектр представляет собой зависимость интенсивности сигнала детектора (относительной меры количества данного иона) от отношения *массы иона к его заряду* (m/z).

Устройство масс-спектрометра. Главными узлами масс-спектрометра являются *система напуска*, *источник ионизации* (ионизатор) с ускорителем ионов, *масс-анализатор* (устройство для разделения ионов) и *детектор* в сочетании с *регистрирующим устройством* (рис. 2.15).

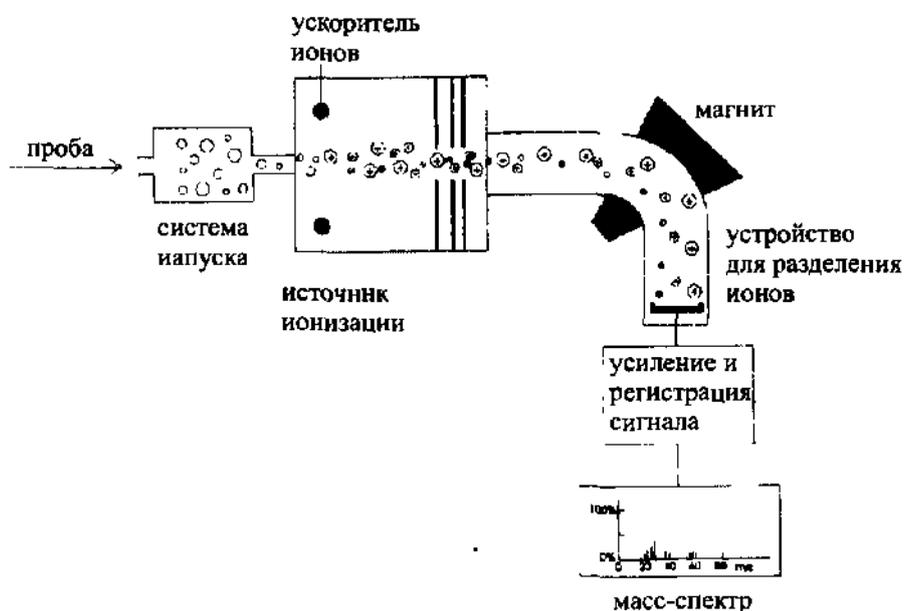


Рис. 2.15. Схема устройства масс-анализатора

Чтобы исключить соударение ионов с другими атомами и молекулами, анализ производят в вакууме. В ионизаторе давление составляет

10^{-3} – 10^{-4} Па, а в масс-анализаторе – 10^{-3} – 10^{-8} Па. Существуют прямой и непрямой способы ввода пробы.

При *непрямом* способе пробу испаряют в специальной камере, из которой пары в виде молекулярного пучка поступают в ионизатор.

Прямой ввод пробы используют в том случае, если проба труднолетуча. Образец вводят в ионизатор с помощью штанги через систему шлюзовых камер. При таком способе ввода потери вещества значительно меньше, чем при непрямом вводе, поэтому для анализа бывает достаточно нескольких нанограммов образца.

Перед разделением анализируемые вещества переводят в ионное состояние. Для ионизации используют потоки быстрых частиц – электронов, ионов, атомов, фотонов, а также тепловую или электрическую энергию. На выходе из ионизатора проба находится в форме положительно заряженных ионов. Их затем ускоряют с помощью специального устройства. Форма получаемого масс-спектра зависит от способа ионизации. В табл. 2.6 приведены способы ионизации в масс-спектрометрии.

Таблица 2.6

*Способы ионизации в масс-спектрометрии.
Символ M означает нейтральную молекулу или атом*

Название	Сокращение	Источник ионизации	Процесс
ионизация электронным ударом	EI	электроны	$M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$
химическая ионизация	CI	газ-реагент	$M + CH_5^+ \rightarrow MH^+ + CH_4$
полевая ионизация, полевая десорбция	FI/FD	электрическое поле	$M \rightarrow M^{+\bullet} + e^-$
бомбардировка быстрыми атомами	FAB	ускоренные атомы	$M + X \rightarrow (M + H)^+$
фотоионизация	PI	УФ-излучение	$M + h\nu \rightarrow M^{+\bullet} + e^-$
искровая ионизация	SSMS	высоковольтная искра	$M \rightarrow M^{+\bullet} + e^-$
ионизация в индуктивно связанной плазме	ICP/MS	тепловая энергия	$M \rightarrow M^{+\bullet} + e^-$
ионизация вторичными ионами	SIMS	ионы	$M + Ar^+ \rightarrow M^{+\bullet} + Ar$

Масс-анализатор – устройство для разделения ионов, которое играет ту же роль, что дифракционная решетка в оптической спектроскопии. Но, в отличие от оптической спектроскопии, где происходит разделение фотонов по их энергиям или длинам волн, в масс-спектрометрии разделяют ионы в соответствии с величинами отношений *массы к заряду*.

Разрешающую способность масс-спектрометрического анализа можно определить как

$$R = \frac{z}{\Delta z} = \frac{m}{\Delta m}. \quad (2.44)$$

Классическим способом разделения ионов в статических условиях является использование **секторного магнитного анализатора**. С его помощью пучок ионов отклоняют в магнитном поле постоянного магнита или электромагнита на определенный угол. Перед разделением пучок ионов ускоряют. Ускорение ионов проводят в электростатическом поле с напряжением 800–8000 В. Ускоренные ионы попадают в магнитное поле с напряженностью H , силовые линии которого ориентированы перпендикулярно направлению движения ионов. При этом траектории ионов искривляются и превращаются в круговые. Основное уравнение, описывающее поведение ионов в магнитном поле, имеет выражение:

$$\frac{m}{z} = \frac{H^2 r^2}{2U}. \quad (2.45)$$

Масс-спектрометры с двойной фокусировкой. При использовании метода двойной фокусировки ионы разделяют сначала в *электростатическом*, а затем в *магнитном* секторе.

В *электростатическом* секторе ионы разделяют (фокусируют) в соответствии с их кинетическими энергиями. Выходная щель электростатического сектора пропускает только те ионы, энергия которых находится в достаточно узком диапазоне и соответствует средней кинетической энергии.

Затем ионы разделяют в *магнитном* секторе в соответствии с их массовыми числами. Обе плоскости фокусировки – электростатической (по энергиям) и магнитной (по массовым числам) перпендикулярны друг другу. В результате такой *двойной фокусировки* в точку пересечения обеих плоскостей попадают только те ионы, которые обладают как определенной кинетической энергией, так и определенным значением массового числа.

Применение двойной фокусировки позволяет достичь разрешения порядка 10^5 и определять массовые числа с точностью до пяти значащих цифр.

Квадрупольные масс-спектрометры компактны и надежны в эксплуатации. Разделение ионов проводят в динамическом режиме. Ионы ускоряют под действием постоянного напряжения 5–15 В и направляют в пространство между четырьмя параллельными электродами. Электроды представляют собой металлические стержни (размером приблизительно $0,6 \times 15$ см). Одна пара расположенных по диагонали электродов заряжена положительно, другая – отрицательно.

Кроме постоянного напряжения, на электроды налагают высокочастотное переменное напряжение. Для одной пары электродов переменное напряжение смещено по фазе на 180° по отношению к другой. Совместное действие постоянного и переменного электрического поля вызывает отклонение траекторий ионов от первоначального направления. При прохождении потока ионов в канале анализатора напряжения подбирают таким образом, чтобы весь путь между электродами прошли только ионы с определенным значением массового числа. При этом происходит своеобразная «фильтрация» ионов. Поэтому данный тип масс-анализаторов называют также «*масс-фильтрами*».

Времяпролетные масс-анализаторы. Действие времяпролетных масс-анализаторов основано на зависимости скорости движения ионов от их массы. После ускорителя все ионы обладают одинаковой кинетической энергией. Следовательно, чем больше их масса, тем меньше скорость. Во времяпролетных масс-анализаторах ускоритель ионов отделяют от детектора трубой дрейфа. Чем тяжелее ион, тем больше время, затрачиваемое им на то, чтобы пролететь трубу дрейфа и достичь детектора. Различие во временах движения ионов может составлять всего 1–30 мкс, поэтому здесь необходима система цифровой регистрации с очень высоким быстродействием. Разрешающая способность времяпролетных масс-анализаторов невелика. Достоинством таких анализаторов является высокая надежность в эксплуатации и неограниченный диапазон измеряемых масс.

Еще один тип масс-анализаторов составляют **ионные ловушки** или **масс-спектрометры с фурье-преобразованием**. Как и другие типы спектрометров с фурье-преобразованием (ИК, ЯМР), они характеризуются высокими значениями отношений сигнал-шум, повышенным быстродействием, высокой чувствительностью и разрешающей способностью. В основе их действия лежит явление ионноциклотронного резонанса.

Для преобразования ионного тока в измеряемый сигнал применяют главным образом электрический способ регистрации на основе *вторичных электронных умножителей* – ФЭУ, диоды которых покрыты слоем Cu/Be и *фарадеевские детекторы*.

Фарадеевские детекторы отличаются хорошей воспроизводимостью. Однако их чувствительность мала, а время отклика велико, что не позволяет их использовать в сочетании с хроматографией.

Масс-спектры для различных источников ионизации. Характер молекулярных масс-спектров зависит от природы используемого источника ионизации. Самым ранним способом ионизации служила ионизация электронным ударом. Метод имеет ряд недостатков, однако остается преобладающим из-за того, что большинство библиотек масс-спектров составлены применительно к ионизации электронным ударом.

Основные типы источников ионизации приведены в табл. 2.6.

При наличии масс-спектрометров *высокого разрешения* (с двойной фокусировкой) брутто-формулу соединения можно установить непосредственно. Для установления брутто-формулы существуют специальные таблицы с точными значениями молярных масс всех возможных соединений, состоящих из атомов С, Н, N, О. Важным правилом является так называемое «азотное правило». Оно гласит, что если молярная масса вещества (округленная до целого) нечетна, то его молекула содержит нечетное число атомов азота.

При использовании масс-спектров низкого разрешения установить брутто-формулу можно на основе данных по природному содержанию отдельных *изотопов*.

Наличие изотопов приводит к появлению пиков M^+ , $(M+1)^+$, $(M+2)^+$ и т. д. В общем случае при наличии двух изотопов одного элемента с молярными массами, различающимися на единицу, соотношения интенсивностей пиков M^+ , $(M+1)^+$, $(M+2)^+$ и т. д. являются слагаемыми биномиального разложения: $(a+b)^n$, где a – относительное содержание легкого изотопа; b – относительное содержание тяжелого изотопа; n – число атомов данного элемента в молекуле.

Для таких элементов, как S, Si, Cl, Br, массы природных изотопов различаются на 2 единицы. Для соединений, содержащих только атомы С, Н, N, О (а также F и P), однозначное установление брутто-формулы часто бывает возможным лишь при привлечении дополнительных данных, например элементного анализа.

При идентификации веществ с помощью масс-спектрометрии исходят из того, что характер фрагментации неизвестного вещества и соединения предполагаемой структуры одинаковы, а спектры получены в близких экспериментальных условиях. Для надежной идентификации необходимо наряду со спектром неизвестного вещества экспериментально получить и масс-спектр вещества с предполагаемой структурой.

С помощью масс-спектрометрии можно проводить вещественный и количественный анализ.

Вещественный анализ осуществляют в сочетании с хроматографическим разделением. В ходе хроматографического процесса регистрируют во времени интенсивность какого-либо пика с определенным массовым числом. В результате получается зависимость сигнала детектора от времени.

Сочетание методов разделения и масс-спектрометрического определения возможно и в форме *тандемной масс-спектрометрии*. Здесь последовательно используют два масс-спектрометра. Первый служит для выделения молекулярных пиков отдельных веществ из масс-спектра их смеси, второй – для фрагментации выделенных веществ с целью их идентификации. В идейном отношении метод тандемной масс-спектрометрии очень похож на хромато-масс-спектрометрию.

Для количественного анализа можно использовать и масс-спектр как таковой. Для этого следует выбрать некоторый пик, принадлежащий определяемому компоненту, и измерить его интенсивность. Для исключения влияния условий эксперимента используют *внутренний стандарт* – обычно изотопную разновидность определяемого вещества или его гомолог. При перекрывании пиков можно использовать математические методы анализа многокомпонентных смесей.

Элементный анализ проводят путем ионизации образца в индуктивно связанной плазме, электрической искре, или тлеющем разряде. При искровой ионизации обычно применяют масс-анализатор с двойной фокусировкой геометрии Маттауха-Герцога. Этим методом анализируют главным образом *твердые* образцы. При использовании ИСП или тлеющего разряда применяют квадрупольные анализаторы. В настоящее время масс-спектрометрия с ИСП стала очень важным методом анализа растворов, позволяющим определять любые элементы (с массовыми числами начиная от 3) с пределами обнаружения от 0,1 до 10 частей на миллион. Для элементного анализа вполне достаточно разрешения в одну единицу m/z . Метод масс-спектрометрии (в форме масс-спектрометрии вторичных ионов) применяется и для исследования *поверхности* при анализе материалов.

2.6. Методы анализа, основанные на радиоактивности

Способов использования ядерных реакций для химического анализа множество. Один из них – измерение *естественной радиоактивности* элементов, содержащихся в пробе. Другой способ (*активационный анализ*) основан на переводе компонентов пробы в радиоактивное состояние (активации) под действием облучения – главным образом пото-

ком нейтронов. Вместо нейтронов можно использовать и заряженные частицы – ядра водорода, дейтерия или гелия. Измерение интенсивности наведенного радиоактивного излучения лежит в основе количественного активационного анализа.

Наконец, можно измерить радиоактивность образца, в который предварительно добавлено определенное количество радиоактивного вещества. Важнейшим из методов этой группы является метод *изотопного разбавления*, применяемый главным образом при определении следовых содержаний.

Методы, основанные на измерении радиоактивности одного определенного компонента, называются *радиохимическими*. Для их реализации достаточно детектора радиоактивности. Более сложное оборудование, например, γ -спектрометры – применяют в *радиоспектроскопических* методах.

Ядерно-физические методы анализа основаны на протекании *ядерных реакций* с участием определенных изотопов того или иного элемента. Любой радиоактивный изотоп (*радионуклид*) претерпевает процесс распада, завершающийся образованием некоторого стабильного изотопа. Этот распад сопровождается испусканием электромагнитного излучения (рентгеновских или γ -лучей) или потоков заряженных частиц (α -, β -частицы). β -частицы представляют собой электроны или позитроны. Испускание как фотонов, так и заряженных частиц может быть положено в основу методов химического анализа.

Основные механизмы взаимодействия γ -излучения с веществом окружающей среды сводятся к следующему. *Низкоэнергетические* γ -кванты отдают свою энергию в результате фотоэффекта. Для γ -квантов *средних энергий* (а также и для рентгеновского излучения, возникающего в ходе рентгенофлуоресцентного анализа) характерен эффект *комптоновского рассеяния*, при котором энергия кванта передается среде лишь частично. При этом образуется новый фотон с меньшей энергией, который может вызвать фотоэффект или еще один акт комптоновского рассеяния. Наконец, наиболее *высокоэнергетические* ($> 1,02$ МэВ) γ -кванты обычно порождают пару электрон–позитрон.

В ходе ядерных реакций (при так называемой *внутренней конверсии* возбужденного ядра) может возникнуть и *рентгеновское излучение*. В этом случае первоначально избыток ядерной энергии затрачивается на выбивание в окружающее пространство одного из внутренних электронов атома (аналогично оже-эффекту). Возникшая вакансия (на *K*- или *L*-уровне) заполняется электроном с более высокого уровня, в результате чего и возникает рентгеновское излучение.

Процесс радиоактивного распада описывается кинетическим уравнением:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N, \quad (2.46)$$

где λ – постоянная радиоактивного распада; N – число ядер радионуклида.

Произведение $A = \lambda N$ называется *активностью*. В интегральной форме процесс радиоактивного распада можно описать следующим образом:

$$N = N_0 e^{-\lambda t}. \quad (2.47)$$

Важной характеристикой скорости распада является время, в течение которого распадается половина ядер. Оно называется *периодом полураспада* и может быть выражено как

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} = \frac{0,693}{\lambda}. \quad (2.48)$$

Для различных радионуклидов период полураспада может составлять от малых долей секунды до многих миллионов лет.

Единицей активности A является беккерель (Бк), равный одному распаду ядра за одну секунду. Таким образом, $1 \text{ Бк} = 1 \text{ с}^{-1}$. Традиционно в качестве единицы активности используется и кюри (Ки): $1 \text{ Ки} = 3,70 \cdot 10^{10} \text{ Бк}$. 1 Ки в точности равен активности 1 г чистого радия-226.

На практике в ходе химического анализа обычно измеряют не абсолютные значения активностей, а так называемую *скорость счета* R . Она отличается от активности на величину коэффициента эффективности детектора b :

$$R = bA = b\lambda N. \quad (2.49)$$

Измерение интенсивности радиоактивного излучения. Для измерения радиоактивности используют детекторы, аналогичные для измерения интенсивности рентгеновского излучения: газоионизационные, сцинтилляционные и полупроводниковые.

При взаимодействии с частицами, образующимися в результате радиоактивного распада, детекторы всех типов генерируют импульсы напряжения, которые анализируют *анализаторами высоты импульсов*. Интегральные анализаторы регистрируют все импульсы с величиной, превышающей заданное пороговое значение. Изменяя высоту порога, получают картину распределения импульсов по энергиям. Такое же распределение получают с помощью дифференциальных анализаторов. Они работают по *многоканальному* принципу: каждый канал (их общее число составляет от 128 до 4096) настроен на узкий диапазон величин импульсов.

Для определения содержания ряда элементов можно использовать радиоактивные свойства их природных радионуклидов.

Нейтронно-активационный анализ. Для активации образца чаще всего используют поток нейтронов. Основным источником нейтронов служит ядерный реактор, радионуклиды и ускорители заряженных частиц.

Период полураспада нейтрона составляет около 12,5 мин. Продуктами распада нейтрона являются протон и электрон. Отсутствие у нейтрона электрического заряда облегчает его проникновение в положительно заряженное атомное ядро. В результате *захвата нейтрона* масса ядра возрастает на единицу, а заряд остается без изменений.

Ввиду того, что нейтрон несет с собой большую энергию, образующееся ядро первоначально находится в возбужденном состоянии.

Степень активации образца зависит от *плотности потока* нейтронов Φ , *сечения захвата* a и *коэффициента насыщения* S . Тогда скорость счета облученного образца составляет

$$R = N\Phi\sigma bS. \quad (2.50)$$

Анализируемую пробу облучают до тех пор, пока не наступит насыщение. Одновременно в тех же условиях облучают и образец сравнения, используемый как внешний стандарт. При одинаковых условиях облучения отношение активностей пробы (индекс x) и образца сравнения (индекс $ст$) определяется только числом активированных ядер N . Поэтому масса определяемого элемента в анализируемой пробе равна

$$m_x = \frac{R_x}{R_{ст}} m_{ст}. \quad (2.51)$$

Пробоподготовка перед облучением может сводиться лишь к запечатыванию пробы и образца сравнения в ампулы – из тефлона, полиэтилена или кварца. После облучения может потребоваться *разделение* компонентов – с помощью экстракции, осаждения или хроматографии.

Недостатками активационных методов анализа являются необходимость использования дорогостоящего оборудования и работы с радиоактивными материалами. При работе с долгоживущими радионуклидами дополнительным недостатком является большая длительность регистрации сигнала из-за малых скоростей счета.

В методе изотопного разбавления к пробе добавляют известное количество изотопно меченого определяемого вещества. Затем определяемый компонент выделяют в чистом виде с помощью экстракции или осаждения и измеряют активность определенной части выделенного препарата.

При использовании метода изотопного разбавления во многих случаях полного отделения определяемого компонента не требуется. Этим методом можно определять свыше 30 элементов, а также органические

и биоорганические вещества в малых концентрациях – инсулин, пенициллин, витамин В₁₂ (в последнем случае удобно использовать изотопную метку ⁶⁰Со). Важнейшее достоинство метода изотопного разбавления – возможность определения отдельных химических форм элемента.

Литература

Основная

1. Основы аналитической химии. В 2 книгах. Книга 1. Общие вопросы. Методы разделения. – Москва : Высшая школа, 1999. – Кн. 1. – 351 с. Книга 2 : Методы химического анализа. – 494 с.
2. Цитович И.К. Курс аналитической химии : учебник / И.К. Цитович. – Санкт-Петербург : Лань, 2004. – 495 с.
3. Васильев В.П. Аналитическая химия. Книга 2. Физико-химические методы анализа / В.П. Васильев. – Москва : ДРОФА, 2002. – 383 с.
4. Основы аналитической химии: практическое руководство / под ред. Ю.А. Золотова. – Москва : Высшая школа, 2001. – 463 с.
5. Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов. В 4 книгах / Я.И. Коренман. – Москва : Колос, 2005. – 239 с.
6. Аналитическая химия. Методы идентификации и определения веществ. Том 1 / под ред. Л.Н. Москвина. – Санкт-Петербург : Академия, 2008. – 576 с.
7. Марченко З. Методы спектрофотометрии в УФ и видимой областях в неорганическом анализе / З. Марченко, М. Бальцежак. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 712 с.
8. Кристиан Г. Аналитическая химия. Том 2 / Г. Кристиан. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 504 с.
9. Отто М. Современные методы аналитической химии / М. Отто. – Москва : Техносфера, 2008.

Дополнительная

1. Бокова Т.И. Основы аналитической химии / Т.И. Бокова ; НГАУ. – Новосибирск, 2005. – 108 с.
2. Пискарева С.К. Аналитическая химия / С.К. Пискарева, К.М. Барашков. – Москва : Высшая школа, 1994.
3. Русин Г.Г. Физико-химические методы в агрохимии / Г.Г. Русин. – Москва : Агропромиздат, 1990.
4. Сакодынский К.И. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский, В.В. Бражников. – Москва : Химия, 1993.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите формы электромагнитного излучения; какие методы анализа с ними связаны?
2. Сформулируйте основной закон светопоглощения.
3. При каких условиях наблюдается полное отражение?
4. Какое явление лежит в основе метода комбинационного рассеяния?
5. Назовите типы рассеяния. Укажите их признаки.
6. Что характеризует разрешающая способность?
7. Почему в методе атомно-абсорбционной спектроскопии не применяют источники непрерывного спектра?
8. Почему нужно подавлять ионизацию атомов при атомно-спектроскопических определениях?
9. Какова функция монохроматора в атомно-абсорбционных приборах?
10. Для чего нужна модуляция светового потока в ААС?
11. От каких факторов зависит ширина атомных спектральных линий?
12. На чем основан метод атомно-эмиссионной спектроскопии?
13. В каких методах анализа применяют рентгеновское излучение?
14. В чем заключаются особенности взаимодействия рентгеновского излучения с веществом? Назовите механизмы электронного возбуждения в рентгеновской спектроскопии.
15. На каком явлении основан метод фотоэлектронной спектроскопии?
16. Какие величины служат мерой светопоглощения в УФ-видимой спектроскопии?
17. Назовите основные причины отклонения от закона Ламберта–Бера.
18. Перечислите основные особенности анализа вещества по ИК-спектрам.
19. Для решения каких вопросов перспективен метод ЯМР?
20. Какие существуют способы ионизации атомов и молекул в методе масс-спектрометрии?
21. На чем основано разделение ионов в масс-спектрометре?
22. Назовите основные достоинства и недостатки методов ААС и АЭС.

Глава 3

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Электрохимические методы анализа – совокупность методов качественного и количественного анализа, основанных на электрохимических явлениях, происходящих в исследуемой среде или на границе раздела фаз. При этом осуществляются ионообменные или электронообменные процессы непосредственно на поверхности электрода либо в приэлектродном пространстве. Аналитическим сигналом служит любой электрический параметр (потенциал, сила тока, сопротивление и др.), функционально связанный с составом и концентрацией раствора.

Методы электроанализа делятся на четыре основных группы: *потенциометрию, вольтамперометрию, кулонометрию и кондуктометрию.*

Потенциометрия объединяет методы, основанные на измерении ЭДС обратимых электрохимических цепей, когда потенциал рабочего электрода близок к равновесному значению. Потенциометрия включает ионометрию и потенциометрическое титрование.

Вольтамперометрия основана на исследовании зависимости тока поляризации от напряжения, прикладываемого к электрохимической ячейке, когда потенциал рабочего электрода значительно отличается от равновесного значения.

Кулонометрия объединяет методы анализа, основанные на измерении количества электричества или массы вещества, выделяющегося на электроде в процессе электрохимической реакции в соответствии с законами Фарадея. Различают потенциостатическую и гальваностатическую кулонометрию.

К кондуктометрии относятся методы, в которых измеряют электропроводность электролитов.

Электрохимические методы анализа играют важную роль в современной аналитической химии, поскольку характеризуются высокой чувствительностью, низкими пределами обнаружения, широким интервалом определяемых содержаний, простотой и невысокой стоимостью аппаратуры.

Наиболее широко на практике применяются различные варианты *вольтамперометрии*, а также *ионометрии*: от определения следов токсичных металлов в водах, атмосферных осадках, других объектах окружающей среды до идентификации и количественного определения сложных органических веществ в биологических жидкостях и медицинских препаратах.

3.1. Потенциометрия с ион-селективными электродами (Ионометрия)

Потенциометрический метод основан на измерении ЭДС электрохимической ячейки, состоящей из индикаторного электрода и электрода сравнения, погруженных в один или два разных раствора, соединенных жидкостным проводящим контактом. Для прямых или косвенных потенциометрических определений концентраций ионов необходимо измерять равновесные потенциалы, для чего могут использоваться любые серийные приборы с компенсационными схемами, высокоомные потенциометры или рН-метры-милливольтметры.

3.1.1. Индикаторные электроды

Существуют различные типы индикаторных электродов по способу возникновения ЭДС на границе раздела электрод/раствор.

1. Электроды, на межфазных границах которых протекают электрообменные процессы:



Функционирование таких электродов основано на зависимости равновесного потенциала от состава и концентрации исследуемого раствора, описываемой уравнением Нернста:

$$E = E^\circ + RT/zF \cdot \ln(a_{ox} / a_{red}), \quad (3.1)$$

где E – равновесный потенциал, В; E° – стандартный или нормальный электродный потенциал, В; $E = E^\circ$ при стандартных условиях, т. е. стандартный потенциал равен равновесному, если активности всех участвующих в электрохимической реакции компонентов $a = 1$ моль/л; R – универсальная газовая постоянная, $R = 8,314$ Дж/К.моль; F – число Фарадея, $F = 96500$ Кл/моль; T – температура (°К); z – число электронов, участвующих в полуреакции; a_{ox} , a_{red} – активности иона в окисленной и восстановленной форме, моль/л.

В основном это активные металлические электроды I рода (серебряный, медный, кадмиевый и др.) и инертные электроды (платиновый, золотой).

2. Электроды, на межфазных границах которых протекают ионообменные процессы – ионоселективные электроды (ИСЭ).

Потенциал системы, состоящей из внешнего электрода сравнения и ИСЭ описывается модифицированным уравнением Нернста (уравнение Никольского–Эйзенмана).

Рассмотрим индикаторные ион-селективные электроды (ИСЭ), работа которых основана на переносе заряженных частиц через мембрану. Мембрана – это система, селективно пропускающая через границу раздела одни ионы по принципу размера или специфического химического взаимодействия. Существуют жидкие (на основе органических растворителей), монокристаллические (LaF_3) и поликристаллические (на основе малорастворимых солей серебра и др.) мембраны.

Измеряемая ЭДС представляет собой сумму нескольких скачков потенциала на границе фаз:

$$E = E_x + E_1 + E_2 + E_3 + E_{\text{д}}, \quad (3.2)$$

где E – потенциалы, В; E_x – на границе раствор – мембрана; E_1 – на границе мембрана – внутренний раствор; E_2 – внутреннего электрода сравнения; E_3 – внешнего электрода сравнения; $E_{\text{д}}$ – сумма диффузионных потенциалов на границе растворов различного состава и концентраций.

При измерении ЭДС все ее компоненты, кроме E_x , должны поддерживаться постоянными. E_x зависит от активности (концентрации) определяемого иона по уравнению Нернста:

$$E_x = E^\circ + RT/zF \cdot \ln(a_x / a_m), \quad (3.3)$$

a_x , a_m – активности определяемого иона в растворе и в мембране соответственно (a_m – при измерениях – постоянна).

При подстановке постоянных и $T = 298$ °К уравнение имеет вид:

$$E_x = E^\circ + 0,059/z \cdot \lg(a_x / a_m). \quad (3.4)$$

Практический интерес представляет не активность, а концентрация (С) определяемого иона, которые связаны соотношением:

$$a = C \cdot f, \quad (3.5)$$

где f – коэффициент активности, зависящий от ионной силы раствора.

При измерениях ионную силу раствора и f стремятся поддерживать постоянными. Для ИСЭ в растворах, содержащих мешающие ионы, применяют модифицированное уравнение Нернста (уравнение Никольского):

$$E_x = \text{const} + 0,059/z_x \cdot \lg(a_x + K_{x/y} \cdot a^{z_x/z_y} + \dots), \quad (3.6)$$

где z_x , z_y – заряды определяемого и мешающего ионов; $K_{x/y}$ – коэффициент селективности ИСЭ по отношению к постороннему (мешающему) иону (у) с активностью a_y . Чем меньше K , тем меньше влияние постороннего иона. Если $K \geq 1$, то фактически измеряется активность мешающего иона.

3.1.2. Электроды сравнения

Как правило, это электроды второго рода, например хлоридсеребряный (ХСЭ) типа ЭВЛ-1МЗ в насыщенном растворе KCl. ХСЭ представляет собой серебряную проволочку, покрытую слоем нерастворимого хлорида серебра, опущенную в раствор хлористого калия постоянной концентрации (например, 1 М или насыщенный – 3 М). В соответствии с уравнением Нернста потенциал ХСЭ определяется активностью ионов хлорида и во время измерений остается постоянным.

Ионселективные электроды.

Ионоселективные электроды (ИСЭ), чувствительные к катионам и анионам, представляют собой электрохимические системы, в которых потенциал определяется процессами распределения ионов между мембраной и раствором.

В соответствии с природой активного материала мембраны различают: *первичные ИСЭ* – а) электроды с жесткой матрицей – стеклянные; б) электроды с твердой мембраной; *ИСЭ с подвижными носителями* – электроды с жидкими мембранами на основе ионообменников и нейтральных переносчиков; *сенситивизированные* (активированные) – газочувствительные, ферментные электроды. При этом классические электроды с внутренним раствором и электродом сравнения являются электродами первого поколения, а электроды с твердым токоотводом (твердотельные) – электродами второго поколения.

Ионоселективные электроды позволяют измерять концентрации ионов до 10^{-6} М в растворе. При этом необходимый для определения объем раствора может составлять всего 0,05–0,1 мл. Устройство и аналитические характеристики некоторых ИСЭ будут рассмотрены ниже.

Наряду с хорошо известными электродами, селективными к широкому кругу катионов и анионов, в настоящее время разработаны и активно используются ИСЭ для определения тетрациклина, сульфаметоксазола, бромгексина, псевдоэфедрина, диклофенака и др.

Рассмотрим некоторые ион-селективные электроды, нашедшие широкое применение.

Хлорид-селективный электрод (Cl-СЭ) представляет собой твердотельный электрод, предназначенный для измерения активности или концентрации хлорид-ионов в водных растворах и в некоторых органических растворителях. Его применяют в паре с соответствующим электродом сравнения для измерения ЭДС. Электродноактивным материалом является смесь хлорида и сульфида серебра, помещенная в пластмассовый корпус. При контакте мембраны с анализируемым рас-

твором на границе раздела фаз мембрана – раствор, содержащей хлорид-ионы, возникает разность потенциалов, величина которой зависит от концентрации хлорид-ионов.

C1-CЭ не следует применять в растворах, содержащих анионы, образующие с ионами серебра малорастворимые соли (например, сульфид и цианид). Для устранения их мешающего влияния в раствор вводят ионы никеля, образующие с ними прочные соединения. Мешают ионы ртути и серебра. Исследуемый раствор не должен содержать также сильных восстановителей, так как в этом случае на поверхности мембраны образуется слой металлического серебра, мешающего определению хлорид – иона. Такие окислители, как Cu (2+), Fe (3+), MnO_4^- , определению хлорида в малых концентрациях не мешают. Определению не мешают также анионы: нитраты, сульфаты, фосфаты, карбонаты. Недопустимо присутствие иодидов. Бромиды мешают при 100-кратном избытке. C1-CЭ имеет следующие рабочие характеристики: область определяемых концентраций 10^{-1} – 10^{-7} М, рН 2–12, температура от 0 до 100 °С.

Нитрат-селективный электрод (NO_3 -CЭ) – это электрод с жидкой мембраной, в состав которой входит жидкий ионообменник, селективный к нитрат-ионам. При контакте мембраны с раствором, содержащим нитрат-ионы, на границе раздела фаз мембрана – раствор возникает разность потенциалов, величина которой зависит от концентрации нитрат-ионов в растворе. Рабочая область концентраций $7 \cdot 10^{-6}$ – 1 М. Анализируемые растворы не должны содержать органических соединений, способных загрязнять или растворять активную фазу мембраны, мешают также анионы бромидов, иодидов и сульфидов.

Стеклянный электрод представляет собой небольшой сосуд из изолирующего стекла, к нижней части которого припаян шарик из стекла специального состава, обладающего заметной электропроводностью. Химический состав стеклянного шарика – оксиды натрия, лития, алюминия, кремния и др. Стенки стекла являются мембраной, на поверхности которой устанавливается равновесие $H^+_{р-р} \leftrightarrow H^+_{ст}$, приводящее к возникновению скачков потенциала. Измеряется ЭДС в цепи:

$$E_{инд} - E_{хсэ},$$

где $E_{хсэ}$ – потенциал хлорид-серебряного электрода сравнения в измеряемом растворе.

$E_{инд}$ представляет сумму скачков потенциала:

$$E_{инд} = (E_{ст1} + E_{ст2} + E_{хсэ1}), \quad (3.7)$$

где $E_{ст1}$ – потенциал на границе стекло – внешний раствор; $E_{ст2}$ – потенциал на границе стекло – внутренний раствор; $E_{хсэ1}$ – потенциал электрода сравнения внутри стеклянного шарика.

Все слагаемые, кроме первого, являются постоянными, поэтому измеряемая ЭДС зависит по уравнению Нернста от концентрации ионов водорода в растворе:

$$E = \text{const} + 0,059 \lg a_{H^+} = \text{const} + 0,059 \lg [H^+] = \text{const} - 0,059 \text{pH} . \quad (3.8)$$

Стеклянный электрод широко используется для измерения рН растворов. Так, значение рН раствора лекарственного препарата дает важную информацию о степени его чистоты. По этому значению можно судить о наличии примесей кислых или щелочных продуктов.

3.1.3. Способы определения концентрации ионов с ИСЭ

Различают прямое потенциометрическое определение и косвенное – по реакции с титрантом, т. е. потенциометрическое титрование с ИСЭ. В первом случае измеряют ЭДС ИСЭ и электрода сравнения, погруженных в раствор определяемых ионов в условиях, когда выполняется соотношение (2) и известна связь между E_x и α_x . Во втором случае ИСЭ является индикаторным электродом при потенциометрическом титровании определяемого иона реагентом известной концентрации до точки эквивалентности. Концентрация определяется по закону эквивалентов.

Метод градуировочного графика. Измеряют ЭДС серии стандартных растворов, содержащих определяемый ион (5–6 растворов). Строят градуировочный график в координатах $E_x - \lg C_x$ при постоянстве ионной силы и находят угловой коэффициент его линейного участка (крутизну электродной функции S), либо рассчитывают уравнение регрессии $E_x = \text{const} + S \cdot \lg C_x$ и находят S . Для анализа анионов ($z < 0$) в уравнении знак плюс изменяется на минус.

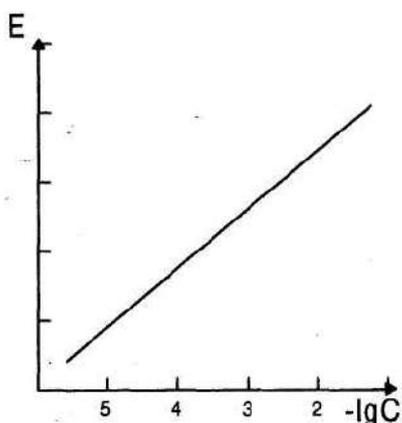


Рис. 3.1. Вид градуировочного графика для определения катионов

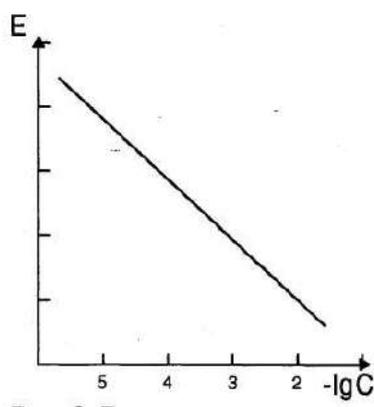


Рис. 3.2. Вид градуировочного графика для определения анионов

Определение концентрации или активности вещества проводят графически, находя непосредственно из графика значение, соответствующее величине ЭДС в исследуемом растворе, или расчетным путем.

Метод стандартных добавок. Концентрацию определяемого иона устанавливают, измеряя ЭДС до и после добавления к анализируемому раствору точно измеренных объемов стандартного раствора этого иона. Повышение чувствительности и точности метода может быть достигнуто поддержанием температуры и ионной силы анализируемого раствора путем термостатирования и использования буферных систем (влияние мешающих примесей, маскирующий эффект). Расчет ведут по формуле:

$$C_x = C_d \cdot (10^{-\Delta E/S} - 1)^{-1}, \quad (3.9)$$

где C_d – концентрация добавки, $C_d = C_{ст} \cdot V_{ст} / V$; ΔE – изменение потенциала после добавки стандартного раствора; S – крутизна градуировочного графика; V – объем раствора в ячейке.

Если объем добавки составляет более 1 % от анализируемого объема, то учитывают разбавление раствора и расчет проводят по формуле:

$$C_x = C_d \cdot [10^{-\Delta E/S} - (V + V_{ст}/V)]^{-1}, \quad (3.10)$$

где $C_d = C_{ст} \cdot V_{ст} / (V + V_{ст})$.

В качестве примера можно привести способы ионометрического определения калия, натрия, галогенидов и кальцийсодержащих лекарственных веществ в таблетках и в солевых кровезамещающих жидкостях.

3.1.4. Потенциометрическое титрование

Наряду с прямой потенциметрией важную роль в химическом анализе играет *потенциометрическое титрование*. Эта роль обусловлена двумя основными причинами:

- не для всех определяемых ионов существуют подходящие ион-селективные электроды;
- точность прямого потенциометрического анализа недостаточно велика, поскольку определяемой величиной служит логарифм концентрации, а не сама концентрация.

Потенциометрическое титрование основано на фиксировании точки эквивалентности по изменению потенциала индикаторного электрода при проведении химической реакции между определяемым веществом и титрантом. Используемый для индикации электрод должен быть чувствителен либо к определяемому иону, либо к иону-титранту, либо к продукту реакции.

В ходе титрования регистрируют ЭДС ячейки после каждого введения порции титранта. Вблизи точки эквивалентности концентрация потенциа-

лопределяющего иона изменяется на несколько порядков. Это приводит к появлению на кривой титрования значительного скачка потенциала, положение которого позволяет с высокой точностью определить эквивалентный объем титранта. Для определения конечной точки потенциометрического титрования можно использовать различные способы.

Во всех случаях по кривой титрования определяют объем титранта, соответствующий точке эквивалентности, и рассчитывают содержание определяемого вещества:

$$m(\text{о. в.}) = \frac{(C_{\text{н}} \cdot V_{\text{т.э}})_{\text{р.р.}} \cdot M_{\text{э}}(\text{о. в.})}{1000}, \text{ г.}$$

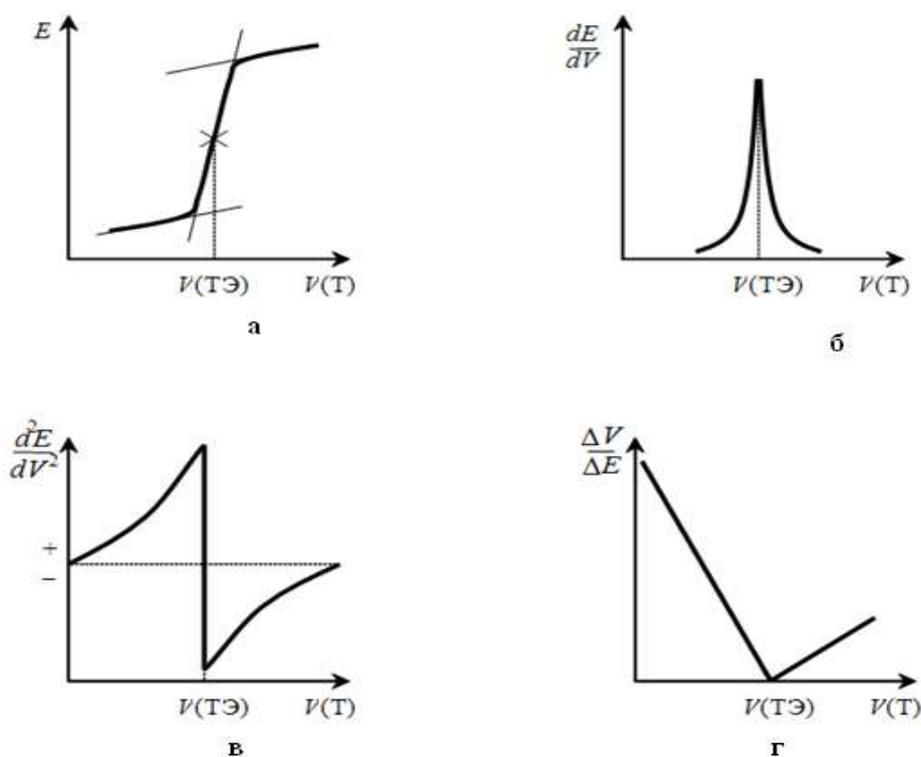


Рис. 3.3. Кривые потенциометрического титрования.
 а) интегральная кривая; б) дифференциальная кривая;
 в) кривая титрования по второй производной; г) кривая Грана

При потенциометрическом титровании используют реакции нейтрализации, окисления-восстановления, комплексообразования. При потенциометрическом титровании применяются любые типы электродов. В практике окислительно-восстановительного титрования наибольшее распространение нашел платиновый электрод. Метод потенциометрического титрования имеет ряд преимуществ перед прямой потенциометрией и титрованием с визуальными индикаторами:

- отсутствие искажения результатов за счет диффузионного потенциала;

- отсутствие необходимости знать коэффициент активности определяемого иона;
- исключение субъективных ошибок за счет инструментального фиксирования конечной точки;
- возможность анализа мутных и окрашенных растворов; сравнительно легкая автоматизация;
- возможность дифференцированного титрования компонентов смеси, в том числе с использованием неводных растворителей. Результаты определений методом потенциометрического титрования более точны, чем при использовании прямой потенциометрии, так как вблизи точки эквивалентности небольшому изменению концентрации соответствует большое изменение потенциала индикаторного электрода.

К недостаткам потенциометрического титрования можно отнести не всегда быстрое установление потенциала после добавления титранта.

