

ВЫСШЕЕ

ОБРАЗОВАНИЕ

Под редакцией Е. М. Плисса

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

УМО ВО
РЕКОМЕНДУЕТ

 **Юрайт**
ИЗДАТЕЛЬСТВО

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВУЗОВ

Под редакцией **Е. М. Плисса**

*Рекомендовано Учебно-методическим отделом высшего образования
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по естественнонаучным направлениям*

УДК 54.06(075.8)

ББК 24.53я73

Ф50

Ответственный редактор:

Плисс Евгений Моисеевич — профессор, доктор химических наук, директор Института фундаментальной и прикладной химии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П. Г. Демидова.

Рецензенты:

Касаикина О. Т. — доктор химических наук, профессор кафедры коллоидной химии Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, заведующая лабораторией Федерального исследовательского центра химической физики имени Н. Н. Семенова Российской академии наук;

Злотский С. С. — доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой общей и аналитической химии Уфимского государственного нефтяного технического университета.

Физико-химические методы анализа : учебное пособие для вузов / под ред. Е. М. Плисса. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 201 с. — (Высшее образование). — Текст : непосредственный.

ISBN 978-5-534-14964-7

В курсе изложены основы современных методов физико-химического анализа, необходимые химикам, биологам и экологам для решения многочисленных задач в различных сферах науки и техники. В конце каждой темы приведены контрольные вопросы для собеседования. В электронной библиотечной системе по каждой теме даны тестовые задания, которые можно пройти в интерактивном режиме.

Соответствует актуальным требованиям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования.

Для студентов, обучающихся по специальностям «Химия», «Биология», «Экология» и направлению «Экология и природопользование» (дисциплина «Физико-химические методы анализа», блок ЕН), очной и заочной форм обучения.

УДК 54.06(075.8)

ББК 24.53я73

Оглавление

Авторский коллектив	6
Предисловие	7
Введение.....	8
Тема 1. Спектральные (оптические) методы анализа.	
Основные понятия и законы	11
1.1. Основные характеристики электромагнитного излучения.....	11
1.2. Законы поглощения света.....	13
<i>Контрольные вопросы</i>	16
Тема 2. Электронная спектроскопия (ультрафиолетовая и видимая области)	17
2.1. Механизм поглощения видимых и ультрафиолетовых лучей.....	17
2.2. Спектры поглощения	18
2.3. Устройство приборов	21
2.4. Практическое применение	23
<i>Контрольные вопросы</i>	28
Тема 3. Методы колебательной ИК- и КР-спектроскопии	29
3.1. Инфракрасная (колебательная) спектроскопия	31
3.1.1. Элементарная теория колебательных спектров	31
3.1.2. Спектры поглощения	32
3.1.3. Возможности метода и практические рекомендации	35
3.1.4. Устройство приборов	37
3.2. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР)	38
3.2.1. Теоретические основы метода	38
3.2.2. Спектры КР.....	40
3.2.3. Возможности метода КР	43
3.2.4. Спектральная аппаратура и образцы.....	45
<i>Контрольные вопросы</i>	47
Тема 4. Эмиссионная спектроскопия	48
4.1. Атомная эмиссионная спектроскопия	48
4.1.1. Теоретические основы метода	48
4.1.2. Возможности метода.....	49
4.1.3. Фотометрия пламени (пламенная эмиссионная спектроскопия)	51
4.1.4. Определение щелочных и щелочноземельных металлов методом пламенной фотометрии.....	52

4.2. Люминесцентные методы анализа: флуоресценция и фосфоресценция	53
4.2.1. Теоретические основы люминесценции	54
4.2.2. Параметры и основные законы люминесценции	58
4.2.3. Практическое применение люминесцентной спектроскопии	60
<i>Контрольные вопросы</i>	62
Тема 5. Ядерный магнитный резонанс.....	63
5.1. Теоретические основы метода	63
5.2. Химический сдвиг	66
5.3. Спин-спиновое взаимодействие	71
5.4. Регистрация спектров ЯМР	79
5.5. Разновидности спектроскопии ЯМР	81
5.6. Применение метода ЯМР	84
<i>Контрольные вопросы</i>	85
Тема 6. Электронный парамагнитный резонанс.....	86
6.1. Теоретические основы метода	86
6.2. Параметры спектров ЭПР	89
6.3. Сверхтонкая структура спектров ЭПР	91
6.4. Методы спинового зонда, спиновых меток и спиновых ловушек... ..	97
6.5. Спектрометры ЭПР	100
6.6. Применение ЭПР-спектроскопии	102
<i>Контрольные вопросы</i>	105
Тема 7. Масс-спектрометрия.....	106
7.1. Методы ионизации молекул	106
7.1.1. Ионизация электронным ударом	106
7.1.2. Другие методы ионизации	110
7.2. Анализ и интерпретация масс-спектров	111
7.2.1. Область пика молекулярного иона	112
7.2.2. Закономерности фрагментации	116
7.3. Возможности масс-спектрометрии	119
<i>Контрольные вопросы</i>	120
Тема 8. Электрохимические методы анализа.	
Кондуктометрия	121
8.1. Общая характеристика электрохимических методов анализа	121
8.2. Электропроводность растворов электролитов	122
8.2.1. Удельная электропроводность	123
8.2.2. Молярная электропроводность	126
8.3. Кондуктометрическое титрование	127
8.4. Применение кондуктометрических методов анализа	129
<i>Контрольные вопросы</i>	130

Тема 9. Потенциометрия	131
9.1. Электродный потенциал	132
9.2. Электроды сравнения.....	133
9.3. Индикаторные электроды	136
9.4. Потенциометрическое титрование	138
9.5. Прямая потенциометрия	140
9.6. Практическое применение и общая характеристика метода.....	142
<i>Контрольные вопросы</i>	143
Тема 10. Вольтамперометрия	144
10.1. Кривая «ток — потенциал»	144
10.2. Полярографический фон.....	146
10.3. Диффузионный ток	146
10.4. Количественный полярографический анализ.....	147
10.5. Качественный анализ.....	148
10.6. Полярографическая установка	149
10.7. Хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала.....	152
10.8. Инверсионная вольтамперометрия.....	152
10.9. Практическое применение	153
<i>Контрольные вопросы</i>	154
Тема 11. Хроматографические методы анализа	155
11.1. Общие принципы хроматографии.....	156
11.1.1. Классификация хроматографических методов	157
11.2. Газовая хроматография.....	159
11.2.1. Общие принципы метода.....	160
11.2.2. Аппаратурное оформление газовой хроматографии.....	162
11.2.3. Выбор условий хроматографирования	167
11.2.4. Качественный и количественный анализ	170
11.3. Жидкостная хроматография	173
11.3.1. Жидкостно-жидкостная хроматография	174
11.3.2. Жидкостно-адсорбционная хроматография	189
11.3.3. Ионообменная хроматография	195
<i>Контрольные вопросы</i>	197
Список рекомендуемой литературы	199
Новые издания по дисциплине «Аналитическая химия» и смежным дисциплинам	201

Авторский коллектив

Казин Вячеслав Николаевич — профессор, доктор химических наук, профессор Института фундаментальной и прикладной химии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П. Г. Демидова;

Тихонов Иван Викторович — кандидат химических наук, доцент Института фундаментальной и прикладной химии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П. Г. Демидова;

Плисс Евгений Моисеевич — профессор, доктор химических наук, директор Института фундаментальной и прикладной химии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П. Г. Демидова;

Гробов Алексей Михайлович — кандидат химических наук, доцент Института фундаментальной и прикладной химии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П. Г. Демидова;

Сирик Андрей Владимирович — кандидат химических наук, доцент Института фундаментальной и прикладной химии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета имени П. Г. Демидова.

Предисловие

Курс составлен в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами высшего образования по направлениям подготовки: 04.03.01 «Химия», 05.03.06 «Экология и природопользование», 06.03.01 «Биология» и отвечает методическим требованиям, предъявляемым к учебным изданиям.

Физико-химические методы анализа основаны на зависимости физических свойств вещества от его природы, причем аналитический сигнал представляет собой величину физического свойства, функционально связанную с концентрацией или массой определяемого компонента.

Целью освоения дисциплины «Физико-химические методы анализа» является формирование у студентов знаний основ современных методов физического, химического и физико-химического анализа, приобретение навыков и умений определения качественного и количественного состава анализируемых объектов и интерпретации полученных результатов.

Подготовка специалистов — химиков, биологов и экологов — предполагает освоение этих методов и умение применять их для решения многочисленных задач в различных сферах науки и техники. Компетентностный подход в этой сфере включает следующие базовые принципы.

В результате изучения материалов данного курса студент должен: **знать**

- теоретические основы физико-химического анализа;
- принципы и области использования основных методов химического и физико-химического анализа;
- особенности объектов анализа и методы их пробоподготовки;
- возможности использования методов физико-химического анализа для химического мониторинга окружающей среды, анализа различных материалов;

уметь

- выбирать оптимальные условия проведения анализа;
- проводить расчеты по результатам анализа;

владеть

- метрологическими основами анализа;
- экспериментальными навыками выполнения анализа;
- методами статистической обработки экспериментальных данных;
- методологией выбора методов анализа и навыками их применения.

Введение

Развитие химии невозможно без широкого использования достижений физики и ее новых методов исследования вещества. Взаимопроникновение наук химии и физики имеет большое значение для методологии науки и способствует их взаимному обогащению. Использование физических методов позволяет исследовать основные вопросы теории химического строения, такие как последовательность и кратность химических связей, координационное число атомов, взаимное влияние атомов и групп атомов в молекуле, энергетические, электрические и другие молекулярные характеристики, промежуточные продукты и механизмы реакций.

Значительные затруднения, встречающиеся при выборе более общих признаков, не позволяют объединить отдельные группы методов в общую систему. Общепринятая классификация методов анализа в настоящее время отсутствует. Общее число физико-химических методов анализа довольно велико — оно составляет несколько десятков.

Настоящий курс ставит своей задачей выделить основные группы физико-химических методов анализа, дать характеристику каждому методу, выделить особенности и дать практические рекомендации, в каком случае возможно использование того или другого метода исследования.

Наибольшее практическое значение имеют следующие физико-химические методы исследования:

- 1) спектральные и другие оптические методы;
- 2) резонансные методы анализа;
- 3) электрохимические методы;
- 4) хроматографические методы анализа.

Среди физических методов анализа наиболее обширной и важной по практическому значению является группа спектральных и других оптических методов анализа. Она включает методы атомной эмиссионной и абсорбционной спектроскопии, электронной и инфракрасной спектроскопии и другие методы, основанные на измерении различных эффектов при взаимодействии вещества с электромагнитным излучением. Эти методы позволяют изучать энергетические состояния атомов и молекул, определять разность энергетических уровней по определяемой частоте перехода и оценивать вероятность перехода по интенсивности полосы, а на их ос-

нове также многие другие характеристики молекул (симметрию, геометрию, электрические свойства и т. п.). Спектроскопические исследования охватывают самые различные типы переходов — электронные, колебательные, вращательные.

В отдельную группу выделяют резонансные методы анализа, в которых изучаются переходы, связанные с изменением направления магнитного момента электронов и ядер в магнитном поле. К данной группе методов относятся ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Метод ЯМР позволяет изучать структуру и динамику молекул, радикалов, ионов в конденсированных и газовой фазах вещества. Спектры ЯМР обладают высокой специфичностью и широко применяются для идентификации соединений, в структурно-аналитических целях, а также для изучения быстрых обменных процессов. Метод ЭПР позволяет идентифицировать свободные радикалы, образующиеся в химических и биохимических процессах, а также исследовать особенности структуры и молекулярно-динамические свойства сложных систем, в том числе биологических объектов.

Особое место в физических методах занимают электрохимические методы исследования. Электрохимические методы анализа основаны на использовании зависимости электрических параметров от концентрации, природы и структуры вещества, участвующего в электродной (электрохимической) реакции или электрохимическом процессе переноса зарядов между электродами. Широкий круг решаемых химических задач делает их конкурентоспособными по отношению к другим инструментальным методам, а в ряде случаев единственно возможными.

Хроматографические методы широко применяются в различных отраслях промышленности и научных исследованиях для анализа смеси газообразных, жидких и твердых веществ, препаративного выделения соединений и для изучения физико-химических свойств газов и растворов.

Особое место среди физико-химических методов анализа занимает метод масс-спектрометрии, который нельзя отнести ни к одной из рассмотренных групп. Масс-спектрометрия дает возможность установления структуры и изотопного состава веществ. Сочетание же хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (метод хромато-масс-спектрометрии) открывает уникальные возможности по разделению сложных смесей с одновременной идентификацией структуры отдельных компонентов, что делает данный метод одним из основных в современной лабораторной практике.

В последние десятилетия наблюдается быстрое совершенствование физико-химических методов анализа и исследования. Постоянно открываются новые свойства веществ, которые могут привести

к созданию новых методов. Поэтому важно и нужно знать фундаментальные свойства и общие закономерности, на которых основано развитие тех или иных родственных методов. Необходимо уметь выбрать метод, наиболее подходящий в данных обстоятельствах, дающий наибольшую информацию. Следует отметить, что не существует универсального метода, пригодного на все случаи жизни. Важной тенденцией в развитии методов является их комплексное использование, особенно в целях идентификации веществ и установления их химического строения. Для полного установления химического строения молекул веществ необходимы данные, получаемые возможно большим числом методов.

Тема 1

СПЕКТРАЛЬНЫЕ (ОПТИЧЕСКИЕ) МЕТОДЫ АНАЛИЗА. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ЗАКОНЫ

Сочетание высокой чувствительности, точности и быстродействия объясняет широкое распространение спектральных методов в химии, биологии, экологии, медицине, сельском хозяйстве и других областях знаний. Спектральные методы позволяют получить сведения о строении и свойствах молекул и веществ в целом, а также об их количественном содержании в анализируемых образцах.

Спектральные методы анализа основаны на взаимодействии электромагнитного излучения с веществом. Можно представить себе два случая такого взаимодействия. В первом из них излучение направляется на вещество и частично им поглощается. Метод анализа, в котором используются спектры поглощения, называется *абсорбционной спектроскопией*. Другая область спектрального анализа рассматривает собственное излучение вещества, приведенного в возбужденное состояние каким-либо посторонним источником энергии. В большинстве случаев вещество нагревают в пламени газовой горелки, вольтовой дуги, в плазме электрического искрового разряда. В люминесцентных методах и при изучении комбинационного светорассеяния анализируемое вещество облучают потоком электромагнитных волн, энергия которых превращается во вторичное излучение. Перечисленные методы относятся к *эмиссионной спектроскопии*.

1.1. Основные характеристики электромагнитного излучения

Электромагнитное излучение имеет двойственную природу — оно обладает волновыми и корпускулярными свойствами. К волновым характеристикам относятся частота колебаний, длина волны и волновое число, к квантовым — энергия квантов.

Частота колебаний (ν) — число колебаний в единицу времени. Единицей частоты служит герц (Гц) или s^{-1} (1 Гц = 1 колебание в секунду).

Длина волны (λ) есть расстояние между соседними максимумами электромагнитной волны. Длина волны в Международной систе-

ме единиц (СИ) измеряется в метрах (м) и его долях — сантиметрах (см), миллиметрах (мм), нанометрах (1 нм = 10⁻⁹ м), ангстремах (1 Å = 10⁻¹⁰ м).

Еще одной применяемой в спектроскопии характеристикой является *волновое число* ($\bar{\nu}$):

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}.$$

Волновое число измеряется в см⁻¹ и показывает, сколько длин волн данного излучения укладывается в 1 см. По сложившейся традиции излучение в инфракрасной области характеризуют волновыми числами.

Спектр электромагнитных колебаний удобно разбить на несколько областей (табл. 1.1). Деление спектра на области важно потому, что взаимодействие излучения с изучаемой системой в каждой из них протекает по различным механизмам и дает разную информацию.

Таблица 1.1

Спектр электромагнитных колебаний

Область спектра	Интервал длин волн (λ)
Радиоволны	> 1 м
Микроволны	10 ⁻³ —1 м
Инфракрасное излучение	750—10 ⁶ нм (7,5·10 ⁻⁷ —10 ⁻³ м)
Видимый свет	400—750 нм (4·10 ⁻⁷ —7,5·10 ⁻⁷ м)
Ультрафиолетовое излучение	10—400 нм (10 ⁻⁸ —4·10 ⁻⁷ м)
Рентгеновское излучение	10 ⁻² —10 нм (10 ⁻¹¹ —10 ⁻⁸ м)
γ-Излучение	10 ⁻⁴ —0,1 нм (10 ⁻¹³ —10 ⁻¹⁰ м)

Каждая область электромагнитных колебаний охватывает определенный интервал длин волн и характеризуется определенным уровнем энергии. Энергия электромагнитного излучения определяется соотношением Бора:

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu},$$

где h — постоянная Планка (6,62·10⁻³⁴ Дж·с), c — скорость света в вакууме (3·10⁸ м/с).

Количество поглощаемой энергии может иметь только строго определенные значения, т. е. поглощается излучение только определенной частоты. Поглощение излучения, а, следовательно, и энергии происходит в том случае, если квант излучения соответствует разности между двумя энергетическими уровнями облучаемого вещества.

В органической химии для исследования строения молекул чаще всего используются следующие области, различающиеся энергией квантов:

— наибольшая энергия требуется для возбуждения электронов; эта энергия соответствует излучению в ультрафиолетовой и видимой областях (электронная спектроскопия);

— меньшие затраты энергии необходимы для изменения колебательных уровней молекулы, связанных с изменением длин связей и углов в инфракрасной области (колебательная спектроскопия);

— еще меньшая энергия необходима для переориентации спинов ядер, которая может вызываться квантами радиочастотного излучения (спектроскопия ядерного магнитного резонанса).

1.2. Законы поглощения света

Абсорбционная спектроскопия имеет дело со спектрами, характеризующими способность веществ поглощать энергию электромагнитного излучения.

Атом, ион или молекула, поглощая квант света, переходит в более высокое энергетическое состояние. Обычно это бывает переход с основного, невозбужденного уровня на один из более высоких, чаще всего на первый возбужденный уровень.

В спектроскопии применяются источники излучения, которые испускают лучи в широкой спектральной области. Такие излучения называются *полихроматическими*. Из полихроматического излучения выделяют узкие по интервалу длин волн излучения, которые принято называть монохроматическими. Для этой цели пользуются светофильтрами или монохроматорами. *Монохроматическим* называют излучение, заключенное в таком узком интервале длин волн, что дальнейшее его сжатие не позволяет получить о веществе дополнительную информацию.

Оптические свойства растворов исследуют, наливая их в специальные кюветы. Важной характеристикой кюветы является ее длина (толщина) l , которая обычно указывается на стенке кюветы.

Ослабление монохроматического светового луча, направленного сквозь кювету с анализируемым веществом, происходит в простейшем случае по трем причинам. Во-первых, может иметь место рассеяние света мутной средой, во-вторых, часть падающего излучения может отражаться поверхностью образца и, в-третьих, поглощаться им. В дальнейшем будет принято во внимание только поглощение света, когда рассеянием и отражением можно пренебречь.

Пропустим сквозь слой вещества длиной l монохроматический световой поток I_0 . Выходящий световой поток I , в общем случае, слабее падающего.

Закон Бугера — Ламберта утверждает, что одинаковые слои одного и того же вещества поглощают свет в одинаковой степени независимо от интенсивности падающего потока:

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

где k — коэффициент поглощения, который зависит от оптических свойств вещества.

Исследуя окрашенные растворы, Бер установил, что коэффициент поглощения равен:

$$k = \epsilon C,$$

где C — концентрация (моль/л), ϵ — молярный коэффициент ослабления или *коэффициент экстинкции* (л·моль⁻¹·см⁻¹). Значение молярных коэффициентов экстинкции различных соединений может меняться от долей единицы до 10⁵. Коэффициент экстинкции во многих случаях может служить характеристикой вещества, подобно показателю преломления или плотности.

Уравнение, переписанное в виде:

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

называют *законом Бугера — Ламберта — Бера*, который связывает уменьшение интенсивности света, прошедшего через слой светопоглощающего вещества, с концентрацией вещества и толщиной слоя. Чтобы учесть потери света на отражение и рассеяние, сравнивают интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор и чистый растворитель.

Отношение I/I_0 называется *светопропусканием* или прозрачностью образца T (изменяется от 0 до 100 % или от 0 до 1).

$$T = 10^{-\epsilon Cl}, \text{ или } -\lg T = \epsilon Cl.$$

Обозначив $-\lg T = A$, где A — *абсорбция* (устаревший термин — «оптическая плотность») вещества, можно записать уравнение в следующей форме (*закон Бера*):

$$A = \epsilon Cl.$$

Абсорбция вещества (безразмерная величина) изменяется от нуля (абсолютно прозрачные растворы) до бесконечности (абсолютно непрозрачные растворы).

Таким образом, концентрацию растворенного вещества можно определить без каких-либо химических операций, измеряя абсорбцию вещества в монохроматических лучах с заранее выбранной длиной волны. Такой метод анализа называется *колориметрическим*.

Закон Бера удобно изображать в графической форме, откладывая опытные значения абсорбции и концентрации раствора по осям координат (рис. 1.1).

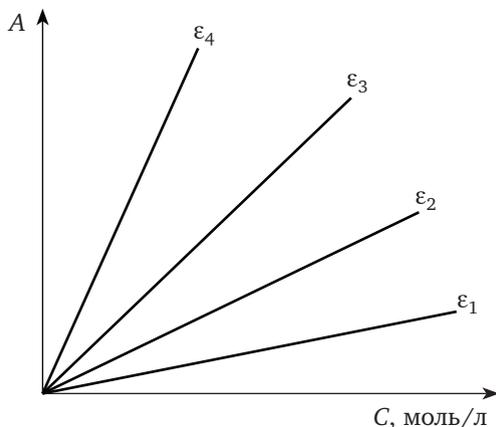


Рис. 1.1. Графический способ выражения закона Бера; $l = \text{const}$; $\epsilon_4 > \epsilon_3 > \epsilon_2 > \epsilon_1$

Угловой коэффициент прямых, проходящих через начало координат, равен ϵl , откуда можно найти коэффициент экстинкции. Чувствительность колориметрического метода определяется величиной $\text{tg } \alpha = \frac{dA}{dC} = \epsilon l$. Чем выше коэффициент экстинкции (при $l = \text{const}$), тем чувствительнее метод.

Широкое применение находит в химии простая аналитическая процедура определения концентрации по методу калибровочных кривых. Она не требует вычисления коэффициента экстинкции, концентрация находится непосредственно по графику. Приготавливают несколько растворов анализируемого вещества с известными концентрациями и измеряют в одной и той же кювете абсорбцию вещества. Результаты наносят на график. Затем в той же кювете измеряют абсорбцию анализируемого раствора и находят концентрацию.

Закон Бера, вообще говоря, выполняется во всех случаях, когда вещество не изменяет своих свойств при разбавлении или концентрировании растворов (рис. 1.2, кривая 1). Изменения в поглощении могут возникать в результате светорассеяния, а также ассоциации, агрегации молекул. При этом могут наблюдаться как положительные (кривая 2), так и отрицательные (кривая 3) отклонения.

Отклонения от закона Бера — весьма распространенное явление, особенно для растворов красителей при достаточно высоких концентрациях. Построение калибровочной кривой, кроме своего основного назначения (определение концентрации), позволяет

проверить выполнимость закона Бера для растворов. Метод калибровочных кривых применим и для растворов, не подчиняющихся закону Бера.

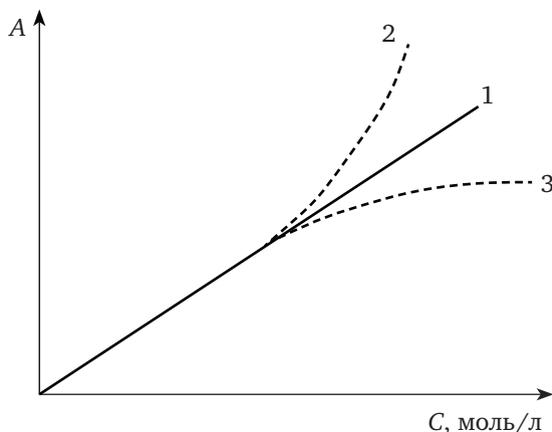


Рис. 1.2. Отклонения от закона Бера

Контрольные вопросы

1. Что такое спектр электромагнитных колебаний? Как применяются различные области спектра в методах анализа?
2. Что такое длина волны, частота и волновое число, и как они связаны друг с другом? В каких единицах измеряются эти величины?
3. В чем заключается закон поглощения света? Что такое светопропускание, абсорбция вещества? Выведите закон Бера.
4. В чем состоят отклонения от закона Бера и их каковы их причины?
5. Как определяется концентрация растворенного вещества по величине абсорбции? Какова зависимость чувствительности метода от коэффициента экстинкции растворенного вещества?

Тема 2

ЭЛЕКТРОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (УЛЬТРАФИОЛЕТОВАЯ И ВИДИМАЯ ОБЛАСТИ)

2.1. Механизм поглощения видимых и ультрафиолетовых лучей

По механизму взаимодействия с веществом видимые лучи близки прилежащей к ней ультрафиолетовой части спектра (см. табл. 1.1). Выделение видимой части спектра в самостоятельную область обусловлено субъективными причинами — границами восприятия электромагнитного излучения человеческим глазом.

При поглощении видимых и ультрафиолетовых лучей изменяется энергетическое состояние электронных оболочек атомов и молекул. Спектры поглощения, полученные в этих областях, называются *электронными*.

Поглощение веществом электромагнитных колебаний в ультрафиолетовой и видимой области обусловлено переходом электронов со связывающих молекулярных орбиталей на разрыхляющие орбитали. Такое состояние молекулы называется возбужденным (обычно изображается символом «*»).

При взаимодействии с квантом света, поглощая энергию, электрон может переходить с высшей занятой на низшую вакантную орбиталь. Электроны в атомах и молекулах занимают орбитали со строго определенной энергией. В обычных органических молекулах присутствуют электроны σ - и π -связей, а также электроны неподеленных пар гетероатомов (O, N, S и т. д.), или n -электроны. Их относительные энергетические уровни и сравнительные энергии возможных переходов представлены на рис. 2.1.

Наибольшая энергия кванта необходима для осуществления перехода $\sigma \rightarrow \sigma^*$, т. е. для возбуждения электронов наиболее прочной σ -связи необходимы кванты света минимальной длины. Энергия переходов $n \rightarrow \sigma^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ меньше, следовательно, длина волны света, возбуждающего такой переход, больше. Практическое значение имеют переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$, поскольку только им соответствуют длины волн, попадающие в рабочий диапазон прибора.

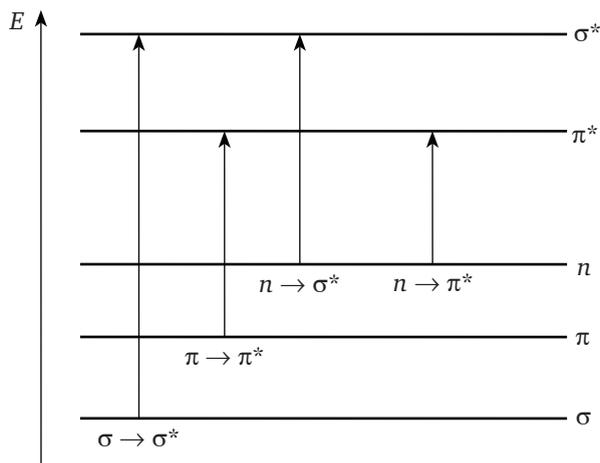


Рис. 2.1. Схема электронных уровней и энергия возможных электронных переходов

Группировки, вызывающие избирательное поглощение электромагнитного колебания в видимой и ультрафиолетовой части спектра, называются *хромофорами*. Основными хромофорами, дающими максимум поглощения в области 200—800 нм, являются системы сопряженных двойных связей. Сопряженные двойные связи будут поглощать кванты света с большей длиной волны, чем изолированные двойные связи. Из изолированных кратных связей в используемом для измерений интервале проявляется только переход карбонильной группы $C=O$ ($\lambda_{\max} = 270$ нм). В ароматических системах переход электрона в возбужденное состояние осуществляется также при меньших затратах энергии, чем в случае изолированной двойной связи.

Таким образом, основными хромофорами в УФ-спектроскопии являются сопряженные $C=C$ -связи, карбонильная группа $C=O$, системы $C=C-C=O$, ароматическое ядро. Исключение составляют переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ изолированных двойных связей $C=C$ и $C=N$, а также тройных связей $C\equiv C$ и $C\equiv N$ ($\lambda_{\max} = 650-180$ нм).

2.2. Спектры поглощения

Если плавно изменять длину волны падающего на вещество светового потока, то коэффициент экстинкции вещества изменяется по довольно сложной зависимости.

Зависимость коэффициента экстинкции от длины волны называется *спектром поглощения* вещества. Спектр поглощения удобен для качественного анализа и идентификации и может претендовать на роль своеобразного паспорта вещества. Практически нет случаев, чтобы различные по химическому строению вещества имели полностью совпадающие спектры.

УФ-спектр органического вещества характеристичен, так как поглощение определяется только собственно хромофором и его ближайшим окружением, т. е. один и тот же хромофор проявляется практически одинаково как в исключительно простых, так и самых сложных молекулах. При этом в зависимости от непосредственного окружения одной и той же хромофорной группировки положение максимума поглощения в УФ-спектрах различных соединений может несколько меняться. Введение в молекулу различных заместителей или изменение внешних условий, например растворителя, обычно вызывает сдвиг полосы поглощения. Сдвиг максимума в сторону более длинных волн принято называть *батохромным* сдвигом (обусловлен наличием атома галогена, гидрокси-, amino-, алкильных групп), а сдвиг в сторону более коротких волн — *гипсохромным* (например, образование водородной связи с растворителем).

УФ-спектр в большинстве случаев представляет собой кривую с одним пологим максимумом (рис. 2.2).

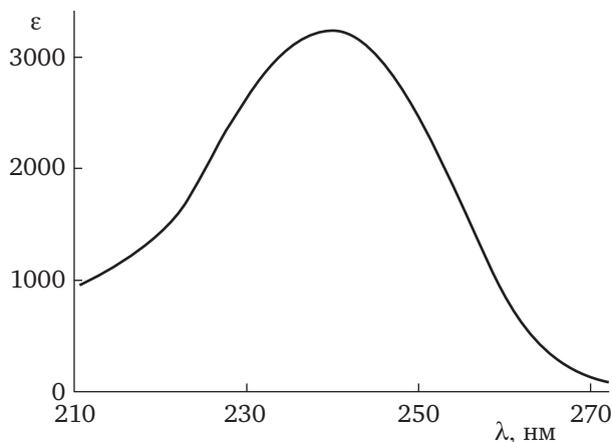


Рис. 2.2. УФ-спектр циклопентадиена

Уширение полос связано с сильным влиянием молекул растворителя на энергетические уровни электронов, ответственных за светопоглощение, и наложением колебательных переходов на электронный переход (помимо основных уровней электронных переходов, существуют подуровни, связанные с колебаниями молекулы).

Обычно УФ-спектр характеризуют длиной волны, при которой наблюдается максимум поглощения, и коэффициентом экстинкции в этом максимуме. Например, спектр циклопентадиена (см. рис. 2.2) достаточно точно может быть передан записью: λ_{max} (в изо-октане) 240 нм (ϵ 3240). УФ-спектр вещества может иметь несколько максимумов поглощения, каждый из которых соответствует различным типам электронных переходов. В этом случае при

цифровой записи спектра перечисляются длины волн максимумов поглощения и в скобках приводятся значения ϵ , соответствующие данному максимуму.

Коэффициент экстинкции для каждого поглощающего в УФ-области вещества при данной длине волны в одном растворителе имеет строго постоянное значение (существуют базы данных спектров поглощения веществ, таблицы коэффициентов экстинкции максимумов поглощения).

Поскольку коэффициенты экстинкции веществ при различных длинах волн могут отличаться на несколько порядков, часто спектр представляют в виде зависимости $\lg \epsilon$ от длины волны. Спектрами называются также и зависимости других оптических характеристик веществ (абсорбции вещества и светопропускания) от длины волны, частоты или волнового числа. Некоторые способы представления ранее рассмотренного спектра циклопентадиена представлены на рис. 2.3.

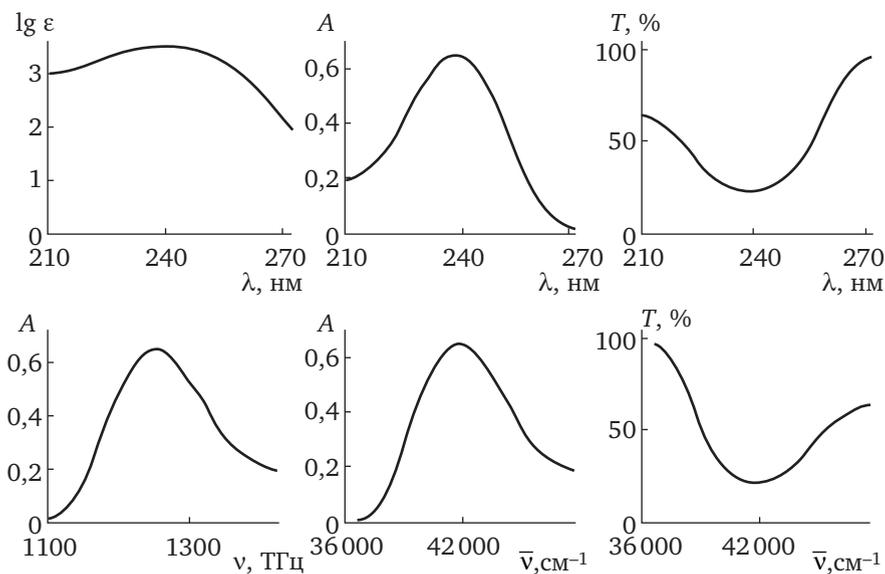


Рис. 2.3. УФ-спектр циклопентадиена в различных координатах

($C = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $l = 1$ см)

В качестве растворителей в УФ-спектроскопии используются вещества, не имеющие поглощения в исследуемой области спектра и не реагирующие с растворенным веществом (гексан, гептан, циклогексан, спирты, вода, галогенопроизводные, простые эфиры, кислоты и др.). Для каждого растворителя существует так называемая граница прозрачности, ниже которой растворитель поглощает излучение. Так, для воды она составляет 210 нм, для хлороформа 250 нм, для ацетона 320 нм.

Интенсивность поглощения в спектре связана с вероятностью данного типа электронного перехода. Наибольшей интенсивностью в спектрах поглощения обладают полосы, обусловленные переносом электрона от одного атома к другому (полосы переноса заряда). Более правильно следует говорить о переносе электрона между молекулярными орбиталями, локализованными у разных атомов. К ним относятся многие $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ -переходы. Однако не все переходы осуществляются в действительности. Существуют так называемые правила отбора, определяющие разрешенные и запрещенные переходы. Эти правила учитывают в основном симметрию молекулы, а также симметрию основного и возбужденного состояний. Запрещены переходы, при которых происходит изменение спина электрона. Интенсивность поглощения, соответствующего разрешенным переходам, обычно более высока, молярный коэффициент экстинкции достигает тысяч, а иногда и сотен тысяч единиц, тогда как для запрещенных переходов значение ϵ составляет десятки, реже — сотни единиц.

2.3. Устройство приборов

Приборы для регистрации селективного поглощения излучения растворами называются *спектрофотометрами*. При всем многообразии схем и конструктивных особенностей приборов абсорбционной спектроскопии в каждом из них имеется несколько основных узлов, функции которых примерно одинаковы в разных приборах. Такими узлами являются: источник света, монохроматор света, кювета с исследуемым веществом, приемник света.

В приборах абсорбционной спектроскопии свет от источника освещения проходит через монохроматор и падает на кювету с исследуемым веществом. Интенсивность монохроматического света, прошедшего через кювету, измеряется приемником света.

В видимой области источником света являются специальные лампы накаливания с вольфрамовой спиралью с высокой температурой нити, чтобы максимум испускания был смещен как можно дальше в видимую область. Такие лампы называют перекальными.

В качестве источника УФ-излучения обычно применяется водородная (дейтериевая) лампа: электрическая дуга в атмосфере водорода при низком давлении, которая дает практически непрерывный спектр излучения в области 200—400 нм. Кроме того, используют ртутные лампы. В ртутной лампе разряд происходит в парах ртути. Возбужденные атомы ртути испускают линейчатый спектр, в котором преобладает излучение с длиной волны 254, 302, 334 нм.

Монохроматоры и светофильтры предназначены для выделения из полихроматического спектра источника узкого участка, который в условиях опыта можно считать монохроматическим.

Светофильтры — это окрашенные стекла, пропускающие полосу 20—50 нм. Светофильтры применяют в колориметрах для выделения спектрального участка, в котором анализируемый раствор имеет наибольшую величину абсорбции (поглощения). Колориметры имеют набор светофильтров, непрерывно перекрывающих весь видимый участок спектра.

Плавное изменение длины волны светового потока возможно с помощью монохроматоров. Наибольшее распространение имеют призмённые монохроматоры и монохроматоры с дифракционной решеткой. Основным элементом призмённого монохроматора является диспергирующая призма, которая разлагает полихроматическое излучение в спектр (рис. 2.4). Излучение источника фокусируется конденсором на входной щели монохроматора. Входная щель установлена в фокусе коллиматорной линзы, направляющей параллельный пучок лучей на грань призмы. Диспергированные лучи фокусируются объективом в фокальной плоскости монохроматора, где находится выходная щель, пропускающая только небольшую часть спектра. Для изменения длины волны выходящего из монохроматора потока излучения можно либо перемещать выходную щель в фокальной плоскости, либо поворачивать призму, последовательно фокусируя на неподвижную щель различные участки спектра. Существует много схем монохроматоров, отличающихся от изображенной на рис. 2.4.

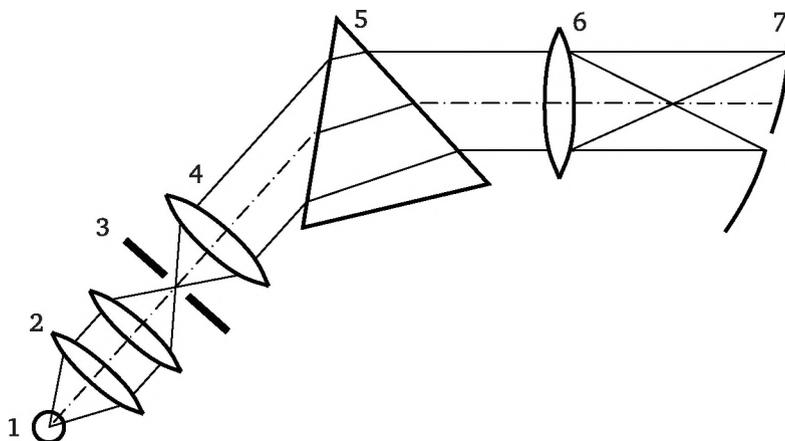


Рис. 2.4. Устройство призмённого монохроматора:

- 1 — источник излучения, 2 — конденсорные линзы, 3 — входная щель, 4 — коллиматорная линза, 5 — диспергирующая призма, 6 — объектив, 7 — фокальная плоскость

Монохроматическое излучение пропускается через кювету. Материалы кюветы и призмы должны быть прозрачны во всем рабочем интервале длин волн монохроматора. В видимой области

применяют призмы и кюветы из различных сортов (оптического) органического стекла, в ультрафиолетовой — кварц.

Приемником света в видимой и ультрафиолетовой областях является фотоэлемент, величина тока которого пропорциональна интенсивности падающего света. Ток усиливается и регистрируется потенциометром. Практически обычно определяют отношение интенсивностей монохроматического света, прошедшего через исследуемый раствор и через чистый растворитель или специально выбранный раствор сравнения. Существуют две основных разновидности оптических схем спектрофотометров: однолучевая и двухлучевая. При однолучевой схеме сначала помещают в световой поток кювету с раствором сравнения, светопропускание которого принимается за 100 %. Затем в световой поток помещают кювету с анализируемым раствором и определяют светопропускание (абсорбцию). При двухлучевой схеме световой поток от источника излучения делится на два пучка одинаковой интенсивности, один из которых проходит через анализируемый раствор, а другой — через раствор сравнения. Светопропускание (абсорбция) раствора рассчитывается по соотношению сигналов с двух фотоэлементов. Как правило, в УФ-спектроскопии спектр записывается в координатах «абсорбция — длина волны».

2.4. Практическое применение

Электронные спектры поглощения для целей качественного анализа используются значительно реже, чем колебательные, так как они обычно бывают представлены небольшим числом широких полос поглощения, которые часто накладываются одна на другую и полностью или частично перекрываются. Однако по электронным спектрам поглощения иногда удается провести достаточно эффективный анализ качественного состава: определить в исследуемых соединениях наличие или отсутствие группировки-хромофора, например в нефтехимии.

УФ-спектроскопия дает прекрасную возможность для количественного анализа веществ. Для этого записывают спектр поглощения анализируемого вещества при одной концентрации, выбирают максимум поглощения. Если в спектре имеется несколько полос, выбор обычно останавливается на наиболее интенсивной, так как работа в области максимума светопоглощения обеспечивает наиболее высокую чувствительность определения. Далее делают несколько разведений и при выбранном одном максимуме поглощения снимают значения абсорбции вещества. Строят калибровочную кривую, затем измеряют величину A анализируемого раствора и по графику определяют неизвестную концентрацию (рис. 2.5).

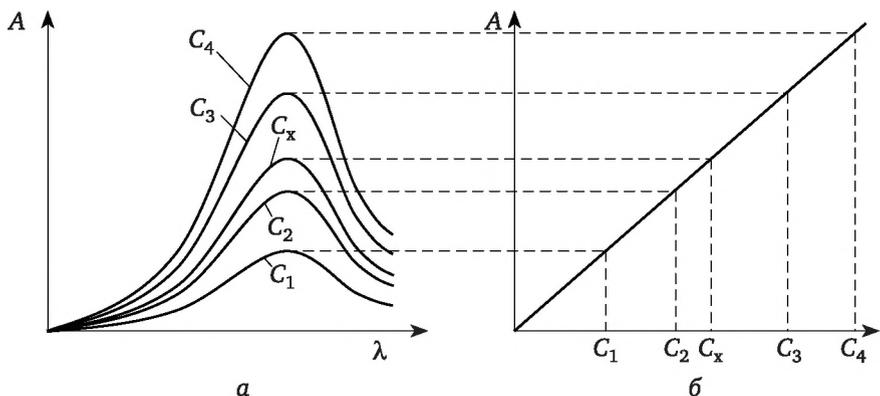


Рис. 2.5. Построение калибровочной кривой (б) по спектрам поглощения (а)

Цвет растворов, поглощающих в видимой области, зависит от положения главной полосы поглощения в спектрах. Окраска в проходящем солнечном свете является результатом избирательного поглощения веществом отдельных участков спектра. Выходящий световой поток имеет световой баланс, отличающийся от соотношения цветов в падающем световом потоке. Окраска придается раствору теми составляющими белого света, которые менее других поглотились веществом. Естественно, что красный раствор пропускает красные, а поглощает лучи другого цвета, в результате доля красных лучей в выходящем световом потоке увеличивается. Такие цвета называются дополнительными (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Соответствие цвета раствора и диапазона поглощаемого излучения

Цвет раствора	Область максимального поглощения, нм	Дополнительный цвет (цвет светофильтра)
Желто-зеленый	400—450	Фиолетовый
Желтый	450—480	Синий
Оранжевый	480—490	Зелено-синий
Красный	490—500	Сине-зеленый
Пурпурный	500—560	Зеленый
Фиолетовый	560—575	Желто-зеленый
Синий	575—590	Желтый
Зелено-синий	590—625	Оранжевый
Сине-зеленый	625—700	Красный

Раствор перманганата калия окрашен в пурпурный цвет, он поглощает зеленые лучи, и его полоса поглощения лежит в области 440—600 нм. Бихромат калия, согласно установленному соотношению, поглощает фиолетовые лучи, т. е. область, близкую 400 нм.

В простейших приборах для определения абсорбции вещества (колориметрах) имеется наборы светофильтров, выделяющих узкие интервалы видимого спектра. Для определения абсорбции растворов необходимо выбрать светофильтр, пропускающий те лучи, которые всего сильнее поглощаются анализируемым веществом. Чтобы правильно выбрать светофильтр, необходимо определить абсорбцию раствора на каждом светофильтре. Цвет светофильтра должен соответствовать области максимального поглощения раствора. Окраска раствора и цвет светофильтра относятся друг к другу как дополнительные цвета. Таким образом, для анализа растворов KMnO_4 требуется зеленый светофильтр, а для $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ — фиолетовый.

Большинство приборов, предназначенных для определения абсорбции вещества, имеют шкалу с отчетом A в диапазоне $0 \div 2$. Теоретические расчеты показывают, что ошибка при определении концентрации исследуемого вещества минимальна, когда $A = 0,44$. Практически хорошие результаты получаются при абсорбции раствора вещества от 0,2 до 0,8. Приборы снабжены набором кювет, отличающихся длиной (толщиной). Эмпирически выбирают кювету такой длины, для которой абсорбция анализируемого раствора падает в указанный интервал.

Определение концентрации по закону Бера называется *анализом по собственному поглощению*. Анализ веществ с низким молярным коэффициентом экстинкции во многих случаях имеет недостаточную чувствительность, а неокрашенные вещества, такие как вода, бензол, вообще нельзя определять по собственному поглощению в видимой части спектра, так как коэффициент экстинкции близок к нулю.

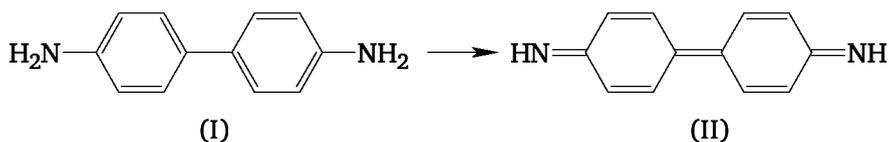
Неокрашенные соединения составляют основную часть известных органических и неорганических веществ, поэтому колориметрический анализ по собственному поглощению в видимой области имеет ограниченное применение. Для расширения круга веществ, которые можно анализировать в видимой области, используют специальные реагенты (колориметрический анализ с помощью реагентов).

Реагенты — это соединения, которые взаимодействуют с анализируемым веществом и образуют продукты, обладающие высоким коэффициентом экстинкции. Анализ с применением реагентов проводят так же, как и по собственному поглощению — методом калибровочных кривых. Коэффициент экстинкции в законе Бера в этом случае характеризует продукты реакции. Если провести реакцию ана-

лизируемого вещества с реагентом, взятым в избытке по сравнению со стехиометрическим соотношением, то концентрация образовавшегося продукта будет пропорциональна концентрации анализируемого вещества. Это соотношение концентраций должно всегда выполняться при использовании реагентов. При этом сам реагент не должен обладать значительным поглощением при анализируемой длине волны.

Применение реагентов обусловлено двумя причинами. Во-первых, стремлением расширить круг веществ, которые можно анализировать в видимой области, во-вторых, способностью некоторых реагентов взаимодействовать с одним веществом, входящим в состав сложной смеси. Эта важная особенность реагентов называется избирательностью. В настоящее время число органических реагентов исчисляется тысячами. Для новых развивающихся отраслей промышленности разработаны реагенты на германий, индий, уран, редкоземельные элементы. Реагенты применяются и для анализа окрашенных веществ, которые, вообще говоря, можно было бы анализировать и по собственному поглощению, если необходимо увеличить чувствительность или определить концентрацию лишь одного из компонентов сложной смеси.

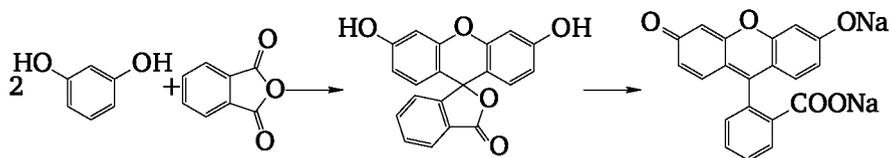
Взаимодействие реагента с анализируемым веществом с образованием окрашенных продуктов может протекать по различным механизмам. Так, многие ионы способны образовывать окрашенные комплексы (реагентами в этом случае являются неорганические или органические лиганды). Другим механизмом возникновения окраски растворов является окисление реагента анализируемым веществом с образованием продуктов, обладающих высоким коэффициентом экстинкции. Так, бензидин (I) окисляется некоторыми ионами в (II) — интенсивно окрашенное вещество:



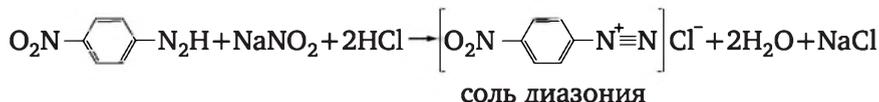
С помощью реагентов определяют многие органические вещества, в некоторых методиках для этого пользуются способностью органических соединений образовывать молекулярные окрашенные соединения. При анализе аминов реагентами могут служить нитросоединения, а при анализе нитросоединений — амины.

Еще один путь, приводящий к окрашиванию растворов, — синтез красителей, в котором принимает участие анализируемое вещество. Для определения резорцинов в сточных промышленных водах сухой остаток, полученный выпариванием пробы, сплавляют с фталевым ангидридом и, подщелачивая раствор, получают трифенилметановый краситель — флуоресцеин. Трифенилметановые

красители имеют наибольшие коэффициенты экстинкции, поэтому чувствительность анализа очень высока.

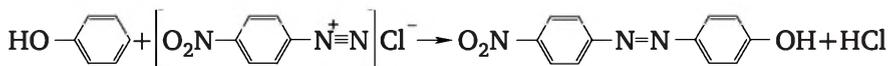


Многие распространенные реагенты представляют собой соли диазония, которые можно получить по следующей схеме:



Данные реагенты широко применяются для определения различных классов органических соединений. Рассмотрим некоторые примеры.

Определение фенолов. Фенолы, как известно, являются слабо окрашенными веществами. В видимой области коэффициент экстинкции фенолов близок к нулю и чувствительность анализа по собственному поглощению ничтожно мала. Для определения фенола проводят реакцию азосочетания с солью диазония:



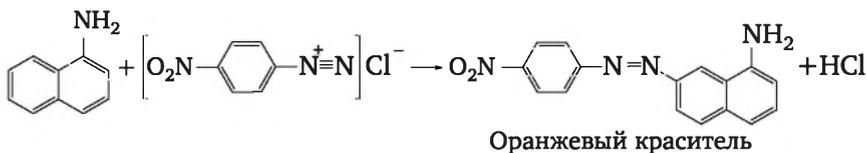
Раствор полученного в реакции красителя поглощает в наибольшей степени лучи с $\lambda = 485$ нм, что соответствует оранжевому окрашиванию раствора. При определении других гидроксипроизводных получают красители со следующими оптическими характеристиками (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Спектральные свойства продуктов взаимодействия фенолов с солью диазония

Определяемое вещество	λ_{max} , нм	ϵ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹
о-крезол	504	25 000
м-крезол	500	28 000
п-крезол	530	6000
α-нафтол	577	18 000
β-нафтол	549	5600

Определение аминов. Ароматические амины вступают в реакцию азосочетания аналогично фенолам с образованием соответствующих окрашенных азосоединений.



Рассмотренный метод применяют для определения кислот, альдегидов, кетонов, нитросоединений, спиртов и др.

Реагенты находят применение в органической химии, особенно в тех случаях, когда необходимо обнаружить и количественно определить микропримеси веществ; в промышленной санитарии (определение вредных соединений, отравляющих веществ в воздухе), в биологии.

Контрольные вопросы

1. Опишите механизм поглощения видимых и ультрафиолетовых лучей.
2. Что такое спектры поглощения? Как определяется коэффициент экстинкции по спектрам поглощения?
3. Источники, монохроматоры, приемники излучения, материал оптики в видимой и ультрафиолетовой области.
4. Каковы правила выбора светофильтра, материала и длины кюветы, растворителя для колориметрического и спектрофотометрического методов анализа в УФ- и видимой области?
5. Как выполняется количественный и качественный анализ по УФ-спектрам?
6. Как применяются для количественного анализа органические реагенты? В чем состоит метод калибровочных кривых?

Тема 3

МЕТОДЫ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ ИК- И КР-СПЕКТРОСКОПИИ

Колебательные спектры молекул экспериментально изучаются методами инфракрасной (ИК) спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света. Эти спектры связаны с переходами между колебательными энергетическими состояниями или, в классической интерпретации, с колебаниями атомных ядер относительно равновесных положений, и определяются строением молекулы. Число и частоты полос зависят, во-первых, от числа образующих молекулу атомов, масс атомных ядер, геометрии и симметрии равновесной ядерной конфигурации и, во-вторых, от потенциального поля внутримолекулярных сил. Что касается распределения интенсивности в спектре, то оно определяется электрическими свойствами молекулы: электрическим дипольным моментом (μ) и поляризуемостью (α), а также их изменением в процессе колебаний.

Тепловое ИК излучение было открыто У. Гершелем еще в конце XVIII в., а ИК-спектры поглощения молекул впервые были получены лишь в начале XX в. Эффект комбинационного рассеяния света веществом был сначала предсказан теоретически А. Смекалем, а экспериментально открыт Л. И. Мандельштамом и Г. С. Ландсбергом в СССР и независимо индийскими учеными Ч. В. Раманом и К. С. Кришнаном в 1928 г. В зарубежной литературе явление КР света и спектры КР называют Раман-эффект и Раман-спектры. Оба метода особенно успешно стали развиваться в середине XX века: ИК-спектроскопия — в конце 1940-х — начале 1950-х гг., благодаря достижениям в создании необходимых оптических материалов и развитию электронной техники, а спектроскопия КР — в 1960-х гг. в результате появления лазерных источников возбуждения этих спектров.

Современные методы колебательной спектроскопии получили очень широкое распространение и, например, без стандартного ИК-спектрометра не обходится в настоящее время практически ни одна химическая лаборатория. В силу исключительно высокой специфичности ИК- и КР-спектров, которые сравнивают даже с дактилоскопическими отпечатками, они служат незаменимым средством

идентификации соединений и используются в аналитических целях. По колебательным спектрам проводят структурные исследования, определяют симметрию молекул, наличие тех или иных функциональных групп, получают другие сведения о строении и внутримолекулярных силах. Полный набор основных частот колебаний свободной молекулы необходим для статистического расчета термодинамических функций вещества и констант равновесия реакций в газовой фазе. Поскольку спектр чувствителен по отношению к малейшим изменениям структуры и силового поля молекулы, методы ИК и КР спектроскопии позволяют изучать также различные межмолекулярные взаимодействия.

Интенсивность спектра зависит от концентрации вещества, что дает основу для проведения количественного анализа по ИК- и КР-спектрам. Качественные и количественные определения этими методами возможны как в статике, так и динамике. Поэтому методы колебательной спектроскопии широко используют в исследованиях различного рода равновесий и кинетики реакций. Для получения спектра требуются миллиграммовые образцы. По нижнему пределу количественного определения методы ИК- и КР-спектроскопии в обычном аппаратном оформлении уступают некоторым другим физическим методам, но использование новейших фурье-спектрометров позволяет повысить концентрационную чувствительность в несколько раз.

Достоинством методов колебательной спектроскопии является то, что они допускают исследование практически любого неорганического или органического вещества в любом агрегатном состоянии — газе, растворах, кристаллах или аморфной фазе.

Колебательные спектры являются чрезвычайно специфическими и чувствительными характеристиками молекул, чем и объясняется широкое применение их в различных областях науки. Например, физику ИК-спектроскопия представляется методом исследования энергетических уровней в полупроводниках или определения межатомных расстояний в молекулах. Для химика-органика это метод идентификации органических соединений, позволяющий выявлять функциональные группы и следить за ходом реакций. Для биолога ИК-спектроскопия — перспективный метод изучения транспорта биологически активных веществ в живой ткани, ключ к структуре многих естественных антибиотиков и путь познания строения клетки. Физикохимику метод позволяет приблизиться к пониманию механизма гетерогенного катализа и кинетики сложных реакций. Он служит дополнительным источником информации при расшифровке структуры кристаллов.

Физическая природа ИК-спектров и спектров комбинационного рассеяния различна. В ИК-спектрах проявляются колебания, которые сопровождаются изменением дипольного момента молеку-

лы (μ), в спектрах КР активны колебания, при которых происходит изменение поляризуемости молекулы (α). Согласно этому имеется правило альтернативного запрета: в случае centrosymmetric молекул в ИК-спектрах активны колебания, antisymmetric относительно центра симметрии, в КР-спектрах — колебания, symmetric относительно центра симметрии. ИК- и КР-спектры различаются между собой, дополняя друг друга. По мере снижения симметрии резкие отличия в ИК- и КР-спектрах уменьшаются, но и в асимметричных молекулах относительные интенсивности многих полос этих полос остаются разными.

