

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**О.С. ВОЛОШИНА
М.М. АНТОНЮК**

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія»
денної та заочної форм навчання

Київ НУХТ 2012

О.С. Волошина, М.М. Антонюк Методи досліджень в біотехнології:
Конспект лекцій для студ. напрям 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч.
форм навч. – К.: НУХТ, 2012. – 157 с.

Рецензент **В.О. Красінько**, канд. техн. наук

О.С.ВОЛОШИНА, канд. біол. наук
М.М. АНТОНЮК, канд. техн. наук

Видання подається в авторській редакції

© О.С. Волошина,
М.М. Антонюк, 2012
© НУХТ, 2012

ЗМІСТ

	ВСТУП.....	5
1.	МЕТОДИ ТОНКОЇ ОЧИСТКИ РЕЧОВИН – ХРОМАТОГРАФІЯ.....	8
1.1.	Класифікація видів хроматографії.....	9
1.2.	Основні терміни й поняття в хроматографії.....	11
1.3.	Принцип хроматографічного розділення.....	12
1.4.	Ефективність і селективність хроматографічної колонки.....	13
1.5.	Хроматографічна система та представлення результатів хроматографії.....	16
1.5.1.	Газові хроматографи.....	18
1.5.2.	Рідинні хроматографи.....	21
1.5.3.	Оцінка результатів хроматографії.....	22
1.6.	Газова хроматографія.....	25
1.6.1.	Обернена газова хроматографія.....	26
1.6.2.	Високоєфективна капілярна газова хроматографія.....	27
1.7.	Рідинна хроматографія.....	27
1.7.1.	Адсорбційна хроматографія.....	29
1.7.2.	Розподільна хроматографія.....	30
1.8.	Надкритична флюїдна хроматографія.....	39
1.9.	Реакційна хроматографія.....	42
1.10.	Лігандообмінна хроматографія.....	43
1.11.	Афінна хроматографія.....	44
1.12.	Гель-хроматографія.....	49
1.13.	Іонообмінна хроматографія.....	51
1.14.	Високоєфективна рідинна хроматографія.....	57
1.15.	Хромато-мас-спектрометрія.....	66
1.16.	Електрохроматографія.....	67
	Запитання для самоперевірки.....	70
2.	ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ МЕТОДИ.....	71
2.1.	Електрогравіметрія.....	73
2.2.	Вольтамперометрія.....	74
2.3.	Кулонометрія.....	78
2.4.	Потенціометрія.....	79
2.5.	Кондуктометрія.....	86
2.6.	Полярографія.....	88
2.6.1.	Амперометрія.....	91
	Запитання для самоперевірки.....	93
3.	СПЕКТРОСКОПІЯ.....	94
3.1.	Характеристика електромагнітних хвиль.....	94
3.2.	Квантова теорія випромінювання.....	102

3.3.	Спектральний аналіз.....	110
3.4.	Спектрометрія кругового дихроїзму.....	114
3.5.	Рентгенівський структурний аналіз.....	114
3.6.	Ультрафіолетова спектроскопія.....	115
3.7.	Інфрачервона спектроскопія.....	117
3.8.	Фотометричний аналіз.....	119
3.9.	Спектрофотометрія.....	121
3.10.	Рефрактометрія.....	126
3.11.	Інтерферометрія.....	128
3.12.	Поляриметрія.....	130
3.13.	Нефелометрія. Турбідиметрія.....	130
3.14.	Спектроскопія комбінаційного розсіювання.....	133
3.15.	Мікрохвильове, або надвисокочастотне випромінювання.....	136
3.16.	Радіоспектроскопія.....	140
3.17.	Ядерний магнітний резонанс.....	145
3.18.	Мас-спектроскопія.....	149
	Запитання для самоперевірки.....	156
	Список літератури.....	157

ВСТУП

У технології харчових продуктів якість і склад сировини, ефективність виробничих процесів, екологічна безпека, відповідність продукції, що випускається, встановленим нормам, дотримання санітарно-гігієнічних вимог мають велике значення. Вирішення усіх цих питань вимагає знання методів дослідження харчової сировини та готових продуктів і передбачає як розробку нових принципів й методів аналізу харчових систем, так і встановлення будови окремих речовин, їх функцій, взаємозв'язку з іншими компонентами.

Дослідження будь-якого харчового продукту – складне аналітичне завдання. Через особливості складу й багатокомпонентності продуктів необхідно адаптувати стандартні методи аналізу до особливостей складу й фізико-хімічної структури продукту, тобто в кожному конкретному випадку потрібне проведення тією чи іншою мірою аналітичної дослідницької роботи.

На сьогодні у харчовій промисловості широкого застосування набули такі методи аналізу: газова та рідинна хроматографія, атомно-абсорбційна спектрометрія, фотометрія, люмінесценція, капілярний електрофорез, інфрачервона спектроскопія, електрохімія, класичні методи аналізу (титриметрія, гравіметрія), реологічні методи дослідження.

Нині відзначається збільшення частки хроматографічних методів і капілярного електрофорезу, що свідчить про першочергову важливість освоєння даних методів для харчової промисловості. Зростає використання спектральних, атомно-абсорбційних методів та методів капілярного електрофорезу для проведення досліджень якості сировини й готової продукції. Тобто, оволодіння методологією оцінки властивостей сировини й готової продукції для інженерів-технологів має найважливіше значення.

Важливе практичне значення мають методи, основані на дослідженні випромінювання й поглинання електромагнітних хвиль різних областей спектру. До таких методів відносять спектроскопію (наприклад, люмінесцентний та спектральний аналіз), нефелометрію й турбідиметрію та ін. До важливих методів фізико-хімічного аналізу належать електрохімічні, що базуються на вимірюванні електричних властивостей речовини (вольтамперометрія, кондуктометрія, кулонометрія, потенціометрія і т.д.), а також хроматографія (наприклад, газова, рідинна іонообмінна, тонкошарова). Успішно розвиваються методи, основані на вимірюванні швидкостей хімічних реакцій (кінетичні методи аналізу), теплових ефектів реакцій (термометричне титрування, колориметрія), а також – на розподілі іонів у магнітному полі (мас-спектрометрія).

Фізико-хімічні методи аналізу основані на залежності фізичних властивостей речовини від її природи, причому аналітичний сигнал являє собою величину фізичної властивості, функціонально пов'язану з концентрацією або масою обумовленого компоненту. Фізико-хімічні методи аналізу можуть включати хімічні перетворення сполуки, що визначається,

розчинення зразка, концентрування аналізуемого компонента, маскування речовин, що заважають визначенню тощо. На відміну від "класичних" хімічних методів аналізу, де аналітичним сигналом слугує маса речовини або її об'єм, у фізико-хімічному аналізі в якості аналітичного сигналу використовують інтенсивність випромінювання, силу струму, електропровідність, різницю потенціалів та ін.

При виконанні фізико-хімічного аналізу використовують спеціальну, іноді досить складну, вимірювальну апаратуру, у зв'язку з чим дані методи часто називають *інструментальними*. Багато сучасних приладів оснащені вбудованими ЕОМ, що дозволяє підбирати оптимальні умови аналізу (наприклад, спектральну область одержання найбільш точних результатів при аналізі суміші забарвлених речовин), виконують розрахунки і т.д.

На всіх стадіях будь-якого виробництва здійснюється *технічний контроль* або *аналіз*, тобто проводяться роботи з контролю якості продукції в ході технологічного процесу з метою уникнення браку й забезпечення випуску продукції, що відповідає технічним умовам і державним стандартам.

Технічний аналіз поділяють на *загальний* – аналіз речовин, що зустрічається на всіх підприємствах (вода, паливо, мастильні матеріали) і *спеціальний* – аналіз речовин, що зустрічаються тільки на даному підприємстві (сировина, напівпродукти, відходи виробництва, кінцевий продукт). Із цією метою щоденно тисячі хіміків-аналітиків виконують мільйони аналізів згідно відповідних Міжнародних державних стандартів.

Докладний опис виконання аналітичних реакцій із вказівкою умов їх виконання наведено у *методиці аналізу*, завданням якої є оволодіння навиками експерименту й сутністю аналітичних реакцій. Методи аналітичної хімії засновані на різних принципах.

За способом виконання методи аналізу поділяють на: хімічні, фізичні й фізико-хімічні (інструментальні) методи.

Залежно від об'єктів аналізу *методи аналізу* поділяють на *неорганічні* і *органічні*.

Хімічний аналіз залежно від поставленої мети класифікують на *якісний* і *кількісний*.

Кількісний аналіз дозволяє встановити кількісні співвідношення складових частин даної сполуки або суміші речовин. На відміну від якісного, кількісний аналіз дає можливість визначити вміст окремих компонентів речовини, що аналізується, або загальний вміст даної речовини в досліджуваному об'єкті.

Методи якісного й кількісного аналізу, які дозволяють визначити в аналізованій речовині вміст окремих елементів, називають *елементним аналізом*; функціональних груп – *функціональним аналізом*; індивідуальних хімічних сполук, що характеризуються певною молекулярною масою – *молекулярним аналізом*.

Сукупність різноманітних хімічних, фізичних і фізико-хімічних методів розділення й визначення окремих структурних (фазових) складових

гетерогенних систем, різних за властивостями і фізичною будовою та обмежених одна від одної поверхнями розділу, називають *фазовим аналізом*.

Залежно від маси проби, яку використовують для аналізу, розрізняють: макро- ($>> 0,10$ г), напівмікро- ($0,10 - 0,01$ г), мікро- ($0,01 - 10^{-6}$ г), ультрамікроаналіз ($< 10^{-6}$ г).

Важливе місце в аналітичній хімії займають методи концентрування мікрокомпонентів. При цьому застосовують *абсолютне концентрування* – переведення мікрокомпонентів з великого об'єму розчину в малий, що знижує межу виявлення. Широко застосовується *відносне концентрування* – це відділення досліджуваних мікрокомпонентів від основи, інших мікрокомпонентів, що заважають визначенню.

Найбільшого поширення набули наступні методи попереднього концентрування й розділення:

- *фізичні* (метод відгонки; метод флотації – оснований на різниці густини основної речовини й домішок);

- *хімічні* (метод осадження; комплексоутворення);

- *фізико-хімічні* (хроматографічне розділення – основане на вибірковій адсорбції і різній швидкості руху іонів у колонках з адсорбентом. Якщо адсорбент безбарвний, а іони, що адсорбуються, – забарвлені, то одержують кольорову хроматограму (наприклад, Cu^{2+} – синій, Co^{2+} – рожевий).

До методів аналізу висувають ряд вимог: точність аналізу, правильність, відтворюваність, чутливість, експресність, простота, економічність, локальність, автоматизація, дистанційність.

Правильність – параметр, що характеризує близькість експериментальних і дійсних значень вимірюваної величини. Вона характеризується систематичною похибкою, яка залежить від роботи приладу, індивідуальних особливостей аналітика, помилок при розрахунках і методичних похибок.

Відтворюваність – параметр, який відображає випадкові помилки вимірювання, що й показує ступінь розсіювання паралельних визначень. Це міра того, як повторюються результати при багаторазовому проведенні аналізу. Відтворюваність визначає ймовірність того, що результати наступних вимірювань виявляться в деякому заданому інтервалі, у центрі якого знаходиться середнє значення. Цей показник можна оцінити за допомогою будь-якого доступного зразка, тоді як для оцінки правильності методу необхідно мати у своєму розпорядженні стандартні зразки.

Стандартні зразки – зразки речовин, склад яких типовий для певного класу аналізованих матеріалів, визначений з високою точністю (після градування по еталонах або стандартах, що мають державну атестацію) й не змінюється при зберіганні. Необхідною умовою застосування в хімічному аналізі стандартного зразка є максимальна близькість його складу і властивостей з аналізованою пробю. Стандартні зразки застосовують для градування й перевірки аналітичних приладів і методів.

Точність аналізу визначається сумою правильності й відтворюваності.

Межа виявлення – це мінімальна концентрація речовини, яка може бути визначена даним методом з деякою допустимою похибкою (моль/дм³; мкг/см³; %).

Чутливість – параметр, що характеризує зміну аналітичного сигналу, (наприклад, оптичної густини або напруги) зі зміною концентрації досліджуваного компонента, тобто – це тангенс кута нахилу градуального графіка.

Вибірковість (селективність) – можливість визначення тої чи іншої речовини (іона) у присутності інших.

У виробничих умовах, де аналізи проводяться у великій кількості, обирають найбільш прості та швидкі методи, якщо вони забезпечують необхідну точність і досить низьку межу виявлення. Вибір методу в кожному конкретному випадку визначається метою й завданнями дослідження, а також виробничими можливостями (наявність хімічних реактивів, приладів тощо).

1. МЕТОДИ ТОНКОЇ ОЧИСТКИ РЕЧОВИН – ХРОМАТОГРАФІЯ

Хроматографія (від гр. *chromatos* – колір) – фізико-хімічний метод розділення та аналізу сумішей, оснований на розподілі їх компонентів між двома фазами – нерухомою та рухомою.

Відкриття цього методу належить М.С. Цвету, який уперше застосував у 1903 р. проявний варіант рідинно-адсорбційної хроматографії для аналізу хлорофілу. Цей історичний дослід було проведено вченим наступним чином. У трубку з порошком крейди Цвет залив розчин рослинних пігментів хлорофілу – у верхній частині утворилося пофарбоване кільце. Потім у трубку безперервно подавався бензол, при цьому пігменти кільця частково розчинялися в ньому, опускалися, адсорбувалися іншими часточками крейди, знову розчинялися в нових порціях бензолу та опускалися по трубці. Так як різні речовини по-різному вивільнялися бензолом з адсорбенту, тому опускалися по трубці з різною швидкістю. Так, первинне зелене кільце, опускаючись, поступово розширювалося й поділялося на декілька по-різному забарвлених кілець. В сумі цих кілець виявилось шість: верхнє – жовте, потім оливково-зелене, далі темно-зелене й три жовті.

Цвет назвав свій метод хроматографією, тобто «кольоровим письмом», а одержаний у такий спосіб пошарово зафарбований стовпчик сорбенту – хроматограмою. Вчений витягнув шар-стовпчик сорбенту з трубки, розрізав його на циліндрики, у кожному з яких виявилось своє кольорове кільце, та вивільнив речовини з адсорбенту спиртом. У результаті Цвет показав, що хлорофіл – це не індивідуальна сполука, а суміш двох речовин, які розділилися на колонці з утворенням оливково-зеленого й темно-зеленого кілець. Вчений дослідив також, що за допомогою цього способу можна розділяти й безбарвні речовини.

1.1. Класифікація видів хроматографії

1. *За агрегатним станом фаз* хроматографія буває:

- газова;
- газорідинна;
- газо-адсорбційна (твердофазна);
- рідинна;
- рідинно-рідинна;
- рідинно-твердофазна;
- рідинно-гелева;
- надкритична флюїдна.

2. *За механізмом взаємодії:*

- розподільна;
- іонообмінна;
- адсорбційна;
- ексклюзивна;
- гель-хроматографія;
- осадова;
- адсорбційно-комплексоутворююча хроматографія.

3. *Окремі види хроматографії:*

- високоефективна рідинна;
- тонкошарова;
- газова хроматографія з програмуванням температури;
- газова хроматографія з програмуванням витрати газу-носія;
- хроматографія з програмуванням тиску газу-носія;
- хроматобарографія;
- хроматермографія;
- хроматофокусування;
- лігандообмінна;
- афінна хроматографія.

4. *За способом уведення проби:*

- *проявна або елюентна хроматографія*. Аналізовану суміш вводять порціями в колонку, заповнену сорбентом. У потоці рухомої фази проба переміщується вздовж колонки. Швидкість переміщення окремих компонентів суміші обернено пропорційна величині їх констант розподілення. В результаті одержують хроматограму проявної хроматографії (рис. 1.1).

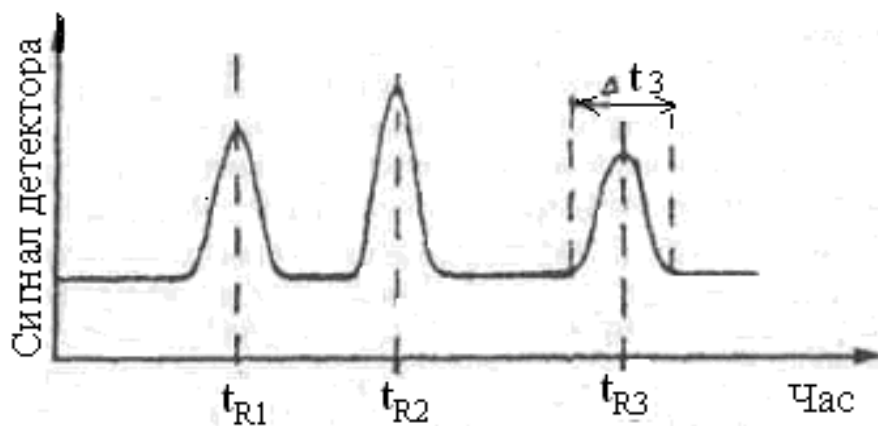


Рис. 1.1. Проявна хроматографія. Піки на хроматограмі відповідають компонентам суміші, що була введена в хроматограф

- *фронтальна хроматографія*. Суміш безперервно подається у шар сорбенту і, фактично, відіграє роль рухомої фази. Одержуємо залежність концентрації компонентів проби від часу (рис. 1.2). Відносний рух та розташування „сходинок” на осі часу визначаються величинами відповідних констант розподілу компонентів суміші. Висота „сходинок” пропорційна концентрації відповідного компонента в суміші.

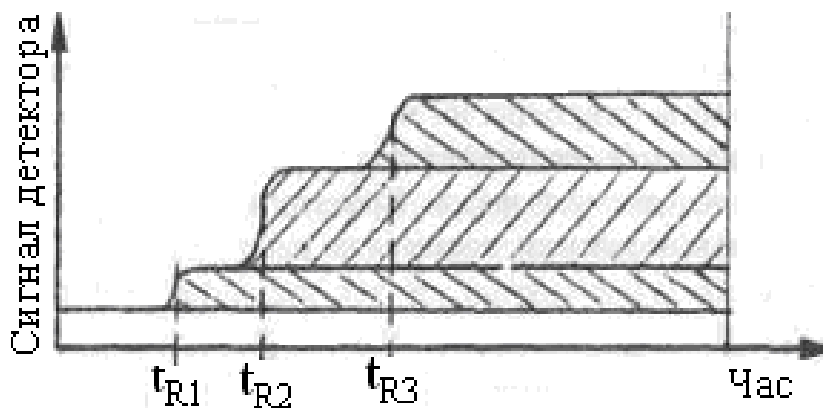


Рис. 1.2. Хроматограма фронтальної хроматографії

- *витискувальна хроматографія*. Переміщення хроматографічних зон досягається шляхом витискування компонентів суміші, що розділяється, речовиною з більшою здатністю до сорбції, ніж кожен з цих компонентів. Кожен з компонентів проби витісняє компоненти, які виявляють меншу взаємодію з нерухомою фазою. Утворюються зони розділених речовин, що примикають одна до одної. Хроматограму витискувальної хроматографії наведено на рис. 1.3.

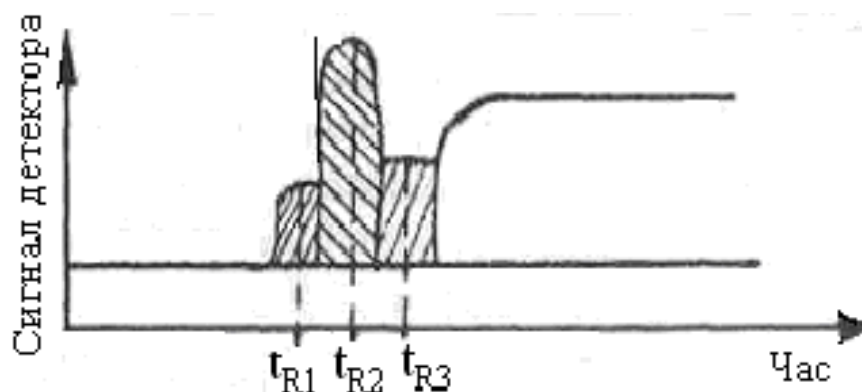


Рис. 1.3. Хроматограма витискувальної хроматографії

5. За метою проведення:

- аналітична – призначена для визначення якісного і кількісного складу досліджуваних сумішей;
- неаналітична – дослідження фізико-хімічних характеристик речовин з використанням хроматографічної апаратури та на основі параметрів хроматографічних зон;
- препаративна – застосовується для виділення невеликих кількостей індивідуальних компонентів із суміші в чистому виді у лабораторних умовах;
- промислова хроматографія – використовується для одержання чистих речовин у значних кількостях.

6. Площинна та колоночна хроматографія:

Площинна хроматографія відбувається на плоскій поверхні. До неї відноситься паперова та тонкошарова хроматографія.

Колоночна хроматографія відбувається в колонках. Колонки для газової та рідинної хроматографії відрізняються за конструкцією.

1.2. Основні терміни й поняття в хроматографії

Основні терміни й поняття в хроматографії були систематизовані й уніфіковані спеціальною комісією ІЮПАК (Міжнародний союз теоретичної та прикладної хімії – *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) – міжнародна неурядова організація, що сприяє прогресу в області хімії.

Згідно з рекомендаціями ІЮПАК, термін «хроматографія» має три визначення та використовується для позначення спеціального розділу хімії.

- Хроматографія – наука про міжмолекулярну взаємодію та перенесення молекул або часток речовини у системах, що не змішуються і рухаються одна відносно одної (рухома і нерухома фази).
- Хроматографія – процес диференційованого багаторазового перерозподілу речовин або їх часток між рухомою і нерухомою фазами, що призводить до виділення та концентрації зон індивідуальних компонентів вихідної суміші.

- Хроматографія – метод розділення суміші речовин, оснований на різниці у швидкості переміщення окремих компонентів у системі фаз, що не змішуються і рухаються одна відносно одної.
- Сорбент – тверда речовина, рідина або їх суміш, здатна поглинати або втримувати гази, пари або розчинені речовини, що використовуються в хроматографії як нерухома фаза.
- Сорбат – компоненти суміші, що розподіляються між нерухомою і рухомою фазою.
- Адсорбент – твердий сорбент, що концентрує на своїй поверхні гази, пари або розчинені речовини. Адсорбентом заповнена хроматографічна колонка, у якій відбувається розділення суміші речовин на окремі компоненти.
- Перепад тиску – різниця між тиском на вході та виході з колонки. Позначається символом p .
- Елюат – розчин, що виходить із хроматографічної колонки.
- Елюент – розчинник або суміш розчинників, або газ-носіїв, призначені для прокачування аналізованої суміші через хроматографічну колонку (рухома фаза).
- Елюція – переміщення компонентів проби по хроматографічній колонці та їх розділення на ряд зон під впливом потоку рухомої фази.
- Нерухома фаза – рідина або тверді частинки, якими заповнюють хроматографічну колонку.
- Селективність – вибірковість.

1.3. Принцип хроматографічного розділення

Розділення речовини зустрічається при кожному хімічному синтезі. Якщо окремі компоненти суміші перебувають у різних фазах, то їх розділення проводиться досить легко – методами фільтрації, осадження, центрифугування тощо. Навпаки, якщо декілька речовин перебувають в одній фазі, тобто мало відрізняються за властивостями (наприклад, розчинністю, адсорбцією або розміром молекул), то в цьому випадку розділення можна досягти шляхом багаторазового повторення елементарного акту розподілу: видаленням молекул, які виходять з нерухомої фази, що здійснюється завдяки постійному руху рухомої фази.

Цільове призначення хроматографії – кількісне розділення та ідентифікація компонентів складної суміші.

Характерною особливістю хроматографічних методів є розподіл розділювальних речовин між двома фазами, які не змішуються, що призводить до розділення компонентів суміші. При цьому одна фаза може бути твердою, а інша – газоподібною або рідкою; обидві фази можуть бути рідкими і поміщені на який-небудь носій. Речовини, що містяться в суміші, під час хроматографічного розподілу переходять з однієї фази в іншу.

Процес хроматографічного розділення суміші речовин полягає в різному розподілі кожного компонента даної суміші між двома фазами, з наступним повним розділенням суміші шляхом застосування операції вимивання або витиснення компонента, що виділяється. Причиною такого розділення є відмінності у взаємодії кожного з компонентів даної суміші речовин, що перебувають у першій фазі (розчинник), із другою фазою – сорбентом (твердим або рідким), поміщеним на носії.

Для пояснення явищ, що відбуваються під час хроматографії, розрахунків довжини колонок, положення і форми піків, вибору оптимальних умов процесів існує два підходи – **теорія теоретичних тарілок** (ТТТ) і **кінетична теорія**. Згідно ТТТ, хроматографічну колонку можна уявити у вигляді ряду вузьких дотичних шарів, що називаються *теоретичними тарілками*. Мартін і Сіндж показали, що висота, еквівалентна теоретичній тарілці, заповненої колонки може досягати 0,002 см. Таким чином, колонка довжиною 10 см може вміщувати порядку 5000 тарілок. Високої ефективності розподілу можна чекати навіть від порівняно коротких колонок. Припускають, що в кожній такій тарілці встановлюється рівновага між рухомою і нерухомою фазами. Чим більше таких рівноваг, тим ефективніше розділення. Для оцінки ефективності колонки використовують поняття *висоти теоретичної тарілки*.

Молекули речовини проходячи через колонку внаслідок хаотичного руху багато разів випадково стикаються між собою, тому одні молекули можуть просуватися швидше, ніж інші. На просування молекул через колонку впливає ряд факторів, що визначають ефективність хроматографічної колонки:

- 1) структура нерухомої фази (розміри гранул, їх однорідність, щільність і рівномірність заповнення колонки);
- 2) швидкість встановлення рівноваги сорбція-десорбція (масообмін);
- 3) дифузія молекул із зони з більшою концентрацією у зону з меншою концентрацією.

1.4. Ефективність і селективність хроматографічної колонки

Хроматографія – це метод розподілення компонентів суміші, оснований на відмінності їх розподілу між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а друга – рухома. Компоненти зразка рухаються по колонці, якщо перебувають у рухомій фазі, і залишаються на місці, якщо знаходяться у нерухомій фазі. Чим більша спорідненість компоненту до нерухомої фази і чим менше – до рухомої, тим повільніше він рухається по колонці й тим довше в ній утримується.

За рахунок відмінності у спорідненості компонентів суміші до нерухомої та рухомої фаз досягається основна мета хроматографії – розділення суміші за певний проміжок часу на окремі смуги (піки) компонентів у міру їх просування по колонці з рухомою фазою.

Отже, хроматографічний розподіл можливий лише за умови, якщо компоненти зразка в колонці, по-перше, будуть розчинні в рухомій фазі та, по-друге, будуть взаємодіяти (утримуватися) з нерухомою фазою. Якщо при введенні проби компонент суміші не розчиняється, то буде відфільтрований і не братиме участі у хроматографічному процесі. Компоненти суміші, що не взаємодіють з нерухомою фазою, також пройдуть через колонку не розділяючись на окремі фракції.

Наприклад, за умови, якщо два компоненти суміші розчинні в рухомій фазі і взаємодіють із нерухомою фазою, хроматографічний процес може протікати без порушень. У цьому випадку після проходження суміші через колонку можна одержати хроматограму виду *а*, *б* або *в* (рис. 1.4).

Ефективність колонки тим вища, чим вузьчий пік виходить за той же проміжок часу утримання. На рис. 1.4 проілюстровано хроматографічні розділення, що відрізняються ефективністю (*а* та *б*) при рівній селективності та селективністю (*б* і *в*) – при однаковій ефективності.

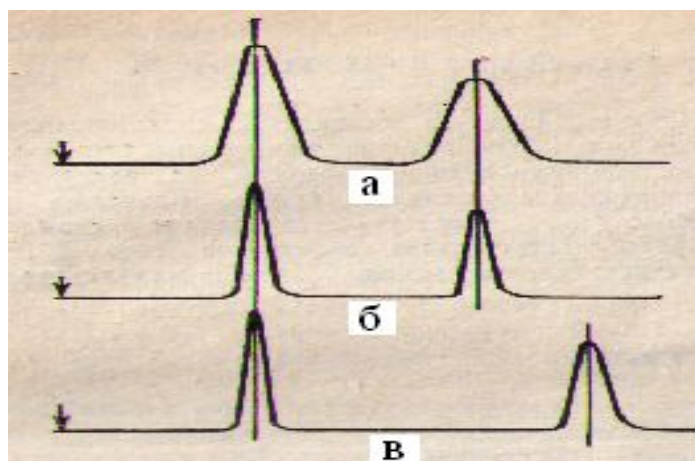


Рис. 1.4. Вид хроматограми залежно від ефективності і селективності колонки: *а* – звичайна селективність, знижена ефективність (менше теоретичних тарілок); *б* – звичайні селективність і ефективність; *в* – звичайна ефективність, підвищена селективність (більше відношення часу утримання компонентів)

Кількість теоретичних тарілок характеризує кількість шаблів встановлення рівноваги між рухомою і нерухомою фазами. Якщо ефективність колонки вимірюється *числом теоретичних тарілок* (ЧТТ) – N , то чим більше ЧТТ, тим вища ефективність, тим менше розширення піка по мірі проходження суміші через колонку, тим вузький пік на виході з колонки. Знаючи число теоретичних тарілок колонки N і довжину колонки L (мкм), а також середній діаметр зерна сорбенту d_c (мкм), легко одержати значення висоти, що еквівалентна теоретичній тарілці (ВЕТТ), а також приведеній висоті, еквівалентній теоретичній тарілці (ПВЕТТ):

$$\text{ВЕТТ} = L/N \quad (1.1)$$

$$\text{ПВЕТТ} = \text{ВЕТТ}/d_c \quad (1.2)$$

Маючи значення ЧТТ, ВЕТТ і ПВЕТТ, можна легко порівнювати ефективність колонок різних типів, різної довжини, заповнених різними за природою і зернистістю сорбентами. Аналізуючи ЧТТ двох колонок однієї довжини, порівнюють їх ефективність. При порівнянні ВЕТТ порівнюють стовпчики із сорбентами однакової зернистості, що мають різну довжину. Величина ПВЕТТ дозволяє для двох будь-яких колонок оцінити якість сорбенту та якість заповнення колонок, незалежно від довжини колонки, зернистості сорбенту, його природи.

Важливу роль у досягненні хроматографічного розділення відіграє **селективність колонки**, характеристика якої залежить від багатьох факторів: хімічної природи обраного сорбенту, складу розчинника, його модифікаторів з урахуванням хімічної структури і властивостей розділювальних компонентів. Іноді помітний вплив на селективність виявляє зміна температури колонки, що змінює коефіцієнти розподілу речовин між рухомою та нерухомою фазами.

При розгляді розділення двох компонентів на хроматограмі і його оцінці важливим параметром є **роздільна здатність колонки R_s** , яка пов'язує час виходу і ширину піків обох розділювальних компонентів. Роздільна здатність колонки як параметр, що характеризує поділ піків, збільшується в міру зростання селективності й росту ефективності, через зменшення ширини піків.

Розмивання в колонці зменшиться, а ефективність колонки підвищиться, якщо використати більш дрібний сорбент, більш рівномірний за складом (вузька фракція), більш щільно і рівномірно упакований в колонку, при використанні більш тонких шарів прищепленої фази, менш в'язких розчинників і оптимальних швидкостей потоку.

Отже, високої ефективності розділення можна досягти лише завдяки частим фазовим переходам, тому нерухома й рухома фази повинні мати більшу поверхню зіткнення, а зовнішні умови обрані так, щоб молекули розділювальних речовин були здатні до швидкого обміну між двома фазами. Оскільки ефективність розділення знижується внаслідок дифузійних явищ, то обидві фази повинні мати невелику товщину шару, а потік рухомої фази повинен бути ламінарним.

Ці вимоги задовольняються, наприклад, якщо рухома фаза протікає під дією перепаду тиску в хроматографічній колонці, наповненій тонко подрібненим сорбентом у якості нерухомої фази.

Суміш, що підлягає розділенню, подається в рухома фазу і разом з нею надходить у колонку, де кожен з компонентів розподіляється між рухомою фазою і сорбентом у певному співвідношенні. Дійсна рівновага між двома фазами буде тим меншою, чим більша швидкість рухомої фази. Так як компоненти суміші, поглинуті в цей момент сорбентом, не беруть участі у русі рухомої фази, то кожному з них для проходження колонки потрібно більше часу, ніж для кожної з молекул рухомої фази. Розділення суміші досягається, якщо її компоненти мають різні коефіцієнти розподілу між

обом фазами, тобто якщо нерухома фаза різним чином перешкоджає їх проходженню через колонку.

Хроматографія застосовується з багатьма методичними змінами, які мають одну загальну основу: розділення відбувається внаслідок частого переходу молекул окремих компонентів суміші між двома фазами, з яких одна є нерухомою з розвинутою поверхнею, а друга фаза (рухома) переміщується щодо неї. Завдяки різному розподілу розділювальних речовин між нерухомою та рухомою фазами вони мають різний час утримання в колонці.

Рухома й нерухома фази можуть бути утворені різними речовинами. Залежно від їх властивостей і виду впливу на компоненти суміші розрізняють різні види хроматографії. Рухома фаза повинна утворюватися тільки речовинами малої в'язкості – газами або рідинами з малою в'язкістю. Хроматографія з газоподібною або рідкою рухомою фазами має зовсім різне експериментальне оформлення й відрізняється за елементарними процесами. У зв'язку з цією обставиною Десті (1957 р.) запропонував класифікацію хроматографії лише на основі агрегатного стану обох фаз. Чітко розмежувати окремі види хроматографії неможливо.

1.5. Хроматографічна система та представлення результатів хроматографії

Хроматографічна система складається із хроматографа, детектора, пристрою, що реєструє піки окремих компонентів.

Деякі види хроматографічного аналізу здійснюються за допомогою приладів, які називаються *хроматографами*. Хроматографи використовують для аналізу та препаративного розділення суміші речовин.

Основним конструктивним елементом хроматографа є колонка, заповнена нерухомою фазою (сорбентом), через яку при відповідній температурі прокачується рухома фаза (елюент), змішана з досліджуваною сумішшю.

В *хроматографічній колонці* проходить розділення первинної багатокомпонентної суміші на ряд бінарних сумішей, які складаються з газу-носія (в газовій хроматографії) або рідини-носія (в рідинній хроматографії) та одного з компонентів суміші.

Прийнято вважати, що найбільша ефективність колонки досягається в тому випадку, коли швидкість проходження рухомої фази через шар сорбенту приблизно дорівнює швидкості молекулярної дифузії в пори часток сорбенту. Коефіцієнт дифузії розчиненої речовини в рухомій фазі залежить від типу сорбенту та властивостей розчинника. Дифузія в колонці тим більша, чим менша в'язкість розчинника і чим менший розмір молекул розчиненої речовини.

Для газової хроматографії використовуються U-подібні або закручені в спіраль трубки, виготовлені із нержавіючої сталі, міді, іноді фторопласту.