3.2. Амперометрия

Метод основан на измерении предельного диффузионного тока, проходящего через раствор при фиксированном напряжении между индикаторным электродом и электродом сравнения. По принципу амперометрии (как и вольтамперометрии) работают миниатюрные электрохимические ячейки, служащие датчиками на выходе колонок жидкостных хроматографов. Гальваностатические методы аналогичны амперометрическим, но в них измеряется потенциал при прохождении через ячейку тока определенной величины. Так, в хронопотенциометрии контролируется изменение потенциала во времени. Эти методы применяются главным образом для изучения кинетики электродных реакций.

3.2.1. Амперометрическое титрование

Амперометрическое титрование представляет собой электрометрический метод анализа, основанный на измерении величин предельного диффузионного тока, наблюдаемого на отдельном электроде в процессе титрования.

Момент эквивалентности устанавливается на основании резкого изменения величины предельного диффузионного тока.

Величина предельного диффузионного тока прямо пропорциональна концентрации деполяризатора находящегося в растворе и участвующего в электрохимическом процессе. Эта зависимость выражена уравнением Ильковича:

$$i_d = \chi C_0, \quad \chi = 605zD^{1/2}m^{2/3}\varepsilon^{1/6}, \quad (3.11)$$

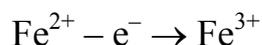
где i_d – предельный ток (мкА); χ – константа уравнения Ильковича; C_0 – концентрация деполяризатора в растворе (моль/л); D – коэффициент диффузии деполяризатора ($\text{см}^2/\text{с}$); z – число электронов, принимающих участие в электродной реакции; m – скорость вытекания ртути из капилляра ($\text{мг}/\text{с}$); ε – время жизни ртутной капли (с).

Такая зависимость будет соблюдаться, если электролиз проводится в присутствии избытка постороннего сильного электролита (фона).

Значение потенциала поляризуемого (индикаторного) электрода задается экспериментатором и должно соответствовать предельному диффузионному току восстановления или окисления одного из следующих веществ: определяемого вещества, реагента (титранта), продукта взаимодействия определяемого вещества с титрантом, или же специально введенного до титрования «полярографического индикатора».

В зависимости от того, какое из перечисленных веществ окисляется или восстанавливается на электроде при выбранном значении потенциала, кривые титрования могут быть различного типа.

1. Электрохимически активно только определяемое вещество, т. е. только оно восстанавливается или окисляется на электроде. Пример: титрования солей Fe^{2+} окислителями при потенциале вращающегося платинового электрода $+0,8$ В (нас. к. э.). В этом случае на электроде протекает реакция окисления:



и, следовательно, величина предельного тока будет зависеть от концентрации в растворе соли Fe^{2+} .

2. Электрохимически активен только титрант (реагент), т. е. он окисляется или восстанавливается на электроде: например, титрование солей Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} ферроцианидом при значении потенциала платинового вращающегося электрода, равном $+0,8$ В (нас. к. э.). В этом случае на электроде протекает реакция окисления ферроцианид-ионов, предельный ток пропорционален концентрации ферроцианида в растворе.

3. Восстанавливаются или окисляются на электроде два вещества – определяемое соединение и титрант. Например, титрование солей Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ортооксихинолином при значении потенциала ртутного каплющего электрода равном $-1,6$ В (нас. к. э.). В этом случае на электроде до момента эквивалентности восстанавливаются ионы Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , а ортооксихинолин – после момента эквивалентности. Таким образом, в этом случае величина предельного тока будет прямо пропорциональна концентрации определяемых ионов Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} в растворе – до точки эк-

вивалентности – и концентрации в растворе ортооксихинолина – после точки эквивалентности.

4. Электрохимически активны как определяемое вещество, так и титрант, причем одно восстанавливается на электроде, другое – окисляется. Например, титрование соли Fe^{3+} раствором TiCl_3 при значении потенциала ртутного электрода, равном $-0,25$ В (нас. к. э.). Точка эквивалентности обнаруживается вследствие различия угла наклона прямых $i_d - V$, мл реагента, описывающих изменение тока до и после момента эквивалентности; это связано с различным числом электронов, принимающих участие в электродных реакциях определяемого вещества и титранта, а также с различием в коэффициентах диффузии этих веществ. В приведенном примере до момента эквивалентности на электроде восстанавливаются ионы Fe^{3+} , величина предельного тока пропорциональна концентрации соли Fe^{3+} в растворе. После момента эквивалентности на электроде протекает процесс окисления соли титана (III), величина предельного тока пропорциональна концентрации последней в растворе.

5. Электрохимически активен только продукт химической реакции, т. е. на электроде протекает восстановление или окисление образующегося в результате химической реакции соединения. Пример: титрование соединений пятивалентного мышьяка иодидами в кислой среде: в результате химической реакции образуется иод, который восстанавливается на вращающемся платиновом электроде. Предельный ток в этом случае прямо пропорционален концентрации иода, образующегося в растворе.

6. Реагирующие вещества и продукты реакции электрохимически неактивны. Тогда специально в раствор вводится электрохимически активное вещество – «полярографический индикатор». Пример: титрование с «полярографическим индикатором» – солью Fe^{3+} , вводимым перед титрованием соединений алюминия, магния или циркония, раствором фторида; электрод – вращающийся платиновый, значение потенциала равно $0,0$ В (нас. к. э.) и отвечает предельному току восстановления активированных ионов Fe^{3+} . В этом случае до точки эквивалентности происходит взаимодействие ионов фтора с определяемым веществом с образованием прочных соединений; только после точки эквивалентности ионы фтора смогут взаимодействовать с Fe^{3+} (полярографическим индикатором), поскольку образующийся фторидный комплекс менее устойчив. В результате падения концентрации ионов Fe^{3+} после точки эквивалентности величина предельного тока начинает убывать.

Последний вид титрования основан на использовании различной прочности соединений: определяемое вещество – титрант, «полярографический индикатор» – титрант образующихся в процессе титрования.

Можно использовать Fe(II) в качестве «полярографического индикатора» при амперометрических титрованиях с ЭДТА. При потенциале +0,4 В на платиновом электроде окисляется не Fe(II), а хелат железа (II) с ЭДТА, и, т. о., после достижения точки эквивалентности предельный ток растет. Резкий подъем тока наблюдается при рН 4 для большинства ионов металлов, образующих с ЭДТА хелаты, константы устойчивости которых больше, чем 10^{18} .

7. В отдельных редких случаях можно проводить титрование, когда на поляризуемом (индикаторном) электроде сначала происходит восстановление (или окисление) определяемого вещества, а после момента эквивалентности – титранта. При этом излом на кривой титрования в точке эквивалентности вызван различием в величинах коэффициентов диффузии этих веществ, а также в числе электронов. Примером такого вида титрования может служить определение ванадия (IV) раствором Ce(IV). До точки эквивалентности V(IV), взаимодействуя с раствором Ce(IV), переходит в V(V), который, являясь электрохимически активным, восстанавливается на электроде. После момента эквивалентности на электроде протекает восстановление ионов Ce(IV).

С помощью амперометрического титрования можно:

- 1) определить концентрацию изучаемого соединения в растворе;
- 2) установить стехиометрические соотношения, при которых образуются соединения в результате химического взаимодействия между определяемым веществом и титрантом;
- 3) определить величину произведения растворимости осадка, образующегося в процессе титрования.

В амперометрических титрованиях могут быть использованы реакции комплексообразования, окисления-восстановления и осаждения.

3.2.2. Титрование с использованием реакций комплексообразования

Амперометрические определения, основанные на реакциях комплексообразования, можно проводить либо по току восстановления (реже – окисления) иона комплексообразователя, либо по анодному току комплексона.

В момент эквивалентности величина остаточного тока зависит от прочности образовавшегося комплексного соединения, т. е. от константы устойчивости комплекса; поэтому амперометрическое титрование может быть использовано для определения последних. К числу реагентов, часто применяемых в этом случае, следует отнести комплексоны (преимущественно – трилон Б), фтористые соли.

Трилон Б (комплексон III) – двузамещенная натриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты – дает весьма прочные комплексы со многими катионами.

Устойчивость комплексов металлов с трилоном при различных pH различна, поэтому титрование этим реагентом проводят при определенной кислотности среды. Цирконий (IV), висмут (III), железо (III) и др. высокочargedные ионы с трилоном Б образуют прочные комплексы и могут титроваться в кислой среде. Цинк, никель, свинец и другие двузарядные ионы образуют менее прочные комплексы и титруются при pH 7.

Трилон Б не восстанавливается на ртутном капаящем электроде, не способен давать анодную волну на платиновом вращающемся электроде. Титрование трилоном Б можно проводить либо на ртутном капаящем электроде по току восстановления иона металла, либо на платиновом вращающемся электроде по току окисления трилона Б. В некоторых случаях титрование трилоном Б можно проводить с использованием индикаторного метода амперометрического титрования.

Амперометрический метод может быть использован для установления состава комплексных соединений.

3.2.3. Титрование с использованием реакций окисления-восстановления

При проведении титрований на основе реакций окисления-восстановления следует различать два процесса: окислительно-восстановительную реакцию, протекающую в растворе, и электрохимическую реакцию, которая происходит на поверхности электрода.

В электродную реакцию могут вступать не только исходные вещества, но и продукты их реакции, поэтому типы кривых титрования с использованием реакций окисления-восстановления весьма разнообразны.

Амперометрический метод позволяет проводить дифференцированное последовательное определение компонентов смеси двух восстановителей в случае, если имеет место значительное различие в величинах окислительно-восстановительных потенциалов.

Применяется в качестве окислителей бихромат калия, соли церия (IV), ванадия (V), галоиды и их кислородные соединения, хлорамин и др. Титрование проводится по току восстановления.

В качестве восстановителей используются: соединения двухвалентных железа и хрома, тиосульфат натрия, аскорбиновая кислота и др. В этих случаях титрование проводят по току их окисления или восстановления определяемого вещества.

3.2.4. Титрование с образованием малорастворимых соединений

При проведении амперометрических определений с использованием реакций осаждения, в зависимости от поведения реагирующих веществ на индикаторном электроде и от выбранного потенциала получают кривые титрования.

Преимуществом амперометрического метода является то, что для построения кривой титрования достаточно снять несколько значений вдали от точки эквивалентности, т. е. когда в растворе имеется избыток одного из ионов осадка. Благодаря этому, метод амперометрического титрования может быть применен при определениях, основанных на осаждении сравнительно хорошо растворимых веществ, когда, например, потенциометрический метод не может дать удовлетворительных результатов.

Реакции осаждения могут быть использованы для определения большого числа катионов, анионов и нейтральных веществ. При этом применяются как неорганические, так и органические реагенты.

Для амперометрического определения многих анионов (SO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , CO_3^{2-} , F^- , CrO_4^{2-} и др.) применяют соли свинца, образующие с ними труднорастворимые соединения.

Ионы Pb^{2+} восстанавливаются на ртутном капаящем электроде ($E_{1/2} = -0,4 \text{ В}$), т. е. при потенциале значительно более положительном, чем ионы водорода, поэтому возможно проведение титрования в нейтральной и кислой средах. Титрование проводят «по току» иона Pb^{2+} (в случае SO_4^{2-} , SiO_3^{2-} , CO_3^{2-} , F^-); в случае титрования CrO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , которые способны восстанавливаться на ртутном электроде титрование до т. э. ведут по току иона Pb^+ , после т. э. – по току титранта.

Для амперометрического определения многих катионов могут быть использованы ферри – и ферроцианиды щелочных металлов. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ дает труднорастворимые соединения с некоторыми катионами Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} . Соль $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ восстанавливается на ртутном капаящем электроде, поэтому в зависимости от выбранного потенциала электрода и от природы определяемого катиона титрование ведут по току титранта либо по току определяемого вещества и титранта. $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ электрохимически неактивен на ртутном капаящем электроде, а на платиновом вращающемся дает отчетливую полярографическую волну окисления. Поэтому на ртутном капаящем электроде он может быть использован только для титрования катионов, электровосстанавливающихся на ртутном электроде: Fe^{3+} , Zn^{2+} ; на платиновом вращающемся электроде – для титрования: Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , и др. по току электроокисления $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Состав ферроцианидов тяжелых металлов зависит от

условий их образования: от природы и концентрации посторонних ионов, находящихся в растворе.

В амперометрии используется большое число органических веществ для количественного определения многих элементов. Для реакций осаждения используются реагенты, образующие с ионами металлов внутрикомплексные соли-хелаты. Применение при титровании различных органических реагентов позволяет увеличить чувствительность и избирательность метода. К органическим веществам, часто используемым в амперометрии, относятся серусодержащие соединения (тиомочевина, унитиол, тиоксин и др.).

Рассмотрим некоторые применяемые в учебном практикуме органические реактивы.

0-оксихинолин (8-оксихинолин). Восстанавливается на ртутном капающем электроде при рН 2–12. Характер полярограмм сильно зависит от рН среды. 8-оксихинолин обладает амфотерными свойствами. Фенольная группа обуславливает кислотные свойства реагента. С большим количеством катионов 8-оксихинолин образует соли, в которых атом металла замещает водород фенольного гидроксила, кроме того, координационно связывается с азотом.

Для разделения смеси катионов используют способность оксихинолятов различных металлов осаждаться при различных значениях рН. С помощью 8-оксихинолина определяют медь, кадмий, магний, цинк, висмут, алюминий и др.

Купферон – аммониевая соль нитрозофенилгидроксиламина – $C_6H_5N(NO)OH$ – способен восстанавливаться на ртутном капающем электроде и окисляться на платиновом вращающемся электроде.

Амперометрический метод нашел широкое применение для определения различных органических соединений: амины титруют тетрафенилборнатрием, фенолы и ароматические амины – окислителями ($K_2Cr_2O_7$, $Ce(SO_4)_2$), альдегиды и кетоны – динитрофенилгидразином, полисахариды – иодом и т. д.

Метод амперометрического титрования можно использовать для определения состава образующихся соединений. Если концентрация реагирующих веществ известна, то можно определить соотношение компонентов в осаждаемых соединениях. Так был установлен состав соединений урана, тория, циркония и олова с м-нитрофениларсоновой кислотой, меди с меркаптобензотиозолом, а также состав сложных ферроцианидов ряда металлов в зависимости от условий осаждения.

В качестве поляризующегося индикаторного электрода в амперометрии можно использовать различные металлы, чаще всего применяют ртутный капающий, платиновый и графитовый электроды.

Выбор материала электрода определяется в первую очередь тем, какую электродную реакцию предполагается использовать для титрования. Ртутный капающий электрод применяется в тех случаях, когда нужно восстанавливать ион какого-либо электроотрицательного металла или восстановить органические соединения. На ртути перенапряжение выделения водорода велико: последний будет выделяться при потенциале (E) около $-1,1$ В в кислых растворах, $-1,5$ В в нейтральных и $-1,9$ В в щелочных.

На платиновом электроде перенапряжение выделения водорода мало и выделение водорода протекает при $E \approx 0,0$ В в кислых растворах, $-0,4$ В в нейтральных и $-0,8$ В в сильнощелочных.

Отсюда следует, что на ртутном электроде процессу восстановления многих электроотрицательных ионов не мешает водород. На платиновом электроде восстановления этих веществ не происходит, т. к. не может быть достигнут достаточно отрицательный потенциал.

С другой стороны, на платиновом электроде могут протекать такие реакции, которые не могут быть проведены на ртути. Платина обладает высоким положительным потенциалом, она индифферентна к большинству окислителей: при использовании платины в качестве анода она практически в большинстве случаев анодно не растворяется.

Графитовый электрод находит применение для изучения процессов как окисления, так и восстановления. Чаще всего для работы применяется графит, предварительно пропитанный воском, парафином или клеем БФ-2. На пропитанном электроде наблюдается меньший остаточный ток. Это можно объяснить способностью пропитывающих веществ снижать емкостной ток.

Выбор потенциала поляризуемого (индикаторного) электрода

Титрование следует проводить при таком потенциале индикаторного электрода, который соответствовал бы области предельного тока иона или молекулы, участвующих в электродной реакции. Для определения потенциала индикаторного электрода необходимо снять полярограмму (вольтамперную кривую) соответствующего иона (молекулы) на этом электроде в той среде, в которой будет проводиться титрование. При снятии полярограмм необходимо учитывать возможность восстановления кислорода (как на ртутном, так и на платиновом электроде). Для удаления кислорода из раствора предварительно через раствор в течение 20–30 минут пропускается струя инертного газа (водород, азот, аргон, гелий). В амперометрическом титровании поляризация индикаторного электрода осуществляется относительно неполяризуемого электрода, в качестве которого используют электроды сравнения: каломель-

ные, ртутиодидный, хлор-серебряный и др., а также платиновый электрод в случае трехэлектродной ячейки.

Влияние разбавления раствора при титровании. В работах по амперометрическому титрованию часто рекомендуется вводить поправку на увеличение объема раствора в процессе титрования.

$$I_{\text{испр}} = (V_0 + V) / V,$$

где V_0 – исходный объем раствора; V – добавляемый объем.

Если применять в качестве титрующего и титруемого растворы приблизительно равной концентрации, как это делается в объемном анализе, то разбавление заметно скажется на форме кривой титрования типа а) и почти не скажется на кривой типа б). Все затруднения, связанные с влиянием разбавления устраняются, если применять для титрования растворы, концентрация которых примерно в 10–20 раз больше концентрации определяемого вещества. Тогда изменение объема практически не скажется на форме кривой титрования и не затруднит нахождения точки эквивалентности.

При амперометрическом титровании исключается опасность «перетитрования», так как конечная точка определяется графическим путем.

Преимуществами метода перед другими объемными методами анализа являются: возможность определения вещества в присутствии других, сопутствующих веществ, определения в мутных и окрашенных растворах, устранение ошибок, связанных с применением цветных индикаторов. При амперометрическом титровании (в отличие от потенциометрического) электродная реакция не обязательно должна быть обратимой. Особенность амперометрического титрования, выгодно отличающей его от полярографических определений, является то, что определяемое вещество не обязательно должно быть электрохимически активным. Достаточно, чтобы на электроде могли восстанавливаться или окисляться титрант или продукт химической реакции. Если же эти компоненты электрохимически неактивны, то в ряде случаев удастся провести титрование с так называемым «полярографическим индикатором».

Амперометрические титрования позволяют проводить определения веществ при их концентрациях 10^{-2} – 10^{-5} М.

3.3. Кондуктометрия

Метод кондуктометрии основан на измерении *электропроводности* анализируемого раствора. На рис. 3.4 схематически представлено устройство ячейки для точного измерения электропроводности растворов. Эту ячейку включают в качестве одного плеча в компенсационную электрическую схему измерения сопротивления (мостик Уитстона).

Из измеренной величины сопротивления ячейки R можно рассчитать удельную электропроводность:

$$k = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{A} = GC, \quad (3.12)$$

где $G = 1/R$ – электропроводность раствора электролита (Ом^{-1}); C – постоянная ячейки (см^{-1}).

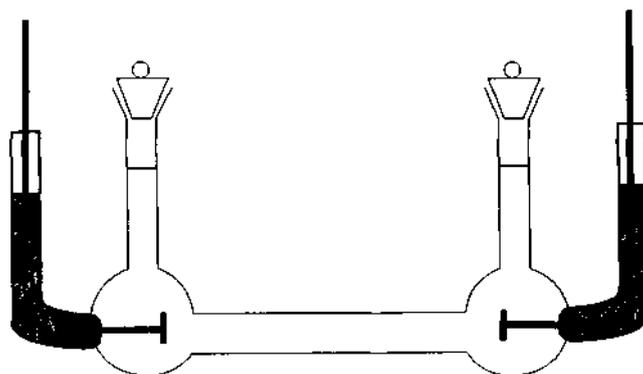


Рис. 3.4. Ячейка для измерения электропроводности.

Электроды изготавливают из платины, серебра или нержавеющей стали

Постоянную ячейки C находят экспериментальным путем с помощью градуировки. Для этого обычно используют растворы КС1 , удельная электропроводность которых при различных концентрациях известна с высокой точностью (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Удельная электропроводность растворов КС1 при 18°C

Концентрация, моль/л	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,1	1,0
$k, \text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$1,271 \cdot 10^{-4}$	$1,225 \cdot 10^{-3}$	$1,111910 \cdot 10^{-2}$	$0,8922 \cdot 10^{-1}$

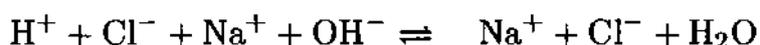
Чтобы исключить явления электролиза и поляризации электродов, к электродам прилагают переменное напряжение. Следует учитывать, что сопротивление ячейки в этом случае имеет, наряду с омической, также емкостную и индуктивную составляющую, и может скомпенсировать их.

Метод прямой кондуктометрии широко используется для контроля производственных процессов, например при производстве бумаги. Это также распространенный способ детектирования в жидкостной хроматографии. Поскольку электропроводность является универсальным свойством ионов, измерение электропроводности позволяет детек-

тировать любые ионы, выходящие из хроматографической колонки. Явление anomalно высокой электропроводности протонов используется в классической ионной хроматографии.

Измерение электропроводности газов при высоких температурах используют для детектирования в газовой хроматографии и в элементном анализе органических веществ.

При кондуктометрическом титровании (кислотно-основном, осадительном) измерение электропроводности служит для индикации конечной точки титрования. Рассмотрим сначала титрование сильной кислоты (HCl) сильным основанием (NaOH).



Кривая кондуктометрического титрования представляет собой зависимость измеренной электропроводности раствора G от степени оттитрованности τ (рис. 3.5). Сначала в ходе титрования очень подвижные ионы H^+ замещаются на менее подвижные ионы Na^+ , в результате чего электропроводность раствора уменьшается. После точки эквивалентности электропроводность начинает возрастать ввиду того, что в растворе появляются дополнительные ионы, в том числе OH^- , обладающие очень высокой подвижностью. В точке эквивалентности наблюдается очень резкое изменение электропроводности.

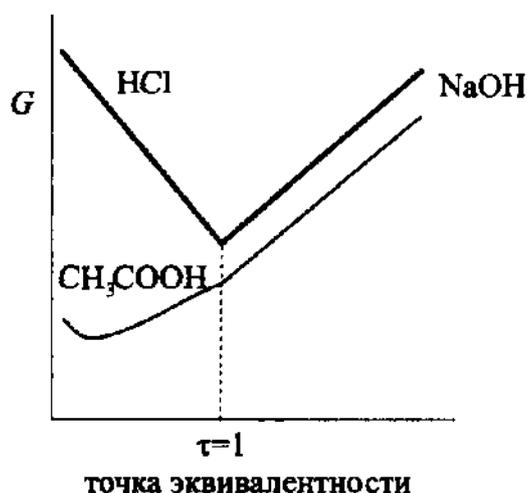
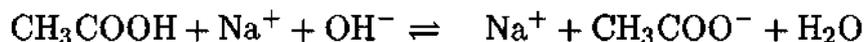


Рис. 3.5. Кривые кислотно-основного титрования сильной (HCl) и слабой (CH₃COOH) кислоты сильным основанием (NaOH) с кондуктометрической индикацией

Совсем иным будет ход кривой при титровании слабой кислоты (например, CH₃COOH).



В начальной точке электропроводность определяется лишь концентрацией свободных протонов и ацетат-ионов, образовавшихся в результате диссоциации уксусной кислоты. Ввиду неполноты ее диссоциации электропроводность ниже, чем для раствора HCl той же концентрации. При добавлении NaOH электропроводность сначала становится еще ниже ввиду замещения ионов H^+ на ионы Na^+ , обладающие меньшей электропроводностью. Однако поскольку замещение H^+ на Na^+ связано также с увеличением степени диссоциации, вскоре электропроводность начинает возрастать. После точки эквивалентности рост электропроводности становится более резким ввиду появления свободных ионов OH^- . В целом ход кривой намного более плавный, а излом в точке эквивалентности выражен куда менее резко, чем при титровании HCl.

В качестве примеров осадительного титрования с кондуктометрической индикацией на рис. 3.6 (а) приведена кривая титрования хлорид-ионов раствором нитрата серебра, а на рис. 3.6 (б) – сульфат-ионов (в растворе $MgSO_4$) раствором гидроксида бария.

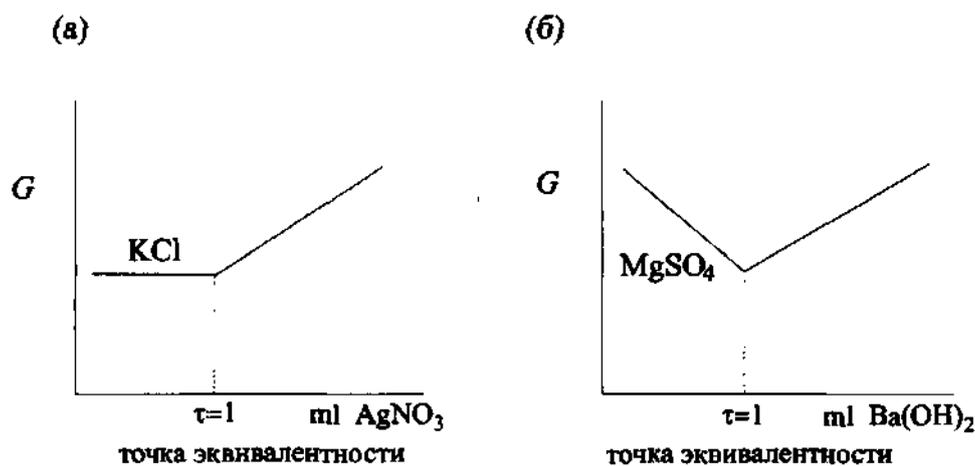
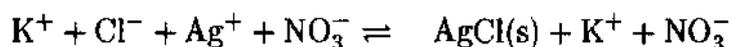


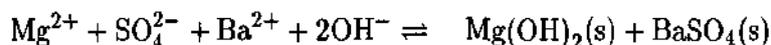
Рис. 3.6. Кривые осадительного титрования хлорид-ионов раствором нитрата серебра (а) и сульфат-ионов раствором гидроксида бария (б) с кондуктометрической индикацией

При титровании хлорид-ионов до точки эквивалентности электропроводность раствора почти не изменяется, поскольку происходит замещение ионов Cl^- на NO_3^- , эквивалентные электропроводности которых близки (см. табл. 3.1).



После точки эквивалентности электропроводность возрастает ввиду увеличения в растворе концентрации переносчиков заряда – ионов Ag^+ и NO_3^- .

Титрование раствора MgSO_4 раствором $\text{Ba}(\text{OH})_2$ протекает по уравнению



До точки эквивалентности электропроводность резко уменьшается, поскольку продукты реакции как сульфат бария, так и гидроксид магния выпадают в осадок. После точки эквивалентности электропроводность начинает возрастать за счет избытка сульфата бария.

Кондуктометрическое титрование отличается от обычного также тем, что дает не одну только точку эквивалентности, а полную кривую всего процесса титрования. На ее основе можно составить представление о ходе реакции, так и о некоторых свойствах получающихся веществ. Например, резкий минимум или явный перегиб на кривой кондуктометрического титрования говорит об устойчивости или малой растворимости продуктов реакции. Размытость области перехода от одного участка кривой к другому указывает (в зависимости от природы реакции) или на гидролиз образовавшейся соли, или на повышенную растворимость осадка, или на недостаточную стойкость нового соединения. При соблюдении известных условий кондуктометрически можно определить содержание двух различных соединений, присутствующих в одном и том же растворе.

3.4. Инверсионная вольтамперометрия

Стандартными методами определения органических веществ в фармацевтических препаратах, рекомендованными отечественной фармакопеей, являются спектрофотометрические и хроматографические, включая метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Несмотря на бесспорное лидерство этих инструментальных методов, при определении органических и неорганических компонентов в фармацевтике в последние годы все чаще используют электрохимические методы. Перед аналитиками ставятся новые задачи разработки высокочувствительных способов, позволяющих определять широкий спектр органических веществ и неорганических элементов в очень малых количествах – от нескольких мкг до нескольких мг, что возможно при использовании электрохимических методов и, в частности, инверсионной вольтамперометрии.

Этот метод позволяет определять следовые количества как органических, так и неорганических веществ в медицинских объектах на уровне предельно допустимых содержаний и ниже. Он конкурирует с обычно используемыми физическими методами по чувствительности

определения, экспрессности и надежности полученных данных, в то же время недорог и прост в эксплуатации. Своеобразный ренессанс, переживаемый в настоящее время инверсионной вольтамперометрией во многом связан с расширением круга определяемых соединений и объектов анализа. Становится очевидным, что инверсионная вольтамперометрия может найти применение, когда использование спектральных или хроматографических методов не представляется возможным или экономически оправданным, особенно в случае определения органических веществ в фармацевтических объектах.

Первые публикации по методу инверсионной вольтамперометрии, как одного из вариантов вольтамперометрических методов (синоним: амальгамная полярография с накоплением) были опубликованы Я. Гейровским более 80 лет тому назад. Большой вклад в становление метода инверсионной вольтамперометрии, развитие его теории и практических приложений внесли школы советских ученых С.И. Синяковой, А.Г. Стромберга, Г.Н. Виноградовой, Х.З. Брайниной и др.

Методы вольтамперометрии относятся к методам определения следовых количеств различных веществ из растворов в области концентраций $10^{-6} \dots 10^{-10}$ моль/дм³ и ниже. Они основаны на явлениях электрохимического восстановления или окисления определяемых веществ на электроде, на который подается потенциал, изменяющийся по определенному закону. Полученная зависимость тока от приложенного напряжения – в форме пика или волны – зависит от концентрации определяемого вещества и его природы.

Построение вольтамперных кривых. Метод вольтамперометрии основан на изучении зависимостей силы тока от напряжения между электродами, называемых вольт-амперными кривыми. Для их регистрации анализируемый раствор помещают в ячейку, состоящую из рабочего электрода (ртутного, угольного, платинового, золотого) и электрода сравнения (каломельного, хлоридсеребряного). Анализируемый раствор должен содержать инертный фоновый электролит. На электроды налагают напряжение, изменяющееся во времени (как правило, линейно). Величину этого напряжения (потенциал рабочего электрода, измеренный относительно электрода сравнения) откладывают по оси абсцисс, обычно направленной в сторону отрицательных потенциалов. Вдоль оси ординат откладывают силу тока, причем катодные токи соответствуют верхней, а анодные – нижней половине оси ординат (рис. 3.7). Такое «обращенное» направление осей координат обусловлено тем, что основным рабочим электродом является ртутный, рабочая область которого находится главным образом при отрицательных потенциалах.

При наложении напряжения U на электроды 1 и 2 справедливо соотношение

$$U = |E_1 - E_2 + IR_i|. \quad (3.13)$$

Таким образом, наложение напряжения в общем случае приводит к изменению потенциалов электродов E_1 и E_2 и омическому падению напряжения вследствие сопротивления ячейки R_i .

Рассмотрим сначала случай, когда оба электрода являются *неполяризуемыми*. Это возможно, например, когда рабочий электрод является медным (а электрод сравнения всегда неполяризуемый). При этом потенциалы электродов не изменятся, и сила тока будет непосредственно связана с напряжением на электродах в силу закона Ома.

Вольтамперная кривая в этом случае будет представлять собой прямолинейную зависимость. Такие вольтамперные кривые не представляют интереса для химического анализа.

Кривая 2 рис. 3.7 отвечает случаю *поляризуемого* рабочего электрода – в данном случае ртутного капающего. Несмотря на прикладываемое напряжение, в области потенциалов от +0,2 до –2 В через ячейку практически не протекает ток. Причина состоит в кинетической затрудненности электрохимической реакции разряда ионов водорода на ртутном электроде, вследствие чего возникает перенапряжение.

Катодный ток в области отрицательных потенциалов обусловлен восстановлением находящихся в растворе ионов водорода.

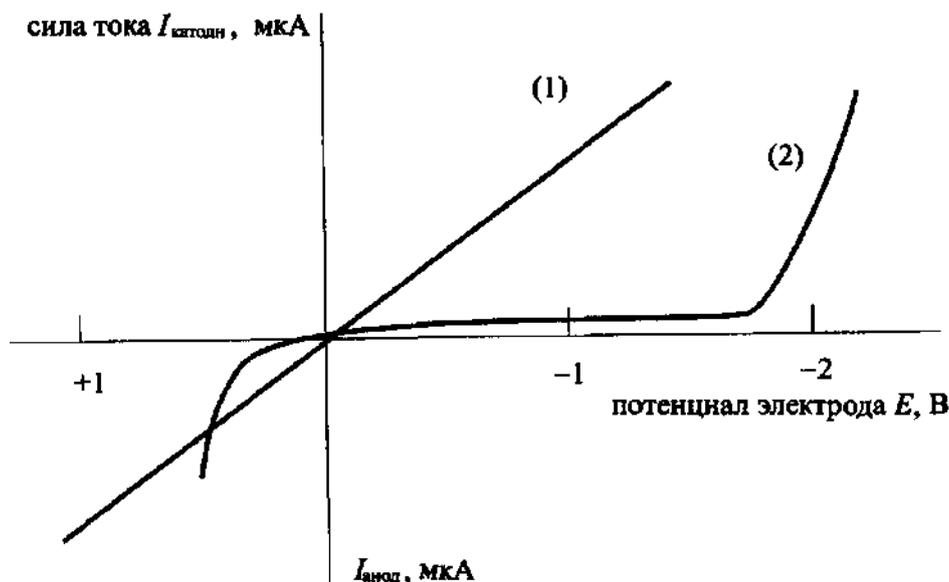


Рис. 3.7. Вольтамперные характеристики неполяризуемого медного (1) и поляризуемого ртутного капального (2) рабочего электрода в анодной и катодной области

В положительной области потенциалов анодный ток вызван растворением ртути вследствие ее электрохимического окисления.

Область поляризуемости большинства твердых электродов, например платинового или угольного, составляет от +1 до -1 В. Твердые электроды характеризуются меньшим перенапряжением по отношению к ионам водорода, но большей устойчивостью к окислению. Поэтому для работы в анодной области потенциалов они более пригодны, чем ртутный электрод.

Механизмы переноса зарядов в растворах. Перенос заряда в растворах происходит в результате направленного движения носителей заряда – ионов. Существуют различные механизмы такого переноса. Среди них можно выделить конвекцию, миграцию и диффузию.

Конвекцией называется перенос вещества макроскопическими потоками. В электрохимическом анализе часто применяют *перемешивание* раствора для ускорения переноса ионов вследствие конвекции.

Миграция – это движение заряженных частиц под действием электростатического поля. Зависимость скорости движения ионов от напряженности электростатического поля может исказить результаты анализа, поэтому миграцию ионов определяемого вещества стараются исключить. Для этого в анализируемый раствор добавляют инертный (электрохимически неактивный) электролит в достаточно высокой концентрации. Находясь в избытке, ионы электролита являются в этом случае основными переносчиками тока, и доля заряда, переносимая определяемыми ионами, оказывается невелика. В водных растворах в качестве инертных электролитов можно использовать растворы KNO_3 , NaClO_4 или KCl в концентрациях 0,1 М или выше. В органических растворителях инертными электролитами могут служить нацело диссоциированные соли, образованные крупными органическими катионами, например перхлорат тетрабутиламмония.

Диффузия – это процесс переноса вещества под действием разности химических потенциалов. Теоретические основы этого явления изучаются в курсе физической химии. Основные законы, описывающие процесс диффузии, называются законами Фика.

Сущность метода. Методы вольтамперометрии (ВА) основаны на получении и изучении вольтамперных кривых (вольтамперограмм), показывающих зависимость силы тока от приложенного напряжения. Различают прямые и инверсионные ВА методы.

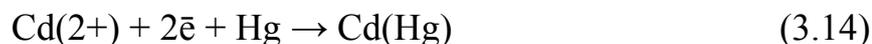
Метод инверсионной вольтамперометрии (ИВ) включает две стадии:

1. Концентрирование вещества из сравнительно большого объема раствора в небольшом объеме или на поверхности электрода при перемешивании раствора и постоянном потенциале.

2. Электрохимическое растворение концентрата при определенном изменении потенциала.

Например, определение Cd на стационарном ртутном электроде методом ИВ:

1. Электролиз при потенциале $-1,2$ В с образованием амальгамы:



2. Анодное растворение концентрата при линейном изменении потенциала со скоростью w : $E = E_0 + wt$



На рис. 3.8. схематично показано изменение потенциала и тока во времени при проведении этих стадий.

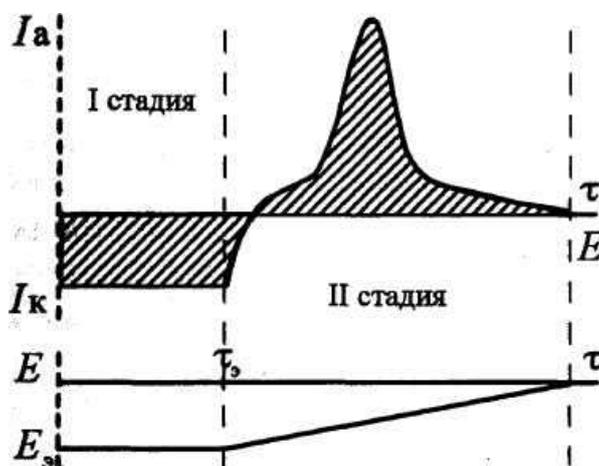


Рис. 3.8. Изменение потенциала и тока во времени при регистрации вольтамперограммы

Аналитическим сигналом является пик (рис. 3.9), величина которого пропорциональна концентрации определяемого вещества, а потенциал пика (E_p) связан с его природой. Высота пика зависит от условий накопления (перемешивания, времени накопления, потенциала электролиза и др.) и от условий электрорастворения (скорости изменения потенциала).

Таким образом, главные отличия метода ИВ от классической полярографии:

- 1) применение стационарных электродов вместо капающих;
- 2) наличие стадии концентрирования определяемого вещества.

Первое позволяет исключить использование больших количеств токсичной ртути, второе – повысить чувствительность метода на несколько порядков. Предел обнаружения многих элементов составляет $0,00001 \dots 0,000001$ мг/дм³, что недостижимо в таких известных методах, как атомно-абсорбционный или нейтронно-активационный анализ.

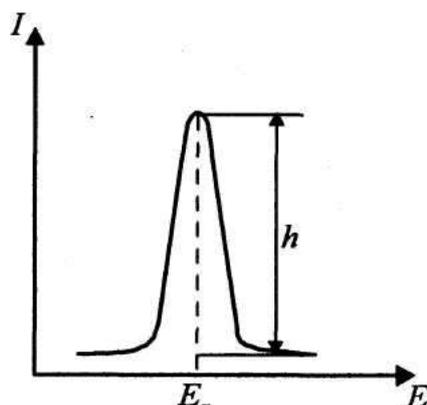


Рис. 3.9. Аналитический сигнал в методе ИВ

Обобщенные сведения о возможностях определения основных и примесных компонентов в фармацевтических объектах методами инверсионной вольтамперометрии приведены в таблице, в которой представлены варианты метода: адсорбционная, инверсионная, дифференциальная импульсная, циклическая, квадратноволновая вольтамперометрия. В табл. 3.2 показана возможность инверсионной вольтамперометрии при определении органических веществ на различных типах индикаторных электродах.

Таблица 3.2

Определение фармацевтических препаратов методом инверсионной вольтамперометрии

Метод	Индикаторный электрод	Определяемый компонент (показатель)
Инверсионная вольтамперометрия	золотой	беназеприл гидрохлорид (лотензин)
	стеклоуглеродный	нибентан, азитромицин
Инверсионная вольтамперометрия	стеклоуглеродный	бутопрофид, амиодарон (кордарон)
	ртутный «висящая капля»	этинилэстрадиол, кетоконазол
Инверсионная циклическая вольтамперометрия	золотой дисковый	имипрамин
	угольный пастовый	пиридоксин (витамин В6), офлоксацин, норфлоксацин, гатифлоксацин, ломефлоксацин
	эпоксиграфитовый	диклофенак натрия
	стеклоуглеродный	колхицин, допамин, ацетаминофен, ацикловир
	ртутный «висящая капля»	колхицин

Метод	Индикаторный электрод	Определяемый компонент (показатель)
Адсорбционная инверсионная вольтамперометрия (в т. ч. анодная и катодная)	стеклоуглеродный	верапамил, тебаин, олигодеоксинуклеотиды
	ртутный «висящая капля»	налидиксовая кислота, ногаламицин
Квадратно-волновая инверсионная вольтамперометрия (в том числе адсорбционная)	ртутный «висящая капля»	варфарин, моноксифлоксацин, резазурин
	графитовый	диклофенак
	стеклоуглеродный	допамин, сертралин гидрохлорид, флупентиксол
	алмазный	пропранолол, атенолол
Дифференциально импульсная вольтамперометрия (в т. ч. циклическая)	стеклоуглеродный	налтрексон, ацикловир, аскорбиновая кислота, допамин, мочева кислота, клопидогрел бисульфат
	углеродный керамический	рутин
	ртутный «висящая капля»	налидиксовая кислота, витамины В ₁ , В ₂ и В ₆ (тиамин, рибофлавин, пиридоксин)
	угольный пастовый	эпинефрин, ацетаминофен, офлоксацин, норфлоксацин, гатифлоксацин, ломефлоксацин
	алмазный	допамин
	графитовый	гуанин
		допамин
	стеклографитовый	триптофан
	электрод с Vi-пленкой	сульфадиазин
	композитный микроэлектрод	L-доп

Среди вольтамперометрических методов используются такие варианты как адсорбционная, инверсионная, дифференциальная импульсная, циклическая, квадратно-волновая вольтамперометрия.

В том случае, когда вещество концентрируют на электроде в виде продукта окисления, метод называется «катодная инверсионная вольтамперометрия». Включив развертку потенциала в направлении более отрицательных потенциалов, регистрируют катодную инверсионную вольтамперограмму восстановления полученного продукта. Методы инверсионной вольтамперометрии применимы для определения многих органических веществ, и прежде всего тех, которые образуют нерастворимые соединения с ионами ртути на поверхности ртутных электродов, поляризованных при потенциалах анодного растворения ртути. Соединения удаляют с поверхности электрода при катодной поляризации, поэтому катодную инверсионную вольтамперометрию можно рассматривать как метод, пригодный для определения ряда органических соединений на уровне микро – и нанограммовых содержаний.

Адсорбционная инверсионная вольтамперометрия. Метод основан на предварительном адсорбционном концентрировании определяемого компонента на поверхности электрода и последующей регистрации вольтамперограммы полученного продукта. Таким образом, можно сконцентрировать многие органические вещества, а также ионы металлов в виде комплексов с органическими лигандами, особенно азот- и серосодержащими. Концентрирование проводят в течение строго контролируемого времени при потенциале максимальной адсорбции. Метод пригоден для определения органических и неорганических веществ, которые не могут быть сконцентрированы электролитически, но способны сильно и воспроизводимо адсорбироваться на электроде.

Распространение метода во многом сдерживалось преимущественным использованием ртутных электродов из-за высокой токсичности металлической ртути. В последнее время все большее распространение приобретают твердые инертные электроды, прежде всего из углеродсодержащих материалов. Поэтому для контроля фармпрепаратов наряду с ртутно-капающими и ртутно-пленочными, широко применяются графитовые, пирографитовые и стеклоуглеродные электроды. В ряде случаев возможно применение для анализа модифицированных угольно-пастовых электродов, чувствительных к определенному типу органических соединений, что позволяет избежать стадии их выделения или разделения (рис. 3.10).