3.1. Инфракрасная (колебательная) спектроскопия

3.1.1. Элементарная теория колебательных спектров

Закон Бугера — Ламберта — Бера выполняется и в инфракрасной области, поэтому все виды анализа, рассмотренные для видимой и УФ-области, можно проводить и в инфракрасной части спектра.

ИК-спектроскопия наибольшее употребление находит для определения структуры органических соединений. Изучение структуры оказывается возможным благодаря особенностям взаимодействия инфракрасного излучения с веществом. Как было показано выше, электронные спектры несут ограниченную информацию о строении скелета молекулы. Поглощение видимых и ультрафиолетовых лучей сопровождается изменением энергии электронных оболочек атомов и молекул.

Энергия квантов инфракрасного излучения значительно ниже интервалов между электронными энергетическими уровнями, поэтому состояние электронной оболочки при поглощении инфракрасных лучей не изменяется. В поглощении инфракрасных излучений веществом принимает участие система колебательных энергетических уровней молекулы, расстояние между которыми соответствует энергии квантов инфракрасных лучей. Колебательные спектры обусловлены в первую очередь смещениями ядер атомов, вследствие этого по ИК-спектрам можно устанавливать структуру молекул.

Колебания молекул проявляются в спектрах поглощения в инфракрасной области. Основными типами колебаний являются валентные и деформационные.

Валентными колебаниями называются колебания ядер атомов вдоль линии связи, они обозначаются буквой ν ($\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$ и т. д.). Приближенной механической моделью валентных колебаний может служить система из двух шаров, связанных жесткой пружиной (рис. 3.1, а).

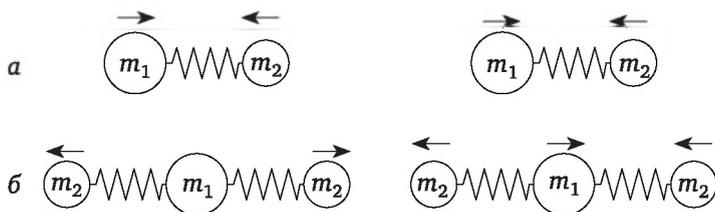


Рис. 3.1. Механическая модель валентных колебаний атомов в молекуле (а); модель симметричных и асимметричных колебаний в системе трех атомов (б)

Валентные колебания подразделяются на *симметричные* (синфазные) — ν^s , и *асимметричные* (несимметричные, антифазные) — ν^{as} . Это возможно в системе из трех или четырех (рис. 3.1, б) атомов (например, молекула CO_2).

Деформационные колебания связаны с изменением валентного угла, образованного связями у общего атома. Они обозначаются буквой δ . Для возбуждения деформационных колебаний требуется меньшая энергия, чем в случае валентных колебаний, и, следовательно, они имеют меньшую частоту (меньшее волновое число):

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}.$$

Деформационные колебания подразделяются на *плоскостные* (ножничные, маятниковые) и *внеплоскостные* (веерные, крутильные) (рис. 3.2).

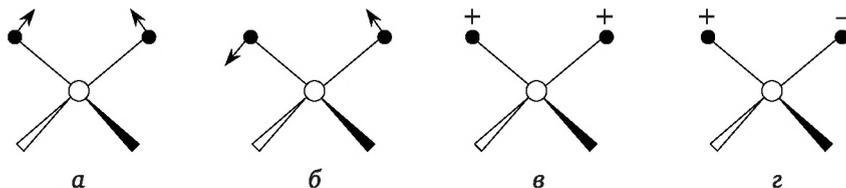


Рис. 3.2. Деформационные колебания метиленовой группы (CH_2):

а — ножничное, б — маятниковое, в — веерное, г — крутильное.

Символом «+» показан выход атома из плоскости вперед,

«-» — движение атома за плоскость

3.1.2. Спектры поглощения

Колебательными инфракрасными спектрами обладают не все молекулы, а только те, у которых при колебании происходит изменение их электрического дипольного момента. ИК-спектрами обладают, например, молекулы HCl , CO , H_2O и т. д., но не H_2 , O_2 и др. В симметричных молекулах (например, таких, как этан) дипольный момент не зависит от длины связи $\text{C}-\text{C}$, и колебания, отвечающие таким связям, не проявляются в инфракрасных спектрах.

Сравнительная простота колебательных или колебательно-вращательных спектров двухатомных молекул обусловлена тем, что колебания происходят только вдоль линии, соединяющей ядра (валентные колебания).

В многоатомной молекуле происходят колебания всех атомов. Число колебательных степеней свободы у нелинейной молекулы, состоящей из N атомов, равно $3N - 6$, а у линейной $3N - 5$, так как у них отсутствует одна вращательная степень свободы.

Вследствие негармоничности колебаний, кроме основных частот, в спектрах наблюдаются, обычно в виде слабых полос, обертоны и составные частоты. *Обертоны* — колебания, частота которых больше в целое число раз, чем у основных (2ν , 3ν и т. д.). *Составные частоты* являются суммой или разностью двух различных фундаментальных частот. Каждому из типов колебаний в молекулах и их суперпозициям отвечают соответствующие полосы, что придает инфракрасным спектрам значительную сложность по сравнению с электронными.

Для высокосимметричных молекул, обладающих осью симметрии не ниже третьего порядка, различные колебания могут иметь одинаковые частоты, вследствие чего в спектре таких соединений появляется вместо нескольких полос одна — осуществляется так называемое *вырождение*.

Бензол, содержащий 12 атомов, имеет $3 \cdot 12 - 6 = 30$ колебаний, из которых 7 колебаний происходят с изменением дипольного момента и поэтому активны в ИК-спектре. Вследствие вырождения в ИК-спектре будет наблюдаться меньшее число полос, а именно — 4 полосы.

Инфракрасные спектры многоатомных соединений сильно отличаются от УФ- и видимых спектров. Различия вытекают из природы взаимодействия поглощающих молекул и их окружения. В УФ-спектрах линии поглощения уширяются и стремятся слиться в широкие полосы поглощения. Большая ширина полосы поглощения обусловлена окружением хромофора, а также тем, что, помимо основных уровней электронных переходов, в хромофоре существуют подуровни, связанные с колебаниями молекулы. В ИК-спектре, наоборот, частота и коэффициент поглощения, соответствующие отдельному фрагменту (связи), обычно мало меняются с изменением окружения. Поэтому линии в ИК-спектре не сливаются в полосу.

Обычно по оси ординат при построении ИК-спектров откладывают светопропускание в процентах, а не абсорбцию вещества. По оси абсцисс откладывают волновое число в обратных сантиметрах (см^{-1}), а иногда длину волны (рис. 3.3).

Полосы в колебательных спектрах делятся на два типа: характеристические (в основном валентные колебания), присутствие которых в спектре доказывает наличие в исследуемом веществе определенных структурных элементов, и нехарактеристические.

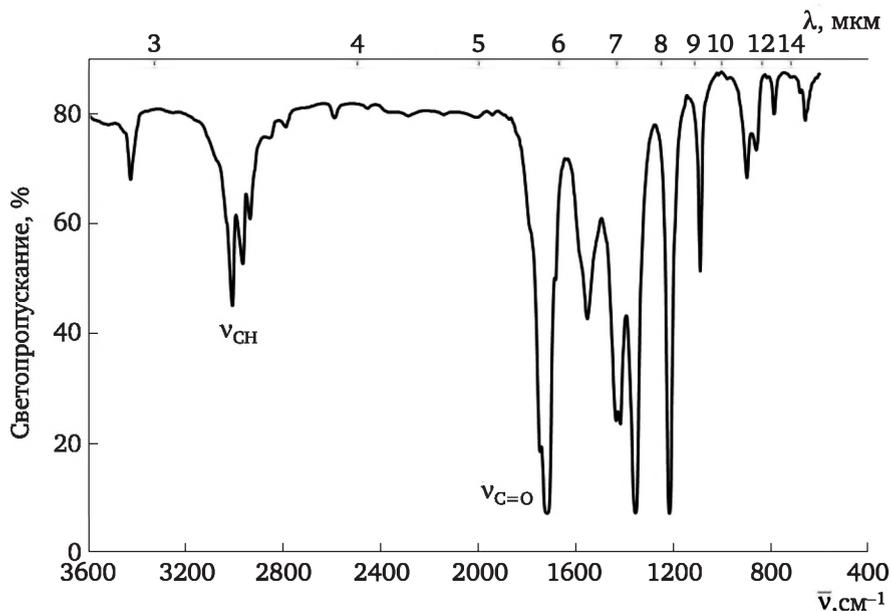


Рис. 3.3. Спектр поглощения ацетона в инфракрасной области

Характеристическое колебание принадлежит определенной связи (С–Н, О–Н, N–H, С–О и др.) и, следовательно, имеет достаточно постоянную частоту в различных веществах.

Нехарактеристические колебания занимают область 400—1000 см⁻¹. Это область колебаний углеродного скелета молекулы, которая резко реагирует на малейшие изменения в структуре молекулы.

ИК-спектр может быть разделен на несколько областей (корреляционные диаграммы).

4000—2500 см⁻¹ — валентные колебания атомов водорода. Группе О–Н соответствует частота 3600—3700 см⁻¹. Если гидроксигруппа образует водородную связь, то последняя снижает эту частоту на 300—1000 см⁻¹. Поглощение группы N–H наблюдается в области 3300—3400 см⁻¹, а группы С–Н в области 2850—3000 см⁻¹.

2500—2000 см⁻¹ — область валентных колебаний тройной связи. Поглощение группы С≡С обычно наблюдается в диапазоне 2050—2300 см⁻¹, но оно может быть слабым или отсутствовать. Поглощение группы С≡N лежит вблизи 2200—2300 см⁻¹.

2000—1400 см⁻¹ — область валентных колебаний двойной связи. Карбонильная группа (С=О) кетонов, альдегидов, кислот, амидов дает обычно сильное поглощение около 1700 см⁻¹. Группа С=C в алкенах имеет поглощение вблизи 1650 см⁻¹. Ароматическое кольцо характеризуется наличием нескольких полос поглощения в диапазоне 1450—1600 см⁻¹.

В область $1400—500\text{ см}^{-1}$ попадают валентные и деформационные колебания самых различных групп, что затрудняет идентификацию отдельных функциональных групп. При этом положение и интенсивность полос поглощения в этой области сугубо индивидуальны для каждого конкретного химического соединения, иногда ее называют *областью отпечатков пальцев*.

Полный спектр органического соединения (от 4000 до 400 см^{-1}) дает возможность устанавливать идентичность веществ. Вещества идентичны, если их инфракрасные спектры, измеренные в одинаковых условиях, совпадают.

Изменение групповых частот внутри интервала, приведенного в корреляционных таблицах, связано с межмолекулярными и внутримолекулярными взаимодействиями в веществе.

Межмолекулярные взаимодействия практически отсутствуют в газообразном состоянии, поэтому истинный спектр вещества получают для его паров. В жидкости под влиянием диэлектрических свойств среды или в результате ассоциации может произойти изменение частот колебаний. Спектр твердого соединения изменен еще в большей степени не только благодаря усилению межмолекулярных взаимодействий, но и вследствие влияния кристаллической решетки. Смещение полос поглощения в спектре кристаллического соединения под влиянием межмолекулярных взаимодействий (за исключением соединений с сильными водородными связями) редко превышает 25 см^{-1} . Растворители оказывают небольшое влияние на положение полос поглощения, и только в случае образования водородных связей может происходить существенное изменение частот колебаний групп, участвующих в ее образовании.

Наиболее существенное изменение в положении групповых частот наблюдается под влиянием внутримолекулярных взаимодействий. Эти взаимодействия определяются массой присоединенных атомов, геометрией молекулы и электронными эффектами заместителей.

3.1.3. Возможности метода и практические рекомендации

Метод ИК-спектроскопии позволяет доказывать присутствие в веществе группировок, обладающих характеристическими частотами колебаний; доказывать тождественность образцов; осуществлять качественный и количественный анализ смесей при известных спектрах компонентов.

Качественный анализ. Благодаря кропотливому изучению огромного числа спектров известных веществ установлены корреляции (зависимости) между положением максимумов поглощения индивидуального колебания и соответствующими атомными группировками.

Для расшифровки инфракрасного спектра необходимо идентифицировать полосы поглощения, т. е. установить принадлежность каждой из полос спектра определенным атомным группировкам.

Значения волновых чисел для различных групп находят в корреляционных диаграммах и таблицах характеристических частот.

С помощью корреляционных диаграмм устанавливают приблизительно, какая часть инфракрасного спектра представляет для данного исследования наибольший интерес. Затем по таблицам характеристических частот уточняют положение ожидаемых полос в спектрах. В расшифровке спектров помогают атласы, объединяющие спектры веществ определенного класса.

Стараясь получить максимум информации о строении вещества из ИК-спектров, следует учитывать, что содержащиеся в них полосы обладают различной степенью характеристичности. Поэтому, изучая ИК-спектр, следует в первую очередь обратить внимание на те области, в которых наличие интенсивной полосы однозначно свидетельствует о присутствии в исследуемом веществе определенной функциональной группы. Обнаружив основную характеристическую частоту, необходимо обязательно убедиться в наличии других полос, характерных для данного структурного элемента.

При определении характеристических полос важнейшее значение имеет их интенсивность. Различают полосы сильной, средней и слабой интенсивности. Так, слабая полоса в области 1700 см^{-1} не может служить доказательством присутствия в исследуемой молекуле карбонильной группы, поскольку характеристическая для этой группы полоса является одной из самых интенсивных в спектре.

Рассмотрим в качестве примера поглощение карбонильной группы. В первую очередь следует проверить наличие наиболее характеристических полос в области $1700\text{—}1800\text{ см}^{-1}$ (группа $\text{C}=\text{O}$ в составе любой возможной функции). Если полосы соответствующей интенсивности в этой области отсутствуют, то можно утверждать, что молекула не содержит данного структурного элемента. Если присутствует полоса $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, то по ее положению с помощью таблиц можно предположить, к какой функциональной группе она относится. Надо учитывать, что положение полосы карбонильной группы меняется под действием собственного молекулярного окружения: полоса $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ в карбоновых кислотах ($1700\text{—}1725\text{ см}^{-1}$), способных образовывать внутримолекулярную водородную связь, отличается от полосы $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ в сложном эфире ($1735\text{—}1750\text{ см}^{-1}$), в котором такая связь образовываться не может. Если вещество представляет собой сложный эфир, ему должны соответствовать две полосы $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ сильной интенсивности в области $1280\text{—}1200\text{ см}^{-1}$. Если предполагаемая группа альдегидная, необходимо отыскать в спектре полосу $\nu_{\text{C}(\text{O})\text{H}}$ в области $2695\text{—}2830\text{ см}^{-1}$ слабой интенсивности. Если полос $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ две и они имеют соответствующие значения частот, то весьма вероятно, что вещество является ангидридом кислоты; в этом случае в области $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ ($1280\text{—}1200\text{ см}^{-1}$) должны также наблюдаться две полосы.

Анализ по ИК-спектрам требует значительного опыта, хорошего знакомства со справочной литературой и химией исследуемых веществ. Отнесение полос и определение структуры по инфракрасным спектрам не всегда однозначно. Для полного определения структуры могут потребоваться дополнительные исследования, выполненные другими методами.

Количественный анализ по ИК-спектрам осуществляется в двух направлениях: определение концентраций веществ в растворе и определение числа групп, входящих в состав молекулы.

Чтобы определить концентрацию вещества, выбирают в ИК-спектре анализируемого вещества характеристическую полосу сильной интенсивности. Приготавливают несколько стандартных концентраций исследуемого вещества, записывают ИК-спектр и находят светопропускание (T), соответствующее выбранному значению волнового числа (длине волны). Строят калибровочный график, затем измеряют светопропускание анализируемого раствора и по графику определяют концентрацию анализируемого вещества.

3.1.4. Устройство приборов

Инфракрасный спектрометр — прибор, широко используемый для исследования структуры соединений. Промышленностью выпускаются записывающие инфракрасные спектрофотометры, обладающие отличным разрешением и воспроизводимостью.

В качестве источников освещения наиболее употребительны ртутные лампы высокого давления, штифты Глобара (или просто глобары) и Нернста. Глобар — стержень из карбида кремния (SiC), который можно нагревать путем пропускания электрического тока. Температура глобара значительно ниже, чем у ламп накаливания, и составляет около $1200\text{ }^\circ\text{C}$. Глобар дает излучение в интервале $2\text{--}16\text{ }\mu\text{m}$. Штифт Нернста конструктивно не отличается от штифта Глобара, он сделан из оксидов редкоземельных элементов (циркония, тория и иттрия) и может быть нагрет без разрушения до более высокой температуры ($1800\text{--}1900\text{ }^\circ\text{C}$). Максимум излучения штифта Нернста при $1900\text{ }^\circ\text{C}$ лежит около $1,3\text{ }\mu\text{m}$, т. е. между полосами испускания перекальных ламп и глобаров.

Наиболее универсальными монохроматорами являются призмы, изготовленные из солей щелочных и щелочно-земельных металлов (LiF , NaCl , KBr). Эти же материалы применяются для изготовления кювет. Призмы из хлорида натрия применяется для записи спектров в широком интервале волновых чисел. Призмы из фторида лития — для сравнительно узкого участка области $1700\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

В кюветы нельзя заливать растворы, содержащие воду, или агрессивные вещества, взаимодействующие с материалом кювет. В качестве растворителей применяют осушенные жидкости.

Существуют различные способы введения образца в ИК-спектрометр.

1. *Растворы веществ* (применяют кюветы с длиной, равной 0,1—1,0 мм). Затруднения при анализе связаны с выбором растворителя, потому что они обладают собственным поглощением. Для ИК-области в качестве растворителя наиболее подходит четыреххлористый углерод, но в нем растворяется ограниченный круг веществ. Также используют сероуглерод, хлороформ, циклогексан и др.

2. *Тонкие пленки*. Высоковязкие жидкости часто помещают в виде слоя между двумя пластинками из соли, поскольку ввести вязкую жидкость в кювету не так просто.

3. *Пасты (суспензии)* готовят тщательным растиранием твердого образца с вазелиновым маслом и помещают в виде тонкого слоя между солевыми пластинками.

4. *Твердые вещества* в виде порошка тщательно измельчают, растирая в агатовой или яшмовой ступке с порошком бромида калия, и затем спрессовывают в специальном устройстве под давлением в таблетки. Полученную таблетку устанавливают вместо кюветы и прописывают спектр. В двухлучевых приборах в потоке сравнения устанавливают таблетку из чистого бромида калия.

Для измерения интенсивности инфракрасного излучения применяют термоэлементы и болометры. В термоэлементах используется термо-ЭДС, возникающая при изменении температуры спая между металлами или сплавами под действием инфракрасного излучения. Широко применяются для этих целей термпары медь-константан, серебро-висмут и др.

Принцип действия болометра основан на изменении электропроводности материала при нагревании. Термочувствительный элемент, представляющий собой зачерненную платиновую, сурьмяную или другую тонкую металлическую пластинку, включают в мостовую схему. Инфракрасное излучение вызывает нагревание термочувствительного элемента и разбаланс моста, пропорциональный интенсивности падающего излучения.

3.2. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР)

3.2.1. Теоретические основы метода

Когда луч света проходит через жидкость или газ, небольшая его часть рассеивается. Идеальное твердое тело не рассеивает излучение, так как излучение, рассеянное единичным кристаллом, будет исчезать в результате интерференции с излучением, рассеянным другим единичным кристаллом. Механизм рассеяния света включает поляризацию молекул или атомов электрическим полем. При

этом электрическое поле излучения индуцирует в атомах или молекулах быстро флуктуирующий диполь. Флуктуация диполя ведет к испусканию электромагнитных волн в различных направлениях при той же частоте, что и у падающего света, — это рассеянное излучение. Такое рассеяние, называемое *рэлеевским*, можно рассматривать как упругое рассеяние фотона молекулой.

Явление *комбинационного рассеяния* состоит в том, что в рассеянном молекулами излучении наблюдаются линии слабой интенсивности, отсутствующие у падающего излучения. Данный эффект в 1928 г. независимо друг от друга обнаружили Ч. Раман (для жидкостей и паров), а также Г. С. Ландсберг и Л. И. Мандельштам (для кристаллов). Разности частот между слабыми линиями и возбуждающей линией являются характерными для рассеивающего вещества и не зависят от частоты возбуждающей линии. Комбинационное рассеивание можно рассматривать как неупругое рассеивание фотона молекулой. Оно отличается от флуоресценции или фосфоресценции, при которых образец не имеет полосы поглощения при длине волны падающего света.

Суть явления КР состоит в том, что при рассеивании молекулами света от монохроматического источника (ртутная лампа, лазер) в спектре рассеянного света можно обнаружить, наряду с волновым числом падающего света ($\bar{\nu}_0$), и измененные волновые числа рассеянного излучения ($\bar{\nu}_p$), так называемые спутники. Колебательный спектр вещества наблюдается при поглощении им ИК-излучения или комбинационном рассеивании света, когда в результате взаимодействия молекул с фотонами ($h\nu$) происходят изменения колебательных состояний, т. е. молекулы переходят на другие уровни энергии. Разность энергий состояний, между которыми происходит переход, равна согласно соотношению Бора:

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu},$$

где ν — частота поглощаемого (или испускаемого) излучения, Гц (с^{-1}); $\bar{\nu}$ — волновое число (см^{-1}).

Разные типы возможных переходов при рассеянии света показаны на рис. 3.4.

Согласно этой схеме молекула, взаимодействуя с фотоном монохроматического излучения, сначала возбуждается до какого-то неустойчивого (*виртуального*) состояния. Затем она может отдавать этот фотон с той же энергией, возвращаясь в исходное состояние, — это *рэлеевское рассеяние* света. Возможно, однако, заимствование молекулой части энергии фотона, т. е. отдается фотон меньшей энергии, а молекула переходит на более высокий колебательный уровень E_1 по сравнению с исходным, — это *стоксово рассеяние*.

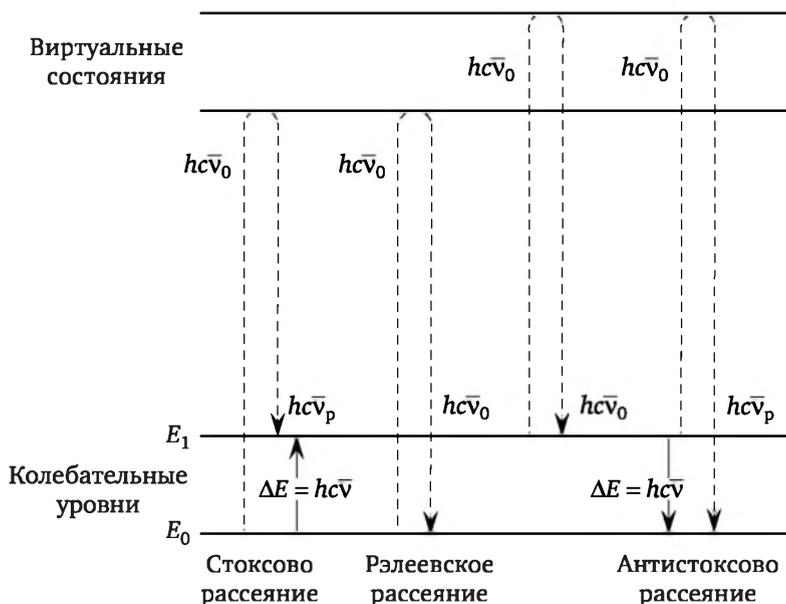


Рис. 3.4. Схема возникновения линий рэлеевского и комбинационного рассеяния

Если молекула уже находилась на возбужденном колебательном уровне E_1 , то при взаимодействии с фотоном она может отдавать часть своей энергии, рассеивая фотон большей энергии и переходя на более низкий колебательный уровень E_0 , — это *антистоксово рассеяние*. В связи с меньшей заселенностью более высоких уровней молекул в соответствии с распределением Больцмана антистоксовых переходов в единицу времени происходит меньше, чем стоксовых, так что интенсивность стоксовых линий КР намного больше и обычно регистрируют именно такие спектры КР. Они расположены с красной стороны, т. е. со стороны больших длин волн или меньших частот от рэлеевской линии.

3.2.2. Спектры КР

В спектрах КР в качестве абсциссы используют *рамановское смещение* — волновое число ($\bar{\nu}$), равное разности волновых чисел возбуждающего излучения $\bar{\nu}_0$ и рассеянного (рамановского) излучения $\bar{\nu}_p$:

$$\bar{\nu} = \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_p.$$

На рис. 3.5 приведен спектр КР жидкого четыреххлористого углерода. Наблюдаемые сдвиги в спектрах КР лежат в области $100\text{—}4000\text{ см}^{-1}$ и соответствуют изменениям колебательной энергии. Стоксовы линии соответствуют положительным значениям рамановского смещения. По шкале ординат откладывают относитель-

ную интенсивность излучения, регистрируемую фотоумножителем. Сильный сигнал при $\bar{\nu} = 0$ связан с рэлеевским рассеянием лазерного излучения.

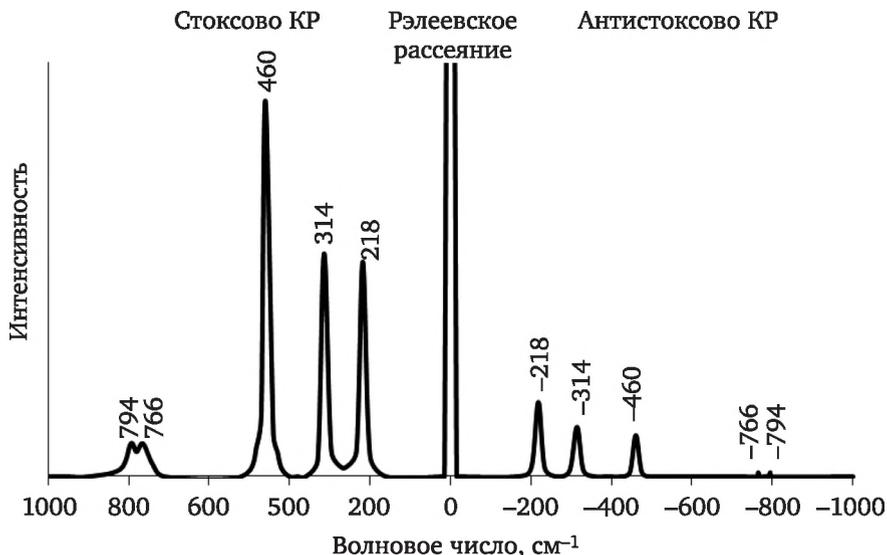


Рис. 3.5. Спектр КР жидкого CS_2 , полученный при использовании лазера с длиной волны 488 нм

Основной физической величиной, определяющей свойства рассеянного веществом электромагнитного излучения, является *поляризуемость* молекул (α). Поляризуемость — способность к наведению диполя под действием электромагнитного поля фотона, попадающего в молекулу. При этом молекула не обязательно должна быть диполем, тогда как для поглощения инфракрасного излучения молекула должна обладать постоянным дипольным моментом (μ). Следовательно, частоты, наблюдаемые в ИК-спектре, могут не проявляться в рамановском спектре, и наоборот.

В отличие от инфракрасных спектров поглощения, где интенсивность полос поглощения пропорциональна квадрату производной дипольного момента по изменению межатомного расстояния, в КР интенсивность линий пропорциональна квадрату производной поляризуемости молекулы по изменению межъядерного расстояния. Из этого следует, что молекула обладает спектром КР только в том случае, если при ее взаимодействии с возбуждающим светом происходит изменение поляризуемости. По этой причине двухатомные гомоядерные молекулы, не дающие инфракрасных спектров поглощения (H_2 , N_2 , O_2), активны в комбинационном рассеивании. Производные поляризуемости и дипольного момента изменяются по-разному, это и приводит к различиям между ИК- и КР-спектрами.

При сравнении ИК- и КР-спектров может быть получена ценная информация относительно симметрии молекул. Причина заключается в том, что электрически симметричная связь (т. е. связь, не имеющая дипольного момента) не поглощает в инфракрасной области. В такой молекуле, как этилен $\text{CH}_2=\text{CH}_2$, валентные колебания двойной связи симметричны, поскольку оба конца молекулы одинаковы. В результате в ИК-спектре не проявляется поглощение, обусловленное валентными колебаниями двойной связи; оно оказывается слабым во всех алкенах, строение которых близко к симметричному. Однако это колебание сильно проявляется в КР-спектре этилена и свидетельствует о симметричности структуры этилена.

В качестве общего вывода можно сказать, что молекула не имеет существенных свойств симметрии, если всем ее полосам поглощения в ИК-спектре соответствуют линии в спектре комбинационного рассеяния. Для иллюстрации этих эффектов на рис. 3.6 и 3.7 приведены ИК- и КР-спектры тетрахлорэтилена и циклогексена.

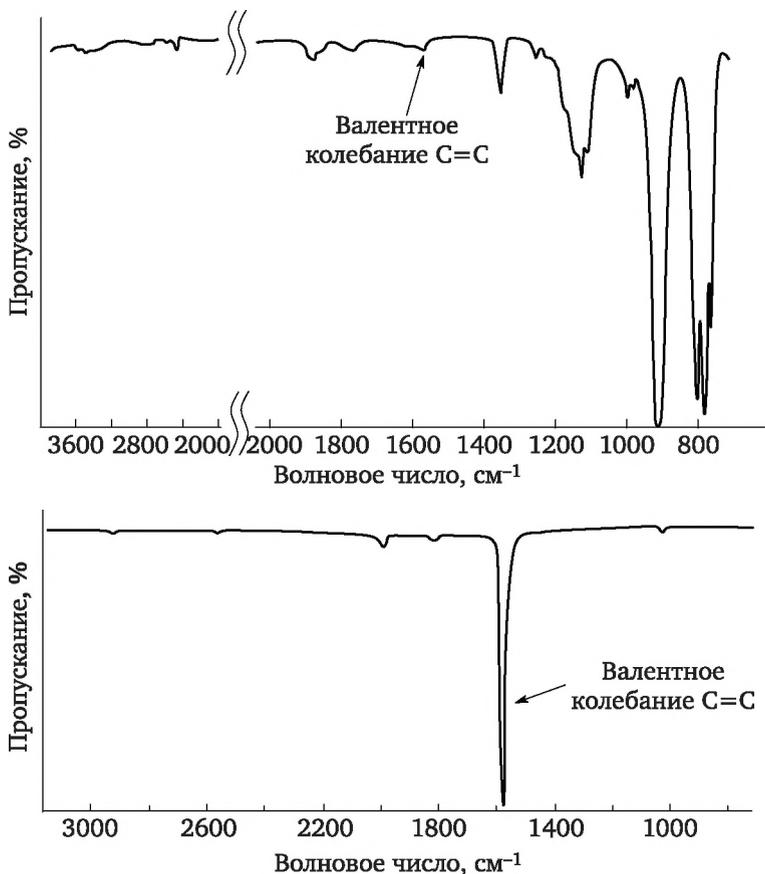


Рис. 3.6. ИК-спектр и спектр комбинационного рассеяния тетрахлорэтилена (разметка горизонтальных шкал неодинакова)

Поглощение, обусловленное валентным колебанием двойной связи в тетрахлорэтилене (1570 см^{-1}), сильно проявляется в КР-спектре и отсутствует в инфракрасном, тогда как поглощение, обусловленное менее симметричной двойной связью циклогексена (1658 см^{-1}), слабо проявляется в ИК-спектре и несколько сильнее в КР-спектре. Значения частот (в ИК и КР), относящихся к одному и тому же колебанию, не обязательно полностью должны совпадать, что связано со спецификой методов. Следует отметить, что на основе анализа спектра комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения может быть получен почти полный набор колебательных частот.

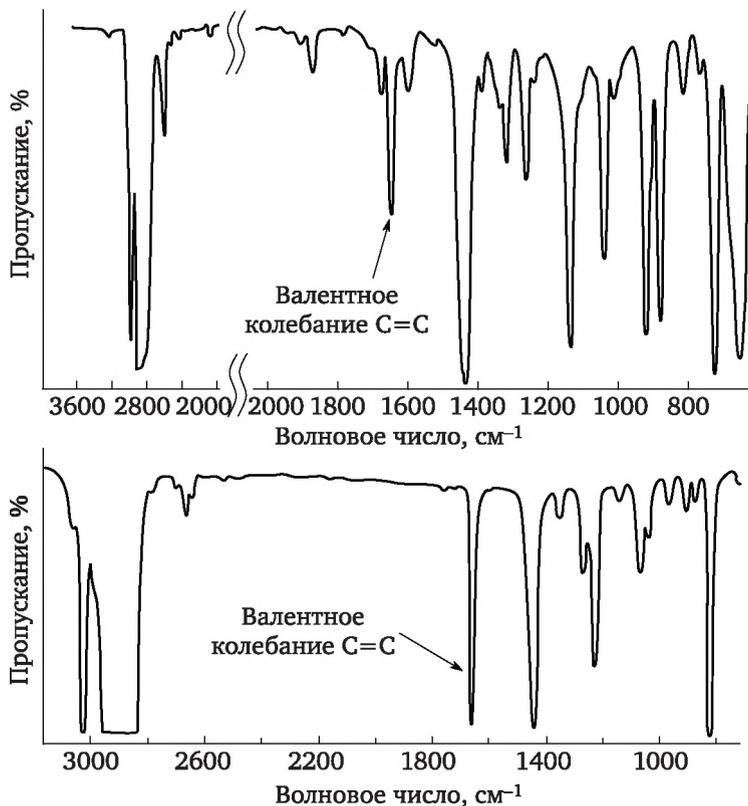


Рис. 3.7. ИК-спектр и спектр комбинационного рассеяния циклогексена (разметка горизонтальных шкал неодинакова)

3.2.3. Возможности метода КР

Спектроскопия комбинационного рассеяния, так же как и инфракрасная спектроскопия, позволяет определять частоты колебаний молекул. Эти два спектральных метода, дополняя друг друга, открывают более широкие возможности для установления структуры органических соединений и используются также в количественном анализе.

Возможности метода КР весьма разносторонние. Так, этим методом изучается взаимное влияние атомов, конформация, таутомерия, ассоциация, ионизация, симметрия молекул.

При идентификации веществ пользуются атласами рамановских спектров. Идентификация органических соединений связана с понятием характеристичности валентных колебаний по частоте и интенсивности (I^S) отдельных атомных групп. Так, например, положение карбонильной, гидроксильной, нитрильной, нитрогруппы мало зависит от строения остальной части молекулы (см. табл. 3.1).

Таблица 3.1

Сигналы различных групп в рамановских спектрах

Группа X	Химические связи	Alk-X		Ph-X		$\frac{I^S(\text{Ph-X})}{I^S(\text{Alk-X})}$
		$\bar{\nu}$, см ⁻¹	I^S	$\bar{\nu}$, см ⁻¹	I^S	
-CH ₃	C-H	2900	40	2900	50	1,2
-SO ₂ R	S=O	1135	100	1160	80	0,8
-COO	C=O	1745	14	1725	100	7
-CO	C=O	1719	14	1690	160	11
-COCl	C=O	1803	12	1770	170	14
-COH	C=O	1729	13	1704	230	18
-CH=CH ₂	C=C	1642	30	1631	340	11
-C≡CH	C≡C	2118	75	2110	400	5,3
-CN	C≡N	2254	32	2231	330	10
-NO ₂	N=O	1380	35	1348	700	20

В тех случаях, где эта зависимость существует, она обычно обусловлена жесткостью химических связей, эффектом сопряжения или различными видами взаимодействия.

Из табл. 3.1 видно, что интенсивность линий в ряду ароматических замещенных существенно выше интенсивности тех же линий для алкилзамещенных. Интенсивность линий КР является надежным критерием оценки степени сопряжения. Из приведенных в табл. 3.2 данных по интенсивности четко прослеживается влияние заместителей на спектры соединений для сопряженных систем.

Таблица 3.2

Влияние заместителей на интенсивность линий спектров КР

Группа X в Ph-X	I_{1600}^S *	Группа X в Ph-X	I_{1600}^S *
H	35	CHO	200
OH	38	C=C	250
CCl ₃	80	Ph	370

Группа X в Ph-X	I_{1600}^S *	Группа X в Ph-X	I_{1600}^S *
CN	150	C=C=C=C	1100
NR ₂	170	C-C-CHO	1800
NO ₂	200	C=C-NO ₂	3200

* В таблице приведены коэффициенты интенсивности характерной линии бензольного кольца, лежащей в области 1570—1610 см⁻¹.

Следует отметить, что для решения различных структурно-химических задач метод комбинационного рассеяния света целесообразно использовать в совокупности с другими спектральными методами.

3.2.4. Спектральная аппаратура и образцы

Комбинационное рассеяние света изучается на аппаратуре, предназначенной для работы в видимой области спектра, что значительно облегчает исследование, поскольку отпадают трудности, связанные с выбором материалов, прозрачных в инфракрасной области.

Важнейшим элементом в спектроскопии КР является достаточно мощный источник монохроматического излучения, поскольку интенсивность линий КР зависит от интенсивности возбуждающего света. Долгое время в качестве источника возбуждающего излучения использовали, а иногда используют и сейчас ртутные лампы цилиндрической формы в специальном осветителе для образца или спиральной формы. С помощью фильтров из ртутного спектра выделяют одну из линий, обычно с длиной волны $\lambda = 435,8$ нм (синяя), а иногда 546,1 нм (зеленая), в частности для окрашенных в желтый цвет веществ. Фильтры изготавливаются из специальных стекол или ими служат концентрированные водные растворы нитрита натрия — для синей линии и хромата калия — для зеленой линии. При использовании в качестве источника возбуждающего излучения ртутных ламп круг объектов, которые могут изучаться методом спектроскопии КР, довольно ограничен. Это связано, прежде всего, с необходимостью использования больших количеств образцов и трудностями работы с газами и твердыми образцами.

Настоящую революцию в спектроскопии КР произвело появление лазеров. Давая мощное, монохроматическое, когерентное и поляризованное излучение, лазер явился почти идеальным источником для возбуждения спектров КР. Из газовых лазеров непрерывного действия в спектроскопии КР первым стал применяться гелий-неоновый лазер с длиной волны 632,8 нм. В дальнейшем нашли широкое применение аргоновый ($\lambda = 488,0$ нм; 514,5 нм и др.) и криптоновый ($\lambda = 530,0$ нм; 647,1 нм) лазеры, дающие большой

выигрыш в интенсивности по сравнению с гелий-неоновым лазером. Высокая мощность и другие достоинства лазерных источников позволяют легко исследовать спектры КР веществ в любых агрегатных состояниях и в микроколичествах.

На рис. 3.8 показана экспериментальная установка для получения спектров комбинационного рассеяния. Монохроматическое излучение от лазера проходит через образец, и свет, рассеянный под прямыми углами к входящему лучу (в принципе могут использоваться схемы, работающие под углами 180° или 45°), фокусируется на щели спектрометра. Регистрация светового потока производится обычно по однолучевой схеме с фотоэлектронным умножителем и усилителем. Интенсивность измеряется как функция волнового числа при помощи фотоумножителя.

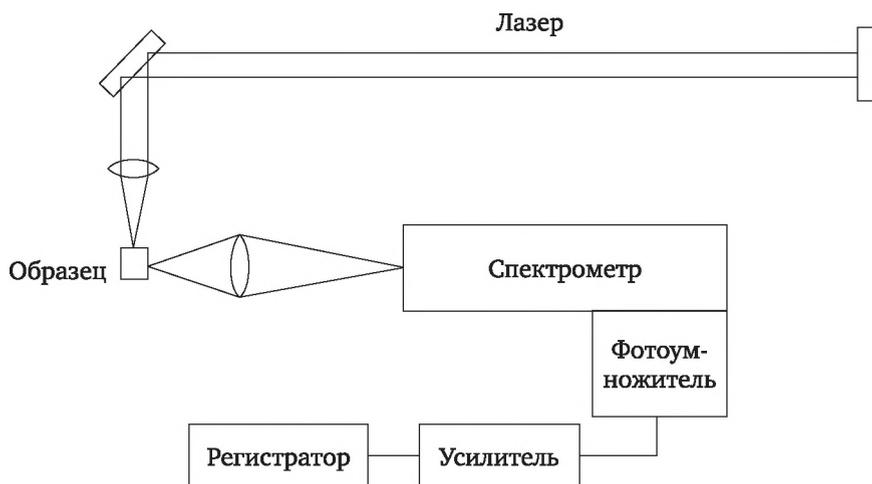


Рис. 3.8. Схема установки для получения спектров КР

Источником помех в рамановской спектроскопии, ограничивающим возможности метода, является флуоресценция. Флуоресцентное излучение обычно гораздо интенсивнее рамановского, поэтому небольшие количества флуоресцирующих примесей (или флуоресценция, вызванная растворителем) могут заглушить наблюдаемый сигнал. Чтобы избежать флуоресценции, нужно подобрать лазер, излучающий свет с длиной волны, находящейся за пределами полосы возбуждения флуоресценции.

Подготовка жидких проб включает их тщательное фильтрование для удаления следов суспендированных веществ, которые увеличивают рассеяние. Флуоресцирующие примеси необходимо тщательно удалять. Профильтрованные газы можно использовать в многоходовой кювете. Твердые вещества или тонкие пленки можно изучать при помощи отраженного от поверхности лазерного луча.

Контрольные вопросы

1. Сопоставьте механизмы поглощения видимых, ультрафиолетовых и инфракрасных лучей. Обоснуйте возможность определения строения молекул по инфракрасным спектрам.
2. Что такое валентные и деформационные колебания атомов в молекулах? Как различные виды колебаний проявляются в инфракрасных спектрах?
3. Что такое колебательные спектры?
4. Как расшифровываются инфракрасные спектры по корреляционным диаграммам и таблицам характеристических частот?
5. Как выполняется количественный анализ по ИК-спектрам?
6. Какие способы введения образца в ИК-спектрометр вам известны?
7. Опишите источники, монохроматоры и приемники излучения в инфракрасной области.
8. В чем состоят особенности солевой оптики?
9. Опишите механизм комбинационного рассеяния света. Что такое стоксово и антистоксово КР?
10. Какое влияние оказывает симметрия молекул на наличие и интенсивность полос поглощения в ИК и КР-спектрах?
11. Каково влияние заместителей на положение и интенсивность полос в КР-спектрах?
12. Какие источники излучения применяются в спектроскопии КР? Опишите схему спектрометра КР.
13. Какие источники помех в спектроскопии КР вам известны?

Тема 4

ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

4.1. Атомная эмиссионная спектроскопия

4.1.1. Теоретические основы метода

Методы эмиссионного спектрального анализа используются во многих областях науки и техники. Этим методом выполняется значительная часть анализов в металлургической промышленности. Очень эффективным оказалось применение спектральных методов при анализе разного рода геологических проб при поиске полезных ископаемых.

Существенную роль играет спектральный анализ природных и сточных вод, почвы, атмосферы и других объектов окружающей среды, а также в медицине и биологии. Большое значение имеет спектральный анализ чистых материалов в электронной технике и других областях, анализ реактивов и т. д.

Под эмиссионным спектральным анализом понимается совокупность методов определения химического состава вещества по наблюдению его возбужденного спектра. Для целей эмиссионного спектрального анализа необходимо перевести анализируемое вещество в возбужденное состояние. Наиболее подходящим для этого является перевод всей или части пробы в парообразное состояние и возбуждение паров пробы нагреванием их до достаточно высокой температуры (1000—5000 °С). Источниками энергии для этого могут быть дуга, искра или высокотемпературное пламя.

При возбуждении молекулярное строение анализируемого вещества нарушается: происходит диссоциация большинства молекул и образование новых молекул, устойчивых при температуре разряда. Поэтому, за редким исключением, результаты анализа дают возможность судить об элементарном, а не молекулярном составе пробы, т. е. о количествах входящих в ее состав элементов, а не о соединениях, в виде которых эти элементы образуют пробу.

При возбуждении паров анализируемого вещества в высокотемпературном источнике наблюдаются три типа спектров: линейчатые, полосатые и сплошные.

Линейчатые спектры обязаны своим появлением переходам электронов между энергетическими уровнями возбужденных ато-

мов и ионов. Дискретный характер спектров связан с квантовым характером уровней. Полосатые спектры принадлежат молекулам, присутствующим в разряде, и являются результатом возбуждения электронных, колебательных или вращательных уровней молекул.

Испускание атомами световой энергии происходит за счет изменения внутренней энергии, обусловленной взаимным расположением ядра атома и окружением его электронов. Атомы могут находиться только в определенных энергетических состояниях E_0 , E_1 , E_2 и т. д. В основном состоянии атомы обладают минимальной энергией E_0 . Чтобы получить излучение атомов, последние необходимо возбудить, сообщив им энергию, переводящую атом в одно из состояний с более высоким уровнем энергии, например E_1 . При последующем возврате атомов в состояние с более низкой энергией высвобождающаяся энергия $\Delta E = E_1 - E_0$ излучается в виде светового кванта. Частота получающегося излучения равна $\nu_{10} = (E_1 - E_0) / h$. Каждый акт соответствует излучению одного кванта. Механизм возбуждения и излучения можно представить схемой (рис. 4.1).

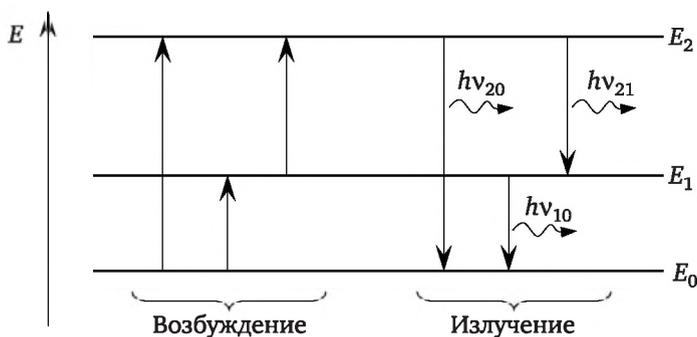


Рис. 4.1. Переходы, соответствующие процессам возбуждения атомов и испусканию атомами световой энергии

Спектры ионов и атомов состоят из бесконечно большого числа линий с частотами ν_{ij} . Вся совокупность и взаимное расположение линий являются однозначной характеристикой элемента. Мы одновременно наблюдаем излучение, соответствующее комбинациям всех возможных энергетических состояний атомов данного элемента, т. е. излучение всего спектра данного элемента.

4.1.2. Возможности метода

Качественный анализ. Основой качественного спектрального анализа является свойство каждого химического элемента излучать характерный линейчатый спектр. Задача качественного спектрального анализа сводится к отысканию линий определяемого элемента в спектре пробы. Принадлежность линии данному элементу устанавливается по длине волны и интенсивности линии. Однако общее

число линий в спектре многих элементов очень велико. Нет необходимости, конечно, определять длины волн всех спектральных линий в пробе. Для целей качественного анализа необходимо установить наличие или отсутствие в спектре так называемых аналитических или последних полос.

При уменьшении содержания элемента в пробе интенсивность линий этого элемента в спектре будет уменьшаться, некоторые линии исчезнут, и число линий уменьшится. При какой-то очень малой концентрации останется всего несколько линий. Это и есть последние линии, по которым обычно проводится качественный анализ. Последние линии хорошо изучены, их длины волн и характеристику интенсивности можно найти в специальных таблицах и атласах спектральных линий.

Для расшифровки спектра и определения длины волны анализируемой линии пользуются спектрами сравнения, в которых длины волн отдельных линий хорошо известны. Чаще всего для этой цели используют спектр железа, имеющий характерные группы линий в разных областях длин волн.

Отсутствие последней линии определяемого элемента в спектре гарантирует отсутствие других линий этого элемента. Однако наличие линии с длиной волны, характерной для последней линии какого-либо элемента, еще не означает, что линия действительно принадлежит именно этому элементу. Окончательную идентификацию проводят, проверяя последние линии всех «подозреваемых» элементов.

Спектральным анализом качественно можно определить более 80 элементов. Предел обнаружения методами качественного спектрального анализа колеблется для разных элементов в очень широких пределах: от 10^{-2} (Hg, Os, U и др.) до 10^{-5} % (Na, B, V и др.).

Количественный анализ. Попытки использовать зависимость интенсивности спектральных линий от концентрации элемента в пробе для количественного определения долгое время оставались безуспешными. Одной из основных причин неудач была недостаточная стабильность условий возбуждения.

В практике количественного спектрального анализа обычно используют интенсивность не отдельной линии, а отношение интенсивностей двух спектральных линий, принадлежащих разным элементам. Таким образом, в качестве свойства, связанного с концентрацией элемента, используется отношение интенсивности линии определяемого элемента к интенсивности линии другого элемента в этом же спектре. Такая методика позволяет снизить требования к постоянству условий возбуждения и регистрации спектров.

Линию определяемого элемента обычно называют аналитической линией и ее интенсивность обозначают I_a . Вторую линию,

обычно называемую линией сравнения, выбирают так, чтобы отношение интенсивностей зависело только от концентрации определяемого элемента, но не от условий возбуждения и регистрации спектра. Интенсивность линии сравнения обозначают I_c . Существенно также, чтобы интенсивности выбранных линий не слишком резко отличались между собой. Обычно выбирают линии, отношение интенсивностей которых не превышает 10, т. е. находится в пределах $0,1 \leq I_a/I_c \leq 10$, так как в противном случае точность определений уменьшается. Иногда в анализируемую пробу специально вводят так называемый внутренний стандарт, т. е. элемент, линию которого используют в качестве линии сравнения. При анализе проб, содержащих большое количество какого-то элемента, в качестве линии сравнения обычно выбирают линию этого элемента.

4.1.3. Фотометрия пламени (пламенная эмиссионная спектроскопия)

Появление специализированных пламенных эмиссионных спектрометров привело в какой-то степени к обособлению метода фотометрии пламени и приданию ему известной самостоятельности, хотя, конечно, фотометрия пламени осталась одним из методов эмиссионного спектрального анализа.

Как и любой другой прибор эмиссионной спектроскопии, фотометр для фотометрии пламени имеет источник возбуждения (пламенная горелка), диспергирующий элемент (обычно светофильтр) и приемник света — обычно фотоэлемент. В спектрофотометрах для пламени вместо светофильтров применяют призмы и дифракционные решетки. Анализируемый раствор в пламя горелки вводится в виде аэрозоля. При этом растворитель испаряется, а соли металлов диссоциируют на атомы, которые при определенной температуре возбуждаются. Возбужденные атомы, переходя в нормальное состояние, излучают свет характерной частоты, который выделяется с помощью светофильтров, и его интенсивность измеряется фотоэлементом.

Количественные определения проводят методом градуировочно-го графика или методом добавок. Методы фотометрии пламени характеризуются низким пределом обнаружения (до 0,001 мкг/мл для щелочных металлов и 0,1 мкг для других) при погрешности 1—3 %. Этим методом могут быть определены Li, Na, K, Rb, Cs, Sr, Ba, Ca, In, Ag и другие элементы. Одним из достоинств метода фотометрии пламени является также высокая производительность.

Спектры, получаемые в пламени, более просты, чем дуговые или искровые, так как температура пламени ниже, чем в электрических источниках возбуждения. Это облегчает анализ, но вместе с этим сужает возможности метода в отношении числа определяемых элементов.

4.1.4. Определение щелочных и щелочноземельных металлов методом пламенной фотометрии

На рис. 4.2 представлена принципиальная схема пламенного фотометра. Воздух под давлением 0,8 атм поступает в распылитель (8), который засасывает раствор из стаканчика (9) и распыляет его в камере (7). Крупные капельки раствора, осевшие на стенках, стекают через водяной затвор (10) в сосуд. Водяной затвор необходим для того, чтобы предотвратить утечку воздуха и газа через распылительную камеру.

Воздух, обогащенный мелкими капельками раствора — аэрозоль, содержащего анализируемое вещество, попадает в смеситель (6) и смешивается с потоком газа. Из смесителя смесь газа, воздуха и исследуемого вещества подается в пламя (1), факел которого расположен перед светофильтром (2). Светофильтр пропускает на фотоэлемент только лучи, расположенные в узком участке спектра, в котором находится характерная для данного элемента частота излучения и соответствующая ей спектральная линия. Диафрагмой (3) в случае необходимости можно ограничить интенсивность светового потока и подобрать, таким образом, необходимую чувствительность прибора. Световой поток падает на фотоэлемент (4), а ток фотоэлемента регистрируется гальванометром (5). Чем больше вещества внесено в пламя, тем интенсивнее спектр испускания, тем больше показания гальванометра.

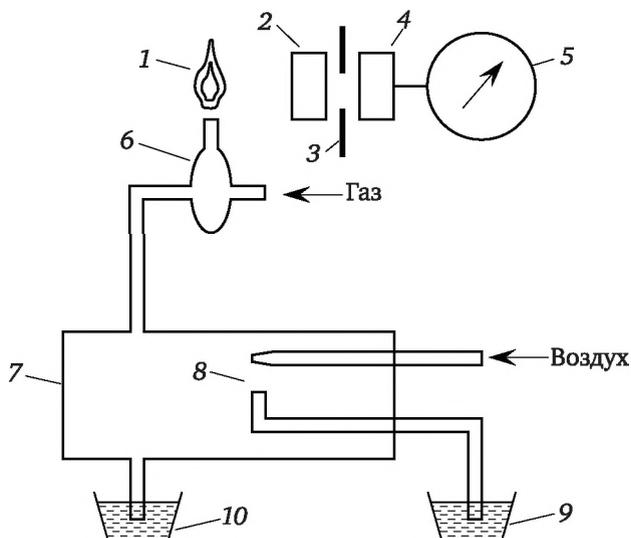


Рис. 4.2. Принципиальная схема пламенного фотометра:

- 1 — пламя, 2 — светофильтр, 3 — диафрагма, 4 — фотоэлемент,
- 5 — гальванометр, 6 — смеситель, 7 — распылительная камера,
- 8 — распылитель, 9 — стаканчик с исследуемым веществом,
- 10 — водяной затвор

Пламенный фотометр имеет сменные фотометрические головки с фотоэлементами и светофильтрами, приспособленными для определения различных катионов, например K^+ , Na^+ , Ca^{2+} . Одновременное присутствие всех трех или других посторонних ионов не мешает определению каждого, так как характеристические линии K^+ , Na^+ , Ca^{2+} достаточно удалены друг от друга (табл. 4.1) и хорошо разделяются светофильтрами.

Таблица 4.1

Характеристические линии и тип фотоэлемента

Определяемый ион	Максимум светопропускания светофильтра, нм	Тип фотоэлемента
Na^+	589	Селеновый
K^+	768	Сернисто-серебряный
Ca^{2+}	620	Селеновый

Методика определения одного из трех ионов состоит в следующем. Готовят серию из 4—6 растворов с известным содержанием каждого из анализируемых ионов. Затем включают соответствующую фотометрическую головку и снимают показания гальванометра для всех концентраций приготовленных растворов, содержащих данный ион. Полученные величины наносят на график — калибровочную кривую и определяют по ней содержание иона в смеси.

После этого анализируют другие ионы смеси, переключая соответствующим образом фотометрические головки. При снятии показаний давление воздуха в системе, расход газа и режим работы распылителя должны оставаться неизменными, поскольку, как показано выше, интенсивность испускаемого света зависит как от концентрации анализируемого вещества в пламени, так и от температуры пламени. В свою очередь эти величины зависят от подачи газа и воздуха в прибор.

4.2. Люминесцентные методы анализа: флуоресценция и фосфоресценция

Люминесценцией называют свечение вещества, возникающее при переходе молекул из возбужденного состояния в основное.

Люминесценция — довольно распространенное явление. Перевод молекул в возбужденное состояние может осуществляться различными путями, как и расходование приобретенной при этом молекулами энергии. Если возбуждение происходит за счет поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения называют *фотолюминесценцией*.

Хемилюминесценция представляет собой испускание света в результате протекания определенных химических реакций (напри-

мер, окисление эфирных растворов *n*-бромфенилбромида магния вызывает зеленовато-голубое свечение). К числу разновидностей люминесценции, которые наблюдаются в природе, относится молния (пример *электролюминесценции*). Некоторые виды бактерий, ракообразных, рыб, грибов, медуз, моллюсков, губок, червей обладают способностью светиться (известный пример — светляки). Такое явление называется *биолюминесценцией*. Оно обусловлено реакцией кислорода с веществом, находящимся в организме, которое называют люциферин. Эта реакция катализируется ферментом люциферазой.

4.2.1. Теоретические основы люминесценции

Схематично процессы поглощения излучения и последующей люминесценции можно представить с помощью диаграммы Яблонского (рис. 4.3). Молекула может существовать в электронных состояниях различной мультиплетности (синглетных, триплетных), и в каждом из них находиться на различных колебательных подуровнях. Нулевой колебательный подуровень каждого состояния на схеме показан жирной линией, а более высокие колебательные подуровни — тонкими линиями.