Внутрішній діаметр колонки газового хроматографа може бути від 2 до 15 мм, а довжина 1-50 м. Колонку наповнюють нерухомою фазою (сорбентом) і за допомогою спеціальних термостатів підтримують задану температуру до 50 °C (з точністю до 0,05 – 1°C) протягом усього процесу хроматографії. Нерухома фаза (сорбент) виконує функцію поділу суміші на індивідуальні компоненти, рухома фаза рухається всередині колонки за рахунок перепаду тиску.

Селективність (здатність до розділення) колонки залежить від характеру взаємодії окремих компонентів суміші з нерухомою фазою. Така взаємодія може бути неполярною (за рахунок сил Ван-дер-Ваальса) або специфічною полярною.

Сили Ван-дер-Ваальса – це сили електростатичної взаємодії молекулярних оболонок. Вони відповідають за міжмолекулярну взаємодію між всіма видами молекул і виникають у результаті фундаментального розподілу між позитивними зарядами ядра атома (протонами) та негативними зарядами (електронами), що розподілені по всьому простору, який займає молекула. Енергія таких сил досить незначна – від 0,419 до 4,19 кДж/моль.

При аналізі розділені в колонці хроматографа речовини разом з елюентом потрапляють через різні проміжки часу у встановлений на виході із хроматографічної колонки *детектор* – пристрій, що реєструє концентрацію і час виходу окремих компонентів з колонки.

Детектор – це обладнання, призначене для виявлення в потоці елюату, що виходить з колонки, індивідуальних компонентів за якими-небудь фізико-хімічними властивостями. Зміну властивостей речовини детектор перетворює в електричний сигнал. Сигнал таких детекторів пропорційний миттєвій зміні значення якої-небудь властивості газового потоку, а його аналоговий запис має вигляд піка. Хроматограма представляє собою ряд піків, причому кількість кожного компонента пропорційно площі відповідного піка.

В рідинній хроматографії використовують оптичні детектори: абсорбційні 190 – 380 нм, 380 – 800 нм, інфрачервоні 800 – 5000 нм, рефрактометричні, емісійні, флуориметричні, хемолюмінісцентні.

Ультрафіолетовий детектор визначає залежність ступеня поглинання світла від концентрації проби в проточній кюветі. *Інфрачервоний* – для ідентифікації природи органічних сполук, тому що більшість груп органічних речовин мають характеристичні спектри поглинання. Принцип дії *рефрактометричного* детектора оснований на диференціальній зміні показника заломлення чистого розчинника та аналізованого розчину.

Принцип дії *флуориметричного* детектора полягає на випромінюванні поглинання світла у вигляді флуоресценції. Поглинання звичайно проводять в УФ-області при довжині хвилі максимального поглинання для даної групи речовин.

Отриману в результаті реєстрації детектором вихідну криву називають *хроматограмою*. Для якісного хроматографічного аналізу визначають час від моменту введення проби до часу виходу кожного компонента з елюенту. Кількісний аналіз базується на визначенні висоти та площі хроматографічних піків з урахуванням коефіцієнтів чутливості детектора до аналізованих речовин.

Відповідно до агрегатного стану рухомої фази розрізняють *газові* і *рідинні* хроматографи.

1.5.1. Газові хроматографи

Газову хроматографію проводять у газовому хроматографі, принципову схему роботи якого наведено на рис. 1.5.

Принцип дії газового хроматографа. Потік газу-носія з балона 1 через регулятори витрат і тиску 2 безупинно й у регульованій кількості подається через випарник у хроматографічну колонку з термостатом 4 у детектор 5. Пробу для аналізу за допомогою спеціального обладнання (шприців-дозаторів, пробовідбірних кранів) подають у систему введення 3, звідки вона переноситься потоком газу-носія безпосередньо в колонку. При проходженні отриманої газової суміші уздовж сорбенту в колонці відбувається розділення суміші на компоненти. З колонки газ-носії несе в певній послідовності розділені компоненти до детектора. Електричний сигнал від детектора через перетворювач сигналів 6 реєструється в записуючому обладнанні 7 у вигляді хроматограми.

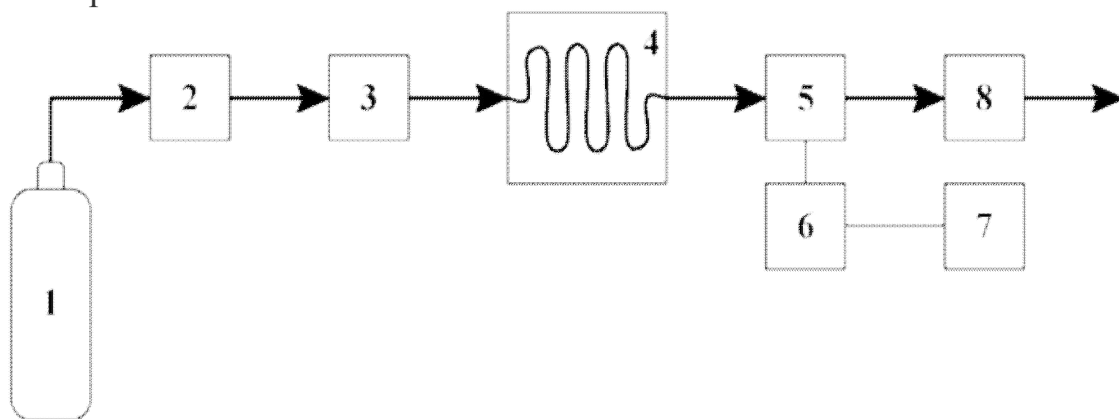


Рис. 1.5. Принципова схема газового хроматографа:

1 – джерело газу-носія (рухома фаза); 2 – регулятор витрати газу-носія; 3 – пристрій для введення проби; 4 – хроматографічна колонка в термостаті; 5 – детектор; 6 – електронний підсилювач; 7 – реєструючий пристрій (самописець, комп'ютер); 8 – пристрій для вимірювання витрати газу.

Таким чином, основними системами будь-якого газового хроматографа є колонка і детектор. Хроматографічна колонка розділяє, а детектор кількісно визначає компоненти газової суміші, що проходять через неї.

Детектори поділяють на диференційні й інтегральні. *Диференційні детектори* реєструють зміни теплопровідності газу, *інтегральні* – підсумовують зміни за певний час.

Термокондуктометричні детектори, які вимірюють теплопровідність називаються *катарометрами*. У катарометрі чутливим елементом є вольфрамова нитка, що нагрівається постійним струмом. Газ-носіє, безперервно протікаючи над нею, відводить тепло з постійною швидкістю. Якщо в газовій суміші над нагрітою ниткою з'являються молекули аналізованої речовини, то швидкість відводу тепла, температура та електричний опір нитки змінюються. Зміна електричного опору нитки пропорційна концентрації компонента в газовій суміші. Різниця в показках до і після проходження якого-небудь компонента реєструється електричною схемою. Цей детектор практично універсальний та дозволяє визначити концентрацію речовини в межах 0,1 – 0,01 %. Принцип роботи *детектора по теплопровідності* або катарометра оснований на процесі передачі тепла від нагрітого чутливого елемента до більш холодного корпусу детектора за рахунок теплопровідності газового потоку. Зі зміною складу газового потоку змінюється його теплопровідність, тобто кількість тепла, що поступає на чутливий елемент. Це, у свою чергу, призводить до зміни температури, а, отже, і електричного опору чутливого елемента.

Головною частиною *іонізаційних детекторів* є іонізаційна камера, де відбувається іонізація молекул, що потрапляють у неї з потоком газу-носія із хроматографічної колонки. Іонізацію досліджуваних речовин здійснюють у полум'ї водню, атомами аргону або гелію, повільними електронами. Іони під впливом напруги переміщуються в іонізаційній камері, що призводить до виникнення електричного струму.

Детектор електронного захоплення є селективним детектором, що найчастіше використовується в газовій хроматографії та з метою визначення сполук, які володіють більшою спорідненістю до електронів.

В основі *полум'яно-іонізаційних детекторів* лежить залежність електричної провідності іонізованого газу від його складу. Сигналом детектора є зміна іонного потоку, спричинена введенням у детектор аналізованої речовини. Газ-носіє у суміші з аналізованими компонентами та воднем подається у форсунку пальника, де відбувається іонізація. Детектор являє собою камеру, у якій підтримується полум'я, що є джерелом іонізації. У камеру вводяться необхідні для підтримки полум'я водень і повітря.

Інфрачервоні детектори. Інфрачервона спектроскопія широко застосовується в хімічному аналізі у комбінації з газовою хроматографією. Отриманий інфрачервоний спектр поглинання можна розглядати як індивідуальну характеристику тої чи іншої сполуки й використовувати для її ідентифікації.

Мас-селективний детектор. Мас-спектрометр розглядається як відмінний детектор для газової хроматографії. Отримані з його допомогою спектри надають інформацію про якісний склад проби. При бомбардуванні

електронами молекул речовини у газоподібному стані зв'язки в молекулах розриваються й утворюються іони. Вид і кількість фрагментів, що утворюються, характерні для даної молекули. При накладанні магнітного поля рух позитивно заряджених часток прискорюється й відбувається по вигнутих траєкторіях, радіус кривизни яких пропорційний кореню квадратному маси іона. В магнітному полі з постійною напругою потік іонів, що містить іони з ідентичним співвідношенням маса/заряд, потрапляє на колектор. Тут при розряді іонів виникає струм, пропорційний відносній кількості іонів з відповідною масою. Зміни магнітного поля поступово переводять на колектор потоки іонів з іншим співвідношенням маса/заряд.

Детектор по щільності. Робота цього детектора основана на вимірюванні тиску у вертикальній трубці, заповненій газом, що виходить із хроматографічної колонки, при потраплянні в неї разом з газом-носієм аналізованого компонента. Зміна тиску в цьому каналі пропорційна зміні щільності газового потоку.

Точність і швидкість при аналізі суміші в хроматографі в значній мірі залежать від правильного вибору робочого режиму детектора та умов експерименту (тип сорбенту, температура, швидкість газу-носія, довжина хроматографічної колонки).

Джерело газу-носія – це балон із стислим або зрідженим газом, що перебуває під тиском до 120 атм. Найчастіше при хроматографії використовують гелій, азот, водень та інші гази.

Балони прийнято маркувати певним кольором залежно від газу, яким вони наповнені (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Маркування балонів із газом

Газ	Колір балона	Колір напису газу
Азот	Чорний	Жовтий
Водень	Темно-зелений	Червоний
Гелій	Коричневий	Білий
Аргон (техн.)	Чорний	Синій
Аргон (чистий)	Сірий	Зелений
Кисень	Блакитний	Чорний
Горючі гази	Червоний	Білий

1.5.2. Рідинні хроматографи

На рис. 1.6 наведена схема рідинного хроматографа.

Принцип дії рідинного хроматографа. Суміш, що аналізується в розчині, за допомогою газового шприца, мікрошприца або мікродозатора вводиться в верхню частину хроматографічної колонки. За допомогою насоса суміш прокачується елюентом через хроматографічну колонку (рис 1.7), в якій проходить розділення суміші на окремі компоненти. Елюат, що витікає з колонки, містить окремі компоненти суміші, які подаються на детектор. Покази детектора реєструються регістратором. У якості детектора у рідинному хроматографі використовується *проточний рефрактометр*, що включається за диференціальною схемою, або *детектор поглинання* в ультрафіолетовій області. Подачу рухомої фази розчинника здійснюють при використанні систем, що створюють тиск до 50 Мн/м^2 . Проба вводиться за допомогою мікрошприца або крана. Хроматографічна колонка у рідинному хроматографі має довжину не більше 1 м. Порівняно з детекторами газових хроматографів детектори рідинних хроматографів мають суттєво меншу чутливість (приблизно на 2 порядки).

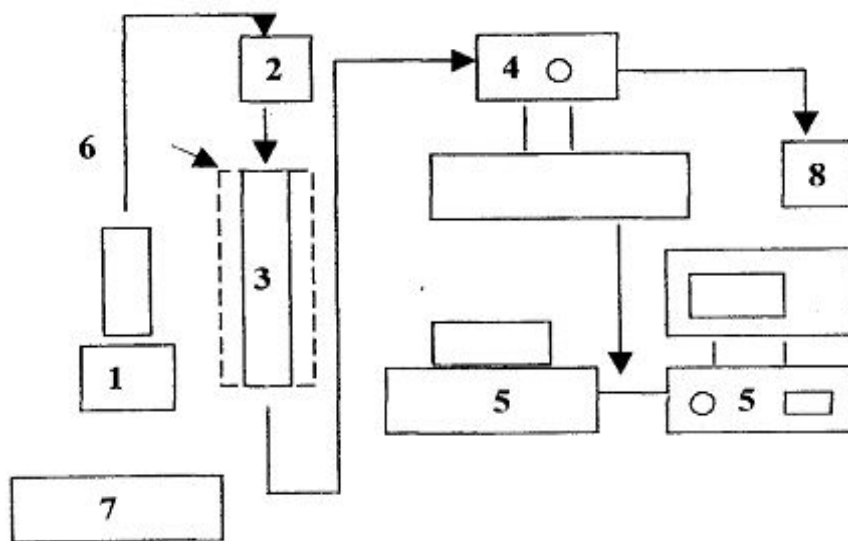


Рис. 1.6. Схема рідинного хроматографа:

1 — насос; 2 — вузол для введення проби; 3 — хроматографічна колонка; 4 — детектор; 5 — реєстратор (самописець або комп'ютер); 6 — термостат колонок; 7 — вузол підготовки елюенту з ємностями для елюенту; 8 — злив елюата або колектор фракцій.

Щоб точно виміряти концентрацію компоненту, детектори калібрують сумішами відомого складу. Для градування приладу готують штучну суміш метанолу та етилового спирту. Знімають хроматограму цієї суміші і вираховують площу піків (S) метанолу та етилового спирту в мм^2 за формулою:

$$S = h \cdot b \cdot M \quad (1.3)$$

де h – висота піка, мм; b – ширина піка, мм; M – масштаб запису сигналу піка.

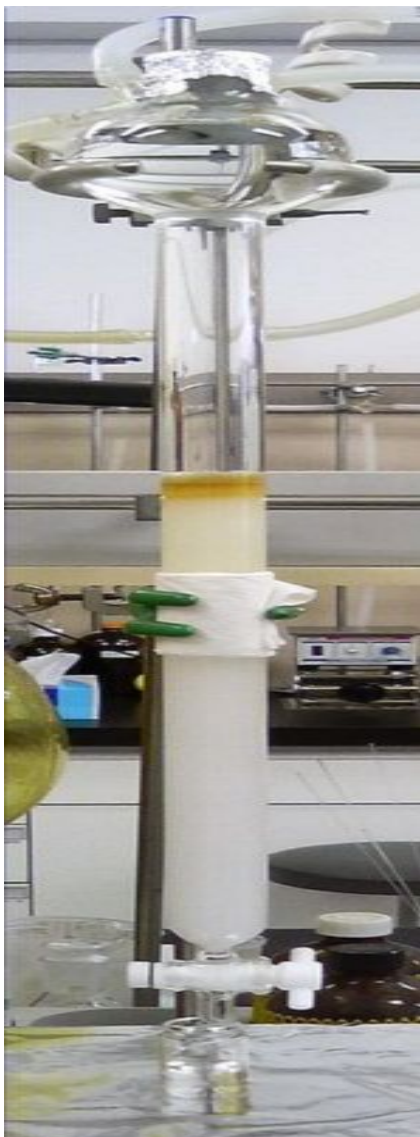


Рис. 1.7. Типова установка для колоночної хроматографії

Ширину піка визначають на половині його висоти. За коефіцієнт градування приймають середнє арифметичне значення п'яти паралельних визначень.

Режим роботи рідинного хроматографа:

- температура колонки в термостаті 70–80 °С;
- температура випаровувача 120–130 °С;
- витрата азоту 0,9–1,5 дм³/год;
- об'єм проби для введення 0,003–0,006 мл.

1.5.3. Оцінка результатів хроматографії

В результаті процесів, що проходять в детекторі, фіксується якісна та кількісна характеристика компонентів, які розділилися в колонці.

Перетворені в електричний сигнал ці процеси записуються у вигляді кривої, яка називається **хроматограмою**. Залежність концентрації компонентів розділюваної суміші на виході з колонки від часу, що пройшов з початку розділення, виражається графічно **хроматограмою**, а концентраційні профілі компонентів на ній називають **хроматографічними піками** (рис. 1.8).

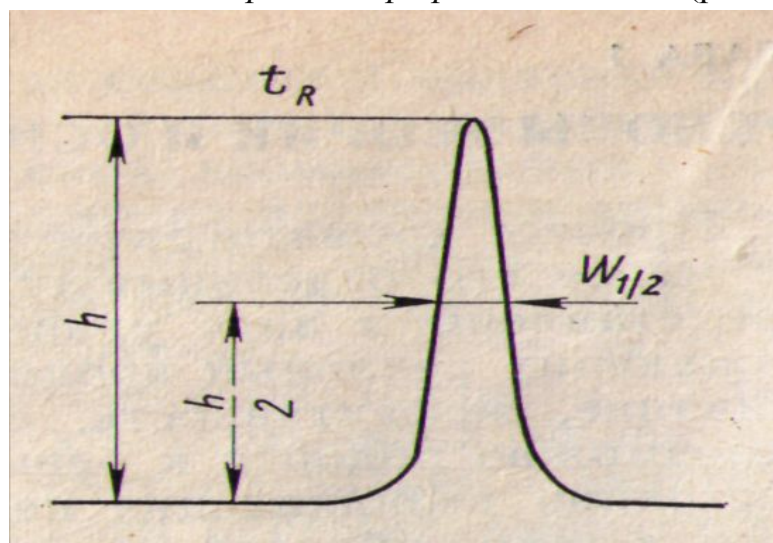


Рис. 1.8. Параметри хроматографічного піка:
 t_R – час утримання піка; h – висота піка; $W_{1/2}$ – ширина піка на половині його висоти

Профіль хроматографічної зони (форма піків) описується за допомогою математичної функції $y = f(x)$ розподілення Гауса (рис. 1.9), яка має вигляд колоколоподібної кривої, схожої на симетричну хроматографічну зону.

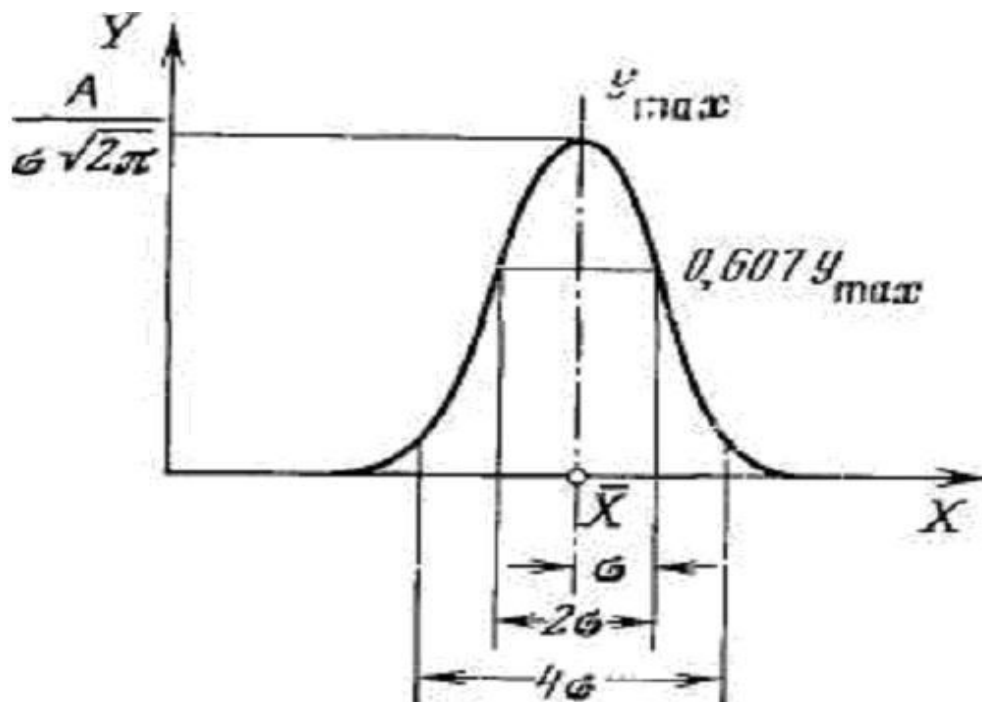


Рис. 1.9. Крива розподілення Гауса

З позицій кінетичної теорії припускається факт збігу форми хроматографічного піка з гаусовою кривою.

Якщо розділення у колонці відбулося, то кожному піку на хроматограмі відповідає одна індивідуальна речовина з суміші (рис.1.10). Площа, обмежена піком і базовою лінією, є кількісним результатом вмісту даного компонента в суміші.

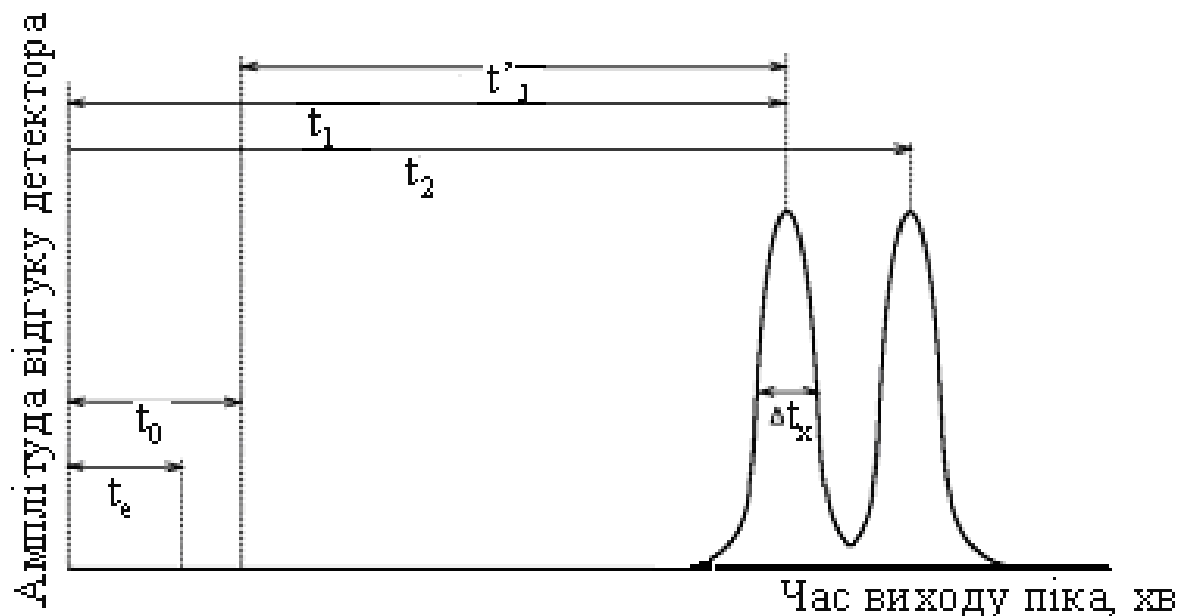


Рис. 1.10. Хроматограма розділення двокомпонентної суміші

Кожному піку на хроматограмі відповідає час, що пройшов від моменту початку розділення, до вершини піка, тобто до досягнення максимальної концентрації компонента на виході із колонки. Цей час називають *часом утримання* (на рис. 1.9 – t_1 , t_2) або *часом перебування* досліджуваної речовини в хроматографі. Час утримання складається із часу перебування речовини в рухомій (t_0) і нерухомій фазах (t'_1). Час утримання визначають від моменту введення проби речовини в хроматограф до моменту реєстрації максимуму сигналу детектора.

Кожна речовина в одних хроматографічних умовах має свій час утримання $t_1 = t_0 + t'_1$. Поряд із шириною і формою піка цей час є основною характеристикою, на підставі якої проводять ідентифікацію речовини на хроматограмі та оцінюють якість розділення.

Добуток часу виходу на швидкість руху елюенту в колонці (u) дає ще одну важливу характеристику – *об'єм утримування*. Це той обсяг елюенту, який необхідний, щоб елюювати (вимити) даний компонент із колонки.

$$V_1 = t_1 \cdot u \quad (1.4)$$

Для одержання кількісних характеристик розділення, хроматограму обробляють, тобто проводять ряд вимірів і розрахунків. Для більшості таких розрахунків необхідна ще одна характеристика хроматографічної системи, а саме t_0 – час перебування молекул у рухомій фазі (*мертвий час*) та *мертвий об'єм* колонки – V_0 (об'єм елюенту, необхідний для заповнення пор сорбенту й простору між його частками в колонці). Враховуючи, що ця величина

дорівнює утримуваному об'єму (відповідає часу утримання – t_0) несорбуючої речовини, на практиці її визначають, додаючи в розділювальну суміш маркери. Об'єм утримання маркера приймають за V_0 .

Відношення $t'R/tM$ – характеризує взаємодію компонентів суміші і хроматографічної системи. Тому це відношення одержало назву відношення розподілу мас, або *коефіцієнта розподілу*:

$$k = (tR - tM) / tM \quad (1.5)$$

Значення k може змінюватися від нуля до нескінченності.

Коефіцієнт масового розподілу (коефіцієнт ємності) D_m у хроматографії – це відношення кількості компонентів в нерухомій і рухомій фазах:

$$D_m = \frac{M_c}{M_e} \quad (1.6)$$

Коефіцієнт утримання – відношення швидкості руху речовини до швидкості руху рухомої фази. Цей параметр має значення для оцінки результатів хроматографії. Чим вище швидкість руху речовини, тим більше коефіцієнт утримання. Коефіцієнт утримання характеризує час знаходження речовини в рухомій фазі.

1.6. Газова хроматографія

Перша робота з газової хроматографії була виконана в 1949 р. Туркельтаубом під керівництвом Жуховицького й Гольберта.

Газовою хроматографією називають хроматографічний процес, у якому рухомою фазою є газ (або пара). В якості елюенту (газу-носія) використовуються водень, гелій, азот, аргон, вуглекислий газ.

Висока швидкість дифузії у випадку газоподібної рухомої фази дозволяє збільшити швидкість потоку цієї фази (можна працювати на колонках довжиною більш 10 м) і зменшити кількість проби в діаметрі колонки. У цих умовах може бути досягнута значно більш висока ефективність розділення, ніж у випадку рідкої рухомої фази.

Так, якщо тривалість розділення багатокомпонентної суміші ректифікацією виміряється годинником, то газова хроматографія дозволяє одержати більш надійні й детальні результати протягом декількох хвилин і навіть секунд. Розшифрування результатів хроматографічного аналізу досить просте, а сучасний газовий хроматограф являє собою автоматичний прилад, звичайно оснащений обчислювальним обладнанням для обробки інформації. Сучасний газовий хроматограф оснащений лічильним обладнанням (іноді таке обладнання обслуговує одночасно кілька хроматографів), яке, одержавши сигнал від детектора, здійснює якісну і кількісну розшифровку результатів аналізу та видає дані про вміст індивідуальних компонентів.

Таким чином, газова хроматографія є універсальним методом, що дозволяє використовувати однотипну апаратуру для аналізу різних речовин і фізико-хімічних досліджень.

Варіант газової хроматографії – *газоадсорбційна хроматографія*, у якій нерухомою фазою служить твердий адсорбент, а рухомою – газ. Для газоадсорбційного варіанта хроматографії у якості сорбенту (частки діаметром 0,1 – 0,5 мм) використовують силікагелі, алюмогелі, вугілля, оксид алюмінію, молекулярні сита, пористі полімери.

Робочі температурні межі для газоадсорбційного варіанта хроматографії від 70 до 600 °С. Газоадсорбційна хроматографія використовується для аналізу сумішей газів та низькокиплячих вуглеводнів, що не містять активних функціональних груп, тобто для аналізу суміші неорганічних газів, які містять водень, азот, кисень, аміак, двоокис сірки, газоподібні вуглеводні.

Випускається різноманітний асортимент твердих сорбентів для адсорбційної газової хроматографії. Для розділення і аналізу газів є одноріднопористі цеоліти (молекулярні сита) і карбосита, для універсального застосування розроблені макропористі адсорбенти – сілохроми, порасили, пористе скло, карбопаки, пористі полімери (тенакс, хромосорб).

1.6.1. Обернена газова хроматографія

Обернена газова хроматографія – варіант газоадсорбційної та газорідної хроматографії, адаптований для вивчення полісахаридів (хітозанів). Термін «обернена газова хроматографія» був запропонований у 1966 р. Назва методу обумовлена тим, що з його допомогою, на відміну від класичної газової хроматографії, вирішується «зворотне» завдання, тобто досліджуються властивості нерухомої фази. У якості сорбатів використовують низькомолекулярні речовини з різною електронною конфігурацією молекул, що поділяються на фрагменти різної природи. В залежності від концентрації сорбату в полімері змінюється кількісний і якісний склад активних центрів, що беруть участь у процесі сорбції. Особливо інтенсивно метод стали використовувати в останні роки для вивчення термодинамічних властивостей сумішей полімерів. Встановлено, що він може успішно застосовуватися для оцінки поверхневих властивостей полімерів, визначення параметрів розчинності, ступеню кристалоутворення сумішей полімерів і співполімерів, впливу наповнювачів на термодинамічні властивості бінарних полімерних систем.

Цей вид хроматографії використовують у харчовій промисловості для виділення хітозанів з панцирів крило крабів. Хітозан – складний полімерний комплекс на основі глюкозаміну. На його основі виготовляють біологічно активні добавки *хітолан* (містить 95 % хітозану, призначений для сорбції холестерину, жирів, жовчних кислот, бактеріальних токсинів, важких металів, радіонуклідів) та *каталітин* (містить крім хітозану жовчогінні компоненти, сорбує харчові жири, холестерин і жовчні кислоти, перешкоджаючи їх усмоктуванню в печінці).

1.6.2. Високоєфективна капілярна газова хроматографія

Високоєфективна капілярна газова хроматографія – це метод хроматографії на капілярних колонках, виготовлених з плавленого кварцу, з нанесеною усередині нерухомою фазою. У методі використовуються колонки без носія, а плівка нерухомої фази наноситься на внутрішню поверхню колонки. На стінці капіляра створюють тонкий (порядку 20 мкм) пористий шар адсорбенту (полімер, силікагель, оксид алюмінію, вуглецю або цеоліту). Цей тип колонок запропонував Голей в 1957 р. В 1979 р. з'явилися гнучкі колонки із плавленого кварцу менш крихкі, ніж скляні. Застосовують також колонки з нержавіючої сталі, латуні, нікелю, полімерів та інших матеріалів. Крім того, поверхня плавленого кварцу більш інертна, що зменшує адсорбцію компонентів на стінках і поліпшує функціонування колонок. Низький опір потоку газу-носія в порожніх колонках дозволяє використовувати капілярні колонки довжиною десятки, сотні й тисячі метрів. У капілярній хроматографії використовують проби $10^{-4} - 10^{-8}$ г.

У газорідному варіанті капілярної хроматографії сорбентом у порожніх колонках служить плівка нерухомої рідкої фази товщиною від 0,1 мкм до декількох мікрометрів, шар сорбенту (графіт, сажа, силікагель і т.д.) або шар твердого носія (діатоміт), який наносять чи хімічно закріплюють на внутрішній поверхні капілярної колонки.

Головною особливістю капілярної хроматографії є збільшення швидкості масообміну сполук, що розділяються, між рухомою і нерухомою фазами і у відносно низькому опорі потоку рухомої фази на одиницю довжини колонки. Висока розділювальна здатність колонки досягається за рахунок її ефективності, обумовленої мінімізацією дифузійних шляхів сорбату як у газовій фазі, так і в гранично тонкому шарі сорбенту. На таких капілярних колонках можна розділити до 400-500 компонентів.

Порівняно з іншими видами хроматографії капілярна хроматографія дозволяє збільшити загальну ефективність розділення, швидкість зміни температури при програмуванні, спростити комбінацію газової хроматографії з мас-спектрометрією, знизити температуру хроматографічної колонки і аналізувати термічно нестійкі сполуки, зменшити витрати рухомої фази, що дозволяє застосовувати дорогі рідини й гази.

Даний вид хроматографії використовується для визначення поліциклічних ароматичних вуглеводнів, амінів, нуклеозидів, фенолів, полімерів дейтерованих і природних сполук, діючої речовини лікарських засобів, для розділення складних багатокомпонентних сумішей вуглеводнів, спиртів, фенолів, ліпідів, стероїдів, пестицидів, летких сполук, ізомерів, ізотопів (D_2 , H_2 і DH).

1.7. Рідинна хроматографія

Метод був відкритий у 1903 р. російським вченим Михайлом Цветом, який використав його для розділення рослинних пігментів на складові у колонці, заповненій порошком крейди ($CaCO_3$). Запропонований Цветом

метод рідинної хроматографії був незаслужено забутий і майже не застосовувався більше 30 років.

Рідинна хроматографія – це вид хроматографії, у якій рухомою фазою (елюентом) є рідина. Нерухомою фазою може бути твердий сорбент, твердий носій з нанесеною на його поверхню рідиною або гелем. Оскільки швидкість дифузії розділюваних речовин у рідині невелика в порівнянні зі швидкістю дифузії в газі, то рідку рухому фазу необхідно пропускати через колонку повільно. Це збільшує тривалість аналізу, дозволяє збільшити діаметр колонки і кількість проби, без втрати ефективності розділення. Принцип рідинної хроматографії полягає у розділенні компонентів суміші, заснований на відмінності урівноваженого розподілу їх між двома фазами, що не змішуються, одна є нерухома, а інша – рухома. При проведенні хроматографії колонка заповнюється твердою фазою – пористим матриксом, розчиненим в елюенті. Резервуар зверху заповнюється рідким елюентом, і на верхню поверхню твердої фази наносять зразок. Суміш компонентів або молекул для розділення, що знаходяться у розчині, пропускають через колонку. У результаті взаємодії з матриксом різні молекули проходять через колонку з різною швидкістю і поступово розділяються. Однорідні компоненти суміші збираються у різних частинах колонки. Після того як вони досягнуть в певній послідовності дна колонки, їх збирають окремими фракціями.

Елюенти для рідинної хроматографії повинні мати низьку в'язкість, забезпечувати необхідний рівень селективності, бути дешевими, нетоксичними, інертними, сумісними з обладнанням для детектування. В нормально-фазній хроматографії звичайно використовують вуглеводні (гексан, гептан, ізооктан, циклогексан) з додаванням невеликих кількостей CHCl_3 , ізопропанолу, ефіру.

У колоночній рідинній хроматографії через колонку, заповнену нерухомою фазою, пропускають порцію суміші речовин у потоці елюенту (під тиском або під дією сили тяжіння), у тонкошаровій рідинній хроматографії елюент переміщається під дією капілярних сил по площині з сорбентом.

У лабораторній практиці для препаративного розділення використовують скляні колонки (див. рис. 1.7) діаметром 8-15 мм, на яких можна виділити від 100 мг до 10 г індивідуальної речовини. Для збору окремих компонентів (фракцій) використовують спеціальне обладнання. Колонка має внизу кран для регуляції швидкості процесу. У промисловості використовують колонки діаметром до 0,5 м, на яких можливо проводити розділення декількох тонн речовини.