Особенно удобны для этих целей химически модифицированные электроды: наличие реакционных групп, закрепленных на электроде способствует концентрированию определяемого вещества исключительно на поверхности электрода и в результате чувствительность определения повышается. Удастся достичь пределов обнаружения на уровне 10^{-10} – 10^{-11} моль/л. Для таких электродов весьма актуальной становится

задача получения воспроизводимых от измерения к измерению результатов. Для этого все шире используется химическое модифицирование поверхности электродов; при этом возрастает селективность измерений и может быть снижен предел обнаружения определяемых веществ. Из физических способов модифицирования наиболее широко используется электрохимическая подготовка поверхности электрода. Хотя первые упоминания об этой обработке появились почти полвека назад, механизм ее воздействия на поверхность электродов во многом остается неясным. В большинстве работ зарубежных исследователей снижение предела обнаружения определяемых веществ (прежде всего, органических) объясняется увеличением поверхностной концентрации кислородсодержащих групп и улучшением обратимости электродного процесса. Стабилизация же аналитического сигнала не находит объяснения в современной научной литературе. Объяснение такой стабилизации лучшей очисткой поверхности электродов от загрязняющих веществ вряд ли может быть принято в случае сильно адсорбирующихся продуктов электродного процесса.

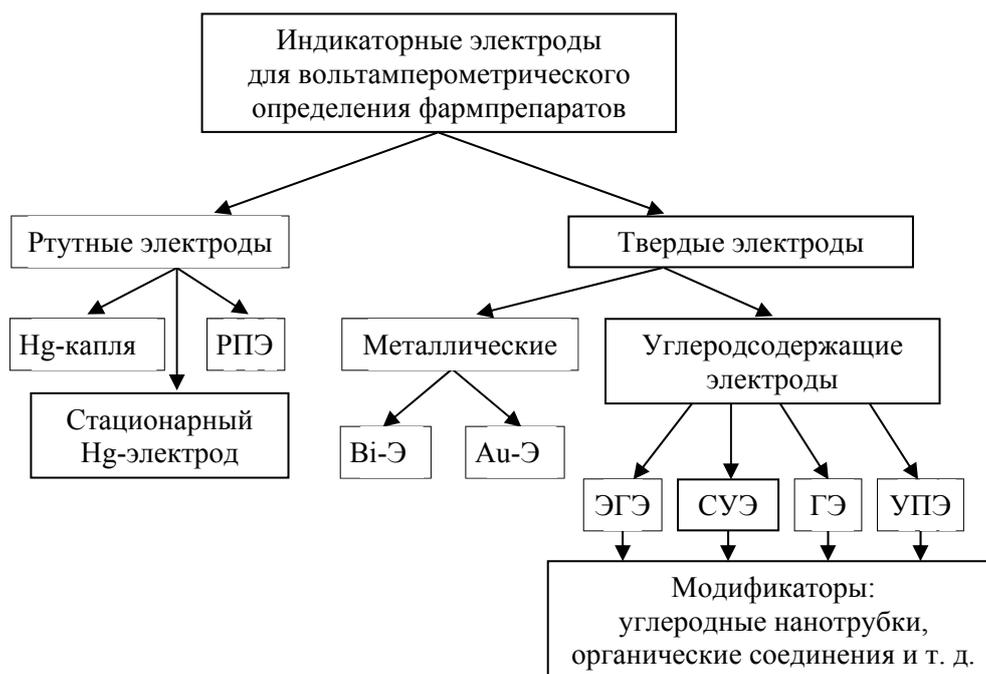


Рис. 3.10. Индикаторные электроды для вольтамперометрического определения фармпрепаратов: ЭГЭ – эпоксиграфитовый электрод; СУЭ – стеклогуглеродный электрод; ГЭ – графитовый электрод; УПЭ – угольно-пастовый электрод

Ртутный электрод в виде висящей капли применяют для определения этинилэстрадиола, варфарина натрия (4-гидрокси-3-(3-оксо-1-фенил-бутил) кумарин натрия), моноксифлоксацина и др., хорошо растворимых в ртути

или образующих малорастворимые соединения со ртутью. На поверхности графитовых и стеклоуглеродных электродов можно концентрировать многие органические вещества, восстанавливающихся при не слишком высоких потенциалах. Пленочные ртутно-графитовые электроды позволяют получать более воспроизводимые результаты, чем электроды из чистого графита. Преимущество пленочных электродов перед стационарным капельным электродом состоит в том, что сконцентрированный в течение одного и того же времени металл собирается в тонком слое ртути, покрывающей графит. Свойства электрода зависят не только от материала, из которого он изготовлен, но и от состояния его поверхности, поэтому их можно существенно изменить, нанеся на поверхность тонкий слой вещества-модификатора. Такие электроды называют химически модифицированными. Для нанесения модификатора используют либо хемосорбцию, либо сшивку модификатора с поверхностью электрода ковалентной связью. Удобным материалом для изготовления модифицированных электродов является графит. Графитированный электрод состоит из гигантских слоев конденсированных ароматических колец, на поверхности которых содержатся различные функциональные группы. Число их невелико и они, скорее всего, сконцентрированы вдоль дефектов поверхности и образуют границу поверхности. Высокая плотность n -электронов способствует сильному хемосорбционному взаимодействию, особенно с ненасыщенными соединениями. По сравнению с обычным электродом химически модифицированный электрод обеспечивает более высокую скорость электродного процесса, обладает более высокой селективностью, более высокой чувствительностью определения.

В последнее время много внимания уделяется свойствам простых аналитических устройств, распознающих определяемый компонент и адекватно реагирующих на изменение его концентрации. Таким устройством является химический или биологический сенсор, на поверхности которого возможно проводить одновременно операции разделения, концентрирования и определения вещества. Формально биосенсоры можно рассматривать как один из вариантов химических сенсоров, в которых в качестве распознающих элементов, обеспечивающих формирование сигнала-отклика, применяются биологические материалы – белки, нуклеиновые кислоты, живые клетки, рецепторы и ткани. Решение задачи миниатюризации и автоматизации электрохимического анализа предусматривает поиск новых материалов, применение современных технологий, проработку новых форм, конструкций и дизайна сенсоров. В последнее время отчетливо наблюдается тенденция к снижению общего количества публикаций по электрохимическим методам контроля, но возрастает число работ с применением сенсоров и биосен-

соров, особенно для вольтамперометрических методов. Это еще раз доказывает повышенное внимание к вольтамперометрическому контролю, как одному из радикальных путей повышения чувствительности определения многих органических соединений. Возможности электрохимических (био)сенсоров при определении биологически активных веществ в лекарственных препаратах и физиологических средах на примере ряда веществ представлены в табл. 3.3

Таблица 3.3

Возможности электрохимических (био)сенсоров при определении биологически активных веществ в физиологических средах

Группа веществ	Определяемый компонент		Объект
	Сенсор	Биосенсор	
Углеводы, аминокислоты, витамины, флавоноиды, метаболиты	Аскорбиновая кислота, глюкоза, мочевая кислота, никотиновая кислота, триптофан	Аскорбиновая кислота, гликолевая кислота, глюкоза, кверцетин, лактат, лактоза, мочевины, оксалат, D-фенилаланин, холин, L-цистеин	Физиологическая среда <i>in vivo</i> , кровь, плазма, сыворотка крови, слюна, моча

В качестве электропроводящих материалов для изготовления электродов шире всего применяются композитные материалы, в том числе нанокompозиты, в состав которых включены наноструктурированные материалы (углеродные нанотрубки, наночастицы металлов и оксидов металлов, самоорганизованные монослои); их используют для замены благородных металлов с целью удешевления электродов, либо для повышения чувствительности и селективности сигнала. Из других материалов следует отметить углеродсодержащие – стеклоуглерод, графит, пирографит, угольную пасту; кроме того, используются благородные металлы (золото, платина), ртуть, смеси оксидов металлов. Для иммобилизации биочувствительных компонентов применяются технологии включения в полярные гидрофильные полимеры, электрополимеризация, поверхностная и аффинная иммобилизация, отмечены использование мезопористых материалов и молекулярный импринтинг.

Биосенсоры как новый тип аналитических устройств переживают период активного развития. Потребность в биосенсорах огромна, с их помощью может быть успешно решена задача высокочувствительного и селективного контроля биологически активных веществ. Создание биосенсоров, заменя-

ющих рецепторы живых организмов, позволит применять их для диагностики ряда заболеваний. Биосенсоры легко подвергаются миниатюризации, и поэтому могут быть интегрированы в различные аналитические системы и даже имплантированы в организм для непрерывного мониторинга.

Литература

Основная

1. Будников Г.К. Основы современного электрохимического анализа / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев. – Москва : Мир, 2003. – 592 с.
2. Васильев В.П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа / В.П. Васильев. – Москва : Дрофа, 2002. – 384 с.
3. Плэмбек Дж. Электрохимические методы анализа. Основы теории и применение / Дж. Плэмбек. – Москва: Мир, 1985.
4. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа / Г. Юинг. – Москва: Мир, 1989.
5. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство / под ред. В.Б. Алесковского. – Ленинград, 1988.
6. Электроаналитические методы в контроле окружающей среды / под ред. Неймана Е.Я. – Москва : Химия, 1990. – 239 с.
7. Корыта И. Ионоселективные электроды / И. Корыта, К. Штулик. – Москва : Мир, 1989.
8. Ионметрия в неорганическом анализе / Л.А. Демина и др. – Москва : Химия, 1991.
9. Захарова Э.А. Инверсионная вольтамперометрия. Конспект лекций / Э.А. Захарова, Н.М. Пикула, Н.М. Мордвинова. – Томск: Изд-во ТПУ, 1999. – 54 с.
10. Выдра Ф. Инверсионная вольтамперометрия / Ф. Выдра, К. Штулик, Э. Юлакова. – Москва : Мир, 1980. – 278 с.
11. ГОСТ 29270–95. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения нитратов. – Минск, 1995.
12. Сонгина О.А. Амперометрическое титрование // Химия / О.А. Сонгина. – 1967.
13. Виноградова Е.Н. Методы полярографического и амперометрического анализа / Е.Н. Виноградова, З.А. Галлай, З.М. Финогенова. – МГУ, 1963.

Дополнительная

1. Физическая химия. Теоретическое и практическое руководство / под ред. Б.П. Никольского. – Ленинград : Химия, 1987.

2. Основы аналитической химии / под ред. Ю.А. Золотова. – Москва : Высшая школа, 1996.
3. Справочное руководство по применению ионоселективных электродов. – Москва : Мир, 1986. – 231 с.
4. Бонд А.М. Полярографические методы в аналитической химии / А.М. Бонд. – Москва : Химия, 1983.

Вопросы для самоконтроля

1. Какая зависимость лежит в основе потенциометрического метода анализа?
2. Как подбираются электроды в потенциометрии? Какие требования предъявляются к индикаторному электроду и к электроду сравнения?
3. Какие электроды используются для определения концентрации водорастворимых витаминов группы В?
4. Что показывает потенциал аналитического сигнала на вольтамперограмме и ее высота?

Глава 4 ХРОМАТОГРАФИЯ

4.1. Теоретические основы хроматографических методов

Хроматография – метод разделения, обнаружения и определения веществ, который основан на распределении разделяемых компонентов между двумя не смешивающимися фазами. Пробу вводят в *подвижную фазу* (ПФ) – жидкость, газ или сверхкритический флюид. Подвижная фаза движется относительно *неподвижной фазы* (НФ), находящейся на колонке или в плоском тонком слое.

По способу регистрации различают внутренние и внешние хроматограммы. Классификация хроматографических методов осуществляется по различным параметрам (см. рис. 4.1).

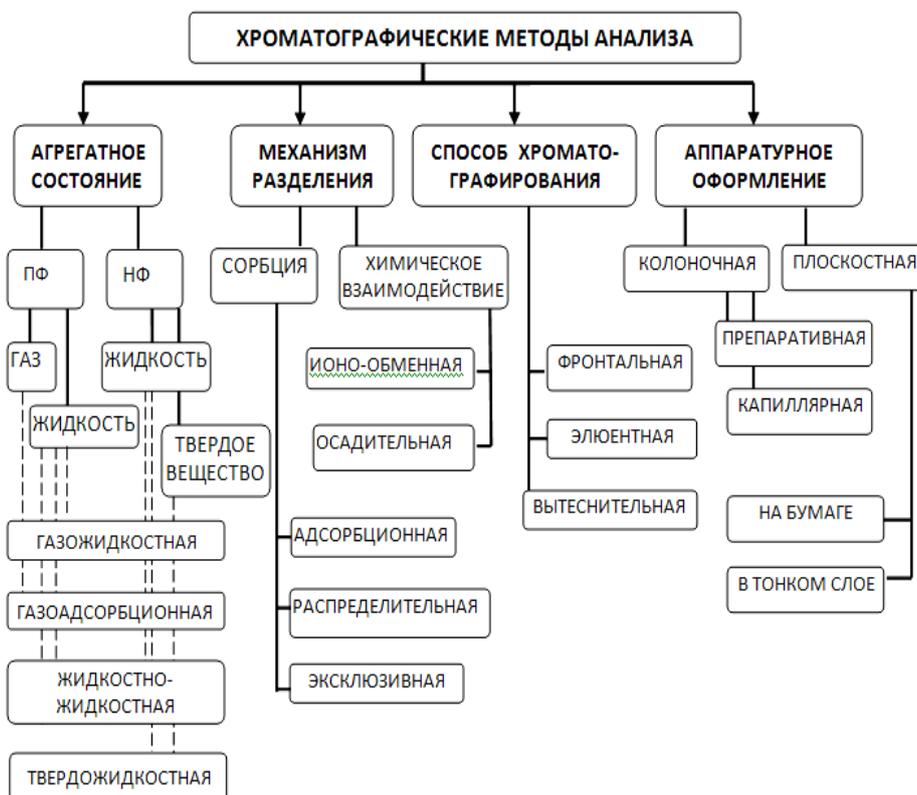


Рис. 4.1. Классификация хроматографических методов анализа

Наиболее важными являются распределительный и адсорбционный механизмы разделения. Адсорбционная хроматография (газо-твёрдофазная, жидкостно-твёрдофазная хроматография) основана на взаимодействии мо-

лекул вещества с поверхностью НФ. В распределительной хроматографии (газо-жидкостная, жидкостно-жидкостная) НФ служит жидкость, иммобилизованная на твердом носителе.

Жидкостную хроматографию можно проводить в колоночном и в плоскостном вариантах, газовую – только в колоночном.

В *элюативной хроматографии* растворенную в подвижной фазе пробу помещают в колонку, через которую пропускают ПФ. В ходе процесса компоненты пробы распределяются между новыми порциями неподвижной и подвижной фазы – *элюентом*.

Для очистки пробы используют еще один способ – фронтальный. В этом случае раствор пробы непрерывно подают в колонку вплоть до ее насыщения, так называемого «проскока». Чем сильнее вещество контактирует с НФ, тем меньше его скорость движения и дольше время контакта.

В ходе процесса разделения происходит увеличение расстояния между зонами компонентов и расширение самих зон, данные явления снижают эффект разделения. Улучшить разделение компонентов можно за счет увеличения *различия в скоростях движения зон* и уменьшения ширины хроматографических пиков.

Хроматограмма – зависимость сигнала детектора от времени.

Хроматографические параметры. Коэффициент распределения – фундаментальная величина, характеризующая относительное сродство вещества к подвижной (индекс M) и неподвижной (индекс S) фазам. Другими словами это отношение равновесных концентраций вещества в неподвижной и подвижной фазах:

$$K = \frac{C_S}{C_M}. \quad (4.1)$$

Время удерживания (t_R), – время выхода вещества из колонки.

Первый пик (рис. 4.2), характеризующийся временем удерживания t_M , принадлежит веществу, которое не удерживается.

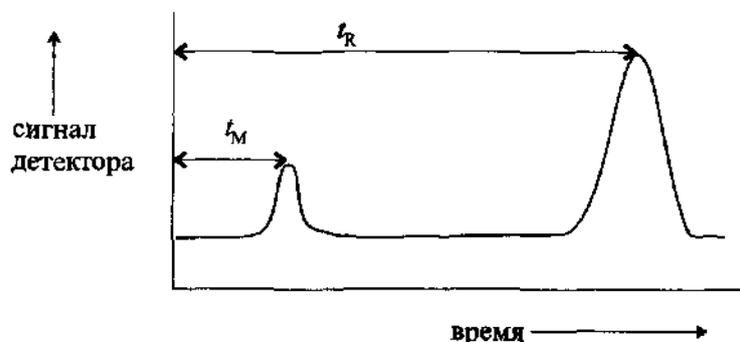


Рис. 4.2. Классическая хроматограмма. Первый пик с временем удерживания t_M соответствует компоненту, который не удерживается НФ

«Мертвое» время – время от момента ввода неудерживаемого компонента до момента его детектирования.

Используя время удерживания можно выразить среднюю скорость движения разделяемого компонента \bar{v} и скорость движения молекул подвижной фазы u как:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}, \quad (4.2)$$

и
$$u = \frac{L}{t_M}, \quad (4.3)$$

где L – длина колонки.

Или
$$\bar{v} = u \frac{C_M V_M}{C_M V_V + C_S V_S} = u \frac{1}{1 + \frac{C_S V_S}{C_M V_M}}. \quad (4.4)$$

Исправленное время удерживания: $t'_R = t_R - t_M$. Разность между общим временем удерживания и «мертвым».

Используя коэффициент распределения K , уравнение (4.4) можно записать в виде:

$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + K \frac{V_S}{V_M}}, \quad (4.5)$$

Отношение объемов фаз $\beta = V_M / V$ называют *фазовым отношением*.

Коэффициент емкости k' – характеристика удерживания вещества при заданных условиях эксперимента:

$$k' = K \frac{V_S}{V_M}, \text{ или } k' = \frac{K}{\beta}. \quad (4.6)$$

Подставив полученные выражения в уравнения (4.5 и 4.2), получим:

$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + k'}, \quad (4.7)$$

и
$$\frac{1}{t_R} = \frac{1}{t_M} \cdot \frac{1}{1 + k'}. \quad (4.8)$$

Отсюда, коэффициент емкости связан с исправленным временем удерживания:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}. \quad (4.9)$$

Оптимальное значение k' находится в диапазоне от 1 до 5. При $k' < 1$ – компоненты быстро вымываются и плохо разделяются. При $k' > 5$ время хроматографического разделения увеличивается.

Коэффициент селективности (α) – характеристика степени разделения веществ А и В:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}, \quad (4.10)$$

или

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}. \quad (4.11)$$

Из экспериментальных данных можно рассчитать коэффициент по уравнению:

$$\alpha = \frac{(t'_R)B}{(t'_R)A} = \frac{(t_R)B - t_M}{(t_R)A - t_M}. \quad (4.12)$$

Ширина хроматографического пика характеризует разделяющую способность колонки, т. е. ее *эффективность*. Классическая теория хроматографии описывает связь между эффективностью колонки и шириной пика.

Создатели *классической теории хроматографии* (Мартин и Синдж, Нобелевская премия 1952 г.) ввели понятия *высоты, эквивалентной теоретической тарелки* (ВЭТТ) и *числа теоретических тарелок*.

Условный участок колонки, в пределах которого устанавливается равновесие частиц между ПФ и НФ, называют теоретической тарелкой. При этом движение вещества вдоль колонки представляют как последовательный его перенос с одной теоретической тарелки на другую. Число теоретических тарелок N равно:

$$N = \frac{L}{H}, \quad (4.13)$$

где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке. Она связана с дисперсией пика в колонке σ^2 и выражается в единицах времени (σ_t^2) или длины (σ_L^2):

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L} = \frac{\sigma_t^2 L}{t_R^2}, \quad (4.14)$$

или

$$H = \frac{W^2 L}{16 t_R^2}. \quad (4.15)$$

Чем выше *эффективность* колонки, тем лучше разрешение пиков.

Число теоретических тарелок рассчитывают из хроматограммы (рис. 4.3).

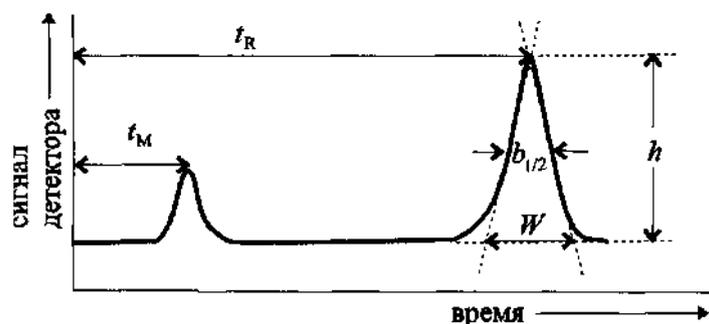


Рис. 4.3. Оценка стандартного отклонения пика σ_t по его ширине у основания W или по ширине $b_{1/2}$ на половине высоты h

Отсюда число теоретических тарелок равно

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2, \quad (4.16)$$

или

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{b_{1/2}} \right)^2. \quad (4.17)$$

Расширение хроматографических пиков зависит от скорости процессов массопереноса (скорости движения ПФ), т. е. от *кинетических параметров*.

На рис. 4.4 показаны типичные зависимости ВЭТТ от *линейной скорости подвижной фазы \bar{u}* (см/с). Как видно из рис. 4.4, минимум для жидкостной хроматографии лежит при меньших скоростях ПФ, в сравнении с газовой. Значение ВЭТТ в газовой хроматографии также значительно больше. Однако в жидкостной хроматографии применяют более короткие колонки (не более 25–50 см), чем в газовой (до 50 м), поэтому числа теоретических тарелок в обоих методах оказываются сопоставимыми.

Уравнение Ван-Деемтера описывает зависимость H от \bar{u} :

$$H = A + \frac{B}{u} + C\bar{u}, \quad (4.18)$$

где константа A характеризует вихревую диффузию; B – молекулярную (продольную) диффузию; C – сопротивление массопереносу.

Более точная зависимость H от \bar{u} описывается уравнением:

$$H = C_M \sqrt{\bar{u}} + \frac{B}{u} + C_S \bar{u}. \quad (4.19)$$

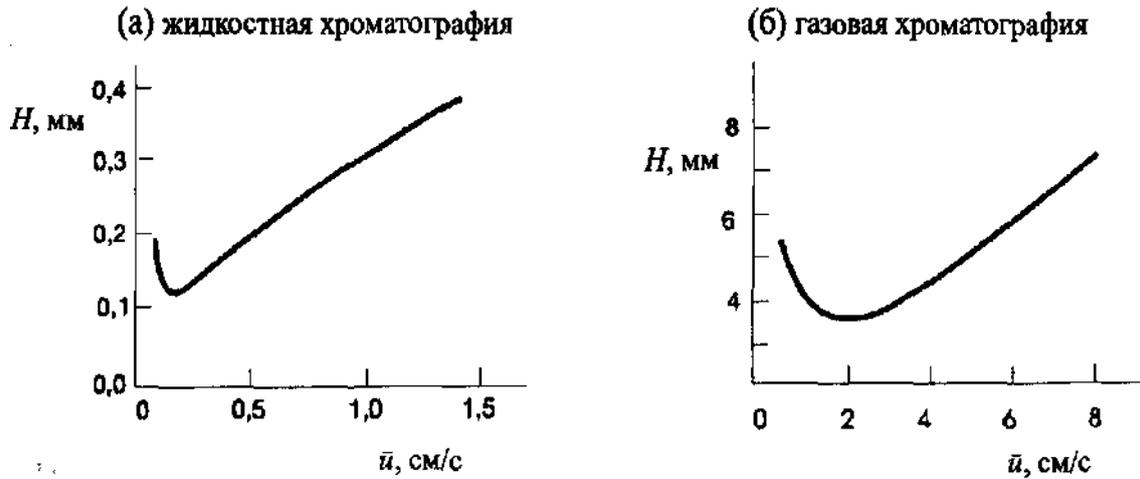


Рис. 4.4. Зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке H , от линейной скорости подвижной фазы \bar{u} для жидкостной (а) и газовой (б) хроматографии

Константы B , C_m и C_s характеризуют молекулярную диффузию и сопротивление массопереносу в ПФ и НФ (рис. 4.5).

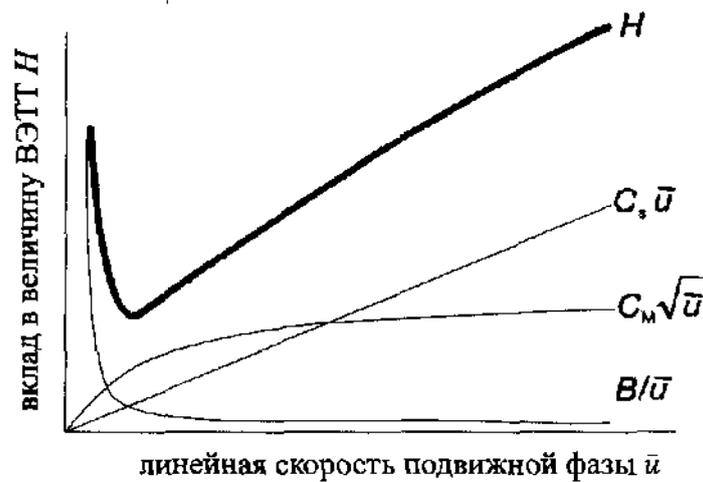


Рис. 4.5. Вклад членов, характеризующих диффузию B/\bar{u} и массоперенос $C_m\sqrt{\bar{u}}$, $C_s\bar{u}$ в величину ВЭТТ H

Слагаемое с коэффициентом B не зависит от размеров частиц НФ, пропорционально коэффициенту диффузии молекул вещества в ПФ, с уменьшением его молярной массы возрастает. В табл. 4.1 и 4.2 представлены величины и факторы, оказывающие влияние на эффективность колонки.

При хроматографическом разделении стремятся достичь *высокой эффективности при малой продолжительности анализа.*

Таблица 4.1

Основные величины, влияющие на эффективность колонки

Величина	Обозначение	Размерность
Линейная скорость потока	\bar{u}	$\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$
Коэффициент диффузии в подвижной фазе	D_M	$\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$
Коэффициент диффузии в неподвижной фазе	D_S	$\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$
Размер частиц наполнителя колонки	d_p	см
Толщина слоя неподвижной жидкой фазы	d_f	см
Характерное время десорбции компонента	t_d	с
Внутренний диаметр колонки	d_c	см

Таблица 4.2

Вклад отдельных кинетических факторов в величину размывания пика

Фактор	Член в выражении (4.19)
Молекулярная диффузия	$\frac{B}{u} = \frac{2k_D D_m}{\bar{u}}$
Массоперенос в жидкой неподвижной фазе	$C_{su} = \frac{qk' d_f^2 \bar{u}}{(1+k')^2 D_s}$
Массоперенос в твердой неподвижной фазе	$C_{su} = \frac{2t_d k' \bar{u}}{(1+k')^2}$
Массоперенос в подвижной фазе	$Cm\sqrt{u} = \frac{f(d_p^2, d_c^2)\sqrt{u}}{D_M}$

k_D, q – константы, f – некоторая функция.

Фактор разрешения R_s – обобщающий параметр, который характеризует степень разделения. Для пиков веществ А и В (см. рис. 4.6) его определяют:

$$R_s = \frac{\Delta t}{(W_A + W_B)/2} = \frac{t_R^B - t_R^A}{W}, \quad (4.20)$$

при $W_A \approx W_B = W$.

Формулу (4.20) можно представить в виде:

$$R_s = \frac{t_R^B - t_R^A}{t_R^B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}, \quad (4.21)$$

$$R_s = \frac{k'_B - k'_A}{1 + k'_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}, \quad (4.22)$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{k'_B}{1 + k'_B}, \quad (4.23)$$

Если $k'_A \cong k'_B = k$, $\alpha \approx 1$, то

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \frac{k'}{1 + k'}. \quad (4.24)$$

Число теоретических тарелок, необходимых для обеспечения требуемого разрешения, вычисляют:

$$N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2. \quad (4.25)$$

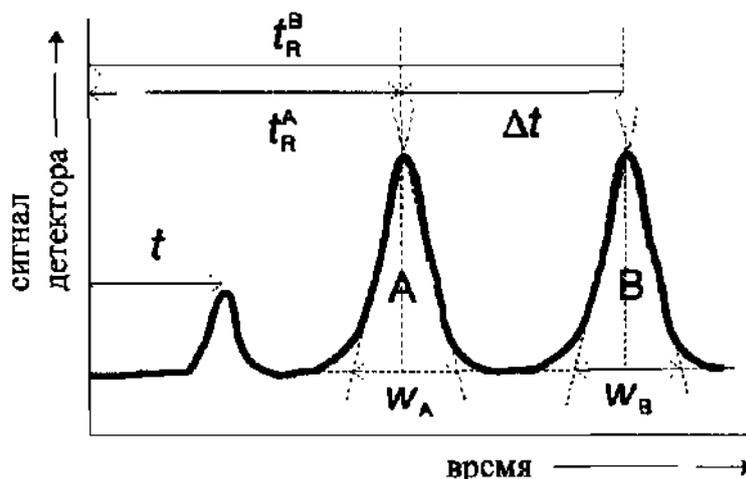


Рис. 4.6. Хроматограмма смеси веществ A и B.
Разрешение пиков R_s может быть рассчитано из данных, приведенных на рисунке, по уравнению (4.20)

Для пиков одинаковой высоты и симметричной формы $R_s = 1$ (называемое 4σ -разрешением).

Положение зоны при внутреннем способе регистрации и время удерживания при внешнем несут информацию о *природе вещества*. Для идентификации следует применять относительные характеристики удерживания, которые рассчитывают на основе внутреннего стандарта.

Необходимо помнить, что при выполнении качественного анализа максимальное число хроматографических пиков, разрешенных до базовой линии, ограничено. В элюативной хроматографии максимальное число разрешенных пиков n оценивают формуле:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_R^n}{t_R^1}, \quad (4.26)$$

где t_R^1 и t_R^n – времена удерживания первого и последнего компонента, вымываемого из колонки.

Типичные максимальные числа разрешенных пиков приведены в табл. 4.3.

Таблица 4.3

Значения максимального числа разрешенных пиков для различных вариантов хроматографии (согласно Гиддингсу)

Число теоретических тарелок N	Максимальное число пиков n		
	гель	газовая	жидкостная
100	3	11	7
400	5	21	13
1000	7	33	20
2500	11	51	31
10 000	21	101	61

В колоночной хроматографии информацию о *количестве* вещества содержит высота или площадь пика. В плоскостной хроматографии (при внутреннем способе регистрации) содержания вещества можно оценить по интенсивности окраски зоны (пятна) компонента. Все хроматографические методы требуют градуировки с использованием образцов сравнения (стандартов). Применяют как внешние, так и внутренние стандарты.

Площадь под пиком оценивают как произведение его высоты h на ширину половины высоты $b_{1/2}$ (рис. 4.3). Сейчас для измерения площадей пиков используют программное обеспечение.

4.2. Варианты газовой хроматографии

Основным вариантом газовой хроматографии является газожидкостная (газовая) хроматография.

В газовой хроматографии все величины, характеризующие удерживание веществ, зависят от температуры и давления. Вместо понятия времени удерживания используют понятие *удерживаемого объема*, он равен произведению времени удерживания на объемную (мл/мин) скорость потока газа-носителя F :

$$V_R = F \cdot t_R, \quad (4.27)$$

или
$$V_M = F \cdot t_M, \quad (4.28)$$

где V_R – удерживаемый объем компонента смеси; V_M – «мертвый» удерживаемый объем.

Исправленный удерживаемый объем V'_R : – основная характеристика удерживания вещества

$$V'_R = V_R - V_M. \quad (4.29)$$

Она связана с его коэффициентом распределения через объем неподвижной фазы V_S :

$$V'_R = KV_S. \quad (4.30)$$

Величина *чистого удерживаемого объема V_N* определяется

$$V_N = j \cdot V'_R. \quad (4.31)$$

$$\text{Коэффициент Мартина} - j = \frac{3 \left[\left(\frac{p_i}{p_o} \right)^2 - 1 \right]}{2 \left[\left(\frac{p_i}{p_o} \right)^3 - 1 \right]},$$

где p_i, p_o – давления газа-носителя на входе и выходе колонки.

Коэффициент Мартина позволяет сделать значения удерживаемых объемов не зависящими от перепада давления.

Удельный удерживаемый объем V_g :

$$V_g = \frac{V_N}{W_S} \cdot \frac{273}{T}, \quad (4.32)$$

где W_S – масса неподвижной фазы (г); T – температура колонки (К).

На практике используют абсолютные или относительные исправленные удерживаемые объемы.

Чтобы определить пригодность колонки для работы, дополнительно необходимы сведения о летучести и сродстве разделяемых веществ к НФ.

Так как давление пара вещества над раствором пропорционально давлению его насыщенного пара p° и коэффициенту активности в растворе γ (закон Рауля), разделяющую способность НФ по отношению к компонентам 1 и 2 можно выразить как:

$$\lg \frac{V_{g2}}{V_{g1}} = \lg \frac{p_1^\circ}{p_2^\circ} + \lg \frac{\gamma_1^\circ}{\gamma_2^\circ}. \quad (4.33)$$

Или для исправленных времен удерживания:

$$\lg \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \lg \frac{p_1^\circ}{p_2^\circ} + \lg \frac{\gamma_1}{\gamma_2}, \text{ или } \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{p_1^\circ}{p_2^\circ} \cdot \frac{\gamma_1^\circ}{\gamma_2^\circ}. \quad (4.34)$$

Относительное сродство НФ к различным компонентам характеризует ее селективность.

На рис. 4.7 показаны **основные узлы газового хроматографа**.

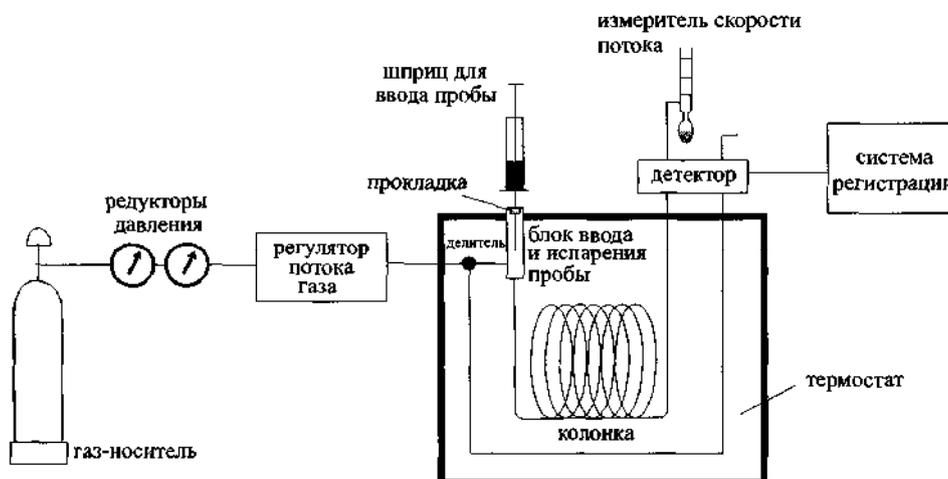


Рис. 4.7. Общая схема газового хроматографа

В качестве **газов-носителей** применяют гелий, аргон, азот, диоксид углерода или водород. Выбор газа-носителя зависит от способа детектирования. При анализе жидких и твердых проб их испаряют в испарителе и затем быстро вводят в поток газа-носителя. При медленном вводе пробы получают размытые пики, которые трудно интерпретировать.

Корпус колонки изготавливают из стекла, кварца или нержавеющей стали. Постоянную температуру колонок поддерживают термостатом. **Основные типы колонок** газовой хроматографии – набивные (насадочные) и капиллярные. *Набивные* колонки заполнены материалом, поверхность которого покрыта тонким слоем жидкости (НФ). *Капиллярные* колонки полые, жидкую НФ наносят на внутренние стенки.

Жидкую фазу на внутренней поверхности капиллярных колонок можно закрепить либо в виде тонкой пленки на стенках (тонкопленочные колонки), либо в порах твердого материала, нанесенного на стенки колонки (*тонкослойные*). В табл. 4.4 приведены основные характеристики колонок различных типов.

При выборе жидкой фазы необходимо, чтобы жидкости были *термически* и *химически устойчивыми, труднолетучими*. Для разделения полярных веществ следует использовать полярные жидкие фазы. неполярные фазы подходят для разделения углеводородов и их галогенпроизводных. Модифицированные – для разделения веществ средней полярности (эфир, кетоны, альдегиды). В качестве примеров в табл. 4.5 приведены основные классы веществ, которые используются в качестве НФ.

Таблица 4.4

*Характеристики основных типов колонок,
используемых в газовой хроматографии*

Характеристика	Набивные	Тонкопленочные	Тонкослойные
Длина, м	1–5	10–100	10–100
Внутренний диаметр, мм	2–4	0,1–0,75	~ 0,5
Эффективность, т.т/м	500–1000	1000–4000	600–1200
Масса пробы, нг	10–10 ⁶	10–1000	10–1000
Перепад давлений	значительный	малый	малый

Таблица 4.5

Неподвижные жидкие фазы для газовой хроматографии

Класс веществ	Представитель	Рабочий диапазон температур	Полярность
Углеводороды	сквалан	20–150	неполярный
	аполан-87	50–300	неполярный
Полигликоли	полиэтиленгликоль (карбовакс)	50–225	полярный
Сложные эфиры	полиэтиленгликоль- сукцинат	100–200	сильно полярный
	диизодециладипинат	20–125	средней полярности
Азотсодержащие соединения	1,2,3-трис (2-циа-ноэтокси)пропан	110–200	полярный
Силиконы	метилсиликон (OV-1, SE-30)	200–300	неполярный
	фенилсиликон (OV-22)		средней полярности
	нитрилсиликоновое масло (OE-4178)		сильно полярный

Химически привитые фазы получают путем закрепления молекул НФ на поверхности частиц носителя или капиллярной колонки посредством ковалентных связей, которые образуются в результате химической реакции. Такие фазы термически устойчивы и не улетучиваются из колонки при экстремальных режимах работы.

Выбор НФ осложняется наличием многообразных видов взаимодействий (неспецифические *дисперсионные, ориентационные, индуцированные*, химические взаимодействия с образованием комплексов с *переносом заряда*) между молекулами НФ и разделяемых компонентов.

Качественную информацию о природе вещества дают исправленные объем и время.

Мерой количества вещества служит высота или площадь хроматографического пика, которые в области линейности отклика детектора прямо пропорциональны массе (для детекторов-катарометров – концентрации) определяемого вещества. Для идентификации удобны *спектроскопические* методы детектирования, которые сами по себе часто являются источником дополнительной информации о природе и составе вещества. Как правило, для этого используют масс-спектрометрию.

В табл. 4.6 приведены общие сведения о детекторах, которые чаще всего используются в газовой хроматографии.

Таблица 4.6

Основные типы детекторов в газовой хроматографии

Тип детектора	Детектируемые вещества	Предел обнаружения	Диапазон линейности
Катарометр	универсальный	10^{-8} г/мл	10^4
ПВД	органические вещества	10^{-13} г/с	10^7
ДЭЗ	соединения с электроотрицательными атомами	$5 \cdot 10^{-14}$ г/с	$5 \cdot 10^4$
Термоионный	P-содержащие	10^{-15} г/с	10^5
	N-содержащие	10^{-14} г/с	
ПФД	P-содержащие	$3 \cdot 10^{-13}$ г/с	10^5
	S-содержащие	$2 \cdot 10^{-11}$ г/с	

ПВД – пламенно-ионизационный детектор, ДЭЗ – детектор электронного захвата, ПФД – пламенно-фотометрический детектор.

В методе **газоадсорбционной (газотвердофазной) хроматографии** НФ является твердое тело – адсорбент. Разделение происходит за счет процессов адсорбции-десорбции. В этом методе также используют набивные капиллярные и капиллярные полые тонкослойные колонки.

Основные преимущества газоадсорбционной хроматографии перед газожидкостной: более широкий рабочий интервал температур; большая устойчивость положения базовой линии; большая скорость установления равновесия и меньшее время анализа.

К недостаткам можно отнести: несимметричность форм пиков; большие времена удерживания; неоднородность поверхности адсорбента, наличие каталитически активных центров; ограниченный выбор и трудность стандартизации неподвижных фаз.

В качестве НФ используют сажу, графит, алюмосиликаты, органические полимеры (сополимер стирола и дивинилбензола).

4.3. Жидкостная хроматография

Метод хроматографии с использованием *жидкой ПФ* называют жидкостной хроматографией. В жидкостной хроматографии первым был реализован адсорбционный механизм в форме *жидкостно-твердофазной хроматографии*. Распределительный механизм лежит в основе *жидкость-жидкостной хроматографии*. К ней относят *нормально-фазовую* и *обращенно-фазовую хроматографии*. Явления ионного обмена реализованы в ионообменной хроматографии. *Ионной хроматографией* называют высокоэффективную ионообменную хроматографию.

Разделение молекул на пористом материале в соответствии с их размерами (молекулярно-ситовой эффект) положено в основу эксклюзионной хроматографии. Методы эксклюзионной хроматографии называют *гель-хроматографией*.

В большинстве случаев нельзя выделить какой-то один определенный механизм разделения.

4.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Общая принципиальная схема устройства *высокоэффективного жидкостного хроматографа* (ВЭЖХ) показана на рис. 4.8. В комплект входят: емкости для растворителей и ПФ, система ввода пробы, система насосов, предколонка, разделяющая колонка, детектор.

Емкости для жидкостей изготавливают из нержавеющей стали или стекла. Жидкости не должны содержать *растворенные газы* и *взвешенные частицы*. Растворенные газы удаляют продувкой гелия или обработкой ультразвуком. Для удаления твердых частиц растворы фильтруют через микропористый фильтр под вакуумом.

Различают градиентный и изократический режимы элюирования (рис. 4.9). В *изократическом* режиме через колонку подают подвижную фазу одного и того же состава непрерывно. Но при *градиентном* элюировании разделение улучшается. В данном случае состав ПФ (элюента) в процессе разделения изменяют согласно специально задаваемой про-

грамме, при этом сокращается время анализа, полученные пики имеют одинаковую форму и более равномерно расположены на хроматограмме.