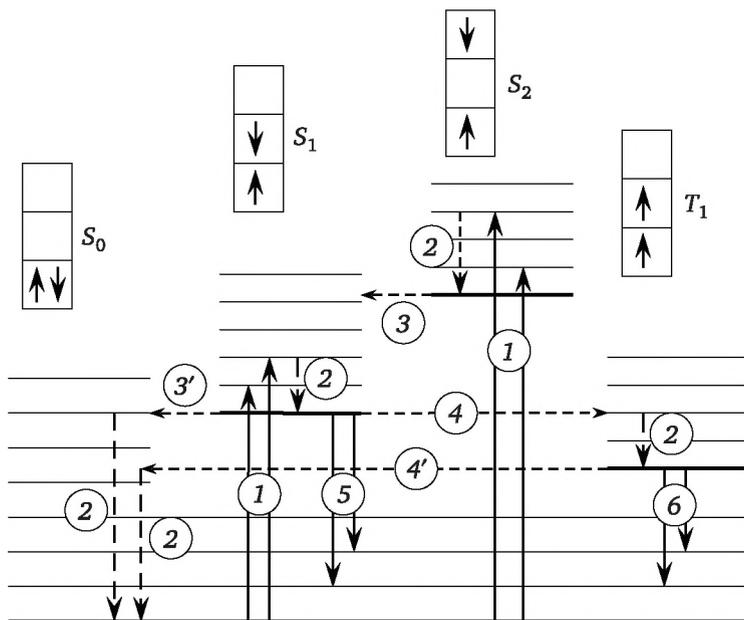


Рис. 4.3. Схема переходов между энергетическими уровнями молекулы: сплошными стрелками показаны поглощение или испускание излучения; пунктирными — безызлучательные переходы; 1 — поглощение излучения, 2 — колебательная релаксация, 3 — внутренняя конверсия, 4 — интеркомбинационная конверсия, 5 — флуоресценция, 6 — фосфоресценция

При нормальных условиях в отсутствие возбуждения молекулы находятся на нулевом колебательном подуровне основного синглетного состояния S_0 . Поглощая квант света, молекула за $\sim 10^{-15}$ с переходит (процесс 1) на некоторый колебательный подуровень одного из синглетных возбужденных состояний (S_1 , S_2 и т. д.), поскольку переход в триплетное состояние запрещен по спину. Полученного избытка колебательной энергии может оказаться достаточно для протекания *фотохимической реакции* с образованием новых молекул (характерное время процесса 10^{-13} — 10^{-8} с). В остальных случаях этот избыток вследствие *колебательной релаксации* (процесс 2) при столкновениях с окружающими молекулами теряется в виде тепловой энергии, а сама молекула за $\sim 10^{-12}$ с оказывается на нижнем колебательном подуровне соответствующего возбужденного состояния.

В возбужденных состояниях выше первого возможна *внутренняя конверсия* (процесс 3) — переход электрона с нижних колебательных подуровней верхнего возбужденного состояния на равные по энергии верхние колебательные подуровни низшего возбужденного состояния.

Например, в результате внутренней конверсии и последующей колебательной релаксации молекула из состояния S_2 за $\sim 10^{-11}$ с переходит на нулевой колебательный подуровень состояния S_1 . Из данного состояния возможны дальнейшие пути перехода:

1) безызлучательный переход $S_1 \rightarrow S_0$ за счет внутренней конверсии (3') и колебательной релаксации (2). Поскольку состояние S_1 отделено от основного состояния S_0 значительным энергетическим интервалом, данный переход затруднен (характерное время процесса 10^{-9} — 10^{-8} с);

2) излучательный переход $S_1 \rightarrow S_0$ (процесс 5), называемый *флуоресценцией*. При этом молекула возвращается на некоторый колебательный подуровень (не обязательно нулевой) основного состояния;

3) передача энергии некоторой невозбужденной частице Q в результате столкновения:



При этом молекула A возвращается в основное электронное состояние S_0 без испускания кванта света, а частица Q переходит в электронно-возбужденное состояние Q^* или остается в основном электронном состоянии, распределяя избыток энергии по внутренним (колебательным) степеням свободы. Данный процесс является одной из причин *тушения люминесценции*;

4) переход электрона с нижнего колебательного подуровня состояния S_1 на равный по энергии колебательный подуровень три-

плетного состояния T_1 — *интеркомбинационная конверсия* (процесс 4). В дальнейшем вследствие колебательной релаксации (2) молекула переходит на нулевой колебательный подуровень состояния T_1 .

Пути дальнейшего превращения молекулы, находящейся в состоянии T_1 , также могут быть различными:

1) фотохимическая реакция с образованием некоторых продуктов (не обязательно протекает с нулевого колебательного подуровня состояния T_1);

2) безызлучательный переход $T_1 \rightarrow S_0$ за счет интеркомбинационной конверсии (4') и колебательной релаксации (2);

3) безызлучательный переход в результате столкновения:



4) излучательный переход $T_1 \rightarrow S_0$ (процесс б), называемый *фосфоресценцией*.

Обсудим более подробно происхождение спектров флуоресценции и фосфоресценции. Рассмотрим зависимость потенциальной энергии (E) двухатомной молекулы (для простоты) от межатомного расстояния (r). На рис. 4.4, а изображены кривые потенциальной энергии и колебательные подуровни основного (S_0) и первого возбужденного (S_1) синглетных состояний двухатомной молекулы. Равновесное межъядерное расстояние молекулы в возбужденном состоянии выше, чем в основном состоянии, поэтому минимумы кривых потенциальных энергий в основном и возбужденном состоянии сдвинуты. Поглощение молекулой кванта света с переходом в состояние S_1 происходит за 10^{-15} с, в то время как характерное время движения ядер при колебании составляет 10^{-13} с. Поэтому при поглощении кванта света ядра не успевают существенно изменить свое положение. В этом состоит *принцип Франка — Кондона*: наиболее вероятным будет такой электронный переход, при котором не произойдет изменений ни в межъядерном расстоянии, ни в импульсе (принцип вертикальности перехода). При таком переходе молекула попадает на возбужденный колебательный подуровень состояния S_1 . Затем в результате быстрой внутренней релаксации молекула «спускается» на нулевой колебательный подуровень состояния S_1 , откуда за время 10^{-10} — 10^{-7} с и происходит испускание кванта света (флуоресценция). Этот переход в соответствии с принципом Франка — Кондона также происходит вертикально, в результате чего молекула попадает на возбужденный колебательный подуровень состояния S_0 . Таким образом, фотоны испускаемого излучения (флуоресценции) обладают меньшей энергией ($h\nu_{\text{фл}}$) и, следовательно, большей длиной волны, чем фотоны возбуждающего излучения.

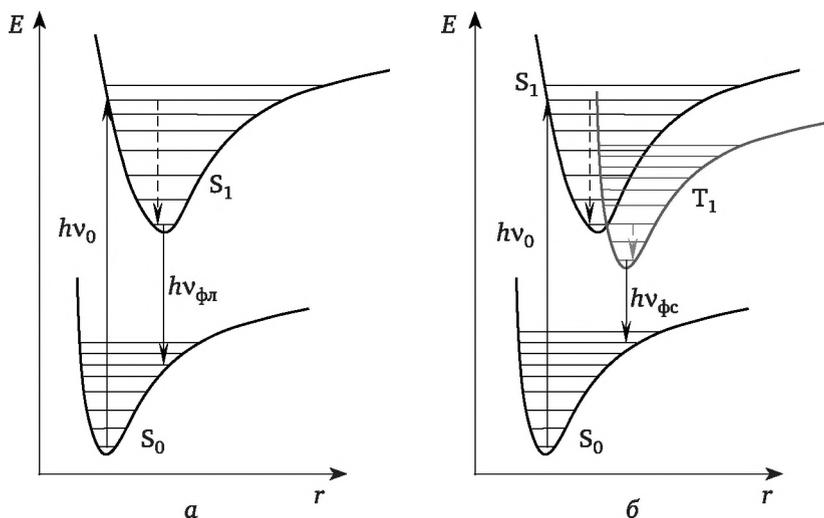


Рис. 4.4. Процессы поглощения излучения с последующей флуоресценцией (а) и фосфоресценцией (б) для двухатомной молекулы

В соответствии с правилом Хунда триплетные возбужденные состояния имеют меньшую энергию по сравнению с соответствующими синглетными. Для двухатомной молекулы потенциальные кривые для состояний S_1 и T_1 могут пересекаться таким образом, что энергия нулевого колебательного подуровня состояния S_1 будет близка энергии некоторого колебательного подуровня состояния T_1 (рис. 4.4, б). В этом случае может произойти переход между этими подуровнями (интеркомбинационная конверсия) с последующей колебательной релаксацией на нулевой колебательный подуровень состояния T_1 . Интеркомбинационная конверсия $S_1 \rightarrow T_1$ происходит за время 10^{-9} — 10^{-7} с и может конкурировать с флуоресценцией, подавляя ее. Интеркомбинационная конверсия $T_1 \rightarrow S_0$ происходит в 10^6 — 10^9 раз медленнее, а излучательный переход $T_1 \rightarrow S_0$ (фосфоресценция) запрещен по спине, поэтому время жизни молекулы в состоянии T_1 может быть довольно значительным (10^{-4} — 10^2 с). В течение этого времени экспериментально может наблюдаться фосфоресценция образца. Излучательный переход при фосфоресценции происходит вертикально, поэтому фотоны, испускаемые при фосфоресценции, обладают меньшей энергией ($h\nu_{\text{фс}}$) по сравнению с флуоресценцией в аналогичных условиях ($h\nu_{\text{фл}}$), и спектр фосфоресценции наблюдается при больших длинах волн, чем спектр флуоресценции.

Таким образом, одним из способов отдачи энергии при переходе из возбужденного состояния в основное является испускание кванта света люминесценции. Чаще всего таким фотоэлектроном сложных органических молекул является π -электрон, участвующий в обра-

зовании делокализованных двойных сопряженных связей молекулы. Сами переходы с поглощением и испусканием света в системе π -электронов представляют переходы типа $\pi - \pi^*$ и $\pi^* - \pi$ между основным и возбужденным состоянием.

4.2.2. Параметры и основные законы люминесценции

Главными параметрами люминесценции (флуоресценции) являются время жизни молекулы в возбужденном состоянии, квантовый и энергетический выходы, спектр люминесценции, спектр возбуждения люминесценции.

Время жизни молекулы в возбужденном состоянии S_1 (τ) определяется суммарной скоростью процессов ее дезактивации:

$$\tau = 1/(k_{\text{фл}} + k_{\text{в.к.}} + k_{\text{и.к.}} + k_{\text{Q}}[Q]),$$

где $k_{\text{фл}}$ — константа скорости флуоресценции; $k_{\text{в.к.}}$ — константа скорости внутренней конверсии; $k_{\text{и.к.}}$ — константа скорости интеркомбинационной конверсии; k_{Q} — константа скорости бимолекулярных столкновений с тушителем люминесценции Q.

Величина τ определяет время, за которое после выключения источника возбуждения интенсивность флуоресценции уменьшится в e раз.

Квантовый выход (φ) — это отношение количества квантов, испускаемых при флуоресценции ($N_{\text{фл}}$) к количеству поглощенных квантов (N_0):

$$\varphi = N_{\text{фл}}/N_0.$$

Если бы все переходы из возбужденного состояния в основное сопровождалось излучением, то квантовый выход был бы равен единице. В реальности он ниже единицы за счет потерь (безизлучательных переходов — внутренней и интеркомбинационной конверсии, тушения и пр.). С константами скорости элементарных процессов квантовый выход флуоресценции связан соотношением:

$$\varphi = k_{\text{фл}}/(k_{\text{фл}} + k_{\text{в.к.}} + k_{\text{и.к.}} + k_{\text{Q}}[Q]).$$

Определить квантовый выход можно по методу Паркера — Рисса. В одинаковых условиях снимается спектр неизвестного вещества и эталона с известным квантовым выходом (φ_0):

$$\varphi = \frac{\varphi_0 S A_0}{S_0 A},$$

где A_0 , A — абсорбции эталона и исследуемого вещества; S_0 , S — площади под кривыми флуоресценции эталона и исследуемого вещества, соответственно. В качестве эталона используют флуоресцеин в растворе NaCl (0,1 M).

В соответствии с *законом Вавилова* квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света, так как испускание квантов света происходит всегда с первого возбужденного энергетического уровня (S_1).

Энергетический выход (ϕ) — это отношение энергии квантов, испускаемых при флуоресценции ($E_{\text{фл}}$) к энергии поглощенных квантов (E_0):

$$B_{\text{эн}} = \frac{E_{\text{фл}}}{E_0} = \frac{N_{\text{фл}} h \nu_{\text{фл}}}{N_0 h \nu_0} = \phi \frac{\nu_{\text{фл}}}{\nu_0} = \phi \frac{\lambda_0}{\lambda_{\text{фл}}}.$$

Поскольку $\nu_{\text{фл}} < \nu_0$, то энергетический выход флуоресценции всегда ниже квантового. Энергетический выход с ростом длины волны возбуждающего света (λ_0) сначала растет пропорционально длине волны возбуждающего ее света, а после некоторой граничной длины волны резко падает вниз. Граничная длина волны соответствует минимальной энергии светового кванта, способного вызвать переход $S_0 \rightarrow S_1$.

Спектр флуоресценции — зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны испускаемых квантов. Форма спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света, так как испускание квантов света происходит всегда с уровня S_1 (*правило Каши*).

В соответствии с *законом Стокса* спектр флуоресценции расположен в более длинноволновой области, чем самый длинноволновый максимум в спектре поглощения. На рис. 4.5 схематично представлено расположение спектров поглощения, флуоресценции и фосфоресценции одного вещества. Спектр флуоресценции (2) сдвинут в длинноволновую область по сравнению со спектром поглощения (1), так как энергия поглощенного кванта частично растрачивается в ходе колебательной релаксации. Спектр фосфоресценции (3) при этом находится в еще более длинноволновой области, поскольку частота фотонов, испускаемых при фосфоресценции, ниже, чем при флуоресценции (см. рис. 4.4).

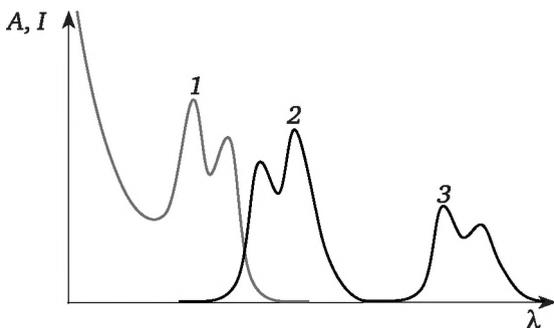


Рис. 4.5. Относительное расположение спектров поглощения (1), флуоресценции (2) и фосфоресценции (3) вещества

Спектр люминесценции является индивидуальным для каждого люминесцирующего вещества, поэтому спектры могут быть использованы для качественного люминесцентного анализа.

Спектром возбуждения флуоресценции называется зависимость интенсивности флуоресценции (при выбранной длине волны) от длины волны возбуждающего света:

$$I_{\text{фл}} / I_0 = f(\lambda_0),$$

где $I_{\text{фл}}$ — интенсивность флуоресценции; I_0 — интенсивность падающего (возбуждающего) света; λ_0 — длина волны возбуждающего света.

Измерение спектров возбуждения флуоресценции имеет большое значение для решения целого ряда задач. Так, спектр возбуждения дает возможность установить спектр поглощения компонента, который флуоресцирует в исследуемой спектральной области, что позволяет идентифицировать этот компонент. Сравнительное изучение спектров возбуждения и флуоресценции позволяет обнаружить миграцию энергии возбуждения между различными компонентами в сложных системах. Так, если в двухкомпонентных системах флуоресцирует только один компонент, а в спектре возбуждения этой флуоресценции зарегистрированы полосы, соответствующие поглощению обоих компонентов, это означает, что в данной системе происходит миграция энергии с одного компонента на другой.

В основе количественного люминесцентного анализа лежит линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции $I_{\text{фл}}$ и концентрацией вещества: $I_{\text{фл}} = kC$. Как правило, применяют метод градуировочного графика. Указанная зависимость соблюдается при концентрациях 10^{-7} — 10^{-4} М. При более высоких концентрациях наблюдаются отклонения от линейности, вызванные самопоглощением — анализируемое вещество поглощает фотоны, ранее испущенные при люминесценции (*концентрационное тушение*). На интенсивность люминесценции оказывают влияние и другие факторы, приводящие к уменьшению квантового выхода люминесценции. Так, с повышением температуры увеличивается вероятность столкновений возбужденной молекулы с другими молекулами, приводящих к безызлучательной деактивации (*температурное тушение*). В присутствии посторонних веществ возможны процессы *внешнего тушения*. Наиболее распространенные тушители люминесценции — парамагнитные ионы и молекулы (O_2 , Mn^{2+}), стимулирующие процессы интеркомбинационной конверсии, катионы и анионы «тяжелых» элементов (I^- , Vg^- , Cs^+ и др.), а также молекулы растворителя.

4.2.3. Практическое применение люминесцентной спектроскопии

Спектры люминесценции, как и абсорбционные электронные спектры, применяются для качественного и количественного ана-

лиза, в структурных исследованиях, для изучения электронно-колебательных состояний молекул, физико-химических свойств растворов, газообразных, жидких и твердых образцов.

Измерение люминесценции проводят на спектрофлуориметрах. Блок-схема спектрофлуориметра представлена на рис. 4.6. Для возбуждения люминесценции используется УФ-излучение, источником которого служат газоразрядные лампы, чаще всего ртутно-кварцевые и ксеноновые. Измерение люминесцентного излучения чаще всего проводят под прямым углом к падающему лучу света, поэтому кюветы должны быть прозрачны во всех направлениях. Для возможности регистрации спектров возбуждения и спектров флуоресценции спектрофлуориметр имеет два монохроматора. Приемником излучения является фотомножитель.

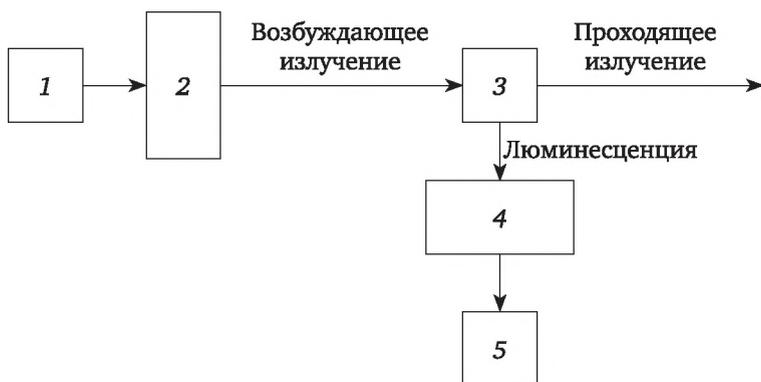


Рис. 4.6. Блок-схема спектрофлуориметра:

1 — источник излучения; 2 — монохроматор для возбуждающего излучения; 3 — кювета с образцом; 4 — монохроматор для люминесценции; 5 — фотоприемник

Если квантовый выход люминесценции больше 1 %, то такие соединения легко обнаруживаются люминесцентным методом. Когда мы имеем дело с сильно люминесцирующим веществом, то флуоресцентный анализ оказывается в 10^2 — 10^4 раз чувствительнее спектрофотометрического. Высокая чувствительность люминесцентных методов анализа обусловлена линейной зависимостью интенсивности флуоресценции от интенсивности возбуждающего излучения (используя источник света большей интенсивности, можно повысить чувствительность метода), в то время как абсорбция раствора не зависит от интенсивности падающего света.

Кроме того, этот флуоресцентный метод анализа более селективен, поскольку флуоресцирует меньшее число соединений, чем поглощает. В связи с высокой чувствительностью химический люминесцентный анализ широко используется в различных областях промышленности, включая химическую и нефтехимическую, в био-

логии, медицине, геологии, в пищевой промышленности, сельскохозяйственном производстве, дефектоскопии, археологии, криминалистике и т. д.

Вследствие высокой чувствительности метода, а также процессов концентрационного тушения, его можно использовать только для очень разбавленных растворов, концентрация которых гораздо ниже, чем при измерении абсорбции раствора.

Регистрацию спектров осуществляют по собственной флуоресценции или с помощью флуоресцентных зондов или меток, вводимых в изучаемую макромолекулу. Различают *флуоресцентные зонды-красители*, которые связываются с макромолекулами нековалентно (электростатическими и ван-дер-ваальсовыми силами), и *флуоресцентные метки*, связанные химической связью. Измерение спектров флуоресценции таких присоединенных меток и зондов особенно важно при изучении свойств нуклеиновых кислот, вследствие малой интенсивности собственной флуоресценции.

К флуоресценции в видимой области способны в основном два класса веществ: 1) большое число минералов и неорганические твердые люминофоры; 2) органические и металлоорганические соединения, обладающие интенсивным поглощением в УФ-области.

Контрольные вопросы

1. Каковы физические основы эмиссионной спектроскопии?
2. На чем основан качественный спектральный анализ?
3. От чего зависит интенсивность спектральных линий?
4. Дайте общую характеристику метода фотометрии пламени. Какие основные приемы работы используются в методе фотометрии пламени? Какие достоинства и недостатки имеет этот метод?
5. Опишите принципиальную схему пламенного фотометра.
6. Что такое люминесценция, каковы ее разновидности?
7. В чем состоят теоретические основы люминесцентного метода анализа?
8. Что такое синглетные и триплетные состояния? Что такое внутренняя и интеркомбинационная конверсии?
9. Что такое флуоресценция и фосфоресценция?
10. В чем состоит принцип Франка — Кондона?
11. Дайте определение квантового выхода.
12. В чем суть законов поглощения света, используемых для объяснения люминесценции: законов Стокса и Вавилова, правила Каша?
13. Каково применение люминесцентного метода анализа? Как выполняются качественный и количественный анализ этим методом?

Тема 5

ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Спектроскопия магнитного резонанса отличается от других видов спектроскопии тем, что расщепление энергетических уровней осуществляется только в присутствии магнитного поля. Взаимодействие можно наблюдать, помещая образец одновременно в два магнитных поля — одно постоянное, другое радиочастотное (переменное). При определенном сочетании полей образец поглощает (или выделяет) энергию, что приводит к изменению сигнала на выходе высокочастотного усилителя и детектора.

К резонансным методам спектроскопии относятся ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Спектры ЯМР и ЭПР дают богатую структурную информацию, что делает их незаменимыми в химии, биологии, медицине.

Открытие ЯМР имеет весьма длинную и захватывающе интересную предысторию. Представления о том, что электрон и атомные ядра имеют собственные магнитные моменты, было введено в физику В. Паули (Нобелевская премия по физике в 1945 г.). Отто Штерн вместе с Вальтером Герлахом экспериментально подтвердили это в опытах с атомными и молекулярными пучками. Отто Штерн был удостоен Нобелевской премии по физике в 1943 г. с формулировкой: «за вклад в развитие метода молекулярных пучков, открытие и измерение магнитного момента протона». И. Раби активно и успешно развивал это направление. Он впервые наблюдал явление ЯМР в молекулярных пучках и получил Нобелевскую премию по физике в 1944 г. «за резонансный метод записи магнитных свойств атомных ядер». Нобелевская премия по физике в 1952 г. была присуждена двум американцам Феликсу Блоху (Стенфордский университет) и Эдварду Перселлу (Гарвардский университет) «за развитие новых методов для точных ядерных магнитных измерений и связанные с этим открытия».

5.1. Теоретические основы метода

Как известно, атомы состоят из атомных ядер и электронных оболочек. Ядра, в свою очередь, состоят из нуклонов (протонов и нейтронов) и обладают *собственным моментом импульса* \vec{p} , ве-

личина которого связана с полным спиновым квантовым числом I ядра соотношением:

$$|\vec{p}| = \hbar\sqrt{I(I+1)}.$$

Величину I упрощенно называют *спином ядра*. Ядро, являющееся заряженной частицей, при наличии собственного момента импульса \vec{p} обладает и *магнитным моментом* $\vec{\mu}$, определяемым соотношением:

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{p},$$

где γ — *гиромагнитное отношение*, являющееся индивидуальной характеристикой ядра.

Таким образом, ядра, обладающие ненулевым спином I , обладают и магнитным моментом. Собственный момент импульса ядра определяется как векторная сумма орбитальных моментов импульса и собственных моментов импульса (спинов) нуклонов, т. е. спин ядра связан с орбитальными и спиновыми квантовыми числами нуклонов. Экспериментально установлены закономерности связи спина ядра с числом протонов и нейтронов в ядре.

1. Ядра, имеющие четную массу, а также четное число протонов и нейтронов (*четно-четные ядра*), имеют нулевой спин. Такие ядра (например, ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S) не имеют магнитного момента и не могут быть исследованы методом ЯМР.

2. Ядра, имеющие нечетную массу, т. е. нечетное число протонов или нейтронов (*нечетно-четные ядра*), имеют полуцелый спин, который может принимать значения $I = 1/2$ (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P), $3/2$ (^7Li , ^{11}B), $5/2$ (^{17}O) и т. д.

3. Ядра, имеющие четную массу, а также нечетное число протонов и нейтронов (*нечетно-нечетные ядра*), имеют целый спин. Примерами являются ядра дейтерия ^2H и ^{14}N ($I = 1$), ^{10}B ($I = 3$).

Наиболее важными для спектроскопии ЯМР являются ядра с $I = 1/2$. Рассмотрим поведение таких ядер во внешнем магнитном поле. Пусть вектор напряженности магнитного поля \vec{B}_0 направлен вдоль оси z . Ядра ориентируются таким образом, что вектор магнитного момента $\vec{\mu}$ составляет с \vec{B}_0 некоторый угол θ (рис. 5.1, а). Проекция вектора $\vec{\mu}$ на ось z равна $\gamma\hbar m$, где m — магнитное квантовое число, которое может принимать значения $I \div -I$ с шагом 1. Для ядер с $I = 1/2$ возможны значения $m = 1/2, -1/2$. Энергия ядер в магнитном поле изменяется на величину

$$E = -\vec{\mu}\vec{B}_0 = -\gamma\hbar m B_0.$$

Ядра, у которых направление проекции вектора $\vec{\mu}$ совпадает с \vec{B}_0 , понижают свою энергию в магнитном поле, в то время как при противоположной направленности происходит повышение энергии.

В результате для ядер с $I = 1/2$ в магнитном поле происходит расщепление энергетического уровня на два подуровня, энергии которых отличаются на $\Delta E = \gamma \hbar B_0 = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi}$ (рис. 5.1, б). При воздействии на систему электромагнитного (радиоволнового) излучения с энергией кванта $h\nu_0 = \Delta E$ становятся возможными резонансные переходы с верхнего уровня на нижний и наоборот, сопровождающиеся изменением ориентации магнитных моментов ядер. Для этого на образец накладывают переменное поле \vec{B}_1 , перпендикулярное \vec{B}_0 ($B_1 \ll B_0$), частота которого (резонансная частота) равна:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}. \quad (5.1)$$

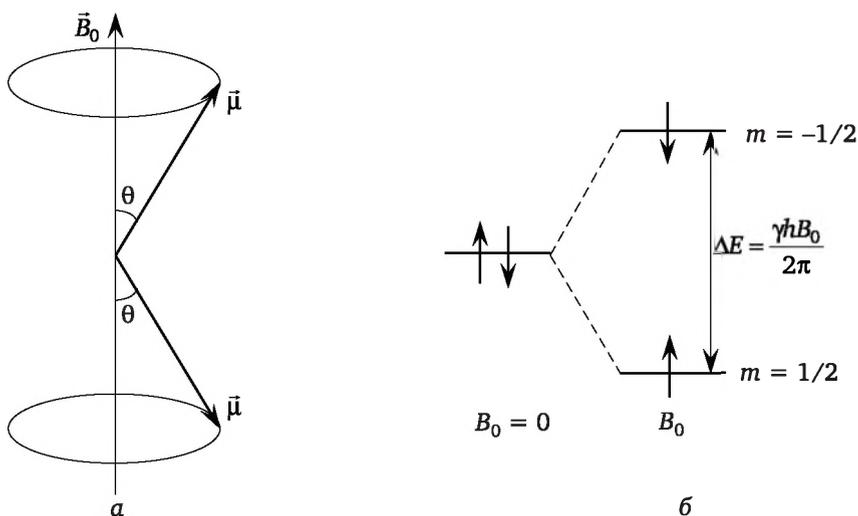


Рис. 5.1. Взаимодействие магнитного момента ядра с внешним магнитным полем (а) и уровни энергии ядер в магнитном поле (б)

В соответствии с распределением Больцмана на нижнем уровне имеется некоторый избыток ядер, определяемый из соотношения $\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)$. Для современного спектрометра ЯМР с рабочей частотой 500 МГц при 300 К данное отношение составляет 1,000080, т. е. избыток ядер на нижнем уровне составляет всего 0,008 %. При наложении внешнего переменного поля происходит выравнивание заселенностей двух подуровней (насыщение), сопровождающееся поглощением электромагнитной энергии. Таким образом, ядерный магнитный резонанс — явление поглощения электромагнитной энергии ядрами с ненулевым спином во внешнем магнитном поле, обусловленное переориентацией магнитных моментов ядер. Данное поглощение (резонансный сигнал) регистрируется спектроме-

тром ЯМР. Разница заселенностей уровней возрастает с ростом ν_0 (и, соответственно, B_0), при этом увеличивается чувствительность метода ЯМР.

Одним из распространенных ядер, сигналы которого применяются в методе ЯМР, является ядро водорода ^1H (протон). Данное ядро имеет самый высокий магнитный момент среди всех других ядер. Именно величина магнитного момента определяет интенсивность сигнала при одном и том же магнитном поле. Кроме того, естественное содержание ^1H в природе составляет почти 100 % (в отличие от ядер других атомов, способных к проявлению эффекта ЯМР). В настоящей главе рассматривается, в основном, ЯМР-спектроскопия на ядрах ^1H . Иногда данный метод называют спектроскопией протонного магнитного резонанса (ПМР).

5.2. Химический сдвиг

Согласно уравнению (5.1), резонансный сдвиг протона должен иметь только одну характеристическую частоту для заданной напряженности поля. Однако в действительности резонансный сигнал протона наблюдается при разных частотах, в зависимости от того, в каком химическом окружении он находится. Сдвиг резонансных сигналов обусловлен тем, что ядра водорода в органических молекулах окружены электронами. Под действием магнитного поля \vec{B}_0 электроны совершают вращательное движение в плоскости, перпендикулярной вектору \vec{B}_0 . При этом индуцируется локальное магнитное поле $\vec{B}_{\text{лок}} = -\sigma\vec{B}_0$, вектор которого направлен противоположно \vec{B}_0 . В результате на ядро действует эффективное поле $\vec{B}_{\text{эфф}} = \vec{B}_0 - \sigma\vec{B}_0 = \vec{B}_0(1 - \sigma)$. Таким образом, электроны экранируют ядро от внешнего магнитного поля, уменьшая его напряженность. Величину σ называют *константой экранирования*. В результате этого условие ядерного магнитного резонанса выражается не уравнением (5.1), а уравнением (5.2):

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0(1 - \sigma)}{2\pi}. \quad (5.2)$$

Вследствие различий в электронном окружении протонов в молекуле каждому типу протона будет отвечать своя резонансная частота ν_0 , поэтому для различных протонов в спектре ЯМР присутствуют отдельные сигналы. В принципе, положение сигналов отдельных протонов можно характеризовать константами экранирования, однако экспериментально определить их невозможно. Кроме того, резонансные частоты, как видно из уравнения (5.2), зависят от величины B_0 , что затрудняет сравнение результатов, полученных на различных спектрометрах.

Более удобной характеристикой положения резонансного сигнала является *химический сдвиг*, который определяется как разность резонансных частот протона в исследуемом образце $\nu_{\text{обр}}$ и стандарта $\nu_{\text{ст}}$, деленная на рабочую частоту прибора ν_0 . Поскольку при этом получаются очень малые величины, то для удобства их умножают на 10^6 . Полученная единица измерения называется миллионная доля (м.д.). Также химический сдвиг может определяться через соответствующие напряженности магнитного поля при фиксированной частоте.

$$\delta = \frac{\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{ст}}}{\nu_0} \cdot 10^6 = \frac{B_{\text{обр}} - B_{\text{ст}}}{B_0} \cdot 10^6.$$

Химические сдвиги, выраженные в м.д., не зависят от условий регистрации спектра. В качестве стандартов используют тетраметилсилан (ТМС) или гексаметилдисилоксан (ГМДС), которые удобны тем, что дают узкие и сильные резонансные сигналы в области, где поглощают только очень немногие виды протонов. Вводимый в раствор вещества эталон должен обладать низкой реакционной способностью, хорошей растворимостью и давать один четкий сигнал в спектре. Преимуществом тетраметилсилана $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ является положение резонансного сигнала в более сильном поле, чем у подавляющего большинства органических веществ, а также большое количество протонов на единицу массы (12 структурно эквивалентных сильно экранированных протонов), что позволяет использовать эталон в минимальных количествах.

В протонном магнитном резонансе применяются две шкалы химических сдвигов: δ и τ . В шкале δ за ноль принимается сигнал ТМС и химические сдвиги увеличиваются в сторону слабого поля, т. е. в сторону уменьшения степени экранирования данного протона. В реже используемой шкале τ сигнал ТМС принят за 10: $\tau = 10 - \delta$. Значение химических сдвигов при этом увеличивается в сторону сильного поля.

Спектр ЯМР представляет собой зависимость интенсивности поглощения от величины δ . Обычно спектр выглядит как набор узких резонансных сигналов, соответствующих отдельным типам протонов. Большое значение имеет также интенсивность сигналов (площадь под сигналом), так как поглощение энергии при данной частоте пропорционально числу протонов, для которых при этой частоте наблюдается явление резонанса. Это позволяет установить, сколько протонов образуют каждый сигнал. Таким образом, спектр ЯМР позволяет определить количество неэквивалентных типов протонов и число протонов данного типа. Для определения интенсивности сигналов современные приборы автоматически производят интегрирование спектров, выдавая интегральную кривую, в которой площади пиков преобразуются в линейные отрезки.

Рассмотрим в качестве примера спектр ЯМР ^1H уксусной кислоты (рис. 5.2). В спектре уксусной кислоты соотношение длин отрезков, соответствующих площади сигналов при $\delta = 2,0$ и $\delta = 11,5$ м.д., составляет 3:1. Это указывает на число атомов водорода: три эквивалентных протона метильной группы и один протон карбоксильной группы, сильно различающиеся по химическому сдвигу.

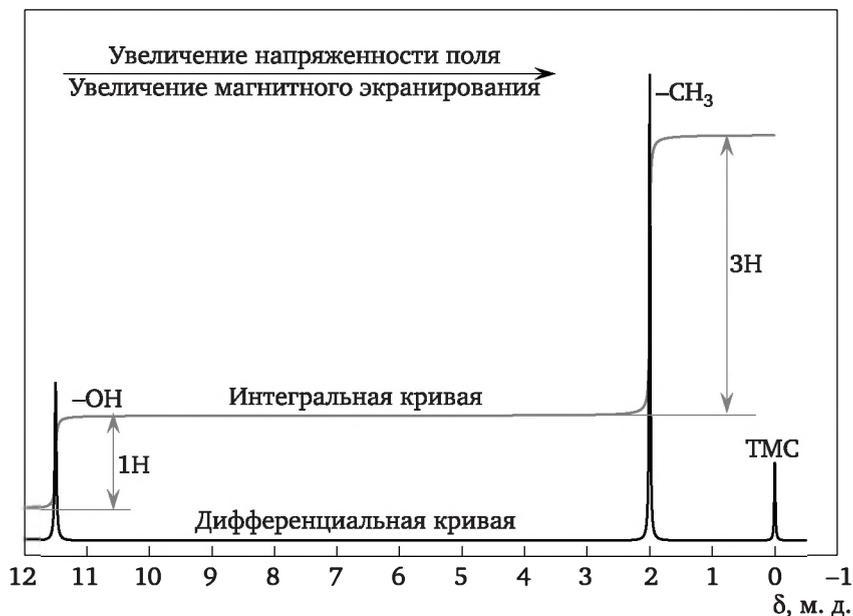


Рис. 5.2. Спектр ^1H уксусной кислоты

При наличии эквивалентных протонов у разных углеродных атомов им будет соответствовать единый сигнал. Например, в ЯМР ^1H спектре бензола присутствует всего один сигнал, поскольку все протоны в молекуле эквивалентны.

Химический сдвиг является основной характеристикой спектра ЯМР и зависит от структуры молекулы. Типичные значения химических сдвигов протонов в различных группах представлены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Химические сдвиги протонов в различных группах

Группа	δ , м.д.	Группа	δ , м.д.
C-H (алканы)	0,8—1,6	RC(O)OH (кислоты)	10—13
>C=CH- (алкены)	4,5—7,0	RC(O)NH ₂ (амиды)	7—8
-C≡CH (алкины)	2,5—3,0	>C=CR-CH ₃ (алкены)	1,6—1,9
Ar-H (арены)	7—9	Ar-CH ₃ (алкиларены)	2,2—2,5

Группа	δ , м.д.	Группа	δ , м.д.
Ar-OH (фенолы)	6—8	RO-CH ₃ (простые эфиры)	3,2—4,0
R-OH (спирты)	3—6	>N-CH ₃ (амины)	2,2—2,6
R-NH ₂ (амины)	2—4	RC(O)-CH ₃ (кетоны)	2,0—2,5
RC(O)H (альдегиды)	9—11	RC(O)O-CH ₃ (сложные эфиры)	3,6—4,1

На величину химического сдвига влияют электронная плотность у протона, а также вторичные магнитные поля, возникающие в результате циркуляции электронов в соседних атомах и связях. Оба фактора непосредственно связаны со структурой молекулы. Электронная плотность у протонов определяется характером химической связи и индуктивными эффектами окружающих групп, вследствие чего экранирование протонов будет различным и их сигналы появятся в разных областях спектра. Чем выше электронная плотность, тем сильнее экранирование, и, следовательно, тем в более сильном поле проявится резонансный сигнал.

В качестве примера сравним величины химических сдвигов протонов в углеводородах у различных атомов углерода:

Фрагмент	CH ₄	-CH ₃	-CH ₂ -	-CH<
δ , м.д.	0,23	0,9	1,3	1,5

Появление алкильных групп приводит к смещению электронной плотности с атома водорода, вызывая снижение экранирования и смещение сигнала в область слабого поля.

Электроноакцепторные заместители еще сильнее стягивают на себя электронную плотность, что приводит к значительному смещению сигнала в область слабого поля. С увеличением электроотрицательности заместителя данный эффект усиливается:

Соединение X-CH ₃	CH ₄	I-CH ₃	Br-CH ₃	NO-CH ₃	F-CH ₃
δ , м.д.	0,23	2,2	2,7	3,5	4,3
Э. О. (X)	2,1	2,5	2,8	3,4	4,0

Химические сдвиги в некоторых молекулах нельзя объяснить только влиянием заместителей на локальную электронную плотность на атоме водорода. На эффект экранирования сильное влияние оказывает магнитная анизотропия молекул. Проиллюстрировать это влияние можно на примере молекулы бензола (рис. 5.3). Под действием внешнего магнитного поля в π -электронных облаках молекулы возникает кольцевой ток (серые сплошные линии), в результате чего индуцируется вторичное магнитное поле, силовые линии которого показаны пунктиром. Направление вектора напряженности данного поля вблизи оси молекулы противоположно вектору \vec{B}_0 , а в области рас-

положения ароматических протонов — совпадает с \vec{B}_0 . Таким образом, возникают области экранирования (+) и дезэкранирования (-). Ароматические протоны расположены в области дезэкранирования, поэтому для них сигнал расположен в значительно более слабом поле (7—9 м.д.), чем для алифатических протонов.

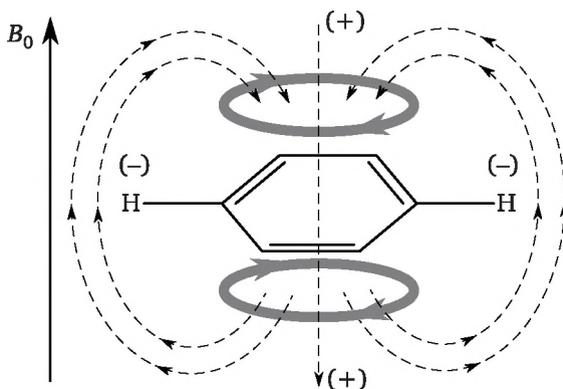


Рис. 5.3. Магнитная анизотропия молекулы бензола

Аналогичные эффекты наблюдаются и для простых кратных связей ($C=C$, $C=O$, $C\equiv C$). Примечательно, что в алкинах протон группы $-C\equiv C-H$ попадает в область экранирования, в результате чего сигнал данного протона расположен в области более сильного поля, чем в алкенах и аренах (см. табл. 5.1).

Химические сдвиги протонов в молекулах достаточно хорошо подчиняются правилу аддитивности, поэтому приближенно могут быть вычислены с помощью инкрементов заместителей. Для алифатических соединений вида $R_1CH(R_2)R_3$ химический сдвиг протона определяется правилом Шулери:

$$\delta = 0,23 + \sum S(\delta),$$

где $S(\delta)$ — инкременты заместителей R, учитывающие индуктивный эффект и магнитную анизотропию групп. Некоторые значения $S(\delta)$ для распространенных заместителей:

Заместитель	$-CH_3$	$-C_6H_5$	$-OH$	$-Cl$	$-C(O)R$	$-C(O)OR$	$-OC(O)R$
$S(\delta)$, м.д.	0,47	1,85	2,56	2,53	1,70	1,55	3,13

Аналогичные соотношения выведены для замещенных алкенов:

$$\delta = 5,28 + \sum S(\delta),$$

и протонов в бензольном кольце:

$$\delta = 7,27 + \sum S(\delta).$$

В последнем случае $S(\delta)$ определяется не только природой заместителя, но и его положением в бензольном кольце.

Химический сдвиг протона зависит также и от внешних факторов: растворителя, концентрации и температуры образца. Наиболее сильно эта зависимость прослеживается для протонов групп $-\text{OH}$, $>\text{NH}$, $-\text{SH}$ и обусловлена образованием водородных связей. При образовании таких связей происходит уменьшение электронной плотности на протоне и, как следствие, значительное (до 3—5 м.д.) смещение сигнала в область слабого поля. Если прочность водородных связей невысока, то в растворе устанавливается равновесие между ассоциатами и свободными молекулами, и в спектре ЯМР регистрируется усредненный уширенный сигнал. При изменении концентрации образца в растворе или температуры происходит смещение равновесия и изменение положения сигнала. На образование водородных связей влияет также природа растворителя. Так, в ЯМР-спектре метанола химический сдвиг протона OH -группы составляет 1,67 (растворитель CDCl_3) и 4,08 (растворитель DMSO-d_6). В первом случае в разбавленном растворе в малополярном хлороформе молекулы метанола присутствуют преимущественно в недиссоциированной форме, в то время как в DMSO-d_6 они образуют прочные водородные связи с растворителем, что приводит к смещению сигнала в область слабого поля.

5.3. Спин-спиновое взаимодействие

Влияние на магнитное экранирование ядра спина другого неэквивалентного ядра называется *спин-спиновым взаимодействием*. Это явление приводит к усложнению спектра. Рассмотрим природу этого явления на примере взаимодействия двух неэквивалентных ядер A и X (система AX) со спинами $I = 1/2$, например протонов в фрагменте $>\text{CH}^A-\text{CH}^X<$.

Энергия взаимодействия спинов ядер A и X , векторы которых равны \vec{I}_A и \vec{I}_X , определяется выражением:

$$E = hJ_{AX}\vec{I}_A\vec{I}_X,$$

где J_{AX} — константа спин-спинового взаимодействия, имеющая размерность энергии и выражающаяся в Гц (может принимать положительные и отрицательные значения).

Для системы AX возможны четыре комбинации спинов ядер A и X ($\uparrow\uparrow$, $\uparrow\downarrow$, $\downarrow\uparrow$, $\downarrow\downarrow$), энергии которых в магнитном поле (в отсутствии спин-спинового взаимодействия) определяются выражением:

$$E = E_A + E_X = -\gamma\hbar m_A B_0(1 - \sigma_A) - \gamma\hbar m_X B_0(1 - \sigma_X).$$

Наименьшую энергию имеет система $\uparrow\uparrow$, в которой проекции ядерных спинов параллельны \vec{B}_0 , наибольшую — система $\downarrow\downarrow$ (рис. 5.4). При наличии спин-спинового взаимодействия (например, $J_{AX} > 0$) энергии данных систем изменяются на величину $\pm hJ_{AX}/4$ (увеличиваются для параллельных спинов ядер и уменьшаются для антипараллельных). В результате энергии переходов A_1 и A_2 , отвечающих переориентации спина ядра А, отличаются от энергии перехода А в отсутствие спин-спинового взаимодействия на величину $\pm hJ_{AX}/2$, поэтому в спектре ЯМР сигнал, соответствующий ядру А представляет собой дублет сигналов, частоты которых отличаются на величину J_{AX} . Аналогичный эффект наблюдается и для ядер X.

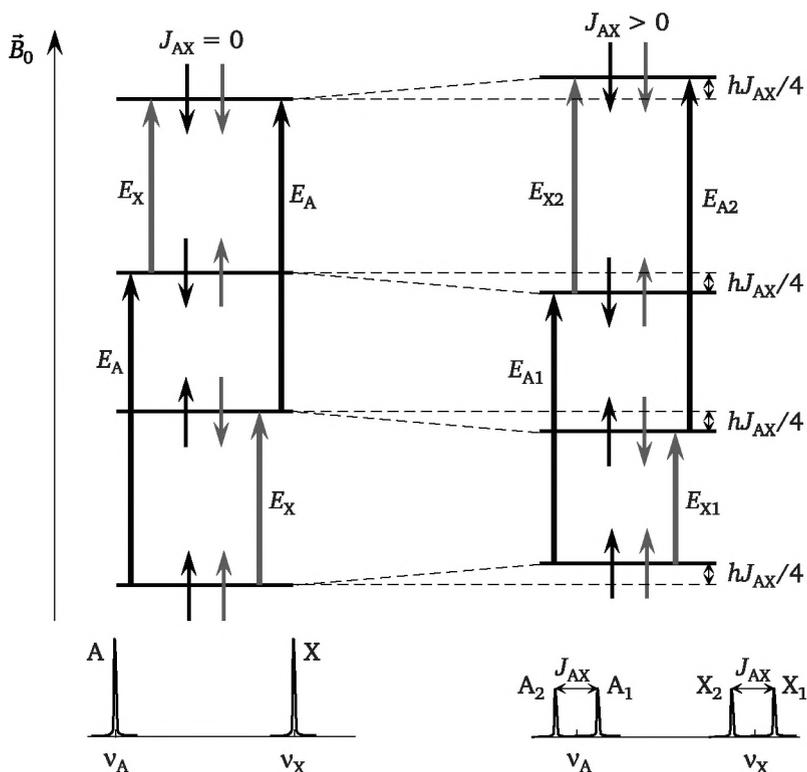


Рис. 5.4. Спин-спиновое взаимодействие в системе AX:

черным цветом показаны спины и переходы для ядра А, серым — для ядра X

Таким образом, два различных спиновых состояния ядра X влияют в результате спин-спинового взаимодействия на локальное магнитное поле ядра А, что приводит к расщеплению сигнала ядра А на две компоненты.

Если рассмотреть взаимодействие протона А с двумя эквивалентными протонами X (система AX₂, например >CH-CH₂-), то на ло-

кальное магнитное поле ядра А влияют одновременно спины двух ядер Х. Они могут образовывать три комбинации ($\uparrow\uparrow$, $\uparrow\downarrow$, $\downarrow\downarrow$), причем вероятность образования второй в два раза выше, чем первой и третьей, поскольку она может получаться двумя разными способами. В результате сигнал протона А распадается на три компоненты (триплет) с соотношением интенсивностей 1 : 2 : 1. Сигнал протонов Х при этом по-прежнему представляет собой дублет, обусловленный взаимодействием со спином одного ядра А.

Таким образом, если данный протон взаимодействует с n эквивалентными протонами, находящимися у соседних углеродных атомов, то его резонансный сигнал состоит из $M = n + 1$ компонент. Данное число называется *мультиплетностью* сигнала. В общем случае при взаимодействии ядра А с n ядрами Х, имеющими спин I_X , мультиплетность сигнала определяется соотношением $M = 2nI_X + 1$.

Эквивалентные протоны не обязательно должны находиться у одного соседнего углеродного атома. Например, в молекуле 2-хлорпропана $\text{ClCH}(\text{CH}_3)_2$ обе метильные группы, а, следовательно, и протоны в них, эквивалентны и образуют систему вида AX_6 .

Соотношение интегральных интенсивностей сигналов в мультиплетах определяется биномиальными коэффициентами разложения $(a + b)^M$, которые наглядно можно представить в виде треугольника Паскаля (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Распределение интегральных интенсивностей линий

Вид сигнала	Число линий (мультиплетность)	Распределение интенсивностей
Синглет	1	1
Дублет	2	1 : 1
Триплет	3	1 : 2 : 1
Квартет (квадруплет)	4	1 : 3 : 3 : 1
Квинтет	5	1 : 4 : 6 : 4 : 1
Секстет	6	1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1
Септет	7	1 : 6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1

В реальных спектрах сигналы высокой мультиплетности наблюдать сложно, так как интенсивность их крайних компонент находится на уровне шума. Например, в упомянутой выше молекуле $\text{ClCH}(\text{CH}_3)_2$ (система AX_6) центральному протону соответствует септет. Общая интенсивность этого септета в соответствии с количеством протонов в молекуле составляет 1/6 от общей интенсивности дублета групп CH_3 , соответственно интенсивность крайних компонент равна

$$\frac{1}{6} \cdot \frac{1}{1+6+15+20+15+6+1} = \frac{1}{6} \cdot \frac{1}{64} = \frac{1}{384}$$

от общей интенсивности дублета, или 1/192 (~ 0,5 %) от интенсивности каждой из компонент дублета. Поэтому вместо септета может наблюдаться квинтет с соотношением интенсивностей 6 : 15 : 20 : 15 : 6. Он существенно отличается от истинного квинтета соотношением интенсивностей, особенно крайних компонент.

Следует подчеркнуть, что расстояние между соседними сигналами в мультиплете равно константе спин-спинового взаимодействия J , которая определяется в Гц и не зависит от рабочей частоты спектрометра. Это расстояние в м.д. определяется отношением J/ν_0 . Константы спин-спинового взаимодействия для протонов меняются по абсолютной величине от нуля до нескольких десятков Гц, а для тяжелых элементов — до нескольких тысяч Гц. Константы спин-спинового взаимодействия в спектрах ЯМР ^1H используются для идентификации соединений, для определения положения заместителя, наряду с химическим сдвигом.

Спин-спиновое взаимодействие проявляется только между неэквивалентными ядрами. Например, в метиленовой группе CH_2 оба протона эквивалентны, и спин-спиновое взаимодействие между ними не наблюдается. Исключением являются метиленовые группы в алкенах ($=\text{CH}_2$, $J = 2 \div 3$ Гц) и малых циклах, в которых невозможны внутренние вращения. Спин-спиновое взаимодействие в насыщенных фрагментах передается по системе σ -связей через 3 связи (HCCN , $J = 6 \div 9$ Гц), в ненасыщенных фрагментах — по системе π -связей через 4 (реже 5) связи. Наличие гетероатома в цепочке может препятствовать спин-спиновому взаимодействию. В алкенах значение J зависит от взаимного положения протонов относительно двойной связи ($J_{\text{дис}} = 8 \div 12$ Гц, $J_{\text{транс}} = 10 \div 18$ Гц), а в ароматах — от взаимного положения протонов в бензольном кольце ($J_{\text{орто}} = 6,5 \div 9$ Гц, $J_{\text{мета}} = 1 \div 3$ Гц, $J_{\text{пара}} = 0,3 \div 0,8$ Гц). Можно считать, что спин-спиновое взаимодействие протонов в пара-положении пренебрежимо мало.

В простейших случаях по мультиплетности сигнала в спектре ЯМР ^1H можно определить число протонов при соседних углеродных атомах. Следовательно, спин-спиновое взаимодействие дает дополнительную ценную информацию о строении исследуемого вещества. Если протон при соседнем углеродном атоме отсутствует (например, уксусная кислота), то спин-спиновое взаимодействие не проявляется. В спектре (см. рис. 5.2) присутствует одиночный сигнал (синглет).

При наличии соседних протонов наблюдается расщепление сигналов. Химические сдвиги протонов при наличии спин-спинового расщепления определяются расстоянием от центра мультиплета

до сигнала эталона. Например, в соединении $\text{Cl}_2\text{CH}-\text{CH}_2\text{Cl}$ (система AX_2) присутствует два типа протонов (а и б). В спектре (рис. 5.5) сигнал эквивалентных протонов метиленовой группы а расщепляется на две компоненты практически равной интенсивности — дублет ($\delta = 3,96$ м.д.), поскольку у соседнего углеродного атома присутствует один протон (б). Сигнал от протона б представляет собой триплет ($\delta = 5,76$ м.д.) с соотношением интенсивностей 1 : 2 : 1. Общая интегральная интенсивность дублета (а) и триплета (б) относятся друг к другу как 2 : 1 в соответствии с количеством протонов каждого типа. Константа спин-спинового взаимодействия $J = 6,06$ Гц попадает в диапазон характерных значений для фрагмента $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$ ($J = 6 \div 9$).

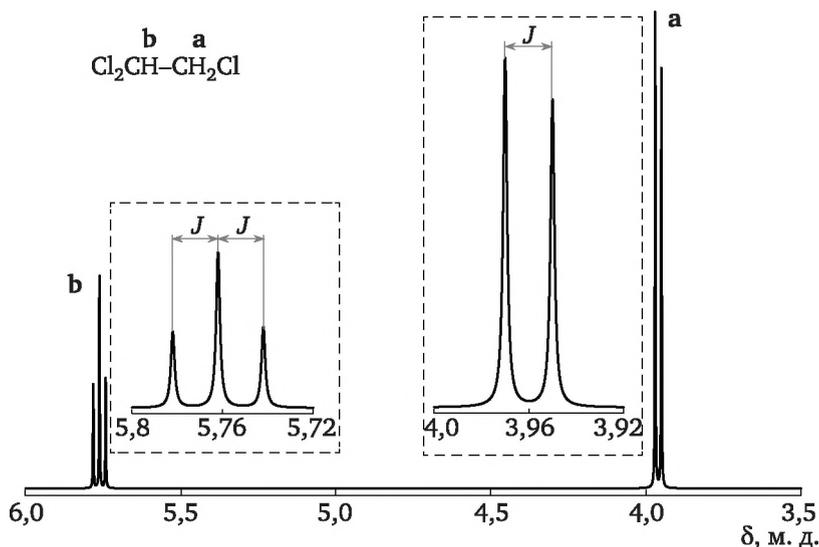


Рис. 5.5. Спектр ЯМР ^1H 1,1,2-трихлорэтана (в CDCl_3 , 300 МГц)

Рассмотренный спектр можно представить текстовой записью:

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д., (J , Гц): 3.96 (2H, д, $J = 6.06$, CH_2Cl), 5.76 (1H, т, $J = 6.06$, CHCl_2).

Для каждого сигнала указывают химический сдвиг в м.д., а в скобках — число протонов (определенное по интегральной интенсивности), тип мультиплета (синглет, дублет, триплет, квартет или мультиплет — указывают первой буквой), константу спин-спинового взаимодействия в Гц и группу в молекуле, к которой отнесен данный сигнал.

В спектре на рис. 5.5 разность между центрами мультиплетов $\Delta\delta$ (1,8 м.д.) значительно превышает расстояние между соседними сигналами в мультиплете J/ν_0 ($6,06/300 = 0,0202$ м.д.), поэтому

мультиплеты находятся в разных частях спектра и не накладываются друг на друга. Однако возможны случаи, когда разность между химическими сдвигами $\Delta\delta$ сопоставима по порядку величины с J/ν_0 . Мультиплеты ядер двух типов можно считать хорошо разделенными, когда выполняется условие $\Delta\delta\nu_0/J > 6 \div 10$. Такие ядра обозначают буквами из разных частей латинского алфавита, например АХ — система из ядер двух типов, АМХ — система из ядер трех типов. Ядра, для которых $\Delta\delta\nu_0/J < 6$, обозначают последовательными буквами алфавита, например АВ или АВС. Теоретические расчеты показывают, что при сближении двух дублетов интенсивности крайних компонент будут уменьшаться, а центральных возрастать. Это проявляется в ЯМР-спектрах как «эффект крыши» (рис. 5.6). Для данного спектра $\Delta\delta = 0,151$ м.д., $J = 8,7$ Гц, $\Delta\delta\nu_0/J = 6,9$. При еще большем сближении мультиплетов отдельные компоненты могут накладываться друг на друга, что затрудняет идентификацию спектра (системы вида АВ). Очевидно, что наилучшее разделение мультиплетов будет происходить на спектрометрах с наибольшими рабочими частотами ν_0 .