За механізмом утримання розділюваних речовин у нерухомій фазі рідинна хроматографія поділяється на осадкову, адсорбційну, розподільну, іонообмінну, лігандообмінну, ексклюзійну (ситову) та афінну хроматографію. Рідинна хроматографія може бути аналітична і препаративна.

1.7.1. Адсорбційна хроматографія

Суть адсорбції в тому, що молекули перебувають на поверхні твердого тіла протягом якого-небудь часу, поки не одержать за рахунок флуктуації (відхилення) теплового руху досить енергії, щоб подолати утримуючі сили. Адсорбція буває фізична, обумовлена Ван-дер-Ваальсовими силами, і хімічна, що наближається за величиною до сил хімічного зв'язку. Як правило, не можна точно визначити, за рахунок яких сил у дійсності відбувається адсорбція.

У твердих речовинах тільки частина поверхневого шару може взаємодіяти зі сторонніми молекулами. Поверхневі сили спорідненості рівномірно розподілені на всій поверхні. Однак, є ділянки, на яких адсорбційні сили особливо великі – це активні центри. Розділення компонентів суміші при адсорбції заснований на різній здатності до сорбції на твердих адсорбентах. У якості адсорбентів використовують активоване деревне вугілля, гель фосфату кальцію, оксиди алюмінію або кремнію.

Адсорбент у вигляді суспензії з розчинником (найчастіше буферним розчином) вносять у скляну вертикальну колонку і рівномірно упаковують. Суміш для хроматографії у невеликому об'ємі розчинника наносять на колонку. Компоненти розділювальної суміші адсорбуються на адсорбенті. Потім приступають до стадії десорбції (звільнення, «зняття» з сорбента) компонентів з колонки, застосовуючи відповідні елюенти (рис. 1.11). Збір фракцій здійснюють за допомогою автоматичного колектора фракцій.

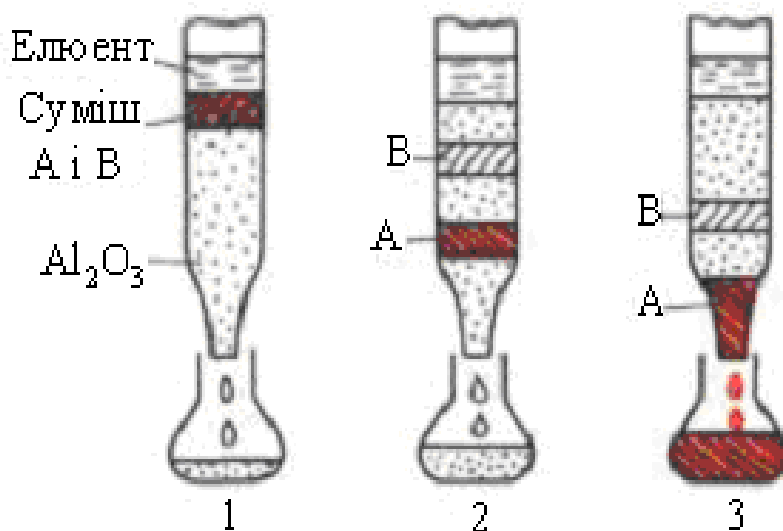


Рис. 1.11. Схема абсорбційної хроматографії. Розділення двох різних речовин (A і B), що рухаються через колонку з різною швидкістю: 1 – нанесення зразка на колонку; 2 – процес розподілу зразка; 3 – кінець розподілу зразка.

Розділення методом адсорбційної хроматографії здійснюється в результаті взаємодії речовини з адсорбентами, такими, як силікагель або оксид алюмінію, що мають на поверхні активні центри. Відмінність у

здатності до взаємодії з адсорбційними центрами різних молекул проби призводить до їх розділення на зони в процесі руху з рухомою фазою по колонці. Розділення зон компонентів, що досягається при цьому, залежить від взаємодії як з розчинником, так і з адсорбентом.

В основі сорбції на поверхні адсорбенту, що має гідроксильні групи, лежить специфічна взаємодія між полярною поверхнею адсорбенту та полярними (або здатним поляризуватися) групами чи ділянками молекул. До таких взаємодій відносять диполь-дипольну взаємодію між постійними або індукованими диполями, утворення водневого зв'язку аж до утворення комплексів. Можливим і досить частим у практичній роботі є прояв хемосорбції, яка може привести до значного підвищення часу утримання, різкого зниження ефективності, появи продуктів розкладання або незворотної сорбції речовини.

Розчинники. В рідинній хроматографії використовується: вода, метанол, етанол, пропіловий спирт, ацетон, етилацетат, диетиловий ефір, хлороформ, хлористий метилен, бензол, толуол, гексан.

Сорбенти. За ступенем активності сорбенти можна розташувати в такому порядку: активоване вугілля, окис алюмінію, окис магнію, силікагель, природні силікати, крохмаль, целюлоза.

Вимоги до сорбентів:

- велика ємність, тобто більша площа активної поверхні, що є наслідком пористості, або високої дисперсності (малого розміру часток);
- чітко визначений розмір часток (чим менший розмір часток адсорбенту, тим швидше встановлюється рівновага);
- однакова величина й форма (дозволяє краще розділяти речовини й сприяє кращій проникності колонки);
- селективність;
- інертність.

1.7.2. Розподільна хроматографія

При розподільному варіанті рідинної хроматографії розділення суміші речовин здійснюється за рахунок відмінності коефіцієнтів розподілу окремих компонентів між двома фазами, що не змішуються – елюентом (рухома фаза) і фазою, що знаходиться на сорбенті (нерухома фаза).

Розподільна хроматографія заснована на наступному: якщо дві фази перебувають у контакті одна з одною, причому одна з них або обидві містять розчинену речовину, що буде розподілена між цими фазами. Цей процес називається розподілом і кількісно описується *коефіцієнтом розподілу*, що представляє собою відношення концентрацій розчиненої речовини в кожній із двох фаз. Стаціонарна фаза в розподільній хроматографії називається *сорбентом*. Якщо сорбент являє собою рідину, яка утримується яким-небудь твердим тілом, це тіло є *носієм* або *матрицею*. Рухома фаза називається

розчинником або проявником, а компоненти розділювальної суміші – розчиненими речовинами.

Колонка при розподільній хроматографії заповнюється сорбентом, який перебуває в розчиннику. Розчин, що містить суміш компонентів, наносять на колонку так, щоб розчинені речовини проникли в сорбент. Потім через колонку пропускають розчинник.

На рис. 1.12 показано принцип дії колонки, у якій розділення молекул між нерухомою та рухомою фазами заснований на розподілі молекул між теоретичними тарілками.

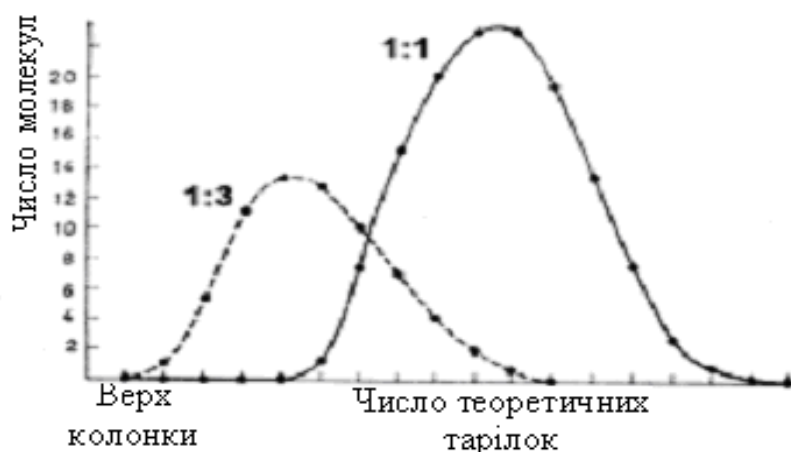
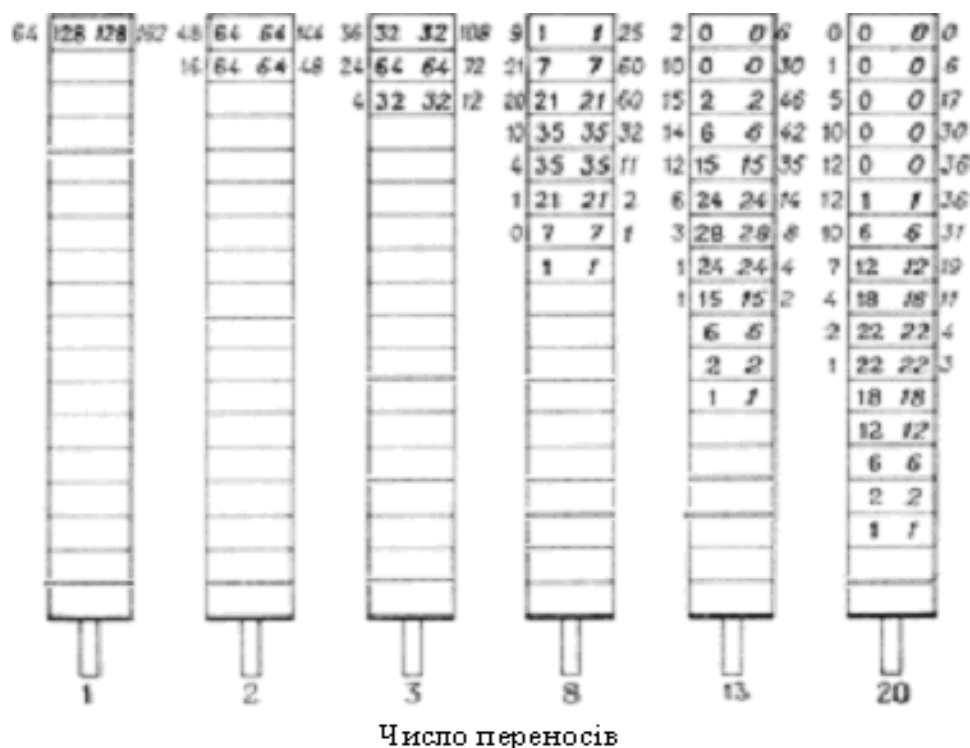


Рис. 1.12. Принцип дії колонки при розподільній хроматографії

Колонка довільно розділена на 18 теоретичних тарілок. На колонку нанесено суміш двох видів молекул. Всього 512 молекул. З них 256 (жирний шрифт) розподіляються порівну між рухомою фазою (прямий шрифт) і нерухомою фазою (курсив); це категорія 1:1. Категорія 1:3 (тонкий шрифт)

розподіляється таким чином, що в рухомій фазі перебуває 25%, а в нерухомій – 75% молекул. При переносі всі речовини рухомої фази переходять на наступну теоретичну тарілку. Після кожного переносу число молекул кожної категорії перерозподіляється відповідно до правила 1:1 і 1:3.

Графік показує розподіл кожної категорії молекул після 20 переносів. Зауважимо, що речовина категорії 1:3 повільніше рухається через стовпчик. Хоча сорбент і розчинник розподілені по всій колонці рівномірно, колонку можна розглядати як сукупність безлічі окремих шарів («теоретичних тарілок»), кожен з яких містить дві фази. Уявімо, що 256 ідентичних молекул, які рівномірно розподіляються між нерухомою та рухомою фазами, нанесені на колонку з 18 теоретичними тарілками. У верхній теоретичній тарілці (початковій) 256 молекул розподілені так, що в кожній фазі перебуває по 128 молекул. При переході 128 рухомих молекул з першої теоретичної тарілки на другу вони розподіляються на ній по 64 і 128 молекул, що залишилися на першій теоретичній тарілці перерозподіляються по 64 у кожній фазі, як показано на рисунку. При просуванні рухомих фаз ще на одну теоретичну тарілку знову відбувається перерозподіл. Після 20 послідовних переносів досягається стан, зображений на рисунку.

Припустимо, що на першій теоретичній тарілці перебуває 256 молекул іншого типу (на рисунку цифри зовні колонки), які в 3 рази більше розподіляються в нерухому фазу. На рисунку показано також їх розподіл після 20 переносів.

Розподіл цих двох видів молекул дуже відрізняється, тому в результаті відділяється значна частина молекул. Чим більше число теоретичних тарілок (тобто довжина колонки), тим краще розділення. Слід зазначити, що в довшій колонці (при збільшенні числа теоретичних тарілок) речовина розподілиться на більшу частину колонки. У дійсності, коли число молекул велике (більше 1016), то число молекул на першій теоретичній тарілці після кількох переходів відрізнятиметься від нуля. З іншого боку, ступінь розподілу зменшується в тому розумінні, що більша частка речовини перебуває на невеликій частині теоретичних тарілок. Наприклад, після 8 переносів 40% молекул, які на рисунку розподіляються 1:1, утримується в 4/8 теоретичних тарілок, після 20 переносів 40% утримується вже в 6/16, або 3/8, теоретичних тарілок. Звідси зрозуміло, що в ідеальному випадку, якщо розділення молекул між нерухомою та рухомою фазами визначається тільки їх розподілом між теоретичними тарілками, то розділення двох речовин буде більш ефективним при збільшенні довжини стовпчика.

Різновидом розподільної хроматографії є *хроматографія на папері*, яка широко використовується в лабораторіях для розділення пептидів, амінокислот та інших речовин (рис. 1.13). Цей вид хроматографії був розроблений Мартіном із співробітниками. В 1952 р. за дослідження в області розподільної хроматографії Мартіну і Сінгу була присвоєна Нобелівська премія з хімії.

У розподільній хроматографії на папері застосовують специфічний носій – хроматографічний папір. У якості стаціонарної фази при цьому служить вода, адсорбована целюлозними ланцюгами фільтрувального паперу. Один або кілька зразків поміщають на одному краї листка хроматографічного паперу, цим же кінцем папір занурюють у відповідну для даного зразка суміш органічних розчинників (наприклад, бутанол-оцтова кислота-вода в певних співвідношеннях). Розчинник рухається завдяки силі капілярності і в цей час відбувається розділення компонентів суміші. Після того як фронт розчинника дійде до протилежного краю паперу на відстань 1-2 см від краю хроматографія вважається закінченою. Хроматографічний папір висушують, а місце розташування кожного з розділювальних речовин визначають хімічними або фізико-хімічними методами.

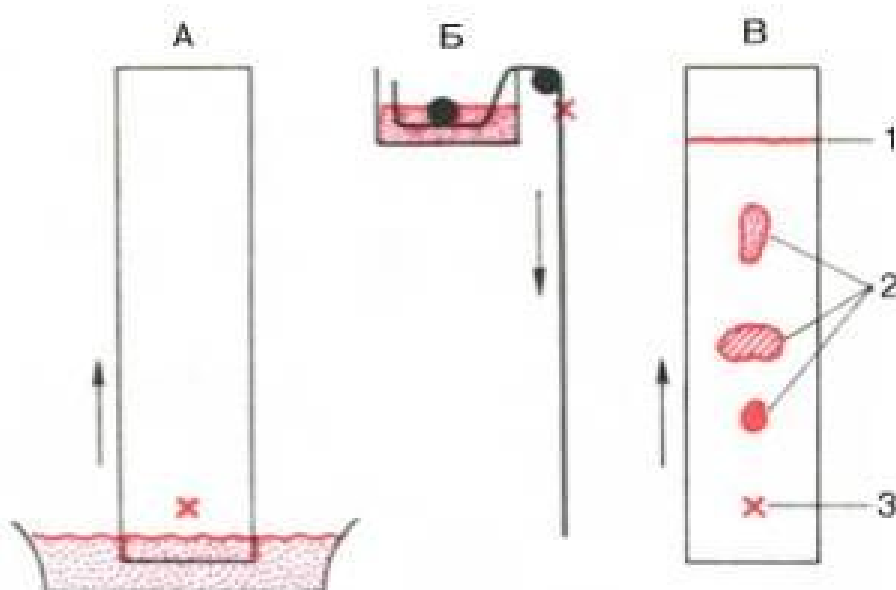


Рис. 1.13. Схема хроматографії на папері. А – висхідна хроматографія; Б – низхідна хроматографія (вид збоку); В – хроматограма з розділеними і зафарбованими речовинами: 1 – фронт розчинника, 2 – розділені речовини, 3 – місце нанесення зразка.

Тонкошарова хроматографія. Розділення речовин на тонкому шарі адсорбенту вперше було здійснено Н.А. Ізмайловим та М.С. Шрайбером у 1938 році. Процес подібний до паперової хроматографії. Його перевагою є більша швидкість аналізу, більш висока якість розділення, і можливість вибору нерухомої фази з кращими властивостями для розділення компонентів суміші. Техніку розділення представлено на рис. 1.14.

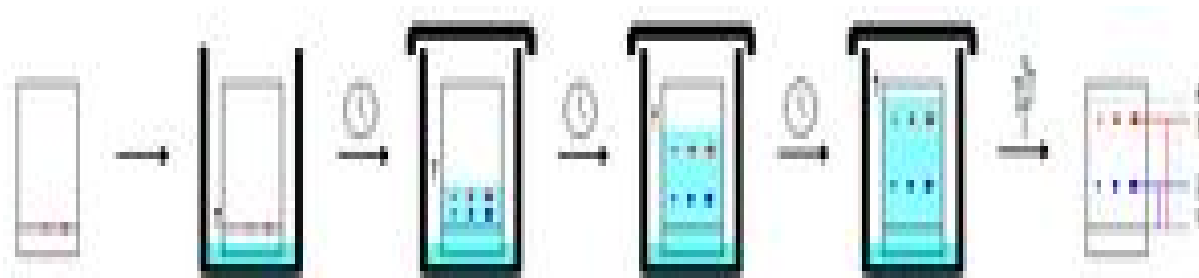


Рис. 1.14. Пластина з нанесеними краплями зразків у процесі розділення

На скляну пластинку або пластинку з якого-небудь іншого матеріалу наносять тонкий шар адсорбенту, який потім просочується рідиною. Якщо метод використовують для препаративного розділення значних кількостей речовин, то шар сорбенту не повинен бути тонким. Така хроматографія називається *препаративно-шаровою хроматографією*. Нерухома фаза (силікагель, крохмаль, целюлоза, Al_2O_3 та ін.) наноситься тонким шаром на скляну, металеву (алюмінієву фольгу) або пластикову пластинку. Для проведення аналізу краплю аналізованої суміші наносять на стартову лінію за 2 - 3 см від краю пластинки або смужки паперу і висушують. Якщо на одну точку наносять кілька крапель, то висушують кожну краплину окремо. Потім край пластинки занурюють у розчинник (вода, органічний розчинник), який діє як рухома фаза. При цьому розчинник не повинен торкатися нанесених краплин зразків. Пластинку можна підвісити так, щоб потік розчинника рухався зверху вниз (низхідна хроматограма) і навпаки (висхідна) або від центру до країв (радіальна). На рис. 1.15 показано типову камеру для проявлення хроматографічної пластинки.

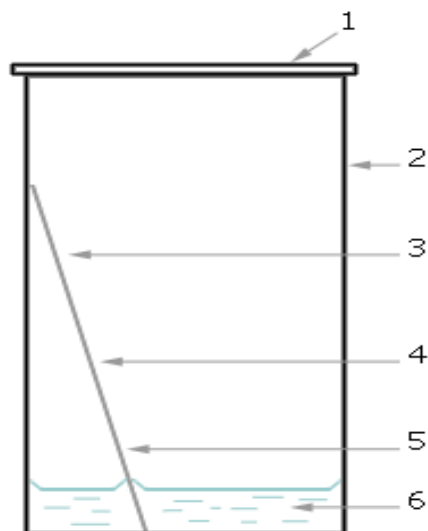


Рис. 1.15. Типова камера для проявлення хроматографічної пластинки:
1 – кришка; 2 – скляна камера; 3 – пластинка з тонкошаровою хроматограмою; 4 – сорбент; 5 – місце нанесення проби; 6 – розчинник.

Під дією капілярних сил розчинник рухається уздовж шару сорбенту і переносить компоненти суміші з різною швидкістю, що призводить до їх

просторового розділення. Коли фронт розчинника досягне необхідного рівня, хроматограму виймають із розчинника, дають їй висохнути, потім проявляють плями компонентів суміші, що розподілилися на площині пластинки шляхом обприскування хроматограми реагентом та виявлення (прояву) розділених речовин на хроматограмі за допомогою ультрафіолетової спектроскопії, інфрачервоної спектроскопії або обробкою реактивами, з утворенням кольорових сполук.

Використовують також здатність деяких речовин до флуоресценції під дією ультрафіолетових променів, для чого в проявник додають флуоресціюючий індикатор. На проявленій хроматограмі звичайно вимірюють відстані, пройдені розчинником H і компонентом h за певний час і знаходять величину $R = h/H$ (рис. 1.16).

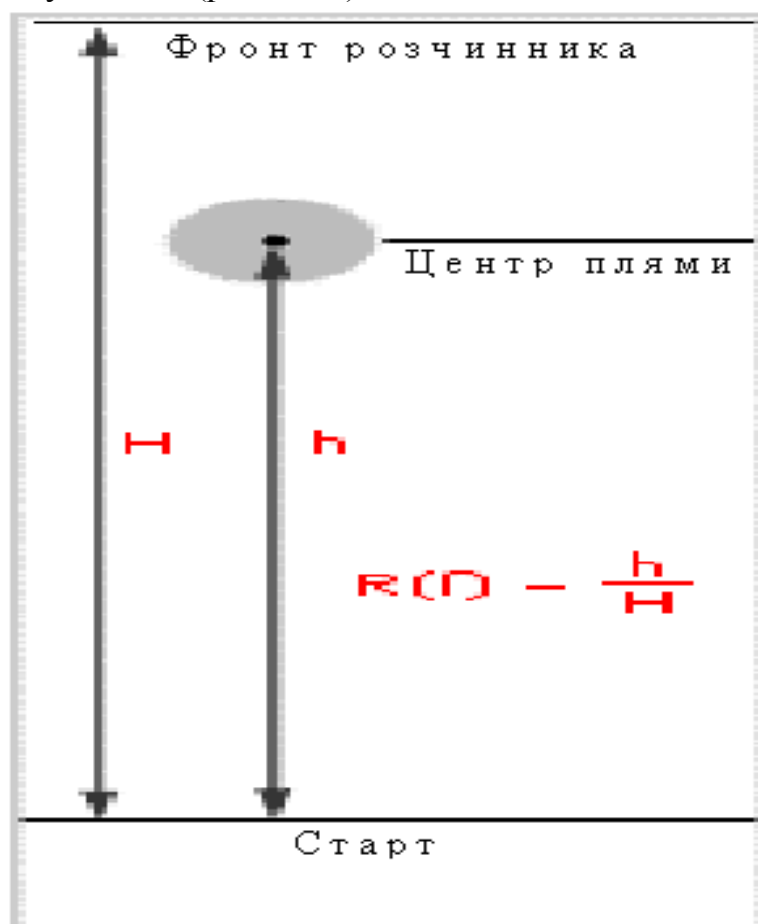


Рис. 1.16. Спосіб підрахунку R_f . Стрілкою показано напрям руху фронту розчинника, який рухається до верхнього краю пластинки.

Сорбційні властивості системи в тонкошаровій хроматографії характеризуються *рухомістю*, тобто величиною R_f , яка розраховується з експериментальних даних за рівнянням:

$$R_f = X_i / X_f \quad (1.7)$$

де X_i – відстань від стартової лінії до центру плями i -го компонента; X_f – відстань, пройдена за цей час розчинником.

В ідеальних умовах рухомість R_f визначається тільки природою речовини, параметрами паперу і властивостями розчинників, але не залежить

від концентрації речовини й присутності інших компонентів. У дійсності R_f , в деякій мірі залежить від цих факторів і техніки експерименту.

Тонкошарова та паперова хроматографія використовуються для аналізу жирів, вуглеводів, білків і неорганічних сполук.

На рис. 1.17 представлено хроматограму ефірних масел. Розвиток процесу хроматографії в часі наведено на рис. 1.18.

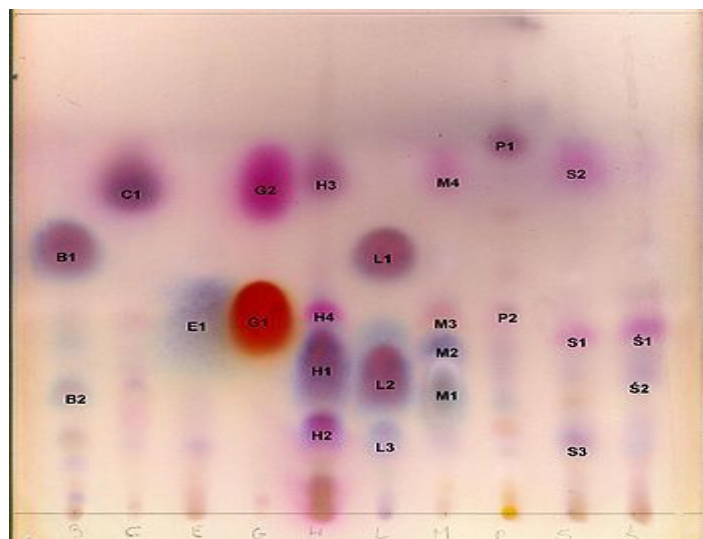


Рис. 1.17. Хроматограма 10 ефірних масел, проявлена ваніліном

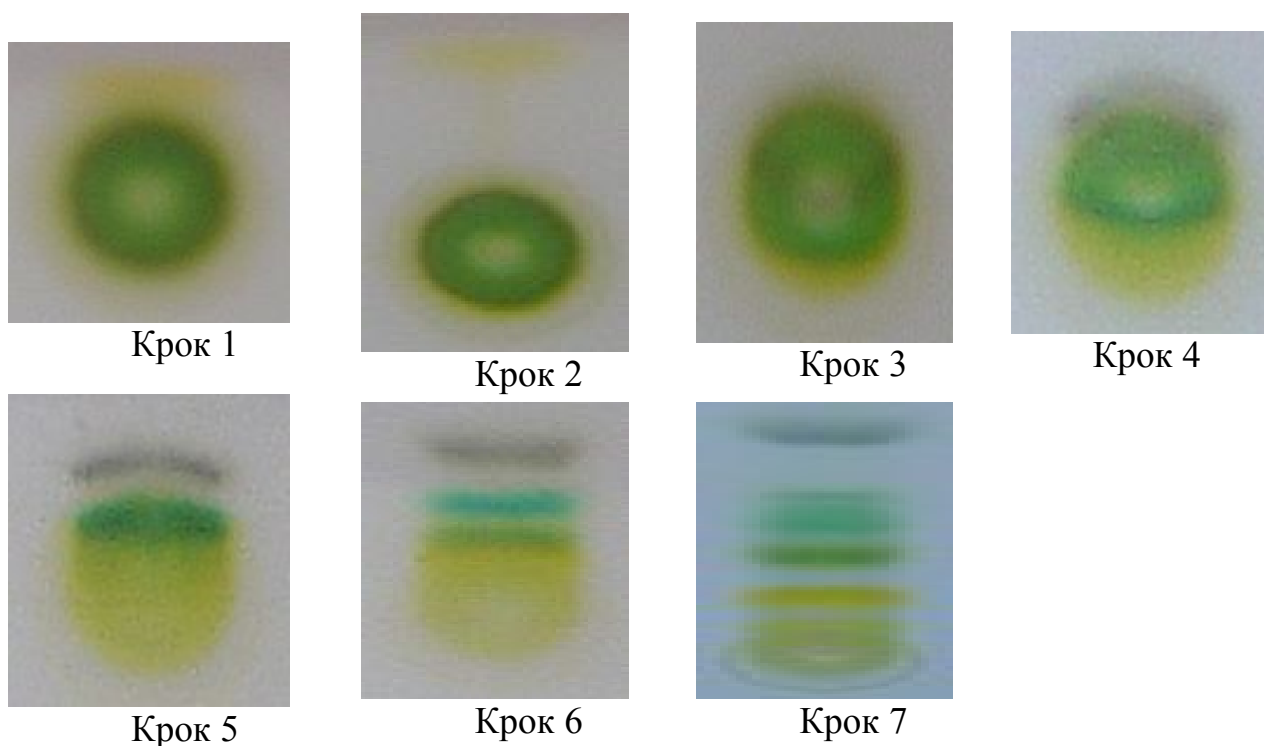


Рис. 1.18. Розвиток процесу хроматографії в часі

При якісному аналізі застосовують метод “свідків”, для чого на лінію старту поруч із аналізованою сумішшю наносять індивідуальні речовини.

Порівнюючи значення R індивідуальних речовин і компонентів суміші, проводять їх ідентифікацію.

Для кількісного аналізу вимірюють площу зони окремих компонентів суміші на хроматограмі й знаходять кількість речовин. Можна також видалити компонент з носія випарюванням і потім визначити його кількість в об'ємі отриманого розчину.

Сорбенти. Найбільш поширеним сорбентом є силікагель. Силікагель – гідратована кремнієва кислота, що утворюється при дії мінеральних кислот на силікат натрію. Силікагель – це полярний сорбент, активні центри якого групи –ОН. Він легко сорбується на поверхні води і утворює водневі зв'язки.

Окис алюмінію є слабоосновним сорбентом і використовується, в основному, для розділення сполук слабоосновного та нейтрального характеру.

Кізельгур – адсорбент, отриманий з природних мінералів. Володіє гідрофільними властивостями, але нижчою адсорбційною ємністю, порівняно з силікагелем.

Кремнієвокислий магній менш полярний ніж силікагель. Використовується у випадках, коли полярні адсорбенти не ефективні.

Ефективними для розділення складних органічних молекул є тонкошарові пластинки з нанесеною целюлозою.

Вимоги до хроматографічного паперу. Хроматографічний папір повинен бути хімічно чистим, нейтральним, інертним відносно компонентів розчину і рухомої фази, бути однорідним за щільністю. Має значення також структура молекул целюлози в папері, здатність до сорбції, орієнтація волокон, яка впливає на швидкість руху розчинника й на інші характеристики процесу.

При виборі паперу в якості нерухомої фази необхідно враховувати, що деякі органічні речовини перетворюють гідрофільний папір у гідрофобний. Для цього його можна просочити розчинами різних гідрофобних речовин – парафіну, рослинної олії та ін.

Вимоги до розчинників. Розчинники рухомої і нерухомої фаз не повинні змішуватися, склад розчинника в процесі хроматографії не повинен змінюватися, розчинники повинні легко видалятися з паперу, бути доступними і нетоксичними. Для розділення водорозчинних речовин в якості рухомої фази звичайно вибирають органічні розчинники, а в якості нерухомої – воду. В обраних розчинниках компоненти проби повинні мати різну розчинність, інакше розділення взагалі не відбудеться. У розчиннику, що є рухомою фазою, розчинність кожного компонента повинна бути меншою, ніж в розчиннику нерухомої фази, але досить значною. Це обмеження пов'язане з тим, що коли розчинність речовини буде дуже великою, компоненти рухатимуться разом із фронтом розчинника, а якщо розчинність буде малою, речовина залишиться на початковій лінії.

Найчастіше застосовують суміші речовин, наприклад бутилового або амілового спирту з метиловим або етиловим, насичені водні розчини фенолу,

крезолу, суміші бутилового спирту з оцтовою кислотою, аміаком і т.д. Застосування різних сумішей розчинників дозволяє рівномірно змінювати величину R_f і створювати найбільш сприятливі умови розділення.

Іншим прикладом розподільної хроматографії є газорідинна хроматографія. З часу відкриття А. Мартіном і А.Т. Джеймсом газорідинної хроматографії (1952 р.) – описано більше тисячі видів стаціонарних рідких фаз. На практиці використовують, в основному, 10-15 типів рідких нерухомих фаз. Особливо широко використовуються неполярні фази – поліметилсилоксани, які стабільні при температурі колонки 300-350°C.

Для збільшення полярності в поліметилсилоксанові фази вводять полярні ціанопропільні групи. Універсальною є фаза полібісціанопропілфеніл (14%) диметил (86%) силоксан, що має три типи груп. Замість сквалана (максимально припустима температура застосування 100°C) запропонована більш термостабільна фаза – поліоктил (50%).

Газорідинна хроматографія є варіантом газової хроматографії, в якій нерухомою фазою служить рідина, нанесена на інертний носій, а рухомою – газ. У якості нерухомої фази використовують нелеткі рідини, нанесені на інертний твердий носій, у якості рухомої фази – газоподібні азот, водень, гелій, двоокис вуглецю й ін. Розділення сумішей цим методом здійснюється в колонках, що являються трубками із внутрішнім діаметром 1 - 6 мм і довжиною 1 - 5 м. Трубки заповнені інертним носієм, наприклад діатомітом, просоченим нелеткою рідиною, або сталеві й скляні капіляри діаметром 0,2 - 0,3 мм і довжиною 25 - 100 м з рідкою фазою, нанесеною на стінки цих капілярів (капілярна газорідинна хроматографія). Сорбент (висококиплячі вуглеводні, складні ефіри, силоксани) готують нанесенням рідини у вигляді плівки товщиною кілька мкм на твердий носій. Робочі температури для газорідинної хроматографії від 20 до 400 °C. Швидкість розподілу речовин між рухомою газовою та стаціонарною рідкою фазами значно вища, ніж у випадку рідкої рухомої фази, тому ефективність розділення суттєво підвищується.

Оскільки багато органічних сполук, наприклад біополімери, перевести в газову фазу важко або взагалі неможливо, для таких речовин застосовується рідинна хроматографія високого тиску (молекулярна рідинна хроматографія). У якості нерухомої фази застосовуються дрібнопористі нерозчинні в органічних розчинниках інертні носії, покриті плівкою різних полімерів. Заповнення колонок діаметром 0,5 - 50 мм нерухомою фазою проводять під тиском в 150 - 300 атм, завдяки чому досягають високого ступеню однорідності та щільності заповнення, а отже й ефективності розділення. Елюція розділюваних речовин здійснюється пропусканням через колонку органічного розчинника або суміші розчинників під тиском в 50 - 200 атм.

Перевага такої хроматографії полягає, по-перше, у тому, що рідких нерухомих фаз із різними властивостями набагато більше, ніж адсорбентів, і, по-друге – в цьому випадку нерухома фаза має гомогенну поверхню, тоді як

поверхня навіть найкращих адсорбентів містить різні центри підвищеної адсорбційної здатності. Механізм розподілу компонентів між носієм і нерухомою рідкою фазою заснований на їх розчинності у рідкій фазі. Селективність колонки залежить від двох факторів: пружності парів компонентів суміші і коефіцієнта активності парів у рідкій фазі. При розчиненні суміші речовин пружність парів над розчином прямо пропорційна коефіцієнту активності, молярній частці в розчині й тиску парів чистої речовини при даній температурі. Тобто, концентрація кожного компонента в рівноважній паровій фазі визначається його парціальним тиском над розчином. Чим нижча температура кипіння речовини, тем слабкіше втримується вона в хроматографічній колонці. Якщо ж температури кипіння речовин однакові, то для розділення використовують їх різницю у взаємодії з нерухомою рідкою фазою: чим сильніша взаємодія, тем менший коефіцієнт активності і більший час утримання. У випадку рідкої нерухомої фази речовини здатні до міцної адсорбції можуть бути розділені без особливих зусиль. Оскільки існують нерухомі фази різної полярності, то хроматографія може бути застосована практично до всіх речовин, оскільки кожна з них в якійсь мірі може бути розчинною і легкою.