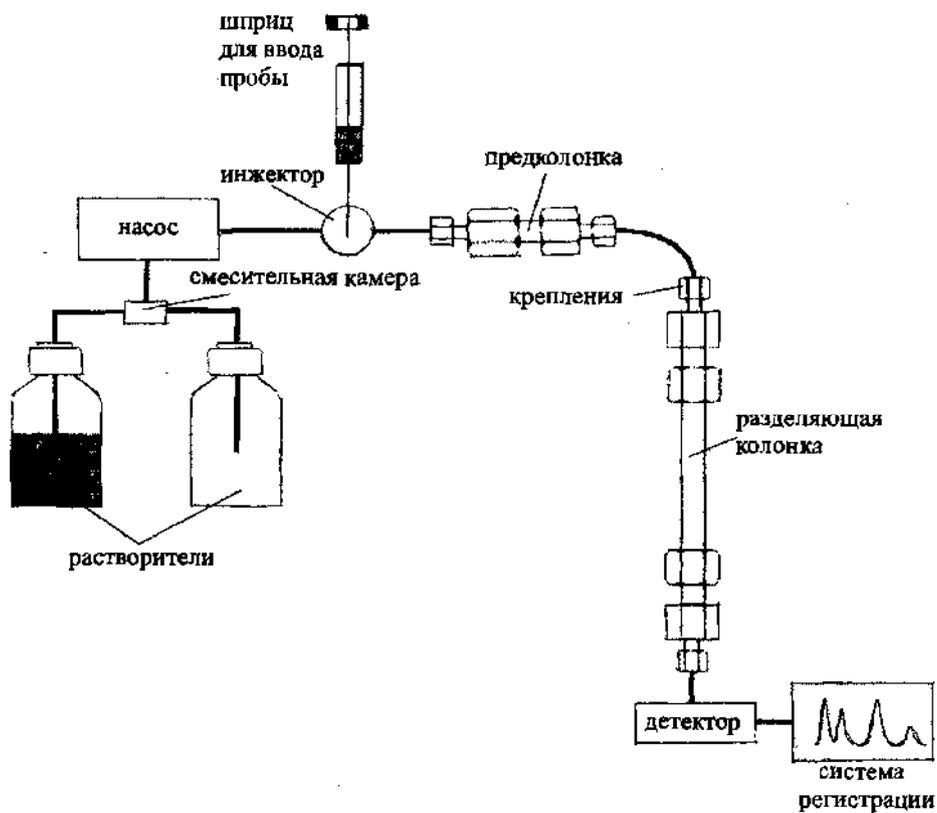


Рис. 4.8. Схема устройства высокоэффективного жидкостного хроматографа с предколонкой

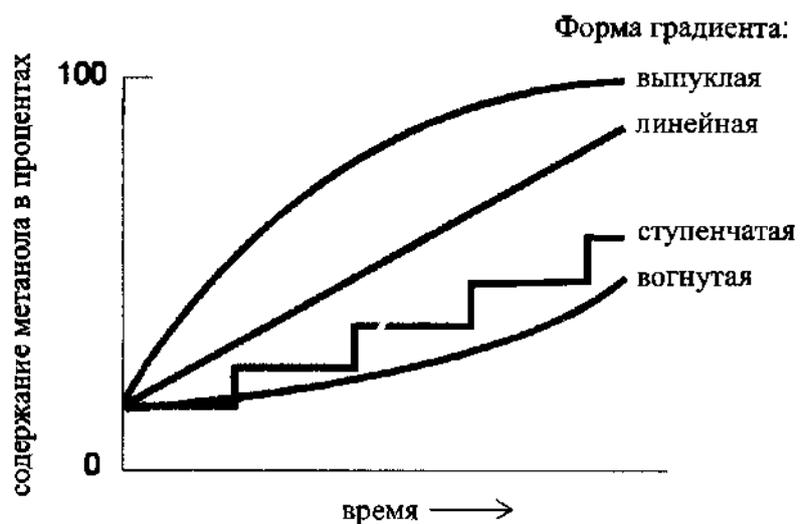


Рис. 4.9. Изменение состава элюента на основе двухкомпонентной системы метанол-вода во времени при градиентном элюировании

Градиент ПФ создают либо в системе высокого, либо низкого давления. В системе *низкого* давления растворители смешивают на входе насоса. В системе *высокого* давления каждый растворитель подают отдельно и смешивают только на выходе, что позволяет точно контролировать соотношения компонентов. При этом давление в системе должно оставаться постоянным. Для подачи дозированного объема пробы используют *петлю инжектора* или автоматические системы, работающие от сжатого воздуха.

Корпуса разделяющих колонок изготавливают из нержавеющей стали или специальных сортов стекла (дюран, пирекс).

При детектировании проводят измерение общего свойства ПФ (показателя преломления, электропроводности) или специфического свойства разделяемых веществ (светопоглощения, флуоресценции, сила тока).

Фотометрическое детектирование. Для измерения светопоглощения ПФ используют проточные фотометрические кюветы (ячейки) Z-образной формы. При измерениях в УФ-области оптические окна кюветы изготавливают из кварца (рис. 4.10).

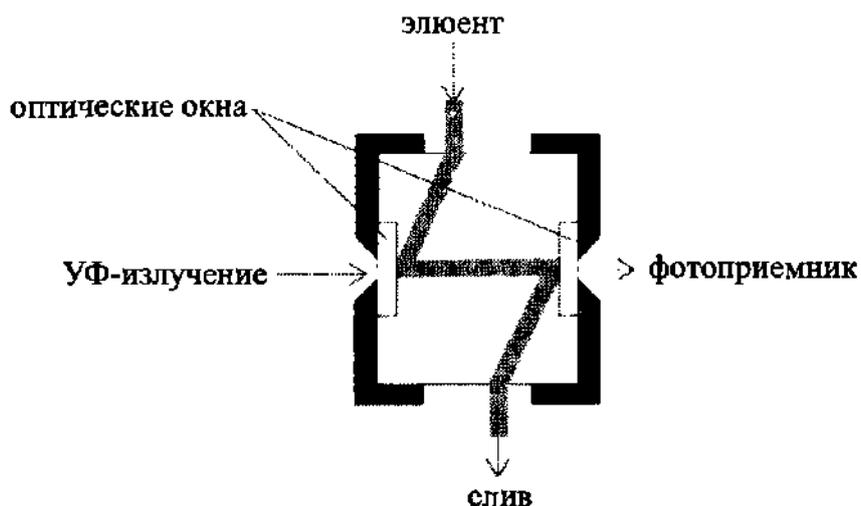


Рис. 4.10. Фотометрическая ячейка для УФ-детектирования

Детектирование в УФ- (или видимой) области можно проводить как при одной, так и нескольких длинах волн. Самый простой фотометрический детектор – *одноволновой* УФ-детектор. Источник света – ртутная лампа. Необходимая длина волны (чаще всего $\lambda = 254$ нм) выделяется светофильтром. Именно вблизи этой длины волны и располагаются максимумы поглощения многих органических и неорганических соединений. Наряду с одноволновыми детекторами используют многоволновые и многоканальные детекторы. Фотометрическое детектирование в ИК-области спектра применяют в специальных случаях.

Флуоресцентные детекторы позволяют повысить чувствительность детектирования приблизительно в 1000 раз по сравнению с фотометрическим. Источником возбуждения флуоресценции чаще всего служат ртутная или ксеноновая лампы. Длина волны выделяется светофильтром. Регистрировать спектр флуоресценции в целом можно спектрофлуориметром. При определении многих биологически активных веществ используют их собственную флуоресценцию. Для детектирования не флуоресцирующих веществ их подвергают дериватизации, т. е. превращают во флуоресцирующие с помощью химических реакций.

Рефрактометрические детекторы. Рефрактометрический метод детектирования применим ко всем веществам при условии, что показатели преломления ПФ и раствора определяемого компонента сильно различаются. Метод основан на измерении показателя преломления ПФ. Для измерения показателя преломления используют призму и проводят как в отраженном, так и в проходящем свете. В качестве примера, на рис. 4.11, показана принципиальная схема рефрактометрического детектора, работающего по принципу отражения света.

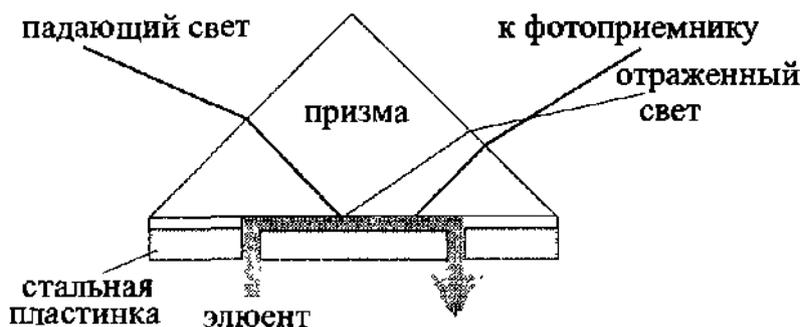


Рис. 4.11. Схема рефрактометрического детектора для ВЭЖХ

В *дифференциальном* детекторе-рефрактометре используют измерительную и ячейку сравнения, через которую непрерывно протекает поток чистого элюента. Чувствительность такого детектора ниже, чем фотометрического в УФ-области.

Электрохимические детекторы основаны на принципах электрохимического измерения и осуществляются методами амперометрии, вольтамперометрии, кондуктометрии и кулонометрии.

Основной метод детектирования в ионной хроматографии – *кондуктометрическое детектирование*, где детектором выступает проточная кондуктометрическая ячейка.

В варианте кулонометрического титрования применяют *кулонометрическое детектирование*, при этом происходит взаимодействие определяемого компонента с электрохимически генерированным реагентом. В ВЭЖХ такой тип детектирования применяют редко.

Амперометрический метод детектирования осуществляют при постоянном значении потенциала индикаторного электрода в области предельного диффузионного тока определяемого вещества. Этим методом детектируют вещества, способные окисляться или восстанавливаться при выбранном потенциале рабочего электрода. При детектировании предпочтение отдается току окисления, т. к. в данном случае растворенный кислород не оказывает мешающего влияния. К сожалению, амперометрическое детектирование нельзя применять в присутствии поверхностно-активных веществ, т. к. они отравляют поверхность рабочего электрода.

Вольтамперометрическое детектирование проводят путем регистрации вольтамперных зависимостей. Для непрерывного детектирования необходимо, чтобы скорость движения ПФ была ниже скорости развертки напряжения. Из-за конструктивных ограничений применяют только стационарные индикаторные электроды. При высоких скоростях развертки детектировать можно только компоненты обратимых окислительно-восстановительных систем.

Примером **спектроскопических детекторов** служит фотометрический детектор с диодной линейкой. Для детектирования используют *атомно-абсорбционную, атомно-эмиссионную спектроскопию, но чаще всего масс-спектрометрию.*

Распределительный вариант жидкостной хроматографии используется намного чаще, чем ионообменный, адсорбционный или эксклюзионный. Методом распределительной хроматографии определяют *незаряженные полярные вещества с молярной массой не более 3000.* НФ является химически модифицированная поверхность носителя (*химически закрепленная фаза*) или *иммобилизованная жидкость.* ПФ представляет собой неполярную жидкость.

Вид хроматографии, когда полярность НФ выше, чем подвижной, называют *нормально-фазовой* хроматографией. Когда НФ малополярна (углеводород), а подвижная – полярна (вода, метанол) – метод называется *обращенно-фазовой* хроматографией. В настоящее время это самый распространенный метод, на его долю приходится около 75 % всех хроматографических анализов.

Выбор ПФ является важным элементом в разработке любой жидкостно-хроматографической методики, так как в отличие от газовой хроматографии, в которой ПФ *химически инертна*, в жидкостной хроматографии между компонентами ПФ и молекулами разделяемых веществ наблюдаются достаточно сильные физико-химические *взаимодействия.*

Разрешение хроматографических пиков зависит от числа теоретических тарелок N , коэффициента емкости k^1 и коэффициента селектив-

ности a . Величины k' и a можно изменять посредством выбора соответствующей ПФ. При этом наибольшую роль играет ее *полярность*.

В табл. 4.7 приведены примеры полярных радикалов, которые используются для синтеза химически закрепленных нормальных хроматографических фаз.

Таблица 4.7

Полярные радикалы, которые используются для синтеза химически закрепленных нормальных хроматографических фаз

Группировка	Радикал
Диольная	$-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
Нитрильная	$-(\text{CH}_2)_3\equiv\text{N}$
Аминная	$-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ($n = 3$ или 4)
Диметиламинная	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Диаминная	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$

Полярность растворителей оценивается *элюотропным рядом*. Количественной мерой служит *индекс полярности* Снайдера (табл. 4.8).

Таблица 4.8

Элюотропный ряд растворителей для жидкостной хроматографии, расположенных в порядке возрастания полярности

Растворитель	Индекс полярности P^1	Элюирующая сила ε° (SiO_2)	Граница прозрачности в УФ-области, нм
Фторированные алканы	< -2	$-0,2$	200
Циклогексан	0,04	0,03	200
Н-гексан	0,1	0,01	195
Тетрахлорид углерода	1,6	0,11	265
Диизопропиловый эфир	2,4	0,22	220
Толуол	2,4	0,22	285
Диэтиловый эфир	2,8	0,38	215
Метиленхлорид	3,1	0,34	230
Тетрагидрофуран	4,0	0,35	210
Хлороформ	4,1	0,26	235
Этанол	4,3	0,68	205
Этилацетат	4,4	0,38	255
Диоксан	4,8	0,49	215
Метанол	5,1	0,73	205
Ацетонитрил	5,8	0,50	190
Нитрометан	6,0	0,49	380
Вода	10,2	большая	170

Для оценки полярности *смесей растворителей* используют аддитивную комбинацию индексов полярности индивидуальных растворителей:

$$P'_{\text{смеси}} = \sum_{i=1}^m \Phi_i P'_i, \quad (4.35)$$

где Φ_i – объемная доля i -го растворителя.

Элюирующая способность растворителя характеризуется *элюирующей силой* ε^o – мера энергии взаимодействия молекул растворителя и НФ (табл. 4.8).

В нормально-фазовой хроматографии полярность НФ выше, чем подвижной, поэтому полярные вещества элюируются в последнюю очередь. Чем менее полярна ПФ, тем больше их времена удерживания. В обращенно-фазовой хроматографии полярные вещества элюируются первыми, чем более полярна ПФ, тем сильнее удерживаются неполярные вещества.

При определении ионогенных веществ элюирующую способность ПФ изменяют, регулируя pH или вводя *ион-парные реагенты*. Эти приемы служат для того, чтобы перевести разделяемые вещества в нейтральные частицы, способные удерживаться на НФ.

Изменяя pH, можно перевести вещества кислотного или основного характера в *равновесную форму*.

С помощью дериватизации можно изменить полярность вещества, повысить чувствительность или селективность детектирования. Если использовать хиральные фазы, то можно разделять даже *энантиомеры*.

Чаще всего неподвижные хиральные фазы создают на основе силикагеля, покрытого полимером. Комплексообразование – один из механизмов взаимодействия разделяемых компонентов с хиральной фазой.

Адсорбционная, или жидкостно-твердофазная, хроматография – самый первый хроматографический метод (работы Цвета). Обычно НФ служит *силикагель* или *оксид алюминия*.

Удерживание компонентов основано на процессах *адсорбции*. С энергетической точки зрения адсорбция – более выгодный процесс, чем распределение вещества между двумя жидкими фазами, поскольку процессы диффузии протекают намного быстрее и времени удерживания меньше, чем в распределительной хроматографии.

К сожалению, в адсорбционной хроматографии даже при малых концентрациях наблюдается *перегрузка* колонки. Это связано с тем, что изотерма адсорбции линейна в ограниченном диапазоне концентраций.

К недостаткам данного метода нужно отнести и необходимость контроля воды в растворителях; т. к. процессы адсорбции идут на *активных центрах* поверхности адсорбента, то сильно полярные молекулы (вода) адсорбируются необратимо и дезактивируют поверхность.

На таких адсорбентах, как силикагель или оксид алюминия времена удерживания веществ различных классов можно представить в виде следующего ряда:

алкены < ароматические углеводороды < галогенпроизводные углеводородов, органические сульфиды < простые эфиры < нитросоединения < сложные эфиры ~ кетоны ~ спирты и амины < сульфоны < сульфоксиды < амиды < карбоновые кислоты.

Очень удобна адсорбционная хроматография для разделения *неполярных веществ* (с самыми разными функциональными группами), *которые плохо растворяются в воде, геометрических изомеров и изомеров положения.*

4.3.2. Ионная хроматография

Высокоэффективный вариант ионообменной хроматографии – называют ионной и применяют для разделения и определения ионов и их различных форм. *Динамический* ионный обмен основан на принципах элюативной хроматографии.

В *классической ионообменной хроматографии* используют ионообменные смолы на основе сополимера стирола и дивинилбензола.

В качестве примера рассмотрим разделение на *анионообменнике* ионов металлов, в виде их *хлоридных комплексов*. Сначала анионит переводят в хлоридную форму соляной кислотой. Затем в колонку вводят раствор пробы в соляной кислоте. В таких условиях большинство катионов металлов переходит в форму хлоридных комплексов и сорбируются на анионообменнике. После этого колонку промывают элюентом. Порядок вымывания ионов соответствует относительной устойчивости их хлоридных комплексов. Полученные фракции анализируют фотометрическим или титриметрическим методами.

На рис. 4.12 показаны хроматограмма и *ступенчатый градиент* концентрации HCl , применяемый для разделения ионов.

Классические ионообменные смолы не пригодны для современной ионной хроматографии.

Взамен них разработаны специальные материалы, которые представляют собой сферические частицы из непористого стекла или высокопрочного полимера, покрытые ионообменником, либо частицы пористого силикагеля, покрытые тонким слоем жидкого ионообменника.

В качестве универсального метода детектирования неорганических ионов используют *кондуктометрию*. Для преодоления ряда сложностей используют подавляющую колонку или *мембранные подавители*.

Принцип действия подавляющей колонки на примере определения анионов. Подавляющую колонку заполняют *катионообменни-*

ком в H^+ -форме и располагают за разделяющей колонкой. ПФ может быть раствор $NaHCO_3/Na_2CO_3$. Компоненты ПФ, выходящие из разделяющей колонки, реагируют с катионообменником подавляющей колонки по уравнениям:

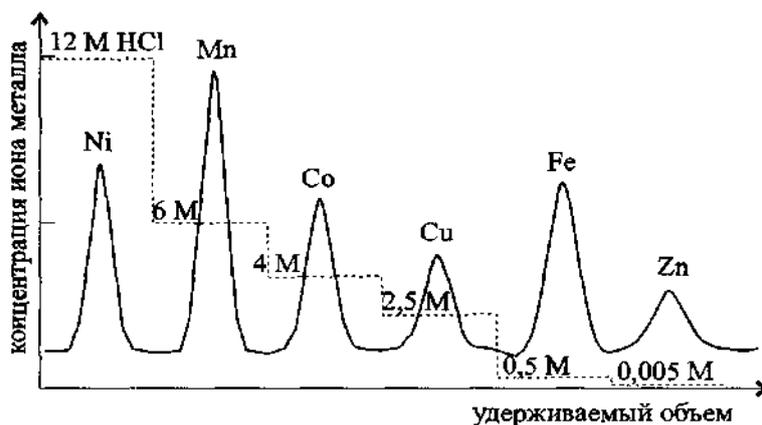
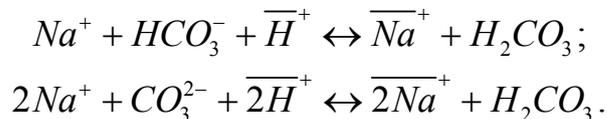


Рис. 4.12. Хроматограмма и ступенчатый градиент концентрации HCl при разделении ионов металлов

Черта символизирует нахождение соответствующего иона в фазе ионообменника. В итоге ионы ПФ превращаются в угольную кислоту, электропроводность которой достаточно мала. Определяемые ионы (Cl^- или NO_3^-) сохраняют свою электропроводность.

На рис. 4.13 приведен пример ионной хроматограммы смеси анионов и условия их определения.

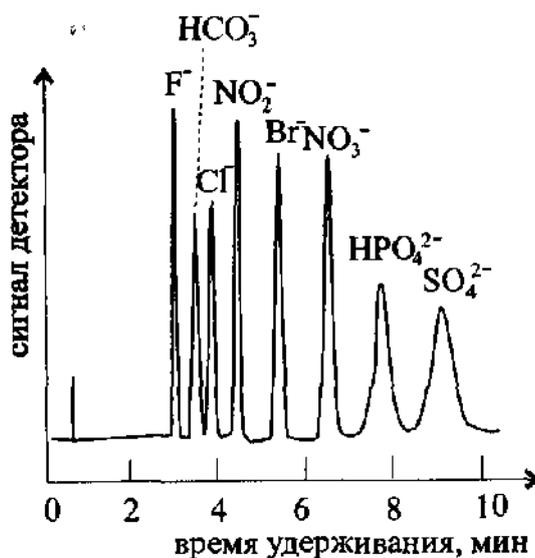
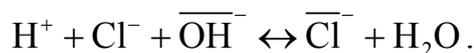


Рис. 4.13. Ионная хроматограмма смеси анионов

Для определения *катионов* разделяющую колонку заполняют катионообменником. Подвижной фазой может служить раствор соляной кислоты, а подавляющую колонку заполняют *анионообменником в OH⁻-форме*. Реакция элюента в подавляющей колонке в этом случае происходит по уравнению



После этого электропроводящими частицами оказываются разделяемые ионы (Na⁺ или K⁺).

Основной недостаток использования подавляющих колонок – необходимость частого регенирирования или замены.

Если собственная электропроводность подвижной фазы мала, то подавляющая колонка не нужна. Если используется фотометрическое детектирование, то также нет необходимости в подавляющей колонке.

4.3.3. Гель-хроматография

Специфическим видом жидкостной хроматографии является *гель-хроматография*, которая основана на принципе разделения молекул в соответствии с их размерами. НФ служат частицы пористого инертного материала с определенным размером пор (силикагель, полимеры). Молекулы с размерами большими, чем размер пор, не задерживаются частицами НФ (эффект *исключения* или *молекулярной эксклюзии*).

Необходимо отметить, что в ходе гель-хроматографического разделения взаимодействий разделяемых частиц с НФ не происходит.

Удерживаемый объем – основная характеристика удерживания – произведение времени удерживания на объемную скорость потока ПФ. По сути, это объем элюента V_E , пропущенный через колонку до момента выхода пика компонента.

Общий объем гель-хроматографической колонки можно определить из

$$V_{\text{общ}} = V_o + V_p + V_{\text{гель}},$$

где V_o – мертвый объем колонки; V_p – суммарный объем пор; $V_{\text{гель}}$ – собственный объем твердой фазы (геля).

Удерживаемый объем неудерживаемых молекул равен мертвому объему V_o . Для молекул, которые свободно проникают в поры геля, удерживаемый объем можно определить как $V_o + V_p$.

В общем случае удерживаемый объем равен

$$V_E = V_o + KV_p$$

где K – коэффициент распределения вещества между порами геля и ПФ

$$K = \frac{V_E - V_o}{V_p} = \frac{C_s}{C_M}, \quad (4.36)$$

в межзеренном пространстве колонки принимает значения от 0 до 1.

При наличии каких-либо физико-химических взаимодействий $K > 1$. Значение K используют при выборе различных носителей.

В качестве наполнителей колонок применяют силикагель, полисахариды, пористые стекла, или синтетические полимеры, с размерами зерен 5–10 мкм. Эти размеры и определяют *границы исключения* молекул, а именно значения относительных молекулярных масс, выше которых молекулы уже не удерживаются гелем. Таким образом, определяющей величиной является *гидродинамический объем* – объем, который занимает сольватированная молекула в растворе, а не молекулярная масса.

В зависимости от природы ПФ методы гель-хроматографии подразделяются на гель-фильтрационную и гель-проникающую.

В *гель-фильтрационной* хроматографии используют гидрофильные гели, ПФ служат *водные растворы* с контролируемым значением pH.

В *гель-проникающей* хроматографии ПФ гидрофобна, а подвижная – неполярна. Этот метод применяют для разделения гидрофобных, нерастворимых в воде веществ.

В качестве детектора используются рефрактометрические, фотометрические (в УФ- или ИК-области) и др., сигнал которых пропорционален концентрации растворенного вещества.

Обычно гель-хроматографию применяют для анализа смесей веществ с относительными молекулярными массами выше 2000. Разновидности гель-хроматографии широко используются для определения *молекулярных масс* и *молекулярно-массового распределения* природных и синтетических полимеров.

Гель-фильтрационную хроматографию часто применяют для отделения высокомолекулярных природных веществ от низкомолекулярных. Например, можно отделять белки от аминокислот и низкомолекулярных пептидов.

С помощью *гель-проникающей* хроматографии можно разделять гомологи и олигомеры гидрофобных органических молекул. Например, жирные кислоты с молекулярными массами от 100–350.

Для определения молекулярных масс используют уравнение

$$\lg M_r = b_0 - b_1 \lg V_E. \quad (4.37)$$

Колонку калибруют по стандартным веществам с известными значениями молекулярных масс M_r и близким по своей природе и свойствам к анализируемым. Измерив для стандартных веществ удерживаемые объемы V_E , находят коэффициенты b_0 и b_1 в уравнении калибровки.

Примеры стандартных веществ, *растворимых в воде*: декстраны, полиэтиленгликоль, сульфированные полистиролы и белки, *нерастворимых в воде*: полистирол, политетрагидрофуран и полиизопрен.

Достоинства гель-хроматографии заключаются в том, что все значения удерживаемых объемов укладываются в интервал между V_o и $V_o + V_p$. Метод характеризуется *небольшими временами удерживания, дает узкие и хорошо воспроизводимые пики*. Однако ввиду ограниченности диапазона значений K (между 0 и 1) *максимальное число разрешенных пиков* в гель-хроматографии относительно невелико.

Этим методом нельзя разделить молекулы *одинакового размера*, (изомеры).

4.3.4. Тонкослойная хроматография

К плоскостным методам хроматографического анализа относят *бумажную* и *тонкослойную* хроматографии, *электрохроматографию*.

В ходе анализа плоский носитель НФ можно использовать непосредственно (например, полоска бумаги), или его наносят в виде тонкого слоя на пластинку. Движение подвижной фазы обеспечивается гравитационными, капиллярными или электромиграционными силами.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – самый распространенный метод плоскостной хроматографии, может рассматриваться как модифицированный вариант колоночной жидкостной хроматографии. Поэтому используют те же НФ. Измельченный носитель наносят на пластинки. Толщина слоя носителя составляет 200–250 мкм, размеры частиц не менее 20 мкм.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) – современным вариант ТСХ. Толщина слоя носителя – 100 мкм, размер зерен не более 5 мкм. Время разделения примерно 10 мин. Пробу на пластинку наносят капилляром. Диаметр пятна не должен превышать 5 мм при качественном анализе, а при количественном еще меньше.

Для *получения хроматограммы* пластинку помещают в камеру, на дно которой налит растворитель. Под действием капиллярных сил растворитель перемещается вверх по пластинке. После того, как растворитель пройдет примерно две трети длины пути, пластинку вынимают из камеры, высушивают и детектируют пятна компонентов пробы.

Отметим, что методы ТСХ, как правило, выступают в качестве обзорных. Поэтому для определения *положения* пятен компонентов пробы существует ряд способов:

1. При использовании *люминесцентных свойств* разделяемых веществ, для неорганических веществ наблюдают фосфоресценцию, для органических – флуоресценцию.

2. Темные пятна на пластине наблюдаются и в результате окисления органических веществ.

Идентификацию вещества осуществляют в сравнении со стандартами (индивидуальными, известными веществами). При этом должны совпасть и положения пятен, и их окраска.

Для детектирования используют измерение интенсивности *локального диффузного отражения света* в УФ- или видимой области с помощью *денситометра* или сканнера. Можно послойно снимать носитель с пластинки и анализировать его отдельные порции спектроскопически.

Для количественной оценки используют *коэффициент удерживания* (R_f) – отношение расстояний, пройденных на пластинке данным веществом (z_R) и фронтом подвижной фазы (z_M):

$$R_f = \frac{z_R}{z_M}. \quad (4.38)$$

Для несимметричных пятен z_R находят по положению максимума интенсивности, а для симметричных – по положению центра пятна.

Связь между величиной R_f и *коэффициентом емкости* можно выразить уравнением:

$$k' = \frac{1 - \frac{z_R}{z_M}}{\frac{z_R}{z_M}} = \frac{1 - R_f}{R_f}. \quad (4.39)$$

Тогда, используя *коэффициент распределения* K и фазовое отношение β , получаем следующее соотношение:

$$R_f = \frac{1}{1 + k'} = \frac{1}{1 + \beta K}. \quad (4.40)$$

Абсолютные значения R_f для идентификации веществ не применяют, поскольку эти значения зависят от условий эксперимента: толщина слоя носителя, влажность ПФ и НФ, температура, степень насыщения хроматографической камеры парами растворителя и т. д. Поэтому предпочтительнее использовать *относительные значения* R_f :

$$R_{f \text{ отн}} = R_{f(\text{в-ва})} / R_{f(\text{станд. в-ва})}, \quad (4.41)$$

Методом ТСХ можно *одновременно проводить* анализ нескольких проб на одной и той же пластинке.

Недостатки метода ТСХ:

1. Скорость потока ПФ не является постоянной величиной, зависит от многих параметров (размеров зерен носителя, вязкости раство-

рителя и т. д.), уменьшается в ходе процесса, что приводит к уширению пятен.

2. При использовании многокомпонентной ПФ ее состав может изменяться в течение процесса, что, соответственно, скажется на воспроизводимости R_f .

Новейший метод тонкослойной хроматографии – радиальная тонкослойная хроматографии, использующая принудительное движение растворителя с постоянной скоростью от центра пластинки к периферии, позволяет в какой-то мере преодолеть данные трудности.

4.4. Сверхкритическая флюидная хроматография и электрофорез

4.4.1. Сверхкритическая флюидная хроматография

Метод сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) сочетает основные достоинства газовой и жидкостной хроматографии.

Совокупность критических значений температуры и давления называется критической точкой, вблизи которой вещество находится в сверхкритическом (флюидном) состоянии. В таком состоянии оно обладает свойствами газа и жидкости. Для хроматографии наиболее важны коэффициенты диффузии, плотность и вязкость. В табл. 4.9 и 4.10 приведены сравнительные данные для газов, сверхкритических флюидов и жидкостей.

Таблица 4.9

Сравнение свойств веществ в газообразном, флюидном и жидком состояниях

Свойство, характеристика	Газы	Сверхкритические флюиды	Жидкости
Плотность, г·см ⁻³	$0,6 \cdot 10^{-3}$ – $2 \cdot 10^{-3}$	0,2–0,5	0,6–2
Вязкость, г·см ⁻¹ ·с ⁻¹	$1 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-2}$ – $3 \cdot 10^{-2}$
Коэффициенты диффузии, см ² ·с ⁻¹	$1 \cdot 10^{-1}$ – $4 \cdot 10^{-1}$	10^{-4} – 10^{-3}	$0,2 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-5}$

Аппаратура для СФХ представляет собой гибрид газовых и жидкостных хроматографов. Основным требованием является поддержание постоянства температуры колонки, которое поддерживается термо-

стативными печами. Также необходимо постоянство давления в колонке, на выходе его сбрасывают с помощью дросселей. От величины давления зависит плотность флюида и коэффициенты емкости. Для контроля давления используют прием *градиентного программирования*.

Таблица 4.10
Критические величины для веществ, используемых как подвижные фазы в сверхкритической флюидной хроматографии

Флюид	Темп. T_k , °С	Давл. p_k , МПа	Плотн. d_k , г·см ⁻³
CO ₂	31,3	7,39	0,468
N ₂ O	36,5	7,27	0,457
NH ₃	132,5	11,40	0,235
Метанол	239,4	8,10	0,272
н-Бутан	152,0	3,80	0,228
Дихлордифторметан	111,8	4,12	0,558
Диэтиловый эфир	195,6	3,64	0,265

В СФХ используют капиллярные и набивные колонки. Чаще всего в качестве подвижной фазы используют CO₂, иногда с добавками модификатора (метанол, диоксан).

Детектируют при помощи фотометрических детекторов в УФ- и ИК-области, флуоресцентных, пламенно-фотометрических детекторов, катарометров, детекторов электронного захвата, ПИД для газовой хроматографии и масс-спектрометра.

Так как флюиды занимают промежуточное положение между газами и жидкостями, то можно использовать *высокие скорости потоков* ПФ. Изменение состава ПФ позволяет контролировать *коэффициент селективности α* .

Хорошая растворимость веществ в сверхкритических фазах позволяет проводить определение при температурах ниже, чем температуры их испарения.

4.4.2. Электрофорез

Метод электрофореза основан на явлении *миграции* – движении ионов в электрическом поле. Различия в величинах подвижностей отдельных ионов используют для их разделения. Большинство электрофоретических методов нельзя отнести к хроматографии, поскольку здесь не происходит распределения частиц между ПФ и НФ. Однако с точки зрения аппаратного оформления и некоторых теоретических положений

ний методы электрофореза сходны с плоскостной и капиллярной хроматографией.

Различают метод простого электрофореза и электрофореза на носителе.

Метод *простого электрофореза* реализован как процесс перемещения ионов вблизи границы контакта исследуемого и буферного растворов (рис. 4.14). Растворы заливают в U-образную трубку. Во избежание механического перемешивания находящийся сверху буферный раствор должен иметь плотность меньшую, чем исследуемый.

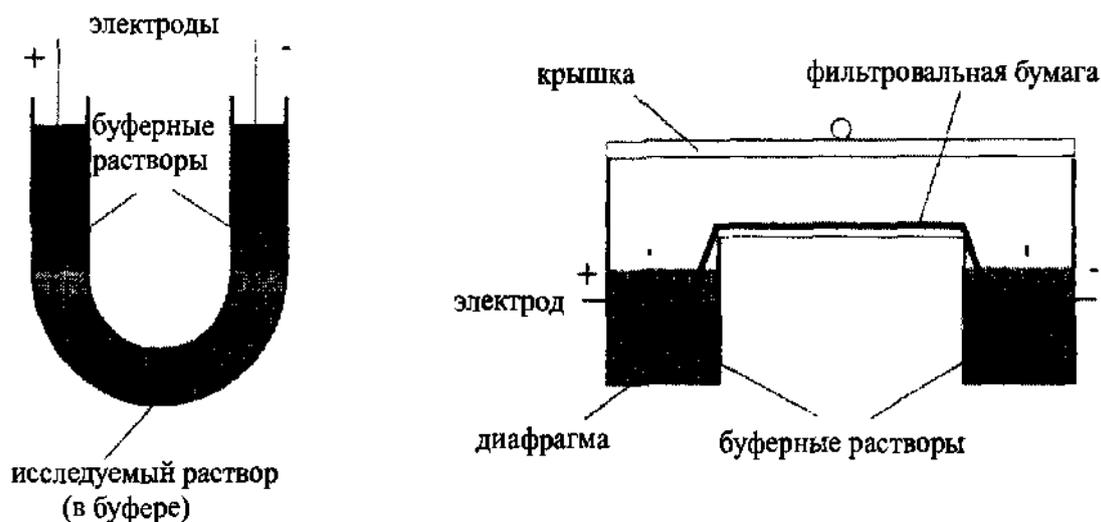


Рис. 4.14. Схемы установок для простого электрофореза (слева) и электрофореза на бумажном носителе (справа)

Если при наложении постоянного напряжения на электроды ионы, находящиеся в исследуемом растворе, концентрируются вблизи поверхности раздела растворов, образуя зоны, такой электрофорез называют *фронтальным*.

Чаще применяют *электрофорез на носителе* – ионы перемещаются в неподвижном слое носителя (бумага, гель, силикагель), который пропитан раствором инертного электролита. Края слоя контактируют с буферными растворами, в которые погружены электроды. Исследуемый раствор в виде полоски наносят у одного из концов слоя носителя. В процессе электрофореза ионы исследуемого раствора образуют отдельные зоны. Такой метод носит название *зонный электрофорез*.

Картина распределения ионов по зонам – называется *электрофорезграммой*.

С помощью подходящей буферной смеси и под действием электрического поля можно создать зоны с соответствующим значением pH (градиент pH) – такой вариант электрофореза называют *изоэлектрическим фокусированием*. Необходимое условие – наличие устойчивого

неподвижного градиента рН. Метод применяют для разделения амфолитов (аминокислот, белков).

Изотахорофрез – вариант электрофореза, основанный на движении различных частиц в электрическом поле с одинаковыми скоростями.

В рассмотренных выше электрофоретических методах частицы движутся в постоянном электрическом поле E с различными скоростями v_i :

$$v_i = Eu_i, \quad (4.42)$$

где u_i – подвижность i -го иона.

Современный вариант электрофореза называют капиллярным электрофорезом или высокоэффективным капиллярным электрофорезом. Использование капиллярной техники позволяет преодолеть недостатки, присущие классическим методам электрофореза, а именно: недостаточную эффективность и воспроизводимость разделения, трудности регистрации зон отдельных ионов.

На рис. 4.15 показана схема установки для капиллярного электрофореза, которая включает: резервуары с буферными растворами, капилляр с системой охлаждения, источник высокого напряжения, устройства ввода пробы, детектора и регистрирующего устройства.

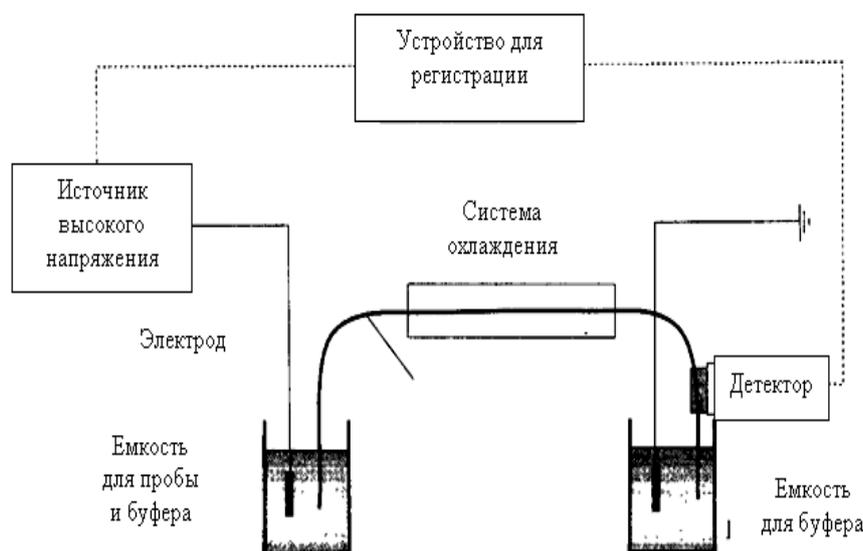


Рис. 4.15. Схема установки для капиллярного электрофореза

Обычно пробу вводят со стороны катода под действием силы тяжести или электрокинетических сил. Во внутреннем пространстве капилляра разделяемые ионы движутся к противоположному электроду. Из-за системы охлаждения капилляр практически не нагревается, поэтому конвекционные потоки жидкости незначительны. Поэтому ширина полученных пиков соответствует теоретически возможному минимуму.

Детектор располагают возле одного из концов капилляра. Расстояние от детектора до противоположного конца капилляра называют *эффективной длиной* капилляра.

Капиллярные методы имеют одну особенность, связанную с *электроосмотическим потоком*. Причина его возникновения – образование *двойного электрического слоя* между раствором и внутренней поверхностью капилляра (рис. 4.16). При этом внутренняя поверхность электрода заряжается отрицательно и притягивает из раствора положительные ионы. Жидкость, находящаяся в капилляре, оказывается заключенной в положительно заряженную трубку. При наложении напряжения весь объем жидкости начинает двигаться к катоду, т. е. происходит образование электроосмотического потока.

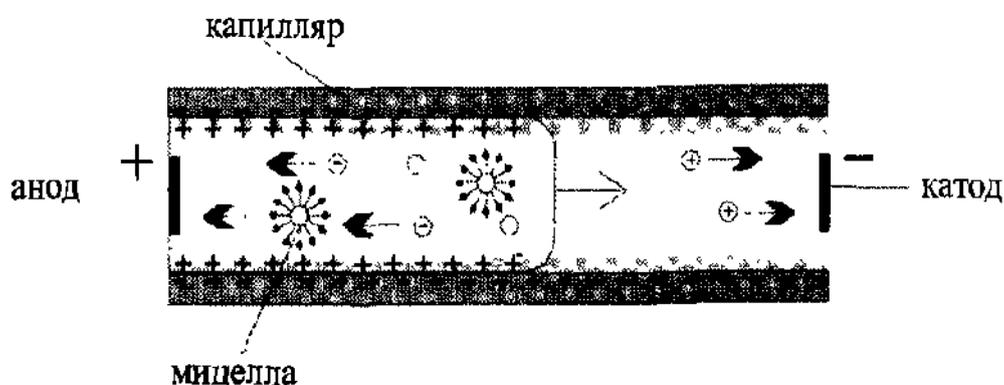


Рис. 4.16. Схема электроосмотического потока, возникающего в результате образования двойного электрического слоя

Электроосмотический поток можно уменьшить, подавить или повернуть в противоположном направлении, используя химическую модификацию капилляра. При отсутствии электроосмотического потока наложение напряжения приводило бы к тому, что все положительные ионы двигались бы к катоду, а отрицательно заряженные – к аноду.

Так как к катоду вместе с электроосмотическим потоком перемещаются и незаряженные частицы, детектор, установленный вблизи катода, регистрирует сначала катионы, затем нейтральные частицы и некоторые анионы. В таких условиях незаряженные частицы движутся с одной и той же скоростью и поэтому не разделяются. Их разделение возможно при наличии в растворе поверхностно-активных веществ, которые образуют *мицеллы*. Такой метод разделения нейтральных частиц называется *мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографией* и основан на *распределительном равновесии* с участием (псевдо)фаз – мицеллярной (аналог ПФ в хроматографии) и фазой раствора (аналог НФ).

4.5. Сочетание хроматографии и спектроскопии

Возможности сочетания отдельных методов хроматографии и спектроскопии представлены в табл. 4.11.

Таблица 4.11

Варианты сочетания методов хроматографии и спектроскопии

Хроматография	Спектроскопия				
	МС	УФ	ИК	ААС	АЭС
ГХ	+++		++		++
ВЭЖХ	++	+++		+	++

«+++» – используется повсеместно, «+ +» – используется часто,
«+» – принципиально возможно

Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии.
Для *капиллярной газовой хроматографии* объединение хроматографа и масс-спектрометра не встречает технических трудностей. В этом случае скорость потока газа-носителя достаточно мала, и выходящий газовый поток можно непосредственно вводить в ионизационную камеру масс-спектрометра.

При использовании *набивных* колонок поток газа слишком велик и не может быть введен в вакуумированную систему масс-спектрометра непосредственно. Поэтому между колонкой и масс-спектрометром устанавливают *сепаратор*.

Действие сепаратора основано на принципе *молекулярных пучков*. Обычно в сочетании с газовой хроматографией используют квадрупольные или секторные магнитные масс-анализаторы. Соответствующие приборы – хромато-масс-спектрометры – серийно выпускаются промышленностью.

В ходе хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием можно регистрировать *полный ионный ток* – сумму ионных токов, отвечающих всевозможным массовым числам – как функцию от времени удерживания. Можно настроить масс-спектрометрический детектор на одно или несколько определенных значений массового числа и непрерывно регистрировать соответствующие ионные токи (селективный мониторинг ионов). Преимуществом этого способа является возможность более длительной регистрации, что увеличивает чувствительность определения.

Для одного пика или всей хроматограммы в целом можно регистрировать и полный масс-спектр. В частности, масс-хроматограмму

можно представить в виде набора отдельных масс-спектров и идентифицировать вещества, пользуясь *библиотекой масс-спектров*.

Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии – очень мощный метод *идентификации* органических веществ по их масс-спектрам. Этим методом можно анализировать пробы сложного состава – природные и сточные воды, продукты питания (в частности, для определения вкусовых и ароматических добавок), определять различные метаболиты в биологических жидкостях.

Путем сравнения масс-спектров, зарегистрированных на *краях пика*, можно судить о том, насколько этот пик соответствует индивидуальному веществу и, таким образом, о полноте хроматографического разделения. Часто для контроля полноты разделения вычисляют отношения интенсивностей характерных масс-спектрометрических пиков при определенных массовых числах. При полном разделении эти отношения должны быть постоянны на всем протяжении хроматографического пика.

Сочетание жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Как и для газовой хроматографии, для ВЭЖХ масс-спектрометрическое детектирование представляет интерес в первую очередь в плане расширения возможностей *идентификации* веществ в многокомпонентных смесях. Однако ввиду использования достаточно больших объемов жидкой фазы в ВЭЖХ непосредственный ввод потока элюата в вакуумную систему масс-спектрометра, как правило, невозможен. Некоторую часть потока можно ввести в масс-спектрометр непосредственно лишь при использовании *микрокапиллярных колонок*, для которых скорость потока жидкой фазы составляет от 10 до 50 мкл/мин. Во всех остальных случаях необходимо применять специальные устройства сопряжения.