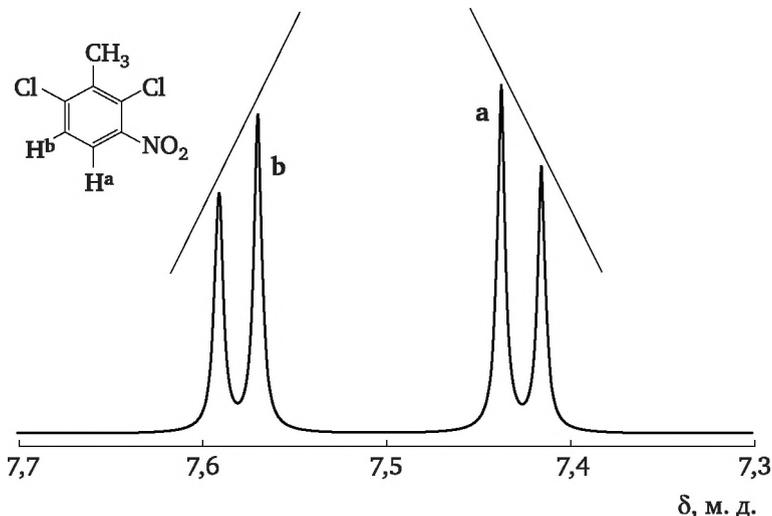


Рис. 5.6. Фрагмент спектра ЯМР ^1H 3-нитро-2,6-дихлортолуола (в CDCl_3 , 400 МГц)

В случаях, когда группа ядер связана спин-спиновым взаимодействием с несколькими различными группами ядер, то мультиплетность ее сигнала определяется как произведение мультиплетностей от каждой соседней группы. Например, в системе вида АМХ в результате спин-спинового взаимодействия протона М с протонами А и Х возникает кватреть (дублет дублетов). Примером такой системы является 1,2,4-триметоксибензол (рис. 5.7). Протон *b* связан сильным спин-спиновым взаимодействием с протоном *a* в орто-положении ($J_{ab} = 8,6$ Гц) и более слабым взаимодействием с протоном *c* в мета-положении ($J_{ac} = 2,8$ Гц). В результате в сигнале протона

В каждой из компонент дублета с J_{ab} расщепляется на дублет с J_{ac} . Спин-спиновое взаимодействие протонов а и с, находящихся по отношению друг к другу в пара-положении, пренебрежимо мало, поэтому каждый из них взаимодействует только с протоном b и характеризуется дублетным сигналом с соответствующими значениями J .

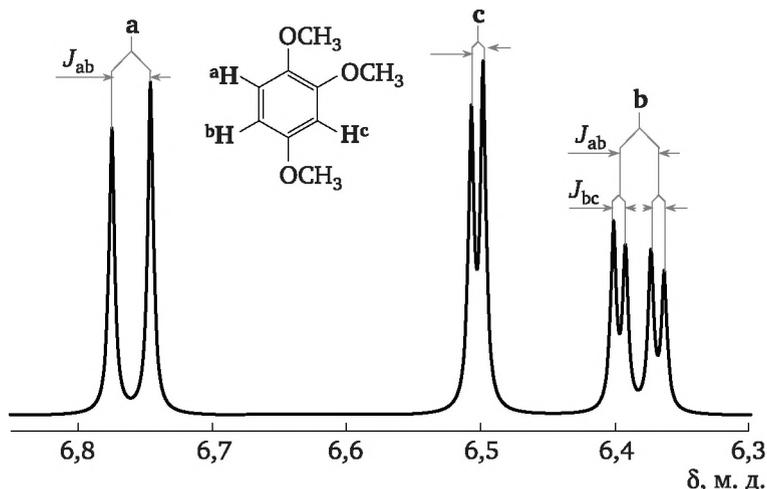


Рис. 5.7. Фрагмент спектра ЯМР ^1H 1,2,4-триметоксибензола (в CDCl_3 , 300 МГц)

В зависимости от числа соседних протонов (1 или 2) в орто- и мета-положениях по отношению к конкретному протону в бензольном кольце его сигнал наблюдается в виде комбинаций дублетов и триплетов, схематично представленных на рис. 5.8. Три из этих комбинаций присутствуют в рассмотренном выше спектре (рис. 5.7).

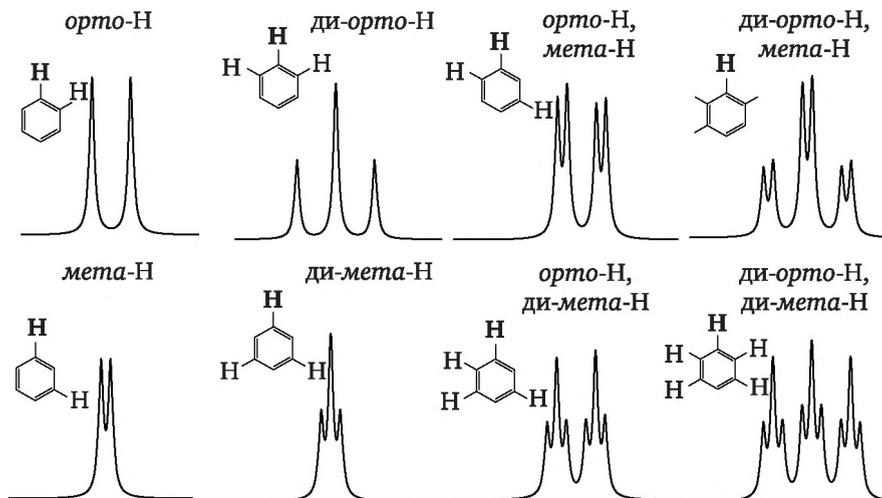


Рис. 5.8. Типичные спин-спиновые мультиплеты ароматических протонов

В частном случае при равенстве констант спин-спинового взаимодействия с различными группами ядер происходит наложение компонент друг на друга, в результате чего получается сигнал меньшей мультиплетности. Например, в спектре 1-хлорпропана протонам **b** центральной группы CH_2 соответствует не мультиплет из $(3 + 1) \cdot (2 + 1) = 12$ компонент, а секстет (рис. 5.9). Каждая из компонент квартета (обусловлен взаимодействием с тремя протонами **a**) с соотношением интенсивностей $1 : 3 : 3 : 1$ расщепляется на триплет (обусловлен взаимодействием с двумя протонами **c**) с соотношением интенсивностей $1 : 2 : 1$. Соотношение интенсивностей компонент в результирующем секстете можно получить путем сложения интенсивностей компонент триплетов в квартете (см. рис. 5.9). Как видно, оно не отличается от представленного в табл. 5.2. Фактически вследствие равенства $J_{ab} = J_{bc}$ три протона **a** и два протона **c**, несмотря на химическую неэквивалентность, образуют по отношению к протонам **b** единую систему вида AX_5 .

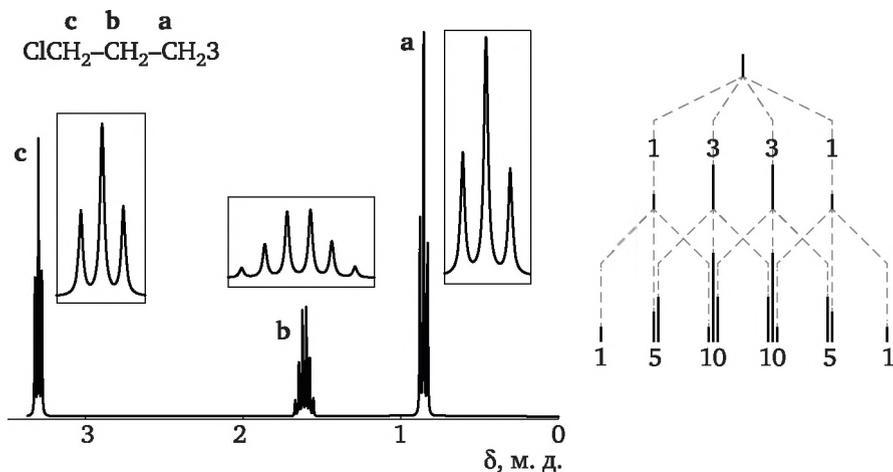


Рис. 5.9. Спектр ЯМР ^1H 1-хлорпропана (300 МГц) и схема образования секстета

Таким образом, анализ спектра ЯМР ^1H дает пять основных аналитических критериев:

- 1) общее число сигналов (число типов неэквивалентных протонов);
- 2) интенсивность сигналов (число протонов каждого данного типа);
- 3) химический сдвиг (положение протона в молекуле);
- 4) мультиплетность сигнала (число протонов при соседних углеродных атомах);
- 5) константы спин-спинового взаимодействия (особенности расположения протонов в пространстве: *цис*-, *транс*-изомеры; *орто*-, *мета*-, *пара*-замещение в ароматическом кольце).

По данным критериям производится расшифровка спектров ЯМР, в результате которой в большинстве случаев можно однозначно установить строение молекулы. Поэтому спектроскопия ЯМР является одним из наиболее информативных физико-химических методов исследования структуры веществ, используемых в настоящее время.

5.4. Регистрация спектров ЯМР

В ЯМР-спектроскопии на исследуемое вещество действуют одновременно два магнитных поля — одно постоянное, а другое — радиочастотное. Образец помещают в датчик спектрометра между полюсными наконечниками магнита (рис. 5.10).

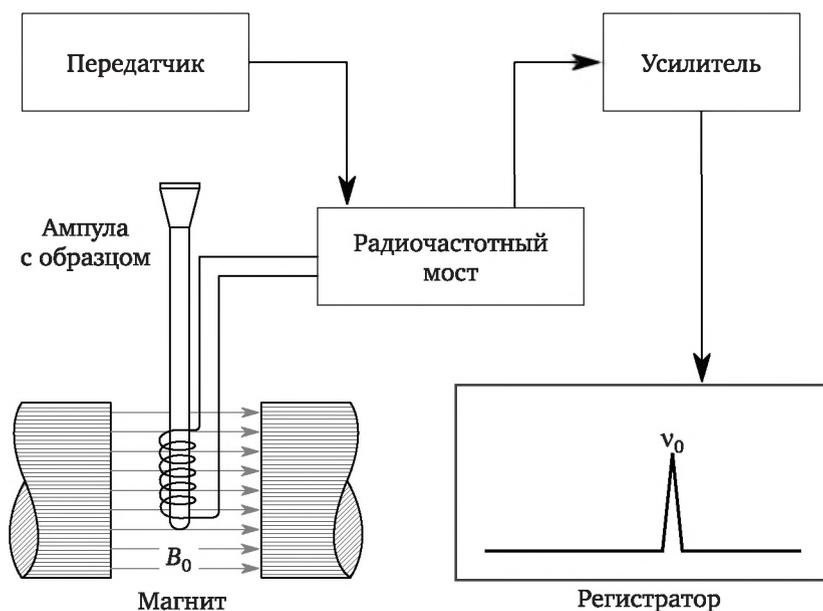


Рис. 5.10. Принципиальная схема ЯМР-спектрометра

Магнит вызывает расщепление энергетических уровней магнитных ядер, т. е. создает необходимые условия для поглощения радиочастотного излучения. Радиочастотный генератор возбуждает переменное магнитное поле, перпендикулярное к постоянному полю. При определенном соотношении этих полей наступает резонансное поглощение энергии, которое регистрируется радиочастотным детектором. Условия резонанса можно достичь либо изменением напряженности постоянного магнитного поля, либо изменением частоты генератора. На практике используется первый принцип. Постепенно изменяя напряженность магнитного поля, регистриру-

ют резонансный сигнал. Так работают спектрометры с *непрерывной разверткой*.

В последние годы все шире используются импульсные спектрометры ЯМР с *преобразованием Фурье*. В этом случае образец облучают коротким мощным радиочастотным импульсом. При этом происходит резонанс одновременно на всех возможных частотах в образце. Из полученного сигнала с использованием преобразования Фурье выделяют сигналы отдельных резонансных частот. Преимуществом данного метода является высокая скорость работы (малое время записи спектра), а также более высокое отношение сигнал/шум (бóльшая чувствительность) по сравнению со спектрометрами с непрерывной разверткой.

Основной характеристикой спектрометра ЯМР является его рабочая частота. Если несколько десятилетий назад рабочие частоты спектрометров составляли 60—100 МГц, то для современных спектрометров типичны значения 400, 500, 600 МГц, а у наиболее совершенных приборов — до 900—1000 МГц. С увеличением частоты повышается чувствительность метода, а также степень разделения близко расположенных мультиплетов.

Твердые вещества анализируют методом ЯМР, как правило, растворяя в подходящем растворителе. Растворители для ЯМР ^1H -спектроскопии не должны содержать протонов, подходящими являются четыреххлористый углерод (CCl_4), сероуглерод (CS_2) или дейтерированные растворители. Для неполярных соединений почти всегда можно использовать CCl_4 , а для полярных соединений подходит хлороформ. В принципе, возможно использование и обычного хлороформа CHCl_3 , однако его сигнал ($\delta = 7,23$ м.д.) попадает в область сигналов ароматических протонов. Поэтому лучше использовать дейтерированный хлороформ CDCl_3 во избежание возможного наложения сигналов. Если продукт не растворяется в хлороформе, используют другие дейтерированные растворители: диметилсульфоксид- d_6 , ацетон- d_6 , ацетонитрил- d_3 , бензол- d_6 и D_2O . Измерения, проводимые в различных растворителях, или с использованием различных стандартов, приводят к одним и тем же результатам, если отсутствуют специфические взаимодействия между растворителем и стандартом или исследуемым продуктом.

Измерение ЯМР ^1H -спектров органических соединений, полученных на приборах без накопителей сигналов, проводится для растворов достаточно высокой концентрации (5—20 %). Исследуемый продукт растворяют в растворителе и помещают в ампулу. В качестве стандарта выбирают тетраметилсилан (ТМС) или гексаметилдисилоксан (ГМДС), в некоторых случаях могут использоваться циклогексан, метиленхлорид или бензол (когда в исследуемом веществе сигнал перекрывается с сигналом ТМС). Стандарт может быть внутренним (непосредственно добавляется в анализируемый

раствор) или внешним, когда стандарт находится в коаксиальном капилляре, расположенном внутри исследуемого образца.

Влияние на качество спектров, а именно на наблюдаемую ширину и релаксационные свойства образца, оказывает вязкость растворителя. Можно разделить растворители для ЯМР спектроскопии на вязкие (бензол, ДМФА, ДМСО, пиридин, толуол и вода) и невязкие (ацетон, ацетонитрил, хлороформ, хлористый метилен и метанол). Достаточно высокое разрешение можно получить только в невязких растворителях, например, в ацетоне.

Качественные спектры регистрируют только на веществах, свободных от твердых частиц и от взвешенной пыли, поэтому необходимо проводить фильтрование растворов образца непосредственно при их переносе в ампулу.

5.5. Разновидности спектроскопии ЯМР

В предыдущих разделах мы рассмотрели основы спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , поскольку данный метод является самым распространенным и применяемым из всех видов спектроскопии ЯМР. Но метод ЯМР не исчерпывается только резонансом на ядрах ^1H .

Спектроскопия на ядрах углерода ^{13}C . Метод широко используется для исследования органических соединений. Чувствительность в этом случае невысока (в 5800 раз ниже, чем для ^1H), так как содержание изотопа ^{13}C в природном углероде составляет лишь 1,1 %, а магнитный момент ядра в 4 раза ниже, чем у ядра ^1H . Поэтому для записи спектра ^{13}C необходимо проводить накопление сигнала, что требует дополнительного времени, а также использовать большее количество анализируемого образца.

В спектроскопии ЯМР ^{13}C также установлены закономерности влияния структуры молекулы на химический сдвиг ядер углерода, существуют таблицы химических сдвигов в различных функциональных группах. Диапазон химических сдвигов в спектрах ЯМР ^{13}C существенно выше, чем в спектрах ЯМР ^1H , и составляет 0—250 м.д. Это объясняется большим количеством электронов в атоме углерода, в результате чего сильнее проявляются эффекты экранирования.

Спин-спиновое взаимодействие между различными ядрами ^{13}C практически не проявляется в силу малой распространенности данного изотопа: если вероятность встретить изотоп ^{13}C в определенной области молекулы равна 1,1 %, т. е. порядка 10^{-2} , то вероятность нахождения в молекуле рядом двух ядер ^{13}C составляет 10^{-4} . С другой стороны, ядра ^{13}C связаны прямым спин-спиновым взаимодействием с протонами. В результате сигнал группы CH в спектре ЯМР ^{13}C проявляется в виде дублета, а группы CH_3 — в виде квартета. С одной стороны, это упрощает расшифровку спектра.

Но в случае большого количества атомов углерода в молекуле данные мультиплеты могут накладываться друг на друга, усложняя спектр. Поэтому иногда при регистрации спектра особым образом подавляют спин-спиновое взаимодействие с протонами, в результате чего каждому ядру ^{13}C соответствует узкий синглет.

Спектроскопия на других типах ядер. Наиболее всего подходят для регистрации спектров ЯМР ядра ^{19}F и ^{31}P ($I = 1/2$, единственные природные изотопы своих элементов, высокие гиромагнитные отношения, как следствие — высокая чувствительность метода). ЯМР на ядрах ^{31}P имеет определенное значение для анализа биомолекул, прежде всего, нуклеиновых кислот. Константы спин-спинового взаимодействия ^1H — ^{31}P невелики, поэтому спектры получаются неосложненными. В то же время константы спин-спинового взаимодействия ^1H — C — ^{19}F и ^1H — C — C — ^{19}F довольно значительны. Это нужно учитывать не только в спектроскопии на ядрах ^{19}F , но и при анализе спектров ЯМР ^1H фторсодержащих соединений.

Двумерная спектроскопия ЯМР. Спины ядер в молекуле взаимодействуют друг с другом, пример таких взаимодействий рассмотрен в параграфе 5.3. При резонансе одного ядра на частоте ν_1 может изменяться интенсивность резонансного сигнала второго ядра на частоте ν_2 . Если последовательно облучать исследуемую систему короткими импульсами с частотами ν_1 и ν_2 (последовательно перебирая все возможные их комбинации), то регистрируемые сигналы свидетельствуют о спин-спиновых взаимодействиях (корреляциях) ядер в изучаемой молекуле. Взаимодействия могут наблюдаться между ядрами одного (например, ^1H — ^1H) и разных (например, ^1H — ^{13}C) типов, химически связанных между собой посредством цепочки из 1—4 связей или просто находящихся в непосредственной близости друг от друга. В соответствии с этим существуют различные разновидности двумерной спектроскопии ЯМР.

1. Гомоядерные межсвязные методы позволяют устанавливать корреляции между ядрами ^1H , разделенными тремя связями $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$ (метод COSY) или большим количеством связей (метод TOCSY).

2. Гетероядерные межсвязные методы позволяют устанавливать корреляции между ядрами разных типов (например, ^1H и ^{13}C), разделенными одной (метод HSQC) или несколькими связями (метод HMQC).

3. Методы спектроскопии с ядерным эффектом Оверхаузера (NOESY) позволяют устанавливать корреляции между ядрами в молекуле, близко расположенными друг к другу ($< 5 \text{ \AA}$), при этом не имеет значения число связей между соответствующими атомами. NOESY-спектроскопия может быть гомо- и гетероядерной.

На осях двумерного спектра ЯМР откладывают химические сдвиги и располагают простые одномерные спектры. Резонансные сигналы представляют в виде областей, размер которых соответствует

интенсивности сигнала, показывающей степень корреляции ядер. В гомоядерных методах интенсивные области с одинаковыми значениями химических сдвигов по абсциссе и ординате (*диагональные пики*) соответствуют обычному резонансу соответствующего ядра, а симметрично расположенные относительно диагонали *кросс-пики* отвечают корреляции соответствующих ядер. В гетероядерных методах диагональные пики в принципе отсутствуют. На рис. 5.11 представлены схематичные примеры двумерных ЯМР спектров аспирина. В COSY-спектроскопии кросс-пики соответствуют взаимодействию вицинальных протонов (в *орто*-положении по отношению друг к другу), в рассматриваемой молекуле это корреляции протонов в положениях 3/4, 4/5, 5/6. В NOESY-спектрах эти пики также присутствуют вследствие близкого пространственного расположения *орто*-протонов. Кроме того, присутствуют слабые пики, отвечающие корреляции *мета*-протонов 3/5 и 4/6 (но не *пара*-протонов), а также пик, отвечающий корреляции протона 3 с протонами метильной группы (лежит вне арильной области — не показан на рис. 5.11).

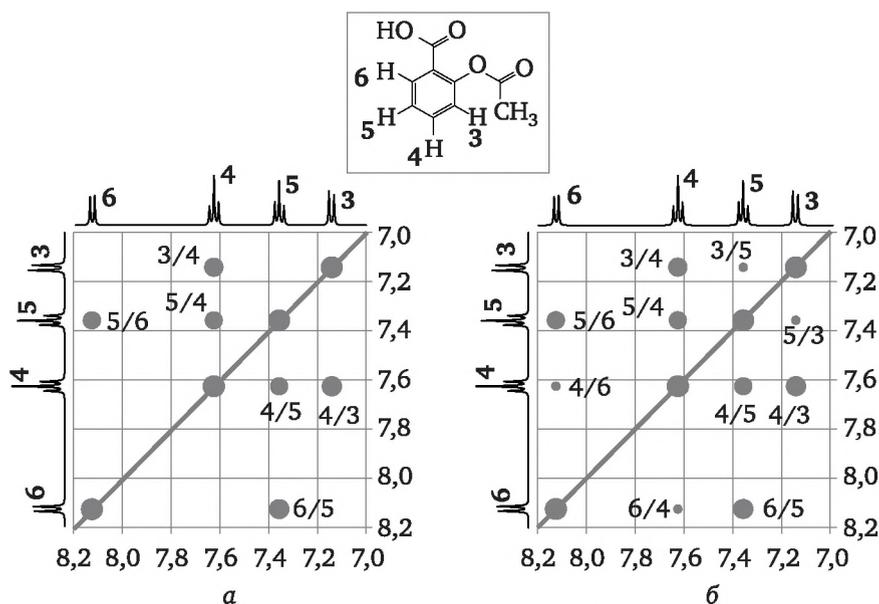


Рис. 5.11. Схематичный вид COSY (а) и NOESY (б) спектров аспирина (арильная область)

Двумерная ЯМР-спектроскопия является информативным методом, позволяющим однозначно устанавливать взаимное расположение атомов в молекуле. Информация из NOESY-спектров о взаимном расположении химически несвязанных атомов полезна при установлении конформаций молекул, в частности вторичной и третичной структуры белков.

5.6. Применение метода ЯМР

Качественный анализ. Вскоре после открытия явления ЯМР в конденсированных средах стало ясно, что ЯМР будет основой мощного метода исследования строения вещества и его свойств. Действительно, исследуя спектры ЯМР, мы используем в качестве резонирующей систему ядер, чрезвычайно чувствительных к магнитному окружению. Локальные же магнитные поля вблизи резонирующего ядра зависят от внутри- и межмолекулярных эффектов, что и определяет ценность этого вида спектроскопии для исследования строения и поведения молекулярных систем.

В настоящее время трудно указать такую область естественных наук, где бы в той или иной степени не использовался ЯМР. Методы спектроскопии ЯМР широко применяются в химии, молекулярной физике, биологии, агрономии, медицине, при изучении природных образований (слюд, янтаря, полудрагоценных камней, горючих минералов и другого минерального сырья), то есть в таких научных направлениях, где исследуются строение вещества, его молекулярная структура, характер химических связей, межмолекулярные взаимодействия и различные формы внутреннего движения.

Количественный анализ. При использовании ЯМР как метода количественного анализа нет необходимости в чистом образце определяемого вещества. Однако используется какое-либо индивидуальное вещество в качестве внутреннего стандарта.

Применение ЯМР в биологии и медицине. В настоящее время получены спектры ЯМР многих белков; метод ЯМР используется для наблюдения за структурными изменениями, сопровождающими функционирование белков. Также метод ЯМР широко используется для изучения состояния воды в разнообразных биологических объектах.

В ЯМР-спектрометрах магнитное поле стараются сделать как можно более однородным, это нужно для улучшения спектрального разрешения. Но если магнитное поле внутри образца, наоборот, сделать очень неоднородным, это открывает принципиально новые возможности для использования ЯМР. Неоднородность поля создается так называемыми градиентными катушками, которые работают в паре с основным магнитом. В этом случае величина магнитного поля в разных частях образца будет разная, а это значит, что сигнал ЯМР можно наблюдать не от всего образца, как в обычном спектрометре, а только от его узкого слоя, для которого соблюдаются резонансные условия, т. е. нужное соотношение магнитного поля и частоты. Меняя величину магнитного поля, можно менять слой, который будет давать сигнал. Таким образом, можно «просканировать» образец по всему объему и «увидеть» его внутреннюю трехмерную структуру, не разрушая образец каким-либо механи-

ческим способом. К настоящему времени разработано большое число методик, позволяющих измерять различные параметры ЯМР (спектральные характеристики, времена магнитной релаксации, скорость самодиффузии и некоторые другие) с пространственным разрешением внутри образца.

Самое интересное и важное, с практической точки зрения, применение ЯМР-томографии нашлось в медицине. В этом случае исследуемым «образцом» является человеческое тело. ЯМР-томография является одним из самых эффективных и безопасных (но также и дорогих) диагностических средств в различных областях медицины.

Контрольные вопросы

1. Что такое спины и магнитные моменты ядер?
2. Какова природа явления ядерного магнитного резонанса?
3. Что такое электронное экранирование? Что такое химический сдвиг?
4. Опишите влияние на химический сдвиг следующих факторов: индуктивный эффект, магнитная анизотропия, температура, концентрация образца, растворитель.
5. Что такое спин-спиновое взаимодействие, мультиплетность сигналов, константы спин-спинового взаимодействия?
6. Как химическое окружение влияет на форму резонансного сигнала?
7. Какие аналитические критерии используются при расшифровке ЯМР-спектров?
8. Опишите схему спектрометра ЯМР. Какие способы используются для записи ЯМР-спектров?
9. Какие эталонные вещества и растворители применяются в спектроскопии ЯМР?
10. Каковы особенности спектроскопии ЯМР на ядрах разных типов?
11. Что такое двумерная спектроскопия ЯМР?
12. Опишите применение метода ЯМР.

Тема 6

ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Теория магнитного резонанса применима не только к ядрам, но и электронам, поскольку они также имеют спин и магнитный момент. Явление электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было открыто в 1944 г. Е. К. Завойским в Казани. Спектроскопия ЭПР является основным методом исследования парамагнитных частиц, к которым относятся: свободные радикалы, ион-радикалы, молекулы с нечетным числом электронов, триплетные состояния органических молекул, парамагнитные ионы переходных металлов и их комплексы.

6.1. Теоретические основы метода

Электрон в атоме обладает орбитальным моментом импульса \vec{p}_l (обусловлен движением электрона вокруг ядра) и собственным моментом импульса (спином) \vec{p}_s , которые связаны с соответствующими квантовыми числами l и s соотношениями:

$$|\vec{p}_l| = \hbar\sqrt{l(l+1)}; |\vec{p}_s| = \hbar\sqrt{s(s+1)}.$$

Данным моментам импульса соответствуют магнитные моменты, определяемые соотношениями:

$$\vec{\mu}_l = -\frac{e}{2m_e} \vec{p}_l; \vec{\mu}_s = -\frac{e}{m_e} \vec{p}_s,$$

где e и m_e — заряд и масса электрона. Коэффициент пропорциональности между $\vec{\mu}_s$ и \vec{p}_s (гиромагнитное отношение) в два раза выше, чем между $\vec{\mu}_l$ и \vec{p}_l .

Полный магнитный момент определяется векторной суммой: $\vec{\mu} = \vec{\mu}_l + \vec{\mu}_s$. Поскольку абсолютные значения μ_l и μ_s могут сильно отличаться, то вводят коэффициент пропорциональности (g -фактор), показывающий долю каждого из магнитных моментов в полном магнитном моменте:

$$\vec{\mu} = -g \frac{e}{2m_e} \vec{p},$$

где $\vec{p} = \vec{p}_l + \vec{p}_s$ — полный момент импульса электрона. При $s = 0$ g -фактор равен единице, а при $l = 0$ g -фактор равен двум. В реальности для свободного электрона в силу релятивистских эффектов $g = 2,002319$, т. е. несколько отличается от двух.

В многоэлектронной системе орбитальные и спиновые моменты импульса отдельных электронов складываются, и состояние системы определяется полным орбитальным L и полным спиновым S квантовыми числами:

$$L = \sum l_i; S = \sum S_i.$$

Полный момент импульса частицы складывается из ее спинового и орбитального моментов импульса и определяется квантовым числом $J = L + S$. Для неспаренного электрона в молекулярном радикале вклад орбитального момента незначителен, поскольку орбитали фиксированы в системе молекулярных связей сильными электростатическими взаимодействиями и вырождение по энергии между ними полностью снято. Для упрощения далее будем рассматривать системы с чисто спиновым моментом ($L = 0; J = S$).

Поместим такую систему во внешнее магнитное поле B_0 , направленное вдоль оси z . Проекция вектора $\vec{\mu}$ на ось z равна:

$$\mu_z = -g \frac{e}{2m_e} m_s = -g\beta m_s,$$

где m_s — магнитное спиновое квантовое число, которое может принимать значения $S \div -S$ с шагом 1, β — магнетон Бора ($9,27 \cdot 10^{-24}$ Дж/Тл).

Энергия системы определяется скалярным произведением магнитного момента и вектора напряженности магнитного поля \vec{B}_0 , которое можно найти как произведение проекции магнитного момента на ось z и напряженности поля:

$$E = -\vec{\mu} \vec{B}_0 = -\mu_z B_0 = g\beta m_s B_0.$$

В результате происходит расщепление энергетического уровня на $(2S + 1)$ подуровней, энергии которых отличаются на $\Delta E = g\beta B_0$ (эффект Зеемана). При воздействии на систему электромагнитного радиоволнового излучения с энергией кванта

$$h\nu_0 = \Delta E = g\beta B_0 \quad (6.1)$$

становятся возможными резонансные переходы между уровнями ($\Delta m_s = \pm 1$ в соответствии с правилами отбора). В простейшем случае

для системы с одним неспаренным электроном ($m_s = \pm 1/2$) в магнитном поле происходит расщепление энергетического уровня на два подуровня, между которыми возможны резонансные электроны, сопровождающиеся изменением проекции спина (рис. 6.1). Более низкую энергию имеет состояние, в котором направление проекции спина электрона не совпадает с вектором напряженности магнитного поля. Это обусловлено отрицательным зарядом электрона и, как следствие, отрицательной величиной гиромагнитного отношения.

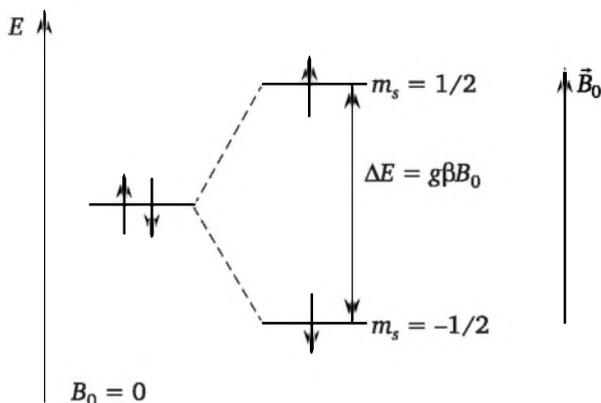


Рис. 6.1. Уровни энергии электронов в магнитном поле

В большинстве современных ЭПР-спектрометров используется рабочая частота 9 ГГц (X-диапазон) или 36 ГГц (Q-диапазон), которым соответствуют значения B_0 (при $g = 2,0023$) 0,33 Тл и 1,3 Тл соответственно. Исторически в методе ЭПР напряженность поля измеряют в Гауссах (Гс, 1 Тл = 10^4 Гс). Например, в X-диапазоне условию резонанса соответствует магнитное поле напряженностью 3300 Гс.

Заселенность нижнего уровня в соответствии с распределением Больцмана чуть выше, чем верхнего (для X-диапазона отношение заселенностей нижнего и верхнего уровней при 300 К составляет 1,0014), поэтому переход с нижнего уровня на верхний будет более вероятен. *Электронный парамагнитный резонанс* — явление поглощения электромагнитной энергии электронами с ненулевым спином во внешнем магнитном поле, обусловленное переориентацией магнитных моментов электронов. Данное поглощение (*резонансный сигнал*) регистрируется спектрометром ЭПР.

В результате резонансных переходов должно наступить выравнивание заселенностей энергетических уровней (*насыщение*), после которого система перестает поглощать энергию. В реальности резонансный сигнал не изменяется с течением времени, поскольку в системе происходят безызлучательные переходы с верхнего уровня на нижний, стремящиеся восстановить больцмановское распределение заселенностей. Такие процессы носят название *релаксации*.

Поглощенная энергия радиоволнового излучения может рассеиваться в виде тепла (*спин-решеточная релаксация*). Среднее время протекания данного процесса обозначают T_1 . Термин «спин-решеточная релаксация» отражает передачу избыточной энергии спиновой системы степеням свободы, связанным с колебаниями кристаллической решетки в твердых телах. В жидкостях энергия передается поступательным и вращательным степеням свободы.

Вследствие неоднородности магнитного поля условию резонанса соответствует только часть спинов системы. Остальные спины не будут поглощать энергию радиоволнового излучения. В то же время, отдельные спины внутри системы могут обмениваться энергией со средним временем процесса T_2 . Этот механизм получил название *спин-спиновой релаксации*. В то время как время спин-решеточной релаксации T_1 сильно увеличивается при уменьшении температуры, время спин-спиновой релаксации T_2 практически не зависит от температуры.

6.2. Параметры спектров ЭПР

Спектр ЭПР представляет зависимость интенсивности поглощения I от напряженности магнитного поля B (рис. 6.2, а). Обычно спектр ЭПР регистрируют и представляют в виде первой производной поглощения от напряженности магнитного поля (рис. 6.2, б). Так как линии ЭПР поглощения достаточно широки, то первая производная дает лучшее представление о характере спектра. Нулевое значение производной соответствует максимуму резонансного поглощения, а максимумы производной отвечают точкам перегиба на кривой резонансного сигнала.

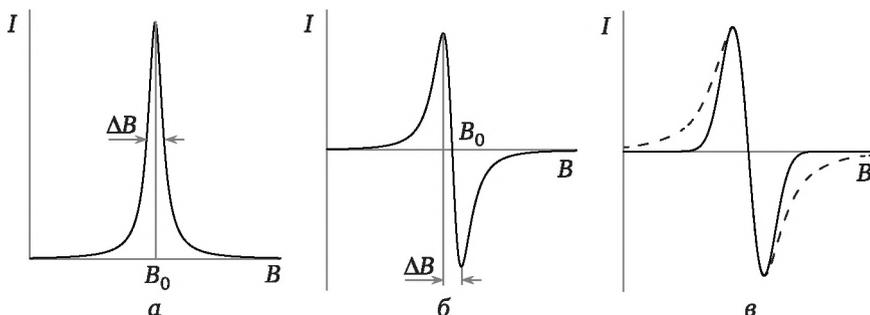


Рис. 6.2. Спектр ЭПР в виде линии поглощения (а) и ее первой производной (б); описание формы линии спектра (в) функциями Гаусса (—) и Лоренца (--).

Основными параметрами спектра ЭПР являются положение линии поглощения, форма линии, ширина линии, интенсивность линии, сверхтонкая структура спектров. Рассмотрим подробнее данные параметры.

Положение линии поглощения (B_0) определяется точкой пересечения производной резонансного сигнала с осью абсцисс (см. рис. 6.2, б). В соответствии с уравнением (6.1) B_0 определяется значением g -фактора. Данная величина вследствие спин-орбитального взаимодействия неспаренного электрона зависит от структуры молекулы и отличается от g -фактора свободного электрона. Характерные значения g -фактора у органических и неорганических радикалов позволяют проводить идентификацию этих частиц. Значение g -фактора определяют относительно стандарта, в качестве которого в спектроскопии ЭПР чаще всего используют стабильный радикал дифенилпикрилгидразил (ДФПГ, $g = 2,0037 \pm 0,0002$).

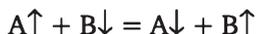
Форма линии спектра ЭПР может быть описана функциями Лоренца или Гаусса (рис. 6.2, в). При отсутствии взаимодействия между частицами (в разбавленных растворах) форма линии спектра ближе к функции Лоренца, а при наличии такого взаимодействия — к функции Гаусса. Чаще всего резонансная кривая имеет форму функции Лоренца в середине и Гаусса — на краях.

Ширина линии спектра ЭПР определяется расстоянием ΔB , измеренным на половине высоты спектрального пика (см. рис. 6.2, а), или расстоянием между максимумами производной (см. рис. 6.2, б). Ширина спектральной линии зависит от времени жизни спинового состояния, которое, в свою очередь, определяется временем релаксации T . В соответствии с принципом неопределенности Гейзенберга $\Delta E \Delta t \geq \hbar$ чем меньше неопределенность времени Δt , тем выше неопределенность энергии состояния ΔE . Если принять, что Δt — это время релаксации T , а $\Delta E = g\beta\Delta B$, то

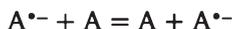
$$\Delta B = \frac{\hbar}{g\beta T}$$

Чем ниже время релаксации, тем выше ширина линии. Основной вклад в ширину спектральной линии вносит механизм релаксации, который имеет меньшее время (T_1 или T_2). Для органических радикалов в растворах, как правило, $T_1 \gg T_2$. Исключительно короткие времена релаксации могут приводить к тому, что спектр ЭПР вообще не обнаруживается — в этом случае ширина линии стремится к бесконечности.

На ширину линии влияют не только процессы релаксации. Например, ориентация спина частицы может измениться при столкновении с другой парамагнитной частицей (спиновой обмен):



Может происходить перенос электрона с анион-радикала на нейтральную молекулу:



В результате подобных процессов уменьшается время жизни спинового состояния, что приводит к уширению линии спектра, а в некоторых случаях — и к исчезновению его сверхтонкой структуры (см. п. 6.3).

Еще один механизм уширения линии спектра — диполь-дипольное взаимодействие. Каждая парамагнитная частица создает вокруг себя локальное магнитное поле. Если две парамагнитные частицы оказываются вблизи друг друга, то каждая из них влияет на напряженность магнитного поля в точке нахождения другой частицы, в результате чего резонанс происходит не при напряженности поля B_0 , а в некотором диапазоне $B_0 \pm \delta B$, т. е. происходит уширение сигнала.

Вероятность процессов спинового обмена и диполь-дипольного взаимодействия возрастает при увеличении количества парамагнитных частиц. Поэтому с ростом концентрации вещества происходит уширение линий в его спектре ЭПР. Также уширение происходит в присутствии парамагнитных примесей, например, кислорода.

Интенсивность линии спектра ЭПР зависит от количества парамагнитных центров. Площадь под кривой резонансного поглощения пропорциональна концентрации парамагнитных частиц в образце. Поскольку спектр ЭПР регистрируют в виде первой производной сигнала, то концентрация парамагнитных частиц пропорциональна двойному интегралу от спектра ЭПР.

Как правило, спектр ЭПР состоит не из одной, а из нескольких линий, т. е. имеет *сверхтонкую структуру* (СТС). Разберем природу этого явления более подробно.

6.3. Сверхтонкая структура спектров ЭПР

Практически в любой частице, которая может изучаться методом ЭПР, присутствуют ядра, обладающие ненулевым спином и магнитным моментом. Примеры таких ядер были рассмотрены в п. 5.1. Явление взаимодействия магнитного момента неспаренного электрона с магнитными моментами ядер называется *сверхтонким взаимодействием* (СТВ). Данное взаимодействие приводит к сверхтонкой структуре спектра ЭПР.

Для ядра со спином I проекции спина на ось z могут принимать $2I + 1$ значение ($m_I = +I \div -I$ с шагом в единицу). Данное ядро создает в точке нахождения электрона $2I + 1$ различных локальных магнитных полей, значения которых равны $B_I = m_I a$. В результате резонанс будет наблюдаться не при величине магнитного поля B_0 , а при значениях $B = B_0 + m_I a$ (всего $2I + 1$ значение). Поэтому линия резонансного сигнала расщепляется на $2I + 1$ компоненту одинаковой интенсивности. Величина a определяет расстояние между

соседними компонентами в спектре и называется *константой СТВ* (измеряется в Гц). В обозначении константы СТВ индексами указывают тип атома, с ядром которого происходит взаимодействие, а при необходимости — и его положение в молекуле.

Если в системе присутствует n эквивалентных ядер со спином I , то происходит расщепление сигнала на $M = 2nI + 1$ компоненту различной интенсивности, где M — мультиплетность сигнала. Для n ядер с $I = 1/2$ (например, протонов) происходит расщепление на $n + 1$ компоненту, интенсивности которых определяются треугольником Паскаля (см. табл. 5.2).

Рассмотрим примеры спектров ЭПР структур, в которых происходит СТВ с эквивалентными протонами (рис. 6.3). Простейшим примером системы, в которой проявляется сверхтонкое взаимодействие, является атом водорода. Резонансный сигнал расщепляется на 2 компоненты равной интенсивности с $a^H = 500$ Гц. Спектр ЭПР метильного радикала $\cdot\text{CH}_3$ в результате взаимодействия электрона с тремя эквивалентными протонами представляет кватрет с соотношением интенсивностей $1 : 3 : 3 : 1$ и $a^H = 23$ Гц. В анион-радикале бензола $\text{C}_6\text{H}_6^{\cdot-}$ имеется шесть эквивалентных протонов, поэтому спектр ЭПР представляет септет ($1 : 6 : 10 : 15 : 10 : 6 : 1$).

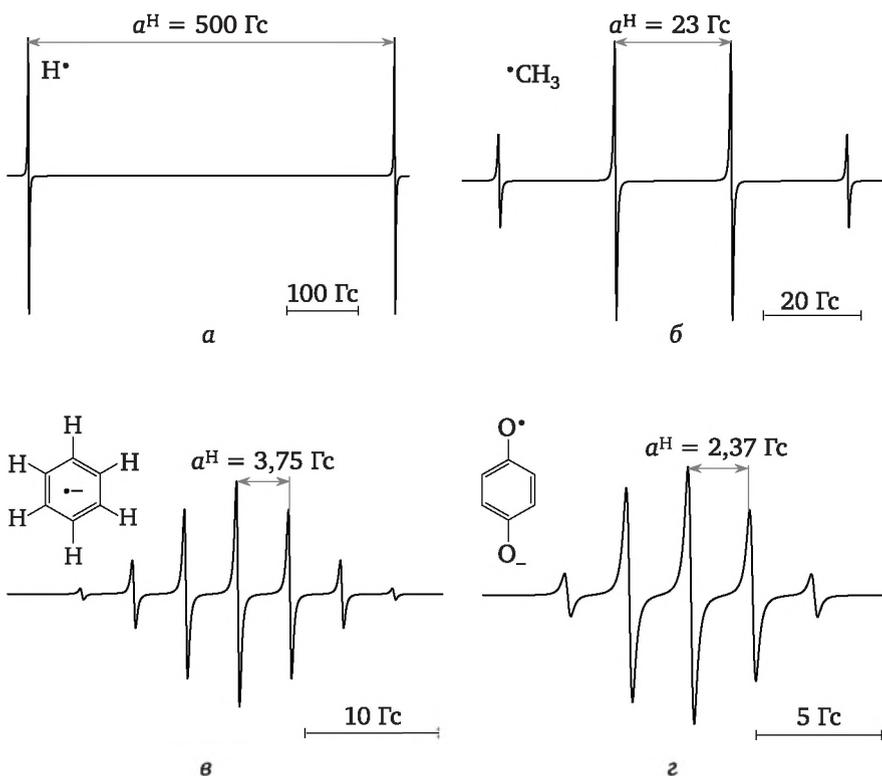
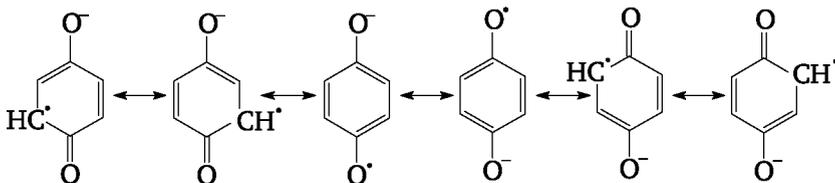


Рис. 6.3. Спектры ЭПР структур с эквивалентными протонами

Спектр ЭПР *n*-бензосемихинона (анион-радикал) представляет квинтет с соотношением интенсивностей 1 : 4 : 6 : 4 : 1 (рис. 6.3, з), что говорит об эквивалентности всех четырех протонов в его структуре. Это объясняется делокализацией неспаренного электрона по сопряженной π -электронной системе:



В результате имеется некоторая спиновая плотность (вероятность нахождения неспаренного электрона со спином 1/2) на атомах углерода в положениях 2, 3, 5, 6 кольца. Данная спиновая плотность взаимодействует с ядром протона в соответствующем положении по механизму спиновой поляризации (рис. 6.4). Структура *a* более энергетически выгодна, чем *б*, поскольку в ней возможно обменное взаимодействие между имеющими параллельные спины электронами на p_z - и гибридной sp^2 -орбиталях. Поэтому в системе будет некоторый избыток электронов со спином $-1/2$ на s -орбитали водорода (отрицательная спиновая плотность на атоме водорода), которая взаимодействует с его ядром.

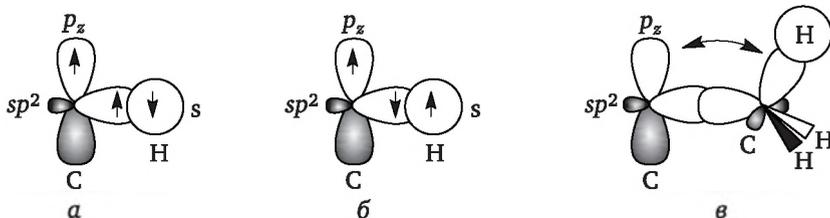


Рис. 6.4. Сверхтонкое взаимодействие в органических соединениях по механизмам спиновой поляризации (*a*, *б*) и сверхсопряжения (*в*)

Чем выше спиновая π -плотность ρ_π на атоме углерода, тем значительней происходит спиновая поляризация, соответственно выше энергия и константа СТВ. Эта зависимость выражается простым соотношением Мак-Коннела: $a^H = Q\rho_\pi$. В качестве приближенного можно использовать значение константы $Q = 23$ Гс — константу СТВ метильного радикала, в котором неспаренный электрон локализован на атоме углерода ($\rho_\pi = 1$). Используя соотношение Мак-Коннела можно оценить величину a^H в анион-радикале бензола (см. рис. 6.3, в), полагая спиновую π -плотность на каждом из эквивалентных атомов углерода равной 1/6: $a^H = 23/6 = 3,83$ Гс, что хорошо совпадает с экспериментальной величиной ($a^H = 3,75$). Спи-

новая плотность на каждом из четырех атомов углерода в молекуле *p*-бензохинона (см. рис. 6.3, *з*) равна $2,37/23 \approx 0,1$, следовательно оставшаяся часть спиновой плотности (0,6) распределена между двумя фрагментами С–О.

Если в системе присутствует несколько групп эквивалентных ядер со спином *I*, то мультиплетность сигнала (*M*) определяется произведением

$$M = (2n_1I_1 + 1) \cdot (2n_2I_2 + 1) \cdot \dots$$

Если константы СТВ значительно различаются, то в спектре ЭПР присутствуют хорошо разрешенные мультиплеты. В качестве примера можно привести спектр ЭПР радикала $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ (рис. 6.5). В результате СТВ с двумя протонами CH_2 -группы ($a_{\text{CH}_2}^{\text{H}} = 17,4$ Гс) сигнал расщепляется на триплет, каждая из компонент которого далее расщепляется на дублет при взаимодействии с протоном гидроксильной группы ($a_{\text{OH}}^{\text{H}} = 1,15$ Гс).

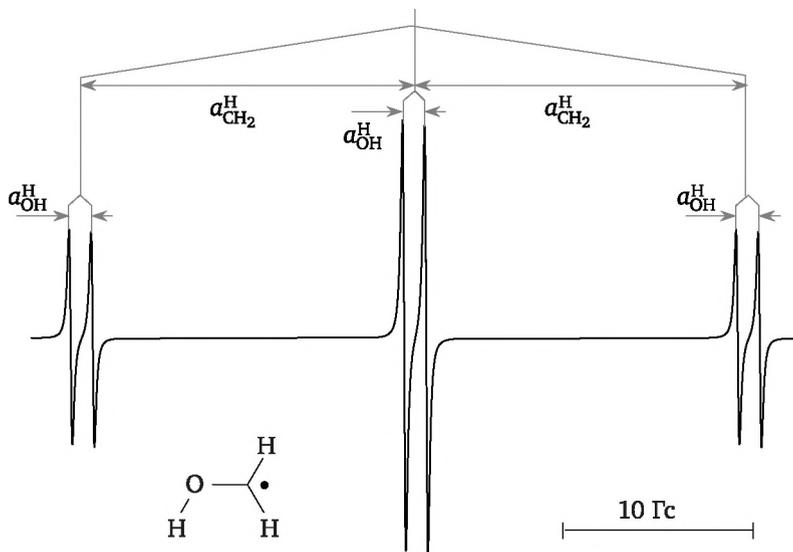


Рис. 6.5. Спектр ЭПР радикала $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$

Приведенный пример показывает, что константы СТВ, как правило, уменьшаются при увеличении удаленности протонов от несущего неспаренный электрон атома. Исключением является СТВ с протонами, расположенными у α -углеродного атома (в фрагменте Н–С–С \cdot), которое осуществляется по механизму сверхсопряжения путем частичного π -перекрывания p_z - и гибридной sp^3 -орбиталей (см. рис. 6.4, *в*). Например, в этильном радикале $\cdot\text{CH}_2\text{CH}_3$ константа СТВ с протонами группы CH_3 (26,9 Гс) даже выше, чем с протонами группы CH_2 (22,2 Гс).

Мультиплеты, образующиеся в результате сверхтонкого взаимодействия, могут накладываться друг на друга, что приводит к значительному усложнению спектров. В качестве примера рассмотрим спектр феноксильного радикала (рис. 6.6), имеющего 3 группы неэквивалентных протонов. Константы СТВ с протонами в различных положениях бензольного кольца составляют $a_4^H = 10,1$ Гс, $a_{2,6}^H = 6,65$ Гс, $a_{3,5}^H = 1,8$ Гс. В результате СТВ с протоном в положении 4 происходит расщепление сигнала на дублет, каждая из компонент которого расщепляется при взаимодействии с протонами в положениях 2, 6 на триплет, а те, в свою очередь, расщепляются на триплет при взаимодействии с протонами в положениях 3, 5 (рис. 6.6). В результате спектр должен состоять из $2 \cdot 3 \cdot 3 = 18$ линий, т. е. представлять дублет триплетов триплетов. Однако, поскольку $2a_{2,6}^H > a_4^H$, то уже на второй «стадии» расщепления триплеты в дублете перекрываются, а в результирующем спектре две пары линий сливаются друг с другом. Поэтому в спектре присутствует всего 16 линий, причем центральная пара является плохо разрешенной. Вид центральной части спектра ЭПР является более сложным, чем было бы при отсутствии наложения линий друг на друга.

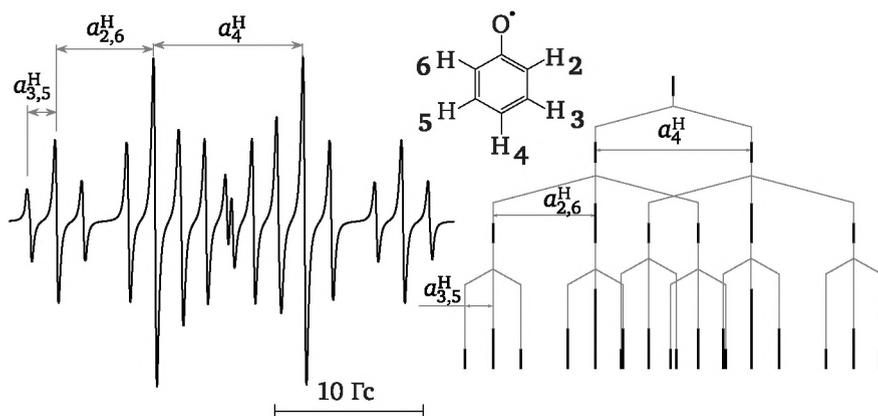
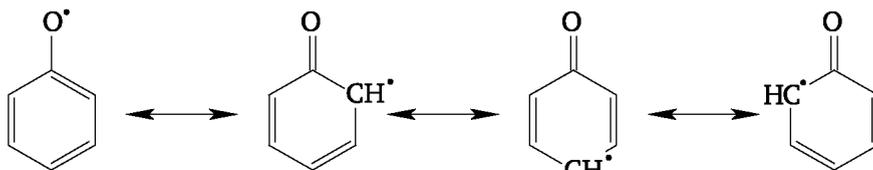


Рис. 6.6. ЭПР-спектр феноксильного радикала и схема образования его СТС

Более высокие значения констант СТВ a_4^H и $a_{2,6}^H$ по сравнению с $a_{3,5}^H$ (более высокие спиновые плотности на соответствующих атомах углерода) обусловлены делокализацией неспаренного электрона в сопряженной ароматической системе по *o*- и *p*-положениям:



Если заменить в *n*-положении фенола атом водорода на метильную группу ($a_{4\text{-CH}_3}^{\text{H}} = 11,9$ Гс), то спектр ЭПР образуется по схеме «квартет триплетов триплетов» (три протона метильной группы дают квартет, два *o*-протона — триплет, два *m*-протона — триплет). Число линий в реальном спектре может быть ниже, чем $4 \cdot 3 \cdot 3 = 36$ вследствие наложения отдельных линий друг на друга. Примечательно, что константа СТВ для протонов группы 4-CH₃ выше, чем для протона 4-H ($a_4^{\text{H}} = 10,1$ Гс), что является следствием эффекта сверхсопряжения (аналогично ранее упомянутому этильному радикалу).

СТВ в радикалах может наблюдаться не только с протонами, но и с другими ядрами. Примером может служить СТВ с ядром азота ¹⁴N (*I* = 1) в нитроксильных радикалах, которое приводит к расщеплению сигнала на $(2I + 1) = 3$ компоненты равной интенсивности (рис. 6.7). В атмосфере воздуха происходит уширение сигнала с одновременным уменьшением его амплитуды. Это обусловлено спиновым обменом между парамагнитными частицами (триплетным кислородом и нитроксильным радикалом), которое приводит к уменьшению времени жизни спинового состояния.

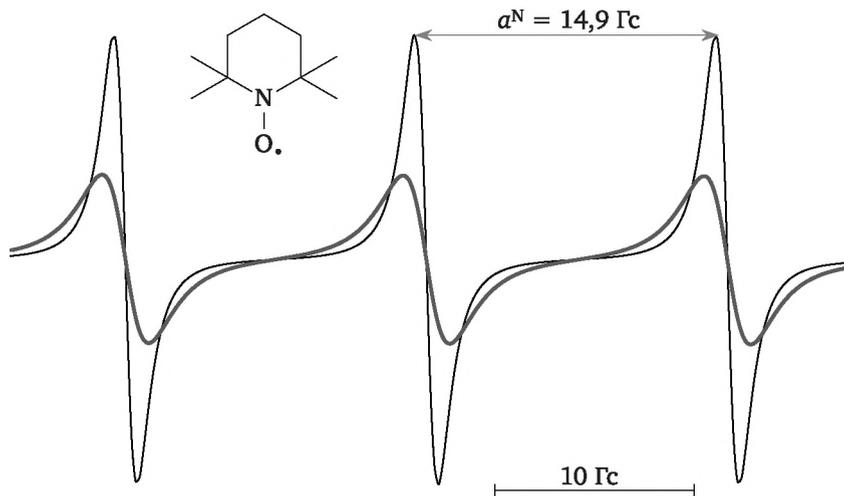


Рис. 6.7. Спектр ЭПР нитроксильного радикала TEMPO в атмосфере аргона и воздуха:

— — аргон; — — воздух

В процессе спинового обмена между парамагнитными частицами изменяется магнитное окружение неспаренного электрона, обусловленное СТВ с магнитным ядром. В результате происходит уширение линий спектра, в пределе приводящее к исчезновению СТС спектра. Например, спектр ЭПР нитроксильных радикалов при высокой концентрации в растворе представляет одну широкую линию, а не триплет узких линий, как на рис. 6.7.

6.4. Методы спинового зонда, спиновых меток и спиновых ловушек

Сверхтонкое взаимодействие между спинами электрона и ядра зависит от угла между осью молекулы и вектором магнитного поля, т. е. является *анизотропным*. Быстрое вращение молекул в невязком растворителе приводит к усреднению СТВ, в результате чего спектры ЭПР являются симметричными, а линии имеют одинаковую ширину. Если же вращение молекул затруднено вследствие высокой вязкости растворителя, проявляется анизотропия СТВ и симметрия спектра нарушается. Аналогичные эффекты происходят и при затрудненном внутреннем вращении отдельных групп в молекулах: химически эквивалентные ядра становятся магнитно неэквивалентными, что приводит к усложнению СТС-спектра.