Для забезпечення селективності колонки важливо правильно вибрати нерухому рідку фазу. Ця фаза повинна бути хорошим розчинником для компонентів суміші (якщо розчинність мала, компоненти виходять із колонки дуже швидко), нелеткою (щоб не випаровувалася при робочій температурі колонки), хімічно інертною, повинна мати невелику в'язкість (інакше уповільнюється процес дифузії) і при нанесенні на носій утворювати рівномірну плівку, міцно з ним зв'язану.

Розрізняють рідкі фази трьох типів: неполярні (насичені вуглеводні й ін.), частково полярні (складні ефіри, нітрили та ін.) і полярні (полігліколи, гідроксиламіни та ін.).

Газорідинна хроматографія дає можливість одержати високий ступінь розділення, допускає високу швидкість потоку розділюваних речовин, завдяки чому скорочується час проведення аналізу. Метод застосовується для аналізу складних органічних сумішей.

1.8. Надкритична флюїдна хроматографія

Проміжне положення між рідинною та газовою хроматографією займає **надкритична флюїдна хроматографія**, коли рухомою фазою служить стиснений газ.

Критичний стан речовини. Агрегатний стан чистої речовини визначається температурою та тиском, але існує граничний тиск та гранична температура, при яких зникає відмінність між рідкою й газоподібною фазами речовини, тобто речовина переходить у критичний стан. Така точка називається *критичною точкою*. Температура й тиск в цій точці носять назву *критичної температури* і *критичного тиску*. Критична точка – це стан

речовини, в якому дві або більше фаз цієї речовини знаходяться в термодинамічній рівновазі. При наближенні до критичного стану властивості речовини змінюються. При температурах, вищих за критичну, розділення речовини на фази не існує (наприклад, зникає різниця між газоподібним та рідким станом речовини).

Потрійна точка води – це певне значення температури та тиску, при яких вода може існувати одночасно у вигляді 3 фаз (рис.1.19). Вода в потрійній точці знаходиться в стані термодинамічної рівноваги і знаходиться одночасно у вигляді твердої, рідкої і газоподібної фази.

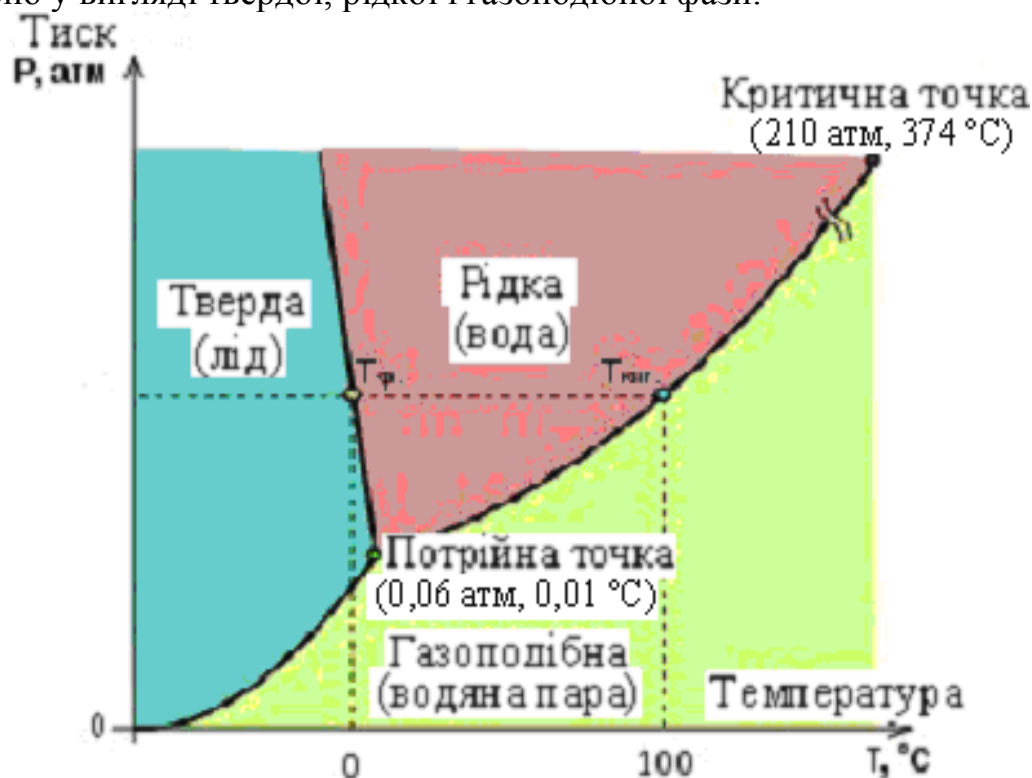


Рис. 1.19. Потрійна точка води

В Міжнародній системі одиниць (СІ) температура вимірюється в Кельвінах. Похідною величиною є градус Цельсія. Абсолютний нуль (0 К) дорівнює $-273,15\text{ °C}$. В Англії та США використовують шкалу Фаренгейта. Нуль градусів Цельсія – це 32 градуси Фаренгейта. Перерахунок температури між шкалами наведено в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

Перерахунок температури між шкалами

в\із	Кельвін	Цельсій	Фаренгейт
Кельвін (К)	$= K$	$= C + 273$	$= (F + 459) / 1,8$
Цельсій (°C)	$= K - 273$	$= C$	$= (F - 32) / 1,8$
Фаренгейт (°F)	$= K \cdot 1,8 - 459$	$= C \cdot 1,8 + 32$	$= F$

Одиниця вимірювання тиску в системі СІ – Паскаль (Па, Ра). На практиці застосовують наближені значення: $1\text{ атм} = 0,1\text{ МПа}$ і $1\text{ МПа} = 10\text{ атм}$. 1 мм водяного стовбчика приблизно дорівнює 10 Па. Нормальний атмосферний тиск вважається рівним 760 мм ртутного стовпчика або 101 325

Па (101 кПа). Бар – позасистемна одиниця тиску, що дорівнює 10^5 Паскалям, приблизно 750 мм ртутного стовпчика або 0,987 атмосфер.

Надкритичний флюїд (НКФ) — це стан речовини, при якому зникає відмінність між рідкою й газоподібною фазами.

При збільшенні температури та тиску вище потрійної точки можна досягнути таких значень, коли зникне відмінність між рідкою та газоподібною фазами і речовина перейде у критичний стан (критична точка води: $T = 374^{\circ}\text{C}$, $P = 220,64$ атм). Речовина, що перебуває при температурі й тиску вище критичної точки є надкритичним флюїдом.

Одна з найбільш важливих властивостей надкритичного стану речовини – це її здатність до розчинення. Змінюючи температуру або тиск флюїду можна змінювати його властивості в широкому діапазоні. Так, можна одержати флюїд, за своїми властивостях близький або до рідини, або до газу. Здатність до розчинення флюїду збільшується із збільшенням щільності (при постійній температурі). Оскільки щільність зростає при збільшенні тиску, то змінюючи тиск можна впливати на здатність флюїду до розчинення при постійній температурі.

У випадку з температурою залежність властивостей флюїду більш складна. При постійній щільності здатність флюїду до розчинення також зростає, однак поблизу критичної точки незначне збільшення температури може призвести до різкого падіння щільності і, відповідно здатності до розчинення. Надкритичні флюїди необмежено змішуються один з одним, тому при досягненні критичної точки система завжди буде однофазною. Приблизна критична температура бінарної суміші може бути розрахована як середнє арифметичне критичних параметрів речовин.

У надкритичній флюїдній хроматографії рухомою фазою служить газ (CO_2 , N_2O), стиснений до надкритичного стану (флюїди). Капілярні колонки мають внутрішній діаметр 25-100 мкм та довжину 10 – 15 м. Використовують спектрофотометричні або полум'яно-іонізаційні детектори.

Здатність флюїду до розчинення порівнюється до рухомої фази в рідинній хроматографії, а значення коефіцієнта дифузії розчинених у флюїді речовин на 2-3 порядки вище, чим у рідинній хроматографії.

Термічно лабільні речовини з низькою леткістю можна аналізувати методом надкритичної флюїдної хроматографії, де в якості рухомої фази використовують речовини у надкритичному стані при високому тиску й температурі. Це можуть бути диоксид вуглецю, н-пентан, ізопропанол, діетиловий ефір та ін. Частіше застосовують диоксид вуглецю, який легше перевести у надкритичний стан, він нетоксичний, не легкозаймистим, є дешевим продуктом.

Перевагою цього методу порівняно з методами газорідинної та високоефективної рідинної хроматографії є можливість прискореного аналізу (експрес метод), обумовленого низькою в'язкістю фаз у надкритичному стані, високою швидкістю потоку рухомої фази і скороченням часу утримання компонентів більш ніж у 10 разів.

Надкритична флюїдна хроматографія має ряд переваг перед рідинною та газовою хроматографією. У ній можливе застосування універсальних детекторів, розділення термічно нестабільних та нелетких речовин (на відміну від газової хроматографії). Незважаючи на високу чистоту одержуваних сполук, висока вартість робить цей вид хроматографії винятковим для очищення або виділення дорогоцінних речовин. Надкритична флюїдна хроматографія забезпечує високоефективне розділення багатокомпонентних сумішей, включаючи олігомерні молекули. Екологічна нешкідливість елюенту (двоокису вуглецю) відрізняє цей метод від інших методів хроматографії. Досить перспективним є застосування надкритичної флюїдної хроматографії у фармацевтичній промисловості.

1.9. Реакційна хроматографія

Реакційна хроматографія – метод аналізу, у якому поряд із хроматографічним розділенням здійснюються хімічні перетворення досліджуваних речовин. Термін "реакційна хроматографія" застосовують у газовій і рідинній хроматографії. Це сукупність методів ("хімічна дериватизація") перетворення аналізованих сполук після їх виходу із колонки з метою поліпшення характеристик для подальшої ідентифікації.

Дериватизація – одержання похідних аналізованої речовини, що володіють іншими (кращими з погляду використання) аналітичними властивостями (наприклад, іншим УФ-спектром, флуоресценцією, термічною стабільністю, леткістю та ін.)

Хімічні реакції проводять у хроматографічній системі (у спеціальному мікрореакторі або обладнанні для введення проби, хроматографічній колонці, детекторі) або поза нею для поліпшення розділення речовин, зниження межі їх виявлення, підвищення селективності.

Використання хімічної реакції часто позитивно впливає на метрологічні характеристики визначення речовини. Так, якщо морфін аналізувати у вигляді його триметилсилильного похідного, це приблизно в 3 рази зменшує межу виявлення, але й ідентифікацію цієї сполуки. Це пов'язано з тим, що перетворення вихідного полярного морфіну у його неполярне похідне призводить до різкого зменшення незворотної адсорбції сполуки в хроматографічній системі.

Застосування реакційної хроматографії дозволяє: поліпшити розділення речовин, розширити область застосування хроматографії шляхом переведення сполук, що не хроматографуються, у сполуки, які легко піддаються хроматографії та полегшити ідентифікацію сполук.

Адсорбенти. Основний адсорбент – кремнезем (силікагель), Al_2O_3 , вуглецеві адсорбенти, полімери, що утримують іоногенні, комплексоутворюючі групи або групи, здатні до специфічної взаємодії з біологічно активними речовинами. Розмір часток силікагелю в аналітичних колонках 3-10 мкм, у препаративних – 20-70 мкм. Малий розмір часток

збільшує швидкість масообміну і підвищує ефективність колонки. Сучасні аналітичні колонки довжиною 10-25 см, заповнені силікагелем з розміром частинок 5 мкм, дозволяють розділити складні суміші з 20-30 компонентів.

Останнім часом розроблені механічно міцні густосітчасті полімерні сорбенти макропористої структури, що наближаються за своєю ефективністю до силікагелів. Внутрішня структура частки силікагелю являє собою систему сполучених каналів. Для рідинної хроматографії використовують сорбенти з розміром пор 6-25 нм. Розділення у рідинній хроматографії проводять на модифікованих силікагелях.

1.10. Лігандообмінна хроматографія

Лігандообмінна хроматографія заснована на різній здатності розділювальних сполук утворювати комплекси з катіонами металів, пов'язаними з функціональними групами катіоніту. Залежно від того, локалізовані комплексоутворюючі катіони в нерухомій фазі або переміщуються разом з розділюваними компонентами в рухомій фазі, розрізняють хроматографію лігандів і лігандну хроматографію комплексів. У першому випадку ліганди утримуються внаслідок утворення змішаних сорбційних комплексів, що містять фіксовані групи нерухомої фази, у другому випадку комплекси розподіляються між фазами. У якості комплексоутворювачів використовують іони Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} та деякі інші лабільні комплекси, які легко обмінюють свої ліганди.

Рухомою фазою може бути будь-яка рідина, що координується слабкіше розділюваних лігандів, або газ. Компоненти аналізованої суміші елюються з такого модифікованого іоніту в порядку зменшення констант нестійкості їх комплексів.

У газовій лігандній хроматографії солі або комплекси перехідного металу розчинені в нерухомій фазі. Сорбентами служать катіонообмінні смоли, здатні втримувати катіони металів, що містять карбоксильні групи, або комплексоутворюючі смоли, зокрема з амінокислотними або імінодіацитатними фіксованими групами.

В лігандній хроматографії комплексів застосовують будь-які сорбенти, якщо вони забезпечують утримання розділювальних сполук. Утримання регулюють шляхом зміни рН рухомої фази, додаванням до неї органічних сполук або конкуруючих за координацію з металом лігандів, наприклад NH_3 . За допомогою лігандної хроматографії вдається виділяти та розділяти сполуки, здатні до координації з іонами металу, в присутності більшої кількості мінеральних солей і некоординуючих речовин.

За допомогою лігандної хроматографії можливо виділяти та розділяти сполуки, здатні до координації з іонами металів (наприклад з морської води виділяють вільні амінокислоти). На катіонітах розділяють феноли, цукри. На карбоксильних катіонітах розділяють аміни, азотвмісні гетероцикли,

алкалоїди. На силікагелі проводять аналіз сумішей амінокислот і пептидів. На декстранових сорбентах виділяють індивідуальні білки та ферменти.

Особливо ефективна лігандна хроматографія при розділенні ізомерів, у тому числі енантіомерів. На полістирольних сорбентах із групами оптично активних амінокислот, координованих з іонами Cu^{2+} , розділяють енантіомери амінокислот, гідроксикислот, аміноспиртів, діамінів, одержують препарати оптично активних амінокислот, мічені радіоактивними ізотопами. Швидке визначення енантеомерного складу сумішей амінокислот проводять за допомогою силікагелів із привитими групами.

1.11. Афінна хроматографія

Афінна хроматографія – різновид лігандної, являє собою один з найбільш специфічних методів виділення реакційноздатних речовин. Вперше запропонована в 1967 р. Поратом, Аксеном і Ернбеком.

Розділення за методом афінної хроматографії засноване на різного роду вибірковій (специфічній) взаємодії біологічно активних молекул суміші, що проходить через колонку (рухома фаза) з закріпленими (імобілізованими) на носії специфічними молекулами (лігандами) нерухомої фази, які хімічно пов'язані з інертним носієм (матрицею). Носієм служить гель типу агарози. Коли розчин, що містить виділювану речовину, пропускають через колонку з відповідним лігандом, взаємодія речовини з лігандом призводить до її концентрування. Специфічність ліганда основана на біологічному розпізнанні, тобто на спорідненості за біологічною функцією або індивідуальною хімічною структурою з одним компонентом суміші. Специфічна і зворотна взаємодія може бути між:

Фермент ↔ Субстрат або інгібітор

Антитіло ↔ Антиген, вірус, клітина

Агглютинін (лектин) ↔ Агглютиноген (полісахарид, глікопротеїн, рецептор клітини)

Нуклеїнова кислота ↔ Послідовність комплементарних основ, гістони, НК-полімерази, НК-зв'язуючі білки

Гормон, вітамін ↔ Рецептор, білок-носій

Глутатіон ↔ Глутатіон-S-трансфераза, гібридний білок

Механізм поділу. Активні центри багатьох біологічно активних речовин (наприклад, ферментів) часто локалізовані в середині глобули і недоступні для невеликих молекул, які є лігандами, безпосередньо пов'язаними з матрицею. Тому між матрицею та лігандом звичайно вбудовують додатковий блок – «спейсер» (рис. 1.20).

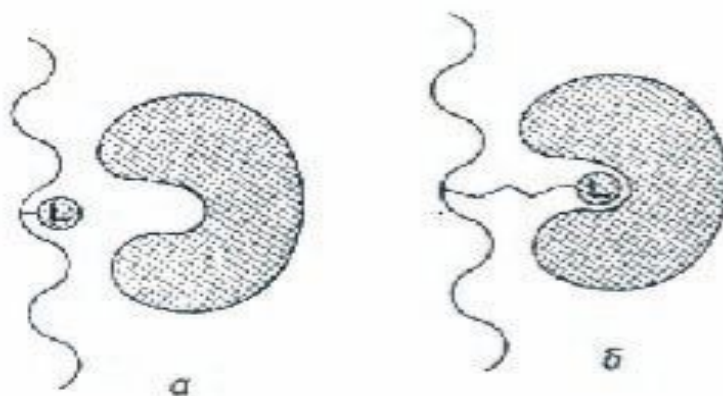


Рис. 1.20. Роль спейсера: *а* – ліганд фіксований безпосередньо на матриці і недоступний для активного центру; *б* – ліганд фіксований через проміжний «спейсер» і здатний взаємодіяти з активним центром.

Схематично механізм розділення в афінній хроматографії представлено на рис. 1.21. (крок 1, 2 та 3).

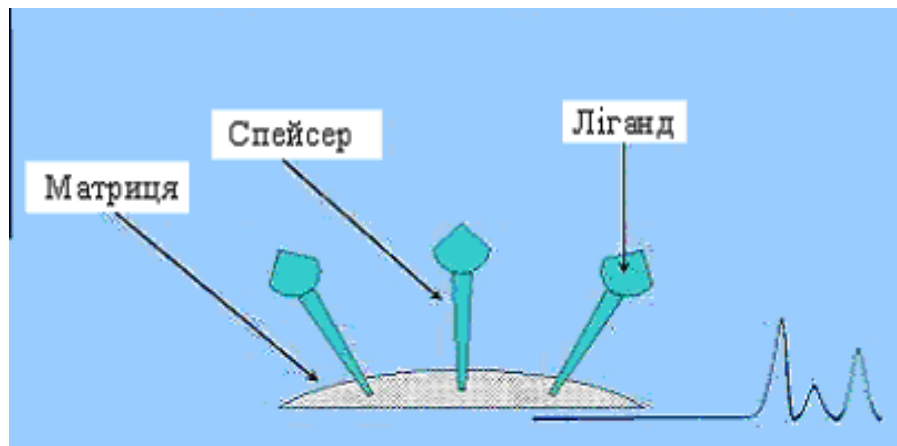
При пропусканні суміші через колонку, виділювана речовина зв'язується з лігандом і виходить з розчину (рис. 1.21, крок 2). Зв'язування засноване на рівноважній зворотній реакції: $L + S \leftrightarrow K$, де K – комплекс. Сорбція носить зворотний характер, при елюції комплекс руйнується і виділювана речовина переходить у розчин елюента (рис. 1.21, крок 3).

Ліганд повинен мати реакційноздатні функціональні групи, за допомогою яких здійснюється його зв'язок з матрицею і зберігати при цьому біоспецифічну активність. У таблиці 1.3 наведено комбінації функціональних груп лігандів та матриць, за яких проводиться іммобілізація.

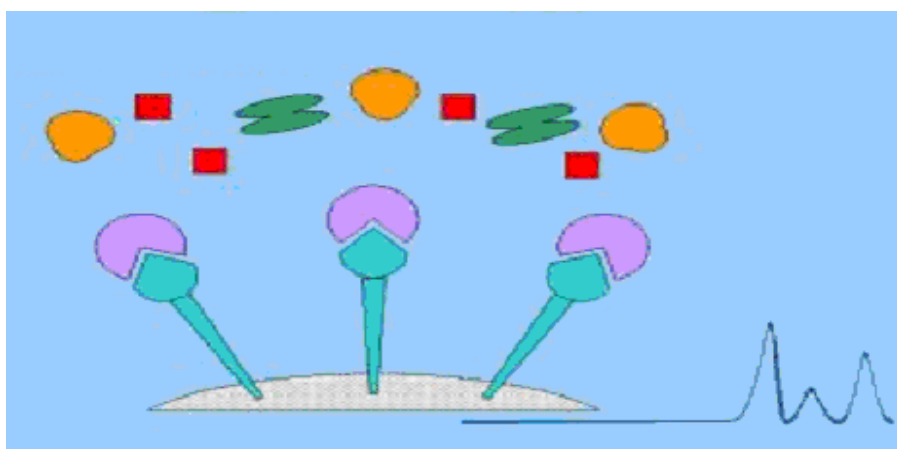
Таблиця 1.3

Можливі комбінації функціональних груп лігандів і матриць

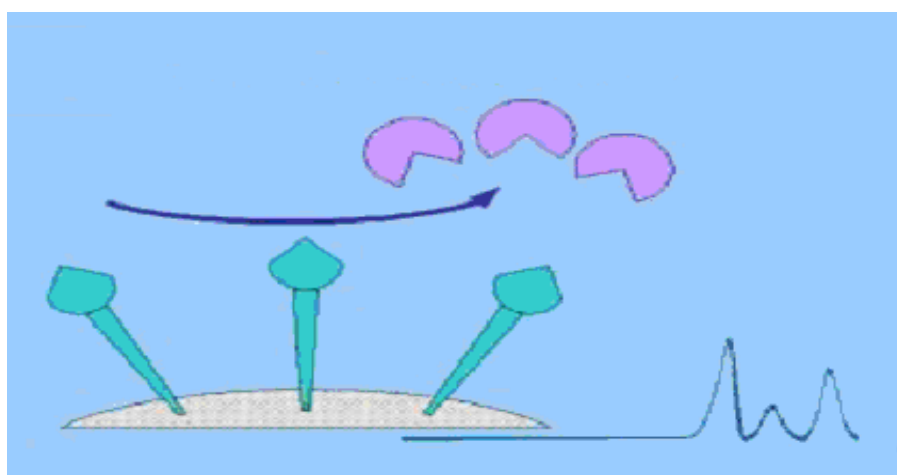
Ліганди	Функціональні групи	
	ліганди	матриці
Білки, пептиди	Аміно-	Карбокси-, імідокарбонатна-, епоксі-
Амінокислоти	Карбокси-, меркапто-	Аміно-, пропіл-тіо, епоксі-
Полісахариди	Гідрокси-, карбокси-	Епоксі-, аміно-
Полінуклеотиди	Аміно-	Імідокарбонатна, пропіл-тіо
Коферменти, кофактори	Аміно-, карбокси-	Карбокси-, аміно-, імідокарбонатна
Антибіотики, стероїди	Меркапто-, гідрокси-	Пропіл-тіо, епоксі-



Крок 1. Підготовка колонки для афінної хроматографії



Крок 2. Взаємодія біологічно активної речовини з закріпленим на сорбенті лігандом призводить до її утримання та концентрації. Оскільки така взаємодія є високоспецифічною, то до іммобілізованого ліганду приєднується тільки один компонент з суміші.



Крок 3. Елюція виділюваного компонента з колонки

Рис. 1.21. Механізм розділення в афінній хроматографії

Афінну хроматографію проводять у водних буферних розчинах, підбираючи оптимальні умови для кожного конкретного випадку. Можна створити такі умови (значення рН розчину або концентрації солі), при яких взаємодія виділюваної речовини з лігандом буде найбільш міцною.

У якості матриці-сорбенту використовують гелі агарози або поліакриламід з різними реакційноздатними групами, призначеними для взаємодії з лігандом. Вибір типу гелю визначається типами функціональних груп ліганда.

Елюють («знімають») речовину з колонки концентрованими розчинами специфічної або конкурентної речовини – *специфічна елюція* (рис.1.22), або концентрованими розчинами солі, розчинами зі зміненим рН, уведеними до складу елюенту детергентами, що послаблюють зв'язок між виділюваним компонентом і лігандом – *неспецифічна елюція* (рис. 1.23).

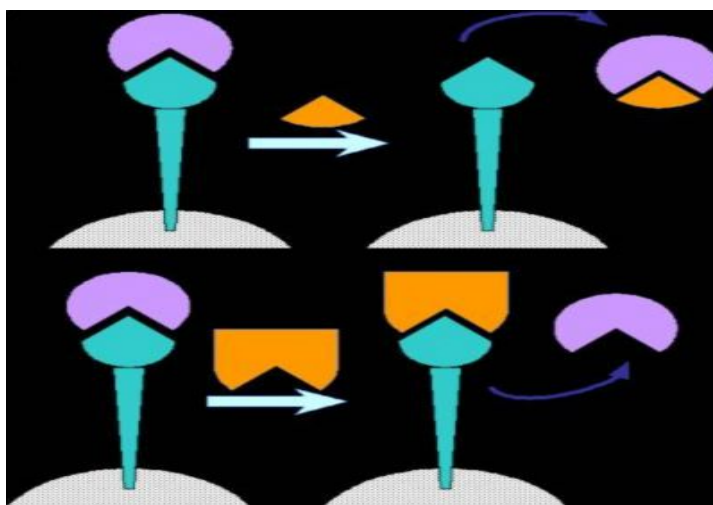


Рис. 1.22. Специфічна елюція

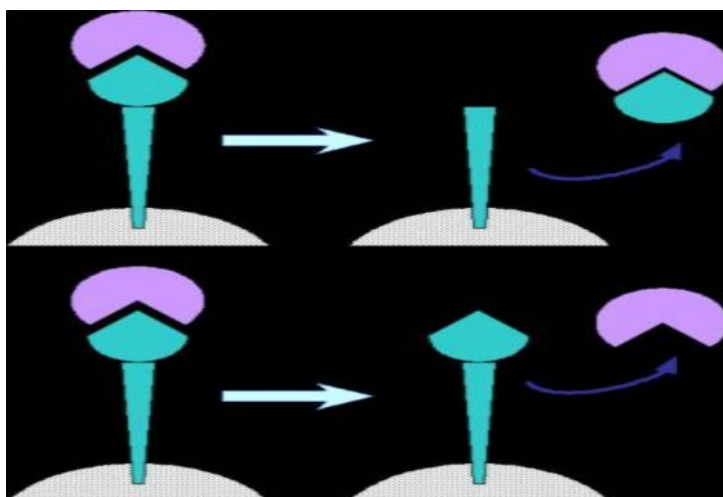


Рис. 1.23. Неспецифічна елюція

Вимоги до матриці хроматографічного сорбента:

1. Максимальна інертність.
2. Можливість до легкої ковалентної модифікації лігандом.
3. Стійкість до складу рухомої фази (рН, детергентів та ін.).

Вимоги до ліганда:

1. Повинен зберігати специфічність зв'язування з виділюваним компонентом в умовах елюції;
2. Забезпечувати зворотність зв'язування.
3. Ковалентне щеплення ліганду до сорбенту повинно витримувати багаторазове використання.

Вимоги до спейсера. На рис.1.24 показано, яким повинен бути спейсер. У першому випадку спейсер не має власної адсорбції і взаємодія цільового компонента з лігандом проходить нормально, у другому випадку спейсер виявився не стійким до рухомої фази і його елюція пройшла раніше цільового компонента.

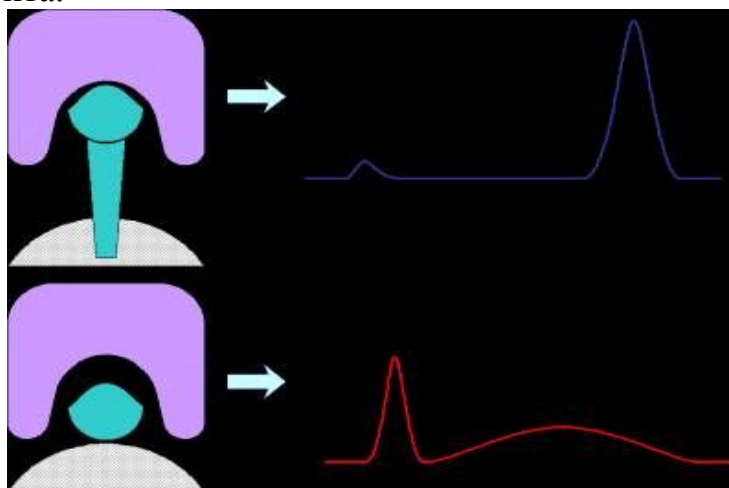


Рис. 1.24. Спейсер

Серед інших методів виділення речовин афінна хроматографія займає особливе місце, оскільки процес проходить вкрай специфічно з використанням біологічної активності виділюваних речовин. Ця особливість дозволяє концентрувати виділювані речовини з великих об'ємів.

Афінна хроматографія застосовується для виділення наступних класів речовин:

- ферментів (роль лігандів виконують субстрати, інгібітори, кофактори);
- субстратів та їх аналогів, інгібіторів, кофакторів (роль лігандів виконують ферменти);
- антигенів, вірусів, клітин (ліганди –антитіла);
- антитіл (ліганд – антигени);
- полісахаридів, глікопротеїнів, клітин (ліганди – лектини);
- гістонів, полімераз (ліганди – нуклеїнові кислоти);
- рецепторів лікарських засобів, білків-переносників (ліганди гормони, вітаміни);
- білків, специфічно взаємодіючих з мембраною клітини, лектинів (ліганди – клітини).

Цей метод особливо ефективний у біотехнології і фармації для виділення ферментів, білків, гормонів:

1. Виділення продукту безпосередньо з культуральної рідини.
 2. Високопродуктивне очищення ферментів. Афінна хроматографія не призводить до денатурації ферментів або втрати активності, тому є методом специфічного очищення. Спорідненість сорбенту до ферменту заснована, як правило, на специфічному зв'язуванні з активним центром.
 3. Очищення гібридних білків. Гібридний білок – це рекомбінантний попередник цільового білку, що має в складі особливу ДНК-кодовану послідовність амінокислот.
 4. Видалення з гідролізату ферментів класу серинових протеаз (тромбін, трипсин, зимоген).
 5. Виділення ДНК-з'єднувальних білків. ДНК-з'єднувальні білки – клас білків, які завдяки спорідненості до нуклеїнових кислот здатні до реплікації і орієнтації молекул ДНК та участі в транскрипції (ДНК-полімерази, активатори транскрипції, репресори, рестриктази).
 6. Очищення глікопротеїнів, гліколіпідів, полісахаридів. Гліколіпіди, глікопротеїни і полісахариди здатні зворотно зв'язуватися з лектинами, тому лектини можна використовувати як ліганди для іммобілізації сорбентів.
 7. Високою вибірковістю відрізняється так звана імуносорбція, при якій у якості ліганду використовують антитіла, що володіють специфічністю до виділюваного білку. Особливо ефективні моноклональні антитіла.
- Афінна хроматографія являє собою один з найбільш специфічних методів виділення цілих клітин, реакційноздатних сполук і навіть таких надмолекулярних агрегатів, як віруси.

1.12. Гель-хроматографія

Гель-хроматографія запропонована в 1959 р. Поратом і Флодином. Використовують різні назви: ексклюзійна, ситова, гель-проникна, гель-фільтраційна. Термін «гельпроникна хроматографія» або «гель-хроматографія» краще відображає суть процесу, підкреслює принцип розділення. Це один із видів рідинної хроматографії, де нерухомою фазою служать гелеподібні неіонні полімери, що вибірково втримують ті молекули з суміші, які здатні проникнути в пори гелю.

На відміну від інших варіантів хроматографії, де розділення іде за рахунок різних видів взаємодії компонентів суміші з поверхнею сорбенту, роль твердого наповнювача в ексклюзійній хроматографії полягає тільки у формуванні пор певного розміру, а нерухомою фазою є розчинник, що заповнює ці пори.

Утримання молекул у ексклюзійній колонці визначається імовірністю дифузії (проникнення) цих молекул в пори та залежить від співвідношення розміру молекул і пор. Молекули з найменшими розмірами (у тому числі й молекули розчинника), проникають в усі пори і тому рухаються через колонку найбільш повільно. На рис. 1.25. показано модель розділення молекул суміші за розміром в ексклюзійній хроматографії.

Розділення засноване на відмінностях у розмірах молекул: молекули малих розмірів проникають у порівняно тонкі пори сорбенту і затримуються в них. Усі молекули, розмір яких більше розміру пор сорбенту або не проникають у пори, або проникають лише в широкі пори і проходять по каналах між частками сорбенту з незначною затримкою. Молекули проміжного розміру, здатні проникати тільки в деякі пори, утримуються в колонці протягом часу відповідного їх розміру.

Поверхню сорбенту і склад елюента підбирають так, щоб виключити або зменшити енергію адсорбції. Компоненти елюють в порядку зменшення їх молекулярної маси. Змінюючи склад розчинника, можна змінити ступінь набухання гелю і розміри пор, що дозволяє проводити тонке розділення сумішей.

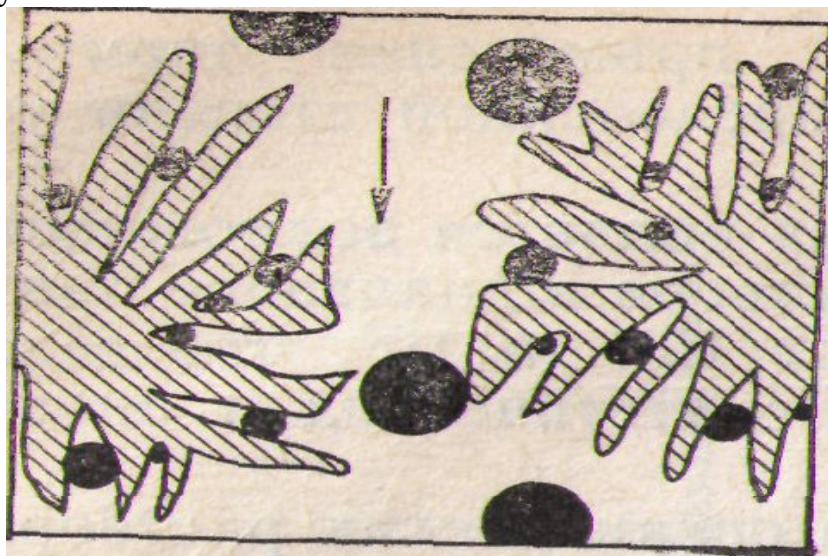


Рис. 1.25. Модель розділення молекул суміші за розміром в ексклюзійній хроматографії

Гідрофільні гелі, що використовуються як нерухома фаза, це желеподібні колоїдні розчини, у яких набухші частинки твердої фази рівномірно розподілені в рідкій фазі. Являють собою зшиті (декстрини з поперечним зшиванням, що називаються сефадексами) або лінійні агарозні гелі (сефароза, біогель А) полісахариди або синтетичні полімери (наприклад, поліакриламід) з відомим розміром пор, що визначають інтервал фракціонування водорозчинних молекул. Вихідним матеріалом для виробництва сефадексів є полісахариди, що утворився при вирощуванні бактерії *Leuconostoc mesenteroides* на середовищі з сахарозою. Цей полімер побудований винятково з залишків глюкози.