Одним из первых таких устройств была движущаяся лента-транспортер, при помощи которой поток жидкости, выходящий из колонки, поступал в нагревательную камеру, где растворитель испарялся. Затем пробу переносили в ионизационную камеру масс-спектрометра и ионизировали ее при помощи десорбционных методов.

В настоящее время для определения неполярных и умеренно полярных веществ чаще всего применяют струйный интерфейс. Полярные соединения определяют, используя термораспыление или химическую ионизацию при атмосферном давлении. Для определения высокополярных, ионных и высокомолекулярных веществ используют электрораспыление.

Сочетание газовой хроматографии и ИК-спектроскопии. Для детектирования в газовой хроматографии посредством ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием используют газовую кювету – стеклянный капилляр длиной от 10 до 40 см и внутренним диаметром 1–3 мм. Внутренние стенки капилляра покрыты слоем золота, поэтому при прохож-

дении через капилляр светового потока наблюдается многократное отражение. Для предотвращения конденсации паров определяемого вещества газовую кювету непрерывно обогревают током горячего газа с температурой до 300 °С.

Для регистрации поглощения в ИК-области используют высокочувствительные детекторы, например на основе теллурида кадмия-ртути. Их охлаждают жидким азотом.

Для регистрации хроматографических пиков применяют универсальный неразрушающий детектор, обычно катарометр. Как и при использовании масс-спектрометрического детектирования, при ИК-детектировании возможно регистрировать как общую величину поглощения, так и поглощение при определенных длинах волн, а также ИК-спектры целиком. Однако если использовать полученные ИК-спектры для идентификации веществ, то следует иметь в виду, что библиотечные ИК-спектры, как правило, относятся к веществам в жидком или твердом состоянии. В газовой же фазе спектры содержат дополнительные полосы, обусловленные вращательными переходами молекул. Напротив, полосы, обусловленные межмолекулярными взаимодействиями, например водородными связями, в газовой фазе, как правило, не наблюдаются.

Существуют и другие способы сочетания хроматографических и спектроскопических методов. В газовой хроматографии используют и **сочетание с атомно-эмиссионным детектированием**. В этом случае поток газа-носителя поступает через нагретый капилляр непосредственно в плазму. В газовой хроматографии обычно используют атомизатор на основе микроволновой, а в жидкостной – на основе индуктивносвязанной плазмы. Хроматография с атомно-эмиссионным детектированием – очень удобный способ определения *отдельных химических форм* какого-либо элемента.

Сочетание ВЭЖХ с атомно-абсорбционным детектированием осуществить особенно просто при использовании гидридной техники для определения элементов, образующих летучие гидриды.

Возможные комбинации различных методов анализа не ограничиваются лишь сочетанием методов хроматографии и спектроскопии. Можно комбинировать между собой отдельные хроматографические методы. Аналогично, возможны и сочетания спектроскопических методов, например в форме тандемной масс-спектрометрии. Следует ожидать, что в будущем появятся новые гибридные методы, сочетающие в себе уже несколько хроматографических и спектроскопических методов в различных комбинациях.

В заключение предложена общая схема выбора хроматографического метода (рис. 4.17).

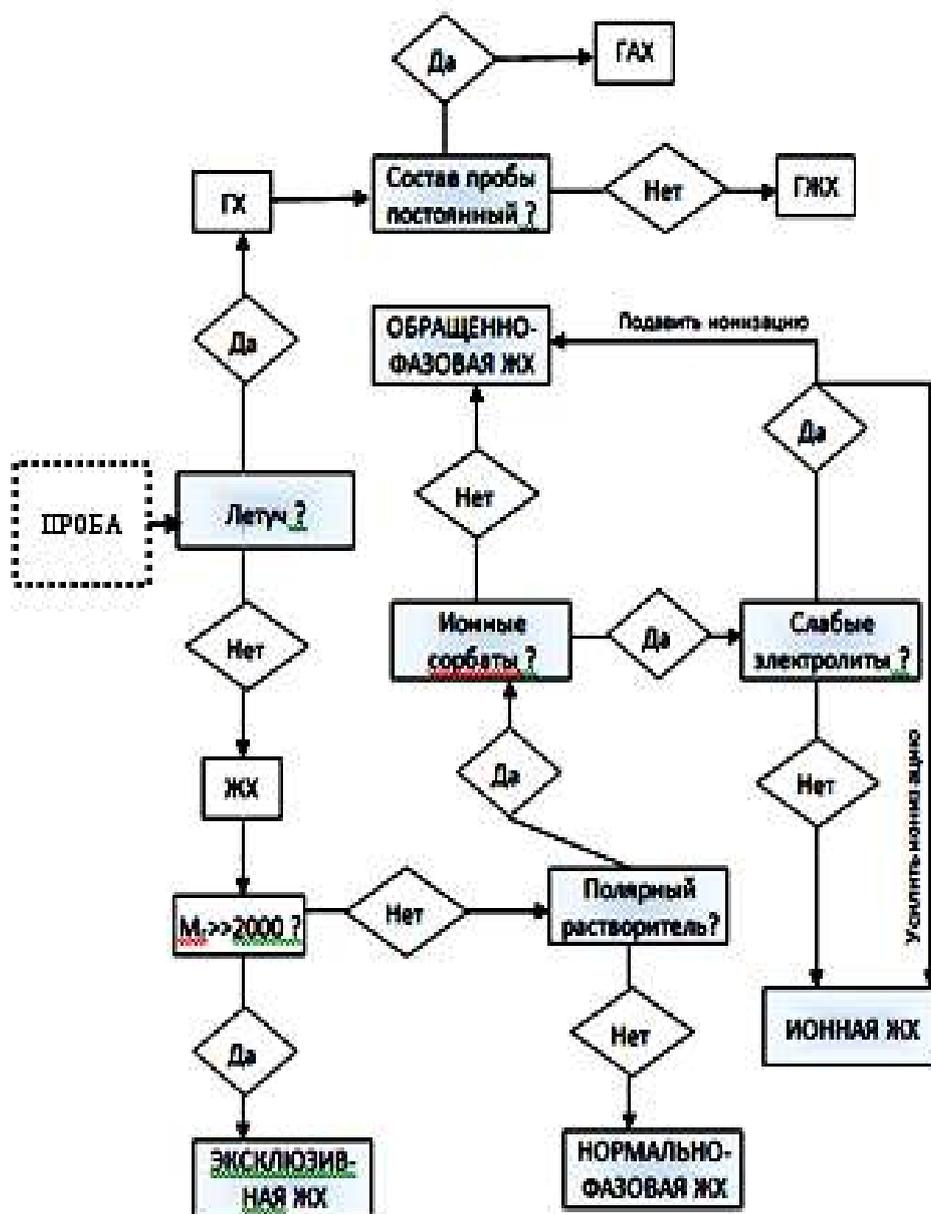


Рис. 4.17. Схема выбора chromatографического метода анализа:
 ГХ – газовая chromatография; ГАХ – газоадсорбционная chromatография;
 ГЖХ – газожидкостная chromatография; ЖХ – жидкостная chromatография

Литература

1. Отто М. Современные методы аналитической химии. В 2-х томах. Том 2 / М. Отто. – Москва : Техносфера, 2004. – 288 с.
2. Золотов, Ю.А. Основы аналитической химии. В 2 книгах. Книга 1. Общие вопросы Методы разделения : учебник для вузов / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др.; под ред Ю.А. Золотова. – 3-е изд., перераб и доп. – Москва : Высшая школа, 2004. – 361 с.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем преимущества элюентной хроматографии перед фронтальной и вытеснительной?
2. Почему предпочитают использовать величину исправленного объема удерживания, а не удерживаемого объема?
3. Какие величины характеризуют эффективность хроматографической колонки? Как ее повысить?
4. Как оценивают эффективность разделения в хроматографии?
5. Объясните, почему при больших объемах элюирования хроматографические пики получаются низкими и широкими.
6. Как влияет скорость потока на эффективность хроматографической колонки?
7. Почему нежелательны слишком высокие и очень низкие значения коэффициентов распределения?
8. Какие хроматографические условия надо менять, чтобы уменьшить вклад в величину N трех составляющих уравнения Ван-Деемтера?
9. Какие хроматографические параметры можно использовать для идентификации компонентов смеси?
10. Укажите возможности и ограничения разных количественных методов хроматографического анализа.
11. Почему результаты идентификации веществ более надежны, если использовать индексы удерживания, а не удерживаемый объем?
12. Что такое градиентное элюирование, какое оно дает преимущество?
13. Предложите условия разделения водорастворимых витаминов методом хроматографии.
14. Какова роль основных узлов в газовом и жидкостном хроматографах высокого давления? Что общего и каковы принципиальные отличия?
15. Сравните роль подвижных фаз в газожидкостной и жидкостной хроматографии.
16. Какова роль полярности подвижной фазы при разделении органических соединений, например при разделении изомеров бензола?
17. Какой вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии вы выбрали бы при разделении аминов и спиртов: нормально- или обращенно-фазовый? Предложите схему хроматографического разделения.
18. Как выполняют количественный анализ в методе ТСХ?
19. Что такое электрофоретическая подвижность? От каких факторов и как она зависит?

Глава 5

АНАЛИЗ РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

5.1. Результаты применения ИК-спектromетрии в фармацевтическом анализе

Рассмотрены алгоритмы идентификации лекарственных субстанций и препаратов по производителям при случайной выборке, а также методики для выявления контрафактной продукции. Все представленные результаты – итог статистической обработки впервые созданных библиотек БИК-спектров, включающих 42 лекарственных субстанции и 355 наименований готовых лекарственных форм. Представленные примеры демонстрируют возможность идентификации фальсификатов и повышение уровня оценки качества фармацевтической продукции на основании дополнительной аналитической информации, ранее недоступной при использовании традиционных методов контроля.

Идентификация производителя лекарственной субстанции

Фармацевтические субстанции по традиции часто продолжают рассматриваться как одна из разновидностей лекарственных средств, что соответствует законодательству многих стран. В практическом же плане субстанции относятся к категории сырья для промышленного изготовления фармацевтических продуктов – лекарственных препаратов в готовых (дозированных) формах. Это нашло отражение в терминологии – во многих нормативных и методических документах субстанции стали именоваться «активными ингредиентами».

Основная доля ответственности за выбор надлежащих исходных веществ и за проверку их качества возлагается на производителей готовых продуктов. Производители фармацевтических препаратов проводят углубленное сравнительное изучение химических и физических свойств, а так же технологических параметров (профиль примесей, полиморфизм, гранулометрический состав, характер кристаллов, сыпучесть, насыпной вес и др.) субстанций различного происхождения и градаций. По результатам этих исследований и с учетом последующих технологических разработок составляются внутренние спецификации качества для исходных материалов и выбираются их поставщики.

Известно, что свойства субстанций даже одного производителя отличаются по многим технологическим и некоторым физико-химическим показателям, контроль которых не предусмотрен фармакопеями веду-

щих стран или стандартами фирмы. Некоторые компании выпускают по несколько «сортов» субстанций одного вида, и эти сведения не всегда известны закупающим предприятиям, несмотря на то, что использование разных субстанций потребует корректировки технологического процесса изготовления из них лекарственной формы. Таким образом, для фармацевтической практики представляет интерес поиск таких методов, которые позволили бы отличить продукцию различных производителей и отдельных серий каждого производителя. Для этих целей – контроля качества и доказательства идентичности субстанций – метод БИК-спектроскопии не имеет конкурентов.

На примере лекарственных субстанций ампициллина натриевой соли, ампициллина тригидрата, цефазолина натриевой соли, цефотаксима натриевой соли, цефтриаксона натриевой соли, метамизола натрия и таурина было показано, что в БИК-области могут быть выявлены спектральные различия между лекарственными субстанциями одного наименования различных производителей. Исследования проводили на БИК-спектрометрах, отличающихся программным обеспечением и формой итоговых результатов, – «ANTARIS II», Thermo Scientific (США) и «Multi Purpose Analyzer», BRUKER Optik GmbH (Германия). Применение в исследованиях приборов разных фирм позволило расширить сведения о возможностях хемометрической обработки спектральных данных и представления результатов анализа разными типами программного обеспечения БИК-спектрометров.

Первоначально была предпринята попытка извлечь информацию из первичных БИК-спектров нескольких субстанций лекарственных средств, как это происходит при интерпретации ИК-спектров в средней области. Традиционный подход позволил накопить экспериментальную информацию и сделать ряд предварительных заключений по первичным БИК-спектрам для субстанций нескольких серий разных производителей: ампициллина натрия (3 производителя), ампициллина тригидрата (2 производителя), цефазолина натриевой соли (3 производителя), цефотаксима натриевой соли (2 производителя).

Для работы использовался БИК-спектрометр «Multi Purpose Analyzer» («BRUKER Optik GmbH», Германия). Перед снятием спектра для исключения влияния диоксида углерода и воды предварительно снимали фоновый спектр воздуха. Для каждой пробы снимали не менее 9 спектров и, используя программное обеспечение прибора, генерировали средний спектр. Оптимальные условия измерения подбирали с учетом соотношения сигнал – шум и минимального времени записи одного спектра. Число сканов равнялось 32. На получение одного спектра требовалось в среднем около 25 с.

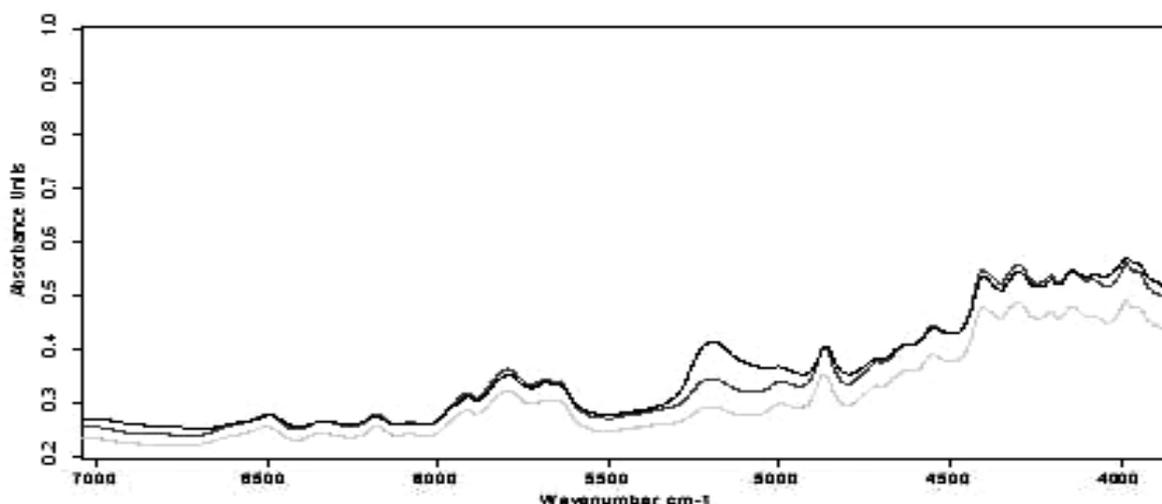


Рис. 5.1. БИК-спектры субстанции цефазолина натриевой соли трех производителей

В спектре цефазолина натриевой соли (рис. 5.1) достаточно информативны следующие участки: полоса в области 8500 см^{-1} относится ко второму обертому валентного колебания CH_3 -группы; широкая полоса при 7000 см^{-1} отражает первый обертом смещения CH -, CH_2 - и CH_3 -групп, область 5750 см^{-1} – первый обертом CH -группы; область 5220 см^{-1} – первый обертом группы CONH_2 .

Как и ожидалось, рассмотренные БИК-спектры не позволили выявить различия между субстанциями отдельных производителей. Это оказалось возможным только после обработки спектров методами математической статистики. Для этого проводили генерирование стандартных спектров исследуемых субстанций. Стандартный (библиотечный, «опорный») спектр субстанции получали усреднением множества спектров, снятых для нескольких ее качественных серий при многократных повторностях.

Хемометрическая обработка спектров методом главных компонент (МГК, Principal Component) в рамках возможностей программного обеспечения спектрометра МРА, BRUKER позволила перенести спектральные результаты в систему координат X , Y и представить их в виде областей скопления точек. Каждая точка на модифицированном спектре соответствовала в пространстве спектру отдельной субстанции. В трехмерном пространстве, где координатные оси – это векторы главных компонент (ГК), точки группируются в области. Главную компоненту следует рассматривать как направление наибольшего изменения в пространстве переменной X или Y . Таким образом, совокупности близлежащих точек одной группы объединяются в общую область – эллипсоид

или сферу. Как оказалось, группы точек или занимаемые ими сферические/эллипсоидные пространства соответствуют образцам субстанций разных производителей.

Аналогичные результаты были получены и для субстанций цефтриаксона натриевой соли (3 производителя), метамизола натрия (2 производителя) и таурина (2 производителя) при анализе их на БИК-спектрометре «ANTARIS II». Измерения также проводили в режиме диффузного отражения с использованием интегрирующей сферы. Для каждой пробы снимали не менее 9 спектров. Число сканов равнялось 16, разрешение – 4 см^{-1} .

Как и при работе на БИК-спектрометре фирмы BRUKER, исходные спектры исследуемых субстанций практически не отличались по числу полос и их частотному расположению, но по величине абсорбции имели заметные различия. Тем не менее полученная спектральная картина не позволила разработать алгоритм для отличия субстанций разного происхождения. Последующая статистическая обработка спектральных результатов дала иной результат, характеризующийся высокой информативностью.

Как и в случае исследования субстанции таурина, при ИК-спектральном анализе в ближнем диапазоне лекарственной субстанции метамизола натрия в координатах Махаланобиса были обнаружены статистически достоверные различия между двумя классами, соответствующими двум производителям (рис. 5.2).

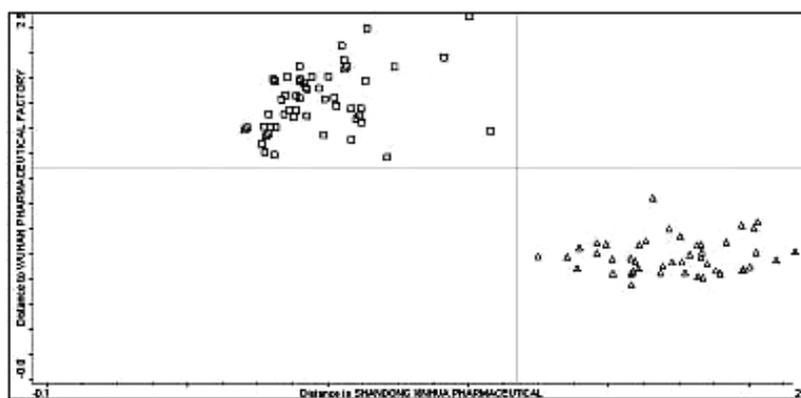


Рис. 5.2. Статистическое разделение образцов субстанции метамизола натрия в координатах махаланобиса: квадраты – субстанции Shandog Xinhua Pharmaceutical Company, Китай; треугольники – субстанции Wuhan Pharmaceutical Factory, Китай

Значения расстояний между выделенными классами менее трех единиц Махаланобиса свидетельствуют об отсутствии достоверных различий между образцами субстанций двух производителей. Субстанции идентичны и по своей химической природе, представляют собой мета-

мизол натрия. Тем не менее графическое разделение результатов на два класса позволяет судить о качественных различиях образцов двух производителей, что может быть использовано для идентификации источника анализируемой субстанции.

Дискриминантный анализ результатов показал, что различия между всеми тремя классами превышают три единицы Махаланобиса. Особенно значительны различия между субстанциями Orchid Chemicals & Pharmaceuticals Ltd, Индия, и Harbin Pharmaceutical Group Co, Китай. Они составляют 5–7 единиц Махаланобиса. Таким образом, выявлено, что исследованные лекарственные субстанции представляют собой качественно разные образцы, хотя нормативные методы не позволили выявить различий между ними.

Таким образом, в результате сравнительного анализа большой выборки БИК-спектров лекарственных субстанций были созданы спектральные библиотеки по 13 производителям. Метод сравнения в рамках дискриминантного и кластерного анализа позволил провести оценку спектральных различий (координаты Махаланобиса) в выпускаемой ими продукции. Впервые были продемонстрированы особенности качества субстанций, не идентифицируемые существующими нормативными методами. Спектральные различия между субстанциями одного наименования могут быть обусловлены расхождениями в технологии получения, а значит, присутствием примесей различной природы. Разная степень очистки субстанций, присутствие влаги, нахождение активного вещества в том или ином фазовом состоянии (полиморфизм), разная степень дисперсности, длительность хранения субстанции при неидентичных параметрах – некоторые из возможных причин наблюдаемых различий.

Создание спектральной библиотеки позволяет в дальнейшем использовать ее для идентификации производителя. Приведенные ниже примеры доказывают возможность идентификации неизвестного производителя субстанций методом дискриминантного анализа с использованием накопленной базы БИК-спектров для одного наименования субстанции разных производителей.

Для решения поставленной задачи были использованы уже ранее классифицируемые БИК-спектры субстанции цефазолина натриевой соли стерильной от двух производителей – Harbin Pharmaceutical Group Co, Китай и Aurobindo Pharma Ltd, Индия. БИК-спектры 12 серий производителя Harbin Pharmaceutical Group Co были разделены на две группы по 6 серий в каждой. Первой группе из шести серий был присвоен статус тестируемого класса. Субстанция другого производителя Aurobindo Pharma Ltd была представлена 5 заводскими сериями. Было прогнозиро-

вано, что при анализе спектры тестируемого класса и «опорного» класса, куда вошли оставшиеся серии производителя Harbin Pharmaceutical Group, должны занять одну и ту же область в координатах Махаланобиса. Как следует из полученных результатов, спектры лекарственных субстанций производства Aurobindo Pharma Ltd, Индия (квадраты), занимают отдельную область в левом верхнем углу графика. Спектры тестируемого и опорного классов (Harbin Pharmaceutical Group Co), как и следовало ожидать, расположены в одной области – в правом нижнем углу графика. Спектральная дистанция между спектрами разных производителей, выражающаяся по оси X и Y в единицах Махаланобиса, составляла от 2,1 до 3,3. Спектральное расстояние между тестируемым и опорным классами не превышало 0,4–1,0 единицы Махаланобиса.

Разработанные алгоритмы определения производителя на базе созданной спектральной библиотеки позволили осуществить идентификацию одной из субстанций цефазолина натриевой соли «вслепую», не зная ее производителя. Идентификацию исследуемой субстанции не удалось провести по совпадению с существующей библиотекой спектров, что свидетельствовало о принадлежности субстанции «неизвестному» производителю, пока не включенному в банк спектральных данных. Действительно, в спектральной библиотеке ближайшим классом по производителю оказался «Харбин фармасьютикал групп», и он находился на расстоянии 17,5 единицы Махаланобиса от исследуемой субстанции. Раскрытие «неизвестного» производителя цефазолина натриевой соли подтвердило правильность выбранной нами модели-субстанция принадлежала компании «G. Amphray Laboratories», Индия, и пока не входила в имеющуюся спектральную библиотеку.

Таким образом, приведенные экспериментальные данные по идентификации производителей продемонстрировали исключительную возможность метода БИК-спектроскопии при использовании группировочных статистических методов обработки спектров провести как разделение спектров на группы производителей, так и определить неизвестного производителя субстанции по принадлежности к группе производителей, внесенных в спектральную базу.

Особенности анализа готовых лекарственных форм

Определенный интерес в ходе работы представляло исследование возможности идентификации не только субстанций, но и готовых лекарственных форм, поскольку лекарственные препараты представляют собой многокомпонентные системы, а это, в свою очередь, накладывает определенный отпечаток на проведение исследований методом БИК-спектрометрии.

В качестве модельных препаратов были выбраны таблетки с действующим веществом эналаприла малеат (20 мг) пяти производителей.

Полученные спектры, на первый взгляд, однотипны, в том числе по интенсивности, если рассматривать в качестве базовой линии левую часть спектра. Незначительные спектральные различия могут быть связаны с природой вспомогательных веществ в таблетках. В соответствии с нормативной документацией список вспомогательных веществ таблеток указанных производителей следующий: везде присутствуют лактоза моногидрат (наполнитель, 90 %) и стеарат магния. Различия существуют при выборе связывающих веществ – кукурузный крахмал (Эналаприл-Яка 80, Ренитек, Энап), желатин (Эналаприл-Хемофарм), целлюлоза микрокристаллическая (Эднит-Гедеон Рихтер), а также в наличии/отсутствии некоторых вспомогательных веществ, например красителей.

Таким образом, однотипность спектральной картины обусловлена присутствием в составе таблеток практически одних и тех же веществ, в первую очередь действующего вещества – эналаприла малеата, а появление нескольких дополнительных полос поглощения связано с различной природой связывающих веществ и красителей. Интенсивность поглощения в диапазоне $4000\text{--}7000\text{ см}^{-1}$ характеризует разницу в количественном соотношении этих вспомогательных веществ.

Как и в случае субстанций, хемометрическая обработка спектров таблеток одного МНН «Эналаприл» методом главных компонент позволила разделить их по группам в зависимости от производителя.

Проведенное исследование продемонстрировало возможности метода БИК-спектрометрии безошибочно группировать многокомпонентные системы, имеющие частично схожий состав, основываясь на присутствии им спектральных различий на примере дженериков эналаприла. Полученные результаты явились основой для создания спектральных библиотек по препарату и производителю для последующего идентификационного анализа ЛС.

Таким образом, результаты, полученные на БИК-спектрометрах с совершенно разным статистическим подходом, продемонстрировали возможность идентификации производителя субстанций и ЛП. Достоинством дискриминантного анализа («ANTARIS II») явилась возможность цифровой оценки исследуемых различий в единицах Махаланобиса.

Созданная в ходе исследования экспериментальная библиотека, включающая более 18 000 спектров субстанций и препаратов, использовалась в дальнейшем для идентификации и оценки качества ЛС, а также для выявления фальсифицированной фармацевтической продукции. При этом библиотека постоянно пополнялась сведениями о субстанциях, препаратах, информацией о контрафактной и фальсифицированной продукции.

5.2. Экстракционно-фотометрическое определение лекарственных веществ в органических и водно-органических средах

Применение органических растворителей в фотометрическом анализе явилось шагом вперед в плане обеспечения повышения чувствительности и избирательности фотометрических определений по сравнению с водными средами. Гибридный метод анализа – экстракционно-фотометрический вариант – нашел применение и в фармацевтическом анализе, как это видно из табл. 5.1.

Исторически первыми в экстракционно-фотометрических определениях лекарственных препаратов, содержащих третичный атом азота, были применены такие красители, как метиловый оранжевый, оранжевый Ж, бромфеноловый синий, конго красный, эозинат натрия, тропеолин 000–1, кислотный ярко-оранжевый, бромкрезоловый пурпуровый и др., образующие с лекарственными веществами экстрагирующиеся ионные ассоциаты. С применением бромтимолового и бромфенолового синего определялись производные хинуклидина, бензимидазола, пирролидина, производные индола, сложных эфиров арилаллифатических кислот с третичным атомом азота, эфедрина гидрохлорида, диэтифена, циклодола, димедрола, промедола, бигумалия, дипразина, новокаинамида в лекарственных формах, содержащих несколько компонентов. С применением метилового оранжевого разработаны экстракционно-фотометрические методики определения тропановых алкалоидов в растительном сырье, настояках, экстрактах, фентанила в растворе для инъекций. Разработаны экстракционно-фотометрические варианты определения анальгина, адамона. В экстракционно-фотометрических определениях последнего времени нашли применение полиметиновые красители, сульфоназо, пикриновая кислота. В качестве экстрагентов чаще всего описаны хлороформ, н-бутанол, толуол и др.

Отмечается, что некоторые преимущества в плане повышения чувствительности определения может дать применение субстехиометрического экстракционно-фотометрического варианта, однако он не нашел еще широкого применения.

Оценивая чувствительность экстракционно-фотометрического варианта определения лекарственных средств, можно отметить, что она выше фотометрического варианта в водных средах, поскольку возможно определение концентрации лекарственных веществ в основном в диапазоне от целых до десятков микрограмм.

Таблица 5.1

Лекарственное средство	Фармацевтическая группа	Лекарственная форма	Объект	Реагент	Условия образования аналитической формы	Метрологические характеристики
Пироксикам, 4-гидрокси-2-метил 3-(N-пиридил-2)-карбоксамидо 2Н-1,2-бензотиазин-1,1-диоксид	Нестероидный противовоспалительный препарат	Таблетки, модельные растворы, капсулы	«Пироксикам В» капсулы; «Пироксикам» таблетки; «Федин» капсулы	Полиметиновый краситель-5-тиоцианат, 3,3-триметил-2-[(1E)-3-[(2E)-1,3,3-триметил-1-Н-индол-2-илидин]-пропенил]-3Н-индолия хлорида (ТТШИ)	рН 8; $\lambda = 569$ нм; экстрагент-метанол, хлороформ, этанол, циклогексанон, толуол	ДОС: 1,0–20,0 мкг/мл; ПРО: 0,49 мкг/мл S _r = 0,041 (Пироксикам В); S = 0,007 (Пироксикам); S = 0,016 г (таблетки)
Флуоксетин (RS)-N-метил-3-фенил-3-[4-(трифторметил)-фенокси] про	Антидепрессант	Капсулы	Капсулы по 10,0 и 20,0 мг	Оранжевый II	рН 3; $\lambda = 482$ нм; эктдихлорметан	БЛБ: 0,2–9,0 мг/мл; S _r = 0,022 и 0,0038; ПРО: 0,17 мкг/мл
Фентанил, 1 – (β -фенил-этил)-4-N-пропионил-фенил-амино)-пиперидин	Синтетический наркотический анальгетик	Раствор для инъекций	Препарат «Раствор фентанила 0,005 % для инъекций»	Метилловый оранжевый (МО), тропеолин (ТО)	рН 2; $\lambda_{\max} = 545$ нм (ТО) и 525 нм (МО); экстрагент-хлороформ	Огн. погребность: $\pm 1,1$ %; S _r = 0,4226 (ТО) и $\pm 2,4$ %; S = 0,9144 (МО)

Окончание табл. 5.1

Лекарственное средство	Фармацевтическая группа	Лекарственная форма	Объект	Реагент	Условия образования аналитической формы	Метрологические характеристики
Производные хинуклидина, бензимидазола, топана, пирролидина	Квалидил (К)-антидеполяризующий миорелаксант	Квалидил-раствор; фенкарол-таблетки; гигроний-ампулы; тропafen-лиофилизированный (0,02 г)	Раствор квалидила (2 %-1 г); таблетки фенкарола (0,025 г); Тропафен-лиофилизированный (0,02 г)	Бромфеноловый синий (К); Бромтимоловый синий (Ф и Г); метиловый оранжевый (Т); кислотный яркий-оранжевый (Д)	Экстрагент-хлороформ; рН 9,2; $\lambda_{\max} = 540$ нм (К); рН 7,8; $\lambda_{\max} = 400$ нм (Ф); рН 6,3; $\lambda_{\max} = 417-418$;	Чувствительность 0,5 мкг/мл (К); 0,4 мкг/мл (Ф); 1,6 мкг/мл (Д); 0,3 мкг/мл (Г). БЛБ: 6-24 мкг/мл (К); 1-32 мкг/мл (Ф); 2-24 мкг/мл (Д); 20-100 мкг/мл
Сумма тропановых алкалоидов	Атропин, холинотор	—	Сухой экстракт и настойка красавки	Метилловый оранжевый	рН 5,4; $\lambda_{\max} = 428-430$; экстрагент-хлороформ	Чувствительность 0,3 мкг в 1 мл БЛБ: 2,5-25 мкг/мл

5.3. Фотометрическое определение лекарственных веществ

В последнее десятилетие интенсивно изучается влияние факторов среды на различные химико-аналитические реакции и процессы. Особая роль принадлежит организованным средам, в частности содержащим мицеллярные системы, которые, в отличие от классических гомогенных сред, являются микрогетерогенными. Это означает, что такие среды содержат, кроме растворителя, большое количество мицелл – специфических ансамблей молекул или ионов, что характерно для коллоидных поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Мицеллы ПАВ – устойчивые агрегаты (средний радиус 24–30 Å и более, $n \geq 20$ –100). Причина устойчивости таких агрегатов состоит в том, что уменьшение энтропии вследствие частичного упорядочения системы при организации молекул в мицеллы и электростатическое отталкивание ионов компенсируются образованием дополнительного числа водородных связей между молекулами воды при уменьшении контактов гидрофобных молекул с полярным растворителем. Высказано много соображений о том, что ядро мицеллы обладает свойством углеводородной фазы, однако в последнее время появились доказательства в пользу того, что внутри мицелл содержится значительное количество воды (33–46 об. % воды для ДДС).

Применение организованных сред на основе ПАВ оказалось эффективным для существенного снижения чувствительности реакций определения многих лекарственных форм.

В работе [Фармацевтический анализ: Проблемы аналитической химии. Г.К. Будникова, С.Ю. Гармонов, 2013] обобщены результаты исследования влияния организованных сред на основе анионных ПАВ на фотометрические реакции первичных ароматических аминов с ароматическими альдегидами, к которым принадлежит большое количество лекарственных средств разных фармакологических групп (табл. 5.2).

В фотометрии лекарственных средств в организованных средах важная роль принадлежит реакциям следующих типов:

- нуклеофильное присоединение (образование оснований Шиффа, ациформ нитросоединений);
- электрофильное замещение (реакции азосочетания);
- нуклеофильное замещение (образование хинониминов).

Реакции конденсации аминов с карбонилсодержащими соединениями (образование оснований Шиффа, полиметиновых красителей, табл. 5.2 № 1–14). Продукт конденсации – азометин (основание Шиффа (ОШ)) может находиться в двух таутомерных формах: бензоидной и хиноидной. Причем аналитически значимой для фотометрии является хиноидная форма. Роль ионов ПАВ сводится к стабилизации хиноидной формы основания Шиффа путем образования ассоциата с анионом.

Таблица 5.2

*Применение организованных сред на основе различных ПАВ
для спектрофотометрического определения лекарственных веществ*

№	Лекарственное средство	Фармацевтическая группа	Аналит (объект)	Реагент	ПАВ*	дос*, про, S r
1	2	3	4	5	6	8
1	Никотиновая кислота	Витамин В (РР) 3	Пиридин, никотиновая кислота (таблетки)	Цианбромид, ариламины (анилин)	ДДС, ЦПХ, Тригон Х-100	ДОС = $(3-9) \cdot 10^{-6}$ М; S = 2 %; r про = $.10-7$ М
2	То же	То же	Никотиновая кислота (таблетки)	То же	ЦПХ, ЦТАБ	Про = $1,2 \cdot 10^{-6}$ М
3	Амоксициллин, ампициллин, цефалоксин	антибиотики	6-амино- пенициллиновая и 7-аминоцефалоспориновая кислоты (таблетки)	4-диметил-аминобен-зальдегид (ДМАБА)	ДДС	–
4	Новокаин (β-(диэтила-миноэти-лово-го эфира)-л-аминобензой-ной кислоты гидрохлорид)	Анестетик	Новокаин (биологические жидкости)	4-диметила-мино-коричный альдегид (ДМАКА)	То же	ДОС = $(0,04-5,6)$ мкг/см ³
5	Анестезин (этиловый эфир л-амино-бензойной кислоты)	То же	Анестезин (биологические жидкости)	То же	»	ДОС = $(0,04-4,0)$ мкг/см ³

Продолжение табл. 5.2

1	2	3	4	5	6	8
6	Пара Аминосалициловая кислота (ПАСК) Новокаинамид	Противотуберкулезный препарат	ПАСК (биологические жидкости, таблетки)	»	»	ДОС = (0,04–8,0) мкг/см ³
7	(β-(диэтиламиноэтиламида)-n-аминобензойной кислоты гидрохлорид)	Противоаритмический препарат	Новокаинамид (органы животных)	»	»	ДОС = (0,04–4,0) мкг/см ³
8	Церукал (Ме-таклопрамид, реглан, 4-амино-5-хлор-N-(2-диэтиламиноэтил)-2-метоксибензамида гидрохлорид)	Противорвотный препарат	Церукал (таблетки, жидкость ротовой полости)	»	»	ДОС = (0,05–8,0) мкг/см ³
9	Букарбан (Надизан, 4-амино-N-[(бутиламино)карбонил]бензолсульфонамид)	Антидиабетический препарат	Букарбан (таблетки, биологические жидкости)	»	»	ДОС = (0,04–6,0) мкг/см ³
10	Сульфанил-амидные препараты	Стрептоцид Этазол	Стрептоцид Этазол	»	»	ДОС = (0,05–5,0) мкг/см ³
11	Аспаргиновая кислота	Аминокислота	Аспаргиновая кислота	Нингидрин	ЦПХ, ЦТАБ	–
12	Лейцин, фенилаланин	То же	Лейцин, фенилаланин	То же		

Продолжение табл. 5.2

1	2	3	4	5	6	8
13	Дигидралазин, Изониазид Леводопа Аспартам	Симпатолитик, противотуберку- лезное средство, противопаркинсо- ническое средство, заменитель сахара	Леводопа, дигидра- лазин, изониазид (коммерческие фармпрепараты)	1-фтор-2,4- динитробен- зол		
14	L-α-амино-кислоты	H ₂ N-CH(R)-COOH	Глицин, лейцин, фенилаланин, фенилглицин	2,6-динитро- 4-три- фторбензол- сульфонат и 2,4-динитро- фторбензол		

где A^- – анион гидрофобного иона, например ClO_4^- – или $C_{12}H_{25}S_4^-$ (додецилсульфат-анион).

Для всех фотометрических определений, основанных на этом типе реакций, установлен каталитический эффект, вызываемый мицеллами, преимущественно анионного типа, ПАВ. Результатом этого действия ПАВ является повышение чувствительности фотометрического определения лекарственных веществ на 1–2 порядка.

Важнейшую роль играют факторы среды (мицеллярные нанореакторы ПАВ, органические растворители), позволяющие направленно изменять аналитические параметры продуктов реакции.

Тем не менее в работах последних лет недостаточно внимания уделяется методологическим аспектам спектрофотометрического анализа, особенно в случае применения хемометрических алгоритмов к многокомпонентным лекарственным смесям: при неидеальном выполнении закона Бугера–Ламберта–Бера, а также нарушении аддитивности светопоглощения анализируемых смесей.

Нет единообразия и полноты представления метрологических параметров разрабатываемых методик спектрофотометрического определения компонентов лекарственных средств. Чаще всего указывается 1–2 параметра (интервал подчинения закону Бера и либо предел обнаружения, либо Sr), оценка правильности в работах последних лет практически не отражена. Отсутствие необходимых метрологических параметров в публикациях является препятствием для их практического применения и дальнейшей метрологической аттестации и валидации.

5.4. Современные методы определения антибиотиков

Микробиологические методы анализа являются исторически первыми, которые применяются и в настоящее время для определения антибиотиков. Методы основаны на способности антибиотиков диффундировать в агаровую среду, содержащую определенный вид бактерий с высокой чувствительностью к антибиотикам, и задерживать процесс размножения бактерий. Это приводит к образованию прозрачных зон ингибиции, по диаметру которых устанавливают концентрацию антибиотика.

Несмотря на то, что микробиологические методы не нуждаются в сложном оборудовании и доступны для клинических лабораторий, они практически не применяются для терапевтического мониторинга антибиотиков. Это связано с продолжительностью анализа, отсутствием специфичности и невысокой точностью при определении больших концентраций, так как размножение и развитие микроорганизмов зависят от температуры, времени выдержки и др.

К высокочувствительным методам можно отнести иммуноферментный метод. Разработана и оптимизирована иммуноферментная тест-система для количественного определения гентамицина в сыворотке крови человека. Диапазон измеряемых концентраций составляет 1–32 нг/мл гентамицина в сыворотке, разведенной в 1000 раз. Время анализа не более 3 ч.

Хроматографические методы анализа в настоящее время используются для разделения и определения различных групп антибиотиков. Для этих целей успешно применяются высокоэффективная жидкостная (ВЭЖХ), жидкостная хроматография (ЖХ), хромато-масс-спектрометрия (ХМС), капиллярный электрофорез.

Опубликованы обзоры по определению антибиотиков цефалоспоринового ряда методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, применению масс-спектрометрии и хромато-масс-спектрометрии в анализе лекарственных препаратов, по определению антибиотиков ВЭЖХ с пульсирующим амперометрическим детектором.

При этом авторы отмечают, что ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте – один из эффективных и перспективных методов определения антибиотиков в лекарственных препаратах и биологических субстратах. Высокая чувствительность, точность и специфичность этого метода дают значительное преимущество при изучении фармакокинетических свойств большого числа лекарственных средств, а скорость анализа позволяет проводить как обширные клинические исследования в условиях стационарного лечения, так и быстрый и эффективный анализ при необходимости срочного диагноза и дозировки лекарств. Другое преимущество связано с мягкими условиями анализа, так как пробы не подвергаются воздействию высокой температуры.

Лекарственные формы. Для идентификации и определения антибиотиков в лекарственных формах применяют различные виды хроматографии. Наибольшее число публикаций посвящено применению ВЭЖХ с различными способами детектирования.

В литературе проведена оптимизация методики определения ципрофлоксацина методом ВЭЖХ в растворе для инфузий. При создании новых лекарственных форм доксорубина проводят определение подлинности и возможных продуктов разложения антибиотика методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol UV-254.

Методом капиллярного электрофореза проведено определение ванкомицина в капсулах. В основе этого электромиграционного способа разделения ионов лежат различия в скоростях их движения в электрическом поле в зависимости от величины заряда и ионного радиуса. Капиллярный электрофорез уступает в селективности газовой хроматографии и ВЭЖХ, превосходя их по эффективности.

Биологические жидкости и ткани

Основная сложность определения антибиотиков в биологических жидкостях обусловлена их низкой концентрацией на фоне большого избытка мешающих веществ. Недостаточная чувствительность и селективность большинства методов при определении антибиотиков в биологических средах обуславливают необходимость их предварительного концентрирования, а дополнительная операция концентрирования влияет на точность анализа и увеличивает время анализа.

Жидкостная хроматография с УФ-детектором ($\lambda = 254$ нм) используется для определения натриевых солей цефазолина в биологических средах человека; предел обнаружения 0,25 мкг/мл.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ широко применяется для определения антибиотиков цефалоспоринового ряда в биологических средах (сыворотка и плазма крови, желчь, цельная кровь, моча, внутрибрюшная жидкость, биологические ткани).

При разработке методик хроматографического определения антибиотиков различными авторами изучается влияние размера хроматографических колонок, зернения, строения и емкости сорбентов, химического состава и расхода элюента, свойств разделяемых веществ. Кроме того, при определении остаточных количеств антибиотиков в биологических объектах проводят их предварительное концентрирование. В большинстве случаев используют твердофазную экстракцию; при этом концентрирование проводят на концентрирующих патронах, содержащих химически модифицированные сорбенты. Исследовали возможность применения патронов ДИАПАК для концентрирования цефазолина, цефотаксима и левомицетина.

Проведено определение цефтриаксона в крови и тканях (печень, легкие) здоровых крыс методом ионообменной хроматографии с УФ-детектированием. Техника ионного обмена позволяет концентрировать разбавленные пробы непосредственно на аналитической колонке, без потери эффективности разделения. Отсутствие этапа твердофазного концентрирования образца на отдельной колонке значительно снижает время и трудоемкость анализов.