В *методе спинового зонда* в исследуемую систему вводят стабильный радикал и анализируют свойства окружающей среды по характеру СТС-спектра ЭПР. Наиболее часто в качестве спиновых зондов используют стабильные нитроксильные радикалы. Для количественного описания вращательного движения радикала используют понятие *времени вращательной корреляции* (τ_c), равное времени поворота радикала на угол 90° . При быстром вращении радикала в невязком растворителе ($\tau_c < 10^{-11}$ с) спектр ЭПР является изотропным — линии имеют одинаковую ширину и интенсивность. При увеличении τ_c происходит изменение амплитуды и ширины отдельных компонент спектра (рис. 6.8). На основании анализа спектра ЭПР величину τ_c можно оценить по эмпирическому уравнению:

$$\tau_c = 6,65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_{+1} \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right)$$

Составляющие данного уравнения показаны на рис. 6.8. Уравнение применимо при значениях $5 \cdot 10^{-11} < \tau_c < 1 \cdot 10^{-9}$ с. При бóльших значениях τ_c происходит существенное искажение формы спектра (рис. 6.8). Таким образом, можно определять локальную вязкость в точке нахождения спинового зонда.

Для исследования молекулярной подвижности и упорядоченности липидных мембран используют липофильные спиновые зонды, в которых нитроксильный радикал присоединен к молекуле жирной кислоты, например, 5-доксилстеарат (рис. 6.9, а). Такая молекула, встроенная в липидную мембрану, вращается преимущественно вокруг своей оси. При этом спектр ЭПР является анизотропным (см. рис. 6.9, а), и по его форме можно судить об упорядоченности мембраны. Примечательно, что при удалении от поверхности липидной мембраны подвижность углеводородных фрагментов возрастает. Например, характер спектра ЭПР 16-доксилстеарата,

внедренного в липидную мембрану (рис. 6.9, б), свидетельствует о достаточно свободном вращении вокруг всех осей зонда.

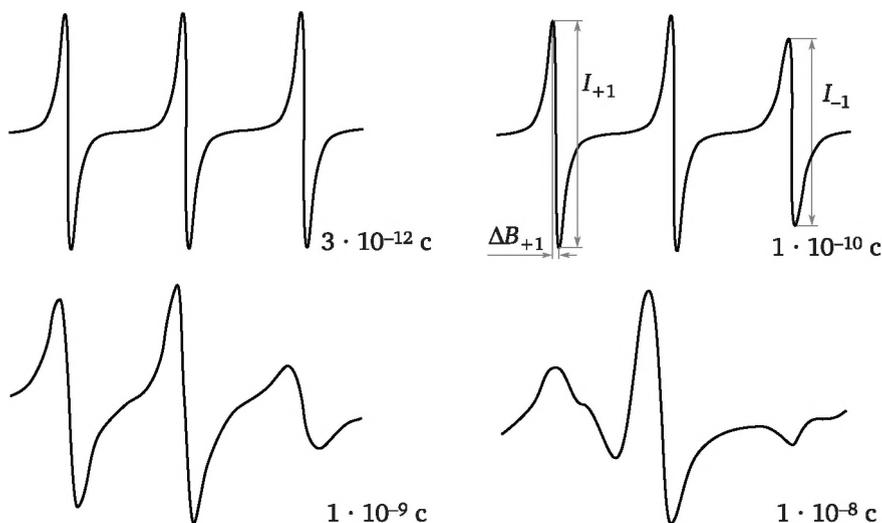


Рис. 6.8. Спектр ЭПР ТЕМРО при различных значениях τ_c

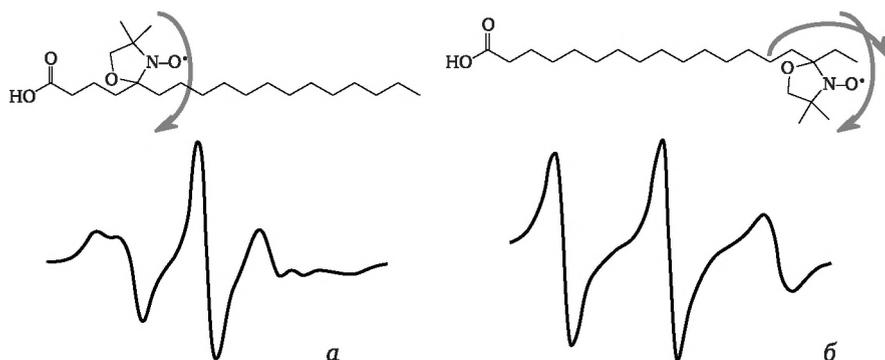


Рис. 6.9. Спектры ЭПР липофильных спиновых зондов в липидной мембране

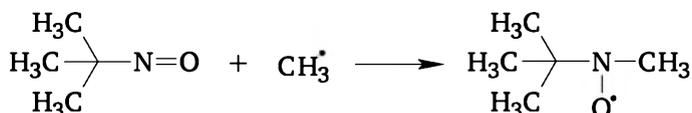
Некоторые нитроксильные радикалы содержат основные группы, способные протонироваться, причем спектры ЭПР протонированной и непротонированной форм различаются. Это позволяет использовать данные радикалы в качестве рН-чувствительных спиновых зондов. При значениях рН, близких к pK_a соответствующей сопряженной кислоты, спектр ЭПР представляет суперпозицию спектров двух форм. Из анализа спектра может быть вычислено значение рН среды. Существуют зонды различной структуры с pK_a от 1 до 13, что позволяет перекрыть практически весь диапазон рН. Данный метод полезен для измерения рН в микрообъемах (например, клетках и их органеллах), где обычные методы рН-метрии неприменимы.

В *методе спиновых меток* также используется принцип зависимости формы спектра ЭПР нитроксильного радикала от скорости и изотропности его вращения, но в данном методе спиновая метка ковалентно присоединяется к исследуемой молекуле. Например, связывая нитроксильный радикал с -SH группами белка, можно судить о конформационной подвижности белковой молекулы и характере внутренних вращений по форме спектра ЭПР. Количество таких групп в молекуле можно определить по интегральной интенсивности сигнала. Сигнал ЭПР может быть уширенным в результате диполь-дипольного взаимодействия двух близко расположенных спиновых меток (~ 0,3—1 нм), что позволяет оценивать пространственную сближенность соответствующих групп в молекуле.

Уширение может быть также следствием диполь-дипольного взаимодействия спиновой метки с парамагнитным ионом металла в активном центре фермента. Если исследовать ферментативную реакцию с использованием спин-меченых ферментов или субстратов, то по изменению формы сигнала ЭПР в ходе реакции можно судить о характере связывания субстрата в фермент-субстратном комплексе.

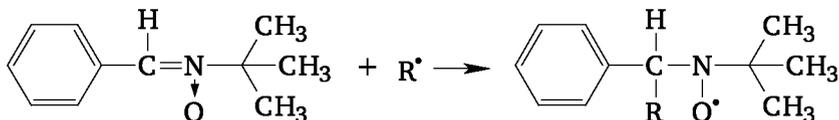
Существует разновидность метода ЭПР, называемая импульсный двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR). Данный метод позволяет определять взаимодействие спиновых меток, находящихся на расстоянии 1,5—7 нм, что открывает новые возможности для исследования структуры и взаимодействий в биомакромолекулах.

Основным ограничением для исследования активных радикалов методом ЭПР является их высокая реакционная способность и, как следствие, низкая концентрация (ниже предела обнаружения методом ЭПР). Зафиксировать образование таких радикалов можно *методом спиновых ловушек*. Для этого в исследуемую систему вводят соединение (спиновую ловушку), способное присоединять активный радикал с образованием стабильного нитроксильного радикала (спиновой аддукт). Например, при взаимодействии *трет*-нитрозобутана с метильным радикалом образуется нитроксильный радикал, спектр ЭПР которого представляет собой триплет (1 : 1 : 1) квартетов (1 : 3 : 3 : 1) в результате СТВ электрона со спинами ядра ^{14}N и трех протонов метильной группы соответственно.



При взаимодействии С-фенил-N-трет-бутилнитрона с различными радикалами ($\text{O}_2^{\bullet-}$, HO^\bullet , RO^\bullet , RO_2^\bullet), возникающими в процессе окислительного стресса в живых системах, образуются спиновые аддукты со спектром ЭПР в виде триплета дублетов (в результате

СТВ электрона со спинами ядра ^{14}N и протона). Каждый из таких аддуктов обладает характерными значениями констант СТВ a^{N} и a^{H} , на основании которых происходит идентификация радикала R^{\bullet} .



6.5. Спектрометры ЭПР

Резонансное поглощение можно наблюдать, изменяя частоту электромагнитного излучения при постоянстве напряженности магнитного поля или напряженность при постоянстве частоты. Поскольку изменять напряженность магнитного поля в широких пределах на практике значительно легче, чем частоту электромагнитного излучения, в спектрометрах ЭПР используется второй подход. Схема спектрометра ЭПР представлена на рис. 6.10.

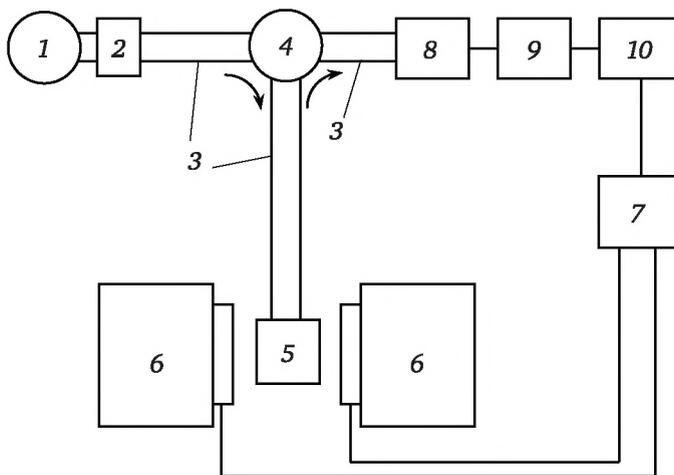


Рис. 6.10. Блок-схема спектрометра ЭПР:

1 — источник СВЧ-излучения; 2 — аттенюатор; 3 — волноводы;
4 — циркулятор; 5 — резонатор; 6 — электромагнит; 7 — генератор
качающейся частоты; 8 — детектор; 9 — усилитель; 10 — регистратор

Кювету с образцом помещают в резонатор 5, находящийся в магнитном поле, создаваемом электромагнитом 6. Аттенюатор 2 позволяет дозировать мощность СВЧ-излучения, подаваемую от источника 1 к образцу в резонаторе 5 через волноводы 3 и циркулятор 4. Отраженное от резонатора излучение через циркулятор 4 подается на детектор 8, сигнал с которого поступает на усилитель 9 с переменным коэффициентом усиления и далее на регистрирующее

устройство 10. Циркулятор необходим для разделения потоков излучения от источника и резонатора в направлениях, указанных стрелками (на детектор попадает только отраженное излучение и не попадает излучение от источника).

В качестве источников постоянного магнитного поля применяют электромагниты. В спектрометрах ЭПР содержатся схемы, позволяющие проводить линейное и плавное изменение напряженности поля с заданной скоростью и в заданном диапазоне. В качестве источников СВЧ-излучения раньше использовали специальные радиолампы (клистроны), а в настоящее время применяют диоды Ганна. Для передачи СВЧ-излучения к образцу используют волноводы — металлические трубки прямоугольного сечения, размеры которого определяются длиной волны.

Резонатор расположен между полюсами электромагнита, и именно в него помещают образец. Назначение резонатора состоит в концентрировании на образце энергии излучения, приходящего от источника по волноводам. Чаще всего применяют цилиндрические или прямоугольные резонаторы. В цилиндрические резонаторы образцы обычно помещают в тонких капиллярах, а в прямоугольных используют плоские кюветы. Основной характеристикой резонатора является его добротность, которая определяет чувствительность спектрометра. Для достижения максимальной чувствительности необходимо согласование резонатора с остальными частями микроволновой цепи, поэтому процедура согласования (настройки) выполняется для каждого образца перед записью спектра. В современных спектрометрах данная настройка выполняется в автоматическом режиме.

В условиях, когда в образце имеют место переходы между электронными спиновыми уровнями, энергия излучения поглощается и на детектор падает меньше энергии. Регистратор фиксирует не поглощение энергии, а первую производную поглощения по напряженности магнитного поля. При таком способе не требуется сравнивать интенсивности отраженного излучения у образца и контрольного объекта, т. е. контрольный объект (раствор сравнения) в ЭПР-спектроскопии не нужен.

Для повышения чувствительности метода спектроскопии ЭПР используют модуляцию магнитного поля. При увеличении амплитуды модуляции возрастает интенсивность сигнала, однако при большой амплитуде модуляции происходит искажение формы спектральных линий, а также уменьшение разрешающей способности. Поэтому в эксперименте подбирают оптимальные амплитуду и частоту модуляции, позволяющие достигнуть высокой чувствительности без существенных искажений спектра ЭПР.

На форму и качество регистрируемого спектра ЭПР оказывают влияние концентрация радикалов, объем образца, природа растворителя, наличие примесей, температура.

С ростом концентрации увеличивается интенсивность сигнала, но возрастает и влияние процессов, приводящих к уширению линий. При низких концентрациях радикалов снижается соотношение сигнал-шум, что ведет к получению спектров низкого качества.

С увеличением объема образца увеличивается количество парамагнитных центров в резонаторе и интенсивность сигнала. Максимальный объем образца, помещаемый в кювету, определяется конструкцией резонатора.

Использование поглощающих растворителей приводит к снижению добротности резонатора и чувствительности метода. Для таких растворителей существует критический объем, выше которого настройка резонатора и регистрация спектра становится невозможной. Например, максимальный объем образца в водном растворе, который можно исследовать методом спектроскопии ЭПР, на порядок меньше, чем образца в малополярных органических растворителях.

Наличие посторонних примесей в образце может привести к появлению обменных процессов и уширению линий. Типичным примером является уширение линий в атмосфере кислорода (воздуха), пример которого представлен на рис. 6.7. Образец не должен содержать взвешенных частиц, поскольку спектр ЭПР вещества в кристаллическом состоянии существенно отличается от спектра вещества в растворе.

С понижением температуры уменьшается скорость обменных процессов, приводящих к уширению линий, но может проявляться затрудненное вращение вследствие увеличения вязкости растворителя, приводящее к искажению спектра (см. рис. 6.8). Для каждого образца существует оптимальная температура, при которой ширина спектральных линий минимальна без искажения спектра.

6.6. Применение ЭПР-спектроскопии

Метод ЭПР приобрел большое значение в химии, физике, биологии, медицине, поскольку позволяет определять структуры и концентрации органических и неорганических свободных радикалов. Свободные радикалы могут быть получены химическим методом, фотохимически или при действии излучения высокой энергии.

Качественный анализ основан на определении g -фактора и анализе СТС-спектра. Сравнивая значение g -фактора и форму спектра с эталонными значениями, можно производить идентификацию парамагнитных частиц. Если вид спектра ЭПР для исследуемого вещества неизвестен, то анализ СТС-спектра позволяет получить информацию о наличии в молекуле неэквивалентных протонов или других ядер с ненулевым спином, с которыми осуществляется СТВ.

Например, триплет с соотношением интенсивностей 1 : 2 : 1 свидетельствует о СТВ электрона с двумя эквивалентными протонами, а триплет с соотношением интенсивностей 1 : 1 : 1 — о СТВ с одним атомом азота ^{14}N .

Количественный анализ основан на двойном интегрировании спектра ЭПР. Обычно для определения концентрации используют сравнение сигналов ЭПР исследуемого образца и эталона с известным количеством парамагнитных частиц (например, ДФПГ). Если на спектре ЭПР имеются значительные шумы, то двойное интегрирование может приводить к значительным ошибкам. В этом случае необходимо предварительно очистить сигнал от шумов, например, с использованием преобразования Фурье.

В качестве аналитического сигнала, определяющего концентрацию конкретного парамагнитного вещества, также может использоваться амплитуда одной из компонент спектра (обычно центральной). При условии постоянства ширины линии между амплитудой и концентрацией наблюдается линейная зависимость, т. е. можно использовать метод градуировочного графика. Например, амплитуда центральной линии спектра ЭПР нитроксильных радикалов прямо пропорциональна концентрации в диапазоне 10^{-6} — 10^{-4} М. При более высоких концентрациях происходит уширение сигнала вследствие диполь-дипольного взаимодействия и спинового обмена и, как следствие, уменьшение амплитуды сигнала (отрицательное отклонение от линейной зависимости на градуировочном графике).

Применение метода ЭПР в химических исследованиях. Метод ЭПР дает ценный вклад в исследование кинетики и механизмов химических реакций. Он позволяет с высокой чувствительностью регистрировать (напрямую или методом спиновых ловушек) парамагнитные частицы, являющиеся интермедиатами химических процессов, что дает ценную информацию о механизмах реакций. В частности, метод ЭПР широко используется при изучении механизма и кинетики цепной полимеризации и цепного окисления органических соединений. Измеряя концентрацию парамагнитных центров в различные моменты времени, можно получать кинетические кривые, из которых рассчитываются константы скорости элементарных стадий. Так, метод ЭПР является основным инструментом при исследовании кинетики реакций нитроксильных радикалов.

Метод ЭПР применяют для исследования быстрых процессов, связанных с изменением молекулярной структуры радикалов (заторможенное вращение и конформационные переходы). Измерение ширины линий в спектрах ЭПР можно использовать для определения констант скорости процессов с участием парамагнитных частиц, характеристическое время жизни которых лежит в интервале 10^{-5} — 10^{-10} с.

Для короткоживущих радикалов чувствительность метода может быть повышена путем использования струевой методики или непрерывного облучения. Спектры ЭПР нестабильных радикалов можно получить, зафиксировав их в стеклах, матрицах замороженных благородных газов или кристаллах.

Применение метода ЭПР в биологии. Благодаря довольно высокой чувствительности и возможности определения природы парамагнитных частиц метод ЭПР нашел широкое применение для изучения целого ряда биологических процессов. Спектроскопия ЭПР широко применяется в исследованиях фотосинтеза: изучаются первичные стадии фотохимических реакций переноса электрона от хлорофилла к первичным акцепторам электрона и дальнейший перенос электрона по электрон-транспортной цепи хлоропластов.

Концентрация свободных радикалов в тканях связана с их метаболической активностью и изменяется при возникновении патологических процессов. Образование активных радикалов ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , RO^{\cdot} , RO_2^{\cdot}) при физиологических температурах в биологических объектах исследуют методом спиновых ловушек. Прямое изучение свободных радикалов в биологических системах затруднено вследствие низкой концентрации свободных радикалов, образующихся при метаболизме (10^{-8} — 10^{-10} М). Повысить концентрацию свободных радикалов можно, увеличив скорость их образования или уменьшив скорость гибели. Легче всего наблюдать образование радикалов при облучении биологических объектов при очень низкой температуре (77 К) УФ- или ионизирующим излучением (радиацией). Радикалы некоторых биологически важных соединений, прежде всего фенолов (α -токоферол, убихинолы), достаточно устойчивы, поэтому их спектры ЭПР наблюдаются и при комнатной температуре.

Помимо сигналов свободных радикалов в тканях наблюдается целый ряд сигналов металлов (Fe, Cu, Mn, Ni, Co). Эти металлы входят в состав металлопротеинов, принимающих участие во многих ферментативных процессах. Железосодержащие белки (цитохромы, ферредоксины) являются компонентами электрон-транспортных цепей в митохондриях и хлоропластах.

Методом ЭПР исследован целый ряд фермент-субстратных систем, в которых были обнаружены свободнорадикальные интермедиаты. В ряде случаев оказалось возможным наблюдать за окислительно-восстановительными превращениями ионов металлов, входящих в активный центр фермента.

Помимо изучения механизмов реакций, протекающих с участием парамагнитных частиц, метод ЭПР широко используют и для исследования структурно-динамических свойств макромолекул и биомембран с применением методов спинового зонда и спиновых меток. Данными методами исследуют структуру и конформационную подвижность белков, клеточных мембран, механизмы фер-

ментативных процессов и т. д. Использование рН-чувствительных зондов позволяет определять локальные значения рН, например, внутри клетки или вблизи активного центра фермента. Используя зависимость ширины линии спектра спинового зонда от концентрации кислорода (см. рис. 6.7), можно определять локальную концентрацию кислорода в тканях и клетках организмов (метод ЭПР-оксиметрии).

Контрольные вопросы

1. Опишите теоретические основы метода спектроскопии ЭПР.
2. Каковы параметры спектров ЭПР?
3. Какие факторы влияют на ширину линии спектра ЭПР?
4. Что такое сверхтонкое взаимодействие в спектрах ЭПР?
5. В чем заключаются методы спинового зонда, спиновых меток и спиновых ловушек?
6. Опишите схему спектрометра ЭПР. Как регистрируют спектры ЭПР?
7. Как метод ЭПР применяется в химии и биологии?

Тема 7

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Методы масс-спектрометрии основаны на ионизации вещества, разделении ионов по значению отношения массы к заряду (m/z) и их регистрации.

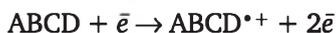
Теоретические и экспериментальные основы масс-спектрометрии были заложены еще Д. Д. Томсоном, который впервые в 1912 г. создал прибор для получения масс-спектра положительных ионов. Однако его прибор имел низкое разрешение. Его ученик Ф. Астон в 1918 г. существенно повысил разрешение и на своем приборе впервые открыл изотопы элементов. Практически одновременно с Ф. Астоном в Чикаго А. Демпстер сконструирован первый масс-спектрометр, в котором анализатором служило поперечное магнитное поле, а ионные токи измерялись электрическими методами. Схема его используется и в современных приборах. С 1940 г. начался выпуск серийных масс-спектрометров. В 2002 г. Дж. Фенн и К. Танакэ получили Нобелевскую премию за новые методы масс-спектрального анализа.

7.1. Методы ионизации молекул

Ионизация молекул должна проводиться в таких условиях, при которых образовавшийся ион вне зависимости от метода ионизации не претерпевал бы никаких столкновений с другими молекулами или ионами. Это необходимо для установления взаимосвязи между свойствами иона и молекулы. Ионизация может проводиться различными методами.

7.1.1. Ионизация электронным ударом

Это наиболее распространенный метод получения ионов в связи с простотой и доступностью источников ионов и их высокой эффективностью. Допустим, что через пары вещества проходит поток электронов, энергию которых можно постепенно увеличивать. Если эта энергия достигнет определенного уровня, то при столкновении электрона с молекулой может произойти «выбивание» из нее электрона с образованием молекулярного иона (катион-радикала):



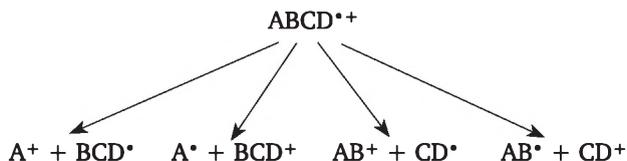
Масса молекулярного иона равна массе ионизируемой молекулы. К сожалению, нет прямых методов определения структуры ионов. Поэтому часто используют предположение о тождественности структуры молекулярного иона (M^{*+}) и нейтральной молекулы (M).

Наименьшая энергия бомбардирующих электронов, при которой возможно образование из данной молекулы иона, называется *энергией ионизации вещества*. Энергия ионизации является мерой прочности, с какой молекула удерживает наименее связанный с ней электрон. Для органических молекул энергия ионизации составляет 9—12 эВ.

Если энергия электронов значительно превышает энергию ионизации, то образующийся молекулярный ион получает избыточную энергию, которой может оказаться достаточно для разрыва в нем связей. Происходит распад молекулярного иона на частицы меньшей массы (фрагменты). Такой процесс называется *фрагментацией*. В практике масс-спектрометрии используются электроны с энергией 30—100 эВ, что обеспечивает фрагментацию молекулярного иона. Вероятность фрагментации молекулярного иона возрастает с увеличением числа атомов в молекуле.

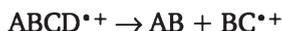
Известны два основных типа фрагментации молекулярного иона — диссоциация и перегруппировка.

Диссоциация — распад молекулярного иона с сохранением последовательности связей. В результате процесса образуются катион и радикал. Диссоциация молекулярного иона может происходить с разрывом различных связей и с разными способами перераспределения электронов:



Диссоциация углеводородов приводит к фрагментам с нечетными значениями отношения m/z .

Перегруппировка молекулярного иона сопровождается изменением последовательности связей, в результате чего образуется новый катион-радикал меньшей массы и нейтральная устойчивая молекула (H_2O , CO , CO_2 и т. д.):



Перегруппировка молекулярных ионов углеводородов и кислородсодержащих соединений приводит к фрагменту с четным значением отношения m/z . Измерение массы образующихся осколков и их относительного количества позволяет получить ценную информацию о строении органических соединений.

Рассмотрим устройство масс-спектрометра (рис. 7.1). Масс-спектрометр должен содержать узлы для выполнения следующих функций: 1) ионизации пробы, 2) ускорение ионов электрическим полем, 3) распределение ионов согласно отношению m/z , 4) детектирование ионов по соответствующему электрическому сигналу.

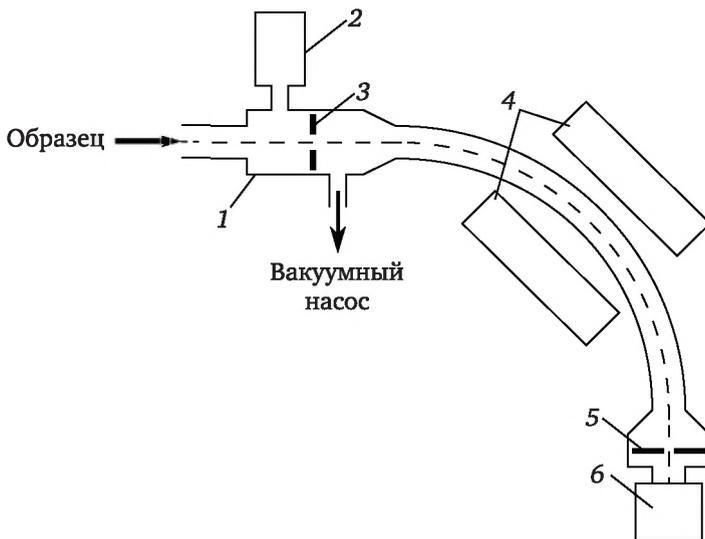


Рис. 7.1. Устройство масс-спектрометра:

- 1 — ионизационная камера; 2 — источник электронов;
- 3 — ускорительные пластины (отрицательный потенциал);
- 4 — магнит; 5 — щель; 6 — коллектор (детектор) ионов

Для получения масс-спектра пары вещества небольшими количествами с помощью специальной системы напуска вводятся в ионизационную камеру 1, где поддерживается глубокий вакуум (давление 10^{-6} мм рт. ст.). Молекулы вещества бомбардируются потоком электронов, излучаемых раскаленным катодом 2. Образующиеся ионы выталкиваются из ионизационной камеры небольшой разностью потенциалов 3. Получаемый поток ионов ускоряется, фокусируется сильным электрическим полем и попадает в магнитное поле 4.

В результате бомбардировки молекул вещества электронами образуются частицы, имеющие положительный или отрицательный заряд, а также нейтральные частицы. При прохождении потока частиц через магнитное поле нейтральные частицы не изменяют направления, а положительные и отрицательные отклоняются в разные стороны. Величины отклонения ионов пропорциональны заряду и обратно пропорциональны их массе.

Каждый отдельный ион, характеризуемый конкретной величиной m/z , при данной напряженности магнитного поля движется

по собственной траектории. Интервал сканирования масс можно изменять, варьируя либо напряженность магнитного поля, либо потенциал электрического поля.

В обычной масс-спектрометрии принято регистрировать только частицы, имеющие положительный заряд, так как при бомбардировке молекул электронами положительно заряженных ионов обычно больше, чем отрицательно заряженных. Если необходимо изучать и отрицательно заряженные ионы, следует изменить знак потенциала ускорения (ускорительные пластины).

Если на выходе ионов из магнитного поля установить регистрирующее устройство, то частицы, различающиеся значениями m/z , будут давать отдельные сигналы. Интенсивность сигналов будет пропорциональна количеству частиц с данным значением m/z . Интенсивность сигналов определяется как их высота, выраженная в мм. Высота пика с максимальной интенсивностью принимается за 100 % (базовый пик), интенсивность остальных пиков пересчитывается пропорционально и выражается в процентах.

Для некоторых соединений, например, полиядерных ароматических систем, при ионизации возможно образование *многозарядных ионов*. Такие ионы характеризуются кратно меньшими значениями m/z по сравнению с массой молекулы.

Фрагментация ионов может происходить не только в ионизационной камере, но и во время пролета через масс-спектрометр. Такие ионы имеют время жизни 10^{-6} — 10^{-5} с и называются *метастабильными*. В результате фрагментации во время пролета значение m/z изменяется, что приводит к отклонению траектории и образованию слабых уширенных пиков, максимум которых, как правило, соответствует нецелочисленным значениям массовых чисел. Наличие метастабильных ионов затрудняет интерпретацию масс-спектров, но в ряде случаев позволяет доказать протекание конкретной реакции, связывающей «родительский» и «дочерний» ионы.

С ростом отношения m/z разница в отклонении магнитным полем частиц, различающихся на одну атомную единицу массы, уменьшается. В связи с этим важной характеристикой масс-спектрометров является их разрешающая способность (R), определяющая максимальную массу ионов, различающихся на одну атомную единицу массы (для которой прибор разделяет пики не менее чем на 90 %):

$$R = \frac{M}{\Delta M},$$

где M — максимальная масса, для которой перекрытие пиков менее 10 %; ΔM — одна атомная единица массы.

Все масс-спектрометры подразделяются на два класса: приборы низкого и высокого разрешения (R). Спектрометры низкого раз-

решения — приборы, на которых можно разделить целые массы до m/z 3000. Соединения $C_{16}H_{26}O_2$ и $C_{15}H_{24}NO_2$ неразличимы, поскольку прибор будет фиксировать и в первом и во втором случае массу 250.

Данные масс-спектрометрии высокого разрешения (m/z 10 000—20 000) — измерение точной массы иона до 4—6 знака после запятой. Например, эти вещества можно различить только с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения:

- CO ($M = 28$), точная масса $M = 27,994915$;
- $CH_2=CH_2$ ($M = 28$), точная масса $M = 28,033000$;
- N_2 ($M = 28$), точная масса $M = 28,006148$.

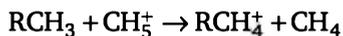
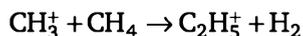
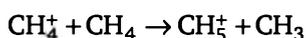
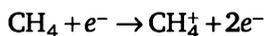
В масс-спектрометрии регистрируются только заряженные частицы: катион-радикалы ($ABCD^{+\bullet}$) и катионы (A^+ , AB^+). Незаряженные радикальные частицы (A^\bullet , BCD^\bullet) не регистрируются.

Установление структурной формулы по данным масс-спектров задача непростая, но ее можно решить, используя подходящий алгоритм. Для получения масс-спектра требуется ничтожно малое количество вещества — около 1 мкг.

7.1.2. Другие методы ионизации

Химическая ионизация. В этом методе образец до облучения пучком электронов разбавляют большим избытком «газа-реагента». Вероятность первичных ионизирующих столкновений между электронами и молекулами образца после этого настолько мала, что первичные ионы образуются почти исключительно из молекул реагента. В качестве реагентов обычно используют газы с низкой молекулярной массой, например, CH_4 , изо- C_4H_{10} , NH_3 и инертные газы (Ar, He). Вторичные ионы образуются в результате переноса атома водорода или электрона.

Если газом-реагентом служит метан, то реакции протекают в такой последовательности:



где RCH_3 — молекула исследуемого вещества.

Исследования показали, что частицы CH_5^+ и $C_2H_5^+$ в сумме составляют около 90 % ионов, присутствующих в этой системе. Протонированные ионы исследуемого вещества (RCH_4^+) обладают меньшей

энергией и менее подвержены фрагментации. Поэтому масс-спектры, получаемые после химической ионизации, намного проще, содержат меньше пиков и легче подвергаются интерпретации.

Ионизация электрическим полем. Ионизация достигается на электродах в виде острия или тонкой проволоки. Под влиянием сильного неоднородного поля происходит переход электрона от молекулы к аноду за 10^{-12} с и образуется положительный ион-радикал. Обычно при ионизации электрическим полем не происходит значительной фрагментации, и наблюдают в основном молекулярные ионы.

Масс-спектрометрия вторичных ионов. В этом методе твердый образец обрабатывают пучком ионов от внешнего источника, в результате чего происходит выбивание молекул или фрагментов с поверхности образца. Образование ионов любого знака может происходить по различным механизмам. Во-первых, исходная молекула (М) может присоединиться к атакующему иону (например, Ag^+), образуя металлоорганическую частицу $(\text{AgM})^+$. Во-вторых, молекула может ионизироваться в процессе электронного перехода с образованием ион-радикалов ($\text{M}^{\cdot+}$ или $\text{M}^{\cdot-}$). Образующийся в результате пучок вторичных ионов анализируется с помощью масс-анализатора для определения элементного, изотопного или молекулярного состава поверхности.

Бомбардировка быстрыми атомами. В этом случае облучающий поток состоит из нейтральных атомов, а не из ионов. Проба добавляется к нелетучей матрице (например, глицерин) и подвергается воздействию высокоэнергетического (8—35 кэВ) пучка атомов аргона или ксенона. В результате происходит образование катионов и анионов, которые в результате десорбции отрываются от поверхности, а также продуктов их фрагментации. Выход ионов анализируемого образца тем больше, чем больше масса ускоренных атомов, поэтому более высокую чувствительность достигают при использовании ксенона. Метод бомбардировки быстрыми атомами весьма успешно применяется при изучении сложных молекул, соединений, участвующих в биохимических процессах, и лекарственных средств.

Существует ряд других способов ионизации. Например, *матричная лазерная десорбционная ионизация* и *ионизация электроспреем* позволяют производить в достаточно мягких условиях ионизацию макромолекул массой до нескольких миллионов г/моль, что позволяет проводить масс-спектрометрический анализ белков, нуклеиновых кислот, полимеров.

7.2. Анализ и интерпретация масс-спектров

Интерпретацию масс-спектра соединения производят по следующему алгоритму.

1. Найти молекулярный ион. Проанализировать область пика молекулярного иона.
 2. Отметить основные самые интенсивные пики масс-спектра.
 3. Выделить и проанализировать пики с характерным изотопным составом.
 4. Найти и интерпретировать пики, обусловленные выбросом небольших нейтральных частиц из молекулярного иона.
 5. Определить и интерпретировать пики, соответствующие легким характеристическим фрагментным ионам.
 6. Интерпретировать спектр с использованием всей дополнительной информации: химической и спектральной.
- Рассмотрим более подробно этапы данного алгоритма

7.2.1. Область пика молекулярного иона

Максимальное значение m/z в масс-спектре вещества может иметь молекулярный ион (M^+), масса которого равна молекулярной массе исследуемого соединения. Поэтому по масс-спектру можно определить молекулярную массу вещества, что в свою очередь необходимо для установления молекулярной формулы вещества (брутто-формула). Масса атома, измеренная с высокой точностью, отличается от массового числа. Так, для CO_2 и C_3H_8 массовое число равно 44, но их точные относительные молекулярные массы равны соответственно 43,989828 и 44,062600, т. е. разница составляет 0,072772 а.е.м. Масс-спектрометр высокого разрешения позволяет разделить пучки ионов CO_2^+ и $C_3H_8^+$, когда они получают одновременно.

Определение атомного состава по точному значению массы проводится с использованием таблиц точных масс для различных соотношений числа атомов С, Н, О и N как наиболее распространенных элементов. Точное измерение масс не заменяет элементного анализа. Оба метода взаимно дополняют друг друга.

При использовании масс-спектрометрии низкого разрешения для определения возможной брутто-формулы молекулярного иона применяются эмпирические правила. Так, согласно *азотному правилу*, органические соединения, состоящие из основных атомов (С, Н, N, S, P, Si, F, Cl, Br, I), имеют четную молекулярную массу, если в их структуре не содержится атомов азота или число атомов азота четное. Таким образом, нечетная масса молекулярного иона свидетельствует о наличии в анализируемой молекуле атомов азота в нечетном количестве.

При исследовании масс-спектра дополнительно к определению типа молекулярного иона (M^+) обнаруживаются пики и для изотопных ионов, включающих более легкие или более тяжелые изотопы (с массовыми числами $M \pm 1$, $M \pm 2$, $M \pm 3$ и т. п.). Некоторые элементы, встречающиеся в органических соединениях (F, P, I),

существуют в виде только одного изотопа. У основных органогенных элементов (С, Н, N, О) доля тяжелых изотопов не превышает 1,1 %, в то время как у S и Si вклад тяжелых изотопов составляет 3—5 %, а у Cl и Br доли изотопов с массами М и М + 2 соизмеримы (табл. 7.1).

Таблица 7.1

Естественное содержание изотопов органогенных элементов и их вклад в относительную интенсивность пиков молекулярных ионов

Элемент	Масса основного изотопа (М)	Естественное содержание изотопов с указанной массой, %			Вклад изотопов в относительную интенсивность пика молекулярного иона, %	
		М	М + 1	М + 2	М + 1	М + 2
H	1	99,985	0,015	—	—	—
C	12	98,90	1,10	—	1,1	—
N	14	99,63	0,37	—	0,37	—
O	16	99,76	0,04	0,20	0,04	0,2
S	32	95,02	0,75	4,21	0,8	4,4
Cl	35	75,77	—	24,23	—	32,0
Br	79	50,69	—	49,31	—	97,3

По относительной интенсивности пиков молекулярных ионов можно делать предположения о присутствии и количестве атомов отдельных элементов в молекуле. Под относительной интенсивностью будем понимать интенсивность (в процентах) пика более тяжелого иона (например, М + 1) по отношению к интенсивности пика иона массой М: $\frac{I_{M+1}}{I_M} \cdot 100\%$. Вероятность присутствия в молекуле одного тяжелого изотопа является аддитивной величиной и возрастает с увеличением числа атомов соответствующего элемента. Вероятность одновременного присутствия двух и более тяжелых изотопов в молекуле рассчитывается с применением формул комбинаторики и теории вероятности.

Рассмотрим некоторые закономерности.

1. Если относительная интенсивность пика М + 2 составляет менее 3 %, исследуемое соединение не содержит атомов Cl, Br, S.

2. Интенсивность пика М + 1 для органических соединений преимущественно обусловлена наличием изотопа ^{13}C , поэтому прямо пропорциональна содержанию атомов углерода в молекуле анализируемого вещества. Каждый атом углерода дает прибавку к относительной интенсивности пика М + 1 в 1,1 %, поэтому прибли-

женно число атомов углерода в молекуле может быть определено из формулы:

$$\frac{I_{M+1}}{I_M} \cdot 100\% = n(C) \cdot 1,1\%.$$

Наличие в молекуле атомов N и S несколько искажает эту зависимость.

3. Одновременное присутствие в молекуле двух изотопов ^{13}C маловероятно. Например, для молекулы с семью атомами углерода данная вероятность (и соответствующий вклад в интенсивность пика $M + 2$) составляет 0,25 %. Поэтому, несмотря на относительно малую распространенность природного изотопа ^{18}O (0,2 %), можно делать предположения о числе атомов кислорода в частице. Если относительная интенсивность пика $M + 2$ в спектре образца с небольшим числом атомов углерода в молекуле выше 0,5 %, можно предположить, что в состав соединения входит 1 или более атомов кислорода. Каждый атом кислорода повышает интенсивность пика $M + 2$ на 0,2 %.

4. В масс-спектре хлор- и бромсодержащих соединений наряду с ионом M^+ будет присутствовать ион $(M + 2)^+$ с интенсивностью, пропорциональной распространенности изотопов. Для хлора соотношение изотопов с массами M и $M + 2$ близко к 3 : 1, а для брома — к 1 : 1. Поэтому в масс-спектре молекулы, содержащей один атом хлора, молекулярный ион дает дублет пиков с соотношением интенсивностей $[M]^+ : [M + 2]^+ = 3 : 1$. При наличии в молекуле двух атомов хлора молекулярный ион дает триплет пиков с соотношением интенсивностей $[M]^+ : [M + 2]^+ : [M + 4]^+ = 9 : 6 : 1$. В справочных таблицах приводятся соотношения интенсивностей пиков молекулярных ионов с различными массовыми числами при различном числе атомов Cl и Br в молекуле (в том числе, и при их одновременном присутствии). Характерный мультиплет наблюдается также для молекулярного иона при наличии атома серы.

Рассмотрим применение рассмотренных закономерностей к анализу области молекулярного иона в масс-спектрах некоторых соединений. Для бензойной кислоты в данной области (рис. 7.2, а) имеется триплет пиков. Молекула не содержит атомов азота, поэтому основной пик имеет четную массу (122), совпадающую с относительной молекулярной массой бензойной кислоты. По интенсивности пика 123 ($M + 1$) можно определить, что в молекуле содержится примерно 7 атомов углерода ($8,1/1,1 = 7,3$). Интенсивность пика 124 ($M + 2$), равная 0,6, говорит о наличии в молекуле атомов кислорода. Теоретически вычисленный по аддитивной схеме вклад в интенсивность пика $M + 2$ семи атомов углерода (0,25 %) и двух атомов кислорода ($2 \cdot 0,2 = 0,4$ %) равен 0,65 %, что хорошо согласуется с экспериментальной величиной.

В области молекулярного иона масс-спектра *n*-хлорнитробензола (рис. 7.2, б) наблюдаются два интенсивных пика 157 и 159 с соотношением интенсивности, близким к 3 : 1, что говорит о наличии одного атома хлора в молекуле. Нечетная масса этих пиков свидетельствует о наличии нечетного количества атомов азота в молекуле (в данном случае одного). Отношения интенсивностей пиков 158 и 157 (7,0 %), а также 160 и 159 (7,1 %) практически совпадают между собой и соответствуют шести атомам углерода в молекуле ($7,0/1,1 = 6,3$). Пик 161 по отношению к пику 159 имеет массу $M + 2$ и относительную интенсивность $0,2/32,2 \cdot 100 \% = 0,7 \%$, что может говорить о наличии атомов кислорода в молекуле.

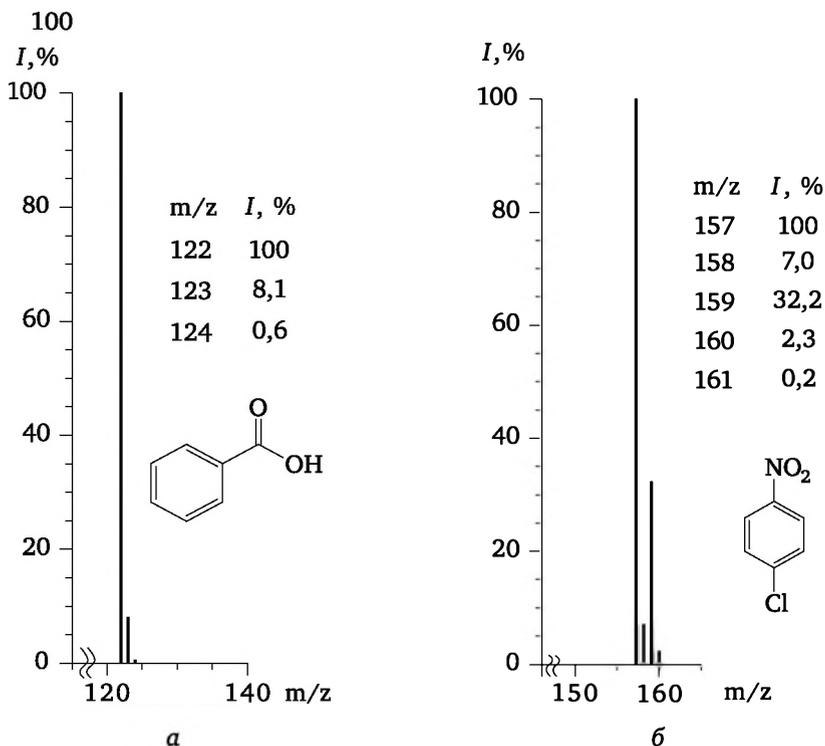


Рис. 7.2. Фрагменты масс-спектров (области пиков молекулярных ионов) бензойной кислоты (а) и *n*-хлорнитробензола (б)

Интенсивность пика молекулярного иона тем выше, чем этот ион стабильнее. В частности, стабильность повышается при наличии сопряженных π -электронных систем, поэтому ароматические соединения имеют более интенсивные пики молекулярных ионов по сравнению с алифатическими. С ростом длины и особенно разветвленности углеводородной цепи увеличивается число вероятных направлений распада молекулярного иона и соответственно уменьшается интенсивность его пика. Для некоторых соединений пик молекулярного

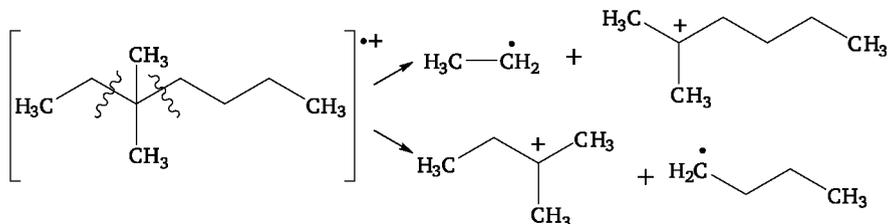
иона может вообще отсутствовать, что приводит к занижению определяемой из масс-спектра молекулярной массы. Например, в масс-спектре CCl_4 пик с наибольшим m/z соответствует катиону CCl_3^+ , поскольку молекулярный ион CCl_4^+ является неустойчивым.

7.2.2. Закономерности фрагментации

Дальнейший ход расшифровки масс-спектра основывается на закономерностях фрагментации. Предполагаемый путь фрагментации проверяют анализом положений пиков неустойчивых ионов.

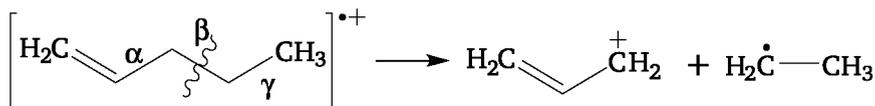
Примером установленных закономерностей фрагментации являются следующие схемы разрыва связей:

1. В алканах вероятность разрыва связи C–H уменьшается с увеличением длины цепи. Поскольку энергия разрыва связи C–C меньше, то более вероятен ее разрыв. При наличии разветвленной углеводородной цепи наиболее вероятен разрыв связей у места ветвления с образованием устойчивых третичных или четвертичных катионов:



При этом разрыв C–C связи с образованием радикала $\cdot\text{CH}_3$ маловероятен вследствие его низкой устойчивости. В масс-спектрах алканов прослеживается гомологическая серия пиков с массами 29, 43, 57, 71, ... (отвечают ионам $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+$). Как правило, наибольшую интенсивность имеют пики 43 и 57. Присутствует также менее интенсивная алкеновая серия (см. ниже).

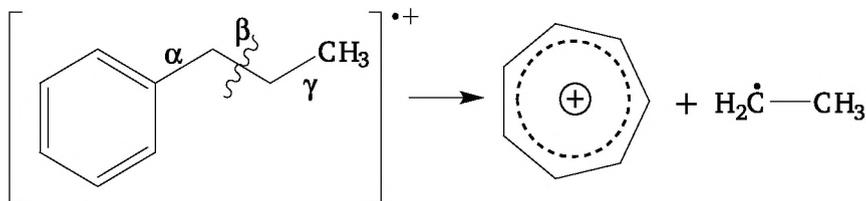
2. В непредельных системах углеводородная цепь разрывается в β -положении к двойной связи и образуется устойчивый аллильный катион:



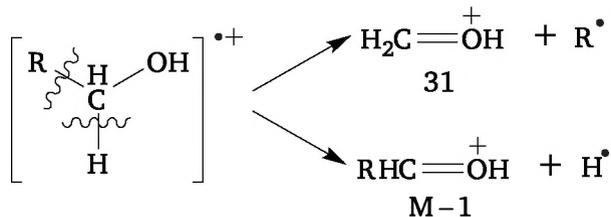
В масс-спектрах алкенов прослеживается серия 27, 41, 55, 69, ... (отвечают ионам $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+$). Возможно также присутствие менее интенсивной алкановой серии.

3. В масс-спектрах ароматических соединений присутствуют пики, соответствующие ионам бензольного кольца (75—78), а также продуктам его фрагментации — области пиков 38—40, 50—52, 63—65. В алкилароматических соединениях наиболее вероятен раз-

рыв β -связи с образованием перегруппировочного тропилиевого иона $C_7H_7^+$ (пик с массой 91) по схеме:

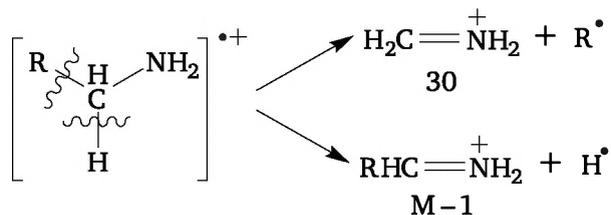


4. В масс-спектрах спиртов характерными осколочными ионами являются фрагменты с массами 31 и $M - 1$, которые соответствуют следующей схеме разрыва связей:

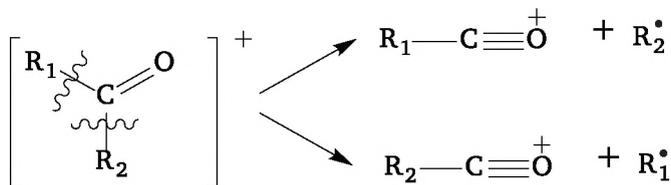


Предполагают, что при образовании ионов происходит стабилизация за счет образования кратной связи $CH_2=O^+H$ (31) или $RCH=O^+H$ ($M - 1$).

5. Для аминов H_2N-CH_2-R характерен разрыв связи с образованием иона $H_2N^+=CH_2$ (30). Значительным по интенсивности также является пик для иона $H_2N^+=CHR$ ($M - 1$):

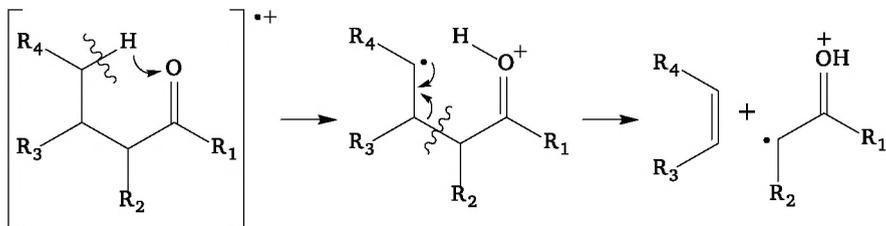


6. В кетонах происходит разрыв α -связи:



Поскольку масса фрагмента CO равна массе фрагмента $(CH_2)_2$, то образующиеся фрагменты имеют массы 43, 57, ..., совпадающие с массами фрагментов алкановой серии.

Если алкильная цепь содержит три или более атомов углерода, то происходит перегруппировка с участием атома водорода и разрывом β -связи:



Подобные и более детальные закономерности установлены для многих классов соединений. Они позволяют в определенной мере объяснить и предсказать фрагментацию молекулярных ионов и, наоборот, на основании масс-спектра установить химическое строение молекул.

В качестве простейшего примера рассмотрим масс-спектр этанола (рис. 7.3). Основной пик молекулярного иона (46) соответствует молекулярной массе. Наиболее интенсивными пиками фрагментных ионов являются 31 и 45 ($M - 1$), что соответствует известным закономерностям фрагментации для спиртов. Также в масс-спектре присутствуют пики катионов CH_3^+ (15), C_2H_5^+ (29) и C_2H_3^+ (27). Остальные пики менее интенсивны и соответствуют продуктам дальнейшего распада фрагментных ионов.

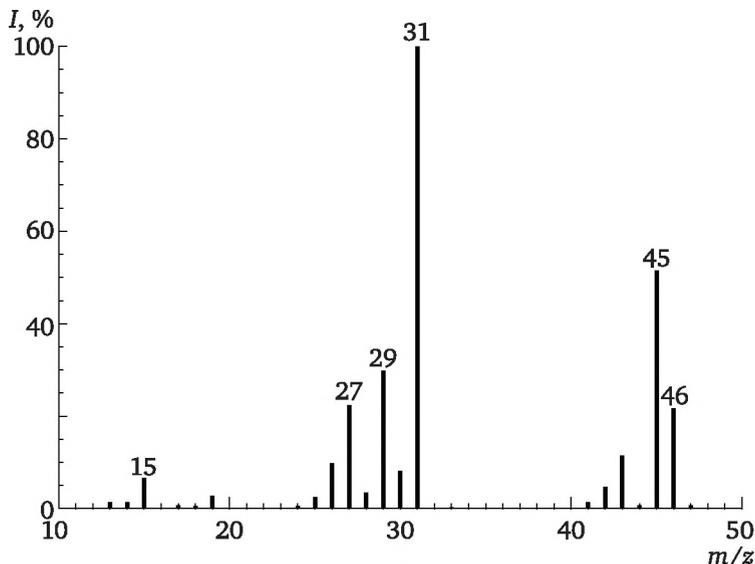


Рис. 7.3. Масс-спектр этанола

Поскольку масс-спектры представляют собой гистограмму пиков, то часто не приводят их графическое изображение, а ограни-

чиваются текстовой записью. В записи указывается способ ионизации (ЭУ — электронный удар) и энергия ионизации (70 эВ). Для каждого пика указывается значение m/z , его отнесение к конкретной структуре и относительная интенсивность (в скобках). Малоинтенсивные пики обычно опускают, за исключением пика молекулярного иона. Например, рассмотренный масс-спектр может быть представлен записью:

Масс-спектр (ЭУ, 70 эВ), m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 46 $[M]^+$ (22),
45 $[M-H]^+$ (51), 43 $[M-H-H_2]^+$ (11), 31 CH_2OH^+ (100),
29 $C_2H_5^+$ (30), 27 $C_2H_3^+$ (22), 15 CH_3^+ (7).

7.3. Возможности масс-спектрометрии

Масс-спектрометрия позволяет проводить идентификацию структур исследуемых соединений, определение молекулярной массы и брутто-формулы соединения по картине спектра в области молекулярного иона, дает возможность установления характера соединения, принадлежности к тем или иным классам органических веществ. Масс-спектрометрия позволяет выявлять отдельные фрагменты структуры по гомологическим сериям молекулярного и главных осколочных ионов. Практически редко удается установить полную структуру соединения только на основе масс-спектра. Но в сочетании с другими физико-химическими методами анализа масс-спектрометрия может дать исчерпывающее доказательство структуры или указание на ограниченное число изомеров.

Масс-спектрометрия в отдельности может применяться только для анализа чистых веществ, поскольку при наличии в анализируемом образце нескольких веществ их масс-спектры будут накладываться друг на друга, усложняя общую картину. Но сочетание масс-спектрометрии с хроматографией (метод хромато-масс-спектрометрии) является одним из наиболее информативных методов исследования. Данный метод позволяет производить количественный анализ смесей, включая определение микропримесей (до 10^{-14} г). Хромато-масс-спектрометрия является одним из основных методов анализа контроля качества (продуктов питания, фармацевтических препаратов и т. д.), а также в криминалистике (определение взрывчатых веществ, наркотических веществ, допинга).

Масс-спектрометрия дает возможность идентифицировать изотопы элементов в составе молекулы, поэтому метод незаменим для определения изотопного состава вещества. Например, метод масс-спектрометрии используют в ядерной энергетике для определения степени обогащения и чистоты образцов ядерного топлива. Также масс-спектрометрическим методом производят определение воз-

раста геологических пород по анализу содержания радиоактивных изотопов химических элементов, распадающихся с течением времени (радиоизотопное датирование). Одним из известных примеров является определение возраста археологических образцов органического происхождения по содержанию изотопа ^{14}C . Масс-спектрометрия позволила существенно повысить точность метода радиоизотопного датирования по сравнению с традиционным методом измерения радиоактивности.

Методом масс-спектрометрии при использовании мягких способов ионизации можно исследовать высокомолекулярные соединения с массой до нескольких млн г/моль (белки, полипептиды, нуклеиновые кислоты, синтетические полимеры и пр.), что обуславливает применение данного метода в биохимии и медицине.

Масс-спектрометрия позволяет проводить элементный анализ неорганических веществ, при этом одновременно определяются до 70 элементов.

Масс-спектрометрическим методом можно определять потенциалы ионизации и энергии диссоциации молекул, изучать элементарные химические процессы (ионизация, перегруппировки, ионные реакции).