Тип сефадекса характеризується “величиною поглинання молекул води”, тобто кількістю води що припадає на 1 г сухого сефадекса у повністю набухшому гелі. Чим вище номер сефадекса, тим більшою гідрофільністю він володіє. Існує 8 типів сефадексів (табл.1.4), що розрізняються кількістю введених у матрицю гліцеринових зшивок. Чим більше зшивок, тим менший розмір пор у гранулах, тим менше набухає гель. Залежно від типу сефадексу буде по різному проходити розподілення молекул.

Типи сефадексів

Тип гелю (назва сефадексу)	Область розподілу за молекулярною масою, Дальтон
G-10	до 700
G-75	від 3000 до 80000
G-100	від 4000 до 150000
G-150	від 5000 до 300000
G-200	від 5000 до 600000

Цей вид хроматографії придатний не тільки для розділення, але й для оцінки молекулярної маси компонентів полідисперсних сумішей.

1.13. Іонообмінна хроматографія

Іонообмінна хроматографія – процес розділення, подібний до адсорбційної хроматографії, тому що затримка молекул речовини в нерухомій фазі обумовлена їх зв'язуванням з поверхнею твердого гідрофільного матеріалу суцільних або пористих гранул, які перебувають у контакті з рідким елюентом. Однак, у цьому варіанті така затримка відбувається не за рахунок молекулярної адсорбції, а в результаті електростатичної взаємодії різнойменно заряджених іонів.

Іонообмінна хроматографія заснована на *електростатичній взаємодії* між іонами протилежних зарядів при пропусканні розчину, що аналізується, через колонку, заповнену іонообмінною речовиною (іонітом). Необхідно щоб іони одного заряду були ковалентно зафіксовані на інертному носії.

На всіх зовнішніх і внутрішніх поверхнях твердих гранул уздовж ниток полімерів і гелів, що утворюють просторову сітку, більш-менш рівномірно розподілені ковалентно пов'язані із цими поверхнями іоногенні групи. У водному елюенті, що їх омиває, вони дисоціюють, утворюючи однойменно заряджені нерухомі іони. Якщо молекули компонентів суміші теж здатні іонізуватися при розчиненні, причому так, що їх сумарний заряд має протилежний знак, то вони зв'язуються з нерухомими іоногенними групами силами електростатичної взаємодії і стають фіксованими в нерухомій фазі. Цей зв'язок є зворотним: іони одних компонентів можуть замінюватися на інші або витіснятися іонними групами сорбенту, які перебувають в елюенті або спеціально вводяться в елюент. Відбувається обмін іонів, тому сорбенти описаного типу називають іонообмінниками (іонітами). Сильні кислоти або основи міцніше утримуються при аніоно- або катіонообмінному розділенні.

Іоніти являють собою нерозчинні неорганічні та органічні високомолекулярні сполуки, що містять активні (іоногенні) групи. Рухомі

іони цих груп здатні при контакті з розчинами електролітів обмінюватися на катіони або аніони розчиненої речовини. При промиванні іонообмінника розчином з більш високою іонною силою або іншим значенням рН сорбовані іони можна селективно перевести в розчин (*елюювати*).

У якості іонітів або іонообмінників застосовують різноманітні іонообмінні речовини – іонообмінні смоли. Іоніти діляться на катіоніти, здатні до катіонного обміну (містять активні групи: сульфогрупу $-\text{SO}_3\text{H}$, карбоксильну групу $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$), аніоніти, здатні до аніонного обміну (активні групи: аміногрупи з різним ступенем заміщення $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $\equiv\text{N}$, $=\text{NH}_2\text{OH}$, $\equiv\text{NHOH}$, здатні до обміну гідроксидіонів на різні аніони) і амфоліти – іонообмінні речовини, що володіють амфотерними властивостями.

Для досягнення оптимального розділення підбирають необхідну кількість іоніту. Перед аналізом іонообмінну колонку регенерують, тобто переводять іоніт, що заповнює колонку, у певну іонообмінну форму. Зарядження колонки з катіонітом (H^+ -іони) або аніонітом (OH^- -іони) проводиться пропусканням через колонку певної кількості кислоти або основи, відповідно.

Потім колонку відмивають водою від надлишку кислоти або основи і пропускають через неї аналізований розчин з певною швидкістю. Колонку промивають елюентом. Іони, сорбовані в колонці, елюють відповідним розчином. Сили взаємодії між молекулами в розчині та іонообмінником визначаються іонною силою елюента.

В іонообмінній хроматографії на ступінь утримання впливає три фактори:

- ступінь іонізації кислот або основ;
- заряд іонізованої молекули;
- здатність речовини мігрувати з водної рухомої фази, в нерухому органічну фазу, що залежить від молекулярної маси сполуки і її гідрофобності.

В якості іонообмінників використовують наступні матрикси:

- аніонообмінний сорбент (заряджений позитивно) – диетиламіноетил-целюлоза (ДЕАЕ-целюлоза);
- катіонообмінний сорбент (заряджений негативно) – карбоксиметил-целюлоза (КМ-целюлоза) і фосфоцелюлоза.

На рис. 1.26 наведено властивості аніоно- і катіонообмінників.

Аніонообмінник з ДЕАЕ має значну ємність при низьких і середніх значеннях $\text{pH}=1 - 6$; катіонообмінник із КМ має високу ємність при високих і середніх значеннях $\text{pH}=6 - 14$.

Поглинання іонів залежить від природи й структури іоніту, природи аналізованих речовин, умов проведення експерименту (температури, pH). Кожен іоніт здатний поглинати певну кількість іонів, тобто має певну ємність. Причиною розділення є різна здатність іонів аналізованого розчину до обміну.

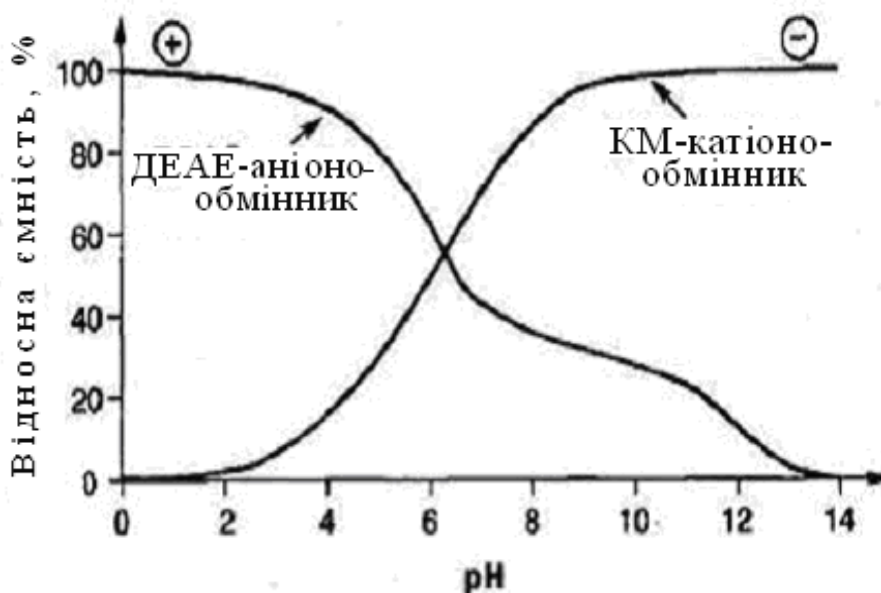


Рис. 1.26. Властивості аніоно- і катіонообмінників

Сильнокислі сульфокатіоніти та високоосновні аніоніти можуть використовуватися при будь-яких значеннях pH:

- слабокислі карбоксильні катіоніти – тільки при $\text{pH} > 6$;
- слабоосновні аніоніти перебувають в іонізованому стані при $\text{pH} < 8$.

Варіюючи pH елюента, можна змінювати ступінь іонізації компонентів розділювальної суміші (сорбатів) і, отже, час їх утримання, домагаючись необхідної селективності розділення (рис 1.27/ 3 a, b, c, d, e).

Багатозарядні іони утримуються іонітом сильніше однозарядних. При рівних величинах зарядів утримання падає зі збільшенням радіуса гідратованого іона. Тому при іонообмінній хроматографії у розбавлених розчинах на сульфокатіонітах, час утримання катіонів зменшується: $\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{UO}^{2+} > \text{Tl}^{+} > \text{Ag}^{+} > \text{Cs}^{+} > \text{Rb}^{+} > \text{K}^{+} > \text{NH}_4^{+} > \text{Na}^{+} > \text{H}^{+} > \text{Li}^{+}$.

Адсорбуюча здатність іонітів залежить від pH і pI поділюваних білків, від якості сорбенту, тиску в колонці. При низькому pH елюату іони компонентів не елюють з іонообмінника (рис. 1.27, 1a). При збільшенні pH іони з більшим радіусом першими елюювали з іонообмінника (рис. 1.27, 1б).

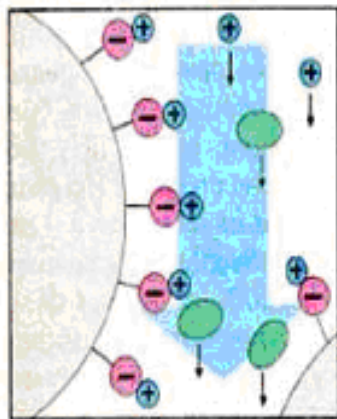
Іонний обмін – це фізико-хімічний процес, тому на коефіцієнт розділення впливають різні фактори:

- хімічні: pH розчину, природа поділюваних іонів, їх концентрація в розчині, схильність до гідратації, хімічний склад іоніту. Наприклад, зі збільшенням pH катіоніт збільшує обмінну ємність, а аніоніт зменшує;
- фізичні: швидкість протікання розчину через колонку, розмір зерен іоніту, висота колонки, температура розчину і т.д.

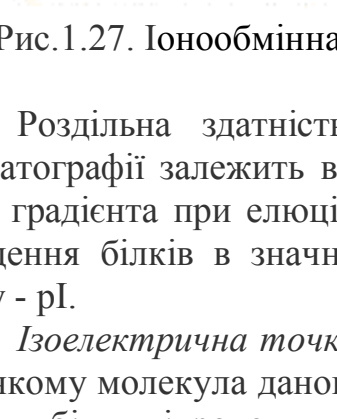
1. Основи методу



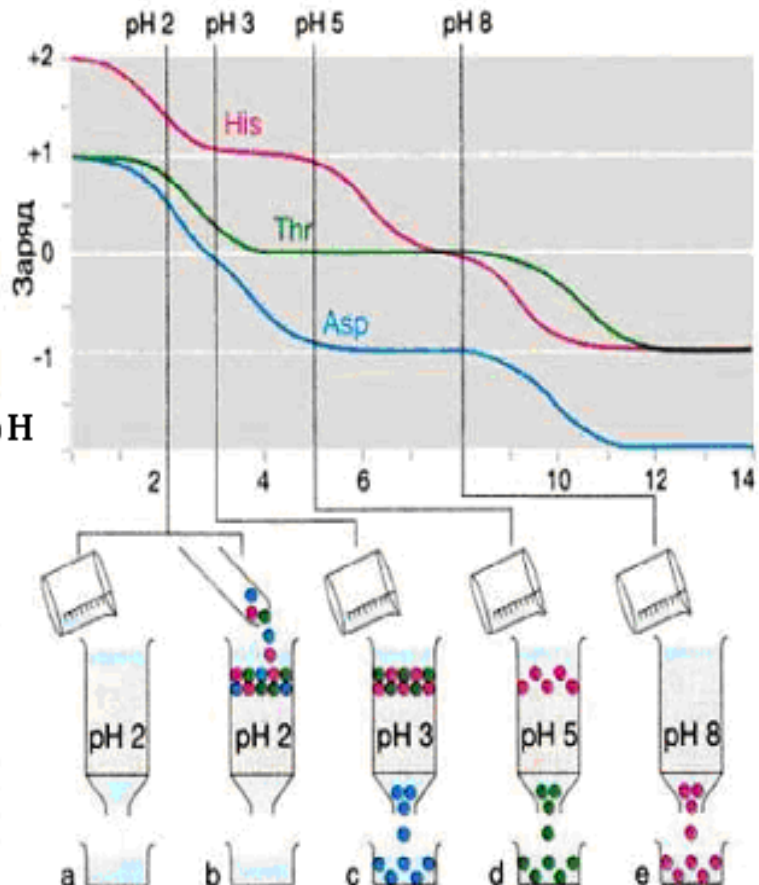
1а. Низькі значення рН



1б. Високі значення рН



2. Графіки дисоціації



3. Елюювання в ступінчастому градієнті рН

Рис.1.27. Іонообмінна хроматографія вільних амінокислот

Роздільна здатність хроматографічного розділення в іонообмінній хроматографії залежить від типу біомолекул, типу і якості сорбенту, іонної сили градієнта при елюції, температури. Вибір іонообмінного сорбенту для очищення білків в значній мірі залежить також від ізоелектричної точки білку - pI .

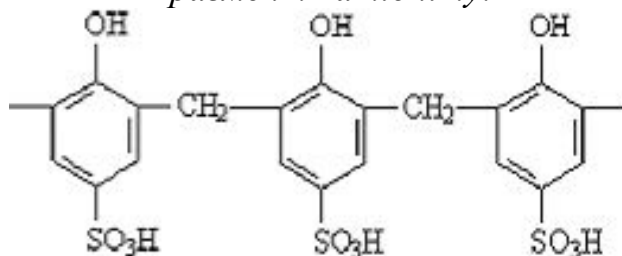
Ізоелектрична точка білку (pI) – це така кислотність середовища (pH), при якому молекула даного білка не несе електричного заряду. Чим більше в даному білку гідроксильних груп (основних залишків), тим вище pI . Білки з pI меншим за 7 називаються кислими, з pI більшим за 7 – основними.

При значеннях pH , що перевищують pI білку, його молекули мають негативний заряд і здатні адсорбуватися аніонним обмінником. При pH нижче pI – білок буде мати позитивний заряд і адсорбується катіонним обмінником.

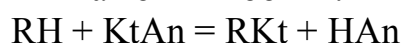
Наприклад, якщо $pI = 4$, то в більшості випадків доцільно підібрати сорбент, який здатний зв'язувати білок при $pH > 4$. Оскільки при $pH > 4$ такий білок заряджений негативно, то сорбент повинен бути аніонообмінником. При $pH < 4$ можна використовувати і катіонообмінник, але багато білків у таких умовах нестабільні, або утворюють агрегати. Якщо, навпаки, білок, який ми намагаємося очистити, має $pI = 10$, то він буде заряджений

позитивно в умовах, придатних, як правило, для іонообмінної хроматографії, тобто при рН близько 7. Таким чином, загалом, для білка такого типу необхідно вибрати катіонообмінний сорбент, який при нейтральному рН заряджений негативно. На рис. 1.28 показано фрагмент хімічної структури катіоніту та аніоніту.

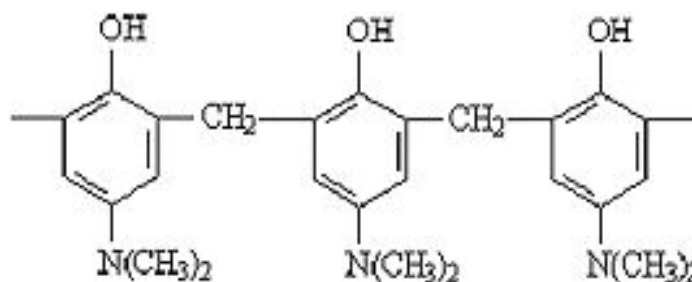
Фрагмент катіоніту:



Катіонний обмін:



Фрагмент аніоніту:



Аніонний обмін:

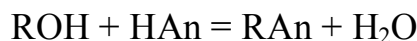


Рис. 1.28. Фрагменти катіоніту та аніоніту

В іонообмінній хроматографії елюентами звичайно служать буферні розчини, що відрізняються величиною рН, іонною силою, а також здатністю до утворення комплексів. Розділення іонів регулюють підбираючи оптимальне значення рН елюента і його іонної сили.

Селективність розділення в іонообмінній хроматографії залежить від концентрації та виду буферних іонів і органічних розчинників, а також від рН середовища.

В іонообмінній хроматографії застосовують наступні буферні розчини: ацетатний, фосфатний, цитратний, форміатний, аміачний, боратний.

Іонообмінне розділення проходить у межах температур 20 – 60 °С. Чим вища температура, тим менша в'язкість рухомої фази і тим ефективніше розділення, але при високій температурі стабільність колонки або зразка може бути порушена. Багато іонообмінників витримують температуру до 60 °С, а деякі полімерні катіонообмінники – до 80 °С. Біохімічні проби прийнято розділяти при низьких температурах, часто при 4 °С. В сучасній

високоєфективній рідинній хроматографії при швидких розділеннях імовірність руйнування зразка при 20-30 °С різко знижується.

Іонообмінна хроматографія застосовується для розділення катіонів металів, сумішей природних амінокислот. Білки і нуклеїнові кислоти розділяють за допомогою іонообмінної хроматографії на гідрофільних високопроникних іонітах на основі целюлози, декстранів, синтетичних полімерів, широкопористих силікагелів.

Амінокислотний аналіз. При розділенні амінокислот методом іонообмінної хроматографії в якості *нерухомої фази* використовують гранули синтетичного полімеру, що несуть сульфогрупи ($-\text{SO}_3^-$). Ці групи іонізовані у всьому діапазоні рН і мають негативний заряд. Для підготовки до роботи іонообмінник вносять у колонку і промивають Na^+ -утримуючим буферним розчином із рН 2. При цьому сульфогрупа зв'язує іони натрію. При нанесенні на колонку розчину амінокислот позитивно заряджені амінокислоти замінюються на іони натрію і сорбуються на іоніті. Оскільки амінокислоти не несуть заряду в ізоелектричній точці, їх елюють буфером з більш високим значенням рН.

Отже, амінокислоти елюються при величинах рН, значно нижчих від ізоелектричних точок, оскільки за зв'язування з іонообмінником конкурують Na^+ -іони буферного розчину.

На рис. 1.29 наведено схему автоматичного аналізатора амінокислот.

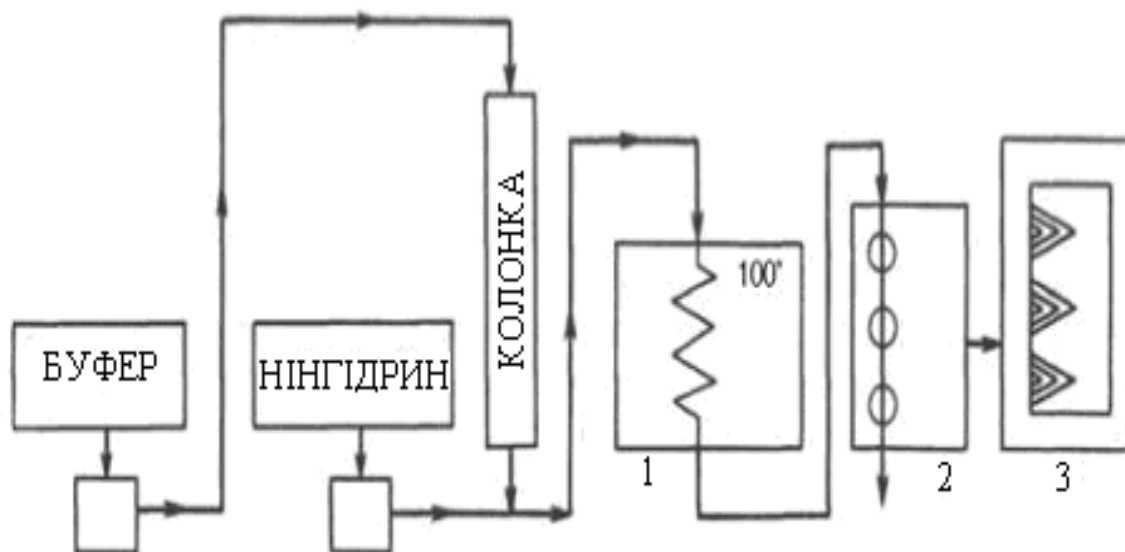


Рис. 1.29. Схема роботи автоматичного аналізатора амінокислот:
1 – змішувач; 2 – фотоелектроколориметр; 3 – самописець.

Автоматичні аналізатори амінокислот увесь час удосконалюються, підвищується чутливість методу і швидкість проведення аналізу. Сучасна високоєфективна рідинна хроматографія проводить аналіз гідролізату білку за 45 хв. Концентрацію амінокислот визначають у пікомолях.

На рис. 1.30 наведено хроматограму розділення амінокислот методом високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

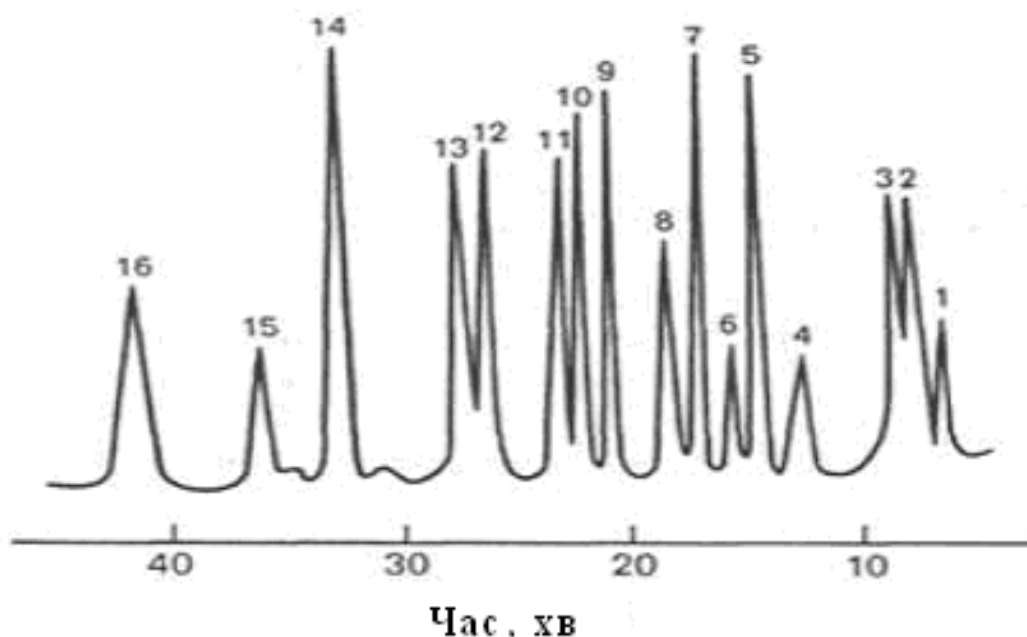


Рис. 1.30. ВЕРХ амінокислот. Розділення на колонці (3 x 250 мм), наповненій іонообмінною смолою – полістиролдивінілбензолом. Концентрація амінокислот 500 нмоль/л. 1 – Асп; 2 – Тре; 3 – Сер; 4 – Глу; 5 – Глі; 6 – Ала; 7 – Цис; 8 – Вал; 9 – Мет; 10 – Іле; 11 – Лей; 12 – Тир; 13 – Фен; 14 – Ліз; 15 – Гіс; 16 – Арг.

1.14. Високоєфективна рідинна хроматографія

Процеси рідинної хроматографії низького тиску протікають з швидкістю, яка залежить від розміру гранул. У звичайній рідинній хроматографії використовують сферичні гранули з широким діапазоном розміру (діаметром 20-300 мікронів). Ефективність колонки пов'язана з в'язкістю, коефіцієнтом дифузії та іншими фізичними властивостями рідин. Роздільна здатність обмежена неомогенністю матриксів, що викликає нерівномірне протікання розчинника через колонку.

Хроматографія на колонці особливо в'язких рідин – дуже повільний процес, оскільки їх проникнення через пористі носії під дією сили тяжіння дуже мале. Для прискорення процесу хроматографію проводять під тиском. Застосування тиску робить метод більш динамічним і ефективним, що відображається в назві – високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, англ. HPLC, *High performance liquid chromatography*) — один з ефективних методів розділення складних сумішей речовин.

Основою хроматографічного розділення є участь компонентів розділювальної суміші в складній системі Ван-дер-Ваальсових сил (переважно міжмолекулярних) на межі розподілу фаз.

Сили Ван-дер-Ваальса (рис. 1.31) – це найбільш універсальний тип зв'язку. Походження сил: в якийсь момент часу атом I має дипольний момент p_I . Цей дипольний момент утворює в центрі другого атому електричне поле E , яке у свою чергу наводить індукований дипольний момент у другого атома

p_2 . Показані два моменти часу t_a , t_b . Взаємодія (притягання) атомів залежить від відстані між ними: чим ближче атоми, тим міцніший зв'язок.

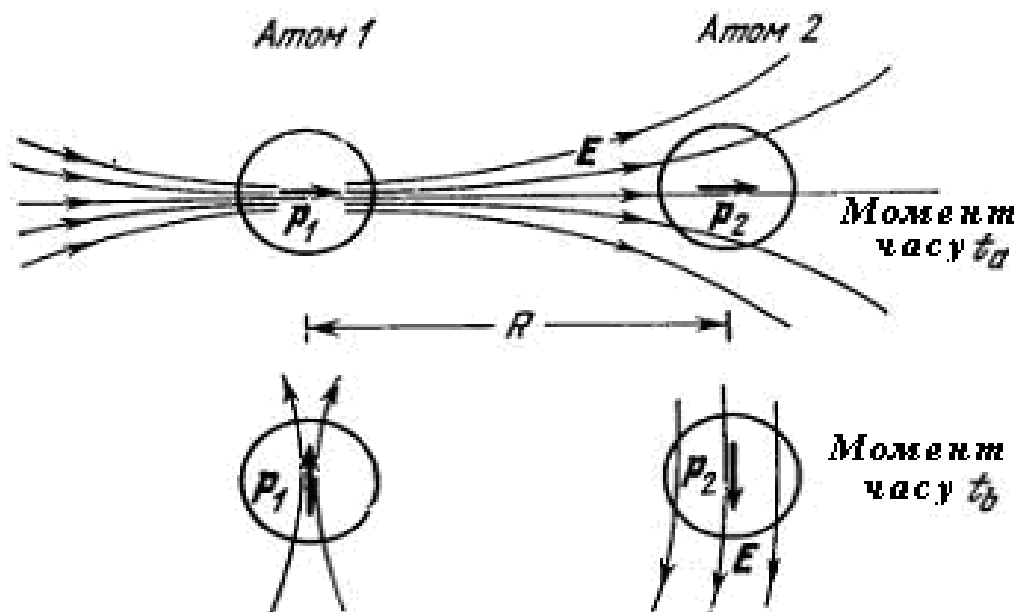


Рис. 1.31. Сили Ван-дер-Ваальса

Характеристики колонок.

- довжина від 100 до 250 мм;
- внутрішній діаметр від 1 мм (аналітичні) до 20-30 мм (препаративні);
- падіння тиску: переважно 40-60 атм.

Колонки виготовляють найчастіше з нержавіючої сталеві полірованої трубки, наповненої нерухомою фазою (наприклад, модифікованим силікагелем) і закритої з обох кінців перехідниками, що дозволяє підключати її до входної та вихідної ліній. Використовують також скляні колонки, вміщені в металічний кожух. Колонки витримують тиск порядку 150 атм.

Нормальним атмосферним тиском вважається тиск в 760 мм рт. ст. = 101 325 Па = 1 атм.

$$1 \text{ ат} = 9,81 \cdot 10^4 \text{ Па}$$

$$1 \text{ Па} = 1,02 \cdot 10^{-5} \text{ ат}$$

$$1 \text{ мм рт.ст} = 133 \text{ Па}$$

$$1 \text{ Па} = 7,50 \cdot 10^{-3} \text{ мм рт.ст.}$$

Оскільки частки носія в колонках для ВЕРХ упаковані дуже щільно, під час відсутності високого тиску швидкість потоку через них незначна. Тому такі колонки звичайно поміщають у сталеві циліндри, з'єднані зі складною системою насосів і шлангів, які забезпечують тиск, необхідний для високої швидкості протікання.

В умовах ВЕРХ відбувається швидке врівноважування розчинів із внутрішнім вмістом сфер малого діаметру, так що розчини, які володіють різною спорідненістю до матриксу, ефективно розділяються при високій швидкості потоку.

При роботі з цим видом хроматографії необхідно враховувати деякі особливості методики:

а) колонки для ВЕРХ наповнюють носієм з дуже малим діаметром частинок. У результаті при об'ємних швидкостях розчинника, які необхідні для швидкого розділення проби, на колонці створюється високий тиск;

б) детектори, що застосовуються у ВЕРХ, чутливі до флуктуації потоку і тиску елюента. Флуктуація – відхилення значення фізичної величини від середнього в певний момент часу;

в) процес хроматографічного розділення супроводжується рядом антагоністичних ефектів, так, наприклад, диспергування (тонке подрібнення) зразка в рухомій фазі веде до змішування компонентів суміші і знижує максимальну концентрацію речовини у її фракції, що проходить через детектор і потім виходить у вигляді піка. Диспергування спостерігається на всіх ділянках системи від місця введення проби до детектора;

г) розчинники, що виконують роль рухомої фази, часто здатні викликати корозію апаратури. Це, в першу чергу, відноситься до розчинників, що використовуються у обернено фазовій хроматографії, яка найчастіше застосовується у ВЕРХ в біохімії.

Детектори. Найчастіше застосовують ультрафіолетові детектори, тому що більшість органічних речовин поглинає світло при 210 нм (C=O) та 250 нм (ароматичні кільця). Порівняно дорогі є детектори-мас-спектрометри. Останнім часом розроблено хроматографічні системи, де детектування відбувається також ядерним магнітнорезонансним спектрометром.

Розмір пор сорбенту у ВЕРХ — один з найбільш важливих параметрів. Якщо пори дуже малі, погіршується проникність молекул суміші, що розділяється, а отже, погіршується сорбційна ємність. При використанні великих пор зменшуються механічна стійкість частинок сорбенту та сорбційна поверхня. Це приводить до зменшення ефективності колонки.

Відмінною рисою ВЕРХ є дрібнозернисті сорбенти – сферичні мікрочастинки (звичайно 3—5 мкм, аж до 1,8 мкм) з макропористих оксидів кремнію (силікагель), рідше алюмінію. Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко й повністю (середня тривалість аналізу від 3 до 30 хв). Використовують також органічні матеріали: пористий вуглець, полімери, такі як співполімери стиролу з дивінілбензолом, полістирол (зшитий дивінілбензолом) або поліметакрилат. При необхідності підвищеної гідролітичної стабільності матеріалу колонок використовують пористі оксиди цирконію або титану.

При розділенні низькомолекулярних сполук оптимальним вважається діаметр пор твердої матриці сорбенту 100-150 А; великі пори близько 300 А необхідні для розділення білків, нуклеїнових кислот і синтетичних макромолекул.

Щеплення нерухомої фази. Поверхню сорбентів на основі силікагелів звичайно піддають модифікації хімічним щепленням алкільних ланцюгів, які можуть містити і полярні функціональні групи. Використовується

пропілнітрильне (нітрильна нерухома фаза) або пропіламінне щеплення (амінна нерухома фаза).

Для підвищення хімічної стабільності матеріалу й запобігання розмивання хроматографічних зон за рахунок неконтрольованих взаємодій із залишковими сіланоольними групами останні блокуються обробкою триметилхлорсіланом.

Енд-кеппірування – захист неприщеплених ділянок сорбенту додатковим щепленням молекулами меншого розміру.

Гідрофобний енд-кеппінг: вища селективність, гірша змочуваність; гідрофільний енд-кеппінг (діол): нижча селективність, вища змочуваність.

Ідентифікацію компонентів у ВЕРХ можна проводити трьома способами:

- 1) використанням інформації про час утримання;
- 2) дослідженням зон, отриманих при розділенні в колонці рідинного хроматографа методами спектрального або хімічного аналізу;
- 3) безпосередньо підключити спектральний аналізатор до колонки.

Метод надзвичайно популярний для розділення як білків, так і малих молекул. За механізмом розділення аналізованих або розділювальних речовин ВЕРХ ділиться на адсорбційну, розподільну, іонообмінну, ексклюзійну, лігандообмінну та інші.

Більшість розділень, проведених методом ВЕРХ, засновані на змішаному механізмі взаємодії речовин із сорбентом. Механізми розділення в чистому виді на практиці зустрічаються досить рідко. Розділення ВЕРХ розглядають за перевагою того чи іншого механізму утримання речовин різної будови.

Метод ВЕРХ знаходить широке застосування в таких областях як хімія, біологія, біотехнологія, медицина, харчова промисловість, охорона навколишнього середовища, виробництво лікарських препаратів.

Адсорбційна ВЕРХ. Найбільше застосування у ВЕРХ знаходять адсорбенти із силікагелю з різним об'ємом та діаметром пор, тому що недостатня механічна міцність більшості інших адсорбентів не дозволяє впаковувати їх у колонку та використовувати при підвищених тисках, характерних для ВЕРХ.

Недоліки:

- тривалість процесів урівноваження адсорбентів з розчинниками, що містять воду в мікрокількостях;
- труднощі приготування таких розчинників з певною вологістю;
- недостатня відтворюваність параметрів утримання, селективності;
- неможливість використання градієнтного елюювання;
- часті випадки перегрупувань чутливих до каталізу сполук, їх розкладання, незворотна сорбція, яка призводить до накопичення речовин на початковій ділянці колонки, зміни природи сорбенту, підвищення опору колонки.

Розподільна ВЕРХ – це варіант ВЕРХ, у якому розділення суміші на компоненти здійснюється за рахунок відмінності їх коефіцієнтів розподілу між двома фазами, що не змішуються: розчинником (рухома фаза) та фазою на сорбенті (нерухома фаза) з використанням прищеплено-фазного сорбента.

Перші прищепленофазні сорбенти були отримані заміщенням силанольних груп, що перебувають на поверхні силікагелю, у результаті їх реакції зі спиртами або амінами. При цьому відщеплювалась вода, а залишки спиртів або амінів хімічно прищеплювалися до поверхні силікагелю. Ці сорбенти показали, що з їх використанням дійсно вдається одержати високу ефективність колонки при стабільності часу утримання. Однак, стійкість таких сорбентів в умовах застосування водних розчинників і навіть слабоосновних або кислих середовищ була низькою: фаза відщеплювалась хімічно за рахунок реакції гідролізу.