Перспективным методом определения антибиотиков является хромато-масс-спектрометрия.

Непосредственно процесс хроматографирования является быстрым и протекает автоматически, поэтому анализ простых объектов (например, фармацевтических препаратов) не вызывает особых затруднений. Однако при анализе биологических жидкостей значительное время уходит на подготовку образцов до введения в колонку. Так, белки сыворот-

ки крови мешают определению, поэтому их отделяют осаждением спиртами, ацетонитрилом и другими осадителями. Предколоночная подготовка довольно трудоемка и в значительной степени определяет точность и воспроизводимость метода.

Многие антибиотики являются смесью близких по химическому строению веществ и при хроматографировании разделяются на несколько индивидуальных соединений. Однако для клинических целей это, как правило, не требуется. В ряде случаев подобное разделение даже затрудняет интерпретацию полученных результатов и может создать дополнительные трудности при анализе объектов.

5.5. Аналитические возможности иммуносенсоров в определении лекарственных веществ

Ферментные сенсоры, основанные на протекании различных ферментативных реакций, позволяют решить ряд задач контроля за содержанием фармацевтических препаратов. В то же время большинство ферментативных реакций при достаточно высокой чувствительности определений не могут обеспечить необходимой в ряде случаев избирательности определений, особенно если речь идет об идентификации отдельного соединения в сложной биологической матрице. И в этом случае вполне закономерно исследователи обратили внимание не только на ферментативные, но и иммунологические реакции, которые относятся к числу самых избирательно действующих из всех используемых для аналитических целей. Такие реакции моделируют отдельные стороны жизнедеятельности биоорганизмов и позволяют получать результаты о содержании биологически активных веществ в анализируемых пробах, наиболее адекватно отражающие действующее их содержание, а главное – воздействие на живой организм, что в первую очередь относится к лекарственным веществам. Кроме того, они служат основой для различных вариантов иммунохимического анализа, в частности разработки иммуносенсоров, являющихся частным случаем биосенсоров. Биосенсоры, использующие в качестве биочувствительного элемента антитела или комплементарно связывающиеся с ними антигены или гаптены, и получили название иммуносенсоров. Биосенсоры (иммуносенсоры) на сегодняшний день можно рассматривать как многофункциональные универсальные устройства для контроля качества и содержания широкого круга лекарственных препаратов, выявления фальсифицированной продукции, определения терапевтических доз и мониторинга их содержания в биологических жидкостях.

Работа в этом направлении привела к появлению разнообразных вариантов детектирующих элементов, интеграция которых со специфици-

ческой мембраной, включающей тот или иной компонент биоспецифического взаимодействия (антиген, антитела, гаптен, конъюгат), позволяет создавать иммуносенсоры для решения широкого круга аналитических задач, связанных с проблемами определения микроколичеств лекарственных соединений, ферментов, вирусов, опухолевых и бактериальных антигенов. Интенсивные исследования последних лет в области создания иммуносенсоров обусловлены, прежде всего, успехами в развитии микроэлектроники, электрохимии, волоконной оптики, появлением новых наноматериалов для модификации электродов.

Следует также отметить, что интерес к иммунохимическим методам анализа в общем плане их использования для определения широкого круга лекарственных соединений связан еще и с высокой скоростью иммунологических реакций, позволяющей проводить анализ в течение уже первых минут или даже секунд, а также с возможностью относительно простого варьирования селективности анализа по отношению к ряду соединений, в основном за счет использования антител с различной специфичностью.

5.6. Методы спектроскопии в определении биологически активных соединений

5.6.1. Флуориметрическое определение охратоксина А в мицеллярных средах

Микотоксины – низкомолекулярные вторичные метаболиты плесневых грибов, обладающие широким спектром токсического действия. Необходимость постоянного мониторинга вызвана тем, что микотоксины могут образовываться как до, так и после сбора урожая, накапливаться при хранении. Среди микотоксинов приоритетное место занимает охратоксин А (ОТА), который обладает нефротоксическим, канцерогенным, тератогенным и эмбриотоксическим действием.

Флуоресцентный метод определения биологически активных веществ занимает особое место из-за его простоты, доступности и высокой чувствительности, возможности скрининга биологически активных веществ.

Охратоксин А обладает собственной флуоресценцией, содержит комплексообразующие группы, по которым возможно взаимодействие с ионами лантанидов. Спектрофотометрическое изучение реакции комплексообразования ОТА с Tb(III) и Eu(III) показало, что в присутствии ионов лантанидов в спектре поглощения ОТА наблюдается смещение максимума полосы поглощения в коротковолновую область на 5–10 нм.

В образующихся комплексах осуществляется перенос энергии возбуждения, о чем свидетельствует появление новых полос флуоресценции в спектрах ОТА, соответствующих сверхчувствительным переходам Eu(III) ($\lambda_{\text{фл}} = 615$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 396$ нм) и тербия ($\lambda_{\text{фл}} = 545$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 375$ нм). Известно, что интенсивность сенсibilизированной флуоресценции зависит от соотношения энергии триплета органического лиганда и резонансного уровня иона лантанида. По-видимому, в этой связи перенос энергии наиболее эффективен в комплексе тербия (III) (рис. 5.3). В присутствии второго лиганда в случае образования разнолигандного комплекса обычно наблюдается увеличение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции лантанида, основанное на удалении молекул воды из ближайшего окружения иона комплексообразователя и дополнительной сенсibilизации лигандом иона лантанида. Апробированы в качестве второго лиганда полидентатный, не содержащий хромофорные группы ЭДТА, монодентатный триоктилфосфиноксид (ТОФО) и бидентатные, содержащие хромофор, 1,10-фенантролин (ФЕН) и теноилтрифторацетон (ТТА) лиганды.

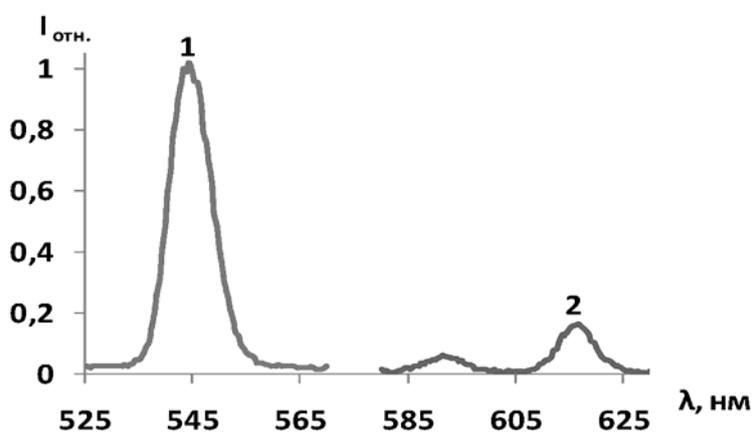


Рис. 5.3. Спектры флуоресценции растворов комплекса ОТА с:
 1 – Tb(III) и 2 – Eu(III), $C_{\text{ОТА}} = 20$ нг/мл, $C_{L_n(III)} = 1 \cdot 10^{-4}$ М;
 $pH = 7,0$, $\lambda_{\text{возб}} = 375$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 396$ нм соответственно

Показано, что в присутствии ЭДТА интенсивность эмиссии бинарного хелата Eu^{3+} с ОТА возрастает незначительно, в присутствии 1,10-фенантролина сигнал не меняется, а при введении ТОФО наблюдается опалесценция растворов.

Для бинарного хелата ОТА- Tb^{3+} в присутствии ФЕН наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции комплекса на 20 %, а в присутствии ТОФО интенсивность меняется незначительно. Добавки ТТА и ЭДТА уменьшают сигнал сенсibilизированной флуоресценции комплекса ОТА- Tb^{3+} .

Таким образом, система Tb³⁺-ОТА-ФЕН характеризуется максимальной сенсibilизированной флуоресценцией. Известно, что эффективность переноса энергии, а следовательно, интенсивность сенсibilизированной флуоресценции возрастают при переходе от гомогенных растворов к микрогетерогенным организованным средам. Установлено, что в присутствии различных добавок мицелл катионных и анионных ПАВ не происходит изменений интенсивности флуоресценции бинарных хелатов лантанидов. В присутствии мицелл неионогенных ПАВ наблюдается уменьшение флуоресценции бинарных хелатов и увеличение сигнала разнолигандного комплекса Tb(III) – ОТА – ФЕН.

Подобраны оптимальные условия получения максимального сигнала флуоресценции для системы Tb³⁺-ОТА-ФЕН-Бридж-35 и на основании полученных данных построен градуировочный график для определения ОТА. Уравнение градуировочного графика, линейного в диапазоне 5,0–100,0 нг/мл, имеет вид $y = 3,84x + 6,28$, $R^2 = 0,995$, предел обнаружения составляет 2,5 нг/мл.

5.6.2. Рентгенофлуоресцентный анализ молока и молочных продуктов

Содержание и соотношение минеральных веществ в молоке и молочных продуктах в значительной степени определяют их пищевую ценность. Среди методов, позволяющих проводить неdestructивный анализ молока, следует отметить рентгенофлуоресцентный анализ (РФА). Метод РФА не получил еще широкого распространения при определении элементов в молоке, однако имеет потенциал, так как высушенные образцы могут быть проанализированы без какой-либо химической обработки, а аппаратура для его применения доступна. Цель настоящей работы заключалась в разработке методики определения элементов Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr и Br в молоке и молочных продуктах. Измерения были выполнены на спектрометре с волновой дисперсией (ВД РФА) S4 Pioneer (Bruker, AXS). Жидкие пробы молока и молочных продуктов были предварительно лиофилизированы, затем сухие порошки спрессованы в излучатели массой 4 г. Для построения градуировочной функции использовали стандартные образцы (СО) растительных материалов, органическая матрица которых близка к матрице молочных продуктов, и диапазон концентраций определяемых элементов в них покрывает возможные вариации содержаний большинства элементов в анализируемых продуктах. Также в градуировочную выборку был включен СО сухого молока IAEA-153. Для учета матричных эффектов был применен способ, основанный на степенной

функции отношения интенсивности флуоресценции к интенсивности некогерентно рассеянного первичного излучения. Для контроля правильности результатов ВД РФА был использован СО сухого молока А-11 (IAEA). В качестве метода сравнения при определении содержаний элементов Р, S, К, Са, Zn, Rb и Sr был применен вариант РФА с полным внешним отражением (ПВО). Для РФА ПВО пробы молока и молочных продуктов были переведены в раствор путем кислотного разложения и измерены на спектрометре S2 Picofox (Bruker AXS). Содержания элементов определяли способами внешнего и внутреннего стандарта. Величины относительного стандартного отклонения (ОСО), характеризующие разброс между результатами ВД РФА и РФА ПВО с внешним стандартом составили (%): для Р – 12, К – 19, Са – 12, Zn – 9, Rb – 7, Sr – 8. Величины ОСО между результатами ВД РФА и РФА ПВО с внутренним стандартом составили (%): для Р – 17, S – 12, К – 22, Са – 12, Zn – 21, Rb – 10, Sr – 24. Приведенные величины ОСО обеспечивают погрешность определения элементов меньшую или сопоставимую с величинами межлабораторной воспроизводимости результатов определения минеральных веществ различными методами в пищевых продуктах.

5.6.3. ЯМР-спектроскопия в анализе биологически активных веществ

Биологически активные добавки и лекарства в настоящее время широко продаются через Интернет. Сложность аналитического контроля таких продуктов привела к тому, что они могут быть сфальсифицированы. Контроль рынка подобных препаратов сложен, так как эталоны, необходимые для идентификации и калибровки в традиционных хроматографических методах анализа, часто отсутствуют или очень дороги. Показано, что ЯМР ^1H спектроскопия может с успехом использоваться для идентификации и количественного анализа биологически активных веществ даже без образцов стандартного состава. Идентификация может быть основана на спектральной информации из литературы или базы данных или, в случае их отсутствия, применении различных вычислительных схем. В целях количественного анализа может быть использован внутренний стандарт, например, тетраметилсилан. Возможности ЯМР метода была продемонстрированы на широком спектре биологически активных соединений, например, мesterolон, оксиметолон, сибутрамин, монаколин, винпоцетин, эводиамин, кофеин, кавайн и дегидроэпиандростерон. Погрешность анализа не превышает 10 % отн., а предел обнаружения 0,5–2 мг/кг является достаточным для целей скрининга препаратов.

Другое направление в развитии ЯМР-спектроскопии биологически активных веществ связано с применением современных хемометрических методов для выделения «спрятанной» в спектрах информации. В настоящее время такая комбинация успешно используется для эффективного и надежного контроля за качеством продуктов питания. К таким проблемам относятся, например, определение географического происхождения продукта, поиск скрытых фальсификаций, а также подтверждение подлинности маркировки.

Важным аспектом хемометрического анализа является возможность идентификации выбросов (outliers). Выбросом может считаться образец, резко отклоняющийся от остальных и непропорционально влияющий на модель. Выбросы также могут указывать на важные характеристики образцов, которые впоследствии могут использоваться в целях контроля качества пищевых продуктов. Так, с помощью ЯМР-спектроскопии возможно определить присутствие меламина в молочных продуктах, контроль за содержанием которого стал актуален после пищевого кризиса в Китае в 2008 году. Еще одним подобным примером является и выявление потенциально небезопасных образцов алкогольной продукции, особенно в контексте нелегального алкоголя. В данном случае, был применен хемометрический подход, основанный на анализе главных компонент (МГК). График счетов, содержащий 304 нелегальной продукции из разных стран Европы, Южной Америки и Африки, отчетливо показывает 7 очевидных выбросов с сильно отличающимися от других образцов значениями нагрузок. Как было подтверждено детальным анализом (также с использованием хемометрических методов), эти образцы содержат опасные биологически активные вещества, такие как диэтилфталат или полигексаметилен гуанидин, а также метанол или этилкарбамат в высоких концентрациях.

ЯМР-спектроскопия в сочетании с хемометрическим моделированием позволяет не только выявить загрязненные образцы и идентифицировать контаминант, но и обеспечить количественную информацию о его содержании после идентификации. Подобными примерами использования ЯМР-спектроскопии в аналитической химии являются, например, количественное определение туйона в абсенте, контроль за качеством косметики и пищевых масел, определение коэнзима Q10 в биологически активных добавках, количественный анализ различных приправ на содержание биологически активных веществ.

Однако в ряде случаев сигналы в спектрах ЯМР могут сильно перекрываться, так, что иногда бывает невозможно выделить селективные химические сдвиги для оценки концентраций аналитов. Для анализа подобных данных широко используются методы многомерной

градуировки. Отличным примером является количественное определение этилкарбамата – генотоксичного и канцерогенного вещества – регулярно обнаруживаемого в ферментированных пищевых продуктах, включая алкогольные напитки. Недавно был разработан экспресс-метод на основе ЯМР-спектроскопии в сочетании с ПЛС градуировкой для количественного анализа этого вещества в спиртных напитках из косточковых плодов ($n=119$) и образцах нелегального алкоголя ($n=27$). Наилучшая калибровочная модель была построена в слабом поле (10–6,0 м. д.) при использовании двумерной ЯМР ^1H -спектроскопии (J-resolved). Метод ПЛС неоднократно используется для скринингового ЯМР-анализа биологически активных веществ и других матрицах (лекарственный чай на основе шалфея, молоко и молочные продукты, мед). Проведенная валидация и сравнение метода ЯМР с другими скрининговыми методами (БИК и ИК-Фурье спектроскопия) показали, что ЯМР превосходит другие спектроскопические методики по чувствительности и селективности. С другой стороны, главным преимуществом перед хроматографическими методами, помимо очевидного сокращения времени инструментального анализа, являются простая пробоподготовка и отсутствие необходимости применения токсичных и/или дорогостоящих реактивов.

5.6.4. Определение пуриновых алкалоидов в пищевых продуктах методом спектрофотометрии

Пуриновые алкалоиды (кофеин, теобромин, теофиллин) – биологически активные органические соединения растительного происхождения содержатся в чае, семенах кофе, применяются в фармацевтической (в составе лекарственных препаратов) и пищевой (в энергетических напитках, шоколаде) промышленности.

Алкалоиды в пищевых продуктах содержатся на уровне микроколичеств, для их определения необходима стадия концентрирования.

Цель исследования состоит в разработке методики, включающей предварительное экстракционное концентрирование алкалоидов в водных вытяжках из пищевых продуктов (темный шоколад, диабетические кондитерские изделия) и анализ концентратов методом УФ-спектрофотометрии.

Предварительно получали водную вытяжку из кондитерского изделия. Навеску помещали в химический стакан, добавляли 200 см³ дистиллированной воды и тщательно перемешивали при нагревании на водяной бане (90 °С). Появляющуюся суспензию отфильтровывали, получали гомогенную систему светло-коричневого цвета.

К 10 см³ фильтрата алкалоида добавляли 1 см³ органического растворителя, экстрагировали на вибросмесителе (5 мин, 20±1 °С). После разделения фаз содержание алкалоидов в концентратах определяли методом УФ-спектрофотометрии (SHIMADZU UV MINI-1240, кварцевая кювета, $l = 1$ см, $\lambda_{\max} = 272\text{--}273$ нм).

В качестве экстрагентов применены гидрофильные органические растворители различной природы, а также бинарные смеси растворителей, каждый из которых обеспечивает высокую степень извлечения алкалоидов из водной вытяжки из кондитерского изделия. Обязательное условие экстракции гидрофильными растворителями (спирты, эфиры) – насыщение водного раствора электролитом, понижающим растворимость извлекаемого вещества в воде и обеспечивающим расщепление системы. Высаливающий эффект при экстракции гидрофобными растворителями (хлороформ) обусловлено конкурирующим влиянием ионов, например, NH_4^+ и алкалоида, что приводит к повышению степени его извлечения.

Установлено, что среди изученных в работе индивидуальных растворителей максимальная степень извлечения алкалоидов достигается при экстракции н.пропиловым спиртом, этилацетатом и хлороформом (до 90 %). Смеси, содержащие эти растворители, также отличаются высокой экстрагирующей способностью.

Известно, что эффективность экстракции смесями выше по сравнению с экстракцией отдельными растворителями. Коэффициенты распределения в системах смесь гидрофильных растворителей – водно-солевой раствор часто характеризуются положительными отклонениями от аддитивности (синергетический эффект). Это объясняется взаимодействием компонентов смеси друг с другом и с распределяемым веществом за счет водородных связей. В результате образуются смешанные сольваты, более устойчивые, чем при экстракции индивидуальными растворителями.

Установлены некоторые общие закономерности экстракции алкалоидов при различном соотношении содержания экстрагентов в бинарной смеси. Оптимизирован состав смеси экстрагентов, обеспечивающий практически эффективное извлечение алкалоидов из водных сред.

Практически полное извлечение алкалоидов достигается при экстракции смесью, содержащей 0,8 мол.доли хлороформа и 0,2 мол.доли этилацетата в присутствии 38 мас. % сульфата аммония, продолжительность стадии концентрирования 5 мин, степень извлечения 92–95 %.

Разработанная методика экстракции и определения алкалоидов экспрессна, легковыполнима, не связана с использованием сложного и дорогостоящего оборудования. Воспроизводимость полученных данных проверена методом «введено-найдено».

5.6.5. Фотометрическое определение аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье

Аскорбиновая кислота является лекарственным средством, которое обладает выраженными антиоксидантными свойствами, играет важную роль в регулировании окислительно-восстановительных процессов в организме человека, защищает его от последствий стресса, повышает устойчивость к инфекциям и нормализует проницаемость капилляров. По химической природе аскорбиновая кислота неустойчива, легко окисляется под воздействием внешних факторов, поэтому для её определения предпочтительны автоматизированные методики анализа, исключая длительные многостадийные процедуры пробоподготовки, характерные для статических методик её определения.

В последние годы отдаётся предпочтение автоматизированным методикам анализа на принципах проточно-инжекционного (ПИИ) и последовательного инъекционного анализа (SIA). Однако эти методики в сопоставимых со статическими аналогами условиях ограничены по нижней границе диапазона определяемых концентраций в связи с тем, что заложенный в методах ПИИ и SIA принцип «контролируемой дисперсии» зон аналитов в гидравлических трассах.

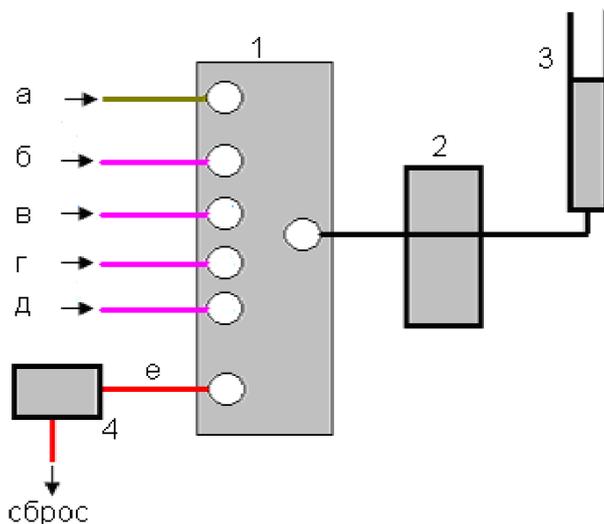


Рис. 5.4. Схема циклического инъекционного фотометрического определения флавоноидов в лекарственных препаратах:

1 – многоходовой кран-переключатель; 2 – перистальтический насос;

3 – реакционная ёмкость; 4 – проточный детектор;

а, б, в, г, д – линии подачи пробы, раствора соляной кислоты, раствора ДФИФ, воздуха и дистиллированной воды соответственно;

е – линия подачи растворов в детектор

Разработана методика циклического инъекционного фотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье, основанная на сочетании высокоселективной и быстрой реакции аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия (ДФИФ) и циклического инъекционного анализа (ЦИА). Методика определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье включает стадию экстракционного выделения аскорбиновой кислоты с последующим ее детектированием по реакции образования окрашенных растворов избытка ДФИФ натрия с соляной кислотой в условиях циклического инъекционного анализа.

Для автоматизации методики использовался циклический инъекционный анализатор собственного производства. Градуировочный график линейен в диапазоне от 0,02 до 0,3 г/л аскорбиновой кислоты в водном растворе. Предел обнаружения составил 3 мг/л, время анализа – 4 мин.

5.6.6. Циклическое инъекционное спектрофотометрическое определение флавоноидов в лекарственном растительном сырье

Флавоноиды являются биологически активными веществами, которые способны повышать прочность стенок капилляров (Р-витаминная активность) за счет антиоксидантного действия, что важно при лечении хронической венозной недостаточности, гипертонии и других сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с увеличением проницаемости кровеносных капилляров. Флавоноиды входят в состав многих препаратов растительного происхождения, к которым в настоящее время проявляется пристальное внимание как к наиболее безопасным лекарственным средствам. В связи с этим определение флавоноидов в растительном сырье является актуальной задачей аналитической химии. Известные фотометрические методики определения содержания флавоноидов, основанные на реакциях образования комплексов с ионами алюминия или железа (III), ограничено пригодны для выполнения массовых анализов, так как лежащие в их основе фотометрические реакции являются кинетически замедленными.

Устранить лимитирующий фактор образования аналитических форм можно за счет проведения фотометрических реакций в мицеллярных средах и автоматизации методики. В последние годы отдаётся предпочтение автоматизированным методикам анализа на принципах проточно-инъекционного (ПИА) и последовательного инъекционного анализа (SIA). Однако эти методики в сопоставимых со статическими

аналогами условиях ограничены по нижней границе диапазона определяемых концентраций в связи с тем, что фотометрические реакции образования аналитических форм, как правило, являются кинетически замедленными. Дополнительным фактором ограничений по нижним границам диапазона определяемых концентраций является заложенный в методах ПИА и SIA принцип «контролируемой дисперсии» зон анализов в гидравлических трассах.

В качестве нового подхода к автоматизации химического анализа, который позволяет преодолеть вышеуказанные недостатки, предложен новый метод проточного анализа – циклический инъекционный анализ (ЦИА), который предполагает одновременное решение проблем унификации гидравлических схем проточного анализа и сохранение чувствительности статических методик при их адаптации к условиям анализа в потоке. В методе ЦИА производится смешение оптимизированных объемов пробы и растворов реагентов, их интенсивное перемешивание и выдерживается необходимая пауза для образования аналитической формы. Таким образом, обеспечивается измерение аналитического сигнала в условиях, когда он достигает максимального для данной методики анализа значения.

На растворах рутина было изучено влияние цетилпиридиния хлорида, додецилсульфата натрия и Triton X-100 на скорость образования аналитической формы.

Согласно этим данным, при прочих равных условиях установлено, что в присутствии ЦПХ скорость протекания фотометрической реакции значительно возрастает, в этом случае для образования аналитической формы достаточно 4 мин. Кроме того, введение ЦПХ приводит к увеличению молярного коэффициента светопоглощения.

Разработана автоматизированная методика спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье, включающая стадию экстракционного выделения флавоноидов с последующим их детектированием по реакции образования окрашенных комплексов с ионами алюминия в мицеллярных средах катионных поверхностно-активных веществ в условиях циклического инъекционного анализа. Для автоматизации методики определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье использовался циклический инъекционный анализатор собственного производства. Предел обнаружения составил 130 мкг/л в пересчете на рутин при массе пробы 0,1 г, время анализа – 8 мин. Разработанная методика была использована для определения флавоноидов в различном лекарственном растительном сырье.

5.6.7. Экстракционное разделение и определение витаминов группы В методом Фирорда

Создание новых поливитаминных комплексов, лекарственных препаратов и пищевых добавок, содержащих различные витамины, связано с контролем их качества и подлинности. К приоритетным аналитическим задачам относится создание новых способов разделения биологически активных веществ и их селективного определения. Цель исследования состоит в разработке способа экстракционного разделения бинарных и тройных смесей витаминов группы В и их последующего селективного спектрофотометрического определения. Объекты исследования – витамины В₁ (тиамин гидрохлорид), В₂ (рибофлавин) и В₂^{*} (рибофлавин-мононуклеотид), В₆ (пиридоксин гидрохлорид), В₁₂ (цианокобаламин).

К наиболее эффективным системам для разделения изученных витаминов относятся изопропиловый спирт – сульфат аммония и этиловый спирт – карбонат калия. Установлено, что изопропиловым спиртом практически полностью разделяются витамины В₁₂ и В₁, фактор разделения $\beta \approx 2050$. При этом степень извлечения витамина В₁₂ достигает 95,4 %; витамин В₁ в тех же условиях извлекается не более чем на 1 %. Высокие факторы разделения получены и для других бинарных систем, содержащих витамин В₁₂, например 430 и 320 для смесей с витаминами В₂ и В₆ соответственно. Тройные смеси В₁, В₆ и В₁₂; В₁, В₂ и В₁₂; В₂, В₆, и В₁₂ также характеризуются практически полным извлечением витамина В₁₂, другие компоненты смеси при этом извлекаются менее чем на 20 %. В смеси В₁, В₂ и В₆ рибофлавин извлекается до 60 %, витамины В₁ и В₂ – менее чем на 25 %.

Для установления подлинности и количественного определения витаминов группы В применяли спектрофотометрию в видимой и УФ-областях спектра. Установлены характеристические длины волн (нм) и молярные коэффициенты светопоглощения ($E \cdot 10^4$) в водно-солевых растворах сульфата аммония и карбоната калия.

Вследствие батохромных сдвигов характеристические длины волн для витаминов В₁ и В₆ изменяются в зависимости от свойств применяемого высаливателя. Остальные изученные витамины не изменяют λ_{\max} .

Для определения витаминов группы В после экстракции в водных растворах при концентрациях 0,01–0,03 мг/см³ применяли расчетный метод Фирордта. При различиях в максимумах светопоглощения витаминов более 5 нм и соблюдении принципа аддитивности оптических плотностей погрешность определения витаминов в двойных смесях не превышает 5 %, в тройных – не более 10 %.

5.6.8. Применение ИК-спектроскопии для анализа белков

В последние 15 лет ИК-спектроскопия зарекомендовала себя как один из основных методов структурного анализа компонентов биологических объектов, в том числе белков. Однако методология количественного определения белков развита существенно слабее, что не позволяет решать многие медико-биологические исследовательские задачи и проводить определение белков в сложных смесях. В настоящей работе исследована возможность количественного определения ряда белков в тонких водных, а также твердых пленках на подложке из фторида кальция.

Для работы с твердыми пленками белков в качестве подложки использовали пластины из фторида кальция. Новизна подхода заключалась в использовании чистых пленок белков в отсутствие полимеров, ПАВ и других структурообразующих агентов. Для построения градуировок использовали основные характеристические полосы поглощения белков: Амид I (1543 см^{-1}) и Амид II (1655 см^{-1}), а также еще четыре полосы поглощения, ранее не использованные для определения белков. Исследовали цитохром *c*, бычий и человеческий сывороточные альбумины. Образцы готовили нанесением капли раствора определенного объема на пластину с последующим высушиванием при различных условиях. Помимо воспроизводимости определения, внимание уделяли подбору условий, обеспечивающих определенное количество воды в образце, которое не мешало ИК определению и в то же время способствовало сохранению структуры белка. На основе дисперсионного анализа проведена оптимизация условий пробоподготовки, обеспечивающая максимальную чувствительность и воспроизводимость определения. Достигнуты пределы обнаружения всех исследованных белков на уровне субмикrogramмовых концентраций (абсолютные количества белка на уровне долей микрограммов), при этом чувствительность определения хорошо коррелирует с числом формирующих сигнал групп в исследуемых белках. Относительное стандартное отклонение определения белков для диапазона концентраций 1–10 мг/мл не превышает 5 %. Предложенная методика определения белков отличается чувствительностью определения, большей чем существующие, а также простотой пробоподготовки.

Водные растворы белка в тонких пленках исследовали на примере человеческого и бычьего сывороточных альбуминов. Использовали тонкостенные кюветы с окнами из фторида кальция. В качестве растворителей использовали тяжелую воду 99,9 % и смесь $\text{D}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ с содержанием H_2O от 5 до 10 %. Оптимизированы условия определения (длина оптического пути, объем аликвоты, полоса поглощения белка, условия

пробоподготовки). Достигнуты пределы обнаружения на уровне 500 мкг/мл, что ниже как минимум на полпорядка, чем существующие данные. Относительное стандартное отклонение определения белков в диапазоне концентраций 5–20 мг/мл не превышает 3 %. Результаты исследования позволяют рекомендовать разработанную методику для количественного определения белков в биологических образцах.

Предложенные методики использованы при исследовании взаимодействия белков (гемопротеинов) с образованием липидных и других комплексов, при определении окисленных и восстановленных форм белков, а также протестированы на ряде реальных объектов.

5.6.9. Изучение влияния некоторых факторов на элементарный состав клеток цианобактерий с использованием атомно-спектральных методов

Элементный состав клетки – важная физиологическая характеристика как одноклеточных, так и многоклеточных организмов. Микроэлементы участвуют в метаболизме клеток, входя в состав коферментов. В связанном состоянии с белками, аминокислотами и другими органическими соединениями регулируют проницаемость мембран, биоэнергетические и другие стороны метаболизма. Влияние различных факторов на элементный состав клеток цианобактерий (представители древнейших родов, важнейшие фотосинтетики планеты) и распределение микроэлементов в клеточных фракциях целесообразно изучить, используя аналитические методы.

Рассмотрено влияние факторов химической и физической природы, к первым относится введение в среду культивирования различных микроэлементов (B, Mo, Se, Zn, V, Li) в повышенных концентрациях; ко вторым – электромагнитное излучение низкой интенсивности миллиметрового диапазона (КВЧ-излучение).

Объектами исследования служили представители цианобактерий: *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima* и *Nostoc commune*. Культивирование *S. platensis*, *S. maxima* проводили на питательной среде Зарука, *N. commune* – на среде BG-11. Исследуемые элементы вводили в среду в виде различных соединений в широком интервале концентраций. Фракционирование биомассы проводили с получением клеточных фракций: хлороформная (ХФ) (гидрофобные белки, липиды), водно-метанольная (ВМФ) (низкотемпературные соединения, гидрофобные белки, цитоплазмы, моносахариды), осадок (фрагменты клеточной стенки, белки, полисахариды). КВЧ-облучение проводили с использованием прибора «АКВАСТИМ» (длина волны 7,1 мм). Для определения макро- и микроэлементов в био-

массе цианобактерий и выделенных клеточных фракциях использовали комплекс атомно-спектральных методов (АЭС-ИСП, ПААС, ЭТААС). Оптимизированы условия минерализации биологических и органических материалов при автоклавном и СВЧ-способах пробоподготовки (использовали смесь HNO_3 и H_2O_2). Общий элементный состав биомассы цианобактерий (Na, K, Mg, Ca, Fe, Mn, P, Cu, Mo, Zn, B, Cr, V, Li) определяли методом АЭС-ИСП на модернизированном полихроматоре JCAP-9000. Определение Zn и Li проводили методом ПААС. Особое внимание уделено разработке методики ЭТААС определения Mo и Se в клеточных фракциях, содержащих хлороформ и метанол.

Использование комплекса аналитических методов и интерпретация полученных результатов позволяют сделать важные научные выводы о способности цианобактерий аккумулировать биологически значимые микроэлементы (B, Mo, Se, Zn, V, Li). В работе были показаны количественные изменения элементного состава клеток цианобактерий при введении в среду отдельных элементов (B, Mo, Se, Zn, V, Li). Впервые было выявлено действие КВЧ-излучения на изменение элементного состава клеток, и его влияние на уменьшение токсического действия Zn и увеличение накопления клетками Mo. Показано, что во фракциях клеточных компонентов цианобактерий большая часть Zn и Se связывается белками и полисахаридами, что свидетельствует о включении данных элементов в метаболизм клетки.

5.7. Электрохимические методы в определении биологически активных соединений

5.7.1. Новые потенциометрические сенсоры для определения β -лактамных антибиотиков

Определение β -лактамных антибиотиков, как одной из групп лекарственных соединений является одной из актуальных проблем современной аналитической химии. Объекты, в которых необходимо определять и контролировать содержание антибиотиков, весьма разнообразны: фармацевтические препараты, биологические жидкости организма человека и животных, продукты питания, сточные воды фармацевтических предприятий.

С целью снижения предела обнаружения β -лактамных антибиотиков предложено вводить в состав электродноактивных веществ комплексные соединения $\text{Ag}(\beta\text{-lac})_2^-$, имеющие отрицательный заряд и образующие ионные ассоциаты с катионами тетраалкиламмония (TAA^+). В связи с этим подробно исследованы процессы комплексообразования

ионов серебра β -лактамами антибиотиками спектрофотометрическим и потенциометрическим методами при варьировании концентрации реагирующих веществ, кислотности среды, а также растворимость образующихся электродноактивных компонентов.

Мольное соотношение серебра (I) и антибиотиков в комплексах установлено методами насыщения и изомолярных серий. При $\text{pH} = 8,1\text{--}8,3$ образуются преимущественно комплексы состава AgL_2^- , где L – ампициллин (Am), оксациллин (Ox), цефазолин (Cef), цефотаксим (Ceftx), цефалексин (Ceflx). Для цефтриаксона (Ceftr) предпочтительно образование полиядерного комплекса вида $\text{Ag}_2\text{L}_2^{2-}$, что согласуется с данными о существовании комплексов серебра с бизарядными лигандами.

Наиболее устойчивые комплексы с серебром (I) образуют антибиотики цефалоспоринового ряда: цефалексин, цефотаксим и цефазолин. Это можно объяснить более выраженной способностью атома серы, входящего в цефем-группу, образовывать донорно-акцепторные пары с ионами серебра. Дополнительным фактором, увеличивающим устойчивость комплексов цефалоспоринов с серебром (I), является наличие в их структуре различных гетероатомных фрагментов.

Отрицательно заряженные комплексные соединения серебра с β -лактамами антибиотиками использованы в составе активных компонентов мембран потенциометрических сенсоров, чувствительных к β -лактамам антибиотикам. Стехиометрическое соотношение компонентов и растворимость органических ионообменников определяли методом осадительного потенциометрического титрования. В сравнении с ранее полученными данными о растворимости ионных ассоциатов тетраалкиламмоний – β -лактамы антибиотик, можно ожидать снижения предела обнаружения антибиотиков с сенсорами, в состав мембран которых входят электродноактивные соединения $[\text{Ag}(\beta - \text{lac})_2]\text{-TAA}^+$, что было подтверждено дальнейшими исследованиями электроаналитических свойств сенсоров.

Показано, что при введении в состав мембран комплексов серебра с β -лактамами антибиотиками угловые коэффициенты электродных функций соответствуют теоретической нернстовской величине для одно- или двухзарядных ионов (цефтриаксон), при этом расширяется диапазон линейности электродных функций и снижается предел обнаружения антибиотиков. Время отклика составляет 25–60 сек; срок службы 2–3 мес. Наиболее оптимальным являются ЭАК на основе комплексов серебра (I) с ампициллином, оксациллином, цефотаксимом, цефтриаксоном и катионами тетрадециламмония. Сенсоры проявляют чувствительность ко всем изученным пенициллинам и цефалоспорином: коэффициенты потенциометрической селективности (K_{ij}) – близки к единице.

Объемные (транспортные) свойства мембран на основе $\text{Ag}(\text{P-lac})_2\text{-TAA}$ исследованы в условиях диффузионного массопереноса и постоянного тока (пластифицированные мембраны) при варьировании концентрации ЭАК, концентрации примембранных растворов. При этом оценивалось стационарное сопротивление мембран, скорости переноса, проницаемость и потоки ионов, константы диссоциации ЭАК в фазе мембраны.

Исследуемые мембраны характеризуются устойчивыми токами проводимости в течение продолжительного периода времени, даже после изменения направления тока. Введение в состав электродноактивных компонентов комплексов серебра с β -лактамными антибиотиками приводит к понижению общего сопротивления мембран ($0,5\text{--}1,2$ МОм) по сравнению с мембранами, не содержащими серебра (I) ($1,2\text{--}1,6$ МОм). Ион серебра повышает проводимость мембраны, облегчая мембранный транспорт.

По стационарным сопротивлениям рассчитаны кажущиеся константы диссоциации органических ионообменников $\text{Ag}(\text{P-lac})_2\text{TDA}$ в мембранной фазе, получено, что K_d электродноактивных компонентов имеют близкие значения и составляют: $(4,7\pm 0,2)\cdot 10^{-4}$; $(1,4\pm 0,2)\cdot 10^{-4}$; $(2,8\pm 0,4)\cdot 10^{-4}$ для $\text{Ag}(\text{Am})_2\text{-TDA}$, $\text{Ag}(\text{Ceflx})_2\text{-TDA}$, $\text{Ag}(\text{Ceftx})_2\text{-TDA}$ соответственно. Это свидетельствует о том, что природа антибиотика в составе электродноактивных компонентов практически не влияет на свойства мембран на их основе.

Наряду с селективностью в работе оценивали также перекрестную чувствительность сенсоров в растворах β -лактамных антибиотиков, т. е. чувствительность к максимальному числу определяемых компонентов в сложных растворах. Параметры перекрестной чувствительности сенсоров на основе различных ЭАК для исследуемых сенсоров: величина $S_{\text{ср}}$, изменяется в диапазоне $25 < S_{\text{ср}} < 48$, мВ/рС; фактор неселективности F составляет от 0,77 до 9,68; фактор воспроизводимости K меняется в интервале от 108 до 193.

Идентичность электрохимических характеристик сенсоров и их неселективность положены в основу создания мультисенсорных систем типа «электронный язык» для отдельного определения антибиотиков.

Для обработки аналитических сигналов от массива сенсоров использовали метод искусственных нейронных сетей. Применялась искусственная нейронная сеть с обратным распространением ошибок (ИНС), состоящая из 10 нейронов в первом слое, 6 – во втором слое, 1 – в третьем (активационная функция – сигмоида, скорость обучения 0,1; момент 0,9; число эпох 20 000).

Относительная погрешность определения β -лактамных антибиотиков в трехкомпонентных смесях составляет (5–7 %); в двухкомпонентных (3–5 %).

5.7.2. Cu-селективный электрод в ионометрии α -аминокислот

Известно, что ионы меди образуют комплексные соединения с α -аминокислотами MeL и MeL_2 в области рН 6–10 и величинами рК в интервале 9–13.

В качестве титранта применяли растворы нитрата, хлорида, сульфата и ацетата меди. Возможно прямое и обратное титрование водных растворов 20 α -аминокислот солями меди (II), исследовано влияние буферных сред, аниона титранта. Показано, что для всех аминокислот наблюдается характерный скачок на кривых титрования в области отрицательных значений потенциалов (50–100 мВ) и лишь для основных аминокислот (гистидина, лизина, аргинина) наблюдался второй, хорошо выраженный скачок в области положительных значений потенциалов (до 150 мВ). Методом бионных потенциалов определена селективность указанного сигнала по отношению к основной массе других α -аминокислот, составившая $10^{-1,5}$, $10^{-2,25}$, $10^{-2,1}$.

Для аналитической практики в плане избирательного определения основных аминокислот в смешанных растворах 17 других аминокислот представлял интерес второй скачок на кривых титрования гистидина, лизина и аргинина. На примере аргинина показаны аналитические параметры определения в смешанных растворах (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Определение аргинина в смешанных водных растворах некоторых α -аминокислот (глицина, изолейцина, треонина) методом «введено-найдено»

Введено $C_{Arg}, \text{мг}$	Найдено $C_{Arg}, \text{мг}$	Погрешность, %	Средняя погрешность, %	Введено		
				$C_{Gly}, \text{мг}$	$C_{Ile}, \text{мг}$	$C_{Thr}, \text{мг}$
69,68	68,57	1,59	2,12	75,1	131,2	119,2
78,39	77,14	1,50				
113,23	115	1,56				
121,94	121,4	0,44				
165,49	157,5	4,8				
182,91	180	1,6				
200,33	192,5	3,9				
217,75	210	3,6				
330,98	332	0,3				
365,82	359	1,9				

Методом бионных потенциалов (рис. 5.5, а) оценена селективность определения аргинина.

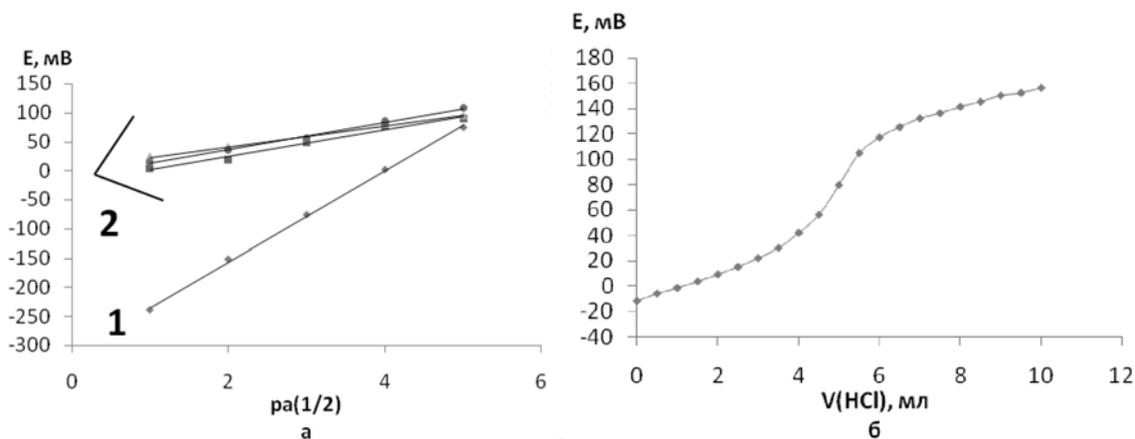


Рис. 5.5. а – селективность определения аргинина (1) на фоне Gly($K = 10^{-1,5}$), Ile($K = 10^{-2,2}$) X Thr($K = 10^{-2,1}$); б – кривая потенциометрического титрования раствора NaOH раствором HCl с Cu-СЭ

Как известно, Cu-селективный электрод имеет прессованную порошковую мембрану из смеси $Ag_2S|CuS$. Сульфид серебра, благодаря ионной проводимости, придает мембране необходимую электропроводность, CuS обеспечивает селективность мембраны по отношению к Cu(II). Однако для халькогенидных электродов было установлено, что они легко модифицируются вследствие протекания на их поверхности различных процессов.