Контрольные вопросы

1. В чем состоят теоретические основы метода масс-спектрометрии?
2. Что такое энергия ионизации? Какие типы фрагментации вам известны?
3. Опишите принципиальную схему масс-спектрометра.
4. Опишите методы ионизации, применяемые в масс-спектрометрии: электронный удар, химическая ионизация и др.
5. Каковы закономерности фрагментации молекулярного иона?
6. Опишите возможности масс-спектрометрии.

Тема 8

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА. КОНДУКТОМЕТРИЯ

8.1. Общая характеристика электрохимических методов анализа

Электрохимические методы анализа основаны на использовании электрохимических процессов, происходящих в электролитической ячейке (гальваническом элементе, цепи). Электролитическая ячейка представляет собой электрохимическую систему, состоящую из электродов и электролитов, контактирующих между собой. На границе раздела фаз может происходить электродная реакция между компонентами этих фаз, в результате которой электрический заряд переходит из одной фазы в другую, и на межфазной границе устанавливается потенциал. В состав электролитической ячейки входят два или три электрода, один из которых — индикаторный или рабочий, второй — электрод сравнения и третий — вспомогательный. Электрод, действующий как датчик, реагируя на фактор возбуждения и на состав раствора (не оказывая влияния на состав раствора за время измерения), является индикаторным. Электрод сравнения служит для создания измерительной цепи и поддержания постоянного значения потенциала индикаторного (рабочего) электрода. Используемый в трехэлектродной ячейке вспомогательный электрод (противоэлектрод) вместе с рабочим электродом включен в цепь, через которую проходит электрический ток. В состав электролитической ячейки могут входить два идентичных электрода, выполняющих одинаковую функцию.

Электрохимические методы анализа основаны на использовании зависимости электрических параметров от концентрации, природы и структуры вещества, участвующего в электродной (электрохимической) реакции или электрохимическом процессе переноса зарядов между электродами. Согласно рекомендациям ИЮПАК электрохимические методы анализа можно классифицировать следующим образом:

- 1) методы без протекания электродной реакции, в которых строение двойного электрического слоя в расчет не принимается (кондуктометрия);

2) методы, основанные на электродных реакциях в отсутствие тока (потенциометрия) или под током (вольтамперометрия, кулонометрия, электрогравиметрия).

Электрические параметры (сила тока, напряжение, сопротивление) могут служить аналитическими сигналами, если они измерены с достаточной точностью. Электрохимические методы анализа используют либо для прямых измерений, основанных на зависимости «аналитический сигнал — состав», либо для индикации конечной точки титрования в титрометрии. Электрохимические методы анализа позволяют определять концентрацию вещества в широком интервале ($1-10^{-9}$ моль/л) с достаточной точностью и воспроизводимостью, могут быть легко автоматизированы.

8.2. Электропроводность растворов электролитов

Кондуктометрия — это метод определения различных физико-химических величин, основанный на измерении электрической проводимости (электропроводности).

Электропроводностью (L) называют способность растворов электролитов проводить электрический ток под действием внешнего электрического поля. Электропроводность есть величина, обратная электрическому сопротивлению:

$$L = 1/R.$$

Единицей электропроводности является сименс (См), $[См] = [Ом^{-1}]$.

Для определения электропроводности может использоваться кондуктометрическая ячейка — стеклянный сосуд без дна с двумя электродами известной площади (S), прочно укрепленными на фиксированном расстоянии друг от друга (l). Электроды выполнены из платиновой черни. Ячейку погружают в раствор электролита. Сопротивление кондуктометрической ячейки измеряют при помощи специального устройства — мостика Уитстона (рис. 8.1). Скользящий контакт перемещается по проволочному сопротивлению до тех пор, пока осциллограф не зарегистрирует минимальный сигнал. В этом положении контакта (точка X) сопротивление ячейки R_x определяется соотношением

$$R_x = BX \cdot R_r / AX,$$

где R_r — сопротивление реостата.

После того как найдено сопротивление ячейки, можно вычислить электропроводность раствора. Отношение $K = l/S$ представляет собой постоянную величину, характерную для данной ячейки.

Она называется постоянной, или константой ячейки (сосуда). Постоянная сосуда является очень важной характеристикой ячейки. Она зависит от площади электродов, расстояния между ними, формы сосуда и объема раствора, проводящего ток. Вследствие того что в переносе электричества участвует заметно больший объем раствора, чем тот, который заключен между электродами, уровень жидкости, заливаемой в сосуд для измерения электропроводности, должен превышать край электродов примерно на два расстояния между электродами.

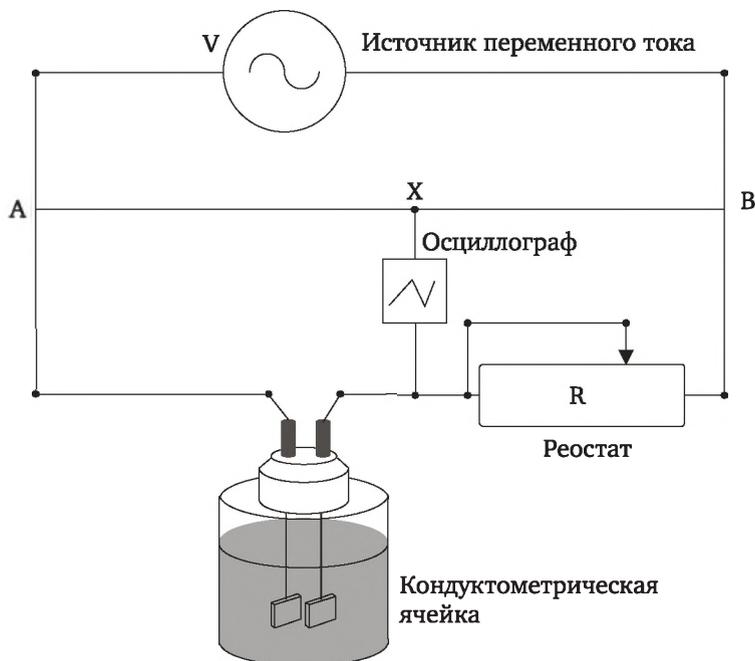


Рис. 8.1. Мостик Уитстона

Постоянную сосуда находят экспериментально по электрической проводимости стандартных растворов с хорошо известными значениями электропроводности (сопротивлениями — R) в широкой области температур и концентраций. Обычно в качестве стандартных растворов используют водные растворы хлорида калия. Для определения константы сосуда измеряют сопротивление 0,02 М раствора KCl.

8.2.1. Удельная электропроводность

Различают удельную и молярную электропроводности. Удельная электропроводность является величиной, обратной удельному сопротивлению, и обозначается символом χ (греческая «каппа»). Таким образом, $\chi = 1/\rho$, где ρ — удельное сопротивление (измеряется в единицах Ом·м).

Если $R = \rho l/S$, где R — сопротивление проводника (Ом); l — длина проводника (м); S — площадь поперечного сечения (м^2), то $\rho = RS/l$, откуда $\chi = l/(SR)$, размерность $[\text{Ом}^{-1} \cdot \text{м}^{-1}]$ либо $[\text{Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}]$. Вместо этого могут использоваться $[\text{См} \cdot \text{м}^{-1}]$ либо $[\text{См} \cdot \text{см}^{-1}]$.

Удельной электропроводностью называют электропроводность столбика раствора электролита длиной 1 см и поперечным сечением 1 см^2 .

Если вместо отношения l/S использовать величину K [см^{-1}] — постоянную сосуда, которая характеризует геометрию электрода, то

$$\chi = K/R.$$

Электропроводность растворов электролитов зависит от скорости движения ионов, температуры и концентрации ионов.

Зависимость удельной электропроводности от скорости движения ионов и температуры. Пусть электрический ток проходит через раствор электролита, помещенный в стеклянную трубу с поперечным сечением 1 см^2 , при расстоянии между электродами 1 см и разности потенциалов E (вольт). Пусть W_- и W_+ — абсолютные скорости движения катионов и анионов, а C — концентрация раствора электролита [моль/л]. Если степень диссоциации электролита равна α , то концентрация катионов и анионов равна $\alpha C/1000$ [моль/ см^3].

Подсчитаем количество электричества, которое переносится через поперечное сечение трубки за 1 с. Через сечение 1 см^2 катионов за это время пройдет $W_+ \alpha CE/1000$ моль, и они перенесут $W_+ \alpha CEF/1000$ Кулонов электричества (1 моль переносит количество электричества, равное числу Фарадея $F = 96\,500$ Кл/моль). Анионы в обратном направлении перенесут $W_- \alpha CEF/1000$ Кулонов электричества.

Сила тока I , т. е. общее количество электричества, проходящего через данное поперечное сечение (1 см^2) раствора в 1 с, равна сумме количеств электричества, переносимого ионами в обоих направлениях:

$$I = (W_+ + W_-) \alpha CEF/1000.$$

Закон Ома в расчете на единицу площади поперечного сечения можно записать как

$$I = E/\rho = \chi E.$$

Тогда

$$\chi = \alpha CF(W_+ + W_-)/1000. \quad (8.1)$$

Удельная электропроводность пропорциональна концентрации раствора, скорости движения ионов и переносимому каждым ионом заряду.

При повышении температуры на один градус χ возрастет на 2—2,5 % за счет понижения вязкости раствора и уменьшения степени гидратации ионов (повышения скорости движения ионов). При повышении давления удельная электропроводность понижается.

Зависимость удельной электропроводности от концентрации электролита. В разбавленных растворах слабых и сильных электролитов удельная электропроводность с увеличением концентрации растет, но при некоторой достаточно высокой концентрации достигает максимума и затем падает. На рис. 8.2 приведены типичные примеры этой зависимости. Электрическая проводимость слабого электролита (CH_3COOH) значительно ниже соответствующей величины для растворов H_2SO_4 или KOH .

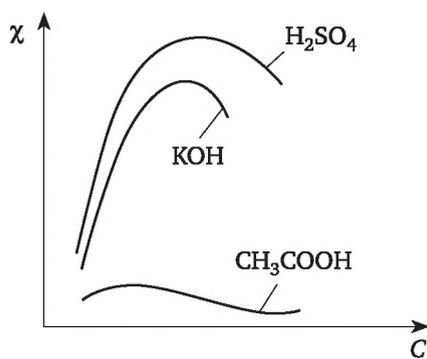


Рис. 8.2. Изменение удельной электропроводности электролитов с концентрацией

Возрастание электрической проводимости с ростом концентрации в растворах происходит вследствие увеличения числа ионов. Однако в концентрированных растворах возникают и другие эффекты, приводящие к уменьшению электропроводности.

В концентрированных растворах сильных электролитов ($\alpha = 1$) уравнение (8.1) принимает вид

$$\chi = k'C(W_+ + W_-),$$

где $k' = F/1000$.

С ростом концентрации возрастают силы межйонного взаимодействия, вследствие чего происходит образование межйонных ассоциатов, или ионных пар, что приводит к снижению скорости движения ионов (W_+ и W_-) и, следовательно, уменьшению электрической проводимости.

Так как для слабых электролитов $W_+ + W_- = \text{const}$, то уравнение (8.1) принимает вид $\chi = k''C\alpha$, где $k'' = F(W_+ + W_-)/1000$. В концентрированных растворах удельная электропроводность падает, так как уменьшается степень диссоциации (чем больше концентрация, тем ниже α).

8.2.2. Молярная электропроводность

Молярная электропроводность является более удобной величиной, так как она относится к объему раствора, содержащему 1 моль вещества.

Молярной электропроводностью (λ) называется электропроводность раствора, содержащего 1 моль растворенного вещества и находящегося между двумя параллельными электродами, расстояние между которыми 1 см.

Удельная и молярная электропроводности взаимосвязаны соотношением

$$\lambda = \chi / C = \chi \varphi,$$

где C — концентрация раствора, выраженная в моль/см³; φ — разведение, объем раствора в миллилитрах, содержащий 1 моль вещества.

Так как размерность удельной электропроводности (χ) [Ом⁻¹·см⁻¹], а концентрация выражена в моль/см³, то размерность молярной электропроводности (λ) [Ом⁻¹·см²/моль].

Молярная электропроводность как для сильных, так и для слабых электролитов возрастает с увеличением разведения, т. е. с уменьшением концентрации, и достигает некоторого определенного значения (рис. 8.3). Это объясняется тем, что у слабых электролитов по мере разбавления растет степень диссоциации (α), т. е. увеличивается число ионов; у сильных электролитов увеличивается расстояние между ионами, ослабляются силы взаимного притяжения между ними и, следовательно, увеличиваются скорости движения ионов.



Рис. 8.3. Изменение молярной электропроводности с разбавлением раствора

Разведение, при котором достигается максимальное значение молярной электропроводности, условно называется молярной электропроводностью при бесконечном разведении (λ_{∞}).

8.3. Кондуктометрическое титрование

Наибольшее практическое значение имеет кондуктометрическое титрование, позволяющее определить концентрацию вещества в растворе путем измерения электропроводности при титровании. Метод особенно удобен при анализе мутных или сильно окрашенных растворов, когда нельзя использовать обычные индикаторы. Этот метод дает более высокую точность.

Об эквивалентной точке титрования судят по изменению характера зависимости электропроводности раствора от объема добавляемого титранта. Точку эквивалентности определяют по резкому излому кривой титрования (пересечению двух прямых), отражающему изменение электропроводности исследуемого раствора по мере прибавления титранта в процессе титрования.

Факторами, влияющими на электропроводность исследуемого раствора при титровании, являются изменение концентрации ионов и их подвижности. Рассмотрим вид этих кривых применительно к кислотно-основному титрованию.

Титрование сильной кислоты сильным основанием.

Рассмотрим кривую титрования соляной кислоты гидроксидом натрия (рис. 8.4). Напишем реакцию в ионном виде:



До прибавления щелочи электропроводность определялась подвижностью ионов H^+ и Cl^- . До точки эквивалентности (Т. Э.) происходит замена подвижного иона H^+ на менее подвижный ион Na^+ (электропроводность падает за счет уменьшения подвижности). В момент полной нейтрализации в растворе остаются только ионы Na^+ и Cl^- .

После точки эквивалентности начинается подъем электропроводности, так как в растворе будет нарастать концентрация ионов Na^+ и OH^- . Однако возрастание будет более пологим, так как подвижность иона OH^- почти в 2 раза меньше подвижности иона водорода.

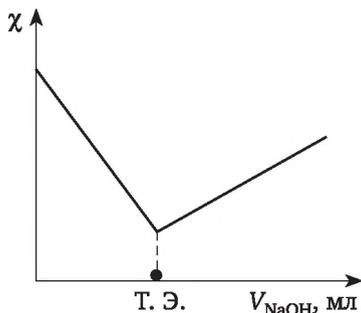
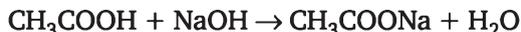


Рис. 8.4. Кривая кондуктометрического титрования сильной кислоты сильным основанием

Титрование слабой кислоты сильным основанием.

Рассмотрим кривую титрования уксусной кислоты гидроксидом натрия (рис. 8.5). Имеем реакцию



Поскольку кислота слабая, то электропроводность исходного раствора мала, так как ионов H^+ мало. По мере добавления раствора сильного основания электропроводность увеличивается из-за накопления ионов соли, так как соль диссоциирует полностью. После достижения точки эквивалентности электропроводность растет за счет увеличения концентрации ионов Na^+ и ионов OH^- с высокой подвижностью.

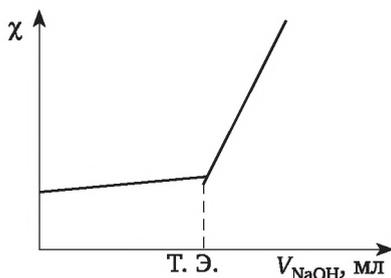


Рис. 8.5. Кривая кондуктометрического титрования слабой кислоты сильным основанием.

Титрование смеси сильной и слабой кислот сильным основанием.

При титровании смеси сильной и слабой кислот сильным основанием в первую очередь оттитровывается сильная кислота, так как диссоциация слабой кислоты подавлена присутствием сильной. При дальнейшем прибавлении щелочи происходит титрование слабой кислоты. Кривая титрования (рис. 8.6) имеет два излома, соответствующих двум точкам эквивалентности: первая показывает объем щелочи, пошедшей на титрование сильной кислоты, а вторая дает общий объем щелочи, израсходованный на титрование обеих кислот.

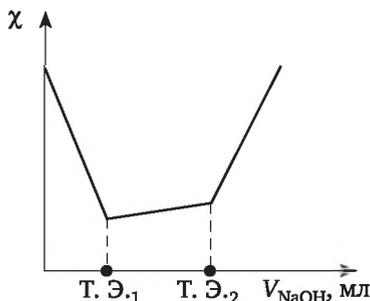


Рис. 8.6. Кривая кондуктометрического титрования смеси сильной и слабой кислот

Следует учитывать, что в ходе титрования исходный объем должен оставаться практически постоянным. Для получения прямых линий необходимо, чтобы объем прибавляемого титранта в эквивалентной точке не превышал 2 % от анализируемого объема. Это достигается разбавлением исходного раствора в 15—20 раз, либо концентрация титранта должна быть на порядок выше концентрации анализируемого раствора.

8.4. Применение кондуктометрических методов анализа

Электропроводность раствора может служить индикаторным свойством при определении содержания вещества в растворе. Метод кондуктометрии позволяет определить растворимость малорастворимых солей:

$$\chi = C\alpha (\lambda_+ + \lambda_-)/1000.$$

Так как растворимость мала, то раствор очень разбавленный, поэтому $\alpha = 1$, скорость движения ионов предельная:

$$\lambda_+ + \lambda_- = (\lambda_+)_\infty + (\lambda_-)_\infty = \lambda_\infty.$$

Тогда $\chi = C \cdot \lambda_\infty/1000$, откуда

$$C = \chi \cdot 1000/\lambda_\infty,$$

где λ_∞ — молярная электропроводность для бесконечно разбавленных растворов (приведена в справочниках); χ — удельная электропроводность электролита.

На практике для определения растворимости труднорастворимых солей в воде сначала измеряют электропроводность чистой воды, а затем электропроводность насыщенного раствора соли. Пусть удельная электропроводность воды равна $\chi_{\text{вода}}$, а удельная электропроводность насыщенного раствора вещества АВ равна $\chi_{\text{раствор}}$. Следовательно, электропроводность вещества АВ будет:

$$\chi_{\text{AB}} = \chi_{\text{раствор}} - \chi_{\text{вода}}.$$

Кондуктометрические методы анализа применяются в промышленности для аналитического контроля концентрации солевых растворов, содержания солей в поверхностных и подземных водах, для контроля очистки и качества воды, оценки загрязненности сточных вод.

Кондуктометрические методы имеют определенные преимущества перед другими методами анализа, поскольку позволяют:

1) проводить определения в мутных и окрашенных растворах, а также в присутствии окислителей и восстановителей, ограничивающих применение органических индикаторов;

2) анализировать не только концентрированные растворы, но и разбавленные (до 10^{-4} моль/л);

3) проводить исследование не только водных, но и неводных, а также смешанных водно-органических растворов;

4) широко использовать разнообразные типы реакций: нейтрализации, осаждения, комплексообразования, окисления-восстановления, присоединения, замещения, омыления и т. д., сопровождающиеся изменением электропроводности исследуемых растворов;

5) во многих случаях избегать предварительного отделения примесей, обычно мешающих определению другими методами.

Контрольные вопросы

1. Что такое электропроводность, какова ее размерность? На каком принципе основан метод определения электропроводности?

2. Что такое удельная электропроводность, какова ее размерность? Как зависит удельная электропроводность от концентрации ионов и их подвижности?

3. Что такое постоянная сосуда, каков ее физический смысл?

4. Что такое молярная электропроводность, какова ее размерность? Как молярная электропроводность зависит от концентрации ионов?

5. Как влияет температура на электропроводность?

6. Почему нельзя проводить измерение электропроводности раствора, если электроды не полностью погружены в жидкость?

7. В чем состоит сущность метода кондуктометрического титрования?

8. Опишите кривые кондуктометрического титрования для сильной и слабой кислоты и их смеси.

9. В каких случаях имеет место отклонение кривых от линейного хода?

10. Какие преимущества имеет метод кондуктометрического титрования перед другими объемными методами?

Тема 9

ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ

Потенциометрия — это метод определения различных физико-химических величин, основанный на измерении электродвижущей силы обратимых гальванических элементов или на измерении электродного потенциала индикаторного электрода:

$$E = \varphi_1 - \varphi_2,$$

где E — электродвижущая сила (ЭДС); φ_1 и φ_2 — потенциалы электродов исследуемой цепи.

По данным потенциометрических измерений вычисляют константы равновесия, константы диссоциации кислот и оснований, константы устойчивости координационных соединений, произведения растворимости, определяют активности и коэффициенты активности электролитов, водородный показатель (рН) и т. д. Если удастся провести реакцию в гальваническом элементе и определить его ЭДС, то можно рассчитать значения основных термодинамических функций и характеристик:

$$\Delta G^\circ = -zFE^\circ;$$

$$\Delta S^\circ = zF \frac{dE^\circ}{dT}.$$

Отсюда:

$$\Delta H^\circ = \Delta G^\circ + T \cdot \Delta S^\circ;$$

$$E^\circ = \frac{RT}{zF} \ln K_a,$$

где ΔG° — изменение стандартной молярной свободной энергии; z — число электронов, принимающих участие в электродной реакции; F — постоянная Фарадея, равная 96 500 Кл/моль; E° — стандартная ЭДС гальванического элемента; ΔS° — изменение стандартной молярной энтропии реакции; T — абсолютная температура, К; ΔH° — изменение стандартной молярной энтальпии реакции; R — универсальная газовая постоянная; K_a — константа равновесия окислительно-восстановительной реакции, протекающей в элементе.

Потенциометрические методы анализа подразделяют на прямую потенциометрию (ионометрию) и потенциометрическое титрование. Методы прямой потенциометрии основаны на прямом применении уравнения Нернста для нахождения активности или концентрации участника электродной реакции по экспериментально измеренной ЭДС цепи или потенциалу соответствующего электрода. При потенциометрическом титровании точку эквивалентности определяют по резкому изменению (скачку) потенциала индикаторного электрода вблизи точки эквивалентности.

9.1. Электродный потенциал

В настоящее время отсутствуют теоретические и экспериментальные методы определения абсолютных значений потенциалов, соответствующих отдельным электродам. Можно точно определить только ЭДС цепи, составленной из данного электрода и некоторого стандартного электрода, потенциал которого условно принимают равным нулю.

В. Г. Нернст предложил в качестве стандартного электрода (или электрода сравнения) использовать стандартный водородный электрод, так как легче всего получить чистый водород. Стандартный водородный электрод — это водородный электрод, работающий при активности ионов водорода, равной единице, и при фугитивности (парциальном давлением водорода), равной 1 атм.

$$E = \Phi_{\text{правый}} - \Phi_{\text{левый}} = \Phi_{\text{правый}} - \Phi_{\text{H}_2}^{\circ} = \Phi_{\text{правый}}$$

Электродным потенциалом называется ЭДС гальванического элемента, составленного из данного и стандартного водородного электродов, последний условно принимается равным нулю.

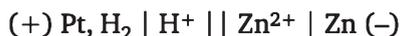
Например, для нахождения электродного потенциала меди составляют элемент:



Тогда

$$E = \Phi_{\text{пр}} - \Phi_{\text{лев}} = \Phi_{\text{Cu}^{2+} \mid \text{Cu}} - \Phi_{\text{H}^+ \mid \text{H}_2}^{\circ} = \Phi_{\text{Cu}^{2+} \mid \text{Cu}} = +0,337 \text{ В.}$$

Для определения электродного потенциала цинка составляют элемент

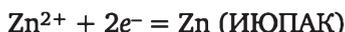


ЭДС этого элемента отрицательна, так как слева находится положительный электрод. За положительное направление ЭДС прини-

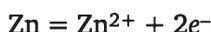
мают направление, когда электрический ток внутри цепи протекает слева направо (в случае медного электрода). В случае цинкового электрода — наоборот ($\varphi_{\text{Zn}} = -E$):

$$-E = \varphi_{\text{Zn}^{2+}|\text{Zn}} - \varphi_{\text{H}^+|\text{H}_2}^\circ = \varphi_{\text{Zn}^{2+}|\text{Zn}} = -0,763\text{В}.$$

Все реакции, протекающие на электроде, по Женевской конвенции (ИЮПАК) записывают как реакции восстановления:



На самом деле имеем



Уравнение Нернста для электродного потенциала имеет вид

$$\varphi = \varphi^\circ + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{окисл. форма}}}{a_{\text{восст. форма}}},$$

где φ° — стандартный электродный потенциал, т. е. потенциал данного электрода при активности реагентов, участвующих в электродной реакции, равной единице.

9.2. Электроды сравнения

На практике потенциометрия заключается в измерении ЭДС гальванического элемента, составленного из двух полуэлементов: индикаторного электрода и электрода сравнения. Потенциал электрода сравнения должен оставаться постоянным независимо от протекания каких-либо реакций в анализируемом растворе. Электроды сравнения должны обладать устойчивым во времени воспроизводимым потенциалом, не меняющимся при прохождении небольшого тока.

Водородный электрод является основным электродом сравнения. Его потенциал принимают равным нулю. Это газовый электрод первого рода. *Электроды первого рода* — это электроды, обратимые относительно катиона, т. е. работающие на основе обмена катионом между электродом и раствором.

Водородный электрод используется в паре с исследуемым электродом для измерения электродного потенциала. Состоит из платиновой пластинки, электролитически покрытой мелко раздробленной чернью (платиновой чернью). Такая пластинка опускается в раствор, содержащий ионы водорода с активностью $a_{\text{H}^+} = 1$, и непрерывно омывается током чистого водорода с летучестью (f), равной 1 (рис. 9.1).

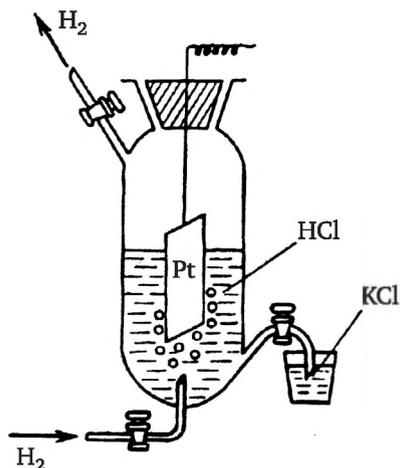
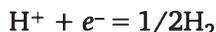


Рис. 9.1. Водородный электрод

Водород адсорбируется на платиновой черни. Она является катализатором электродного процесса: ускоряет процесс адсорбции водорода, диссоциации молекул водорода на атомы и ионизации атома водорода с образованием протона и электрона.

Схема водородного электрода: $\text{Pt, H}_2 \mid \text{H}^+$. Электродная реакция, протекающая на водородном электроде:



Уравнение Нернста для водородного электрода:

$$\varphi_{\text{H}_2} = \varphi^\circ_{\text{H}_2} + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{H}^+}}{(a_{\text{H}_2})^{1/2}}$$

Так как $\varphi^\circ_{\text{H}_2} = 0$, $a_{\text{H}_2} = f_{\text{H}_2} = 1$, $\text{pH} = -\lg a_{\text{H}^+}$, то

$$\varphi_{\text{H}_2} = \frac{RT}{F} \ln a_{\text{H}^+} = 2,303 \frac{RT}{F} \lg a_{\text{H}^+} = -2,303 \frac{RT}{F} \text{pH}.$$

Если $T = 298 \text{ K}$; $F = 96\,500 \text{ Кл/моль}$; $R = 8,314 \text{ Дж}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1}$, то

$$\varphi_{\text{H}_2} = -0,059 \text{ pH}.$$

Таким образом, водородный электрод является обратимым относительно ионов H^+ . Его можно использовать для определения pH:



$$E = \varphi_{\text{правый}} - \varphi_{\text{левый}} = \varphi_{\text{AgCl}} - \varphi_{\text{H}_2} = \varphi_{\text{AgCl}} - 0,059 \lg a_{\text{H}^+} = \varphi_{\text{AgCl}} + 0,059 \text{pH},$$

$$\text{pH} = (E - \varphi_{\text{AgCl}}) / 0,059.$$

Водородный электрод обладает высокой точностью, хорошей воспроизводимостью результатов, может работать в интервале рН от 0 до 14 при любых давлениях водорода и при любых температурах. Недостатки: равновесие между электродом и раствором устанавливается в течение 20—30 мин, платина быстро отравляется каталитическими ядами, в присутствии окислителей и восстановителей дает неверный результат.

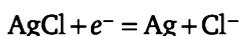
На практике в качестве электродов сравнения используются электроды второго рода, потенциал которых по отношению к водородному (стандартному) точно известен (хлорсеребряный и каломельный).

Электроды второго рода — это электроды, обратимые относительно аниона. Состоят из металла, покрытого слоем малорастворимой соли металла, и опущены в раствор растворимой соли, имеющей общий анион с малорастворимой солью.

Хлорсеребряный электрод представляет собой серебряную проволоку или пластинку, покрытую слоем AgCl и помещенную в раствор KCl или HCl определенной концентрации (обратим относительно ионов хлора).

Схема полуэлемента: Ag, AgCl | Cl⁻.

Электродная реакция, протекающая на хлорсеребряном электроде:



Уравнение Нернста для хлорсеребряного электрода (электрод второго рода):

$$\varphi_{\text{x.c}} = \varphi^{\circ}_{\text{x.c}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{AgCl}}}{a_{\text{Ag}} a_{\text{Cl}^-}}$$

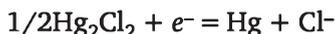
Так как $a_{\text{Ag}} = 1$, $a_{\text{AgCl}} = 1$, получаем

$$\varphi_{\text{x.c}} = \varphi^{\circ}_{\text{x.c}} - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{Cl}^-}$$

В *каломельном электроде* паста из ртути и каломели (Hg₂Cl₂) помещена в раствор KCl (обратим относительно ионов хлора — электрод второго рода).

Схема полуэлемента: Hg, Hg₂Cl₂ | Cl⁻.

Ему отвечает реакция



Потенциал каломельного электрода равен

$$\varphi_{\text{к.э}} = \varphi^{\circ}_{\text{к.э}} - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{Cl}^-}$$

Потенциалы хлорсеребряного, каломельного и ряда других электродов сравнения изучены при различных концентрационных и температурных условиях, и их величины по отношению к стандартному водородному электроду хорошо известны (справочные данные).

9.3. Индикаторные электроды

Индикаторным называют электрод, потенциал которого зависит от концентрации (активности) определяемого иона.

Индикаторный электрод — электрод, который служит для определения точки эквивалентности при титровании.

1. Для окислительно-восстановительного титрования в качестве индикаторного электрода используется инертный металлический электрод, в качестве электрода сравнения — каломельный электрод.

2. Для осадительного титрования используется ионселективный электрод в сочетании с каким-либо электродом сравнения. Например, для титрования хлорида калия нитратом серебра применяют серебряный электрод, селективный к ионам серебра.

3. Для кислотно-основного титрования используется стеклянный электрод в сочетании с хлорсеребряным или каломельным электродом. Показания прибора могут считываться в вольтах либо, если используется рН-метр, в единицах рН.

Стеклянный электрод. Стеклянный электрод (рис. 9.2) представляет собой тонкостенный стеклянный шарик 1, заполненный раствором HCl (0,1 М) либо буферным раствором 2. Внутри шарика помещают вспомогательный хлорсеребряный электрод 3. Это устройство обычно закрывают защитной трубкой 4.

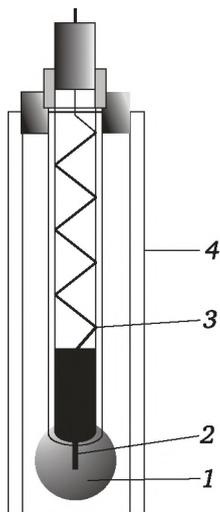


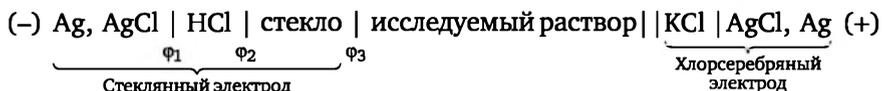
Рис. 9.2. Стеклянный электрод

Перед работой стеклянный электрод некоторое время вымачивают в 0,1 М растворе HCl. При этом ионы водорода из раствора обмениваются на ионы натрия из стеклянной мембраны и в системе устанавливается некоторое равновесие. Подготовленный таким образом электрод, в котором протоны поверхности стекла находятся в равновесии с протонами раствора, может быть использован для определения pH. Величина скачка потенциала на границе «раствор — внешняя поверхность мембраны стеклянного электрода» зависит от активности ионов водорода в исследуемом растворе.

От ранее рассмотренных электродов стеклянный электрод отличается тем, что в потенциалопределяющей реакции электроны не принимают участия. Электродная реакция на стеклянном электроде представляет собой обмен ионами водорода между анализируемым раствором и стеклом (стеклянной мембраной):



Стеклянный электрод является ионообменным электродом. Для его изготовления используются специальные сорта ионитов. Переход иона водорода из одной фазы в другую эквивалентен переносу единицы заряда ($z = 1$). Стеклянный электрод обычно используют в паре с хлорсеребряным электродом сравнения. Применяемую при этом электрохимическую цепь можно записать следующим образом:



Потенциал стеклянного электрода включает три скачка:

φ_1 — скачок потенциала на границе раздела «металл внутреннего электрода — буферный раствор» (или 0,1 М HCl), $\varphi_1 = \text{const}$;

φ_2 — скачок потенциала на границе «буферный раствор (или 0,1 М HCl) — внутренняя поверхность мембраны» (стекло), $\varphi_2 = \text{const}$;

φ_3 — скачок потенциала на границе «внешняя поверхность мембраны (стекло) — исследуемый раствор», $\varphi_3 \neq \text{const}$.

Потенциал стеклянного электрода выражается уравнением Нернста

$$\varphi_{\text{ст}} = \varphi_{\text{ст}}^{\circ} + \frac{RT}{F} \ln a_{\text{H}^+}.$$

Стандартный потенциал стеклянного электрода $\varphi_{\text{ст}}^{\circ}$ зависит от сорта стекла мембраны, состава внутреннего раствора и температуры. Рассчитать его невозможно, так как он включает потенциал асимметрии, обусловленный различием электрохимических свойств внутренней и внешней поверхностей стеклянной мем-

браны. С целью уменьшения потенциала асимметрии стеклянный электрод вымачивают в 0,1 М растворе HCl и после этого хранят в дистиллированной воде.

ЭДС гальванического элемента равна (при 25 °С):

$$\begin{aligned} E &= \varphi_{\text{правый}} - \varphi_{\text{левый}} = \varphi_{\text{х.с}} - \varphi_{\text{ст}} = \\ &= \varphi_{\text{х.с}} - \varphi_{\text{ст}}^{\circ} - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{H}^+} = \varphi_{\text{х.с}} - \varphi_{\text{ст}}^{\circ} + 0,059\text{pH}. \end{aligned}$$

Таким образом, стеклянный электрод является обратимым относительно ионов H^+ (электрод первого рода), его можно использовать для определения pH. Так как рассчитать $\varphi_{\text{ст}}^{\circ}$ невозможно, эта операция заменяется настройкой приборов (pH-метров) по стандартным буферным растворам, поскольку шкала pH-метров проградуирована непосредственно в единицах pH.

При потенциометрическом титровании со стеклянным электродом не требуется калибровки последнего, так как отчет ведут не по шкале pH, а по шкале ЭДС.

Основные достоинства стеклянного электрода: простота работы, устойчивость к действию ядов, применимость в широкой области pH, быстрое установление равновесия и возможность определения pH в окислительно-восстановительной системе (так как электроны не участвуют в электродном процессе). К недостаткам относят хрупкость их конструкции и усложнение работы при переходе к сильно щелочным и сильно кислым растворам.

9.4. Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование применяют для реакций нейтрализации, осаждения, комплексообразования и окислительно-восстановительных. Во всех случаях индикаторный электрод должен быть обратимым по отношению к ионам водорода в растворе либо по отношению к ионам, образующим комплексное или труднорастворимое соединение, выпадающее в осадок.

Потенциометрическое титрование широко используется для определения концентрации кислот, оснований и их смесей. Метод применяется для титрования окрашенных или мутных растворов, когда использование индикаторов затруднено. Сущность его состоит в том, что точка эквивалентности находится не по переходу окраски индикатора, а по резкому изменению потенциала индикаторного электрода.

Практически потенциометрическое титрование кислот осуществляется следующим образом: составляют гальванический элемент, у которого один электрод — индикаторный, другой — электрод сравнения (хлорсеребряный, каломельный). Для экспериментального определения pH могут быть использованы различные инди-

катодные электроды: водородный, стеклянный, хингидронный и др. Наибольшее практическое применение в последнее время нашел стеклянный электрод, используемый в широком интервале рН и в присутствии окислителей.

В известный объем титруемого раствора прибавляют небольшими порциями при постоянном перемешивании титрант и каждый раз измеряют ЭДС элемента. Для нахождения точки эквивалентности строят кривую титрования, нанося по оси ординат ЭДС гальванического элемента (рис. 9.3, а) или потенциалы индикаторного электрода (рис. 9.3, б), а по оси абсцисс — количество реагента (мл). Скачок потенциала отвечает эквивалентной точке (Т. Э.). Титрующий раствор (титрант) должен быть примерно в 10 раз более концентрированным, чем титруемый.

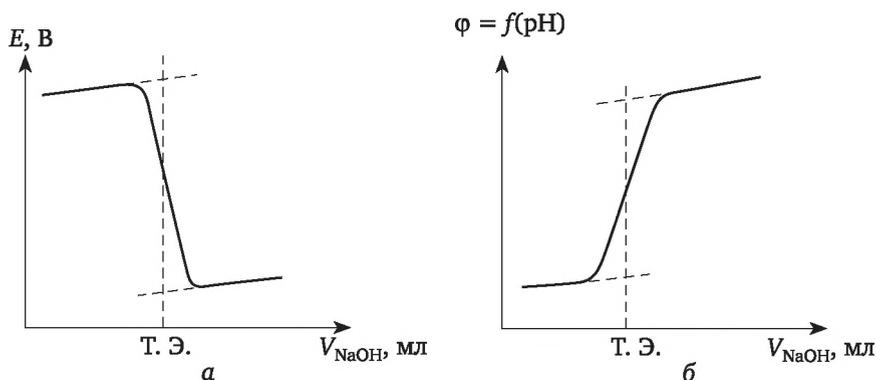


Рис. 9.3. Кривые потенциометрического титрования

Как видно, в ходе титрования происходит уменьшение ЭДС гальванического элемента или резкое увеличение потенциала индикаторного электрода. По кривым титрования можно определить точку эквивалентности: строят касательные к трем участкам кривой титрования, находят середину отрезка, опускают перпендикуляр на ось абсцисс и определяют число миллилитров прибавляемого титранта. Зная объем титранта, израсходованного на титрование до точки эквивалентности, и концентрацию титранта, можно рассчитать содержание анализируемого вещества во взятой пробе.

Потенциометрическое титрование может применяться не только для определения одного компонента, но и для дифференцированного титрования смеси кислот и оснований. Потенциометрический метод позволяет провести количественное определение компонентов в смеси кислот, если константы диссоциации в воде различаются не менее чем на четыре порядка. Если константы двух кислот в воде отличаются на 2—3 порядка, то они не могут быть отдельно оттитрованы в водной среде. На кривой титрования имеет место один скачок потенциала, когда обе кислоты оттитрованы совместно.

Существует группа растворителей (неводные), которые обладают дифференцирующим действием. Так, если константы двух кислот в водном растворе близки, то в среде дифференцирующего растворителя различие в величинах констант диссоциации увеличивается: константа диссоциации слабой кислоты уменьшается в большей степени. Например, определение содержания соляной и монохлоруксусной кислот в смеси титрованием водного раствора является сложной задачей в связи с трудностью обнаружения двух скачков титрования. При титровании в ацетоне оба скачка выражены достаточно четко, и содержание каждой кислоты в смеси может быть рассчитано. Некоторые двухосновные кислоты не удается ступенчато оттитровать в воде, тогда как в среде органического растворителя на кривых титрования наблюдаются два скачка.

В общем случае дифференцирующее действие является результатом комплексного влияния свойств растворителя на константы диссоциации и отношение констант диссоциации электролитов. В каждом отдельном случае может преобладать то или иное действие растворителя на электролит: величина диэлектрической проницаемости (ϵ), сольватирующая способность, кислотно-основные свойства. Например, дифференцирующее действие ацетона объясняется очень низкими кислотно-основными свойствами.

9.5. Прямая потенциометрия

Методы прямой потенциометрии основаны на непосредственном применении уравнения Нернста для нахождения активности или концентрации участника электродной реакции по экспериментально измеренной ЭДС цепи или потенциалу электрода. Наибольшее распространение среди прямых потенциометрических методов получил метод определения рН, хотя создание в последнее время надежно работающих ионоселективных электродов значительно расширило практические возможности прямых методов. Прямые потенциометрические методы часто стали называть ионометрическими методами анализа или ионометрией. Эта группа методов интенсивно развивается в связи с успехами в конструировании и улучшении качества ионоселективных электродов, позволяющих проводить быстро и точно определение концентрации или активности ионов и обладающих рядом других достоинств.

Водородный показатель и потенциометрический метод определения рН

Понятие о водородном показателе введено в 1909 г. Зеренсенем, который под водородным показателем понимал отрицательный десятичный логарифм молярной концентрации ионов водорода:

$$\text{pH} = -\lg[\text{H}^+].$$

В настоящее время величина рН считается характеристикой активности ионов водорода:

$$\text{pH} = -\lg a_{\text{H}^+} = -\lg(C_{\text{H}^+} \cdot \gamma_{\text{H}^+}).$$

Для разбавленных растворов $\gamma_{\text{H}^+} = 1$, поэтому для расчета рН таких растворов можно пользоваться концентрациями.

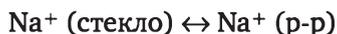
Надо помнить, что рН является логарифмической функцией концентрации ионов водорода и изменение рН на единицу соответствует десятикратному изменению концентрации ионов H^+ . Величины рН лежат в пределах от 0 до 14. Величины рН ниже нуля (отрицательная величина) и выше 14 возможны для растворов с концентрацией более 1 моль/л, соответственно, сильной кислоты и сильного основания. Однако наиболее часто встречающиеся значения рН лежат в пределах от 0 до 14. В настоящее время трудно найти отрасль науки или производства, в которой бы не использовались величины рН. Величина рН характеризует процессы жизнедеятельности животных и растений, кислотность почв. Величиной рН пользуются в гидрохимии и гидрологии.

Потенциометрический метод определения рН основан на применении гальванических элементов, в которых индикаторный электрод обратим по отношению к ионам водорода. Для экспериментального определения рН могут быть использованы различные индикаторные электроды: водородный, хингидронный, стеклянный и др. Наибольшее практическое применение в последнее время нашел стеклянный электрод, используемый в широком интервале рН и в присутствии окислителей.

Ионоселективные электроды

Решающее влияние на развитие и успехи ионометрического метода анализа оказало удачное конструирование ионоселективных электродов на основе различных мембран. Стеклянные ионоселективные электроды чувствительны к ионам щелочных металлов Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , а также к ионам Ag^+ , Tl^+ и NH_4^+ . Их устройство и принцип действия такие же, как и у стеклянного электрода. Наиболее существенным отличием является состав стекла, из которого готовятся мембраны. Установлено, в частности, что введение Al_2O_3 в стекло положительно влияет на селективность мембраны к ионам металлов, но не к H^+ .

Селективный электрод, например, с натриевой функцией находится в равновесии с ионами натрия в растворе:



Важной характеристикой ионоселективного электрода является его коэффициент селективности, показывающий, во сколько раз электрод

более чувствителен к данным ионам, чем к посторонним (мешающим). Например, в паспорте электрода на калий указано, что электрод селективен в присутствии ионов Na^+ и NH_4^+ при превышении их концентрации соответственно в 200 и 20 раз по сравнению к ионам K^+ .

Стеклянные ионоселективные электроды широко используются для определения катионов щелочных металлов в различных биологических пробах: крови, плазме, сыворотках и т. д.; в объектах окружающей среды — водах, растениях, различных экстрактах и пр. Определения с помощью ионоселективных электродов успешно конкурируют с пламеннофотометрическими методами по точности и нередко превосходят их по скорости.

В твердых мембранных электродах ионочувствительный элемент изготавливается из малорастворимого кристаллического вещества с ионным характером проводимости. Из электродов этого типа широко применяется фторидный электрод, в котором мембраной является монокристалл LaF_3 , имеющий чисто фторидную проводимость. Чувствительность фторидного электрода позволяет проводить измерения равновесной концентрации фторид-ионов в широкой области концентраций от 10^{-6} до 1 моль/л. Селективность электрода очень высока — даже тысячекратный избыток посторонних ионов (галогенид-, нитрат-, сульфат-ионов и др.) по сравнению с фторид-ионом не мешает его определению, и только в присутствии ионов OH^- селективность падает.

Фторидный электрод используется для определения фторид-ионов (F^-) в питьевой воде, различных биологических пробах, витаминах, при контроле за загрязнением окружающей среды и т. д.

Практическое значение имеет ионоселективный электрод с мембраной из сульфида серебра, пригодный для измерения концентрации (активности) ионов Ag^+ и S^{2-} . На основе сульфида серебра конструируются также различные галогенидные электроды. Для этого в сульфид серебра вводят галогениды серебра. Электроды на основе сульфида серебра с добавкой соответствующего галогенида серебра чувствительны к ионам Cl^- , Br^- , I^- , CN^- и др.

9.6. Практическое применение и общая характеристика метода

Большое практическое значение имеют потенциометрические методы определения pH раствора со стеклянным и другими электродами, а также прямые потенциометрические определения концентрации (активности) других ионов с помощью ионоселективных электродов (ионометрия). Ионоселективные электроды на ионы Cu^{2+} , Ag^+ , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , F^- , S^{2-} , NO_3^- и др. успешно применяют в анализе различных растворов, объектов окружающей среды и т. д.

Во многих областях находит практическое применение кальциевый ионоселективный электрод. Помимо традиционного анализа

воды, различных растворов большое практическое значение кальциевый электрод имеет в медико-биологических исследованиях, клинической медицине и т. п., поскольку концентрация (активность) ионов кальция влияет на многие процессы жизнедеятельности и физиологические процессы (нервная деятельность, функция ферментов и т. д.). Известен мембранный ионоселективный электрод, позволяющий определять жесткость воды, так как он имеет примерно одинаковую чувствительность на оба иона (кальций и магний).

Основными достоинствами потенциометрического метода являются его высокая точность, высокая чувствительность и возможность проводить титрования в более разбавленных растворах, чем это позволяют визуальные индикаторные методы. Необходимо отметить также возможность определения этим методом нескольких веществ в одном растворе без предварительного разделения и титрования в мутных и окрашенных средах. Значительно расширяется область практического применения потенциометрического титрования при использовании неводных растворителей. Они позволяют, например, найти содержание компонентов, которые в водном растворе отдельно не титруются, провести анализ веществ, нерастворимых или разлагающихся в воде и т. д.

К недостаткам потенциометрического титрования можно отнести не всегда быстрое установление потенциала после добавления титранта и необходимость во многих случаях делать при титровании большое число отчетов.

Контрольные вопросы

1. На чем основаны потенциометрические методы анализа?
2. Что такое электродный потенциал? Что такое стандартный электродный потенциал? Как записывается уравнение Нернста для электродного потенциала?
3. Опишите электроды сравнения: водородный, хлорсеребряный, каломельный.
4. В чем сущность потенциометрического определения pH раствора? Какие индикаторные электроды могут быть использованы для определения pH?
5. Опишите достоинства и недостатки стеклянного электрода.
6. Что такое и как выглядят кривые потенциометрического титрования?
7. Что такое метод прямой потенциометрии?
8. Что такое ионоселективные электроды?
9. Что такое водородный показатель? В каких пределах может изменяться pH?
10. Опишите потенциометрическое титрование в неводных средах.

Тема 10

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ

Вольтамперометрия основана на изучении поляризационных или вольтамперных кривых (кривых зависимости силы тока от напряжения), которые получаются, если при электролизе раствора анализируемого вещества постепенно повышать напряжение и фиксировать при этом силу тока.

Электролиз следует проводить с использованием легко поляризуемого электрода с небольшой поверхностью, на котором происходит электровосстановление или электроокисление вещества (индикаторный или рабочий электрод).

При проведении анализа используют два электрода — индикаторный поляризуемый электрод и электрод сравнения (практически неполяризуемый — каломельный электрод или хлорсеребряный).

Если в качестве индикаторного выбран электрод с постоянно обновляющейся поверхностью (например, ртутный капаящий электрод), то метод анализа называют *полярографическим*. За открытие и развитие этого метода чешскому ученому Я. Гейровскому в 1959 г. была присуждена Нобелевская премия.

10.1. Кривая «ток — потенциал»

Процесс прохождения постоянного тока через электролитическую ячейку характеризуется соотношением:

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

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

При вольтамперометрических измерениях к анализируемому раствору добавляют индифферентный электролит (полярографический фон) большой концентрации, поэтому $R \approx 1$ кОм и, так как ток в вольтамперометрии не превышает 10^{-5} А, падением напряжения на ячейке ($I \cdot R$) можно пренебречь.

Поскольку в вольтамперометрии один из электродов не поляризуется и для него потенциал остается постоянным (электрод сравнения), подаваемое на электролитическую ячейку напряжение

проявляется в изменении потенциала только индикаторного электрода. Если потенциал индикаторного электрода измерять относительно потенциала электрода сравнения, условно приняв последний за нуль, то $E = E_a$ для рабочего микроанода и $E = -E_k$ для рабочего микрокатада.

Таким образом, регистрируемая вольтамперная кривая отражает электрохимический процесс, происходящий только на одном электроде. Если в растворе присутствуют вещества, способные электрохимически восстанавливаться или окисляться, то при наложении на ячейку линейно изменяющегося напряжения (скорость не превышает 200 мВ/мин) кривая $I = f(E)$ имеет форму волны (рис. 10.1). В отсутствие электрохимической реакции эта зависимость линейна, как следует из закона Ома.

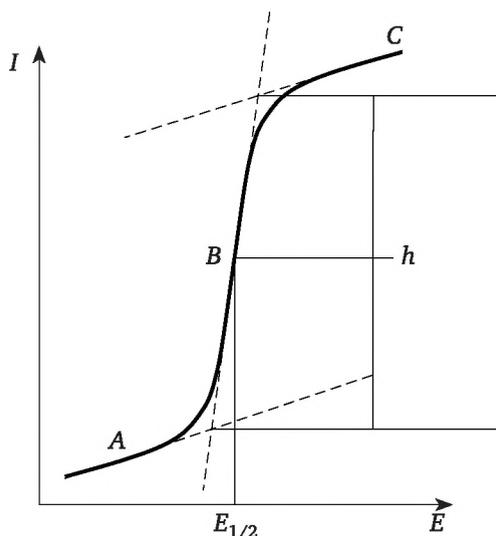


Рис. 10.1. Вольтамперограмма

Если приложить разность потенциалов к электродам, опущенным в раствор электролита, и постепенно увеличивать эту разность потенциалов, то в начале ток через раствор протекать почти не будет. На участке кривой А электролиз не протекает. Ток в этом месте вызывается восстановлением примесей и зарядением ртутной капли. По достижении потенциала восстановления на катоде начинается разряд ионов электрохимически активного вещества, называемого деполаризатором (вещество, снижающее поляризацию индикаторного электрода), и сила тока резко возрастает, стремясь к предельной величине диффузионного тока. Участок В характеризует прохождение процесса электролиза, сопровождающегося все более интенсивным обеднением приэлектродного слоя. Участок С — все ионы анализируемого вещества успевают разрядиться.

10.2. Полярографический фон

Для того чтобы ионы определяемого вещества перемещались к индикаторному электроду только вследствие диффузии, а не за счет диффузии и электростатической силы притяжения, в исследуемый раствор добавляют какой-либо индифферентный электролит с катионом, восстанавливаемым гораздо труднее анализируемого катиона (например KCl , NH_4Cl , KNO_3 при концентрации в 100—1000 раз превышающей концентрацию определяемого вещества).

Индифферентную соль, добавляемую для устранения движения анализируемого вещества под действием электрического тока, называют *полярографическим фоном* или просто *фоном*.

Катионы электролита-фона движутся к катоду, но не могут разрядиться на нем при данном потенциале. Они остаются у поверхности электрода, образуя двойной электрический слой. Электрическое поле индикаторного электрода экранируется этими ионами фона, и поэтому катионы определяемого вещества не притягиваются электрическим полем катода, а движутся к нему только за счет диффузии. Органические молекулы не имеют обычно электрического заряда и для них в еще большей степени, чем для ионов, справедливо утверждение, что перемещение происходит только под действием диффузионного переноса. Фон имеет еще и другое значение — он увеличивает электропроводность раствора.

Ход вольтамперных кривых существенно искажается растворенным кислородом, восстанавливаемым на катоде. Кислород удаляют из растворов продувкой азотом, аргоном и др., и только после этого записывают полярограммы. В случае кислых растворов для удаления кислорода можно использовать CO_2 . В щелочных средах удобно удалять кислород при помощи Na_2SO_3 . В раствор фона во многих случаях вводят специальные поверхностно-активные вещества, которые устраняют так называемые максимумы на вольтамперных кривых. Происхождение максимумов связано с изменением поверхностного потенциала растущей ртутной капли. Максимумы сильно искажают полярограммы главным образом в области плато, где устанавливается предельный диффузионный ток. Для устранения максимумов в раствор добавляют небольшие количества высокомолекулярных соединений (желатин, агар-агар) или некоторых органических красителей (метилловый красный, фуксин и др.).

10.3. Диффузионный ток

Силу тока, при которой достигается разряд всех ионов анализируемого вещества (участок С, см. рис 10.1), поступающих в приэлектродное пространство ртутного катода за счет диффузии, называют *предельным* или *диффузионным током*.

Диффузионный ток пропорционален концентрации определяемого иона в растворе (концентрация ионов у поверхности катода приближается к нулю, когда ток достигает предельного значения).

Зависимость силы диффузионного тока от концентрации выражается уравнением, выведенным Ильковичем:

$$I_d = 605 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot \tau^{1/6} \cdot C,$$

где I_d — диффузионный ток, мкА; 605 — числовой множитель, в который входят геометрические факторы, константа Фарадея, плотность ртути; n — число электронов, принимаемых ионом при восстановлении или отдаваемых при окислении; D — коэффициент диффузии иона, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$; m — масса ртути, вытекающей из капилляра за секунду, $\text{г} \cdot \text{с}^{-1}$; τ — время жизни ртутной капли, с; C — концентрация определяемого иона, $\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Если анализ проводят с каким-нибудь одним типом ионов, то для них n и D — const; если работают с одним и тем же капилляром и с одной и той же скоростью вытекания ртути, то $m^{2/3} \cdot \tau^{1/6} = \text{const}$, тогда $I_d = k \cdot C$.

Полученная линейная зависимость является основой количественного анализа. Высота волны h (см. рис. 10.1) характеризует предельный ток и дает возможность определить концентрацию анализируемого вещества.

10.4. Количественный полярографический анализ

Для определения неизвестной концентрации наиболее широко применяют метод градуировочного графика на основе уравнения: $I_d = k \cdot C$. График строят по данным исследований нескольких стандартных растворов. На оси ординат откладывается пропорциональная силе диффузионного тока высота волны h , а по оси абсцисс — концентрация анализируемого вещества. Калибровочный график должен представлять прямую линию, проходящую через начало координат.

При анализе некоторых хорошо изученных систем часто применяется менее трудоемкий метод стандартных растворов. В этом методе в строго одинаковых условиях снимают кривые стандартного и анализируемого растворов и рассчитывают неизвестную концентрацию (C_x):

$$C_x = \frac{C_{\text{ст}} h_x}{h_{\text{ст}}},$$

где $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора, h_x и $h_{\text{ст}}$ — высота волны при полярографировании соответственно анализируемого и стандартного растворов.

Широко распространен в количественной полярографии метод добавок. Пусть при полярографировании исследуемого раствора сила диффузионного тока равна $I_x = kC_x$. Добавим к этому раствору известное количество стандартного раствора ($C_{ст}$) и снова определим диффузионный ток:

$$I_{x+ст} = k(C_x + C_{ст}).$$

При почленном делении этих уравнений получаем:

$$\frac{I_x}{I_{x+ст}} = \frac{C_x}{C_x + C_{ст}},$$

откуда

$$C_x = \frac{C_{ст}I_x}{I_{x+ст} - I_x}.$$

10.5. Качественный анализ

Для качественного анализа удобно пользоваться потенциалом полувольты. Если отрезок В (см. рис. 10.1) разделить пополам, восстановить перпендикуляр, то получим отрезок на оси абсцисс, характеризующий потенциал, необходимый для достижения половины предельного тока (потенциал полувольты $E_{1/2}$). Он не зависит от концентрации растворенного вещества, а зависит только от природы восстанавливаемого иона. Потенциал полувольты является, таким образом, качественной характеристикой иона в растворе данного фонового электролита, и определение потенциала полувольты составляет основу качественного анализа (по соответствующим таблицам можно определить, какой ион находится в растворе).