Надалі зусилля дослідників були спрямовані на пошук реагентів, щеплення яких протікало б досить швидко й повністю, а зв'язки, що утворювалися, були максимально стійкими. Такими реагентами стали алкілхлорсилани та їх похідні, що дозволили за подібною технологією одержувати щепленофазні сорбенти різного типу та різними (полярними або неполярними) групами на поверхні.

Складність технології щеплення реагентів і підготовки сировини й матеріалів призводять до того, що навіть отримані за однією технологією однієї фірми-виробника партії сорбентів можуть відрізнятися за хроматографічними характеристиками.

В **іонообмінній ВЕРХ** розділення компонентів суміші досягається за рахунок зворотної взаємодії речовин, що іонізуються, з іонними групами сорбенту. Речовини, що мають різну спорідненість до фіксованих зарядів, розділяються на аніонітах або на катіонітах. Аніоніти мають на поверхні позитивно заряджені групи й сорбують з рухомої фази аніони. Катіоніти, відповідно, містять групи з негативним зарядом і взаємодіють з катіонами.

Розділення конкретних речовин залежить у першу чергу від вибору найбільш підходящого сорбенту й рухомої фази. Колонки упаковують сорбентом з розміром зерен 5-10 мкм, при прокачуванні елюенту застосовують тиск до 10^7 Па.

У якості рухомої фази використовують водні розчини солей кислот, основ і розчинники типу рідкого аміаку, тобто системи розчинників, що мають високе значення діелектричної проникності. Елюцію проводять буферними розчинами, що дозволяє регулювати рН.

У якості нерухомої фази в іонообмінній хроматографії застосовують іонообмінні смоли й силікагелі із прищепленими іоногенними групами.

Іонообмінна ВЕРХ використовується для розділення сумішей нуклеотидів, нуклеозидів, пуринових і піримідинових основ та їх метаболітів у біологічних рідинах (плазма крові, сеча, лімфа та ін.), для діагностики захворювань.

Іонообмінну хроматографію можна застосовати для розділення будь-яких іонізованих сполук. Іонообмінна хроматографія незамінна при розділенні високополярних речовин. До них відносяться амінокислоти, пептиди, цукри.

Ексклюзійна ВЕРХ (гель-проникаюча, а у водних системах — *гель-фільтраційна*) являє собою варіант рідинної хроматографії, у якому розділення відбувається за рахунок розподілу молекул, що перебувають усередині пор сорбенту, і тими, що знаходяться між його частинками.

Принциповою особливістю методу є можливість розділення молекул за розміром в діапазоні практично будь-яких молекулярних мас — від 10^2 до 10^8 , що робить його незамінним для дослідження синтетичних біополімерів.

Обернено-фазова ВЕРХ має ряд переваг перед іншими варіантами рідинної хроматографії:

- це досить гнучкий метод, тому що змінюючи склад водоорганічних сумішей, які використовуються у якості рухомої фази, можна на одній колонці забезпечити розділення сполук різної природи;
- селективність даного методу майже завжди значно вища, ніж інших варіантів хроматографії для всіх сполук, крім дуже полярних;
- при використанні гідрофобізованих силікагелів швидко встановлюється рівновага між рухомою та нерухомою фазою, ці сорбенти відрізняються високою ефективністю розділення;
- можна здійснювати розділення сполук, розчинних як у воді, так і в органічних розчинниках;
- можливість використання в рухомій фазі буферних розчинів може поліпшити селективність і ефективність розділення іоногенних сполук.

В оберненофазовій хроматографії нерухомою фазою служать гідрофобізовані силікагелі, які одержують при обробці силікагелю хлор- і алкоксисиланом. Широко в аналітичній практиці використовують гідрофобізовані силікагелі із привитими октадецильними групами.

Механізм розділення сполук у цьому варіанті хроматографії пояснює теорія, що використовує теорію параметрів розчинності Гільдебранта, і сольвофобна теорія Хорвата-Міландера. За першою теорією, утримання визначається молекулярними взаємодіями розділювальних речовин з рухомою і нерухомою фазою.

Більш адекватно закономірності утримання сорбатів описує *сольвофобна теорія*, згідно якої водні елюенти, що не містять органічні розчинники, можуть бути використані для розділення полярних біологічних молекул на октадецилсилікагелі. Навіть за відсутності органічного компоненту в елюенті, взаємодія між розчиненою речовиною й прищепленими вуглеводневими радикалами нерухомої фази, була причиною утримання розчиненої речовини.

Існує принципова відмінність між процесами сорбції на полярних поверхнях з неполярних розчинників («нормально-фазовий режим») і сорбції з води або сильнополярних розчинників на неполярних поверхнях

(«обернено-фазовий режим»). У першому випадку, між молекулами сорбатів і нерухомих фаз утворюються асоціати за рахунок кулонівських взаємодій або водневих зв'язків. У другому випадку, причиною асоціації на поверхні є сольвофобна взаємодія в рухомій фазі. Для полярних рухомих фаз, що містять воду, характерною є сильна взаємодія й утворення водневих зв'язків між молекулами розчинників. Усі молекули в таких розчинниках пов'язані досить міцно міжмолекулярними силами. Для того щоб помістити в це середовище молекулу сорбату, необхідно утворення «порожнини» між молекулами розчинника. Енергетичні витрати на утворення таких «порожнин» лише частково покриваються за рахунок взаємодії полярних груп у молекулі сорбату з полярними молекулами розчинника. В аналогічному положенні стосовно розчинника перебувають і неполярні молекули нерухомої фази. З енергетичної точки зору більш вигідним є таке положення, коли поверхня розподілу між полярним середовищем (розчинником) і неполярними фрагментами нерухомої фази та молекул сорбату мінімальна. Зменшення цієї поверхні і досягається при сорбції (рис. 1.32).

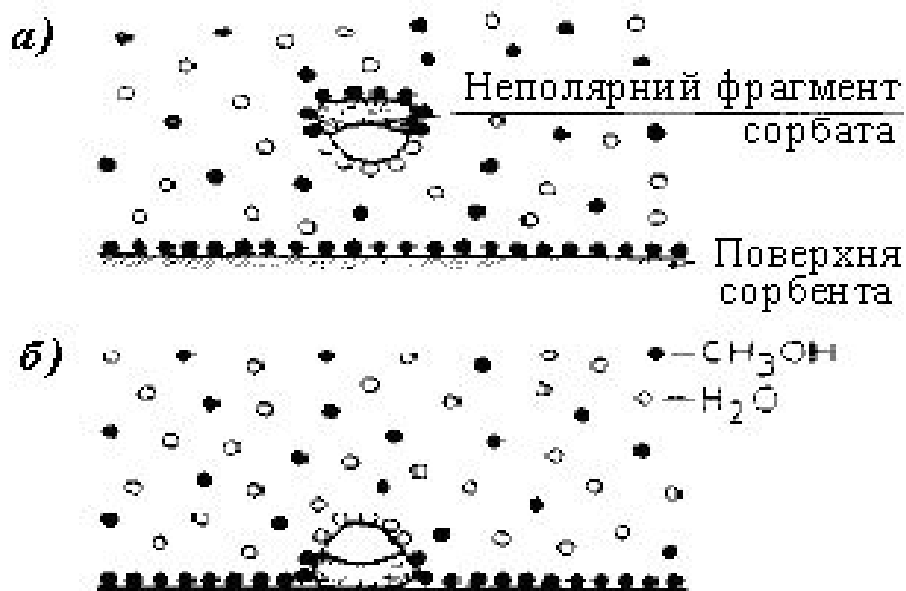


Рис. 1.32. До механізму зворотно-фазової хроматографії: а – сорбат в розчині; б – сорбат на поверхні нерухомої фази. Молекули води і органічного розчинника позначені світлими і темними крапками, відповідно.

У якості рухомої фази, зазвичай, використовують суміші розчинників, оскільки це дозволяє поліпшити селективність і ефективність розділення й зменшити час, необхідний для його проведення.

Змінюючи склад рухомої фази, можна регулювати час утримання в дуже широких межах. Майже для всіх аналізованих сполук час утримання в деяких чистих розчинниках (метанол, тетрагідрофуран) дуже малий, а в чистій воді надзвичайно великий, тому використовують суміші води з органічним розчинником – так званим модифікатором.

При постійних умовах хроматографії утримання різних сорбатів визначається наступними факторами:

- гідрофобністю сорбатів;
- дипольним моментом;
- об'ємом молекул;
- поляризованістю;
- зменшенням площі неполярної поверхні при сорбції.

Оберненофазова хроматографія широко застосовується не тільки для розділення нейтральних сполук, але й іоногенних речовин. Залежно від рН середовища змінюється співвідношення різних форм у розчині і фактори утримання.

Хіральна ВЕРХ. *Хіральність* (з грец. «рука») – здатність будь-якого об'єкта мати своє дзеркальне відбиття. Синонім — дисиметрія. Хіральні молекули також називають оптично-активними, оскільки вони по різному взаємодіють із світлом різної кругової поляризації. Однакові за хімічним складом та структурою молекули, які відрізняються хіральністю, називаються енантіомерами, або L (лівий) та D (правий)-ізомерами.

Хіральна хроматографія – це розділення, у якому хіральна нерухома фаза селективно втримує один з енантіомерів більш міцно, ніж інший. Для пояснення розділення оптичних ізомерів запропонований ряд моделей хірального розпізнавання, які в багатьох випадках засновані на моделі «трихточкової взаємодії», висунутої Далглішем в 1952 р. Згідно із цією теорією, для хірального розпізнавання необхідні три одночасних контакти між енантіомером і нерухомою фазою.

Високоєфективний хіральний сорбент одержують адсорбцією децил-L-гідроксипроліну або октиламіду L-гідроксипроліну на гідрофобній поверхні обернено-фазного силікагелю, модифікованого октадецилсіланом. Енантіомери амінокислот ефективно розділяють в елюентах оптично активні комплекси, що містять Cu^{2+} .

Нерухомі фази для хіральної ВЕРХ, поряд з високою селективністю розділення енантіомерів і універсальністю, повинні мати також як можна вищу ефективність. Сучасні хіральні нерухомі фази на основі силікагелю мають таку властивість. Нерухомі фази для хіральної ВЕРХ можна класифікувати за типом хірального селектора (табл. 1.5).

Найбільш універсальними в застосуванні є фази з хіральними селекторами на основі модифікованих полісахаридів (карбаматів і ефірів). Ці нерухомі фази одержують щепленням модифікованих полісахаридів на силікагельну основу.

Для розділення енантіомерів водорозчинних сполук широко застосовуються фази із прищепленими антибіотиками. Ці фази, спочатку були розроблені для розділення амінокислот, але розділяють велику кількість гідрофільних хіральних сполук.

Класифікація хіральних селекторів для нерухомої фази

Джерело	Тип селектора	Хіральний селектор
<i>Натуральні</i>	Протеїни	Альбуміни, глікопротеїни, ензими
	Олігосахариди	α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, γ -циклодекстрин
	Антибіотики	Ванкоміцин, тейкопланін, ристоцетин
	Алкалоїди	Хінін, хінідин
<i>Напівсинтетичні</i>	Модифіковані олігосахариди	Дериватизовані циклодекстрини
	Модифіковані полісахариди	Карбамати полісахаридів, складні ефіри полісахаридів
	Модифіковані низькомолекулярні природні сполуки	Іонообмінні селектори, похідні проліну та інших амінокислот (лігандообмінні селектори)
<i>Синтетичні</i>	Низькомолекулярні синтетичні сполуки	Піркловські фази (фази браш-типу)
	Синтетичні полімери	Зшиті тартраміді, поліакрилати і поліакриламіді, імпринтні матеріали

Рідше для розділення водорозчинних сполук застосовуються фази із прищепленими протеїнами. Недоліками таких фаз є невисока універсальність, ефективність і стабільність. У той же час, для деяких сполук, структура яких подібна зі структурою антигенів, фази із привитими протеїнами здатні проявляти неперевершену селективність.

Для нерухомих хіральних фаз із привитими протеїнами використовують BSA (бичачий альбумін), HAS (людський альбумін), AGP (α 1-глікопротеїн), OMCHI (овомукоїд яєчного білку), CBH I (целобіогідролазу I), пепсин.

Особливість хіральної хроматографії полягає в тому, що для успішного розділення адсорбат повинен взаємодіяти з адсорбентом принаймні в трьох точках. Інакше кажучи, в оптимальному варіанті повинна досягатися множинна взаємодія найбільш утримуваного енантіомеру з хіральною порожниною. Тільки в цьому випадку різниця в енергії адсорбції енантіомерів буде достатньою для їх хроматографічного розділення.

Хіральна рідинна хроматографія (chiral LC) застосовується для розділення й кількісного аналізу дзеркальних ізомерів (енантіомерів) оптично активних органічних сполук.

Оскільки різні енантіомери біологічно активних речовин мають різну дію на організм, хіральна хроматографія найчастіше застосовується для аналізу фармацевтичних препаратів і продуктів їх синтезу.

1.15. Хромато-мас-спектрометрія

Хромато-мас-спектрометрія – метод аналізу сумішей органічних речовин і визначення їх слідових кількостей у розчині. Метод оснований на комбінації двох самостійних методів – хроматографії і мас-спектрометрії. За допомогою першого здійснюють розділення суміші на компоненти, за допомогою другого – ідентифікацію речовини, кількісний аналіз.

Відомі варіанти хромато-мас-спектрометрії, що являють собою комбінацію мас-спектрометрії та газорідинної хроматографії або вискоефективної рідинної хроматографії. Перші дослідження аналітичних можливостей хромато-мас-спектрометрії були проведені в 1950-х рр., перші прилади, що поєднували газорідинний хроматограф і мас-спектрометр, з'явилися в 60-х рр.

Сумісність цих двох приладів обумовлена тим, що в обох випадках аналізована речовина перебуває в газовій фазі, робочі температурні інтервали однакові, межі виявлення (чутливість) близькі. Відмінність полягає в тому, що в іонному джерелі мас-спектрометра підтримується високий вакуум (10^{-5} – 10^{-6} Па), тоді як тиск у хроматографічній колонці 10^5 Па. Для зниження тиску використовують молекулярний сепаратор, який одним кінцем з'єднаний з виходом хроматографічної колонки, а іншим – з іонним джерелом мас-спектрометра.

Аналізована речовина в розчині вводиться у випаровувач хроматографа, де миттєво випаровується. Найбільш зручним для хромато-мас-спектрометрії є газ-носієвий гелій. Пари суміші з газом-носієм під тиском надходять у колонку, де відбувається розділення суміші, і кожен компонент з током газу-носія в міру елюювання з колонки надходить у молекулярний сепаратор. У сепараторі газ-носієвий віддаляється і збагачений органічною речовиною газовий потік надходить в іонне джерело мас-спектрометра, де молекули іонізуються. Число іонів пропорційне кількості речовини, яка поступає. Хроматографічні колонки повинні вміщувати важколеткі та термостабільні стаціонарні рідкі фази, щоб мас-спектр їх парів не накладався на спектр аналізованої речовини. Досліджувані речовини повинні бути термічно стабільні, хроматографічно рухливі в інтервалі робочих температур колонки, легко переходити в парову фазу при температурі випаровувача. Якщо речовини не задовольняють цим вимогам, їх можна хімічно модифікувати.

Хроматограму записують за допомогою встановленого в мас-спектрометрії датчика, що реагує на зміну повного іонного потоку. Одночасно із записом хроматограми в будь-якій її точці, звичайно на вершині хромато- графічного піка, реєструється мас-спектр, що дозволяє встановити будову речовини.

1.16. Електрохроматографія

Електрохроматографія — хроматографічний процес, при якому рух заряджених часток здійснюється під дією прикладеної напруги. Це фізичний метод, в основі якого лежить різниця у швидкостях пересування біомолекул в електричному полі. Швидкість руху часток визначається їх масою та зарядом. Метод застосовується в аналітичних дослідженнях при роботі з відносно невеликими кількостями речовин.

Біомолекули звичайно несуть сумарний позитивний або негативний заряд, обумовлений наявністю на їх поверхні позитивно або негативно заряджених груп амінокислот. Якщо білкові молекули помістити в електричне поле, вони починають переміщатися зі швидкістю, яка визначається їх сумарним зарядом, а також формою та розмірами.

Електрокінетичне явище переміщення часток дисперсної фази (колоїдних або білкових розчинів) у рідкому або газоподібному середовищі під дією зовнішнього електричного поля називається *електрофорезом* (відкритий професорами Московського університету П.І. Страховим і Ф.Ф. Рейссом в 1809 році).

Практичне застосування електрофорезу почалося після створення лауреатом Нобелівської премії шведським ученим А. Тиселіусом в 1937 р. спеціального апарату для фронтального (або вільного) електрофорезу білків у розчині. Метод заснований на відмінності у швидкості руху білків в електричному полі, яка визначається величиною сумарного заряду молекули білку при певних значеннях рН, іонною силою розчину та формою і розмірами молекул.

Розроблено модифікований метод електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН або SDS). При використанні даного методу білки мігрують в інертному матриксі (поліакриламідний гель з високим вмістом поперечних зв'язок). Звичайно гель готують полімеризацією мономерів безпосередньо перед використанням. Розміри пор гелю можуть бути підібрані для того, щоб гель міг сповільнити або прискорити міграцію молекул. При цьому білки перебувають у розчині, що містить потужний, негативно заряджений детергент – додецилсульфат натрію. Зв'язуючись із гідрофобними ділянками білкової молекули, цей детергент викликає розгортання білкових молекул у довгі витягнуті ланцюги. Кожна молекула білка зв'язує велику кількість молекул детергенту, здобуваючи сумарний негативний заряд. Тому білок,

після того як буде прикладена напруга, починає рухатися в напрямку позитивного електрода.

Білки одного розміру поведуться подібно, оскільки, по-перше, їх природна структура повністю зруйнована ДСН так, що їх форма ідентична, по-друге, вони зв'язують однакову кількість ДСН і здобувають однаковий негативний заряд. Великі білки, що володіють більшим зарядом, зазнають дії значних електричних сил і рухаються повільніше. У звичайних розчинах ці ефекти, як правило, взаємно погашаються, але в порах поліакриламідного гелю, що діє як молекулярне сито, більші молекули гальмуються значно сильніше, ніж менші, тому виявляються ближче до стартової лінії. Суміш молекул ділиться на ряд смуг, розташованих відповідно до їхньої молекулярної маси.

Для виявлення білків при електрофорезі в гелях їх обробляють одним з наступних барвників: бромфеноловим синім, амідочорним, кислотним синім, кумасі брильянтовим блакитним та ін. Інтенсивність фарбування та відповідно вміст кожної білкової фракції звичайно визначають денситометричними методами шляхом прямого сканування на *денситометрі*.

Гель-електрофорез має високу роздільну здатність. Якщо при електрофорезі білків сироватки крові людини на папері можна розділити всього 6 фракцій, то при електрофорезі в крохмальному гелі – 10, а в поліакриламідному гелі – до 18 різних білкових фракцій.

В останні роки стали застосовувати методи електрофорезу білків із градієнтом концентрації гелю, що значно підвищує роздільну здатність, особливо при фракціонуванні білків з високою молекулярною масою, що перевищує 50000 - 100000. Одним з найпоширеніших методів фракціонування білків та оцінки їх гомогенності є диск-електрофорез у поліакриламідному гелі, в якому використовують пари буферних розчинів з різними значеннями рН і різним ступенем пористості гелів.

Досить перспективними методами розділення білків виявилися різні варіанти методу ізоелектричного фокусування: ізотахофорез, засновані на проведенні електрофорезу в підтримуючих середовищах (на колонці або в тонкому шарі) із градієнтом рН. Точне місце розташування на колонці кожного білка із суміші визначається значенням його ізоелектричної точки, тобто таким значенням рН, при якому сумарний електричний заряд молекул даного білку дорівнює нулю. При використанні методу ізоелектричного фокусування застосовують суміші синтетичних поліамінополікарбонових кислот (амфоліни) для створення градієнта рН у діапазоні від 3,0 до 10,0.

Для фракціонування білків використовують різні комбінації ізоелектрофокусування та диск-електрофорез в поліакриламідному гелі: методи двовимірного електрофорезу, який дозволяє аналізувати сотні й навіть тисячі білкових фракцій. Результати при цьому одержують у вигляді «двовимірної» білкової карти. Цим методом можна розділити дисоційовані поліпептидні ланцюги.

Останнім часом широкого поширення набули методи зонального електрофорезу білків на різних носіях, зокрема, на твердих підтримуючих середовищах: гелях крохмалю та поліакриламіді, целюлозі.

Капілярний електрофорез – це метод аналізу складних сумішей, що використовує електрокінетичне явище міграції іонів та інших заряджених часток та електроосмос для розділення та ідентифікації компонентів (рис. 1.33).

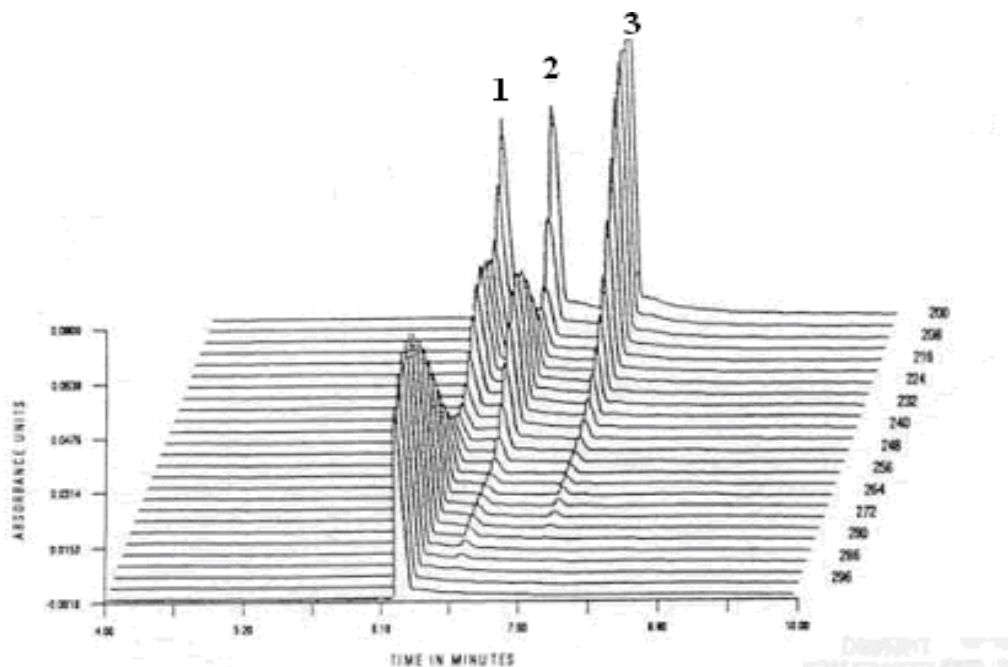


Рис. 1.33. Електрофорограма з розгорненням за довжиною хвилі:
1 - прокаїн; 2 - кокаїн; 3 – лідокаїн

Ці явища виникають у розчинах, розміщених в електричному полі високої напруги. Якщо розчин перебуває у тонкому кварцовому капілярі, то електричне поле, накладене уздовж капіляра, викликає в ньому рух заряджених часток і пасивний потік рідини, у результаті чого проба розділяється на індивідуальні компоненти, тому що параметри електроміграції специфічні для кожного виду заряджених молекул. Фактори протидії (дифузія, сорбція, конвекція та ін.) у капілярі суттєво ослаблені, завдяки чому досягається рекордна ефективність розділення.

Для багатьох сумішей капілярний електрофорез дозволяє одержати краще розділення порівняно з іншими стандартними методами.

Капілярний електрофорез має цілий ряд переваг:

- висока роздільна здатність;
- висока швидкість аналізу до 15 хв;
- можливість аналізу будь-яких речовин, незалежно від молекулярної маси, гідрофобності та заряду;
- мінімальний об'єм аналізованої проби.

Капілярний електрофорез завдяки гнучкості методу і широким можливостям знайшов широке застосування. Метод незамінний для контролю якості лікарських засобів і продуктів харчування (визначення

домішок та харчових добавок), при допінг-контролі, для поділу енантіомерів (це єдиний спосіб, що має велику роздільну здатність і економічність).

Визначення домішок в інсуліні. Людський інсулін є одним з перших комерційних продуктів біотехнології та генної інженерії. Інсулін, як кінцевий продукт, може містити сліди важких металів, захоплених протеїнами. Капілярний електрофорез – це найшвидший метод оцінки відносної чистоти інсуліну (рис. 1.34).

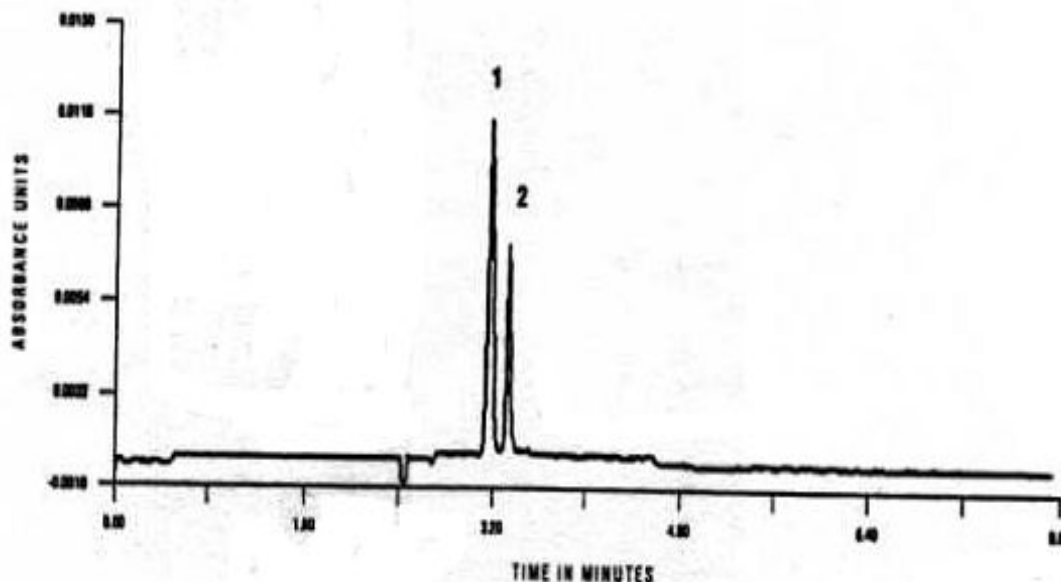


Рис.1.34. Електрофорограма інсуліну: 1 - інсулін; 2 – домішки.

Запитання для самоперевірки

1. У чому полягає суть методу хроматографічного розділення? Як оцінюють результати хроматографічного розділення?
2. Які є види хроматографії? З якою метою їх використовують?
3. У чому принцип роботи рідинного хроматографа?
4. Охарактеризуйте види газової хроматографії.
5. Які вимоги до сорбентів, що використовуються у хроматографічному розділенні?
6. У чому принцип дії хроматографічної колонки при розподільній хроматографії?
7. Які вимоги до розчинників, що використовуються у тонкошаровій хроматографії?
8. У чому переваги газорідинної хроматографії порівняно з іншими видами цього аналізу?
9. Охарактеризуйте метод надкритичної флюїдної хроматографії.
10. У чому особливість методу афінної хроматографії?
11. Порівняйте види вискоєфективної рідинної хроматографії.
12. Яким методом проводиться розділення амінокислот? З якою метою використовується гель-електрофорез?

2. ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ МЕТОДИ

Електрохімічні методи аналізу засновані на використанні електрохімічних властивостей аналізованих речовин.

До них відносяться:

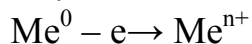
- *електрогравіметрія* – вимірювання маси речовини або її складових, які виділяються на електродах при проходженні постійного електричного струму через аналізований розчин. Різновидом цього аналізу є *метод внутрішнього електролізу*, заснований на використанні електричного струму, що виникає при зануренні в аналізований розчин двох електродів, які складають гальванічну пару. На принципах електролізу базуються вольтамперометрія, кулонометрія та електрогравіметрія; електроліз не використовують у потенціометрії та кондуктометрії;
- *вольтамперометрія* – вимірювання сили струму, що змінюється залежно від напруги в процесі електролізу, за умов, коли один з електродів має дуже малу поверхню. При полярографічних вимірах таким електродом є краплі ртуті, що випливають із дуже тонкого отвору капілярної трубки, а також платиновий, графітовий, срібний та інші електроди;
- *кулонометрія* – вимірювання кількості електричного струму, витраченої на електроліз певної кількості речовини;
- *потенціометрія* – вимірювання потенціалу електрода, зануреного в аналізований розчин, що змінюється в результаті хімічної реакції. Величина потенціалу електрода залежить від концентрації відповідних іонів у розчині при інших постійних умовах вимірювання;
- *кондуктометрія* – вимірювання електропровідності аналізованих розчинів, що змінюється в результаті хімічних реакцій і залежить від властивостей електроліту, його температури й концентрації розчиненої речовини;
- *полярографія* – використання явища концентраційної поляризації, що виникає на електроді з малою поверхнею при проходженні електричного струму через аналізований розчин електроліту.

Електрохімічні методи аналізу засновані на використанні електрохімічних процесів, що відбуваються всередині електролітичної комірки (являє собою електрохімічну систему, що складається з електродів, поміщених у розчини електролітів) і, залежно від процесів, що відбуваються в ній, може бути або *електрохімічною ванною* або *гальванічним елементом*.

Електрохімічною ванною називається система, у якій за рахунок прикладеного ззовні електричного струму відбуваються хімічні перетворення речовин на електродах. В електрохімічній ванні проводиться процес електролізу. Отже, *електролізом* називаються хімічні перетворення речовин під дією електричного струму. Для процесу електролізу необхідно, щоб на електродах ванни були досягнуті потенціали розряду (виділення) іонів, що перебувають у розчині електроліту. Тоді на катоді ванни будуть проходити процеси відновлення, наприклад:



а на аноді – процеси окиснення:



Основні закони електролізу, встановлені Фарадеєм:

1. Кількість перетвореної (відновленої або окисненої) у процесі електролізу речовини прямо пропорційна кількості електричного струму.

2. Маса різних речовин, виділених або розчинених при проходженні однакової кількості струму, пропорційні їх електрохімічним еквівалентам.

Електрохімічний еквівалент – це маса речовини, що виділилася на електроді (або розчинилася з електроду) в процесі електролізу при протіканні одиниці кількості електричного струму, тобто 1 кулона.

Суть законів Фарадея полягає в тому, що для виділення одного моля еквівалента будь-якої речовини в процесі електролізу необхідно витратити одну й ту ж кількість струму, яка дорівнює числу Фарадея ($F = 96500$ кулон/моль).

$$m = (Q / F) \cdot M / n, \quad (2.1)$$

де Q – кількість електрики (кулон), необхідна для виділення на електроді m грамів речовини з молярною масою еквівалента, рівною M / n (M – молярна маса речовини; n – число електронів, що брали участь в електродній реакції).

$$Q = I \cdot t, \quad (2.2)$$

де I – сила струму, А (ампер); t – час електролізу, с (секунда).

Наприклад, два платинові електроди опущені в скляну ємність, що містить 0,1 М водний розчин соляної кислоти. До електродів комірки підведений постійний струм необхідної напруги. Оскільки соляна кислота у воді дисоціює на іони H^+ і Cl^- , то до негативно зарядженого електрода (катода) будуть рухатися іони H^+ , до позитивно зарядженого електрода (анода) – іони Cl^- . Якщо прикладена ззовні напруга постійного струму забезпечує підвищення потенціалів розряду іонів H^+ і Cl^- , то на електродах комірки будуть проходити електродні реакції.

Очевидно, що внаслідок цих процесів щільність електронної хмари на аноді буде зростати, а на катоді – зменшуватися. Тому електрони від анода через металеві проводи зовнішнього ланцюга почнуть перетікати на катод, де будуть витрачатися на відновлення іонів водню.

Таким чином, у даній електролітичній комірці, що є електрохімічною ванною, проходження електричного струму забезпечується двома видами електропровідності:

- металевою провідністю провідників першого роду (платина, срібло, мідь, алюміній і т.п.), у яких електричний струм являє собою потік електронів, що переміщуються від негативного полюса до позитивного;
- електролітичною провідністю провідників другого роду (розчину електролітів), коли електричний струм проходить через розчин електроліту за рахунок руху іонів, що перебувають у ньому.

Гальванічний елемент. Через межу розділу фаз «метал – розчин електроліту» електричний струм проходить за рахунок електродних реакцій на катоді й аноді.

Аналогічна картина проходження електричного струму спостерігається і у гальванічному елементі. Необхідно відзначити, що гальванічний елемент є системою, яка протилежна електрохімічній ванні. Отже, гальванічним елементом називається система, у якій за рахунок хімічних перетворень речовин на електродах електролітичної комірки у зовнішньому ланцюзі виникає електричний струм.

Електричні параметри електролітичної комірки (сила струму, напруга, опір і т.п.) можуть слугувати аналітичними сигналами при проведенні аналізів, якщо ці сигнали вимірюються з достатньою точністю. Тому електрохімічні методи аналізу засновані на використанні залежності електричних параметрів комірки від концентрації, природи і структури речовини, що бере участь в електродній реакції або в електрохімічному процесі перенесення електричних зарядів між електродами.

2.1. Електрогравіметрія

Електрогравіметрія – електрохімічний метод кількісного аналізу, заснований на визначенні збільшення маси робочого електрода внаслідок виділення на ньому досліджуваного компонента в результаті електролізу. Як правило, досліджувану речовину осаджують у вигляді металу (або оксиду) на попередньо зважений платиновий катод (або анод). Момент завершення електролізу встановлюють за допомогою специфічної чутливої якісної реакції на цей іон. Робочий електрод промивають, висушують і зважують. За різницею мас електрода до і після електролізу визначають масу металу або оксиду.

Теоретично потенціал виділення металу на катоді можна розрахувати за допомогою величин стандартних електродних потенціалів.

Електрогравіметрія – селективний метод: при рівності вихідних концентрацій роздільне виділення на електроді можливе при різниці їх електродних потенціалів порядку 0,3 В (для однозарядних іонів), 1 В (для двозарядних іонів).

Електроліз можна проводити при постійній напрузі між електродами, при постійній силі струму або при контрольованому потенціалі робочого електрода.

У випадку електрогравіметрії при постійній напрузі відбувається зсув потенціалу робочого електрода у бік більш від'ємних величин за рахунок поляризації. Цей варіант електрогравіметрії застосовують для визначення відновлюваних речовин у присутності домішок, що відновлюються складніше, ніж іони H^+ .

Якщо проводити електроліз при постійній силі струму, необхідно періодично збільшувати зовнішню напругу, яка накладається на комірку, щоб

компенсувати зменшення струму, що викликається концентраційною поляризацією. Внаслідок цього аналіз стає менш селективним.

Значно більш висока селективність досягається у випадку проведення електролізу при контрольованому потенціалі робочого електрода. Звичайно потенціал робочого електрода вимірюють щодо третього електрода з відомим і постійним потенціалом, тобто електроду порівняння (насиченого каломельного або хлорсрібного).

Виділений на електроді осад повинен добре прилипати до нього, бути щільним і гладким для уникнення механічних втрат при промиванні, висушуванні та зважуванні.