Титрование аминогрупп основных аминокислот применено для их избирательного определения более чем в 30 различных смешанных водных растворах α -аминокислот.

Интервал линейности для таких аминокислот, как аргинин, лизин, гистидин, составляет 10–400 мг, погрешность определения 0,5–4,8 %.

5.7.3. Новый экспрессный амперометрический способ определения антиоксидантной активности растительных лекарственных препаратов, биологически активных добавок и напитков

Уменьшение защитных сил организма человека, в т. ч. снижение активности антиоксидантной системы, происходит за счёт воздействия радиации, УФ-облучения, инфекционных болезней, постоянных стрессов, курения, алкоголизма, некачественного питания. В результате этих процессов в организме возрастает концентрация свободных радикалов (супероксидный анион-радикал, гидропероксидный радикал, пероксид водорода, гидроксил радикал и др.), избыток которых приводит к серьёзным патологическим изменениям и заболеваниям (атеросклероз, злокачествен-

ные образования, преждевременное старение). Уменьшить вредное воздействие на организм свободных радикалов возможно при систематическом употреблении некоторых продуктов питания (соки, мёд, чай, фрукты, овощи и др.), некоторых биологически активных добавок, лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантной активностью.

ОАО НПО «Химавтоматика» совместно с Институтом клинической фармакологии НЦ ЭСМП РФ разработали оригинальный способ определения антиоксидантной активности лекарственных препаратов, продуктов питания и биологически активных веществ. Антиоксидантная активность связана с присутствием в указанных продуктах природных соединений, в частности флавоноидов, оксикислот и других соединений. Научно доказано, что природные фенольные соединения обладают антисклеротическим, антиканцерогенным и антиаллергическим действием. Чувствительность амперометрического способа определяется как природой рабочего электрода, так и потенциалом, приложенным к нему. В качестве материала рабочего электрода используются: стеклоуглерод, золото, платина, серебро, медь, никель, палладий и др. Потенциал может устанавливаться в пределах от 0 до 2,5 В.

Известно, что амперометрический способ анализа обладает рядом преимуществ: низким пределом обнаружения, высокой селективностью (определяются только соединения, молекулы которых могут окисляться, другие соединения, присутствующие даже в больших концентрациях не определяются), малым объемом ячейки (0,1–5 мкл), простотой обслуживания. В условиях амперометрического детектирования хорошо окисляются соединения, содержащие гидроксильные группы, предел их обнаружения на уровне 10^{-9} – 10^{-12} г, в благоприятных условиях некоторые соединения определяются на уровне 10^{-15} г (фемтограммов). Основные и наиболее активные природные антиоксиданты имеют фенольную природу. Это природные полифенолы, разные типы флавоноидов, фенольные оксикислоты, витамины и другие.

Таким образом, амперометрический способ наиболее подходящий метод для оценки антиоксидантной активности. Антиоксидантную активность трудно измерить по отношению к свободным радикалам непосредственно *in vivo*, поэтому действие антиоксидантов оценивается степенью его окисления *in vitro*. Особенно хорош амперометрический способ при сопоставлении антиоксидантной активности (АОА) разных лекарственных форм, напитков, БАДов и др. Некоторые из подобных сопоставлений приведены в табл. 5.4 и 5.5.

В табл. 5.4 приведена АОА свежесжатых соков фруктов и овощей (2 грамма сока разбавлялись 10 мл воды).

Таблица 5.4

Антиоксидантная активность свежевыжатых соков фруктов и овощей

Наименование	Отношения (площадь исслед)/(площадь рутин)
лимон	7,86
чеснок	7,82
белая редька	6,86
свекла	6,61
гранат	5,984
грейпфрут	5,84
красный виноград	5,29
апельсин	4,5
мандарин	4,2
красный перец	4,1
лук	3,95
хурма	2,85

В табл. 5.5 приведена АОА некоторых типов бальзамов и эликсиров, взятых в упаковках производителя.

Таблица 5.5

*Антиоксидантная активность бальзамов
(стандартное вещество – рутин 0,01 %)*

Название бальзама	АОА, мг/г
Тайга	14,1
Виватон	9,8
Ишимский	5,6
Демидовский	4,8
Алтайский	1,2
Jagermeister	1,2

Таким образом, описан принцип действия и особенности нового амперометрического метода определения антиоксидантной активности разных продуктов. Показано, что метод селективен к полифенолам, флавоноидам, оксикислотам и др. Приведены данные по антиоксидантной активности соков, бальзамов и эликсиров, измеренные амперометрическим методом.

5.7.4. Определение витамина Е методом кулонометрии

Предложена методика кулонометрического определения витамина Е в сыворотке крови человека. Установлено, что взаимодействие α -токоферола с электрогенерированным бромом протекает быстро и количественно в соотношении 1:2. Для определения суммы токоферолов предложен метод амперометрического титрования в среде 1 н. серной кислоты раствором сульфата церия (IV) с использованием платинового электрода. Потенциометрическое и амперометрическое титрование хлорным золотом находит ограниченное применение из-за малой специфичности, так как для суммы токоферолов предложен метод амперометрического титрования в среде 1 н. серной кислоты раствором сульфата церия (IV) с использованием платинового электрода. Потенциометрическое и амперометрическое титрование хлорным золотом находит ограниченное применение из-за малой специфичности, так как хлорное золото не обладает способностью окислять эфиры токоферолов и другие производные.

5.7.5. Оценка биодоступности полифенолов по данным гальваностатической кулонометрии

Основным источником фенольных антиоксидантов являются продукты питания, содержащие широкий круг биологически активных веществ, способных к взаимному влиянию компонентов и изменению свойств отдельных соединений. Отсюда следует проблема оценки биодоступности полифенолов. Известно, что большое влияние на реакционную способность полифенолов оказывают белки матрицы.

Гальваностатическая кулонометрия с электрогенерированными гексацианоферрат(III)-ионами в качестве титранта открывает новые возможности для оценки закономерностей протекания реакций полифенолов с одноэлектронным переносчиком и оценки биодоступности полифенолов в присутствии белков.

Биодоступность полифенолов оценивали в системах полифенол – белок. Установлено, что белки связывает исследуемые полифенолы, причем содержание доступного полифенола уменьшается по мере увеличения доли белка в смеси, что приводит к снижению их биодоступности. При этом зависимость интенсивности связывания полифенолов от соотношения компонентов в смеси имеет линейные участки.

Поскольку основными источниками природных полифенолов в ежедневном рационе человека являются чай и кофе, то проводится оценка биодоступности их полифенолов в присутствии белков молока по изменению антиоксидантной емкости (АОЕ) напитков.

Определена собственная АОЕ чая. Показано, что зеленый и черный чаи обладают близкой по значениям АОЕ. Установлено, что АОЕ растворимого кофе незначительно зависит от марки производителя. Однако сублимированный растворимый кофе обладает большей АОЕ, чем гранулированный. Кофе в зернах значительно уступает растворимому кофе по АОЕ.

Установлена корреляция между интегральной АОЕ по бромату и АОЕ по реакции с $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -ионами для чая и кофе. Полученные результаты показывают, что использование $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -ионов в качестве титранта позволяет определять АОЕ напитков, обусловленную присутствием низкомолекулярных антиоксидантов.

Для оценки биодоступности полифенолов готовили смеси чая и кофе с пастеризованным молоком, содержащие 5, 20, 50 и 70 % молока. Молоко обладает собственной АОЕ, поэтому ее предварительно определяли и учитывали при расчете АОЕ напитков.

Установлено, что АОЕ чая и кофе значительно уменьшается в присутствии молока. Белки молока связывают полифенолы, содержащиеся в напитках, значительно снижая их биодоступность. Основным связывающим протеином является казеин, доля которого в молоке составляет около 80 % от общего содержания белков.

5.7.6. Вольтамперометрическое определение серосодержащих аминокислот на электродах, модифицированных полимерными пленками

Определение серосодержащих аминокислот и их производных в биологических средах является важной задачей клинической медицины, поскольку изменение содержания их приводит к нарушению обменных процессов в организме человека и развитию нервных заболеваний.

Для определения серосодержащих аминокислот широко используют электрохимические методы, в том числе и вольтамперометрию. Вольтамперометрия с химически модифицированными электродами (ХМЭ) с включенными редокс-медиаторами позволяет повысить чувствительность и селективность определения органических соединений. Один из способов создания ХМЭ состоит в нанесении на поверхности электрода композитной пленки из различных органических и неорганических полимерных материалов.

Сопоставлены электрокаталитические свойства органических полимерных пленок из тетрасульфонатных металлофталоцианинов (poly-NiTsPc и poly-CoTsPc), а также неорганических полимерных пленок из гексацианорутената рутения (RuO-RuCN) или гексацианорутената

осмия (OsO-RuCN), нанесенных на графитовую подложку, при электроокислении цистина, цистеина и метионина.

Выбор пары медиатор-субстрат зависит от природы медиатора, субстрата и условий регистрации каталитического отклика ХМЭ. Электрокаталитическое окисление цистеина происходит на всех рассматриваемых ХМЭ. Максимальный каталитический эффект наблюдается на ХМЭ с пленкой OsO-RuCN. Варьирование pH раствора позволяет разработать селективный способ определения этих кислот при совместном присутствии. Так, электрокаталитическое окисление цистина и метионина на электроде с пленкой poly-NiTsPc происходит на фоне буферного раствора с pH 9.08, а цистеина – в сильно-щелочных растворах с pH 13. Электрокатализ на ХМЭ проявляется в уменьшении потенциала перенапряжения окисления цистина, метионина и цистеина по сравнению с немодифицированным СУ, а также в многократном приросте тока окисления медиатора в присутствии аналитов, что значительно повышает чувствительность вольтамперометрического определения аминокислот.

Способность гексацианорутенатов к электрохимическому генерированию нескольких каталитических центров расширяет круг катализируемых реакций. Так, на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN проявляется каталитическая активность при окислении всех серосодержащих аминокислот. Окисление цистеина происходит при E 0.80 В с участием редокс-пары -Ru(IV)O/-Ru(III), а окисление цистина и метионина при $E \sim 1.00$ В с участием редокс-пары -Ru(VI)O/-Ru(IV). Такие пленки характеризуются высокой химической и электрохимической стабильностью.

Разработаны методики селективного вольтамперометрического определения цистеина в присутствии цистина и метионина на ХМЭ с пленкой OsO-RuCN в кислых и на пленке poly-NiTsPc-СУ в сильно-щелочных средах, а также цистина и метионина на ХМЭ с пленкой poly-NiTsPc-СУ в слабощелочных растворах. Зависимость каталитического тока от концентрации цистеина линейна в интервале от 1×10^{-6} М до 1×10^{-3} М, а цистина и метионина – 5×10^{-5} М до 1×10^{-3} М. Относительное стандартное отклонение не превышает 5 % во всем определяемом диапазоне концентраций.

5.7.7. Вольтамперометрическое исследование морина

Флавоноиды – это активные антиоксиданты, способные нейтрализовать свободные радикалы, образующиеся в организме под влиянием активных форм кислорода. Один из таких флавоноидов – морин (3, 5, 7, 2', 4'-пентагидроксифлавонон). Морин относится к той группе биофлавоноидов, которые проявляют высокую антиоксидантную актив-

ность. Между тем недостаточно исследовано электрохимическое поведение морины в анодной области потенциалов, отсутствуют данные по его электровосстановлению.

Вольтамперометрические исследования проводятся на полярографах LP-7 и ПУ-1. Для измерений используют двух- и трехэлектродную ячейку. При работе в анодной области потенциалов на полярографе LP-7 в качестве электрода сравнения применяют насыщенный каломельный электрод. Рабочим является стеклоуглеродный электрод. В катодной области (полярограф ПУ-1) электрод сравнения – насыщенный хлорсеребряный электрод, вспомогательный – платиновый электрод, рабочий – ртутный капающий (РКЭ). Ртутный капающий электрод представляет собой стеклянный капилляр с внешним диаметром 5 мм. Капилляр характеризуется двумя величинами: скоростью вытекания $m = 0,92$ мг/с (количество ртути, вытекающей за 1 с); периодом капания $\tau = 5,5$ с (время, которое проходит от начала образования капли до момента ее отрыва). Произведение $m^{2/3}\tau^{1/6} = 1,26$ мг^{2/3}/с^{1/6} (при отсутствии поляризации) – постоянная величина, характерная для каждого капилляра, входящая в уравнение Ильковича, связывающее величину силы среднего диффузионного тока с концентрацией депольризатора в растворе.

В качестве фоновых электролитов используют фосфатный и ацетатный буферные растворы (рН = 3,0–8,0). Исходный 10^{-2} М раствор морины готовили путем растворения точной навески в изопропанолу либо диметилформамиду (ДМФА). Исследуемые растворы морины готовят разбавлением исходного. Объемное соотношение буферный раствор: органический растворитель = 9 : 1. Величину рН буферных растворов контролируют на рН-метре рН-410 стеклянным электродом.

В режиме классической вольтамперометрии на фоне фосфатного буферного раствора (рН = 7,0) в смеси с ДМФА на стеклоуглеродном электроде для морины зарегистрирован пик окисления при потенциале, равном +0,24 В.

Процесс окисления морины зависит от рН буферного раствора, при увеличении которого потенциал пика окисления смещается к менее положительным значениям. Полученная зависимость прямолинейна в интервале рН = 3,0–7,0 с тангенсом угла наклона, равным 55 мВ/ед. рН, что характерно для электрохимического процесса с участием двух электронов и двух протонов.

Между величиной тока окисления морины (аналитический сигнал) и его концентрацией в растворе существует прямая пропорциональная зависимость в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-3}$ М, что может быть использовано для количественного определения морины. Определению мешают кверцетин и дигидрокверцетин вследствие наложения

аналитических сигналов. Так, для модельных растворов воспроизводимость составляла $S_r = 0,1$.

Вольтамперометрический метод может быть использован для количественного определения морины в модельных растворах. При этом воспроизводимость результатов анализа при применении ртутного каплюющего электрода выше, чем стеклоуглеродного.

Показана принципиальная возможность по уменьшению высоты волны восстановления кислорода в зависимости от концентрации морины определять его антиоксидантную активность.

5.7.8. Инверсионно-вольтамперометрическое определение антибиотиков

Проведена разработка экспрессной и чувствительной методики количественного химического анализа проб лекарственных препаратов на содержание левомицетина методом дифференциальной вольтамперометрии. Объектами исследования служили лекарственные формы: глазные капли и таблетки. В качестве рабочего электрода выбран ртутно-пленочный электрод, который представляет собой фторопластовый стержень с запрессованной серебряной проволокой диаметром 2,0 мм длиной 9–10 мм, площадь поверхности составляет около $15,0 \text{ мм}^2$, на которую нанесена пленка ртути толщиной 10–20 мкм. Преимуществом такого электрода является возможность получения более узких и высоких пиков, которые характеризуются лучшей воспроизводимостью, чем на электродах из углеродных материалов. Кроме того, ртутные электроды являются менее токсичными и более удобными в использовании, чем стационарная ртутная капля. Установлена способность левомицетина восстанавливаться на ртутно-пленочном электроде в растворах фоновых электролитов: 0,1 М раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 М раствор KCl, 0,1 М раствор цитрата аммония двузамещенного ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_7\text{N}_2$) и буферных растворах Бриттона–Робинсона pH 4,0–5,0.

Одним из определяющих факторов при определении левомицетина вольтамперометрическим методом является pH среды. С увеличением pH раствора от 3 до 5,5 потенциал восстановления левомицетина смещается в более отрицательную область на 200 мВ и ток восстановления возрастает практически в 3 раза, что, по-видимому, связано с протеканием в растворе предшествующей протолитической реакции. Диапазон определяемых концентраций составляет 10–500 мг/дм³. Нижняя граница определяемых содержаний составляет 0,005 мг/дм³. Предел обнаружения, рассчитанный по 3 σ -критерию, равен 0,0039 мг/дм³.

Объектами анализа служили сложные многокомпонентные системы: глазные капли и таблетки, в состав которых входят различные со-

путствующие вещества (крахмал картофельный, низкомолекулярный медицинский поливинилпирролидон, кальций стеариновокислый, борная кислота).

В качестве стандартных образцов использовали сухой порошок левомицетина, соответствующий требованию фармакопейной статьи 42-2482-95.

Также разработана методика количественного определения азитромицина дигидрата в фармпрепаратах, а также проведены экспериментальные исследования его вольтамперометрического поведения.

Антибиотик обладает способностью окисляться на различных типах графитовых электродов. В качестве индикаторных электродов применяли СУ и графитовый электрод, пропитанный полиэтиленом и парафином в вакууме. Использование таких электродов обусловлено высокой химической и электрохимической устойчивостью графита, широкой областью рабочих потенциалов как в водных, так и в неводных средах, а также простотой механического обновления поверхности и требованиями техники безопасности. На рис. 5.6 представлена типичная вольтамперограмма окисления азитромицина на СУ электроде, снятая в дифференциально-импульсном режиме развертки потенциала.

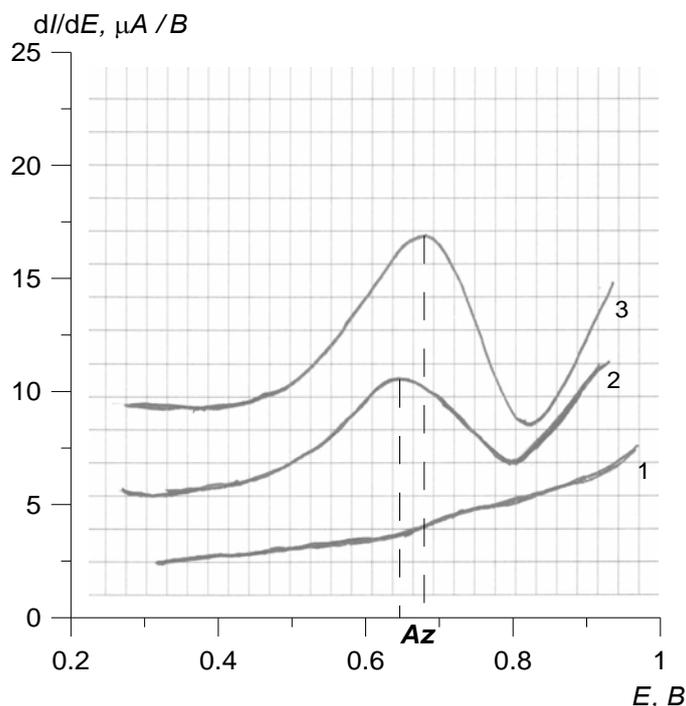


Рис. 5.6. Вольтамперограмма окисления азитромицина дигидрата на СУ электроде:
 1 – фон $0,2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$; 2 – $CAz = 1,99 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$;
 3 – $CAz = 2,98 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$. $\tau = 30 \text{ с}$; $w = 30 \text{ мВ/с}$; $E_0 = 0,2 \text{ В}$

Значение потенциала, при котором происходит электрохимическое концентрирование, оказывает существенное влияние на высоту и форму аналитического сигнала.

Величина тока пика азитромицина на стеклоуглеродном электроде достигала максимального значения в области потенциалов $0,15 \div 0,25$ В и увеличивалась примерно в 2,4 раза.

При анализе лекарственных препаратов не требуется предварительного выделения азитромицина дигидрата и отделения сопутствующих веществ. Сущность методики состоит в разведении проб с последующим ВА определением азитромицина.

5.7.9. Инверсионно-вольтамперометрическое определение витаминов

Витамины – важная группа незаменимых пищевых факторов. Концентрация витаминов в тканях и суточная потребность в них невелики (например, средняя потребность взрослого человека в витаминах B_1 и B_2 – $1,5 \div 2,5$ мг, витамина С – $70 \div 100$ мг), но при недостаточном поступлении витаминов в организм наступают характерные и опасные патологические изменения.

Витамин B_1 (тиамин, 4-метил-5-β-оксиэтил-N-(2-метил-4-амино-5-метилпиримидил)-тиазолит бромид (или хлорида) гидробромид (или гидрохлорид). В качестве рабочего электрода используется ртутный пленочный электрод, представляющий собой пленку ртути толщиной 10–20 мкм, нанесенную на серебряную подложку. Регистрируемые пики имеют удобную для измерения форму, хорошо воспроизводимы.

Рабочим фоном является раствор Na_2HPO_4 концентрацией $0,1$ моль/дм³. В растворе этого фонового электролита линейный характер градуировочного графика наблюдается в широком диапазоне определяемых концентраций.

Витамин B_2 (рибофлавин), 6,7-диметил-9-(D-1-рибитил)-изоаллоксазин. Способность витамина B_2 окисляться на графитовых электродах использована для разработки методик количественного химического анализа пищевых продуктов. Величина потенциала окисления органического вещества определяется строением, структурой и степенью адсорбируемости на гексагонах графита, имеющих π-зонную структуру. Структурное подобие материала электрода и адсорбция плоскостью молекулы (стереоспецифическая адсорбция), по-видимому, благоприятствует переходу электронов при меньшем значении потенциала и способствует более обратимому окислению рибофлавина на графите, чем на стеклоуглероде и пирографите.

Оптимальными фоновыми растворами для количественного определения витамина В₂ являются 0,1 М аммоний лимоннокислый двузамещенный С₆Н₁₄О₇Н₂ (рН 4–5) и 0,1 М натрий виннокислый кислый С₄Н₅О₆Na · Н₂О (рН 3–4). Вольтамперограммы окисления рибофлавина на СУЭ представлена на рис. 5.7.

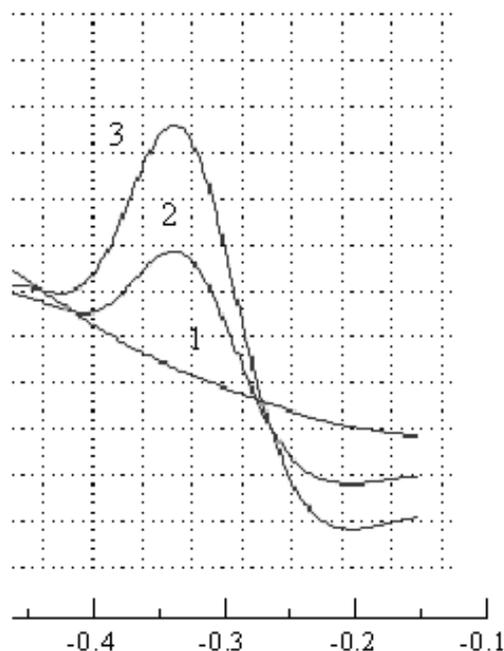


Рис. 5.7. Вольтамперограммы окисления рибофлавина на СУЭ электроде:

$$E_{\text{Э}} = -0,6 \text{ В}, \tau_{\text{Э}} = 30 \text{ с}, W = 40 \text{ мВ/с};$$

1 – фон 0,1 М С₆Н₁₄О₇Н₂; 2 – то же + С(В₂) = 0,5 мг/дм³;

3 – то же + С(В₂) = 1,0 мг/дм³

Нижняя граница определяемых содержаний Сн и предел обнаружения, рассчитанные по 3σ-критерию С_{min} соответственно равны 6,9·10⁻³ и 5,0·10⁻⁴ мг/дм³. Это позволяет определять витамин В₂ и в других объектах.

Витамин С. Одним из основных представителей водорастворимых витаминов является витамин С (аскорбиновая кислота), который принимает участие во многих окислительно-восстановительных реакциях обмена. Процесс электрохимического окисления витамина С проводят в растворе хлорида калия концентрацией 0,1 моль/дм³, подкисленном соляной кислотой до рН примерно 3–4, на индикаторном стеклоуглеродном электроде при потенциале, равном (0,45 ÷ 0,60) В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода (нас. х. с.) в зависимости от рН среды (рис. 5.8). Регистрация аналитического сигнала на вольтамперограмме проводится при линейно-меняющемся (в сторону

положительных значений) потенциале, либо при накопительной развертке потенциала в накопительном режиме записи вольтамперограмм.

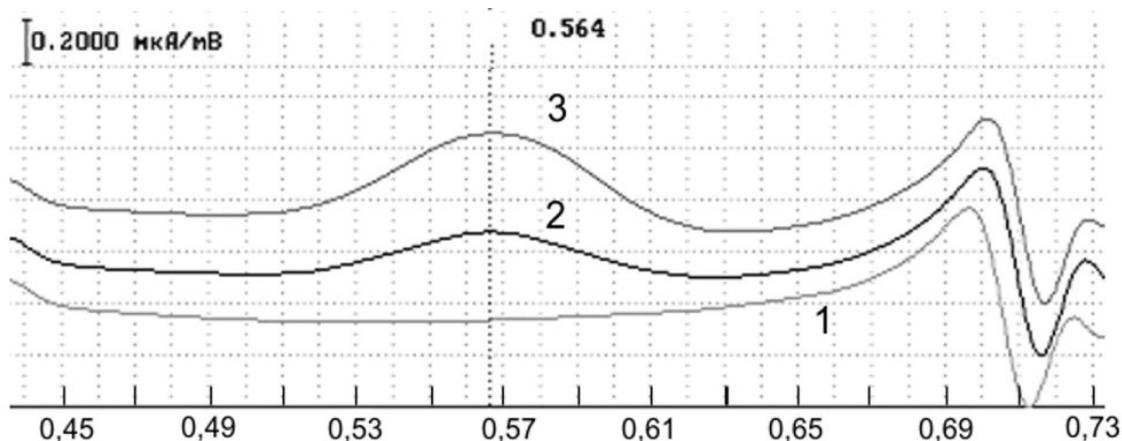


Рис. 5.8. Вольтамперограмма окисления витамина С на фоне KCl, подкисленного HCl. Электрод – СУ, $E_0 = -0.30$ В, $W = 15$ мВ/с.
1 – фоновый электролит; 2 – проба; 3 – проба с добавкой стандартного раствора

Витамин Е. Витамин Е представляет собой группу токоферолов, из которых наибольшей биологической активностью обладает α -токоферол. В состав поливитаминных препаратов α -токоферол входит в виде α -токоферола ацетата (6-ацетокси-2,5,7,8-тетраметил-(4/,8/,12/-триметилтридецил)-хромана), представляющего собой устойчивый синтетический аналог природного α -токоферола. Препарат α -токоферола ацетат проявляет несколько большую биологическую активность, чем свободный витамин, вследствие большей устойчивости к окислению.

Электролитическое окисление является основой полярографического определения хроманов. Этот метод имеет ограниченное применение для природных масел, но дает прекрасные результаты для α -токоферола. β - и γ -токоферолы не дают полярографической волны.

Метод дифференциальной вольтамперометрии (ДВА) основан на способности витамина Е электрохимически окисляться на углеродных электродах различных типов, таких как стеклоуглеродный (СУ) электрод.

Полярографическое определение витамина Е возможно и в виде его окисленной формы – токоферилхинона.

Электрохимические методы в настоящее время ограничено используются в фармацевтическом анализе, по-видимому, из-за проблем, возникающих при анализе многокомпонентных поливитаминных препаратов, сложности автоматизации анализа, а также токсичности больших количеств ртути, используемой в полярографах. Методики анализа, в основе которых лежит электрофорез, в научной литературе не обнаружены.

Для определения витамина Е предложен высокочувствительный метод дифференциальной вольтамперометрии (ДВА), основанный на способности витамина электрохимически окисляться на углеродных электродах различных типов. В качестве индикаторных использовали графитовый электрод, пропитанный полиэтиленом с парафином в вакууме, стеклоуглеродный и углеситаловый электроды. Наименьшее значение остаточного тока и лучшую воспроизводимость сигналов на вольтамперограмме наблюдали на стеклоуглеродном (СУ) электроде, который и был выбран в качестве рабочего. Фоновыми электролитами служили растворы перхлората калия, перхлората тетраметиламмония, сульфата натрия, сульфата аммония в неводных растворителях ацетонитриле, пропиленкарбонате. Каждый из этих фоновых электролитов можно использовать для количественного определения витамина, однако оптимальным фоном является раствор перхлората натрия в ацетонитриле. Линейная зависимость между током окисления и концентрацией витамина Е наблюдалась в широком диапазоне концентраций от 2,0 мг/л до 20,0 мг/л. Предел обнаружения, рассчитанный по 3 σ -критерию ($C_{min,p}$) равен 0,35 мг/л. Нижняя граница определяемых содержаний – 0,80 мг/л. Концентрацию α -токоферола определяли по высотам анодных пиков в диапазоне потенциалов от +1,3 В до +1,8 В относительно донной ртути. Вольтамперограмма окисления α -токоферола ацетата на СУ электроде представлена на рис. 5.9.

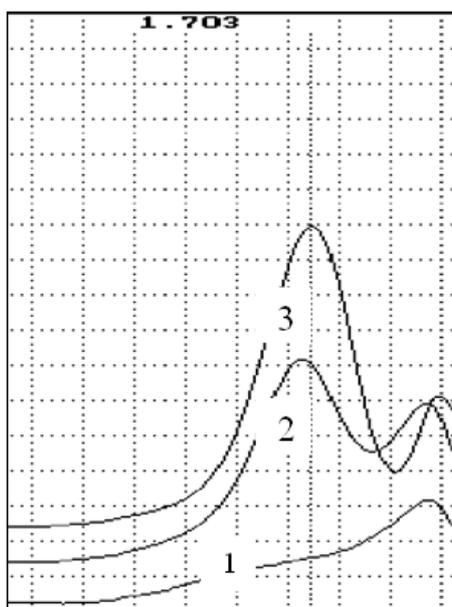


Рис. 5.9. Вольтамперограмма определения витамина Е на СУЭ в фоновом электролите (1), в пробе (2) и в пробе с добавкой (3) стандартного раствора

Сущность методики определения α -токоферола ацетата в фарм-препаратах состоит в извлечении витамина из пробы путем экстракции его хлороформом с последующим вольтамперометрическим определением массовой концентрации витамина Е методом дифференциальной анодной вольтамперометрии. Регистрацию аналитического сигнала на вольтамперограмме проводили при линейно-меняющемся (в сторону положительных значений) потенциале в дифференциальном режиме съемки вольтамперограмм. Массовую концентрацию витамина Е в пробе определяли методом добавок аттестованных смесей α -токоферола ацетата. Метод использовали для определения витамина в сложных многокомпонентных смесях, содержащих большое количество водо- и жирорастворимых витаминов. При определении витамина Е в лекарственных формах, представляющих собой твердые сухие смеси, необходимо перевести витамин в раствор. Для его извлечения предложен метод экстракции с использованием аппарата Сокслета, который обладает следующими достоинствами: простота установки, нахождение объекта анализа в постоянном контакте с растворителем, что обеспечивает наиболее полное экстрагирование, отсутствие постоянного внимания оператора.

Разработанная методика количественного химического анализа α -токоферола ацетата с использованием аппарата Сокслета улучшает воспроизводимость результатов анализа, позволяет экспрессно и селективно проводить определение витамина Е в фармпрепаратах в диапазоне концентраций от 5 мг/драже до 100 мг/драже с относительной погрешностью не превышающей 13 % отн.

5.7.10. Инверсионно-вольтамперометрическое определение флавоноидов

Кверцетин и рутин. Флавоноиды имеют широкий спектр действия на организм; имея высокую Р-витаминную активность, они нормализуют проницаемость капилляров, укрепляют и делают более эластичной сосудистую стенку. На рис. 5.10 и 5.11 приведены вольтамперные кривые окисления кверцетина и рутина на стеклоуглеродном электроде. Измерения проводят на стеклоуглеродном электроде по пикам окисления на фоне соляной кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³ при определении кверцетина (рис. 5.10) или на фоне 0,1 моль/дм³ Na₂HPO₄ при определении рутина (рис. 5.11).

Предложенный способ применяется при определении следовых количеств кверцетина как в чистых растворах, так и в сложных по составу фармакологических препаратах.

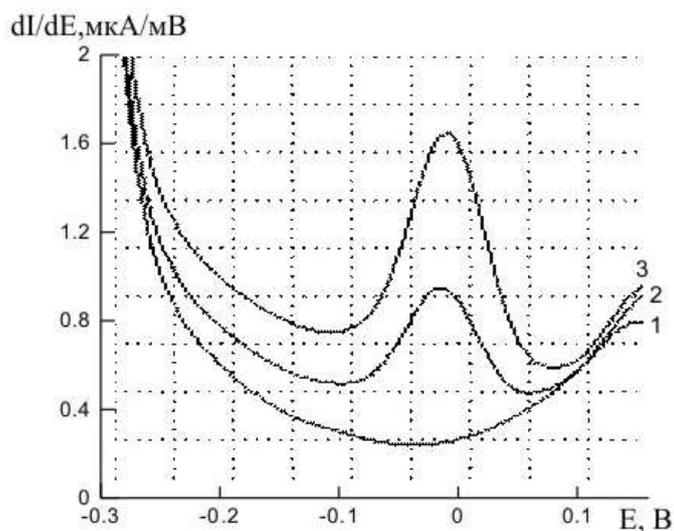


Рис. 5.10. Вольтамперограммы окисления кверцетина на стеклоуглеродном электроде в дифференциальном режиме. 1 – фон 0,05 HCl; 2 – С кверцетина = 0,15 мг/л; 3 – С кверцетина = 0,3 мг/л

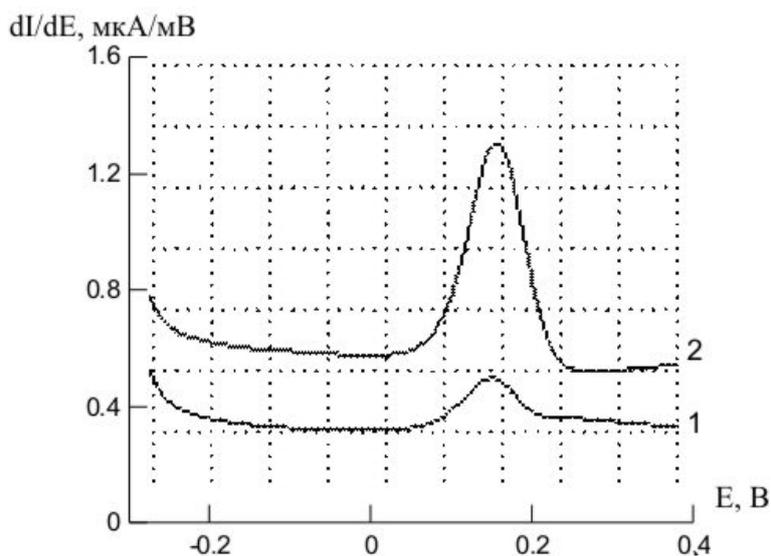


Рис. 5.11. Вольтамперограммы окисления рутина на стеклоуглеродном электроде в дифференциальном режиме. 1 – фон 0,1 М Na₂HPO₄; 2 – С рутина = 0,4 мг/л; 3 – С рутина = 1,2 мг/л

В заключение отметим, что использование разработанных методов пробоподготовки, их оптимизации, а также аттестация и стандартизация методик выполнения измерений делают инверсионную вольтамперометрию рутинной при анализе фармпрепаратов. Разработанные и метрологически аттестованные методики способствуют тому, что метод уже внедрен и используется в более чем 900 испытательных лабораториях России, конкурируя с широко распространенными методами по таким характеристикам, как чувствительность, точность, возможность од-

новременного определения нескольких элементов и низкая стоимость оборудования.

5.8. Хроматографические методы в определении биологически активных веществ

5.8.1. Одновременное определение водо- и жирорастворимых витаминов методом жидкостной хроматографии

Большинство опубликованных работ по количественному анализу витаминов и их смесей методом ВЭЖХ посвящено отдельному определению двух разных групп – водо- и жирорастворимых витаминов. Это обусловлено большим различием хроматографических свойств витаминов этих групп. Водорастворимые витамины (ВВ) относительно слабо удерживаются неподвижной фазой и могут быть разделены в режиме обращенных фаз элюентами на основе буферных растворов с добавлением органического модификатора – ацетонитрила или метанола в количестве 5–30 % об. или буферными растворами, не содержащими органический растворитель. Для элюирования жирорастворимых витаминов (ЖВ), молекулы которых гидрофобны и имеют сильное сродство к модифицированной поверхности сорбента, необходима подвижная фаза на основе чистого органического растворителя или органического растворителя с небольшим содержанием воды, например 1 % об. воды в метаноле. ЖВ определяют как в обращенно-фазовом, так и нормально-фазовом режимах. Раздельное определение ВВ и ЖВ требует длительного времени и неудобно для серийного анализа продукции на производстве. При анализе ВВ происходит загрязнение колонки ЖВ, которые при соответствующих составах элюента остаются в неподвижной фазе. При таких условиях для получения воспроизводимых количественных результатов необходима дополнительная промывка колонки. В литературе описан другой способ решения этой проблемы. При анализе витаминного сиропа отделяют ЖВ методом твердофазной экстракции с использованием патронов, заполненных сорбентом С18. При пропускании раствора пробы в метаноле через патрон ЖВ переходят в слой сорбента, а ВВ остаются в растворе. ЖВ переводят в другой раствор промыванием патрона смесью ацетонитрил – тетрагидрофуран (1:1). Полученные растворы анализируют раздельно методом ВЭЖХ. Такой подход также длителен и трудоемок.

В связи с этим представляет научный и практический интерес разработка методики одновременного количественного определения ВВ и ЖВ в сложной смеси витаминов, например в витаминном сиропе.

В ходе работы использовали жидкостный хроматограф Waters Alliance 2695 с диодно-матричным детектором Waters 2996 с четырехкомпонентным градиентным смесителем на низком давлении. Разделение компонентов сиропа проводили на полимерных колонках размером 100×4,6 мм с монолитными сорбентами Chromolith Performance RP-8e и Chromolith Performance RP-18e. Для приготовления подвижных фаз использовали ультрачистую воду, ацетонитрил, изопропиловый спирт (ИПС), гексансульфонат и октансульфонат натрия квалификации «для жидкостной хроматографии» (Мерк, Германия).

Анализируемый сироп содержал витамины А (ретинола пальмитат, I), С (аскорбиновая кислота, II), В₁ (тиамина хлорид, III), В₂ (рибофлавин-5-фосфат, IV), В₃ (кальция D-пантотенат, V), В₆ (пиридоксина гидрохлорид, VI), Е (α-токоферол, VII), РР (никотинамид, VIII), консерванты нипагин (IX), нипазол (X), натрия бензоат (XI) и другие компоненты и вспомогательные вещества.

Хроматографическое разделение сложной смеси веществ, сильно различающихся по полярности и гидрофобности, возможно только в градиентном режиме. В связи с этим перспективно использование колонок нового типа Chromolith.

Для обеспечения оптимального удерживания компонентов основной природы (III, IV, VI) исследовали два подхода:

- повышение pH подвижной фазы до 6,0;
- введение ионпарного реагента в подвижную фазу с pH 3,0.

Варианты градиентного элюирования представлены в табл. 5.6.

Таблица 5.6

Варианты градиентного элюирования

Сорбент	Вариант	Изменение состава подвижных фаз
Chromolith Performance RP-8e	I	CH ₃ CN:0,05 М КСlO ₄ , pH 6,0 (0:1) → 1:1 (к 4 мин) → CH ₃ CN:ИПС = 4:1 (8 мин)
	II	CH ₃ CN:(0,05 М КСlO ₄ , pH 3,0 + 2,5 % натрия гексансульфонат) (0:1) → 15:85 (к 6 мин) → CH ₃ CN:ИПС = 4:1 (к 8 мин)
	III	CH ₃ CN:(0,05 М КСlO ₄ , pH 3,0 + 2,5 % натрия октансульфонат) (0:1) → 15:85 (к 6 мин) → CH ₃ CN:ИПС = 4:1 (к 8 мин)
Chromolith Performance RP-18e	IV	Состав (II)
	V	Состав (III)

Наилучшее разделение ВВ было получено при условиях варианта V. Для элюирования ЖВ на последнем этапе градиента была использована ПФ, содержащая только органические растворители. При этом пришлось столкнуться с проблемой возникновения пузырьков воздуха и потери потока подвижной фазы при переходе от водно-органического растворителя к 100 % объемн. ацетонитрила. Устойчивость потока подвижной фазы

и бесперебойная работа хроматографа были обеспечены добавлением изопропилового спирта (соотношение $\text{CH}_3\text{CN} : \text{ИПС} = 4 : 1$).

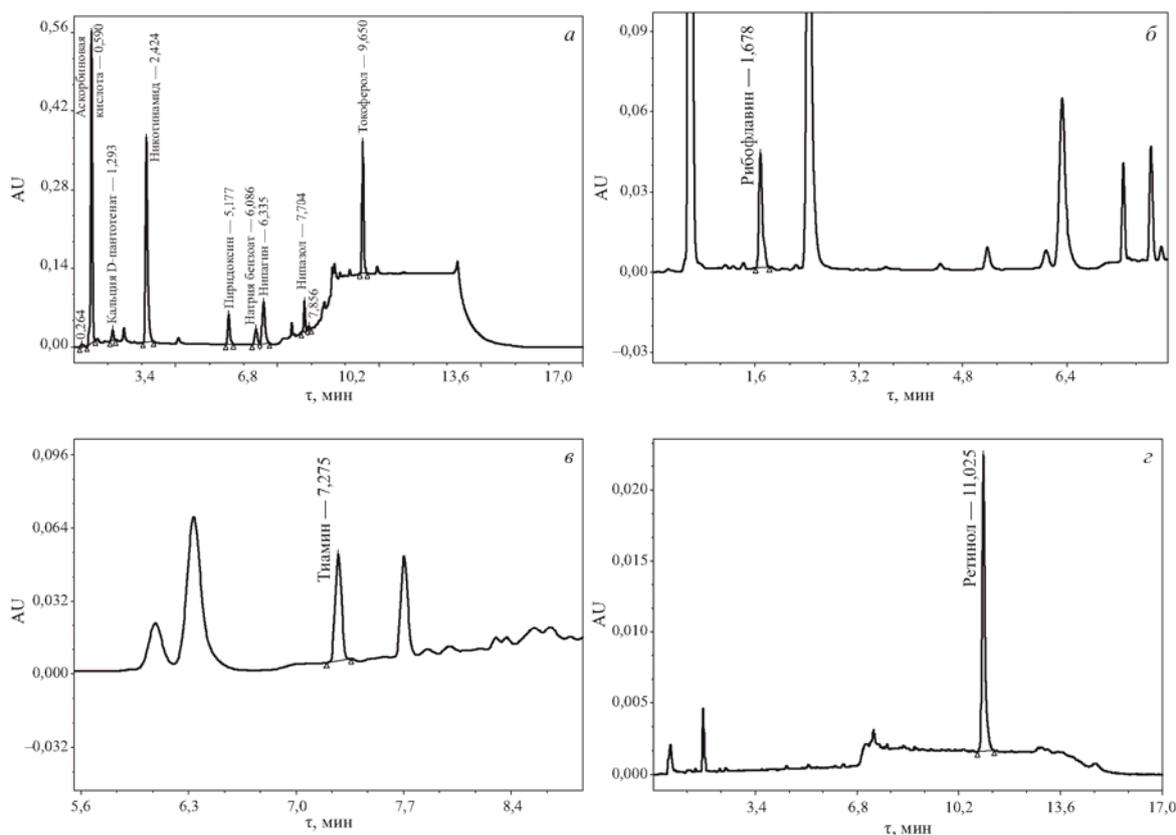


Рис. 5.12. Хроматограммы анализируемого раствора при 210 (а), 267 (б), 246 (в) и 328 (г) нм

Компоненты исследуемой смеси существенно различаются не только по хроматографическим, но и спектральным свойствам. Наиболее точные результаты анализа могут быть получены при детектировании каждого вещества в максимуме его поглощения. Такой подход неудобен, так как требует большого количества расчетов. Вместе с тем при анализе сложной многокомпонентной смеси измерение при одной длине волны также неприемлемо, поскольку не обеспечивает достаточную чувствительность и селективность определения компонентов с относительно низким содержанием или невысоким поглощением. На основании данных, полученных при помощи диодно-матричного детектора в процессе регистрации хроматограмм, было принято решение проводить детектирование при четырех длинах волн. Один из компонентов, определивших выбор длины волны 210 нм, – кальция D-пантотенат (V). Его спектр не имеет максимума: поглощение монотонно убывает с увеличением длины волны. При $\lambda = 210$ нм определяли

также компоненты II, VI, VII – XI. Вещества I, III, IV детектировали при максимумах поглощения (328, 246, 267 нм соответственно). Хроматограммы испытуемого раствора представлены на рис. 5.12, где обозначены только те пики, площадь которых рассчитывали при соответствующей длине волны.