Если в растворе находится несколько веществ, потенциалы полувольты которых различаются на 100 мВ и больше, то получим не одну волну, а несколько — по числу восстанавливающихся ионов, а возможно и больше, так как при ступенчатом восстановлении один ион может давать две волны. Например, две волны дает ион Cu^{2+} в присутствии NH_3 ($C = 1$ моль/л): первую при потенциале полувольты $-0,20$ В и вторую при $-0,48$ В. Можно получить таким образом спектр ионов, а затем по этим данным и измеренному потенциалу полувольты идентифицировать неизвестное вещество. Вполне понятно, что положение элемента в таком спектре будет зависеть от фонового электролита: его природы и концентрации.

Для анализа смесей, содержащих ионы или вещества с близкими потенциалами полувольты, применяют кривые $\frac{dI}{dE} - E$ (первая производная от вольтамперной кривой). Дифференциальная вольтам-

перометрия имеет значительно более высокую разрешающую способность, позволяя определять в одном растворе ионы с близкими потенциалами полуволны.

Например, этим методом могут быть определены свинец и таллий, у которых потенциалы полуволны на фоне KNO_3 (с концентрацией 2 моль/л) различаются только на 0,06 В. В методе обычной полярографии (интегральная полярограмма) оба иона образуют одну общую волну (рис. 10.2, а), а на дифференциальных кривых четко видны два максимума (рис. 10.2, б). Кроме того, методы дифференциальной полярографии более точны, так как фиксировать положение максимума и измерять его высоту можно с более высокой точностью.

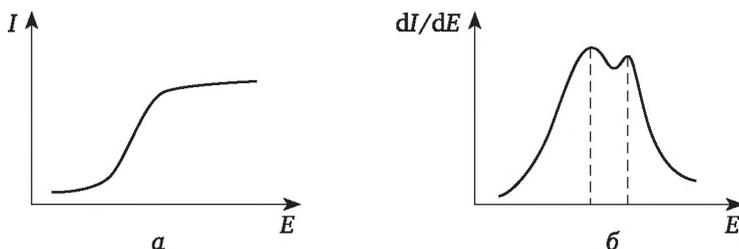


Рис. 10.2. Интегральная (а) и дифференциальная (б) полярограммы раствора, содержащего $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ и TlNO_3 на фоне KNO_3

10.6. Полярографическая установка

Систему электродов для вольтамперометрических измерений выбирают таким образом, чтобы плотность тока на этих электродах существенно различалась: на индикаторном (рабочем) электроде плотность тока должна быть велика, на электроде сравнения — ничтожно мала. В этом случае поляризоваться будет только рабочий электрод и, естественно, только на нем возможны электрохимические процессы восстановления или окисления ионов из раствора. Рабочий электрод, как правило, имеет очень малую поверхность по сравнению с поверхностью электрода сравнения — это микроэлектрод, который может быть изготовлен из твердого материала (Pt, Ag, Au, графит специальной обработки и др.) или в виде ртутной капли, вытекающей из капилляра.

Ртутный капающий электрод в качестве рабочего микроэлектрода используют при полярографическом анализе веществ, восстанавливающихся в области потенциалов $+0,3 \div -2,0$ В (в щелочных или нейтральных растворах) или до $-1,0$ В (в кислых растворах) относительно насыщенного каломельного электрода. Постоянно обновляющаяся поверхность ртутной капли, а также высокое пере-напряжение выделения водорода, позволяющее электрохимически

восстанавливать на таком электроде ионы металлов, расположенных в ряду напряжений левее водорода (т. е. почти все катионы), делает ртутный капающий электрод одним из наиболее широко используемых.

Принципиальная схема полярографической установки представлена на рис. 10.3.

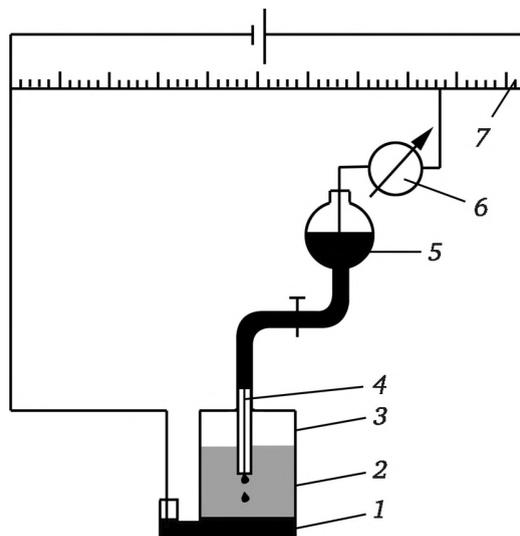


Рис. 10.3. Схема полярографической установки

Анализируемый раствор 2 находится в электролизере 3, на дне которого имеется слой ртути 1, являющийся анодом. Часто в качестве анода используют насыщенный каломельный электрод. Катодом служит ртутный капающий электрод 4, соединенный с резервуаром ртути 5. Внешнее напряжение, подаваемое на электроды, можно плавно менять с помощью реохорда или делителя напряжения 7 и измерять при этом гальванометром 6 силу тока, проходящего через раствор.

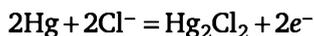
Рассмотрим процессы, происходящие на ртутном капающем электроде (катоде) и на электроде сравнения, который является анодом (каломельный электрод). На катоде происходит процесс восстановления:



Образовавшийся свободный металл диффундирует вглубь капли. Затем капля амальгамы (раствор металла друг в друге) падает и процесс начинается снова на новой капле. Благодаря очень малой силе тока, протекающего через электролизер (порядка 10^{-6} А), концентрация вещества в растворе очень мало изменяется и остается

почти постоянной во время электролиза (величина предельного тока не изменяется с течением времени).

Процесс на аноде заключается в том, что атомы ртути отдают электроны, причем ионы ртути образуют с ионами хлора, находящимися в растворе, осадок каломели:



Полярографический метод применяют также для определения органических веществ, способных восстанавливаться на ртутном каплюющем электроде. Одним из недостатков полярографического метода является необходимость применения ртути. Ртуть обладает способностью накапливаться в организме, что приводит к тяжелым отравлениям. В связи с этим полярографы устанавливаются в специально оборудованных ртутных комнатах с хорошей вентиляцией.

В вольтамперометрии с успехом применяют твердые микроэлектроды, изготавливаемые из благородных металлов (платины, золота и т. д.) или различных углеродных материалов (графит, стеклоуглерод, углесталл, угольная паста). Твердые электроды представляют собой проволочки или стержни, запрессованные в изолирующий материал (стекло, тефлон и др.). Рабочая поверхность такого электрода приблизительно $0,2 \text{ см}^2$. Конструктивно твердые электроды более удобны и безопасны, чем ртутные, но область их использования ограничена. Использование твердых электродов позволяет проводить анализ в более положительной области потенциалов (до $+1,3 \text{ В}$). Наиболее удобным из твердых электродов является платиновый электрод. Перенапряжение водорода на платине невелико, поэтому водород восстанавливается при потенциале ($-0,1 \text{ В}$). Это ограничивает использование платины в отрицательной области потенциалов. Из металлов на платиновом электроде могут быть определены серебро, золото и ртуть. Использование твердых электродов также имеет свои трудности, связанные, главным образом, с обновлением поверхности электродов. Стационарные твердые электроды не нашли широкого применения в практике из-за медленности установления предельного тока, невысокой чувствительности и других недостатков.

Значительно более широкое применение имеют вращающиеся и вибрирующие платиновые микроэлектроды (вращающийся дисковый электрод), на которых устойчивая сила тока устанавливается быстро. При работе таких электродов раствор непрерывно перемешивается, благодаря чему к поверхности электрода ионы доставляются не только за счет диффузии, но и за счет механического перемешивания. Вращающийся дисковый электрод позволяет кроме простой съемки кривых $I = f(E)$ изучать механизм электрохимических процессов. Каждый раз перед началом работы твердые

электроды следует промывать раствором HNO_3 (1:1), а затем многократно водой.

10.7. Хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала

Новые возможности в анализе и изучении электродных процессов открывает хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала. Обычная скорость изменения потенциала в этом методе составляет до 50 мВ/с вместо 2—3 мВ/с в классической полярографии. Для измерения силы тока здесь вместо гальванометра используют безынерционный осциллограф.

Полярограмма, получаемая в этом методе, представлена на рис. 10.4. При достижении потенциала восстановления ток резко возрастает и достигает максимума, превышая величину (I_d) классической полярографии, поскольку происходит электровосстановление практически всех ионов приэлектродного слоя, и затем падает, так как приэлектродный слой обедняется ионами, а скорость диффузии недостаточна, чтобы пополнить дефицит за столь короткое время. Потенциал максимума на этой кривой (E_{max}) является качественной характеристикой иона, а высота максимума (h_{max}) пропорциональна концентрации иона. Хроноамперометрия с линейной разверткой потенциала имеет более низкий предел обнаружения, чем обычная вольтамперометрия.

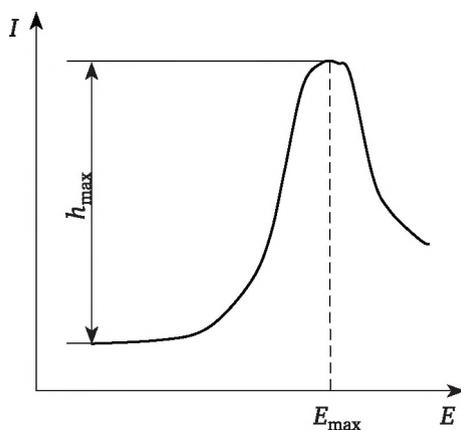


Рис. 10.4. Осциллографическая полярограмма

10.8. Инверсионная вольтамперометрия

Существенное увеличение чувствительности дает инверсионная вольтамперометрия. Идея метода инверсионной полярографии состоит в выделении определяемого элемента из очень разбавленного

раствора на ртутной капле или тонкой пленке ртути на графитовом электроде или просто на графитовом электроде электролизом с последующим анодным растворением полученного на электроде соединения. Процесс накопления происходит при потенциале, соответствующем предельному току.

Зависимость силы тока от напряжения при анодном растворении имеет вид характерного пика (рис. 10.5), глубина которого h пропорциональна концентрации определяемого иона, а потенциал минимума E_{\min} определяется природой иона. Предел обнаружения в методике инверсионной вольтамперометрии на 2—3 порядка ниже предела обнаружения в обычных полярографических методах. Рабочая область потенциалов для инверсионных электрохимических методов находится от +1,5 до -0,7 В для графитовых электродов в водной среде.

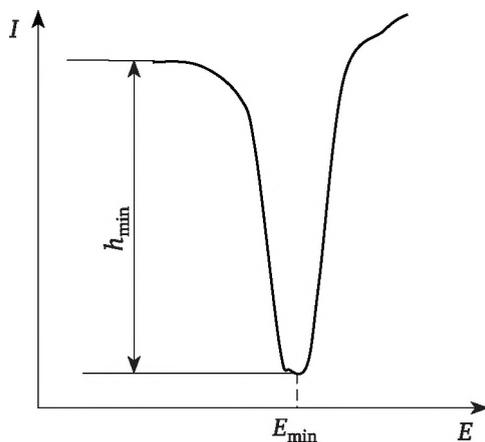


Рис. 10.5. Кривая анодного растворения

10.9. Практическое применение

Вольтамперометрический метод достаточно универсален и применим к многочисленному кругу объектов. Основными достоинствами метода являются быстрота анализа, возможность определения нескольких веществ в смеси без предварительного разделения, достаточно высокая точность и применимость к анализу небольших содержаний определяемого элемента. Погрешность полярографического анализа в обычных условиях составляет $\pm 2\%$ для растворов концентрации порядка 10^{-3} — 10^{-4} моль/л и около $\pm 5\%$ для более разбавленных растворов.

Вольтамперометрический метод применяют для определения многих металлов. Кадмий, кобальт, медь, свинец, марганец, никель, олово, цинк, железо, висмут, уран, ванадий и многие другие могут

быть определены в рудах, концентратах, сплавах и иных природных и технических объектах.

В условиях вольтамперометрического анализа легко восстанавливаются и могут быть определены соединения с сопряженными кратными связями, многие альдегиды, кетоны, галогенсодержащие соединения, хиноны, гидроксиламины; нитро-, нитрозо-, азо-, азоксисоединения; соли диазония, многие серусодержащие и гетероциклические соединения; пероксиды и редуцирующие сахара.

Широко используется полярографический метод для анализа биологически важных материалов: крови, сыворотки и т. д.

Контрольные вопросы

1. Какова сущность вольтамперометрического метода?
2. Что такое вольтамперная кривая?
3. Что такое полярографический фон и каково его назначение?
4. Что такое диффузионный ток, как определяется концентрация растворенного вещества?
5. Что такое потенциал полуволны? Как потенциал полуволны применяется в качественном анализе?
6. Опишите устройство простейшего полярографа. Какие электрохимические процессы протекают на ртутном каплюющем электроде?
7. Что такое твердые микроэлектроды?
8. Опишите хроноамперометрию с линейной разверткой потенциала.
9. Что такое инверсионная вольтамперометрия?
10. Как на практике применяется вольтамперометрия?

Тема 11

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Хроматографический метод разделения и анализа веществ открыт в 1903 г. русским ботаником М. С. Цветом при пропускании сложной смеси растительных пигментов (петролейно-эфирной вытяжки из листьев растений) через трубку (колонку) с карбонатом кальция. В колонке образовался ряд окрашенных зон, что и дало название методу. Слово «хроматография» состоит из двух корней греческого происхождения, означающих «цвет» и «писать». М. С. Цвет назвал метод хроматографией, то есть цветописью, указывая на возможность разделения и бесцветных веществ. Автор метода опубликовал ряд статей по хроматографии, однако метод не развивался вплоть до 1931 г., когда Куном, Винтерштейном и Ледераром были воспроизведены опыты М. С. Цвета. Более того, им удалось выделить в кристаллическом виде α - и β -каротины из сырого каротина и продемонстрировать препаративную ценность метода.

В 1938 г. появился вариант тонкослойной хроматографии. Он был предложен отечественными учеными Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер. Однако широкие возможности этого метода были открыты позднее благодаря работам Ю. Кирхнера и Э. Штала.

Началом современной хроматографии принято считать 1941 г., когда американские ученые Л. Мартин и Р. Синдж разработали метод распределительной хроматографии и дали его теоретическое обоснование. Эти же авторы указали на возможность осуществления газо-жидкостной хроматографии. Середина 1970-х гг. ознаменована рождением высокоэффективной колоночной хроматографии. В это время появились первые жидкостные хроматографы.

В настоящее время хроматографические методы анализа активно применяются как в научных исследованиях, так и во всех отраслях промышленности. Они широко используются для анализа смесей газообразных, жидких и твердых веществ. В нефтехимической и газовой промышленности на долю хроматографии приходится более 95 % всех анализов. Предприятия органического синтеза с их помощью осуществляют контроль качества сырья, полупродуктов и продуктов производства (до 50 % от всех методов анализа). Треть всех анализов по контролю состояния окружающей среды (загазованность воздуха, анализ сточных вод и др.) выполняется с использованием газохроматографических методов.

11.1. Общие принципы хроматографии

Хроматография — это динамический сорбционный метод разделения смесей веществ, основанный на многократном распределении веществ между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижная, а другая — подвижная, непрерывно перемещающаяся вдоль неподвижной фазы.

В качестве подвижной фазы выбирается жидкость или газ, проходящие под давлением через слой неподвижной фазы. Неподвижной фазой выбирается либо твердое пористое вещество с развитой поверхностью, либо пленка жидкости, нанесённая на поверхность твердого инертного носителя.

В процессе хроматографирования анализируемое вещество вместе с потоком подвижной фазы поступает в слой сорбента. По мере перемещения вдоль колонки вещество сорбируется с последующим десорбированием при контакте со свежими порциями подвижной фазы. Происходит непрерывное движение подвижной фазы, и как следствие, многократная сорбция и десорбция вещества. В этих условиях часть вещества находится в неподвижной фазе, а другая часть остается в подвижной фазе, перемещаясь вместе с ней. Таким образом, чем сильнее сорбируется вещество, тем медленнее оно перемещается вдоль колонки.

В случае хроматографирования смеси веществ скорость перемещения каждого из них будет различна вследствие разного сродства к сорбенту. В результате этого одни компоненты задерживаются в начале пути, другие продвигаются дальше, что в итоге приводит на выходе из колонки к разделению исследуемых веществ.

Во всех случаях разделение компонентов происходит вследствие разности в коэффициентах распределения между подвижной и неподвижной фазами. Закон распределения описывает динамическое равновесие, в котором молекулы непрерывно обмениваются между фазами. Равновесное распределение анализируемого вещества между несмешивающимися фазами характеризуется коэффициентом распределения (K). Коэффициент распределения определяется как отношение концентраций анализируемого вещества в неподвижной и подвижной фазах. Его можно выразить, написав вместо концентраций среднее время пребывания молекул каждого из компонентов в неподвижной и подвижной фазах:

$$K = C_m/C_s = \tau_m/\tau_s,$$

где C и τ — концентрация и время пребывания молекул компонентов в неподвижной (m) и подвижной (s) фазах соответственно.

Понятие «коэффициент распределения», взятое из закона распределения Нернста, является основополагающим в хроматографии.

Величина его зависит только от природы подвижной и неподвижной фаз и температуры (с ростом температуры коэффициент распределения уменьшается).

Относительная скорость движения анализируемого вещества обратно пропорциональна коэффициенту распределения K . При больших значениях коэффициента распределения большая часть вещества находится в неподвижной фазе и поэтому не перемещается. Напротив, если коэффициент мал, то это растворенное вещество перемещается с подвижной фазой. При отсутствии взаимодействия растворенных веществ с подвижной и неподвижной фазами в системе быстро устанавливается термодинамическое равновесие, в котором каждому компоненту соответствует определенное среднее время пребывания в подвижной фазе. Чем больше это время, тем быстрее компонент перемещается с подвижной фазой. Наибольшая скорость, равная скорости перемещения подвижной фазы, наблюдается при $K = 0$. Наименьшая скорость, равная нулю, отвечает случаю, когда компонент не растворяется в подвижной фазе. Различие молекул компонентов по скоростям движения приводит к разделению их на группы, перемещающиеся с различными скоростями.

Подбор фаз для хроматографического разделения производится так, чтобы коэффициенты распределения компонентов смеси в них были различными. Термином «эффективный коэффициент распределения» обозначают отношение общего количества вещества (в отличие от концентрации) в одной фазе к общему количеству этого вещества в другой фазе, следовательно, это есть произведение коэффициента распределения вещества и отношения объемов обеих фаз.

11.1.1. Классификация хроматографических методов

Многообразие вариантов хроматографического метода вызвало необходимость их систематизации, при этом до сих пор не существует их единой классификации.

Обычно используют лишь несколько классификаций, в основу которых положены следующие признаки: агрегатное состояние неподвижной и подвижной фаз; механизм взаимодействия вещества с сорбентом; техника выполнения анализа; способ хроматографирования; цель хроматографирования.

1. Классификация видов хроматографии по агрегатному состоянию фаз приведена в табл. 11.1.

Таблица 11.1

Классификация видов хроматографии по агрегатному состоянию фаз

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Название хроматографии
Газ или пар	Твердый адсорбент	Газо-адсорбционная
	Жидкость	Газо-жидкостная

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Название хроматографии
Жидкость	Твердый адсорбент	Жидкостно-адсорбционная
	Жидкость	Жидкостно-жидкостная

2. По механизму взаимодействия вещества с сорбентом различают следующие виды хроматографии:

— *адсорбционная* — разделение основано на различиях в адсорбируемости компонентов смеси на данном адсорбенте;

— *распределительная* — разделение основано на различной растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах;

— *ионообменная* — разделение зависит от констант равновесия между ионообменной смолой (неподвижной фазой) и электролитом (подвижной фазой);

— *проникающая* — разделение веществ обусловлено тем, что молекулы разделяемой смеси отличаются по размеру и, следовательно, обладают разной способностью проникать в поры геля (неподвижную фазу);

— *аффинная* — основана на уникальном свойстве макромолекул — их биологической специфичности, широко используется для очистки высокомолекулярных биологических соединений.

3. По технике выполнения процесса выделяют *колоночную* хроматографию (процесс разделения ведут в колонках, заполненных сорбентом) и *плоскостную* хроматографию (процесс разделения ведут на плоской поверхности под действием капиллярных сил в потоке растворителя). Плоскостная хроматография включает в себя две разновидности: хроматографию на бумаге и тонкослойную хроматографию на пластинках.

4. По способу хроматографирования выделяют три вида: проявительная (элюентная), вытеснительная, фронтальная.

Чаще всего применяется *проявительный* способ хроматографирования, когда в непрерывный поток подвижной фазы (элюент) вводят смесь веществ, которые сорбируются лучше элюента. При движении элюента через колонку с сорбированными веществами они перемещаются вдоль слоя сорбента с различной скоростью и, наконец, выходят из нее отдельными зонами, разделенными элюентом.

Вытеснительный способ хроматографирования — в поток подвижной фазы вводят смесь веществ, а затем начинают непрерывно пропускать поток вещества-вытеснителя, которое сорбируется сильнее всех остальных веществ. По мере продвижения по колонке, вытеснитель постепенно десорбирует (вытесняет из нее) сорбированные компоненты смеси в порядке увеличения их сорбционной способности.

Фронтальный способ хроматографирования — анализируемую смесь веществ непрерывно пропускают через слой сорбента. По мере заполнения колонки веществами они начинают выходить в порядке увеличения их сорбционной способности.

5. По цели проведения хроматографического процесса выделяют следующие виды хроматографии:

— *аналитическая* хроматография — используется как самостоятельный метод разделения, качественного и количественного анализа веществ;

— *неаналитическая* хроматография — метод исследования физико-химических характеристик веществ при использовании хроматографической аппаратуры;

— *препаративная* хроматография — применяется для выделения небольших количеств особо чистых веществ из смеси в лабораторных условиях;

— *промышленная* хроматография — используется для выделения чистых веществ в значительных количествах.

11.2. Газовая хроматография

Газовая хроматография — универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся без разложения. Этот метод впервые был реализован в 1952 г. Джеймсом и Мартином для разделения летучих жирных кислот.

Газовая хроматография находит применение в нефтяной, металлургической, химической, фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности. С повышением экологических требований к среде обитания, продуктам, лекарствам резко возросла роль газовой хроматографии как аналитического метода анализа.

Метод широко используется в настоящее время в анализе органических суперэтоксикантов. С помощью метода газовой хроматографии определяют хлор-, азот- и фосфорорганические пестициды, полихлор- и полибромзамещенные бифенилы, нитроароматические соединения и многие другие вещества.

Кроме того, газовая хроматография используется во многих областях медицины, в гигиене и экологии для определения содержания вредных примесей в воздухе, воде и пищевых продуктах. Этот метод используют также в токсикологии и судебной медицине для диагностики отравлений техническими жидкостями (хлорпроизводными углеводородами, алкоголем и его суррогатами), в фармакологии и фармации для контроля качества препаратов, при исследовании метаболизма лекарственных средств.

Применение газовой хроматографии в биохимических целях сравнительно долго не получало должной оценки. Считалось, что

биологические объекты недостаточно летучи и мало устойчивы к различным физико-химическим воздействиям, применяемым в газохроматографическом анализе. Успехи в разработке методов расщепления липидов, углеводов и белков до более простых компонентов и превращение их в летучие соединения открыли широкую дорогу для применения метода в биохимическом анализе. Наиболее велики успехи в исследовании липидов, в особенности жирных кислот. Возможность определения индивидуального состава жирных кислот тех или иных липидов является мощным инструментом в познании структуры и функции биологических мембран, процессов внутриклеточного метаболизма.

Газохроматографическое определение спектра карбоновых кислот цикла Кребса внесло большой вклад в понимание процессов метаболизма при различных патологических состояниях. Газовая хроматография используется в медицинской микробиологии и диагностике врожденных нарушений метаболизма.

Достоинства газовой хроматографии: 1) высокая разделительная способность; 2) возможность идентификации и количественного определения индивидуальных соединений многокомпонентных смесей; 3) универсальность и высокая чувствительность; 4) возможность изучения различных свойств веществ и физико-химических взаимодействий в газах, жидкостях и на поверхности твердых тел; 5) возможность выделения чистых веществ в препаративном и промышленном масштабе.

11.2.1. Общие принципы метода

Подвижной фазой в газовой хроматографии является газ или пар. В зависимости от состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на газо-адсорбционную, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент, и газо-жидкостную, когда неподвижной фазой служит жидкость, а точнее, пленка жидкости на поверхности частиц твердого сорбента.

В *газо-адсорбционной хроматографии* (ГАХ) происходит непрерывное распределение компонентов смеси между движущейся газовой фазой, называемой газом-носителем, и твердым адсорбентом, обусловленное чередованием процессов сорбции и десорбции. Чем хуже вещество сорбируется, тем раньше оно выходит из колонки. Селективность адсорбента определяется характером и прочностью взаимодействий разделяемых веществ с поверхностью адсорбента. Поэтому для разделения полярных соединений используются адсорбенты с пониженной адсорбционной активностью, а для разделения неполярных веществ подбирают адсорбенты с высокой адсорбционной способностью.

В газо-адсорбционной хроматографии сорбентами служат активные адсорбенты (активированный уголь, силикагель, молекулярные

сита и др.). Твердый носитель, применяемый в газовой хроматографии, должен иметь большую площадь поверхности и однородный размер частиц. Обычно используются частицы размером 0,25—0,35 мм.

Достоинствами газо-адсорбционной хроматографии являются: 1) высокая разделительная способность при анализе смесей газов и паров низкокипящих веществ; 2) термическая устойчивость и нелетучесть адсорбентов позволяет анализировать высококипящие соединения без снижения чувствительности детекторов; 3) в данном методе характерна более высокая скорость массообменных процессов по сравнению с газожидкостной хроматографией, что сокращает время выполнения анализов.

К недостаткам относятся: 1) неоднородность поверхности адсорбентов, их химическая и каталитическая активность; 2) повышенная адсорбционная активность; 3) нелинейность изотермы адсорбции.

В *газо-жидкостной хроматографии* (ГЖХ) применяются твердые инертные носители типа диатомита, используются также фарфор, стекло, пластмассы, различные типы твердых носителей промышленного изготовления. Количество твердых фаз все же ограничено, поэтому поверхность твердого носителя часто покрывают тонким слоем жидкости (неподвижная фаза). неподвижная жидкая фаза наносится в виде пленки на внутренние стенки капиллярной колонки или на зерна твердого носителя, которым заполняется насадочная колонка. Обычно применяются жидкости с низкой упругостью паров, химически инертные по отношению ко всем компонентам смеси. Число жидких фаз, пригодных для хроматографии, во много раз превышает число адсорбентов, что позволяет в каждом отдельном случае подобрать наиболее эффективную жидкость. Последняя может быть твердой при низкой температуре, но обязательно должна быть жидкой и практически нелетучей при температурах, обеспечивающих разделение компонентов смеси. Происходит чередование растворения компонента в пленке жидкой фазы, нанесенной на твердый носитель, с обратным выделением в газовую фазу, т. е. в поток газа-носителя.

Основной характеристикой жидкой фазы является степень ее полярности. При прочих одинаковых условиях более полярные фазы дают лучшее разделение. неполярные фазы, как правило, имеют больший молекулярный вес и устойчивы при высоких температурах. Полярные фазы обладают высокой избирательностью, однако они менее устойчивы при повышенных температурах, и, разлагаясь, могут нарушать процесс разделения. Количество жидкой фазы в процентах к твердому носителю варьируется в широких пределах от 1 до 30—50 %, что зачастую позволяет влиять на быстроту и качество разделения смесей.

В качестве неподвижных фаз в ГЖХ применяют полиэтилен, гликоли с молекулярными массами от 200 до 40 000, сложные эфиры и полиэфиры, силиконовые жидкости, жидкие кристаллы и т. д., применяют также бинарные неподвижные фазы.

Достоинства газо-жидкостной хроматографии: 1) число жидких фаз, пригодных для хроматографии, во много раз превышает число адсорбентов, что позволяет в каждом отдельном случае подобрать наиболее эффективную жидкость; 2) большая избирательность растворения газов в пленке жидкости, чем различие в их адсорбционных свойствах; 3) изотерма абсорбции линейна в более широком интервале концентраций, чем изотерма адсорбции.

Развитие газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) привело к созданию комплексных методов. К ним относятся реакционная хроматография, сочетающая химические реакции определяемых соединений и хроматографический процесс, и хромато-масс-спектрометрия, осуществляемая путем последовательного соединения хроматографической системы и масс-спектрометра (при этом получают полные или частичные масс-спектры для каждого из компонентов анализируемой смеси, по которым проводят их идентификацию и количественное определение).

11.2.2. Аппаратурное оформление газовой хроматографии

Основными узлами газового хроматографа являются источник газа-носителя и блок подготовки газов, испаритель, термостаты колонки и детектора, хроматографические колонки, детектор, система регистрации и обработки данных (рис. 11.1).

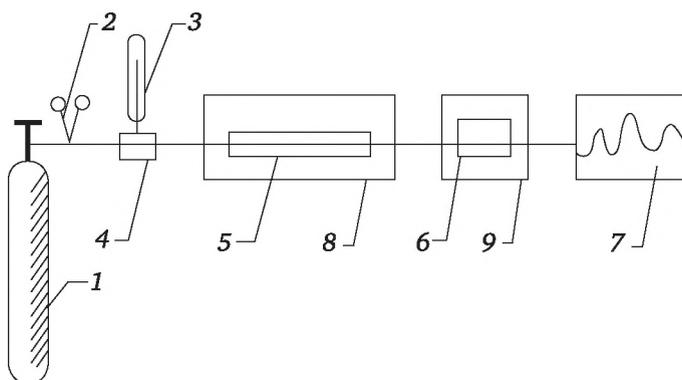


Рис. 11.1. Принципиальная схема газового хроматографа:

- 1 — газовый баллон; 2 — редуктор; 3 — дозатор; 4 — испаритель;
- 5 — хроматографическая колонка; 6 — детектор; 7 — регистратор;
- 8, 9 — термостаты

Стабилизация и очистка газовых потоков происходит в системе подготовки газов, состоящей из баллона с газом-носителем 1 и бло-

ка подготовки газов. Блок подготовки газов включает дроссель, регулятор давления 2, регулятор потока и служит для регулировки и поддержания постоянного расхода газа-носителя.

Для точного количественного введения пробы в хроматографическую колонку используют дозатор 3. Одним из основных требований к дозатору является воспроизводимость размера пробы и постоянство условий ее введения в колонку. Твердые пробы вводятся в хроматограф после перевода их в раствор, газообразные и жидкие пробы вводят в испаритель 4 с помощью специальных шприцев, прокалывая в месте ввода пробы каучуковую мембрану. После испарения проба с потоком газа-носителя переносится в колонку 5, где и осуществляется разделение смеси на отдельные составляющие компоненты. Требуемые температурные режимы испарителя, колонки и детектора достигаются помещением их в соответствующие термостаты, управляемые терморегулятором. Колонка расположена в термостате 8. Система детектирования состоит из детектора 6, расположенного в термостате 9, который преобразует соответствующие изменения физических или физико-химических свойств смеси «компонент — газ-носитель» по сравнению с чистым газом-носителем в электрический сигнал. Сигнал детектора, преобразованный блоком усилителя сигнала детектора, записывается в виде хроматограммы регистрирующим устройством 7.

Хроматографические колонки

К изготовлению хроматографической колонки предъявляется ряд существенных требований. Материал колонки не должен быть химически или каталитически активным по отношению к сорбенту и компонентам разделяемой смеси. Как правило, колонки изготавливают из стекла, кварца, нержавеющей стали, меди, алюминия и полимеров.

При всем многообразии форм и размеров, различают три типа колонок: насадочные, микронасадочные (значительно меньший диаметр, чем у насадочных колонок) и капиллярные (рис. 11.2).

Наибольшее распространение получили насадочные колонки благодаря простоте заполнения (твердый носитель, обработанный неподвижной фазой). Колонки той или иной формы обычно выбирают в соответствии с размерами термостата. Используют U- и W-образные колонки, спиральные трубки, прямые колонки. Диаметр колонок составляет от 3 до 10 мм, а длина — от 0,5 до 5 м.

Для каждого типа твердого носителя и неподвижной фазы существует определенное количественное их соотношение, при котором реализуется наибольшая разделительная способность колонки. Обычно масса неподвижной фазы составляет от 3 до 40 г на 100 г твердого носителя. Пленку неподвижной фазы на твердом носителе получают путем прямого перемешивания не-

подвижной жидкой фазы и зерен твердого носителя, либо растворением определенного количества неподвижной фазы в подходящем легколетучем растворителе, смешиванием раствора с зернами твердого носителя с последующим удалением легколетучего растворителя при постоянном перемешивании и слабом нагревании.

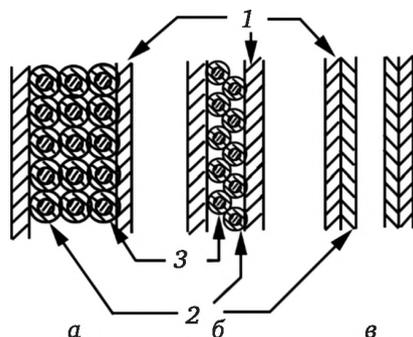


Рис. 11.2. Хроматографические колонки:
насадочная (а), микронасадочная (б), капиллярная (в);
1 — стенки колонки, 2 — неподвижная фаза, 3 — твердый носитель

Капиллярные колонки представляют собой трубки диаметром от 0,3 до 0,5 мм и длиной от 20 до 200 м. Функцию твердого носителя выполняют ее стенки. Здесь стоит отметить большую эффективность капиллярных колонок. Если эффективность насадочных колонок соответствует 500—10 000 теоретическим тарелкам, то в случае капиллярных она может достигать 10^6 теоретических тарелок¹.

Детекторы

Хроматографический детектор — датчик, позволяющий фиксировать какое-либо физико-химическое свойство смеси газа-носителя с компонентом анализируемой пробы. Регистрация этого свойства осуществляется посредством преобразования его изменения в электрический сигнал.

В газовой хроматографии применяют широкий круг детекторов, которые можно разделить на: 1) интегральные (регистрирует изменение во времени суммарного количества выходящих из колонки компонентов); 2) дифференциальные (измеряет мгновенную концентрацию вещества в потоке подвижной фазы).

Дифференциальные детекторы в свою очередь делятся на: 1) концентрационные — сигнал определяется текущей концентрацией в ячейке и многократно регистрируется, зависит от скорости

¹ Теоретическая тарелка — условный участок хроматографической колонки, в пределах которого устанавливается равновесие частиц между подвижной и неподвижной фазами. Чем больше число теоретических тарелок в колонке, тем выше степень разделения компонентов.

потока (детектором такого типа может служить катарометр); 2) потоковые — регистрируют сигнал однократно, сигнал определяется мгновенным значением концентрации, не зависит от скорости потока (детектором такого типа может служить пламенно-ионизационный детектор).

К детекторам предъявляются следующие требования:

— детектор должен обладать высокой чувствительностью, регистрировать даже малые изменения физико-химических свойств подвижной фазы;

— величина сигнала детектора должна изменяться пропорционально изменению концентрации определяемого компонента в подвижной фазе;

— детектор должен регистрировать определяемые компоненты по возможности мгновенно;

— рабочий объем детектора должен быть по возможности наименьшим, чтобы исключить дополнительное размывание пиков;

— на показания детектора не должны влиять внешние условия: температура, давление и другие параметры хроматографического процесса.

Применительно к газовой хроматографии создано большое количество универсальных и селективных детекторов: по теплопроводности, ионизации пламени, электронного захвата, термоионный, масс-спектрометрический и т. д. Основными характеристиками хроматографических детекторов являются чувствительность или предел обнаружения, линейный динамический диапазон и инерционность.

Чувствительность детектора связывает его сигнал с измеряемой концентрацией вещества, создаваемой в детекторе, она определяет аналитические возможности хроматографа в целом. Предельная чувствительность детектора — это минимальная концентрация анализируемого вещества в потоке подвижной фазы, создаваемая в детекторе, которая вызывает сигнал детектора, равный удвоенному сигналу шумов. Предел обнаружения выражают в различных единицах: мг/мл, мм/мл, % об. и др.

Детектор по теплопроводности (катарометр). Катарометр представляет собой металлический блок, в котором находятся проточные камеры, соединенные с колонками хроматографа. В камерах находятся сопротивления, на которые подается напряжение. Через одну камеру катарометра (рабочую) проходит газ-носитель из колонки, через другую (сравнительную) — чистый газ-носитель. В основе работы детектора по теплопроводности лежит изменение электрического сопротивления проводника в зависимости от теплопроводности окружающей среды. Катарометр измеряет различие в теплопроводности чистого газа-носителя и смеси газа-носителя с веществом, выходящим из хроматографической колонки. Он наи-

более эффективен в случае, когда теплопроводность анализируемого вещества сильно отличается от теплопроводности газа-носителя.

Так как большинство органических веществ имеют низкую теплопроводность, то для их анализа целесообразно использовать газы-носители с возможно более высокой теплопроводностью (например, водород или гелий). На практике водород ввиду его взрывоопасности применяется значительно реже гелия, но гелий — довольно дорогой газ, поэтому нередко в качестве газов-носителей используют азот или аргон.

Достоинствами катарометра являются: универсальность (возможен анализ любых веществ); большой уровень выходного сигнала, что не требует специальных усилителей; высокая линейность и хорошая воспроизводимость результатов.

К недостаткам детектора относится сравнительно низкая чувствительность и инерционность, что не позволяет его использовать при работе с капиллярными колонками; сильная зависимость показаний от внешних факторов, что требует наличия специального термостата детекторного блока.

Пламенно-ионизационный детектор. Принцип работы пламенно-ионизационного детектора основан на ионизации, происходящей при сгорании за счет энергии окисления углерода. Схема детектора приведена на рис. 11.3.

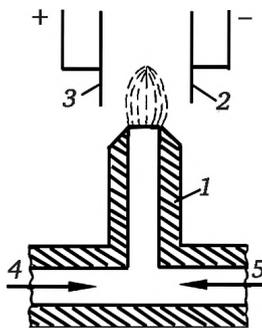


Рис. 11.3. Схема пламенно-ионизационного детектора:
1 — горелка; 2 — электрод; 3 — коллекторный электрод;
4 — элюат; 5 — воздух

Детектор работает следующим образом: выходящий из колонки газ-носитель смешивается с водородом и поступает к соплу горелки, куда подается очищенный воздух. Горение происходит между двумя электродами. На электроды подается напряжение от 90 до 300 В, под действием которого движение ионов упорядочивается и возникает ионный ток.

При внесении из колонки анализируемых органических веществ с газом-носителем число ионов в пламени резко увеличивается, со-

противление пламени падает, и во внешней цепи детектора регистрируется возрастание ионного тока.

Достоинства пламенно-ионизационного детектора: высокая чувствительность к органическим соединениям, широкий линейный диапазон, малая зависимость показаний от внешних параметров (температуры, давления). К недостаткам относится низкая чувствительность к негорючим веществам.

11.2.3. Выбор условий хроматографирования

Одним из преимуществ хроматографического метода является возможность широкого выбора условий анализа в зависимости от конкретной аналитической задачи. В данном случае можно выделить две основные группы аналитических задач.

Первая группа объединяет задачи, когда необходимо получить полное разделение за заданное время (экспрессная хроматография). Сокращение времени разделения связано чаще всего с повышением скорости потока газа-носителя. Естественно, что подобная экспрессность почти всегда достигается за счет ухудшения качества разделения.

Вторая группа — это полное разделение для получения точных количественных результатов, этим занимается прецизионная хроматография. Одним из возможных путей для улучшения разделения веществ является увеличение длины слоя сорбента (колонки).

Оптимальный выбор условий хроматографирования возможно осуществить лишь на основе критериев разделения. В методе газо-жидкостной хроматографии широко варьируются природа и скорость газа-носителя, природа жидкой фазы, твердый носитель, параметры хроматографической колонки (длина, диаметр, температура), тип детектора. Это создает совершенно уникальные условия для решения различных аналитических задач.

Выбор газа-носителя. Так как природа газа-носителя и его параметры существенно влияют на качество разделения веществ, то здесь важно понять все требования предъявляемые к газу-носителю. Он должен: 1) быть инертным по отношению ко всем компонентам анализируемой пробы, сорбенту и конструкционным материалам хроматографа; 2) обеспечивать высокую чувствительность детектора; 3) быть чистым и взрывобезопасным; 4) быть доступным (как в плане себестоимости, так и доступности).

Использование легких газов-носителей (гелий) ускоряет анализ, а относительно тяжелых (азот) улучшит качество разделения в ущерб скорости. Скорость газа выбирают экспериментально для достижения хорошего разделения компонентов смеси и максимального ускорения времени анализа.

В зависимости от условий и задач проведения хроматографического анализа в качестве газа-носителя могут быть использованы:

— гелий (высокая теплопроводность и безопасность в работе, но низкая вязкость и высокая стоимость);

— аргон (эффективен при использовании ионизационных детекторов, но имеет низкую теплопроводность);

— азот (прост в очистке и безопасен в использовании, имеет низкий коэффициент диффузии разделяемых соединений, но имеет тот же недостаток, что и аргон);

— водород (отличная теплопроводность, легкость получения в процессе электролиза, но низкая вязкость и высокая взрывоопасность).

Твердый носитель. В качестве твердых носителей чаще всего используют хроматоны, хромосорбы, целиты, тефлон, стеклянные шарики и т. д. Твердый носитель служит для закрепления на его поверхности определенного количества неподвижной фазы в виде возможно более однородной пленки. Основное его назначение в ГЖХ — обеспечение наиболее эффективного использования неподвижной фазы (увеличение поверхности контакта).

Твердый носитель должен обладать следующими свойствами: химической и адсорбционной инертностью по отношению к хроматографируемым веществам; значительной удельной поверхностью, позволяющей нанести неподвижную фазу в виде тонкой пленки и не допускающей ее перемещения под действием силы тяжести; одинаковыми по форме и по размерам макропористыми частицами; достаточной механической прочностью; стабильностью при повышенных температурах.

Природа неподвижной фазы. Природа неподвижной фазы является основным фактором, определяющим последовательность выхода хроматографируемых веществ из колонки и отношение времени удерживания максимумов их зон.

Поэтому неподвижная фаза должна отвечать следующим требованиям: 1) высокая селективность к хроматографируемым веществам; 2) химическая инертность к материалу колонки, твердому носителю, подвижной фазе и хроматографируемым веществам; 3) химическая стабильность; 4) малая вязкость и низкое давление пара при рабочей температуре.

При выборе жидкой фазы полезным оказалось старое правило — «подобное растворяется в подобном». В соответствии с этим правилом для разделения смеси двух веществ выбирают жидкую фазу, близкую по химической природе одному из компонентов. Но ограниченность такого подхода для веществ с близкими свойствами или смесями сложного состава вполне очевидна. В данном случае эффективным оказалось применение колонок, содержащих несколько неподвижных фаз или сложные сорбенты. Компоненты смеси селективно удерживаются неподвижной фазой, а затем выходят из колонки и регистрируются детектором. Сигналы детектора

записываются в виде хроматограммы автоматическим потенциометром (самописцем) или же регистрируются на экране компьютера.

Параметры хроматографической колонки. Длина и диаметр колонки играют большую роль в плане времени проведения эксперимента. С увеличением длины и уменьшением диаметра колонки возрастает ее эффективность, но при этом существенно возрастает гидравлическое сопротивление, т. е. время анализа. Выбор размера колонки определяется составом анализируемой смеси, размером пробы и чувствительностью детектора. Например, более длинную колонку следует использовать для разделения компонентов смеси по мере усложнения ее состава и уменьшения разности времен удерживания в ней. Обратное условие, при анализе несложных смесей, содержащих легко разделяемые компоненты, совершенно целесообразно использовать слишком длинную колонку, которая увеличивает время анализа.

Другой параметр — это температурный диапазон колонки, который оказывает решающее влияние на ход хроматографического разделения. Повышение температуры обуславливает уменьшение времени удерживания, и, следовательно, сокращает время анализа. В среднем температуру колонки варьируют от 20 до 350 °С. Однако следует учитывать эмпирическое правило: в газовой хроматографии температура кипения вещества должна отличаться от температуры колонки не более чем на 50—60 °С. Когда анализируемая смесь содержит вещества, существенно различающиеся по температурам кипения, то температуру колонки повышают в процессе анализа (газовая хроматография с программированием температуры).

Тип детектора. Выбор детектора принципиально важен для анализа проб. Критериями выбора являются чувствительность и диапазон применения. Катарометр позволяет определить вещество, содержание которого в пробе составляет 10^{-3} % об. Чувствительность ионизационных детекторов к органическим веществам значительно выше (10^{-8} % об.). Для термоионного детектора чувствительность по отношению к фосфорорганическим соединениям возрастает еще на 3—4 порядка. Электронозахватный детектор практически нечувствителен к соединениям без атомов галогенов, зато по отношению к полигалогенпроизводным на 2—3 порядка чувствительнее, чем пламенно-ионизационный детектор.

Применение масс-спектрометра в качестве детектора газового хроматографа явилось событием такого масштаба, что потребовало самостоятельного наименования. Эта разновидность метода называется хромато-масс-спектрометрия. Масс-спектрометр обладает способностью не только зарегистрировать появление в нем разделяемого компонента, но и установить его структуру. Широкое применение хромато-масс-спектрометров вызвало необходимость

создания гигантских библиотек — баз данных масс-спектров всевозможных соединений.

Таким образом, при правильном выборе колонки, детектора и с учетом малого объема пробы предел обнаружения веществ методом газовой хроматографии составляет 10^{-12} — 10^{-13} г, что превосходит многие другие методы анализа.

11.2.4. Качественный и количественный анализ

Каждому компоненту смеси на хроматограмме соответствует отдельный пик (рис. 11.4). Время от начала хроматограммы до появления вершины пика называется *временем удерживания*. При строгом воспроизведении всех условий время удерживания является такой же физико-химической характеристикой вещества, как его плотность, показатель преломления и т. д.

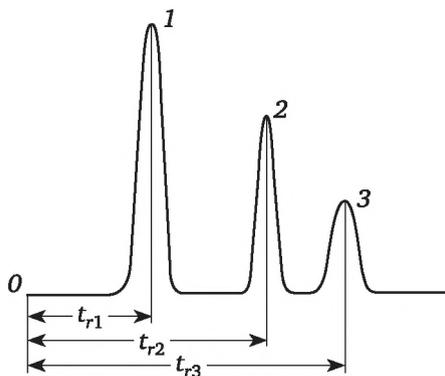


Рис. 11.4. Хроматограмма трехкомпонентной смеси:

0 — момент введения пробы в прибор; 1, 2, 3 — хроматографические пики компонентов смеси; t_{r1} , t_{r2} , t_{r3} — время удерживания компонентов

Определение качественного состава смеси проводится путем сопоставления времени удерживания данного компонента и эталона — вещества известной структуры. Совпадение времени удерживания эталона и определяемого компонента может указывать на их идентичность. Эталон чаще всего добавляется в исследуемую смесь (метод метки). При этом число пиков на хроматограмме не должно изменяться, а интенсивность пика одного из компонентов должна увеличиваться.

Время анализа зависит от химических, физических или физико-химических свойств разделяемых веществ (температуры кипения, показателя преломления, числа функциональных групп, молекулярных масс, констант заместителей Гаммета или Тафта) и природы неподвижной фазы. Более полярные соединения дольше удерживаются полярными жидкими фазами. Время удерживания также зависит от скорости газа-носителя, температуры разделения компонентов

(температурный режим хроматографической колонки), длины и диаметра колонки.

Скорость газа выбирают экспериментально для достижения хорошего разделения компонентов смеси: при увеличении скорости наблюдается уменьшение времени анализа. Повышение температуры обуславливает уменьшение времени удерживания. С увеличением длины и уменьшением диаметра колонки возрастает гидравлическое сопротивление, что приводит к увеличению времени удерживания.

Определение количественного состава смеси основано на допущении того, что интенсивность пика каждого компонента пропорциональна его содержанию в смеси. В качестве меры интенсивности принимается площадь пиков: $S = h \cdot \alpha$, где h — высота, α — ширина, измеренная на полувысоте пика (рис. 11.5).

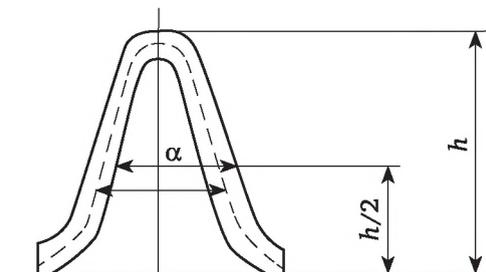


Рис. 11.5. Параметры хроматографического пика

Анализ данных в современных хроматографах автоматизирован. Как правило, полученные данные обрабатываются в специализированной программе, сопоставляются с базами данных, подвергаются статистической обработке.

Основными в количественной хроматографии являются методы нормировки, нормировки с калибровочными коэффициентами, внутренней стандартизации и абсолютной калибровки.

При использовании *метода нормировки* принимают сумму высот всех пиков или сумму их площадей за 100 %. Тогда отношение высоты отдельного пика к сумме высот или отношение площади одного пика к сумме площадей, умноженное на 100, будет характеризовать массовую долю (%) компонента в смеси. Вполне понятно, что такой метод предполагает существование одинаковой зависимости величины измеряемого параметра от концентрации для всех компонентов смеси.

В *методе нормировки с калибровочными коэффициентами* за 100 % принимается сумма параметров пиков с учетом чувствительности детектора. Различие в чувствительности детектора учитывается с помощью поправочных коэффициентов для каждого компонента. Один из преобладающих компонентов смеси считают

сравнительным и поправочный коэффициент для него принимают равным единице. Калибровочные коэффициенты (K) рассчитывают по формуле:

$$K_i = S_{ст} / S_i,$$

где $S_{ст}$ — площадь пика стандартного вещества; S_i — площадь пика определяемого вещества.

Концентрация компонентов в анализируемой смеси рассчитывается по формуле:

$$C = \frac{S_i K_i}{\sum S_i K_i} \cdot 100 (\%).$$

Наиболее точным является *метод абсолютной калибровки*. В этом методе экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят калибровочные графики. Далее определяют те же характеристики пиков в анализируемой смеси и по калибровочному графику находят концентрацию анализируемого вещества. Этот простой и точный метод является основным методом определения микропримесей. Кроме того, метод не требует разделения всех компонентов смеси, а ограничивается лишь теми, определение которых необходимо в данном конкретном случае.

Метод внутреннего стандарта применяется как при условии регистрации на хроматограмме всех компонентов анализируемой смеси, так и в случае не полностью идентифицируемых смесей. Преимущество метода внутреннего стандарта заключается в том, что в отличие от предыдущих методов нет необходимости идентифицировать все пики хроматограмм: достаточно определить необходимые пики. Метод основан на добавлении в анализируемую смесь известного количества определенного вещества, называемого внутренним стандартом. При этом стандарт не должен реагировать с компонентами смеси. Например, при анализе смеси гомологов стандарт должен быть членом этого гомологического ряда. Время удерживания стандарта должно быть равно среднему времени удерживания компонентов смеси.

После хроматографирования искусственных смесей измеряют параметры пиков анализируемых компонентов и стандартного вещества и строят калибровочные кривые. По оси ординат откладывают отношение площадей пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта, а по оси абсцисс — отношение объемных или весовых процентных содержаний обоих веществ (рис. 11.6).

Затем анализируют смесь, содержащую компоненты, для которых были построены калибровочные кривые. Добавляют к этой пробе определенное количество внутреннего стандарта (например,

толуола) в таком количестве, чтобы концентрация стандарта соответствовала среднему ее значению в искусственных смесях.

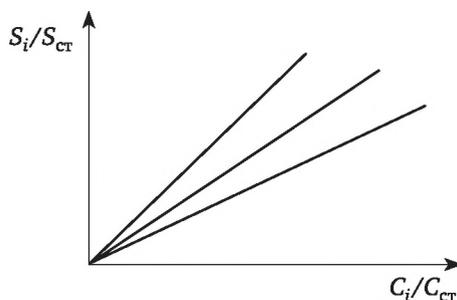


Рис. 11.6. Калибровочные кривые для определения состава смеси

Хроматографируют анализируемую смесь и определяют отношение площадей компонентов $S_i/S_{ст}$ для всех компонентов. Пользуясь калибровочными кривыми, находят отношение $(C_i/C_{ст})$ для всех компонентов и рассчитывают их концентрацию.

11.3. Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) находит широкое применение в научных исследованиях и в таких областях, как химия, нефтехимия, биология, медицина, пищевая промышленность, охрана окружающей среды и др.

Все хроматографические методы, использующие в качестве подвижной фазы жидкость, относят к жидкостной хроматографии. По механизму взаимодействия молекул сорбата с неподвижной фазой различают: распределительная, адсорбционная, ионообменная и ситовая хроматография. Однако классификация видов хроматографии по механизму сорбции достаточно условна, так как очень часто в реальном процессе параллельно протекают различные взаимодействия в зависимости от природы разделяемых веществ.

По критерию формы неподвижной фазы выделяют колоночную и плоскостную хроматографию (бумажный и тонкослойный варианты).

Применение в жидкостной хроматографии в качестве элюента жидкости позволяет анализировать смеси практически всех растворимых веществ, в том числе и тех, которые не могут быть проанализированы методом газовой хроматографии из-за их высоких температур кипения или их термолабильности. Другой особенностью жидкостной хроматографии является возможность использования значительно большего числа параметров при оптимизации условий разделения за счет реализации взаимодействия молекул разделяе-

мых веществ не только с неподвижной фазой, но и с подвижной фазой. Разделение в ЖХ возможно проводить при низких температурах (20—60 °С), что иногда улучшает разделение.

Очевидно, что теоретические положения жидкостной хроматографии, например, вопросы эффективности и селективности разделения, несколько отличаются от таковых в газовой хроматографии. Подобные отклонения обусловлены тем, что в жидкостях по сравнению с газом возрастает плотность (в 10^3 раз) и вязкость (в 10^2 раз) подвижных фаз и, как следствие, уменьшаются коэффициенты диффузии (в 10^4 раз). Поэтому в колоночной жидкостной хроматографии влиянием молекулярной диффузии на размывание зоны часто пренебрегают.

Основными процессами, влияющими на ширину хроматографической зоны, становятся вихревая диффузия и массопередача. Оба эти процесса существенно зависят от диаметра частиц неподвижной фазы. Чем больше диаметр частиц, тем больше высота, эквивалентная теоретической тарелке, тем сильнее размывание. В классической ЖХ частицы неподвижной фазы имеют диаметр от 10 мкм и выше, а жидкость по колонке передвигается за счет силы тяжести. Таким образом, по окончании процесса на выходе из колонки собираются и анализируются отдельные фракции элюата.

11.3.1. Жидкостно-жидкостная хроматография

В жидкостно-жидкостной хроматографии разделение веществ осуществляется за счет их различной растворимости в подвижной фазе (элюенте) и неподвижной фазе, физически сорбированной или химически привитой к поверхности твердого носителя. Следовательно, она основана на распределении веществ между двумя жидкими фазами, одна из которых неподвижна.

Распределительная хроматография стала использоваться с 1941 г., когда для разделения смеси веществ А. Мартин и Р. Синдж впервые показали возможность использования различий в их коэффициентах распределения между двумя несмешивающимися жидкостями и разработали совместно с Р. Консденом и А. Гордоном метод бумажной хроматографии. За разработку распределительной хроматографии А. Мартин и Р. Синдж в 1952 г. были удостоены Нобелевской премии.

11.3.1.1. Бумажная хроматография

Одним из вариантов жидкостной хроматографии, различающихся по форме неподвижной фазы и способу перемещения подвижной фазы, а также по технике исполнения и аппаратурному оформлению хроматографического процесса, является бумажная хроматография, являющаяся разновидностью плоскостной хроматографии.

Метод бумажной хроматографии значительно расширил возможности разделения, идентификации и количественного определения

малых количеств веществ в различных областях химии и биохимии. Хроматография на бумаге широко используется для разделения аминокислот, пептидов, углеводов, пигментов, органических кислот и других веществ. Бумажная хроматография применяется и в качестве аналитического метода определения смесей.

В зависимости от того, какого типа применяют бумагу или чем ее пропитывают, механизм разделения может быть различным: распределительным, адсорбционным, ионообменным, осадочным или смешанным.