2.2. Вольтамперометрія

Вольтамперометрія – це сукупність електрохімічних методів дослідження та аналізу, заснованих на вивченні залежності сили струму в електролітичній комірці від потенціалу зануреного в аналізований розчин індикаторного мікроелектрода, на якому реагує досліджувана електрохімічно активна речовина. Використовують два електроди: робочий поляризований електрод з малою поверхнею і неполяризований – індикаторний мікроелектрод (стаціонарний або обертовий), виготовлений з ртуті, срібла, золота, платини, вуглецевих матеріалів (наприклад, графіт), а також крапельні електроди з ртуті, амальгам галію). Останні являють собою капіляри, з яких по краплях витікає рідкий метал.

Теоретичні основи методу. Вольтамперометрія заснована на електродних реакціях, що протікають за рахунок прикладеного ззовні постійного електричного струму. В цьому методі використовується явище поляризації мікроелектрода, одержання та обробка вольтамперних (поляризаційних) кривих, що відображають залежність сили струму від прикладеної напруги. Аналітичним сигналом для кількісного аналізу в даному методі є сила струму, яка залежить від концентрації розчину електроліту.

Вольтамперометричний аналіз проводиться в електролітичній комірці полярографа, яка складається зі скляної посудини ємністю від 1 до 50 мл із зануреними в неї робочим і допоміжним електродами. Залежно від типу індикаторного електрода вольтамперометричні методи прийнято ділити на полярографію і, власне вольтамперометрію.

Якщо мікроелектродом є ртутна крапля – полярографічний метод; якщо метал (Pt, Au, Ag, Fe і т.п., а також графіт спеціальної обробки) – вольтамперометрія. У якості допоміжного електрода використовують шар ртуті з великою поверхнею або електроди порівняння (каломельний, хлорсрібний і т.п.). Електродами порівняння слугують звичайно електроди другого роду, наприклад каломельний або хлорсрібний. Для одержання вольтамперограми або полярографічної хвилі (рис. 2.1) вимірюють силу

струму, що проходить через комірку, і будують криву залежності сили струму від потенціалу V .

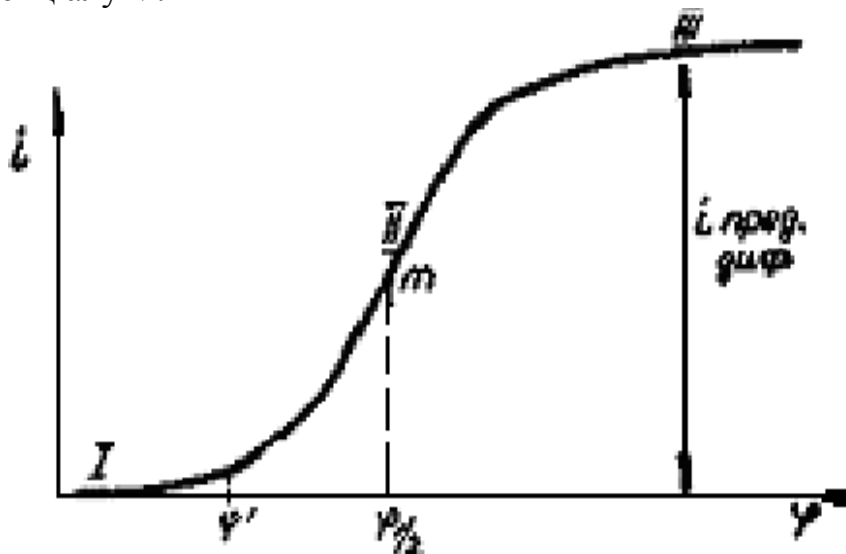


Рис.2.1. Полярографічна хвиля

При малих значеннях потенціалу іони аналізованої речовини не розряджаються на мікроелектроді, тому що потенціал їх розряду ще не досягнений.

Невеликий струм на ділянці I , обумовлений розрядом більш позитивних, ніж іони аналізованої речовини, домішок називається *залишковим струмом*. При подальшому збільшенні напруги досягається потенціал розряду досліджуваних іонів ϕ' , які починають розряджатися на робочому мікроелектроді. У результаті цього струм різко зростає (ділянка II) та збільшується до деякого граничного значення, і з подальшим ростом потенціалу його значення практично залишається постійним (ділянка III). Виникає граничний струм дифузії ($i_{пред.диф.}$). Ділянку збільшення струму називають хвилею. Хвилі можуть бути анодними, якщо електроактивна речовина окиснюється, або катодними – якщо відновлюється.

Полярографічна хвиля або полярограма містить важливу аналітичну інформацію. Для цього на полярограмі необхідно визначити величину *потенціалу півхвилі* $\phi_{2/1}$ та значення $i_{пред.диф.}$. Потенціалом півхвилі $\phi_{2/1}$ називається потенціал середини полярографічної хвилі (точка m). Потенціал півхвилі не залежить від концентрації аналізованих іонів, а залежить лише від їх природи. Величина $\phi_{2/1}$ служить якісною характеристикою полярографічно активної речовини, оскільки кожен іон має свій постійний потенціал півхвилі. Значення потенціалів півхвилі вказано у довідниках. Тому, знайшовши за табличними даними величину $\phi_{2/1}$, можна визначити іони якої речовини беруть участь в електрохімічній реакції на робочому мікроелектроді.

Відомі різні способи вольтамперометричного аналізу, засновані на одержанні та вимірюванні параметрів динамічної вольтамперної залежності (вольтамперограми).

Різницевий метод, заснований на вимірюванні різниці струмів двох комірок, в одній з яких знаходиться розчин, що не містить аналізованих компонентів.

Метод *циклічної вольтамперометрії* використовує лінійно мінливу поляризуючу напругу, яка завдяки ряду переваг (простоті реалізації, високій експресності та інформативності) широко застосовується для експрес-аналізу сполук речовин. Зміна напруги в негативному напрямку називається катодною, у позитивному – анодною. Розгортання може бути спочатку катодним, а потім – анодним, або навпаки. В обох випадках початковий напрямок розгортання називають прямим, а протилежний – зворотним. Вольтамперометричний аналіз полягає в одержанні динамічної вольтамперної залежності при прямому і зворотному напрямках циклічного розгортання поляризуючої напруги.

Циклічна вольтамперометрія дозволяє вивчати кінетику і механізм електродних процесів шляхом спостереження на екрані осцилографа одночасно вольтамперограм із анодним і катодним розгорненням потенціалу, що відображають електрохімічні реакції продуктів електролізу (рис. 2.2 та 2.3).

Нижня межа концентрацій, які визначаються цим методом, становить 10^{-5} – 10^{-6} М. Для її зниження до 10^{-7} – 10^{-8} М використовують удосконалені інструментальні варіанти – змінно-струмову і диференційну імпульсну вольтамперометрію. Вольтамперограми мають вигляд першої похідної звичайної вольтамперометричної хвилі. Висота піка на них пропорційна концентрації електроактивної досліджуваної речовини, а потенціал піка служить для ідентифікації цієї речовини.

Таким чином, по величині потенціалу півхвилі можна провести якісний аналіз досліджуваного розчину, а за значенням граничного струму дифузії – кількісний аналіз (визначити концентрацію розчину).

Вольтамперометрію застосовують:

- для кількісного аналізу неорганічних і органічних речовин у дуже широкому інтервалі вмісту – від 10^{-10} % до десятків %;
- для дослідження кінетики та механізму електродних процесів, включаючи стадію переносу електрона у хімічній реакції і т.п.;
- для вивчення будови подвійного електричного шару, рівноваги комплексоутворення в розчині та ін.

Аналізатори вольтамперометричні (полярографи) призначені для вимірювання масової концентрації елементів, аніонів і катіонів у воді, харчових продуктах, продовольчій сировині, напоях, біологічних об'єктах та інших матеріалах методом інверсійної вольтамперометрії відповідно до стандартизованих і атестованих методик аналізу.

Вольтамперометричними методами можна визначити домішки: ртуті (Hg), миш'яку (As), цинку (Zn), кадмію (Cd), свинцю (Pb), міді (Cu), заліза (Fe), селену (Se), сурми (Sb), олова (Sn), вісмуту (Bi), марганцю (Mn), кобальту (Co), нікелю (Ni), золота (Au), йоду (I), срібла (Ag).

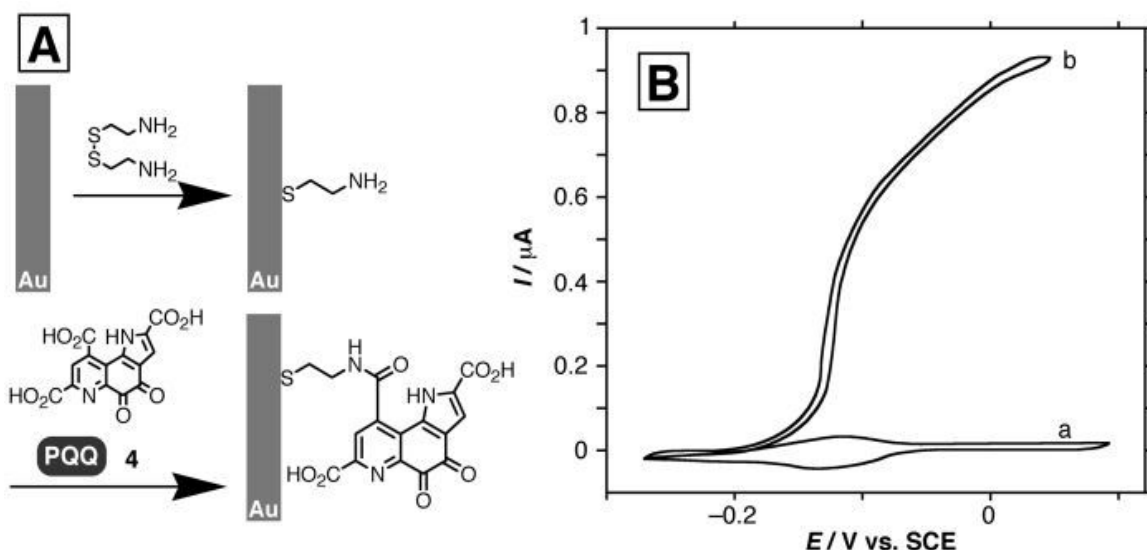


Рис. 2.2. Електрохімічні реакції продуктів електролізу. А – одержання модифікованого золотого електрода; Б – циклічна вольтамперограма на Au-елемоді (геометрична площа 0,2 см², у присутності: а – 0,1 М тріс-буфера, рН 8,0; б – 10 мМ НАДН та 200 мМ Са²⁺).

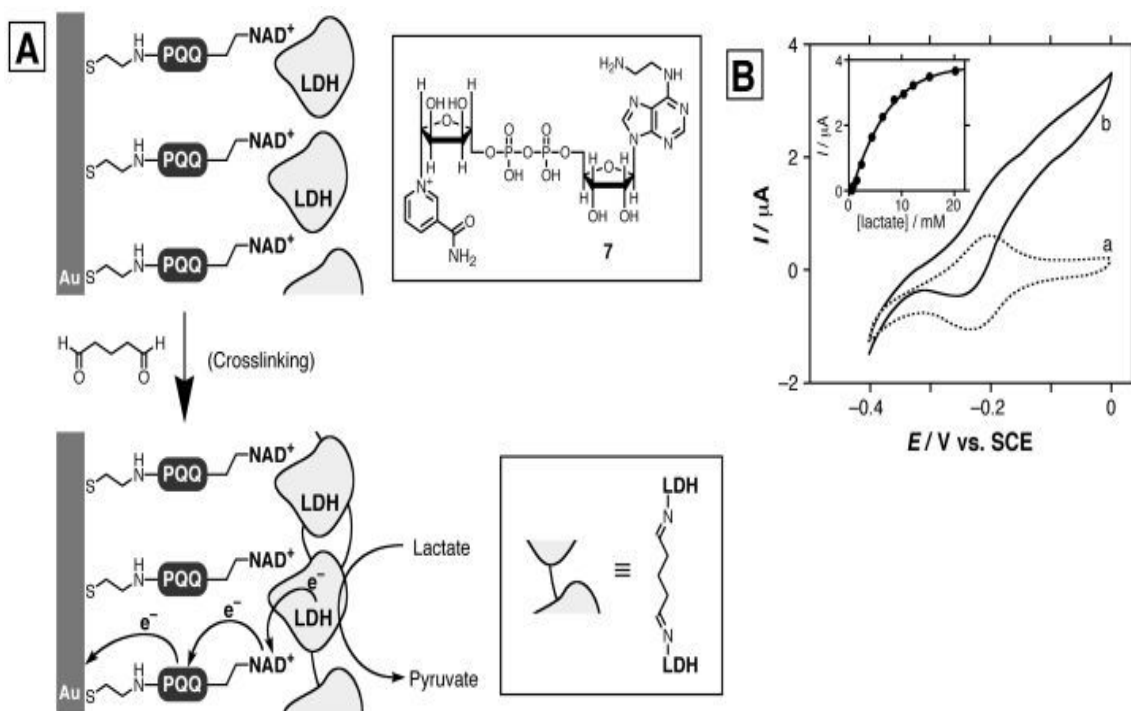


Рис. 2.3. Електрохімічні реакції продуктів електролізу. А – створення лактатдегідрогеназного моношарового електрода, що складається з лактатдегідрогенази та золотого електрода з нанесеним моношаром NAD⁺. Б – циклічні вольтамперограми. Геометрична площа близько 0,2 см²: а – у відсутності лактату; б – з лактатом, 20 мМ. Вимірювання в 0,1 М тріс-буферному розчині, рН 8,0, в присутності 10 мМ СаCl₂, в аргоні.

2.3. Кулонометрія

В основі кулонометричних методів лежать закони електролізу Фарадея:

$$M = \frac{A \cdot Q}{F \cdot n} \quad (2.3)$$

де M – кількість елемента, що визначається;

F – число Фарадея (98500 Кл);

A – атомна маса елемента;

n – кількість електронів, що приймають участь в електрохімічному перетворенні даного елемента;

Q – кількість електрики ($Q = I \cdot \tau$).

Розрізняють два основні види кулонометричних визначень – пряму кулонометрію і кулонометричне титрування. У методах прямої кулонометрії аналізована речовина зазнає електрохімічних перетворень безпосередньо в кулонометричній комірці. У методі кулонометричного титрування електролізу піддається допоміжна речовина, а далі продукт електролізу – титрант – реагує з досліджуваною речовиною. Кулонометричні визначення можуть проводитися при постійному потенціалі (*потенціостатична кулонометрія*) і постійній силі струму (*амперостатична кулонометрія*). У прямій кулонометрії широко застосовують потенціостатичні методи.

У методі кулонометричного титрування використовують установки з постійною силою струму. Вміст досліджуваної речовини розраховують за кількістю електричного струму, витраченого на генерацію необхідного для реакції з аналізованою речовиною кількості титранта. Кулонометричне титрування в значній мірі зберігає аналогію з іншими титриметричними методами. Основна відмінність полягає у приготуванні титранта. У звичайних титриметричних методах його заздалегідь готують за точними наважками або стандартизують за спеціальними настановними речовинами, а в методах кулонометричного титрування титрант генерується електрохімічним методом.

Визначення точки еквівалентності можна проводити потенціометричним, амперометричним, спектрофотометричним та іншими методами.

У кулонометричному титруванні використовуються хімічні реакції різних типів: кислотно-основні, окисно-відновні, комплексоутворення та ін.

Установка для кулонометричного титрування при постійній силі струму містить наступні основні вузли:

- 1) джерело постійного струму;
- 2) обладнання для визначення кількості електричного струму;
- 3) електричну комірку з генераторним електродом;
- 4) індикаторну систему для визначення закінчення титрування;
- 5) хронометр для визначення тривалості електролізу.

Індикаторна система слугує для індикації кінцевої точки титрування. Найчастіше з цією метою використовують амперометричний і

потенціометричний методи. У комірку вводять індикаторні електроди: два платинові (при амперометричній індикації) або платиновий і каломельний електроди (при потенціометричній індикації). Силу струму або різницю потенціалів вимірюють відповідними приладами. Іноді для визначення кінцевої точки титрування використовують фотометричний метод, поміщують комірку в кюветне відділення фотоелектроколориметра і вимірюють світлопоглинання в ході титрування. В окремих випадках закінчення титрування встановлюють візуально, наприклад, за появою забарвленого розчину, викликаного надлишком титранта. Промисловість серійно випускає кулонометричні титратори, у яких для індикації кінцевої точки титрування використовується амперометричний або потенціометричний методи.

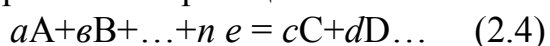
Кулонометричне титрування відрізняється більшою чутливістю, порівняно з іншими відомими титриметричними методами, і має ряд переваг:

- можливість визначення різних речовин у широкому діапазоні концентрацій;
- високою точністю і відтворюваністю;
- високою чутливістю (можна визначити 10^{-10} моль речовини);
- можливістю селективного визначення речовин у їх суміші.

2.4. Потенціометрія

Потенціометрія – це вимірювання електродних потенціалів, які залежать від активності іонів, а в розведених розчинах – від їх концентрації.

Потенціометрія — електрохімічний (електрометричний) метод дослідження та аналізу речовин, що базується на визначенні залежності між рівноважним електродним потенціалом φ та термодинамічною активністю a компонентів А, В і С, D (іони, молекули у рідкій, твердій або газовій фазі), які беруть участь в електрохімічній реакції:



де, a, b, c, d — стехіометричні коефіцієнти; n — кількість електронів, які беруть участь у реакції; e — заряд електрона.

Теоретичні основи методу. Пластинку металевого цинку внесемо в розчин сірчаноокислого цинку. Оскільки хімічний потенціал металевого цинку більший за його хімічний потенціал у розчині електроліту, іони цинку з металу переходять у розчин. Внаслідок цього на поверхні металевого цинку накопичуються електрони, вона заряджається негативно. У результаті іони цинку не дифундують у глибину розчину, а накопичуються біля поверхні металу. В остаточному підсумку досягається динамічна рівновага – скільки іонів перейшло в розчин, стільки ж повернулося з розчину в метал.

Таким чином, поверхня металу набуває негативного заряду, а шар електроліту, що прилягає до неї – позитивного. У результаті утворюється подвійний електричний шар. З електротехніки відомо, що якщо обкладки плоскопаралельного конденсатора заряджені різнойменно («+» і «-»), то між

ними виникає стрибок потенціалу. Отже, на межі поділу фаз «метал-розчин» також виникає стрибок потенціалу, який називається *рівноважним електродним потенціалом* (рис. 2.4.)



Рис. 2.4. Подвійний електричний шар цинку

Аналогічні процеси відбуваються і з металевою міддю, опущеною в розчин сірчаноокислої міді. Різниця полягає лише в тому, що поверхня металевої міді заряджена позитивно, а прилягаючий шар електроліту – негативно. Це є наслідком того, що хімічний потенціал міді в розчині більший за хімічний потенціал металевої міді. У результаті на останній адсорбуються іони Cu^{2+} , поверхня набуває позитивного заряду і притягує іони SO_4^{2-} .

Гальванічний елемент. З'єднаємо ємності з розчинами CuSO_4 , і ZnSO_4 електролітичним ключем, що представляє собою загнуту скляну трубку, заповнену електролітом, який добре проводить струм, наприклад, розчином KCl . Металеві електроди з'єднаємо проводами, приєднавши до них амперметр.

Розглянемо систему, у якій два електроди перебувають у розчинах власних іонів. Прикладом може слугувати гальванічний елемент Даніеля-Якобі, схему якого наведено на рис.2.5.

Гальванічний елемент Даніеля-Якобі складається із двох пластин: мідної (зануреної в розчин CuSO_4) і цинкової (зануреної в розчин ZnSO_4). На поверхні цинкової та мідної пластин виникає подвійний електричний шар і встановлюється рівновага, що характеризується певними значеннями електродного потенціалу.

Внаслідок більшої активності цинку з його поверхні відходить більше іонів і на поверхні металевої пластини виникає більший надлишок електронів. Тому при замиканні зовнішнього ланцюга, тобто при сполученні цинку з міддю металевим провідником, електрони будуть переходити від цинку до міді. У результаті цього процесу рівновага на цинковому електроді зміститься вправо, тому в розчин перейде додаткова кількість іонів цинку. У той же час рівновага на мідному електроді зміститься вліво і відбудеться розряд додаткової кількості іонів міді.

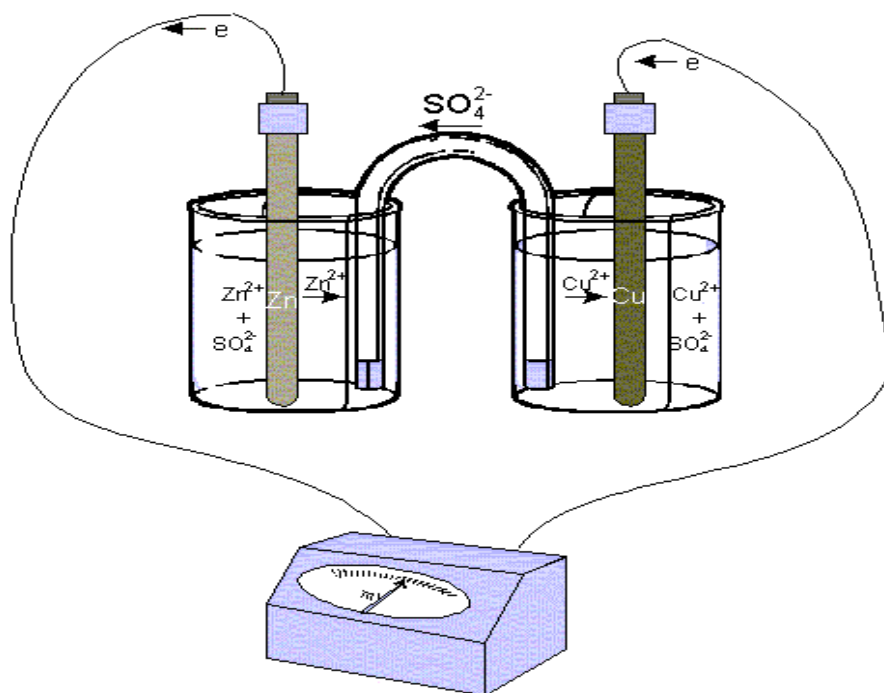
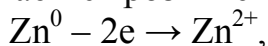


Рис. 2.5. Схема гальванічного елементу Даніеля-Якобі.

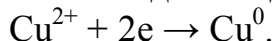
У результаті ми одержали гальванічний елемент Даніеля-Якобі, що складається із двох напівелементів, електролітичного ключа і зовнішнього ланцюга. Подібна система називається *гальванічним елементом з переносом*.

Електролітичний ключ відсутній, коли два різні електроди (наприклад, Cu і Zn) опущені в один розчин. Така система називається *гальванічним елементом без переносу*.

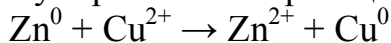
Оскільки гальванічний елемент є системою, зворотною електрохімічній ванні, катод у ньому має позитивний знак, а анод – негативний. На аноді відбувається розчинення цинку:



а на катоді – осадження міді:



Сумарна хімічна реакція має вигляд:



Гальванічні елементи бувають хімічні і концентраційні.

У потенціометрії, залежно від обставин, використовують гальванічні елементи з переносом і без переносу. При цьому застосовують два типи електродів: електроди порівняння та індикаторні.

Електродом порівняння називається такий електрод, потенціал якого не залежить від природи і концентрації розчинів. Тобто, потенціал електрода порівняння залишається сталим у різних розчинах різної концентрації.

Індикаторним електродом називається такий електрод, потенціал якого залежить від зміни концентрації іонів, якими обмінюється електрод з розчином. Індикаторні електроди бувають двох типів – металеві й мембранні.

Металевими індикаторними електродами називаються такі електроди, у яких на межі розподілу фаз «метал – розчин електроліту» протікають реакції за участю електронів. У якості індикаторних металевих електродів використовують платину, срібло, мідь, кадмій, свинець, тобто такі метали, які здатні до зворотніх напівреакцій. Потенціали цих металів відтворюються і повністю відображають активність їх іонів у розчині.

Мембранними, або іоноселективними, називаються такі електроди, у яких на межі розподілу фаз «електрод – розчин електроліту» протікають іонообмінні реакції. Іоноселективні електроди поділяють на чотири групи:

- 1) скляні електроди;
- 2) електроди із твердими мембранами;
- 3) електроди з рідкою мембраною;
- 4) електроди з газовими мембранами.

Серед іоноселективних електродів найбільшого поширення набув *скляний електрод*, призначений для визначення рН (рис. 2.6).

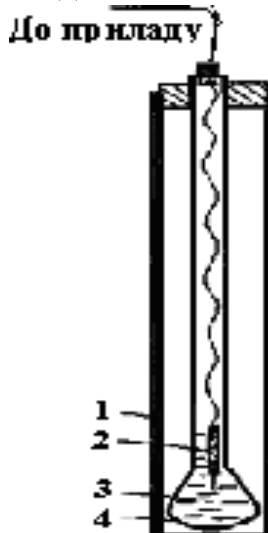


Рис.2.6. Складний електрод:

1 – захисна трубка; 2 – срібний дріт, покритий хлоридом срібла; 3 – 0,1 М розчин HCl, насичений AgCl; 4 – тонкостінна кулька.

Будова скляного електрода. До кінця товстостінної скляної трубки припаяна тонкостінна кулька 4, виготовлена зі спеціального рН-чутливого скла, яка і є мембраною. У середину кульки заливається 0,1 М розчин HCl, насичений AgCl (3). У розчин занурюють срібний дріт, покритий хлоридом срібла, який і є струмовідводом 2. До кінця струмовідводу припаяється провід, що підводиться до приладу. Пристрій закривається захисною трубкою 1. Перед початком роботи скляний електрод вимочується в 0,1 М HCl протягом 8 годин (інакше він не буде селективним відносно іонів водню). Іоноселективний електрод обмінюється з розчином тільки одним іоном, наприклад, лише іоном H^+ або іоном Cl^- , хоча в електроліті можуть бути присутні й інші іони. При цьому іони водню з розчину обмінюються на іони натрію зі скляної мембрани, і в системі встановлюється деяка рівновага.

Таким чином, потенціал скляного електрода обумовлений обміном іонів лужних металів, що перебувають у склі, з іонами водню розчину, тобто

не пов'язаний з переходом електронів. Природно, що зміна рН розчину змістить рівновагу, яка встановилася на склі між іонами водню та іонами лужного металу – потенціал скляного електрода зміниться.

Для виготовлення рН-чутливого скла використовують сполуки, які містять 22% Na_2O , 6% CaO , 72% SiO_2 . Скло такого складу може застосовуватися до рН 9. При більш високих значеннях рН мембрана стає чутливою до іонів лужних металів. Тому, крім скляних електродів, призначених для вимірювання рН, є спеціальні скляні електроди для визначення активності іонів Na^+ і K^+ .

Для визначення концентрації іонів у розчині електролітів також можуть бути застосовані електроди із твердими мембранами (рис. 2.7).

Іоноселективний електрод із твердою мембраною складається з мембрани 5, корпуса електрода 4, внутрішнього розчину (0,1 М розчини досліджуваного іона і хлориду калію) 3, внутрішнього напівелемента Ag/AgCl 2, місця приєднання проводу 1.

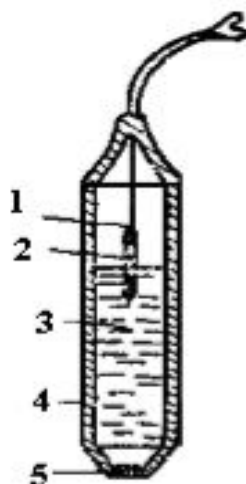


Рис.2.7. Іоноселективний електрод із твердою мембраною:

1 – місце приєднання проводу; 2 – внутрішній напівелемент Ag/AgCl ; 3 – внутрішній розчин; 4 – корпус електрода; 5 – мембрана.

У лабораторній практиці широко застосовують електроди з гомогенними мембранами, які чутливі до іонів F^- , Cl^- і Cu^{2+} . В якості твердих мембран використовують такі сполуки, як LaF_3 , $\text{AgCl}-\text{Ag}_2\text{S}$, $\text{Cu}_2\text{-XS}$. У цих сполуках у процесі перенесення заряду бере участь тільки один з іонів кристалічної решітки, що має, як правило, найменший іонний радіус і найменший заряд. У цьому випадку уніполярна провідність забезпечує високу вибірковість електрода.

Застосування електродів з рідкими мембранами засноване на тому, що на межі розподілу фаз між аналізованим розчином і рідиною, що не змішується з ним, виникає потенціал, обумовлений іонним обміном між двома цими рідинами. Таким чином, електрод з рідкою мембраною відрізняється від скляного електрода або електрода із твердою мембраною тим, що аналізований розчин відділений від розчину з відомою і постійною

активністю тонким шаром органічної рідини, що не змішується з водою. У якості електроактивних сполук в електродах з рідкою мембраною можуть бути використані хелати металів, іонні асоціати органічних катіонів й аніонів, комплекси з нейтральними переносниками.

Електроди порівняння. Для проведення потенціометричного аналізу, що полягає у вимірюванні електрорушійної сили (ЕРС) гальванічного елемента, необхідний напівелемент, потенціал якого був би відомий, постійний і зовсім не залежав від сполуки досліджуваного розчину. Напівелемент, що відповідає цим вимогам, називається *електродом порівняння*. Електрод порівняння зберігає практично постійним і відтворюваним свій потенціал, навіть при проходженні досить малих струмів у розчинах різних електролітів. Стабільність потенціалу електрода порівняння досягається підтримкою в контактуючому внутрішньому розчині постійної концентрації речовин, на які реагує електрод.

У потенціометрії найчастіше застосовують хлорсрібний і каломельні електроди порівняння.

Хлорсрібний електрод (рис. 2.8) є системою, що складається зі скляної посудини 1, усередині якої вміщений срібний дріт 2, покритий хлоридом срібла 3 і опущений в розчин хлориду калію 4, з досліджуваним розчином такий електрод контактує через азбестову тканину 5.

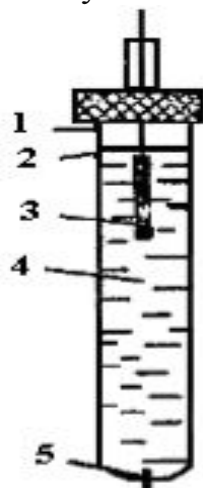
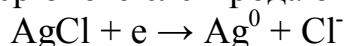


Рис.2.8. Хлорсрібний електрод порівняння:

1 – скляна посудина; 2 – срібний дріт; 3 – покриття із хлориду срібла; 4 – розчин хлориду калію; 5 – азбестова тканина.

Електродна реакція хлорсрібного електрода описується рівнянням:



Потенціал хлорсрібного електрода по відношенню до стандартного водневого електрода дорівнює $+0,1988$ при 25°C .

Потенціометричний метод аналізу заснований на вимірюванні потенціалу електрода, зануреного в досліджуваний розчин.

Способи знаходження кінцевої точки титрування. Основним завданням при потенціометричному титруванні є виявлення стрибка

потенціалу, що відповідає кінцевій точці титрування, і знаходження еквівалентної точки.

Величина потенціалу електрода, зануреного в досліджуваний розчин, пропорційна концентрації досліджуваних іонів у розчині. Електрод, за потенціалом якого судять про концентрацію досліджуваних іонів у розчині, називають *індикаторним електродом*. Потенціал індикаторного електрода визначають, порівнюючи його з постійною величиною потенціалу електрода порівняння. Звичайно в якості електрода порівняння застосовують нормальний водневий електрод або каломельний електрод.

Залежність величини потенціалу індикаторного електрода від концентрації розчину дозволяє встановити точку еквівалентності при титруванні, тому що в цій точці концентрація досліджуваного іона стає мізерно малою, що у свою чергу призводить до різкої зміни (стрибка) потенціалу (рис. 2.9). Отже, аналітичним сигналом даного методу аналізу є зміна електродного потенціалу в процесі титрування.

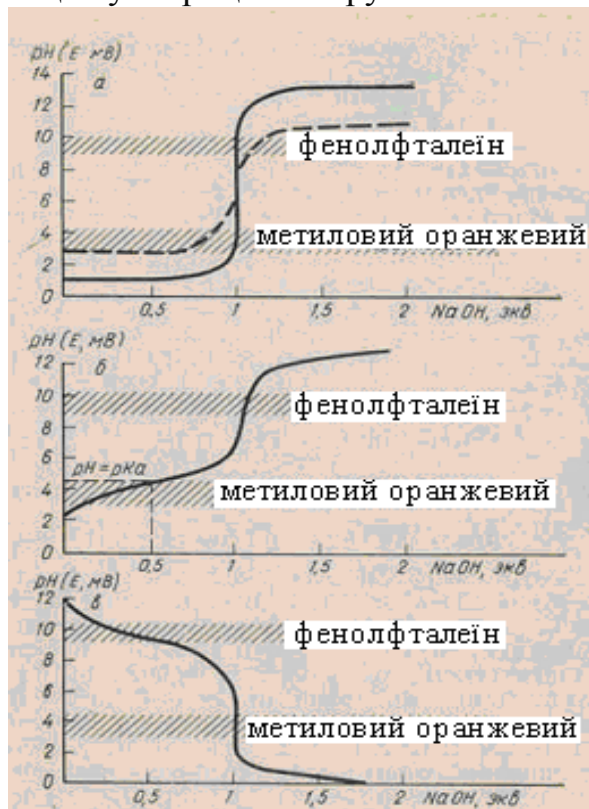


Рис. 2.9. Криві потенціометричного титрування: а – крива нейтралізації хлористоводневої кислоти їдким натрієм (10^{-1} та 10^{-3} н. розчини); б – крива нейтралізації оцтової кислоти їдким натрієм; в – крива нейтралізації аміаку хлористоводневою кислотою.

При визначенні концентрації речовини в розчині методом потенціометричного титрування необхідно мати на увазі наступне:

- чутливість методу визначається правильним вибором індикаторного електрода;
- величина стрибка потенціалу поблизу еквівалентної точки тим більша, чим вища концентрація досліджуваного розчину;

- величина стрибка потенціалу залежить також від константи іонізації слабкої кислоти або слабкої основи;

- у випадку титрування сумішей двох або більше речовин спочатку відтитровується речовина, що має більш високий ступінь іонізації та окисно-відновний потенціал;

- на початку титрування титрант можна доливати більшими порціями, а поблизу еквівалентної точки – однаковими порціями не більше 0,2 мл.

Потенціометричне титрування можна успішно використовувати для титрування забарвлених і мутних розчинів, слабких кислот і основ, сумішей кислот або основ, сумішей окиснювачів або відновників у неводних середовищах, для визначення рН досліджуваних розчинів і т.д.

Таким чином, метод потенціометричного титрування має ряд істотних переваг, порівняно з індикаторним методом.