Разрешение «критической пары» – бензоата и нипагина – равно 1,1. Все остальные пики разделены до базовой линии ($R > 1,5$). Таким образом, полученное разделение позволяет провести селективное определение компонентов I – XI.

В табл. 5.7 приведены результаты анализа трех экспериментальных образцов сиропа и их метрологические характеристики.

Таблица 5.7

Результаты анализа трех опытных образцов витаминного сиропа

Компоненты	Норма, мг/мл	$x_{\text{ср}}$	s	$s_{\text{гп}}$	$\Delta x_{\text{ср}}$
Аскорбиновая кислота	10,8 – 20,2	21,570	0,532	0,177	0,410
		21,369	0,661	0,220	0,509
		20,785	0,720	0,240	0,554
Никотинамид	2,2 – 4,4	3,669	0,122	0,041	0,094
		3,594	0,190	0,063	0,146
		3,577	0,148	0,049	0,114
Тиамин хлорид	0,22 – 0,40	0,347	0,011	0,004	0,008
		0,334	0,014	0,005	0,011
		0,338	0,017	0,006	0,013
Рибофлавин-5-фосфат	0,22 – 0,40	0,353	0,022	0,007	0,017
		0,349	0,026	0,009	0,020
		0,352	0,014	0,005	0,011
Кальция D-пантотенат	1,08 – 2,02	2,160	0,110	0,037	0,085
		1,977	0,094	0,031	0,072
		1,995	0,086	0,029	0,066
Пиридоксин гидрохлорид	0,27 – 0,51	0,472	0,021	0,007	0,016
		0,447	0,032	0,011	0,025
		0,452	0,024	0,008	0,018
Ретинола пальмитат	0,108 – 0,2025	0,223	0,012	0,004	0,009
		0,193	0,013	0,004	0,010
		0,174	0,011	0,004	0,008
Токоферола ацетат	1,08 – 2,025	2,148	0,123	0,041	0,095
		1,982	0,121	0,040	0,093
		1,800	0,114	0,038	0,088
Нипагин	0,68 – 0,82	0,771	0,032	0,011	0,025
		0,692	0,044	0,015	0,034
		0,702	0,041	0,014	0,032
Нипазол	0,22 – 0,28	0,286	0,018	0,006	0,014
		0,240	0,016	0,005	0,012
		0,240	0,013	0,004	0,010
Натрия бензоат	0,9 – 1,1	1,002	0,026	0,009	0,020
		0,918	0,029	0,010	0,022
		0,917	0,028	0,009	0,022

Для подтверждения достоверности результатов были приготовлены и проанализированы тест-растворы, содержащие все определяемые и вспомогательные (плацебо) вещества сиропа. Диапазон концентраций определяемых веществ в тест-растворах составил $\pm 20\%$ от номинала. Обработка данных анализа тест-растворов по методу наименьших квадратов подтвердила, что в изученном диапазоне площади пиков определяемых компонентов и их концентрации связаны линейной зависимостью ($K_{\text{корр}} > 0,99$).

5.8.2. Разделение биологически активных веществ методом тонкослойной хроматографии

Характерной чертой современной тонкослойной хроматографии (ТСХ) является поиск новых способов и приемов хроматографирования, направленных на повышение чувствительности определения, эффективности и селективности разделения аналитов в сложной многокомпонентной матрице.

Предложен новый вариант ТСХ, в котором параметры хроматографической системы (эффективность и селективность) можно направленно изменять, варьируя природу газовой фазы в замкнутом объеме хроматографической камеры. Этот вариант назван ТСХ с управляемой газовой фазой (ТСХ-УГФ). Предварительные данные, свидетельствуют о том, что газовая фаза может использоваться для направленного и активного воздействия на процесс разделения соединений в ТСХ. Однако систематических исследований в этом направлении не проводилось.

Выявлены закономерности, особенности и аналитические возможности нового метода тонкослойной хроматографии с управляемой газовой фазой.

В качестве модельных систем использовали смеси бензойных кислот, фенолов, ароматических аминов, пищевых красителей, аминокислот. В качестве газообразных модификаторов выбраны кислотные (CO_2) и основные (NH_3) газы. Углекислый газ, полученный в процессе взаимодействия соляной кислоты с карбонатом кальция в аппарате Киппа, подавали в хроматографическую камеру в динамическом режиме через специальные отверстия. В случае аммиака проводили насыщение камеры парами раствора этого модификатора. Раствор NH_3 находился во втором отсеке хроматографического стакана, отделенном от камеры с элюентом специальной перегородкой.

Для разработки нового метода хроматографирования проводили восходящей ТСХ при термостатировании (20 ± 1 °C) в оригинальных камерах, представленных на рис. 5.13.

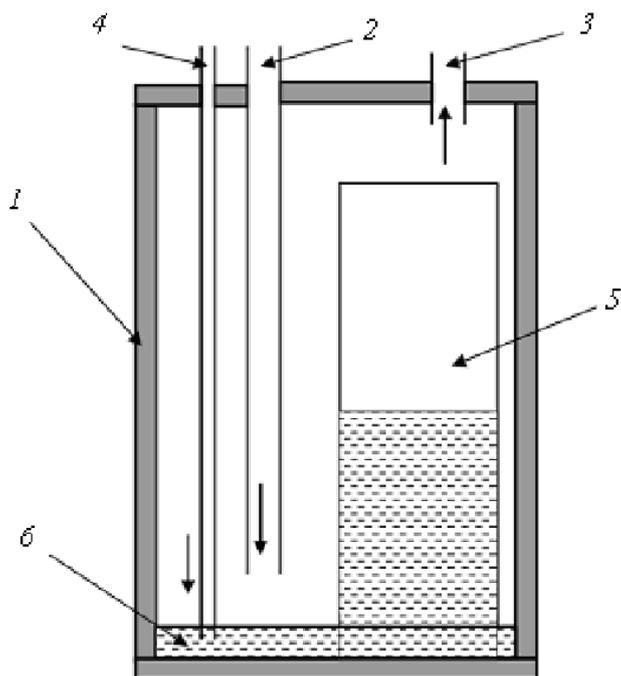


Рис. 5.13. Хроматографическая камера с подачей газового модификатора.

*1 – камера; 2 – трубка для подачи в камеру газа;
3 – трубка для отвода газа; 4 – трубка для подачи подвижной фазы;
5 – пластинка для ТСХ; 6 – жидкий элюент*

Предварительными экспериментами установлено, что замена исходной газовой среды на газ-модификатор изменяет величину подвижности веществ, число теоретических тарелок, высоту, эквивалентную теоретической тарелке, и разрешение при разделении всех сорбатов. Установлено, что действие газа индивидуально и зависит от его природы, природы сорбата, времени контакта с сорбатом, природы неподвижной и подвижной фаз. При хроматографировании на нормальной фазе особенностью влияния газовых модификаторов является селективная динамическая модификация неподвижной и подвижной фаз, а также разделяемых соединений вследствие абсорбции и адсорбции газа на пластинке ТСХ, что приводит к хроматографическим эффектам и закономерностям, заключающимся: в изменении подвижности кислотных и основных сорбатов; зависимости значений R_f анализируемых веществ от природы сорбента, типа подложки пластинки ТСХ и связующего неподвижной фазы; изменении компактности хроматографических зон и значений AR_f между ними; изменении количественных характеристик разделения в хроматографической системе по сравнению с традиционным вариантом ТСХ. Найдено, что на всех нормальных неподвижных фазах действие газовых модификаторов более эффективно для кислот-

ных сорбатов, чем для основных. Показано, что особенность ТСХ-УГФ на обращенной фазе и полиамиде заключается в динамическом и постепенном изменении в соответствии с величинами рК химической формы кислот и оснований и дифференцировании их хроматографических свойств вследствие изменения рН подвижной фазы.

Метод тонкослойной хроматографии с управляемой газовой фазой предложен для разделения смесей фенолов, бензойных кислот, пищевых красителей, аминокислот. Правильность определения контролировалась методом стандартной добавки.

5.8.3. Определение сахаров и аминокислот методом ВЭЖХ

Определение сахаров – сложная аналитическая задача, их определяют газовой, жидкостной и ионной хроматографией. Для определения методом газовой хроматографии сахара дериватизируют в летучие производные. Дериватизация (химическое превращение) – дополнительная трудоемкая длительная операция, ухудшающая точность измерения.

Методом жидкостной хроматографии можно разделять сахара без дериватизации. Однако большие проблемы с детектированием. Ранее сахара определялись рефрактометрическим детектором, однако он имеет серьезные недостатки из-за низкой чувствительности и плохой селективности. В последние годы предложены два новых детектора для определения сахаров: по светорассеиванию и амперометрический. Первый детектор дорогой, в нашей стране не выпускается. Амперометрический детектор с золотым электродом в импульсном режиме позволяет селективно и с высокой чувствительностью определять сахара. Подобный детектор разработан в НПО «Химавтоматика». На этом детекторе были выбраны оптимальные условия детектирования. Смеси моносахаров: арабиноза, галактоза, глюкоза, ксилоза и фруктоза можно разделить за 10–12 мин. С разработанной методикой были определены сахара в реальных смесях, в частности в соке и в красном вине. В этих пробах определены глюкоза и фруктоза. Возможно определение и полисахаридов. Определено содержание сахаров в продуктах ферментативного разложения соломы (производство биотоплива). В последние годы возрос интерес к анализу аминокислот в биотехнологии, при решении задач протеомики, в продуктах функционального и лечебного питания и пр.

Аминокислоты определяются в физиологических жидкостях, в кормах для животных жидкостной хроматографией с предварительной их дериватизацией и детектированием УФ-или флуориметрическим детекторами. Это связано с тем, что не все аминокислоты можно определять напрямую (без дериватизации) этими детекторами.

Дериватизация, как известно, дополнительный процесс, который никогда не бывает полным. Таким образом этот процесс удорожает, удлиняет и ухудшает весь анализ. Для детектирования напрямую аминокислот амперометрически на золотом электроде в импульсном режиме выбраны оптимальные условия.

5.8.4. Идентификация и количественное определение флавоноидов в лекарственных препаратах растительного происхождения

Разработаны методики идентификации и количественного определения флавоноидов в фармацевтических препаратах растительного происхождения. Объектами исследования служили водно-спиртовые извлечения из лекарственных препаратов растительного происхождения (люцерна, календула, цветки боярышника). Пробоподготовку образцов осуществляли методом экстракции 70%-м этанолом при нагревании в течение 1 ч с обратным холодильником. Предварительно были установлены оптимальные параметры извлечения, включающие выбор экстрагента, время и кратность экстракции. Изучение хроматографических свойств наиболее распространенных растительных флавоноидов (кверцетин и рутин) проводили методом нормально-фазовой и обращенно-фазовой тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Силуфол и Сорбфил, RP-18, содержащих люминофорные группы. В качестве подвижных фаз (ПФ) были апробированы системы растворителей: бензол – этилацетат – ледяная уксусная кислота (5:5:1); ацетон – аммиак (9:1); н-бутанол – ледяная – уксусная кислота – вода (5:1:1); хлороформ – метанол, обладающие высокой скоростью продвижения по адсорбенту и часто используемые при анализе различных фенольных соединений. Проявление хроматографических зон осуществляли опрыскиванием 5%-м раствором хлорида алюминия и выдерживанием пластин в атмосфере аммиака. Идентификацию кверцетина и рутина в растительном сырье проводили путем сравнения значений величин подвижности (R_f) пятен со значениями R_f стандартных образцов рутина и кверцетина. В водно-спиртовых извлечениях из цветков боярышника и календулы обнаружили только рутин, в извлечении из люцерны обнаружили зону, соответствующую кверцетину. Количественное содержание ФЛ в растительных лекарственных препаратах определяли методом спектрофотометрии по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. С целью выбора оптимальной аналитической длины волны были получены УФ-спектры спиртовых экстрактов исследуемых препаратов и стандартных образцов рутина и кверцетина. Изучение УФ-спектров водно-спиртовых экстрактов показало, что максимумы поглощения вышепе-

речисленных растворов находятся в интервале длин волн 360–440 нм. В результате комплексообразования происходит гипсохромный сдвиг полосы поглощения флавоноидов в видимую область на 30–70 нм, сопровождающийся гиперхромным эффектом. Суммарное определение флавоноидов проводили методом градуировочного графика. В качестве стандартного вещества был выбран рутин (боярышник, календула) и кверцетин в случае люцерны. Суммарное содержание флавоноидов в исследуемых препаратах составило: календула – $0,92 \pm 0,02$ %; люцерна посевная – $0,67 \pm 0,07$ %; боярышник колючий – $1,29 \pm 0,03$ %. Оценку правильности определения осуществляли методом «введено-найдено». Обработка полученных результатов по *F*- и *t*-критерием показала отсутствие систематической ошибки.

5.8.5. Определение витамина Е методом ВЭЖХ с косвенным спектрофотометрическим детектированием

Для разделения и определения витаминов широко используется нормально- и обращенно-фазовый варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Известно также, что предел обнаружения УФ-детектором *α*-токоферола, обладающего наибольшей биологической активностью, выше, чем предел обнаружения других жирорастворимых витаминов. Проведены идентификация и количественное определение витаминов Е и D₃ методом ВЭЖХ с косвенным спектрофотометрическим детектированием. В качестве модификаторов подвижных фаз исследованы хлорофилл (Хл) и тетрафенилпорфирин (Н₂ТФП). При выборе модификаторов учитывали, что витамин Е относится к природным фенолам, а принципиальная возможность использования хлорофилла, обладающего $\varepsilon > 1 \cdot 10^5$ л/моль·см, $\lambda = 404$ нм, для косвенного детектирования фенолов в ВЭЖХ была показана ранее.

В качестве подвижных фаз использовали растворители: ацетонитрил (АН), гексан, диоксан, этилацетат (ЭА), изопропанол (ИП), метанол, хлороформ, циклогексанол, воду или их смеси. Для косвенного детектирования витаминов эти подвижные фазы модифицировали растворами хлорофилла в этаноле ($1,33 \cdot 10^{-5}$ М, $8,89 \cdot 10^{-6}$ М, $4,45 \cdot 10^{-6}$ М) и тетрафенилпорфирина в этилацетате ($8,33 \cdot 10^{-6}$ М). Равновесие в колонках устанавливали после пропускания 2000 мкл модифицированной подвижной фазы.

Хлорофилл (*a+b*) экстрагировали из листьев сухой крапивы по стандартной методике. Концентрацию полученного раствора определяли спектрофотометрически. Известную аликвоту раствора переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки подвижной фазой (ПФ).

Точную навеску тетрафенилпорфирина фирмы «Fluka» растворяли в известном объеме этилацетата. Далее переносили аликвоту раствора в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки ПФ. Точные навески продажных препаратов витаминов Е и D₃ растворяли в изопропанол, этаноле или ПФ. Для построения градуировочных графиков растворы витаминов исходных концентраций последовательно разбавляли.

Хроматографическое поведение витаминов исследовали на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром 4 с колонками из нержавеющей стали 64×3 мм, 64×2 мм и 80×2 мм, заполненных сорбентами Силасорб 600 (5 мкм), Нуклеосил С₁₈ (5 мкм) и Диасорб-130-NH₂ (7 мкм) соответственно; объем пробы составлял 2–15 мкл; расход подвижной фазы – 100 или 50 мкл/мин.

Прямое детектирование витаминов проводили при λ=280 нм, косвенное – при λ=404 нм. Электронные спектры поглощения (ЭСП) подвижных фаз снимали на спектрофотометре «Hewlett Packard 8452 A», l=1 см.

Мертвый объем V_m определяли по удерживанию несорбируемых компонентов: СС1₄ для колонок Силасорб 600 (112 мкл) и Диасорб-130-NH₂ (123 мкл), и нитрометана для колонки Нуклеосил С₁₈ (119 мкл).

Хроматографическое поведение витаминов оценивали с помощью коэффициентов емкости k'=(V_R - V_m)/V_m.

Прямое детектирование (280 нм). В колонке Диасорб-130-NH₂ коэффициенты емкости витаминов низки, различаются незначительно, кроме того, витамины в ряде случаев выходят из колонки вместе с растворителем (табл. 5.8). На этой колонке поведение витаминов в модифицированных ПФ не изучали. На колонке Силасорб 600 во всех элюентах коэффициент емкости витамина D₃ больше, чем k' Е, что согласуется с их гидрофобностью. Лучшего разделения удалось добиться в ПФ гексан-диоксан (97:3) (рис. 5.14).

Таблица 5.8

Коэффициенты емкости витаминов на разных колонках

Витамин	Диасорб-130-NH ₂ (280 нм)				Силасорб-600 (280 нм)				Нуклеосил-С ₁₈ (280 нм)		Нуклеосил-С ₁₈ (404 нм)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Е	0,77	0,87	1,20	0,79	0,71	0,67	0,72	1,32	4,85	4,04	3,29	4,29
D ₃	1,20	0,85	Размыв.	1,05	0,77	2,21	1,80	9,73	0,37	4,21	5,55	–

Примечания. 1 – гексан – ИП (95:5); 2 – АН – Н₂О (75:25); 3 – СН₃ОН – Н₂О (4:1); 4 – гексан – ИП (95:5); 5 – СН₃С1 – гексанол (95:5); 6 – гексан – ЭА (5:1); 7 – гексан – диоксан – ИП (94,5:5:0,5); 8 – гексан – диоксан (97:3); 9 – АН; 10 – АН – СН₃ОН (70:30); 11 – АН+ТФП (8·10⁻⁶ М); 12 – АН+Хл (4,45·10⁻⁶ М).

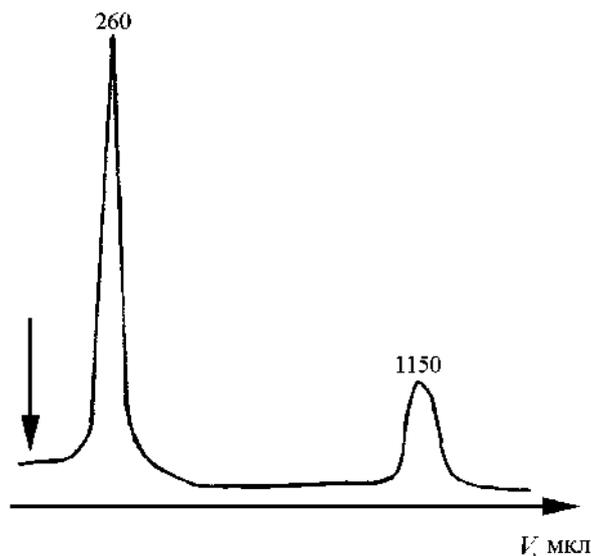


Рис. 5.14. Хроматограмма смеси витаминов E (260 мкл) и D₃ (1150 мкл). Колонка Силасорб 600, ПФ гексан – диоксан (97:3), F = 100 мкл/мин

Однако при прямом спектрофотометрическом детектировании определение в этих условиях витамина E в фармацевтическом препарате «Компливит» оказалось невозможным из-за перекрывания пика витамина E пиком ретинола, также входящим в состав исследуемого препарата. На колонке Нуклеосил С₁₈ в АН порядок выхода витаминов E и D₃ закономерно изменяется на обратный по сравнению с показанным на рис. 5.12. В ПФ АН – метанол (70:30) *k'* витаминов различаются незначительно.

Косвенное детектирование (404 нм). Для косвенного спектрофотометрического детектирования витаминов E и D₃ две ПФ (АН и гексан – диоксан) модифицировали хлорофиллом и тетрафенилпорфирином. Хроматографические системы при этом приобретают новые свойства. В модифицированной ацетонитрильной фазе удерживание витаминов E и D₃ сильно изменяется по сравнению с их удерживанием в АН. Значительно увеличивается удерживание витамина D₃ и незначительно уменьшается удерживание витамина E. При введении пробы (растворитель, модификатор, витамин) в колонку с модифицированной ПФ происходит нарушение равновесного распределения модификатора между подвижной и неподвижной фазами, на хроматограмме появляются пики модификатора, растворителей и витаминов, соответствующие этим нарушениям. Объемы удерживания растворителей (188–200 мкл), отрицательных системных пиков Хл (900 мкл) и Н₂ТФП (665–670 мкл), витаминов E (500, 630 мкл) и D₃ (780 мкл) на колонке Нуклеосил С₁₈ указаны на хроматограммах (рис. 5.15).

Меньший объем удерживания $H_2TФП$ по сравнению с объемом удерживания хлорофилла связан с большей гидрофобностью последнего. Это приводит к тому, что витамин Е выходит до системного пика, витамин D_3 – после системного пика. Направление пиков Е и D_3 положительное.

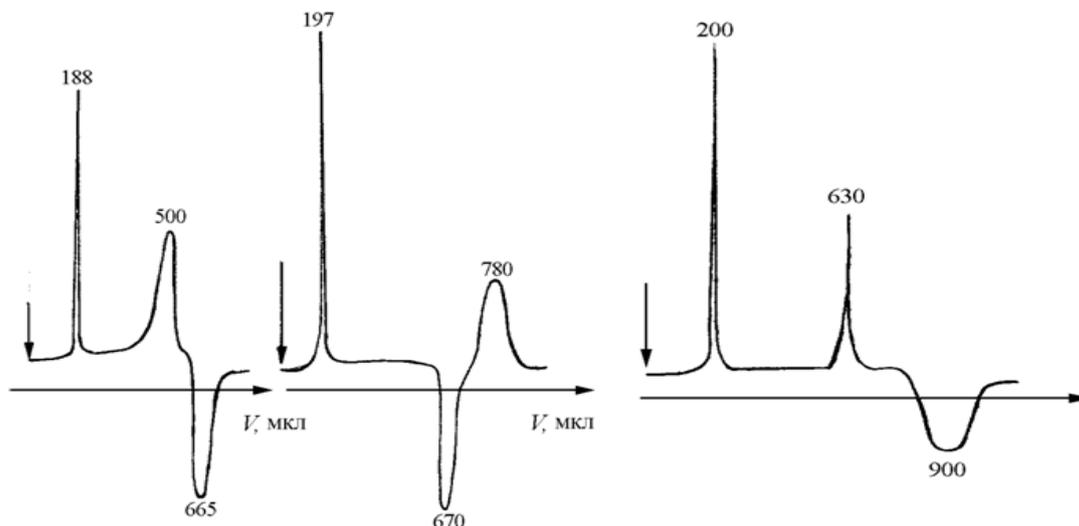


Рис. 5.15. Хроматограммы витаминов на колонке Нуклеосил C_{18}
а – 5 мкл витамина Е в ИП, *б* – 7 мкл витамина D_3 в этаноле;
 ПФ АН+ $H_2TФП$ ($C = 8,33 \cdot 10^{-6} M$); *в* – 10 мкл витамина Е в ИП;
 ПФ АН+хлорофилл ($C = 4,55 \cdot 10^{-6} M$)

Такие изменения связаны, по-видимому, с различной степенью взаимодействия витаминов, различающихся гидрофобностью, с модификатором – хлорофиллом. Электронное строение порфиринов позволяет оценить слабые взаимодействия молекул модификаторов и сорбатов спектрофотометрическим методом. Ниже рассмотрены, например, изменения в ЭСП хлорофилла в присутствии витамина D_3 (рис. 5.16).

При соотношении витамина D_3 и хлорофилла (5,1:1) наблюдается батохромный сдвиг на 4 нм плеча в спектре хлорофилла при длине волны 228 нм. И на фоне общего гипохромного эффекта наблюдается гиперхромный эффект в области 265–285 нм. На состояние π -системы хлорофилла, возможно, влияют взаимодействия гидрофобных структур – фитолового остатка хлорофилла и витаминов.

При введении пробы с одинаковым содержанием витамина Е в подвижные фазы с различным содержанием хлорофилла обнаружили, что высота (площадь) пика витамина Е возрастает с увеличением концентрации модификатора ПФ.

Витамин Е из поливитаминного препарата «Компливит» экстрагировали по следующей методике: таблетку препарата растирали в ступке,

брали точную навеску (0,9773 г), переносили в мерную пробирку и экстрагировали 10 мл ИП, полученный светло-желтый раствор отфильтровывали и использовали для определения витамина Е. Из точной навески (0,8534 г) фармацевтического препарата «Витамин Е в масле для внутримышечных инъекций 10%-й раствор» α -токоферол ацетат экстрагировали 2 мл этанола. Слои растворителей разделяли при помощи делительной воронки. Верхний слой (раствор витамина Е в этаноле) использовали для анализа.

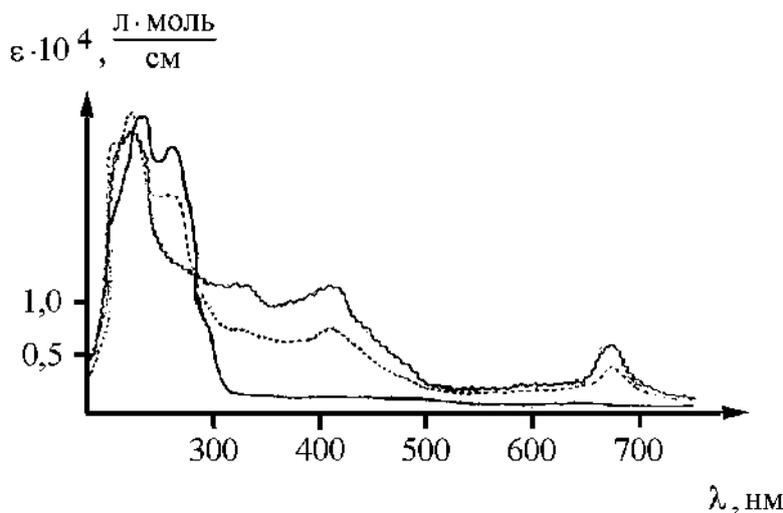


Рис. 5.16. ЭСП хлорофилла (1), витамина D_3 (2), хлорофилл – витамин D_3 (5,1:1) (3)

Результаты определения содержания витамина Е в объектах приведены в табл. 5.9.

Таблица 5.9
Содержание витамина Е в определяемых объектах ($n = 3, P = 0,95$)

Объект исследования	Подвижная фаза				Содержание по паспорту
	АН + хлорофилл ($c = 8,89 \cdot 10^{-6} M$)		АН + $H_2TФП$ ($c = 8,33 \cdot 10^{-6}$)		
	$\langle H_{\text{пик}} \rangle$, мм	$\langle m(E) \rangle$, г	$\langle S_{\text{пик}} \rangle$, мм ²	$\langle m(E) \rangle$, г	
Компливит	2,33	0,011 ± 0,001	11	0,0101 ± 0,0006	0,01
Масло	7,00	0,0715 ± 0,0084	40	0,0782 ± 0,0008	0,08534

Предел обнаружения витамина Е методом ВЭЖХ на колонке Нуклеосил C_{18} в ПФ АН + $H_2TФП$ ($c_{\text{тфп}} = 8,33 \cdot 10^{-6} M$) при косвенном спектрофотометрическом детектировании составил 0,3 мкг, т. е. на порядок ниже, чем известный из литературы (прямое УФ-детектирование).

5.8.6. Определение микотоксинов методом ВЭЖХ

Количественное определение отдельных микотоксинов сводится к извлечению их из продуктов органическими растворителями, очистке экстракта и определению методом жидкостной или газовой хроматографии. Для извлечения микотоксинов используют хлороформ, этилацетат, метанол, ацетон, толуол или ацетонитрил. Очистку экстракта в настоящее время проводят на иммуноаффинных колонках или на патронах для твердофазной экстракции. Предложены методики одновременного определения трихотеценов А и Б методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим или пламенно-ионизационным детекторами в виде производных с N,N-диметилтриметилсилилкарба матом или методом жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором после обработки кумарин-3-карбонилхлоридом, а также определение трихотеценов А, Б и зеараленона в кукурузном зерне методом, сочетающим жидкостную хроматографию и тандемную масс-спектрометрию. Экстракты в этих методиках очищали на иммуноаффинных колонках MusoSep®.

По существующим в России ГОСТ и методическим указаниям определение охратоксина А, зеараленона (ЗОН), дезоксиниваленола (ДОН), токсина Т-2 проводят каждого в отдельности после очистки экстрактов на хроматографических колонках и затем используют методы ТСХ, ВЭЖХ с флуориметрическим или УФ-детекторами. Токсин Т-2 определяют методом газожидкостной хроматографии после получения производных с трифторуксусным ангидридом. Предлагаемые методики достаточно сложны, длительны (продолжительность анализа одного микотоксина от 3 до 6 ч) и дорогостоящи.

Показана возможность использования «зеленой химии» при одновременном ускоренном определении микотоксинов различных классов из одной навески. Данная цель достигнута использованием упрощенного способа пробоподготовки – применением способа QuEChERS и очистке экстракта методом дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции (ДЖЖМЭ). Последняя представляет собой уникальный способ значительного сокращения качества органических растворителей для экстракции (100–300 мкл) и повышения эффективности экстракции. Предложенная схема проведения анализа при определении микотоксинов различных классов в продуктах животного и растительного происхождения представлена ниже. Степень извлечения составила 80–110 %, коэффициенты концентрирования – 10–20 раз.

Продолжительность анализа при определении всех нормируемых микотоксинов в данных условиях не превышает 1,5–2 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1.

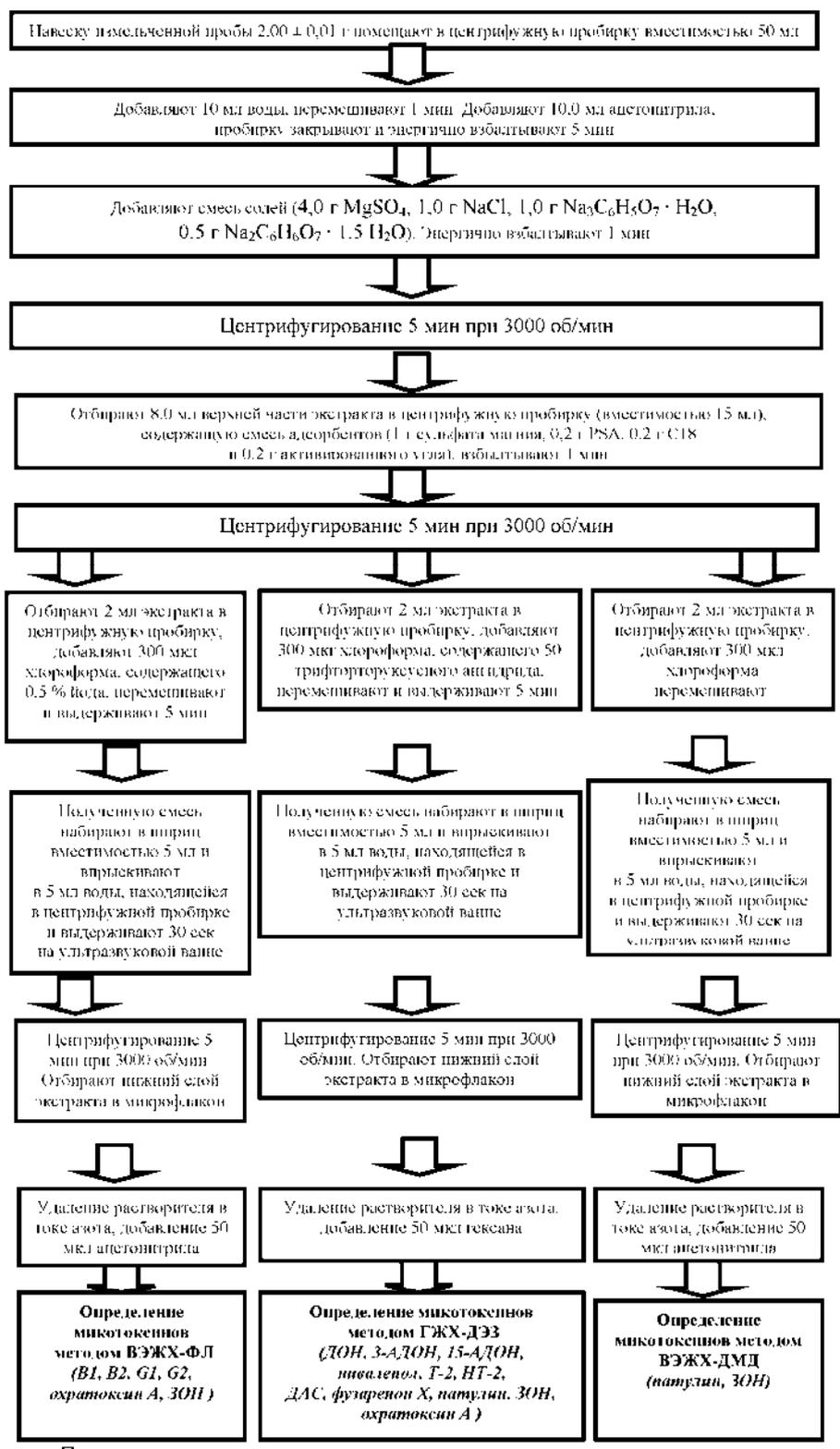


Рис. 5.17. Схема одновременного определения микотоксинов в продуктах растительного и животного происхождения из одной навески с использованием пробоподготовки по QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции

5.8.7. Электрофорез. Анализ аминокислот

В связи с возросшими объемами фальсификации синтетических терапевтических средств необходима разработка легкоосуществимых и экономически целесообразных способов определения аминокислот в составе фармацевтических препаратов. Эта задача относится к одной из приоритетных в аналитической химии, ее решение возможно с применением экстракции гидрофильными растворителями и последующего анализа концентрата методом капиллярного электрофореза.

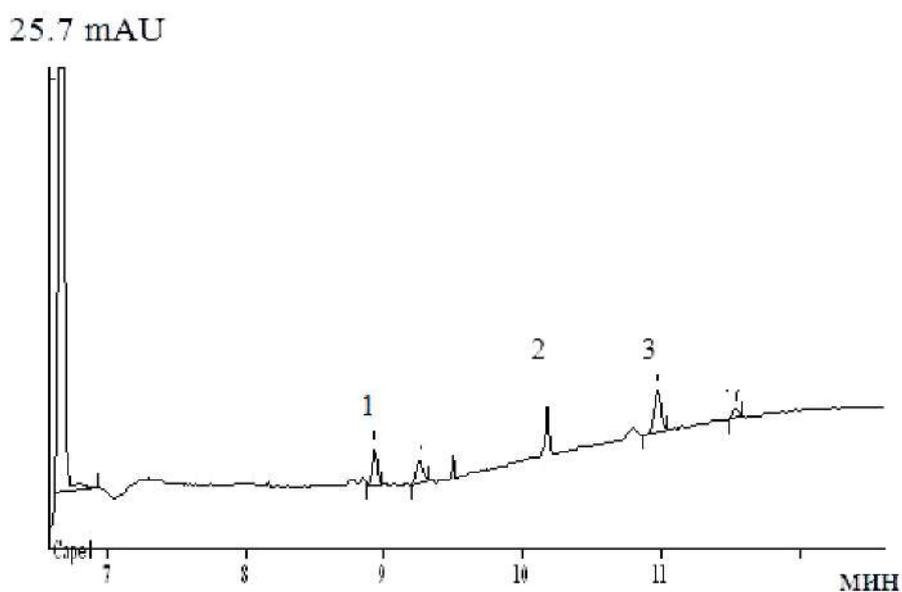


Рис. 5.18. Электрофореграмма тирозина (1), триптофана (2), фенилаланина (3)

Для разработки способа определения лизина, тирозина, аланина и глицина в препарате «Альвезин» (ООО «Алтайвитамины») изучена экстракция этих аминокислот из водных растворов смесью гидрофильных растворителей (бутиловый спирт – этилацетат – ацетон). Такие растворители и их смеси имеют известные преимущества по сравнению с гидрофобными растворителями: повышенная растворяющая способность по отношению к аминокислотам, возможность определения аминокислот в экстракте электрофоретическим методом. Капиллярный электрофорез отличается высокой точностью определений, экспрессностью, малым расходом реактивов.

Обязательное условие применения гидрофильных растворителей в качестве экстрагентов – насыщение водной фазы электролитом, снижающим растворимость распределяемых соединений в воде в результате гидратации. Установлено, что сульфат лития – наиболее эффектив-

ный высаливатель аминокислот, при этом практически нерастворим в применяемых экстрагентах.

Водный раствор смеси аминокислот (лизин, тирозин, аланин, глицин) готовили из навески препарата «Альвезин», отфильтрованный раствор подкисляли ($\text{pH} = 5,5\text{--}6,0$) и насыщали сульфатом лития. К водно-солевому раствору аминокислот добавляли экстрагент – смесь гидрофильных растворителей. Полученный концентрат анализировали методом капиллярного электрофореза (установка «Капель-105» с источником высокого напряжения положительной полярности). Содержание аминокислот определяли с помощью встроенного фотометрического детектора ($\lambda = 254$ нм). Запись и обработку полученных данных осуществляли с применением программного обеспечения «МультиХром». Анализ проводили при напряжении +23 кВ и температуре 30 °С. Для разделения лизина, тирозина, аланина и глицина в капилляре в качестве добавки к фоновому электролиту применяли боратный буферный раствор ($\text{pH} = 9,18$). При таком значении рН аминокислоты находятся в виде анионов и таутомеров с биполярной ионизированной структурой, поэтому возможно получение электрофореграммы с четким разрешением (рис. 5.18).

Коэффициенты распределения и степень извлечения аминокислот вычисляли по известным уравнениям. Максимальные коэффициенты распределения достигаются при соотношении компонентов в смеси бутиловый спирт – этилацетат – ацетон, равном 6:1:3. При однократной экстракции в установленных условиях степень извлечения лизина, тирозина, аланина и глицина достигает 97–98 %.

Литература

1. Золотов Ю.А. Разделение и концентрирование в химическом анализе / Ю.А. Золотов // Российский химический журнал. – 2005. – Т. XLIX. – № 2. – С. 6–10.
2. Москвин Л.Н. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии / Л.Н. Москвин, Л.Г. Царицына. – Ленинград : Химия, 1991. – 256 с.
3. Берштейн И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский. – Ленинград : Химия, 1981. – 198 с.
4. Мокшина Н.Я. Экстракция аминокислот и витаминов / Н.Я. Мокшина. – Воронеж : Воронеж. гос. технол. акад., 2007. – 246 с.
5. Спектрофотометрическое определение ароматических и гетероциклических аминокислот в их смесях / А.В. Казначеев, О.Н. Хохлова,

В.Ф. Селеменев и др. // Журнал аналитической химии. – 2000. – Т. 55. – № 4. – С. 375–377.

6. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты и аминокислот при совместном присутствии / Н.Я. Мокшина, Р.В. Савушкин, В.Ф. Селеменев и др. // Аналитика и контроль. – 2004. – Т. 8. – № 4. – С. 346–348.

7. Мокшина Н.Я. Раздельное определение никотиновой кислоты и ароматических аминокислот / Н.Я. Мокшина // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – Т. 73. – № 9. – С. 22–24.

8. Determination of ochratoxin A in vine grapes: comparison of extraction procedures and method validation / R. Serra, C. Mendonca, L. Abrunhosa et al. // Anal. Chem. Acta. – 2004. – V. 513. – P. 41–47.

9. Widestrand J. Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2-toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants / J. Widestrand, H. Pettersson // Food Additiv. Contamin. – 2001, Vol. 18, № 11. – P. 987–992.

10. Jaimes J., Fente CA., Vazquez B.I. et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis // J. Chromatogr. – 2000, Vol. 882. – P. 1–10.

11. Headspace solvent microextraction / A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen et al. // Anal. Chem. – 2001, Vol. 73. – P. 5651–5654.

12. Bruheim I. Thin-film microextraction / I. Bruheim, X. Lin, J. Pawliszyn // Ibid. – 2003, Vol. 75 – P. 1002–1010.

13. Jodldauer J. Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction / J. Jodldauer, N.M. Maier, W. Linder // J. Chromatogr. – 2002, Vol. 945A. – P. 45–63.

14. Фармацевтический анализ (Серия «Проблемы аналитической химии»). Том 16 : монография / сост. Г.К. Будников, С.Ю. Гармонов. – Москва : АГРАМАК-МЕДИА, 2013. – 778 С. – (Научное сообщество). – С. 362–389.

Контрольные вопросы

1. Какие основные варианты ВЭЖХ используются в контроле фармпроизводства и фармакопейном анализе?

2. Подготовка пробы к анализу. Важнейшие реагенты для дериватизации и наиболее распространенные типы химической трансформации функциональных групп молекул органических веществ.

3. Стратегия выполнения качественного газо-хроматографического анализа лекарственных средств и биологически активных веществ.

4. Хромато-масс-спектрометрия, ее возможности. Масс-спектрометрический анализ в медицине.
5. Перспективы развития исследований по изысканию новых лекарственных средств и совершенствование методов оценки их качества.
6. Специфичность анализа различных лекарственных форм: таблетки, капсулы, суппозитории. Порошки, растворы, растворы для инъекций, глазные капли, мази, суспензии, эмульсии и т. д.
7. Применение физико-химических методов анализа для определения подлинности биологически активных веществ.
8. Какие измерительные методы используются для контроля качества биологически активных веществ?
9. Количественные методы определения веществ в многокомпонентных биологически активных веществах, основанные на их физико-химических свойствах.

Учебное издание

СЛЕПЧЕНКО Галина Борисовна
ДЕРЯБИНА Валентина Ивановна
ГИНДУЛЛИНА Татьяна Михайловна
ПИКУЛА Нина Павловна
БАКИБАЕВ Абдигали Абдиманатович

**ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Учебное пособие

Корректурa *Е.Л. Тен*
Компьютерная верстка *К.С. Чечельницкая*
Дизайн обложки *Т.В. Буланова*

Подписано к печати 30.12.2015. Формат 60×84/16. Бумага «Снегурочка».
Печать XEROX. Усл. печ. л. 11,52. Уч.-изд. л. 10,41.
Заказ 542-15. Тираж 100 экз.



Издательство

ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