Однако в большинстве случаев на практике используют метод, в котором реализуется *распределительный механизм*, когда разделение достигается за счет различного растворения веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами (вариант жидкостно-жидкостной хроматографии). Идеальный вариант распределительного механизма — когда неподвижная фаза удерживается твердым носителем — хроматографической бумагой, а подвижная фаза представляет собой органический растворитель или смесь растворителей.

Неподвижная фаза. В хроматографии на бумаге используют свойство хроматографической бумаги поглощать воду из атмосферы и задерживать ее между целлюлозными волокнами. Воду можно рассматривать поэтому как один из растворителей, она представляет собой неподвижную фазу. Часто подвижная фаза представляет собой смешивающийся с водой растворитель (например, бутанол). Казалось бы, что в таких случаях разделения не должно происходить, так как имеется только одна фаза. Однако комплекс воды с целлюлозой хроматографической бумаги по свойствам напоминает концентрированные водные раствора полисахаридов. Они не смешиваются с органическими растворителями, в том числе и с теми, которые смешиваются с водой.

При движении по бумаге под действием капиллярных сил неводного растворителя (подвижная фаза) молекулы вещества распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения.

Подвижная фаза. Критерием выбора подвижной фазы для бумажной хроматографии является растворимость в ней определяемого вещества и, следовательно, их физическое или химическое взаимодействие. Чем выше растворимость, тем больше, как правило, подвижность данного соединения в растворителе и, следовательно, тем дальше оно продвинется по бумаге вслед за растворителем. Наоборот, чем меньше растворимость, тем ближе будет зона определяемого вещества к точке старта. Растворители, используемые в бумажной хроматографии, располагают в так называемый миксотропный ряд по гидрофильности и полярности в порядке уменьшения значений этих параметров: вода, формамид, муравьиная кис-

лота, ацетонитрил, метиловый спирт, уксусная кислота, этиловый спирт, изопропиловый спирт, ацетон.

Хроматографическая бумага. Хроматографическую бумагу изготавливают из высококачественного хлопка, т. е. из практически чистой α -целлюлозы (до 98 %). Хроматографическая бумага должна быть химически чистой, для чего ее предварительно обрабатывают растворами минеральных кислот, щелочей или ацетоном, спиртами. Бумага должна быть химически и адсорбционно инертной по отношению к разделяемым веществам и подвижной фазе; быть однородной по плотности и толщине.

Хроматографическая бумага должна представлять собой длинные, ориентированные в определенном направлении волокна. В этом случае нанесенная на бумагу жидкость перемещается по капиллярам, образуемыми волокнами хроматографической бумаги. Наиболее четкое и воспроизводимое разделение достигается в том случае, когда направление движения подвижной фазы совпадает с направлением волокон бумаги.

Для проведения хроматографического разделения используют полоски хроматографической бумаги. Существует три сорта этой бумаги, отличающиеся различной толщиной и впитывающей способностью — медленная, средняя, быстрая. Одномерную хроматографию следует проводить по направлению волокон.

Методика хроматографирования. Хроматографирование проводят в хроматографической камере, в качестве которой можно применить любой сосуд с герметичной крышкой, чтобы не происходило испарения растворителя. Анализируемый раствор наносят на стартовую линию хроматографической бумаги в объеме не более 5—10 мкл с помощью микропипетки или микрошприца. Чем меньше площадь стартового пятна, тем менее размытой будет зона вещества после хроматографирования. Поэтому пробу смеси веществ объемом более 1 мкл наносят в одну и ту же точку повторно в несколько приемов, каждый раз подсушивая пятно.

После высыхания капли край бумаги ниже линии старта погружают в подвижную фазу, налитую на дно хроматографической камеры. Затем подвешивают вертикально полоску бумаги, плотно закрывают камеру и оставляют на некоторое время (восходящий вариант).

Подвижная фаза под действием капиллярных сил поднимается по бумаге, вместе с ней перемещаются с различной скоростью анализируемые вещества. Когда фронт подвижной фазы приблизится к линии финиша (пройдет заданное расстояние) лист вынимают и сушат.

Зоны разделяемых веществ в виде пятен, которые могут быть как видимыми, так и невидимыми, обнаруживают и проводят определение (качественное и количественное) разделенных компонентов.

Для определения местоположения пятен хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают специальными растворами. Использование бумажной хроматографии в препаративных целях ограничено.

Способы получения хроматограмм. По направлению движения подвижной фазы можно выделить ряд способов получения хроматограмм, а именно: восходящий, нисходящий, двумерный, круговой, линейный, и др.

При восходящем способе лист хроматографической бумаги погружают в подвижную фазу ниже линии старта (рис. 11.7, а). За счет капиллярных сил подвижная фаза перемещается вверх по вертикально закрепленному листу. По мере продвижения растворителя происходит разделение смеси веществ.

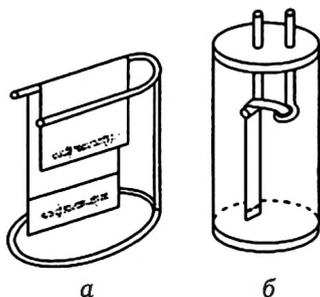


Рис. 11.7. Получение восходящей (а) и нисходящей (б) хроматограмм

При нисходящей хроматографии верхний конец бумаги с нанесенным на линию старта образцом закрепляют в «лодочке» с растворителем, которая расположена в верхней части камеры (рис. 11.7, б). Нижний конец бумаги опускают вниз камеры так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно растворителем. Его роль заключается в поддержании равновесной упругости паров растворителя в камере. Под действием капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает двигаться вниз по бумажной полосе, в ходе чего и происходит разделение.

Первый вариант более прост в работе и применяется чаще. Однако скорость движения растворителя во втором случае гораздо выше, чем при восходящей хроматографии. При движении подвижной фазы в одном направлении получают одномерную хроматограмму. На ней в одной подвижной фазе не всегда удастся разделить сложную смесь веществ.

Для более эффективного разделения веществ используют многократное хроматографирование в той или другой системе растворителей. Хорошее разделение сложных смесей веществ близких по химическому строению достигается при двумерной хроматографии. В данном варианте бумажной хроматографии подвижную фазу

пропускают в одном направлении, достигая группового разделения смеси, состоящей из нескольких веществ. Затем лист бумаги сушат, поворачивают на 90° и погружают в другую подвижную фазу, в которой происходит разделение пятен, не полностью разделившихся в первом направлении движения (рис. 11.8).

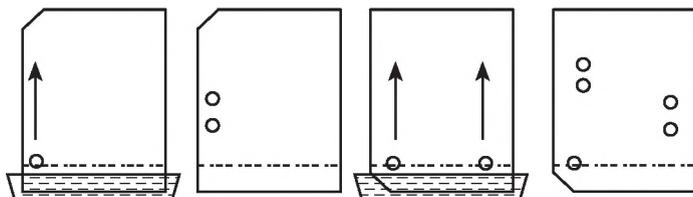


Рис. 11.8. Получение двумерной хроматографии

Качественный анализ. Если хроматографируемые вещества окрашены, их зоны наблюдаются визуально. Если зоны бесцветны, то на полоске бумаги их выявляют следующими приемами. Проявляют хроматограмму раствором-проявителем, который дает с определяемым веществом окрашенный продукт реакции. Проявитель наносят путем распыления с помощью пульверизатора.

Очень часто хроматограмму помещают в пары иода (в закрытый сосуд), который вступает в реакцию с различными органическими веществами, окрашивая их в желтый, коричневый или чернильно-синий цвет. Кроме этого, используют специфическую реакцию на алифатические амины и аминокислоты с нингидрином: после опрыскивания реагентом и последующего нагревания бумаги на ней появляются окрашенные в малиново-красный цвет пятна.

Для проявления неорганических ионов, например Fe^{3+} и Co^{2+} , на хроматограмму распыляют 10%-ный раствор роданида аммония в ацетоне, при этом зона железа окрашивается в красно-коричневый цвет, кобальта — в синий, вследствие образования комплексных роданидных ионов этих элементов. Иногда реактив наносят на хроматограмму кисточкой, если требуется проявление на ограниченном участке бумаги.

Бесцветные вещества можно обнаружить при воздействии ультрафиолетовых лучей по возникновению их собственной флуоресценции или путем обработки их каким-либо реагентом, дающим специфическую флуоресцентную реакцию. Полоску бумаги помещают в ультрафиолетовый свет ртутной лампы и тут же обводят карандашом появившиеся пятна.

При выявлении на бумажной хроматограмме зон разделяемых веществ приступают к их идентификации, т. е. к определению их принадлежности к определенным веществам. Используют хроматографирование со «свидетелем». Для этого рядом с каплей определяемой смеси веществ на линию старта наносят несколько капель

растворов индивидуальных веществ (сколько их содержится в анализируемой смеси). По итогам хроматографирования и проявления сопоставляют положения пятен веществ исследуемой смеси и «свидетелей», делая вывод о присутствии или отсутствии их в анализируемом растворе.

В качестве основной характеристики вещества используется фактор R_f (коэффициент скорости движения), определяемый как отношение скорости (или расстояния) движения фронтов зоны и подвижной фазы: $R_f = l/L$, где l — расстояние от линии старта до середины зоны хроматографируемого соединения, см; L — расстояние, пройденное подвижной фазой от стартовой линии до линии фронта (финиша). Величина R_f зависит от свойств бумаги, температуры, степени чистоты растворителей, однотипности процедур и аппаратуры.

Количественный анализ. В бумажной хроматографии существуют две группы способов проведения количественного анализа: непосредственно на хроматограмме или после извлечения (элюирования) зоны с хроматограммы.

Исходят из пропорциональности между количеством вещества и площадью пятна. В интервале микрограммовых количеств хроматографируемых веществ между площадью пятна и содержанием вещества в нем наблюдается линейная зависимость: $S = a \cdot \lg C + b$, где S — площадь пятна, C — содержание вещества в пятне.

В этом случае на полоску бумаги наносят несколько капель, содержащих разные, но определенные концентрации вещества (метод градуировочного графика). После хроматографирования измеряют площадь пятен. Затем строят градуировочный график или методом наименьших квадратов получают числовое значение коэффициентов a и b . Измерив площадь пятна определяемого вещества, его содержание в пятне находят по графику или рассчитывают по уравнению.

Используют также и такой метод: вырезают и взвешивают пятно на бумаге и аналогичный по площади чистый кусочек той же бумаги, по разности находят массу вещества.

Если зоны (пятна) на хроматограмме окрашены, содержание вещества определяют по интенсивности окраски. В этом случае сравнивают интенсивность окраски с полученной на бумаге шкалой пятен различной интенсивности (и, следовательно, различного содержания данного вещества).

Количественный анализ можно провести путем извлечения (элюирования) вещества с хроматограммы, как водой, так и любым другим растворителем с последующим измерением концентрации вещества в экстракте различными химическими, физико-химическими или физическими методами (титрование, фотометрия, потенциометрия, полярография и т. д.).

Приведем пример для определения количественного содержания аминокислот. В данном случае в испытуемых смесях хроматограмму расчерчивают простым карандашом так, чтобы лежащие на одном уровне окрашенные зоны, соответствующие одной и той же аминокислоте, оказались заключенными внутри примерно одинаковых прямоугольников (рис. 11.9).

Очерченные участки бумаги вырезают и помещают в пробирки, номера которых должны соответствовать номерам пятен на хроматограммах. В каждую пробирку наливают из бюретки по 10 мл 75 %-ного раствора этилового спирта, насыщенного сульфатом меди (к 500 мл этилового спирта добавляют 0,2 мл насыщенного раствора сульфата меди). Пробирку закрывают пробкой и, периодически перемешивая, добиваются полного перехода кирпично-красной окраски (медной соли сине-фиолетового Руэмана) с бумаги в раствор. Абсорбцию стандартного и испытуемого растворов измеряют на фотоэлектрокалориметре с зеленым светофильтром (540 нм). В поток сравнения устанавливают кювету с 75%-ным раствором этилового спирта с сульфатом меди.

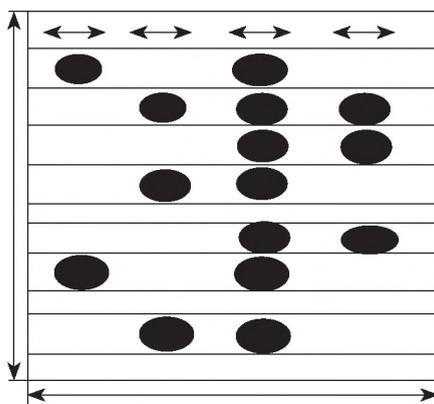


Рис. 11.9. Схема расположения аминокислот на хроматограмме

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

Возможности метода. Метод хроматографии на бумаге является одним из наиболее универсальных среди современных методов разделения многокомпонентных смесей неорганических и органических веществ. Методы качественного и количественного анализа применяют для анализа сложных смесей неорганических ионов всех элементов периодической системы, для разделения смесей микро- и субмикроколичеств близких по химическим свойствам элементов — редкоземельных элементов, актинидов, циркония и гафния, ниобия и тантала, селена и теллура, галогенов.

Достоинствами метода являются: 1) простота и доступность аппаратуры, что выгодно отличает этот метод от колоночной хроматографии; 2) быстрота проведения; 3) малая трудоемкость; 4) простота способов обнаружения зон веществ на хроматограммах; 5) возможность доступной и быстрой оценки содержания элементов в зонах хроматограмм. К недостаткам относятся использование токсичных растворителей, невозможность разделения веществ с близкими свойствами, сильное размывание хроматографических зон из-за неоднородности бумаги.

11.3.1.2. Гель-проникающая хроматография

Гель-хроматография или гель-проникающая, или эксклюзионная хроматография является одним из вариантов жидкостно-жидкостной (распределительной) хроматографии. Подвижной фазой в проникающей хроматографии является растворитель (жидкость), а неподвижной — та же жидкость, заполнившая поры сорбента (геля), т. е. и подвижную, и неподвижную фазы составляет одно то же вещество или одна и та же смесь веществ.

Ввиду того, что сорбенты, используемые в гель-хроматографии, имеют различные по размерам поры, разделение в данном случае зависит от соотношения размеров молекул разделяемых веществ и размеров пор сорбента. Помимо размеров, которые можно в первом приближении принять пропорциональными молекулярным массам, существенную роль в гель-хроматографии играет форма молекул. Особенно большое значение этот фактор имеет для растворов полимеров, в которых при одной и той же молекулярной массе молекулы могут принимать различную форму (сферическую или другую) в соответствии с их конформационной подвижностью и вследствие этого они по-разному ведут себя в колонке.

При прохождении через колонку компоненты смеси разделяются на фракции в соответствии с их молекулярными массами. Первыми вымываются (элюируются) наиболее крупные молекулы, особенно такие, у которых размеры молекул превышают размеры пор сорбента, так как они не в состоянии проникнуть в поры и остаются только в окружающем сорбент слое растворителя (внешнем объеме). При промывании колонки растворителем скорость движения таких молекул максимальна. Молекулы меньшего размера будут проникать в поры полностью или частично (в зависимости от размера пор), и весь процесс разделения будет зависеть, кроме размера пор сорбента, от коэффициента диффузии разделяемых молекул.

Для данного вида геля распределение анализируемого вещества в растворителе внутри и снаружи геля определяется коэффициентом распределения K_d , который зависит от размера молекул вещества. Если молекулы крупные, в растворителе внутри частиц геля их будет мало, величина K_d в этом случае практически равна 0.

Если молекулы вещества достаточно малы и могут беспрепятственно проникать внутрь частиц геля, то $K_d = 1$. Поскольку размеры пор варьируются, молекулы среднего размера будут проникать в растворитель, находящийся в порах, лишь частично; следовательно, величина K_d в этом случае будет находиться между 0 и 1. Это позволяет разделять на данном геле вещества, молекулярные массы которых различаются лишь весьма незначительно.

Сорбенты. В зависимости от свойств хроматографируемых соединений в гель-хроматографии применяют гидрофильные или гидрофобные сорбенты с жесткой, полужесткой и мягкой матрицей. В качестве гидрофильных сорбентов используют мягкие декстрановые гели (сефадексы и молселекты), полиакриламидные гели (био-гели), а также макропористые силикагели и макропористые стекла (жесткие сорбенты). В качестве гидрофобных сорбентов применяют некоторые типы сефадексов, полистирольные гели, поливинилацетатные гели и также силикагель и макропористое стекло (порасил).

Основное требование к работе сорбентов в гель-хроматографии — исключить адсорбцию и ионный обмен разделяемых веществ, т. е. разделение должно проходить только за счет размеров молекул. Среди гидрофильных сорбентов наиболее применимыми являются декстрановые гели-сефадексы. Для получения сефадекса используется декстран. Декстран — растворимый линейный полисахарид с молекулярной массой до 10 млн, очень гидрофилен.

Аппаратура. Гель-хроматографию проводят в хроматографических колонках или на пластинках в тонком слое, так что аппаратура в гель-хроматографии практически не отличается от аппаратуры, используемой в других вариантах жидкостной хроматографии. Это может быть обычный колоночный вариант со сбором фракций ручным способом или с помощью коллектора, или любой жидкостной хроматограф.

Из детекторов наибольшее применение в высокоэффективной гель-хроматографии нашли проточный оптический детектор, дифференциальный рефрактометр для анализа полимеров, вискозиметрический детектор.

Тонкослойная гель-хроматография осуществляется на стеклянных пластинках, на которых тонким слоем нанесен гель. Образец на стартовую линию наносится в виде точки, и подвижная фаза движется вдоль слоя только нисходящим методом. За ходом хроматографирования наблюдают по движению окрашенного стандарта, который одновременно наносят на стартовую линию.

Гель-хроматография широко применяется в биохимии, синтетической органической химии и химии полимеров. Одним из направлений использования возможностей гель-хроматографии является определение молекулярных масс белков, полимеров, углеводов.

Определение основано на линейной зависимости объемов выхода веществ от молекулярной массы:

$$V_R/V_0 = k \cdot \lg M.$$

Содержание белка по всех исследуемых фракциях можно определять спектрофотометрически, измеряя абсорбцию каждой пробы на спектрофотометре при 280 нм или на фотоэлектроколориметре, предварительно проведя цветные реакции по методу Лоури. Строят выходную кривую (рис. 11.10).

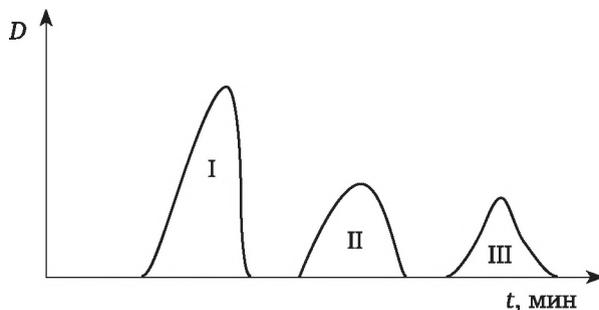


Рис. 11.10. Выходная кривая:

D — оптическая плотность (абсорбция) фракций; t — время их выхода; I, II, III — белковые фракции

Каждый сорбент характеризуется своей градуировочной кривой, по которой находят молекулярные массы веществ (рис. 11.11).

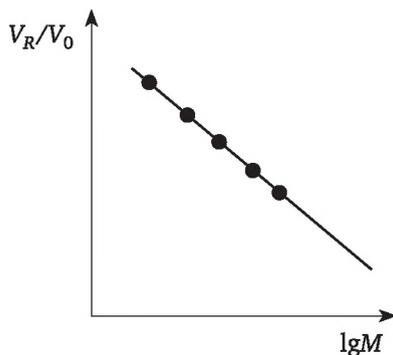


Рис. 11.11. Калибровочный график для определения молекулярных масс в гель-хроматографии

В качестве калибровочных соединений (стандартов) используют вещества, близкие по своей природе к исследуемым веществам. Так как на данной колонке объем выхода вещества воспроизводится очень точно, то вначале через колонки пропускают стандартные вещества и определяют их объемы выхода, строят калибровочный

график, а затем, зная V_R вещества с неизвестной молекулярной массой, находят ее по графику.

Тонкослойная гель-хроматография находит широкое применение для определения молекулярно-массового и композиционного распределения полимеров, в клинической диагностике как экспресс-метод для определения патологических белков в сыворотке крови.

Гель-проникающая хроматография используется для очистки высокомолекулярных биологических соединений. Так проводят очистку и разделение вирусов, белков, ферментов, гормонов, антигенов, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Этим методом можно отделять аминокислоты от пептидов, фракционировать пептиды, образующиеся в результате гидролиза белков, а также олигонуклеотиды из гидролизатов нуклеиновых кислот. Метод проникающей хроматографии позволяет определять молекулярные массы неизвестных белков, проводить обессоливание белков и концентрирование их растворов, а также удалять фенол из растворов нуклеиновых кислот, моносахариды отделять от полисахаридов и аминокислоты от белков. Гель-хроматография находит широкое применение в клинической диагностике как экспресс-метод для определения патологических белков в сыворотке крови.

11.3.1.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Классический вариант жидкостной хроматографии не всегда обеспечивает полное разделение компонентов. Качество разделения можно улучшить при уменьшении размера частиц. Поэтому на смену классическому варианту пришел метод с сорбентом гораздо меньшего размера частиц (3—10 мкм) и небольшими колонками (длинной от 10 до 30 см и диаметром ~5 мм). Это привело к значительному росту гидравлического сопротивления. Для решения возникшей проблемы и ускорения анализа элюент стали нагнетать в колонку под большим давлением, в 100—400 раз превышающем атмосферное. Пробу в хроматограф вводят с помощью специальных микрошприцов-дозаторов. Соединительные трубки и сами колонки выполняют из прочных, способных выдерживать высокие давления и химически инертных материалов. Важной особенностью прибора является необходимость обеспечить герметическое соединение разных узлов жидкостного хроматографа, которые должно выдержать высокое давление.

Новый вариант анализа получил название: *высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или жидкостная хроматография высокого давления*. Начав развиваться с середины 1970-х гг., метод ВЭЖХ в первое время существенно проигрывал из-за отсутствия подходящих сорбентов для заполнения колонок. Однако с появлением привитых фаз насадочные колонки стали обеспечивать воспроизводимые результаты, что сделало ВЭЖХ идеальным инструментом

для определения большинства пестицидов, включая хлор- и фосфорорганические производные, полиароматических углеводов, относительно нелетучих высокомолекулярных загрязнителей. С помощью ВЭЖХ можно разделять также белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, красители, полисахариды, взрывчатые вещества, лекарственные препараты, метаболиты растений и животных.

Этот метод позволил внести свежие идеи в классику жидкостного хроматографирования. Например, *градиентное элюирование*: когда состав элюента меняют непрерывно, смешивается в переменном соотношении 2—3 растворителя по заранее заданной программе. Данный прием позволяет полностью вымывать из колонки все компоненты пробы и получать на одной хроматограмме пики соединений, сильно различающихся по растворимости (например, растворимых только в воде или только в ацетоне).

Кроме того, применение сорбентов нового типа привело к созданию современного варианта жидкостной хроматографии с увеличенной эффективностью разделения.

В этом методе резко уменьшается вклад внешне- и внутридиффузионной массопередачи. Применение узких колонок с внутренним диаметром 4—6 мм вызвало необходимость повысить давление на входе в колонку до 0,5—40 МПа, чтобы увеличить скорость прохождения элюента. Появилась возможность работать при больших скоростях элюирования. Результатом стало появление колонки с числом теоретических тарелок $\sim 10^5$ и новых детекторов, позволяющих определять до 10^{-10} г вещества, а именно: фотометрических (работающих, как в УФ, так и видимой области), рефрактометрических, флуориметрических, амперометрических.

Большим достоинством ВЭЖХ является возможность реализовать все механизмы разделения — распределительный, адсорбционный, ионообменный, ситовой.

Высокоэффективная жидкостная хроматография базируется на тех же принципах что и ГЖХ. Но вместо газа-носителя в качестве подвижной фазы применяется поток жидкости. Данный поток не смешивается с жидкой неподвижной фазой хроматографической колонки. Таким образом, обе контактирующие фазы — жидкости. При этом разделение компонентов базируется на отличиях их коэффициентов распределения между неподвижной и подвижной фазами. Следовательно, метод распределительной хроматографии базируется на распределении вещества между двумя несмешивающимися фазами и сводится к многократной ступенчатой экстракции.

В данном методе жидкую неподвижную фазу наносят на пористый достаточно инертный сорбент, как в газожидкостной хроматографии, и заполняют им колонку. При пропускании жидкой подвижной фазы через колонку происходит разделение смеси на компоненты преиму-

щественно за счет их разной растворимости в жидкой неподвижной фазе. Обычно растворимость компонентов смеси в неподвижной и подвижной фазах разной полярности очень отличается. При большей растворимости пробы в неподвижной фазе время удерживания компонентов значительно возрастает. Если растворимость выше в подвижной фазе, то время удерживания уменьшается.

Для достижения быстрого разделения смеси в подвижную фазу добавляют третий компонент, снижающий различия по полярности неподвижной и подвижной фаз. Например, к смеси неполярного (гексан) и полярного (вода) растворителей прибавляют спирт. Только в этом случае удастся подобрать оптимальные условия для разделения компонентов смеси.

В распределительной хроматографии в зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз разделяют два варианта метода: *нормально-фазовый* и *обращенно-фазовый*.

В первом случае в качестве неподвижной фазы применяется полярный растворитель (вода, спирт), зафиксированный на твердом носителе (силикагель, диатомит, целлюлоза, Al_2O_3). Подвижной фазой в этом случае являются неполярные растворители (изооктан, бензол и др.). Такие системы используют в нормально-фазовой распределительной хроматографии.

Второй случай — это неполярный растворитель, зафиксированный на носителе, а в качестве подвижной фазы используются полярные растворители (вода, спирт, буферные растворы и др.). При этом стоит отметить, что нанесенные жидкие фазы имеют недостаток — они быстро смываются подвижной жидкой фазой с поверхности носителя, в особенности при использовании распределительного метода в ВЭЖХ. Решением этой проблемы стала возможность «пришивать» жидкие фазы к носителю. Поэтому для нормально-фазовой распределительной хроматографии в качестве носителей неподвижных жидких фаз используют силикагели с пришитыми нитрильными, аминными и другими группами.

В обратно-фазовом варианте распределительной хроматографии берут силикагели с пришитыми алкилсилильными группами от C-2 до C-22 (часто применяемыми фазами являются фазы с пришитыми C-18).

Рассматривая блок-схему ВЭЖХ (рис. 11.12), стоит отметить, что теоретические положения ВЭЖХ и классической колоночной жидкостной хроматографии практически одинаковы. Конструкция приборов не зависит от механизма разделения и, следовательно, от природы подвижной и неподвижной фаз.

В ее состав входят следующие основные элементы.

Емкости для элюента. В качестве материала для изготовления емкости для элюента используется стекло, полиэтилен, полипропилен, политетрафторэтилен, нержавеющая сталь.

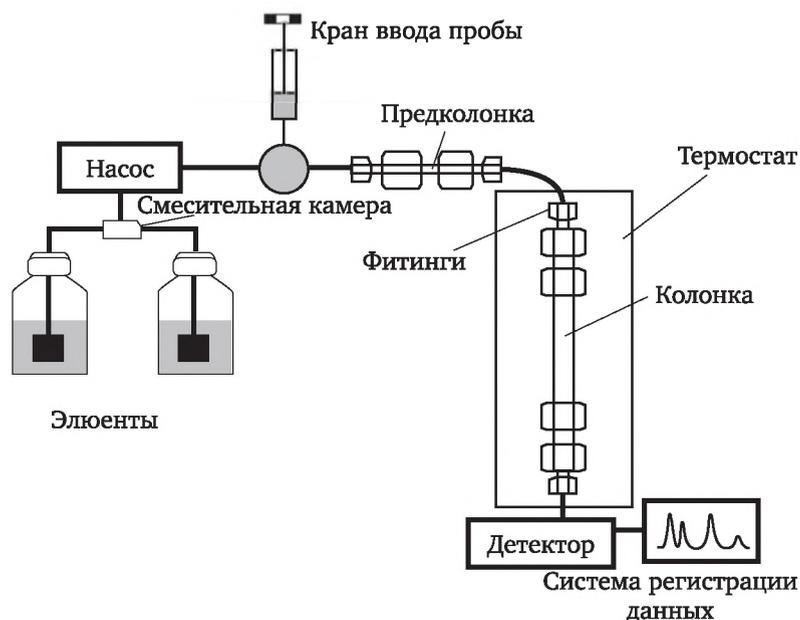


Рис. 11.12. Блок-схема жидкостного хроматографа

Элюенты. Так как выбор растворителя при разделении имеет большее значение по отношению к выбору неподвижной фазы, то можно обозначить ряд требований к элюенту: 1) элюент должен не создавать помех при детектировании пробы; 2) проба должна полностью растворяться в элюенте; 3) элюент должен легко удалиться по истечении анализа; 4) при подборе элюента важно учитывать его вязкость (с понижением его вязкости уменьшается необходимое давление при сохранении скорости переноса); 5) недопустимы необратимые взаимодействия элюента ни с пробой, ни с адсорбентом.

Смесительная камера. В данной камере происходит смешивание различных растворителей для приготовления подвижной фазы.

Насосы. Материалом для изготовления насосов являются сплавы титана. Данные насосы создают стабильный непульсирующий поток подвижной фазы и при необходимости развивают большое, до нескольких сотен атмосфер, давление. Эти насосы, так называемого шприцевого или плунжерного типа, представляют собой вариации от одно или двух- до трех-поршневых возвратно-поступательных систем, способных создавать указанное высокое давление и формировать градиент элюирования с использованием трех и даже более растворителей.

Дозаторы оснащены системой ввода пробы, где проба вводится краном или шприцем через самозатягивающуюся мембрану. В первом случае на дозаторе установлен кран, который соединен с главной магистралью потока и емкостью определенного объема (дози-

рующая петля), в которую вводится проба. После введения пробы кран переключают в рабочее положение, при котором емкость соединяется с главной магистралью, проба вымывается потоком элюента из смесительной камеры и поступает в колонку.

Во втором случае проба вводится шприцем (прокалывая самозатягивающуюся мембрану) непосредственно в верхнюю часть колонки. Однако подобный способ используется крайне редко, лишь при очень невысоких давлениях на входе в колонку (не более 5 атм).

Предколонка выполняет роль фильтра-ловушки для удержания на себе примесей и механических частиц. Таким образом, предколонка защищает аналитическую колонку, существенно продлевая срок ее эксплуатации.

Хроматографические колонки представляют собой трубки из нержавеющей стали. Внутренние стенки трубки полируются или покрываются стеклом, полимером или золотом. Колонки различают по диаметру трубок: 4—8 мм (полупрепаративные), 2—4 мм (аналитические), 1—2 мм (микростолонки). В трубки помещается адсорбент в виде порошка с определенным размером частиц (например, 5 мкм). В качестве адсорбента широкое распространение получили оксид алюминия и силикагель. Наиболее важными характеристиками адсорбента являются площадь частиц или объем пор, приходящихся на единицу объема колонки. Колонки соединяются с трубками особыми торцевыми соединениями, которые обеспечивают плавный перенос подвижной фазы из соединительного капилляра в колонку.

Термостат используется главным образом как средство ускорения анализа. С повышением температуры может возрастать эффективность хроматографической колонки. Например, с повышением температуры от комнатной до 70 °С увеличение эффективности может составлять 20—40 % за счет снижения вязкости подвижной фазы. Для их работы в равной степени применяются водяная, воздушная или металлическая рубашки.

Детекторы. Детекторы, используемые в данном методе, предназначены для непрерывного определения концентрации растворенного вещества в подвижной фазе на выходе из колонки. Он может быть специфическим (избирательно реагирующим на конкретный тип или класс соединений) или неспецифическим (универсальным).

По способу действия детекторы классифицируются на 1) оптические (рефрактометрические, ультрафиолетовые, флуоресцентные); 2) электрические (кондуктометрические, вольтамперомерметрические, кулонометрические); 3) электрохимические; 4) масс-спектрометрические; 5) термометрические.

Применение ВЭЖХ позволяет проводить качественный и количественный анализ, разделение компонентов смеси. Последнее, как правило, осуществляется в препаративных жидкостных хроматогра-

фах, главным отличием которого является присоединение к детектору коллектора фракций для отбора нужных компонентов смеси после ее разделения. Стоит отметить высокую воспроизводимость времен удерживания, высот и площадей пиков, которая составляет $\pm(2 \div 3) \%$.

Если говорить о чувствительности метода, то она определяется типом применяемого детектора и свойствами определяемого вещества, например, наличием хромофорных групп при использовании фотометрических детекторов. Наиболее чувствительными являются электрохимические и флуориметрические детекторы, позволяющие обнаружить до 10^{-12} г/мл вещества. Стоит отметить и скорость проведения эксперимента: продолжительность одного анализа составляет от 3 до 20 мин

Следует отметить основные достоинства ВЭЖХ.

1. Высокая разделительная способность, откуда — хорошее разделение многокомпонентной смеси.

2. Высокая скорость движения хроматографической зоны, которая позволяет проводить анализ в небольшой промежуток времени.

3. Проведение хроматографического процесса в мягких условиях, в том числе при комнатной температуре.

К недостаткам следует отнести следующее.

1. Представленные методы детектирования не всегда достаточно чувствительны для определения малых уровней концентрации (например, в случае применения в клиническом фармакокинетическом анализе).

2. Ряд веществ не могут быть детектированы применяемыми в ВЭЖХ фотометрическими методами, если они не поглощают свет в интервале от 80 нм до 190 нм.

3. Методы ВЭЖХ требуют применения большого количества органических растворителей, которые, как правило, высокотоксичны и пожароопасны. Более того, очистка этих растворителей является трудоемким процессом, а очищенные для целей хроматографии высокого давления спектрально чистые растворители дороги и не всегда доступны.

4. Аппаратура для ВЭЖХ в среднем более дорогая и сложная в обслуживании, чем, например, для ГЖХ.

5. Наполнители для ВЭЖХ дороже, чем для ГЖХ, а наполнение колонок намного сложнее.

11.3.2. Жидкостно-адсорбционная хроматография

В основу классификации методов жидкостной хроматографии может быть положен механизм взаимодействия молекул сорбируемого вещества с неподвижной фазой. Если молекулы сорбата удерживаются поверхностью твердого адсорбента за счет дисперсионных, ориентационных и индукционных взаимодействий, ме-

тод называют адсорбционной хроматографией. Подвижная фаза играет активную роль в межмолекулярных взаимодействиях. Взаимодействие хроматографируемых веществ с элюентом уменьшает удерживание (адсорбцию) на неподвижной фазе. Поэтому при рассмотрении механизма сорбции в жидкостной хроматографии необходимо учитывать сорбцию молекул элюента на поверхности неподвижной фазы.

Возможны следующие варианты сорбции сорбата (рис. 11.13): а) вытеснение молекул элюента непосредственно с поверхности сорбента; б) адсорбция на монослое молекул элюента; в) растворение в полислоях элюента. Эти варианты наглядно иллюстрирует следующая схема:

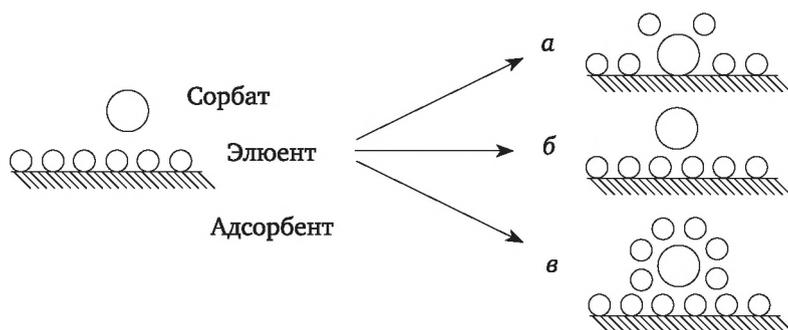


Рис. 11.13. Сорбция молекул элюента

Таким образом, важной особенностью адсорбционной жидкостной хроматографии является то, что удерживание вещества на сорбенте определяется тремя типами взаимодействия: адсорбент — сорбат; адсорбент — элюент; элюент — сорбат.

По сравнению с газовой хроматографией в жидкостной хроматографии добавляется взаимодействие элюент — сорбат и элюент — адсорбент, и с точки зрения межмолекулярных взаимодействий хроматографическую систему сорбент — сорбат — элюент надо рассматривать в целом.

В адсорбционной жидкостной хроматографии в зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз различают два варианта метода: нормально-фазовый и обращенно-фазовый.

В нормально-фазном варианте хроматографии применяют полярные сорбенты (силикагель, оксид алюминия), неполярные подвижные фазы (гексан) и разделяют полярные вещества. Особенно широко в нормально-фазном варианте хроматографии применяют сорбенты на основе силикагеля. Силикагель — аморфное вещество, общая химическая формула $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Введение различных функциональных групп, например CN, NO_2 , NH_2 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, позволяет изменить свойства и селективность силикагелей. При выборе под-

вижного растворителя необходимо учитывать не только его транспортную функцию, но и возможность взаимодействия с растворенным веществом.

Идентификация компонентов смеси методом адсорбционной жидкостной хроматографии проводится аналогично идентификации в газовой хроматографии, т. е. по времени или объему удерживания, а также по логарифмическим зависимостям, существующим для гомологических рядов. В последнем случае хроматографируют несколько веществ, являющихся членами гомологического ряда, и строят график зависимости логарифма времени удерживания от числа звеньев гомологического ряда.

Расчет количественного состава смесей проводят методом калибровочного графика или методом внутреннего стандарта, который позволяет исключить ошибку, связанную с вводом пробы. Метод нормировки используют редко.

Пики на хроматограммах в современных хроматографах обрабатываются цифровыми интеграторами и специализированными программами, которые выводят на печать все нужные исследователю параметры: название веществ, площади пиков, времена удерживания и содержание (в различных единицах) для всех компонентов исследуемого образца.

11.3.2.1. Хроматография на колонке

Колонка для адсорбционной хроматографии представляет собой стеклянную трубку, заполненную адсорбентом. На адсорбент в колонке наносят смесь веществ. Затем через них пропускают растворитель или смесь растворителей, служащих подвижной фазой. Разделение основано на том, что вещества с более высоким эффективным коэффициентом распределения продвигаются на колонке с большей скоростью, отделяясь таким образом от веществ с более низким коэффициентом.

Если исследуемые вещества окрашены, то при разделении можно видеть движение по колонке окрашенных зон. Образующиеся в результате разделения зоны извлекают одним из двух способов. В первом случае столбик сорбента выталкивают из колонки, зоны разделяют шпателем. Затем элюируют из зон разделенный материал. Другой способ состоит в том, что растворитель (элюент) пропускают через колонку до тех пор, пока не соберут все фракции по мере их выхода. Этот способ применяется чаще.

Если разделяемые с помощью хроматографии на колонке вещества не окрашены, то весь выходящий из колонки раствор (элюент) собирают в виде фракций, а потом анализируют их. При этом часто элюат контролируют, например, освещая ультрафиолетовыми лучами. При выходе чистого растворителя флуоресценция отсутствует, а возникает во время появления примесей компонентов.

Для получения адсорбционных хроматограмм применяют растворители, обладающие слабой адсорбируемостью на применяемых адсорбентах. При выборе растворителя руководствуются правилом, согласно которому неполярные адсорбенты адсорбируют из полярных растворителей значительно хуже, чем из полярных. Полярные же адсорбенты слабее адсорбируют из полярных растворителей.

Эффективность разделения зависит от правильного заполнения колонки адсорбентом. Если плотность заполнения колонки неодинакова, особенно у стенок, то при анализе окрашенных веществ можно обнаружить затекание, т. е. проникновение вещества из одной зоны в другие. Затекание может привести к сильному снижению эффективности разделения, оно особенно опасно при разделении неокрашенных веществ, так как в этом случае его трудно обнаружить в ходе хроматографии.

В настоящее время жидкостно-адсорбционная хроматография на колонке применяется при разделении и изучении состава углеводов, фенолов, углеводородов, липидов, стероидов, производных аминокислот, компонентов нуклеиновых кислот, алкалоидов, пестицидов, витаминов и других веществ.

11.3.2.2. Тонкослойная хроматография

Тонкослойная хроматография (ТСХ) занимает особое место среди других хроматографических методов благодаря доступности оборудования, простоте методики, обширной области применения, высокой экономичности, при достаточно высокой селективности и чувствительности.

При этом ТСХ отличается от колоночной хроматографии следующими особенностями: по форме неподвижной фазы; способу перемещения подвижной фазы; технике исполнения и аппаратурному оформлению хроматографического процесса.

Процесс разделения в ТСХ происходит в слое тонкодисперсного сорбента, нанесенного на пластинку. Отсюда тонкослойную хроматографию вместе с бумажной хроматографией относят к плоскостным хроматографическим методам.

Данный метод успешно применяется для разделения очень малых количеств веществ (до 0,1—0,005 мкг). Впервые на тонком слое были разделены алкалоиды лекарственных растений. В отличие от колоночной хроматографии, при ТСХ слой сорбента наносят на горизонтальную стеклянную, металлическую или пластмассовую пластинки (ТСХ с незакрепленным слоем). Применяют также способы закрепления слоя крахмалом, сульфатом кальция и другими связывающими агентами. В промышленности используются готовые пластинки для ТСХ с закрепленным слоем сорбента (чаще всего используют оксид алюминия и силикагель) на алюминиевой фольге (силуфоловые пластинки).

Принцип разделения такой же, как в других видах хроматографии — неодинаковое сродство разделяемых веществ к подвижной жидкой фазе и стационарному сорбенту.

По механизму разделения веществ метод ТСХ аналогичен работе колоночной хроматографии. В тонкослойной хроматографии применяют следующие сочетания подвижной и неподвижной фаз: жидкость — твердое вещество (адсорбент, ионообменная смола); жидкость — жидкость, нанесенная на твердое вещество; жидкость — гель или пористое вещество. Соответственно разделение может быть реализовано по: адсорбционному; ионообменному; распределительному; молекулярно-ситовому механизму. В практике аналитической химии, особенно в органическом анализе, наибольшее распространение получила адсорбционная ТСХ.

Методика анализа. При использовании готовых пластинок полоску материала нужного размера отрезают ножницами. Процедура анализа смеси веществ методом ТСХ выглядит следующим образом. На расстоянии 1,5—2 см от короткого края пластинки проводят линию, являющуюся линией старта, и на нее капиллярами, микропипетками или микрошприцами в виде точки или полоски наносят анализируемую смесь и стандартные вещества («свидетели»).

В одну точку можно наносить от 50 мкг до 1 мг вещества. После нанесения образцов на сорбент пластинку переносят в герметичную камеру для хроматографического анализа и погружают в растворитель, который выполняет роль подвижной фазы. Растворитель (или смесь растворителей) заливают заранее в хроматографическую камеру, чтобы в ней установилась равновесная упругость паров. В противном случае растворитель, поднимаясь вверх по пластинке, будет интенсивно испаряться, что отразится на качестве разделения. При погружении пластинки в растворитель нужно следить за тем, чтобы стартовая линия была выше уровня растворителя. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению.

После достижения растворителем линии фронта пластинку высушивают и проводят идентификацию компонентов смеси. Многие вещества не обнаруживаются в видимой области и для их определения невидимые зоны (пятна) проявляют опрыскиванием пластины ТСХ специальными реагентами. Неокрашенные вещества иногда выявляют также с помощью выдерживания пластинки в течение нескольких минут в парах йода, или ее облучают УФ-лучами, или проводят термическую деструкцию разделяемых веществ.

Качественный анализ. Качественный анализ ТСХ позволяет идентифицировать разделенные компоненты непосредственно на хроматограмме или после выделения их из слоя сорбента. Важной характеристикой степени разделения определяемых соединений

является величина индекс подвижности (R_f) — отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (x) к расстоянию (y), пройденному растворителем от линии старта до линии фронта (рис. 11.14).

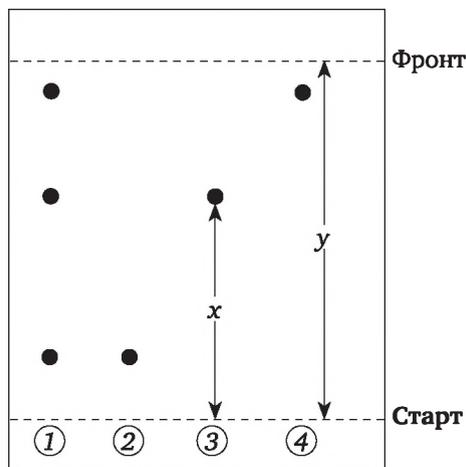


Рис. 11.14. Схема анализа методом ТСХ:

1 — анализируемая смесь, 2—4 — стандартные вещества («свидетели»)

Величина R_f является характеристикой природы определяемого соединения. Поскольку величина R_f зависит от свойств сорбента и растворителя, используемых для разделения, необходимо сравнение величин R_f исследуемого вещества со стандартным веществом («свидетелем»), наносимым на ту же пластинку. «Свидетелем» служит предполагаемое чистое вещество. Идентификацию веществ можно проводить по равенству значений R_f анализируемого вещества и стандарта («свидетеля»).

Количественный анализ. Количественный анализ осуществляют как непосредственно на хроматограмме, так и после вымывания анализируемого вещества из слоя сорбента и последующего исследования полученного раствора с помощью спектральных и радиометрических методов. Для этого широко используются денситометры, которые измеряют интенсивность поглощения электромагнитного излучения при сканировании хроматографической пластинки.

Тонкослойная хроматография хорошо сочетается с различными инструментальными аналитическими методами для определения содержания разделенных компонентов (в том числе для анализа микроколичеств соединений).

Применение. Большое значение имеет развитие высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). За счет создания принудительного движения подвижной фазы с регулируемой скоростью, уменьшения размера частиц сорбента (до 5—7 мкм) и на-

сыщения пространства над пластиной парами растворителя удается существенно ускорить процесс и повысить четкость разделения.

В настоящее время широко используется сочетание ТСХ с высокоэффективной жидкостной хроматографией. При этом первоначально анализируемый образец разделяют на колонках ВЭЖХ. В анализируемой смеси разделяется до 30 отдельных фракций. В отдельных случаях в образцах сточных вод обнаруживали до 300 веществ. Такой прием продемонстрировал эффективность совместного использования двух методов при определении веществ в диапазоне концентраций от нанограммов до пикограммов.

Использование пластинок с более толстым слоем адсорбента (до 5 мм) позволяет хроматографировать гораздо большее количество материала (препаративная ТСХ). При этом удается проводить не только анализ, но и получать достаточные для микрометодов количества чистых веществ. В этом случае пробу наносят не в виде пятен, а полосой вдоль одной из сторон пластинки. После хроматографирования соединения располагаются на пластинке в виде отдельных полос.

Достоинством ТСХ являются: доступность и техническая простота исполнения; невысокая стоимость анализа; большая производительность по сравнению с колоночной хроматографией за счет возможности одновременного анализа нескольких проб (причем последнее проходит независимо от хроматографической подвижности анализируемых компонентов); возможность визуализации контроля процесса разделения.

Как способ разделения ТСХ хорошо сочетается с различными инструментальными аналитическими методами для определения содержания разделенных компонентов, что позволяет использовать метод для анализа микроколичеств соединений.

11.3.3. Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография — это метод разделения смесей, основанный на распределении компонентов смеси между раствором и ионообменником (ионитом). Ионообменники поглощают из раствора положительно или отрицательно заряженные ионы в обмен на эквивалентное количество ионов с зарядом того же знака.

Широкое применение ионообменных процессов в практике началось после создания синтетических ионообменников — так называемых ионообменных смол или ионитов. Используемые ранее естественные ионообменники (различные алюмосиликаты и другие соединения) не обладали достаточной воспроизводимостью свойств, не были химически устойчивыми и поэтому существенно практического значения не имели.

Применяемые в настоящее время синтетические ионообменники имеют высокую обменную емкость и воспроизводимые ионообмен-

ные и другие свойства, устойчивы к действию кислот и оснований, не разрушаются в присутствии многих окислителей, восстановителей и т. д. Обычно синтетический ионообменник представляет собой высокомолекулярный полимер, например, поперечно сшитый полистирол, содержащий различные функциональные группы, которые и определяют наиболее характерные свойства смол. Известны также синтетические неорганические иониты, например, активированный оксид алюминия, гели на основе соединений железа или циркония. Однако органические ионообменные смолы имеют намного большее применение.

В зависимости от знака заряда функциональных групп ионообменные смолы являются катионитами или анионитами. Катиониты содержат кислотные функциональные группы ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$), поэтому каркас катионита, несущий фиксированные отрицательные заряды, заряжен отрицательно. Отрицательные заряды каркаса компенсируются положительными зарядами противоионов, так что в целом катионит остается электронейтральным. Однако противоионы, в данном случае катионы, в отличие от функциональных групп каркаса обладают подвижностью и могут переходить в раствор в обмен на эквивалентное количество ионов из раствора. Этот обмен приводит к установлению подвижного равновесия между ионами, находящимися в фазе смолы, и ионами в растворителе.

Наиболее распространенными катионитами являются сульфокислоты, образованные сульфированными продуктами сополимеризации стирола и дивинилбензола. Это отечественные смолы КУ-2, СДВ-3 и др., иностранные — дауэкс-50, амберлит IR-120 и др. Сульфокатиониты характеризуются высокой химической стойкостью и механической прочностью, большой скоростью установления ионообменного равновесия.

Функциональными группами каркаса анионитов являются четвертичные $-\text{NR}_3^+$, третичные $-\text{NR}_2\text{H}^+$ или первичные $-\text{NH}_3^+$ аммониевые, пиридиновые или другие основания, а в качестве подвижных противоионов выступают анионы. Анионообменные смолы получают также путем проведения реакций полимеризации или поликонденсации с использованием различных аминоксоединений. Так были получены аниониты АН-1, АН-2Ф, амберлит. Амфотерные иониты или амфолиты способны осуществлять одновременный обмен катионов и анионов.

Взаимодействие ионообменной смолы с раствором электролита включает несколько сложных процессов, наиболее важными из которых являются собственно ионный обмен, физическая абсорбция ионов и молекул на смоле, набухание смолы за счет поглощения растворителя и проникновения электролита внутрь смолы. Всего установлено несколько эмпирических закономерностей, связывающих константы ионного обмена со свойствами ионов. В частности,

показано, что с ростом заряда сродство ионов к смоле увеличивается. С повышением температуры избирательность поглощения несколько уменьшается, хотя этот эффект не очень велик. Введение в раствор веществ, способных образовывать комплексные соединения с присутствующими ионами, сдвигает равновесие ионного обмена, так как в результате комплексообразования уменьшается равновесная концентрация иона в растворе.

Ионообменная хроматография используется преимущественно для разделения ионов. Количественные определения компонентов после разделения могут быть выполнены любым подходящим методом.

Простейшая методика ионообменного разделения состоит в поглощении компонентов смеси ионитом и последовательном элюировании каждого компонента подходящим растворителем. Например, катионы щелочных металлов легко элюируются разбавленным раствором соляной кислоты (0,1 М HCl). Известны ионообменные методики для разделения изотопов. Большое практическое значение имеет основанный на ионном обмене процесс деминерализации воды.

В методе ионной хроматографии используются поверхностно-слойные сорбенты с небольшой емкостью, небольшим размером частиц, повышенное давление на входе в колонку и высокочувствительные детекторы с автоматической записью сигнала. Детекторы ионообменных разделений должны регистрировать концентрацию анализируемых ионов в элюате в присутствии ионов элюента. Особенно широко в ионной хроматографии используют кондуктометрический детектор, являющийся универсальным, так как он реагирует на все ионы в растворе. Применяют также селективные детекторы: электрохимические и спектрофотометрические.

Методом ионной хроматографии определяют очень многие анионы в питьевой и технической воде, в продуктах технологической переработки, в пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности. Описаны методики определения свыше 70 анионов неорганических и органических кислот, в том числе галогенидов, нитритов, нитратов, сульфатов, ацетатов. Число определяемых катионов значительно меньше. Ионная хроматография успешно применяется в анализе объектов окружающей среды (атмосферы, воды и т. д.), в клинических исследованиях и многих отраслях промышленности.

Контрольные вопросы

1. Каковы теоретические основы методов хроматографии?
2. Опишите принципы классификации хроматографических методов.
3. Каковы теоретические основы газовой хроматографии?

4. По какому принципу выбирают газ-носитель, твердый носитель?
5. Опишите свойства и применение неполярных и полярных жидких фаз.
6. Опишите аппаратное оформление газовой хроматографии.
7. Как выбирают условия хроматографирования?
8. Опишите качественный анализ методом газовой хроматографии.
От каких факторов и как зависит время удерживания?
9. Опишите количественный анализ методом газовой хроматографии.
10. Каковы области применения газовой хроматографии?
11. Что представляют подвижная и неподвижная фазы в бумажной хроматографии?
12. Опишите свойства хроматографической бумаги.
13. В чем состоит методика хроматографирования в бумажной хроматографии?
14. Каковы способы получения хроматограмм в бумажной хроматографии?
15. Как проводится качественный и количественный анализ методом бумажной хроматографии?
16. Опишите возможности бумажной хроматографии.
17. Опишите теоретические основы метода гель-хроматографии.
18. Какие сорбенты применяют в гель-хроматографии?
19. Опишите области применения гель-хроматографии.
20. Какие принципы разделения веществ использует метод ВЭЖХ?
21. Нарисуйте блок-схему жидкостного хроматографа. Каковы его основные элементы?
22. В каких областях применяется ВЭЖХ?
23. Какие принципы разделения веществ используются в жидкостно-адсорбционной хроматографии?
24. Каков механизм разделения веществ методом тонкослойной хроматографии?
25. Опишите методику проведения анализа методом тонкослойной хроматографии.
26. Как проводится качественный и количественный анализ методом тонкослойной хроматографии?
27. Где применяется тонкослойная хроматография?
28. Каковы теоретические основы метода ионообменной хроматографии?
29. Где и как применяется ионообменная хроматография?

Список рекомендуемой литературы

1. *Александрова, Э. А.* Аналитическая химия. В 2 кн. Книга 2. Физико-химические методы анализа : учебник и практикум для вузов / Э. А. Александрова, Н. Г. Гайдукова. — 3-е изд, испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2020. — 344 с.

2. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : учебник для вузов. В 2 т. Т. 2 / под ред. А. А. Ищенко. — 2-е изд. — Москва : Академия, 2012. — 412 с.

3. *Васильев, В. П.* Аналитическая химия. В 2 ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа / В. П. Васильев. — Москва : Дрофа, 2009. — 384 с.

4. *Казин, В. Н.* Физическая химия : учебное пособие для академического бакалавриата / В. Н. Казин, Е. М. Плисс, А. И. Русаков. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019. — 182 с.

5. *Казин, В. Н.* Физико-химические методы анализа : лабораторный практикум / В. Н. Казин, Т. Н. Орлова, И. В. Тихонов. — Ярославль : ЯрГУ, 2011. — 71 с.

6. *Казин, В. Н.* Физико-химические методы анализа : учебно-методическое пособие / В. Н. Казин. — Ярославль: ЯрГУ, 2016. — 55 с.

7. *Никитина, Н. Г.* Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : учебник и практикум для вузов / Н. Г. Никитина, А. Г. Борисов, Т. И. Хаханина; под ред. Н. Г. Никитиной. — 4-е изд., перераб. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2020. — 394 с.

8. Основы аналитической химии. В 2 кн. Книга 2 : учебник для вузов / под ред. акад. Ю. А. Золотова. — 4-е изд., перераб. и доп. — Москва : Изд. центр «Академия», 2010. — 416 с.

9. *Отто, М.* Современные методы аналитической химии : учебник для вузов / М. Отто; пер. с нем. под ред. А. В. Гармаша. — 3-е изд. — Москва : Техносфера, 2008. — 543 с.

10. *Харитонов Ю. Я.* Аналитическая химия. Аналитика: учебник для вузов. В 2 книгах. Книга 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа / Ю. Я. Харитонов; М-во образования и науки РФ. — Москва : Высшая школа, 2008. — 559 с.

Интернет-ресурсы и базы данных

1. База данных NIST Chemistry WebBook. — URL: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

2. База данных ChemSpider. — URL: <http://chemspider.com>.
3. База данных SDBS — Spectral Database for Organic Compounds. — URL: https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.
4. База данных Pubchem. — URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

**Новые издания
по дисциплине «Аналитическая химия»
и смежным дисциплинам**

1. *Кольцова, Э. М.* Синергетика в химии и химической технологии : учебное пособие для вузов / Э. М. Кольцова, Л. С. Гордеев. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 295 с.

2. *Неудачина, Л. К.* Электрохимические методы анализа. Лабораторный практикум : учебное пособие для вузов / Л. К. Неудачина, Ю. С. Петрова, Н. В. Лакиза, Е. Л. Лебедева. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 133 с.

3. *Рудой, В. М.* Электрохимия. Методика исследования кинетики электродных процессов : учебное пособие для вузов / В. М. Рудой, Т. Н. Останина, И. Б. Мурашова, А. Б. Даринцева. — 2-е изд. — Москва : Издательство Юрайт, 2021. — 111 с.