2.5. Кондуктометрія

Кондуктометрія – це поєднання електрохімічних методів дослідження та аналізу речовин, що ґрунтуються на вимірюванні електричної провідності розчинів електролітів, яка пропорційна їх концентрації. Аналітична кондуктометрія поєднує прямі та опосередковані методи, кондуктометричне титрування.

Електрична провідність розведених розчинів пропорційна концентрації електролітів. Тому, визначивши електричну провідність та порівнявши отримане значення зі значенням на калібрувальному графіку, можна знайти концентрацію електроліту в розчині. Методом кондуктометрії, наприклад, визначають загальний вміст домішок у воді високої чистоти.

Прямі методи використовують у тих випадках, коли концентрація речовини, що аналізується у розчині, лінійно пов'язана з електричною провідністю розчину, а концентрації інших компонентів постійні. На методі прямої кондуктометрії базуються конструкції солемірів та інших кондуктометричних приладів, які дозволяють визначати різні солі в мінеральній, річковій та морській воді, фізіологічних розчинах. Пряму кондуктометрію використовують для контролю регенерації іонітів, очищення води, промивання осадів, для визначення чистоти органічних розчинників, газів, твердих солей тощо.

В опосередкованих методах, які дозволяють досліджувати суміші електролітів, кондуктометрію поєднують з іншими фізико-хімічними методами аналізу, що ґрунтуються, наприклад, на вимірюванні рефракції, рН, в'язкості, густини. Сукупність усіх експериментальних величин дає можливість визначати кількісний склад суміші.

Кондуктометричне титрування побудоване на зміні *електричної провідності* (χ) розчину при хімічних реакціях, що пов'язано зі зміною концентрацій іонів різної рухливості. Кондуктометричне титрування проводять у водних, водно-органічних та неводних середовищах. Криві титрування — це залежність χ від об'єму доданого реагенту (титранту) (рис.

2.10), який має злам у точці еквівалентності. При титруванні суміші електролітів кількість зламів дорівнює кількості компонентів, що визначаються, які реагують з титрантом.

Кондуктометрія може бути постійного чи змінного струму. В кондуктометрії постійного струму використовують контактні комірки, в яких електроди з Pt, Ti занурені у середовище, що досліджується. Електроди закріплюють таким чином, що відстань між ними не змінюється під час вимірювання. Для запобігання похибки від електродної поляризації досліджують розведені розчини. Для вимірювання χ розчинів з високою концентрацією електролітів (10^{-2} – 10^{-3} М) використовують платинові електроди з розвиненою поверхнею.

У кондуктометрії змінного струму низької частоти також використовують контактні комірки, але досліджують розчини в більш широких межах концентрацій.

На рис. 2.10 наведено форми кривих кондуктометричного титрування, яке може базуватися на різних реакціях. Графік титрування електропровідність – об'єм титранта звичайно має вигляд ламаної лінії, де точки перегину (зламу) відповідають точкам еквівалентності.

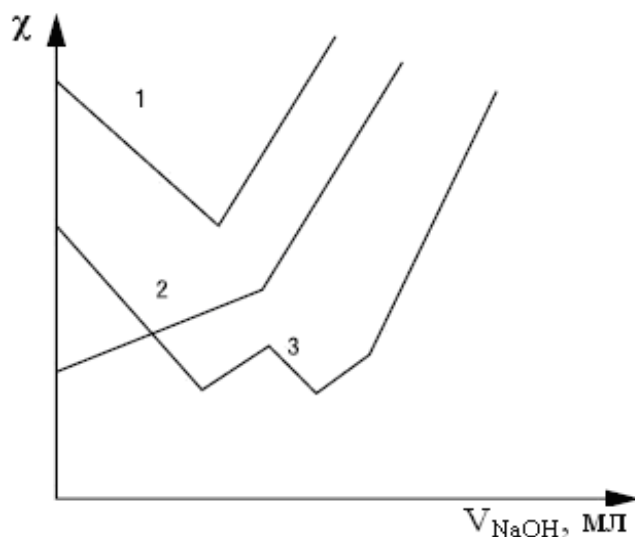


Рис. 2.10. Криві кондуктометричного титрування у контактній комірці розчином NaOH: 1 — HCl; 2 — CH₃COOH; 3 — суміші HCl + CH₃COOH + (C₂H₅)₃N•HCl + фенол.

Найчастіше використовують кислотно-основні взаємодії. Розроблено методи визначення у воді кислот та основ з $pK \leq 10$, солей слабких кислот та основ. При титруванні сильної кислоти сильною основою (крива 1), χ до точки еквівалентності знижується у зв'язку із заміною високорухомих іонів H^+ на менш рухомі іони титранту, а при титруванні слабкої кислоти сильною основою (крива 2) — χ до точки еквівалентності збільшується внаслідок дисоціації солі. При надлишку сильної основи після точки еквівалентності концентрація різко змінюється. При титруванні солей, χ до точки еквівалентності порівняно мало змінюється, оскільки рухомість іонів, які

замінюють один одного, близькі, тому можна проводити аналіз сумішей солей з кислотами та основами, які містять від 2 до 5 компонентів (рис. 2.10, крива 3).

Контактні методи мають високу точність. Їх використовують не тільки для хімічного аналізу, а й для вивчення кінетики реакцій, визначення констант іонізації (асоціації) електролітів, розчинності осадів, коефіцієнтів дифузії.

Переваги кондуктометрії: висока чутливість (нижня межа концентрацій, що визначаються, становить $\sim 10^{-4}$ – 10^{-5} М), простота методик, доступність апаратури, можливість аналізувати забарвлені та мутні розчини, а також автоматизація аналізу. Умовою застосування цього методу є істотна зміна електропровідності в момент досягнення точки еквівалентності. При титруванні аналізованої речовини стандартним розчином титранта у випадку утворення нерозчинної або малодисоціюючої сполуки електропровідність розчину знижується внаслідок зменшення кількості іонів у розчині. Найменша кількість іонів, а значить і найменша електропровідність розчину будуть у точці еквівалентності. Після досягнення цієї точки електропровідність знову почне зростати внаслідок надлишку титранта-електроліта.

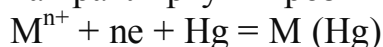
2.6. Полярографія

Полярографія – це метод аналізу, заснований на вимірюванні сили струму, що виникає при електровідновленні або електроокисненні досліджуваної речовини на мікроелектроді.

Полярографією називається електрохімічний аналіз речовин у розчинах або розплавах з використанням явища поляризації, найчастіше ртутного крапельного електрода.

Полярографічний метод має високу чутливість, що дозволяє проводити визначення дуже малих кількостей досліджуваної речовини. Рекомендований інтервал концентрації для дослідження становить 10^{-3} – 10^{-4} моль/л. Полярографія дозволяє одночасно проводити визначення кількох речовин без їх попереднього розділення. Тривалість визначення звичайно не перевищує декількох хвилин.

Полярографічний метод аналізу було запропоновано чеським ученим Я. Гейеровським в 1922 р. У цьому методі будують криву напруга – сила струму для комірки, яка має два ртутних електроди. Один електрод, що крапає, другий електрод – нерухомий, з великою площею поверхні. У комірку заливається аналізований розчин. При проходженні струму аналізований іон осаджується на краплі ртуті й розчиняється в цій краплі:



Напруга комірки визначається, насамперед, потенціалом електрода, що крапає, на якому виникає значна концентраційна поляризація, так як він має

невелику площу поверхні і, відповідно, високу щільність струму. Відновлення його іонів протікає в режимі граничного струму.

Потенціал ртутного електрода визначається природою іонів, що розряджаються, і струмом, що залежить від концентрації іонів.

Якщо до електродів, поміщених у розчин електроліту, прикласти різницю потенціалів і поступово її збільшувати, то при занадто малій різниці потенціалів струм практично не буде протікати через розчин. При досягненні різниці потенціалів певної величини (*потенціал розкладання*) сила струму різко зростає. При полярографічних визначеннях про хід електролізу досліджуваної речовини судять одночасно по силі струму в ланцюзі та напрузі. Отримана вольтамперна характеристика (рис. 2.11) використовується як для ідентифікації речовини, так і для визначення її концентрації.

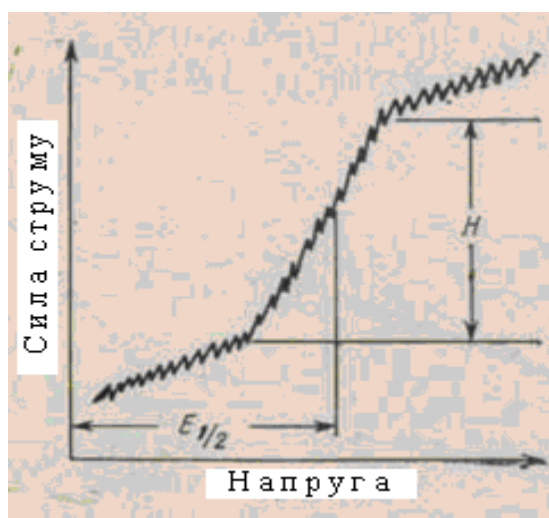


Рис. 2.11. Полярографічна (вольтамперна) крива:

$E_{1/2}$ – потенціал півхвилі; H – висота полярографічної хвилі.

Якщо взяти один з електродів з малою поверхнею (звичайно застосовують крапельний ртутний катод), а інший – з великою поверхнею, то при пропусканні через розчин постійного струму основна зміна концентрації буде спостерігатися в електрода з малою поверхнею. Це пояснюється великою щільністю струму на мікроелектроді. Для правильної інтерпретації вольтамперної кривої необхідно, щоб процесом, який лімітує швидкість електролізу, була дифузія аналізованої електроактивної речовини до електрода. У полярографії рух певних іонів зводиться до мінімуму за рахунок додавання великого надлишку (100-кратного) індиферентного електроліту, який називається фоном.

Поступове підвищення напруги призводить до зростання щільності струму на мікроелектроді. При цьому концентрація електроактивної речовини в приелектродному просторі стає меншою за його концентрацію в основній масі розчину, тому що швидкість його відновлення (або окиснення) на мікроелектроді більша швидкості його дифузії з розчину. У цьому випадку

подальше підвищення різниці потенціалів не викликає помітного зростання сили струму, що протікає через розчин (граничний струм). Якщо швидкість процесу в електролітичній комірни контрольюється дифузією, то сила струму пропорційна концентрації електроактивної речовини. Таким чином, при потенціалі розкладання тільки частина іонів, що досягають електрода, розряджається на його поверхні. При потенціалі півхвилі на електроді розряджається половина іонів, що досягають його поверхні. І, нарешті, граничний струм пропорційний концентрації обумовлених іонів у масі розчину. Дифузійний струм дорівнює різниці між граничним і залишковим струмом та прямо пропорційний концентрації речовини в розчині. Таким чином, висота хвилі H характеризує дифузійний струм і дає можливість визначити концентрацію аналізованої речовини.

Потенціал, що відповідає струму, який дорівнює половині дифузійного струму, називається *потенціалом півхвилі*. Цей показник залежить не від концентрації речовини, а від природи відновлюваного (або окиснюваного) іона. Потенціал півхвилі є важливою характеристикою речовини і може слугувати для її ідентифікації. За значенням потенціалу півхвилі визначається вид іонів, а за величиною граничного струму – їх концентрація. У такий спосіб полярографічний метод дозволяє визначати концентрацію декількох іонів у розчині.

Електрод, на якому відбувається аналітична електрохімічна реакція, повинен бути поляризований. При відбудовній полярографії найчастіше використовується ртутний електрод, що крапає. Він складається з тонкого капіляра, через який повільно (1 крапля в 3-5 с) крапає ртуть із розташованого вище резервуару. Період утворення краплі можна регулювати, змінюючи висоту розташування резервуару із ртуттю над капіляром. Значним недоліком ртутного електрода, що крапає, є його порівняно легка здатність окиснюватися. Тому його не рекомендують використовувати в якості анода. В такому випадку використовують мікродисковий платиновий обертовий електрод.

В якості другого електрода (з великою поверхнею) використовують стандартний насичений каломельний електрод або ртуть, налиту на дно електролітичного гнізда.

Прилади для полярографічного аналізу називаються *полярографами*. Сучасні полярографи – складні прилади, що реєструють, забезпечують високу точність визначень (похибка 1 – 2%). Графік залежності сили струму від потенціалу електрода, що крапає, називається *полярограмою*.

За допомогою полярографічного методу визначають багато неорганічних катіонів (наприклад, металів), аніонів (йодат-, бромат-, нітрат-, перманганат-іони) і молекул (кисень, двоокис сірки, окис азоту, перекис водню і т.п.). До органічних речовин, які відновлюються на ртутному крапельному електроді, відносяться сполуки, що містять карбонільні групи, подвійні вуглець-вуглецеві зв'язки, зв'язки вуглець-галоген, азот-кисень, сірка-сірка та ін. У якості розчинників часто використовують органічні

рідини, тому що багато з аналізованих за даним методом речовин є нерозчинними у воді.

Полярографічний метод дуже чутливий, що дозволяє працювати з розведеними розчинами і невеликими об'ємами. Цим методом одержують дані про окиснення та відновлення окремих речовин або ферментних систем.

Полярографічна установка служить для одержання *полярограм*, тобто кривих залежності сили струму, що протікає через розчин, від потенціалу, прикладеного до робочого електрода. Прилад складається із трьох основних вузлів: електролітичної комірки з робочим електродом та електродом порівняння, джерела напруги для поляризації робочого електрода й обладнання для реєстрації струму. У якості неполяризовуючого електрода порівняння використовується кулька ртуті на дні гнізда. Застосовують також електроди порівняння: каломельний, ртутно-сульфатний, хлорсрібний та ін. Робочим електродом може бути твердий мікроелектрод, що виготовляється із платини, золота, графіту та інших матеріалів.

2.6.1. Амперометрія

Амперометрія є різновидом полярографічного аналізу. Амперометричне титрування проводиться в електролізері, в який вміщують досліджуваній розчин. Цей вид титрування заснований на вимірюванні величини струму між електродами, до яких прикладена напруга на 0,3 – 0,5 В більша потенціалу півхвилі або редокс-потенціалу досліджуваної речовини.

Момент при титруванні, коли кількість реагенту, що додається, стає строго еквівалентною кількості досліджуваної речовини, називається *точкою еквівалентності*, а в експерименті – *кінцевою точкою титрування*. Концентрація титранта повинна перевищувати концентрацію розчину речовини, яка титрується, в 10-15 разів.

За даними величини струму між електродами будують криву амперометричного титрування в координатах «сила струму – об'єм титранта» і на графіку знаходять точку перетину двох гілок кривої титрування, що відповідає об'єму титранта в точці еквівалентності. Форма кривих титрування $I_d = f(V)$ залежить від того, яка речовина є електроактивною до та після точки еквівалентності, але завжди ці криві мають принаймні дві гілки, які перетинаються в кінцевій точці титрування. Перетин двох гілок кривої титрування відповідає кінцевій точці.

Залежно від типу реакції і речовини, яка бере участь в реакції, одержують різні форми кривих амперометричного титрування (рис. 2.12).

При амперометричному титруванні індикаторними електродами можуть бути ртутний крапельний електрод, платиновий обертовий, графітовий та інші тверді електроди. У якості електродів порівняння застосовують насичений каломельний, хлорсрібний та інші електроди.

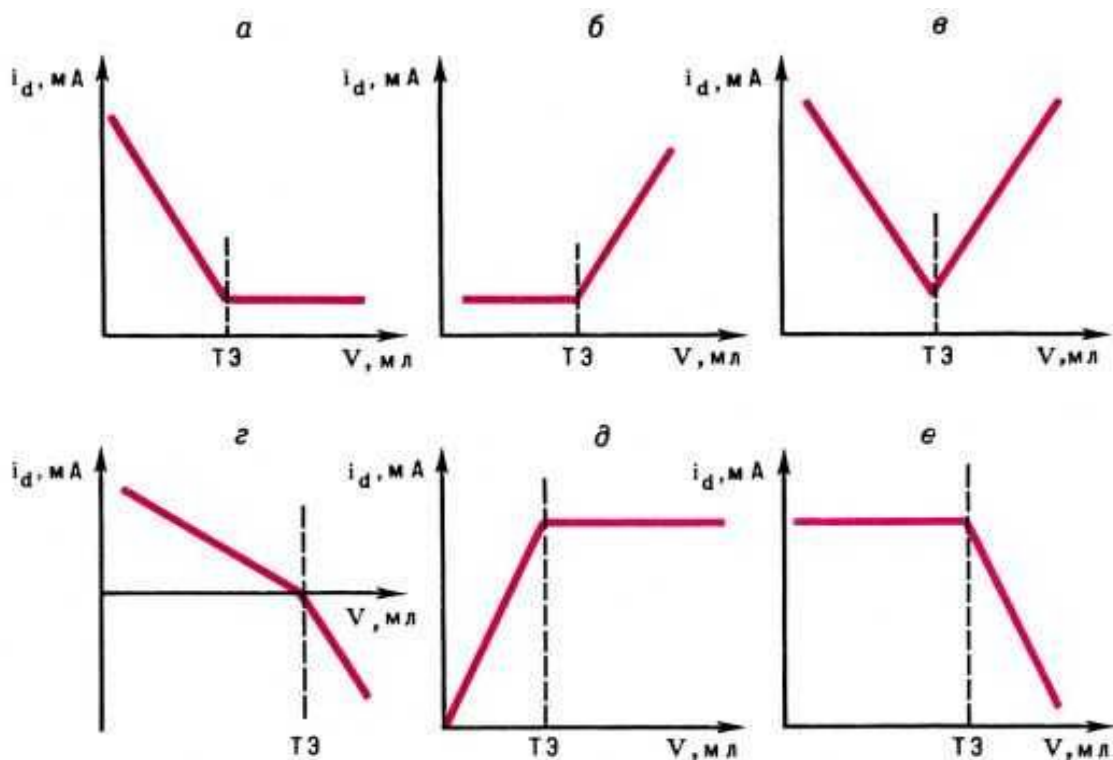


Рис. 2.12. Криві амперометричного титрування:

а – відповідає титруванню електрохімічно активної речовини розчином неактивного реагенту (наприклад, титрування Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} комплексоном III);

б – протилежний випадок: титрування Mg^{2+} 8-оксіхіноліном;

в – досліджувана речовина і титрант відновлюються на електроді (наприклад, визначення Fe^{3+} нітросо-*б*-нафтолом);

г – якщо на електроді одна речовина відновлюється, а інша окиснюється;

д – якщо взаємодіють електрохімічно неактивна речовина і титрант з утворенням електрохімічно активної речовини, (наприклад, титрування арсенатів йодидом калію, при взаємодії яких утворюється електрохімічно активний I_2);

е – титрування в присутності індикаторів (наприклад, титрування луку кислотою з індикатором із суміші іонів I^- і IO_3^- , що призводить також до утворення електрохімічно-активного I_2).

Метод амперометричного титрування дозволяє виявити 10^{-6} г речовини в об'ємі, що титрується. Цим методом визначають більше 60 елементів у різних промислових і природних матеріалах, органічних речовинах, наприклад алкалоїди, альдегіди, аміни, кетони, органічні кислоти, барвники, цукри, феноли та ін.

Аналітичні можливості методу амперометричного титрування широкі. Метод застосовують для аналізу органічних і неорганічних речовин, визначення розчинності осадів, стійкості комплексних сполук і т.д. Цим методом можна визначати практично всі елементи періодичної системи та

велику кількість органічних сполук, використовуючи реакції осадження, комплексоутворення, окиснення – відновлення і кислотно-основної взаємодії. Нижня межа обумовлених концентрацій в амперометричному титруванні з одним індикаторним електродом становить 10^{-5} М, із двома – 10^{-6} М.

Важлива перевага амперометричного титрування перед вольтамперометрією – можливість визначати не тільки електроактивні речовини, але й будь-які інші з застосуванням електроактивних реагентів.

Автоматичний титратор у комплекті з сенсорним (Touch Screen) терміналом та кольоровим рідкокристалічним дисплеєм, ручним стендом для титрування і бюреткою має унікальну технологію титрування *Oneclick* (титрування одним натисканням клавіші), автоматичне розпізнавання (Plug & Play) обладнань, що підключаються (бюретки, модулі дозування, принтер, ваги, комп'ютер і т.д.), а також можливість створення користувачем до 120 методів, 37 вбудованих методів, включаючи програми контролю титру розчинів. Проводить наступні види титрування: кислотно-лужне, окисно-відновне, аргентометрію, комплексонометрію, можливість роботи з іонселективними датчиками, вольтамперометричне титрування (метод К.Фішера, бромне число, визначення вітаміну С та ін.). Типи титрування: до кінцевої точки, до точки еквівалентності, рН-стат, ручне титрування.

Отже, електрохімічні методи аналізу використовують для прямих вимірів, заснованих на залежності «аналітичний сигнал – сполука», та для визначення кінцевої точки титрування.

Електрохімічні методи дозволяють визначати концентрацію речовин:

- у широкому інтервалі ($1 - 1 \cdot 10^{-9}$ моль/л);
- у мутних і забарвлених розчинах;
- у суміші речовин (наприклад, визначення концентрації слабкої та сильної кислоти в розчині).

Електрохімічні методи аналізу можуть бути використані для автоматичного контролю і керування виробничими процесами.

Питання для самопідготовки

1. У чому суть електрохімічних методів аналізу?
2. Охарактеризуйте електрогравіметричний метод аналізу.
3. На чому оснований вольтамперометричний аналіз? Які прилади використовують у вольтамперометрії?
4. Які є види кулонометричних визначень? Які переваги кулонометричного титрування порівняно з іншими титриметричними методами?
5. У якому методі аналізу використовується гальванічний елемент?
6. З якою метою використовують потенціометричне титрування?
7. У чому суть кондуктометричного титрування? Які переваги цього методу?
8. Як проводять визначення полярографічним методом?

3. СПЕКТРОСКОПІЯ

3.1. Характеристика електромагнітних хвиль

Електромагнітні хвилі – електромагнітні коливання, що поширюються в просторі з кінцевою швидкістю. Існування електромагнітних хвиль було передвіщене М. Фарадеєм у 1832 році. В 1865 році Д. Максвел теоретично доказав, що електромагнітні коливання поширюються у вакуумі зі швидкістю світла (рис. 3.1).

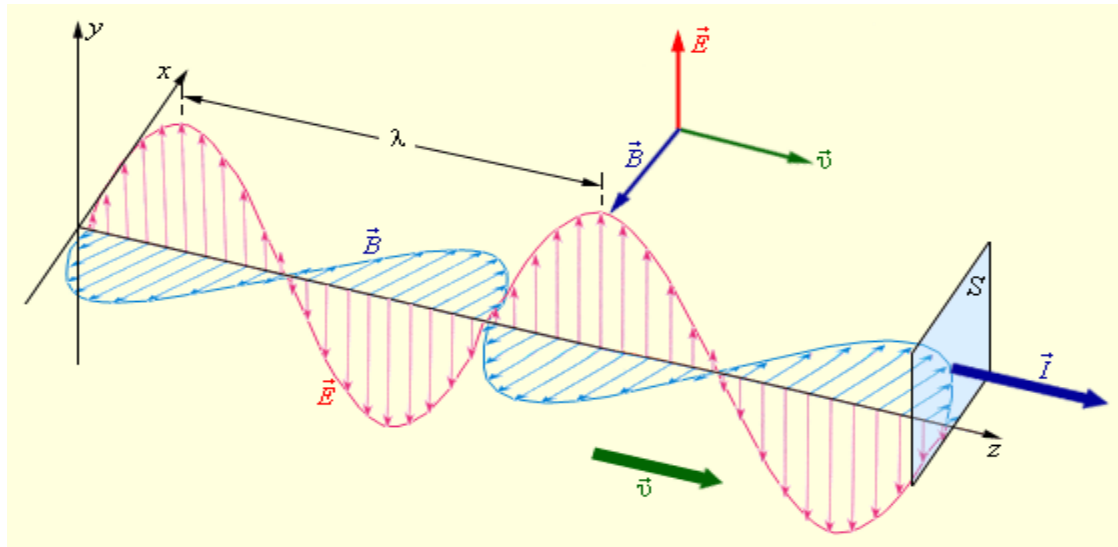


Рис. 3.1. Поширення електромагнітних хвиль

Структуру електромагнітної хвилі показано на рис. 3.1. Вона містить два змінні в часі та просторі поля: електричне E і магнітне H . Електромагнітні хвилі поперечні – вектори E та B перпендикулярні один одному і лежать у площині, перпендикулярній напрямку поширення хвилі. Модулі індукції магнітного поля B і напруженості електричного поля E в кожній точці простору пов'язані. Поля не можуть існувати незалежно: коливання електричного поля породжують магнітне поле, а коливання магнітного – електричне. Тільки так, підтримуючи один одного, вони і поширюються в просторі, «відірвавшись» від джерела. Хвиля поширюється уздовж осі z , і шлях, пройдений хвилею за один період коливань T , називається *довжиною хвилі* $\lambda = c \cdot T$. Період обернено пропорційний частоті коливань f : $(T - 1) / f$. Можна вивести важливу формулу, що пов'язує частоту коливань і довжину хвилі:

$$\lambda = c / f \quad (3.1)$$

де, c – шлях, пройдений хвилею за один період коливань;

f – частота коливань.

Електромагнітне випромінювання це:

1) процес утворення вільного електромагнітного поля при нерівномірному русі й взаємодії електричних зарядів;

2) вільне електромагнітне поле (електромагнітні хвилі), які створюються електричним зарядом, що довільно рухається. Електромагнітне поле в загальному випадку є сумою зосередженого поблизу заряду, що рухається разом з ним, власного поля та того, що йде від заряду на нескінченно далеку відстань поля випромінювання.

Теорія Максвела дозволила встановити, що радіохвилі, світло, рентгенівське та гамма-випромінювання є електромагнітними хвилями різної довжини l (табл. 3.1), причому між сусідніми діапазонами шкали електромагнітних хвиль немає чіткої межі (рис. 3.2).

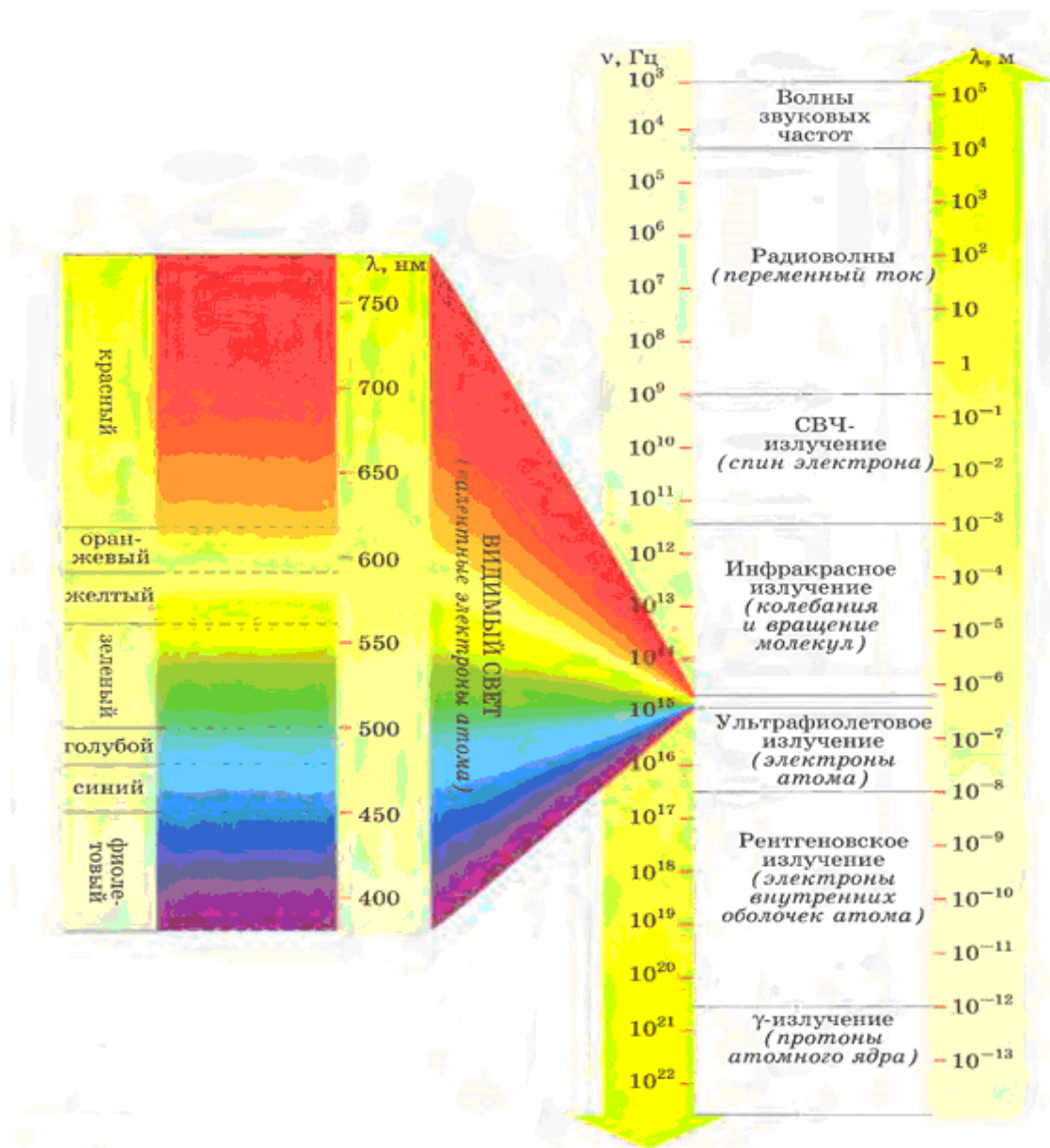


Рис. 3.2. Спектр электромагнітних хвиль

Діапазони випромінювання. Хоча у вакуумі електромагнітні хвилі всіх частот поширюються зі швидкістю світла, їх взаємодія з речовиною залежить від частоти, а також від довжини хвилі та енергії кванта. Залежно від характеру взаємодії з речовиною випромінювання поділяють на такі

діапазони: гамма-випромінювання, рентген, ультрафіолет, видиме світло, інфрачервоне випромінювання та радіохвилі. Разом ці діапазони утворюють електромагнітний спектр. Діапазони, у свою чергу, поділяють на піддіапазони, причому немає єдиного підходу щодо такого розподілу, де багато залежить від застосовуваних технічних засобів генерації та реєстрації випромінювання.

В таблиці 3.1 наведено діапазони спектру електромагнітних хвиль та джерела випромінювання.

Таблиця 3.1

Діапазони спектру електромагнітних хвиль та джерела випромінювання

Назва діапазону	Джерело
Радіохвилі	атмосферні та магнітні явища, радіозв'язок
Інфрачервоне випромінювання	випромінювання молекул і атомів під впливом теплових і електричних джерел
Видиме (оптичне) випромінювання	
Ультрафіолетове	випромінювання атомів під впливом прискорених електронів
Рентгенівське	атомні процеси під впливом прискорених заряджених частинок
γ - випромінювання	ядерні та космічні процеси, радіоактивний розпад

Гамма-випромінювання. Межа, на якій рентгенівський діапазон змінюється гамма-випромінюванням, умовна. Звичайно її пов'язують із енергією квантів, які випускаються під час ядерних реакцій (або навпаки, можуть їх викликати). Інший підхід пов'язаний з тим, що теплове випромінювання не прийнято відносити до гамма-діапазону, якою б високою не була його енергія. Гамма-випромінювання генерується нетепловим шляхом. Основним механізмом є випромінювання при зіткненні заряджених часток, розігнаних до близькосвітлових швидкостей потужними електромагнітними полями, наприклад, у нейтронних зірок.

Розподіл гамма-випромінювання на піддіапазони носить умовний характер. До надвисоких енергій відносять гамма-кванти, генерація яких виходить за межі можливостей сучасних технологій. Усі джерела такого випромінювання пов'язані винятково з космосом.

Атмосфера захищає нас і від гамма-випромінювання. У м'якому і твердому піддіапазонах вона повністю його поглинає.

Більш енергійні кванти з ультрависокою енергією породжують потужні каскади часток, які пробивають атмосферу наскрізь і досягають поверхні Землі. Їх називають атмосферними зливами. Ці частки поряд із природною радіоактивністю земних порід можуть ушкоджувати біологічні молекули, зокрема ДНК, і викликати мутації в живих організмах, що вносить свій

внесок в еволюцію життя на Землі. Чим вища енергія гамма-квантів, тим рідше вони зустрічаються. Найенергійніші кванти з енергією близько 10^{20} еВ приходять приблизно раз у сто років на квадратний кілометр земної поверхні.

Рентгенівське випромінювання. Формальної межі між ультрафіолетовим і рентгенівським випромінюванням немає. До їх визначення є два основні підходи: з одного боку, до рентгена прийнято відносити випромінювання, здатне викликати порушення атомних ядер — подібно тому, як видиме та інфрачервоне випромінювання збуджує електронні оболонки атомів та молекул. У цьому випадку навіть твердий вакуумний ультрафіолет у деяких випадках може бути віднесений до рентгена. В іншому підході рентгеном вважають випромінювання з довжиною хвилі меншою характерного розміру атомів (0,1 нм).

Рентгенівські промені — електромагнітне випромінювання, що займає спектральну область між ультрафіолетовим і гамма-випромінюванням у межах довжин хвиль $\lambda =$ від 10^2 до 10^{-3} нм (або енергій фотонів $h\nu$ від 10 еВ до кількох Мэв; $\nu = c/\lambda$ — частота випромінювання). Відкрите в 1895 році В. К. Рентгеном рентгенівське випромінювання з $\lambda < 0,2$ нм має значну проникаючу здатність і називається твердим, при $\lambda > 0,2$ нм рентгенівське випромінювання поглинається речовиною і називається м'яким.

Найбільш розповсюдженим джерелом рентгенівського випромінювання є рентгенівська трубка, у якій електрони, що вириваються з катода в результаті термоелектронної або автоелектронної емісії, прискорюються електричним полем і бомбардують металевий анод. Випромінювання рентгенівської трубки називається первинним і складається із двох частин: лінійної (рентгенівське випромінювання) і безперервної (гальмівне рентгенівське випромінювання). При дії первинного рентгенівського випромінювання на речовину випускається флуоресцентне (вторинне) рентгенівське випромінювання, що складається тільки з лінійної частини. У якості джерел рентгенівського випромінювання можуть служити деякі радіоактивні ізотопи. Одні з них безпосередньо випускають рентгенівське випромінювання (наприклад, атом ^{55}Fe), ядра радіоактивних елементів випускають електрони або α -частки. Інтенсивність випромінювання ізотопних джерел на кілька порядків нижча інтенсивності випромінювання рентгенівської трубки, а їх габарити, вага і вартість значно менші, ніж в установці з рентгенівською трубкою.

Ультрафіолетове випромінювання (від лат. *ultra* — понад, за межами та фіолетовий) (ультрафіолетові промені, УФ-випромінювання) — невидиме оком електромагнітне випромінювання, що займає спектральну область між видимим і рентгенівським випромінюваннями в межах довжин хвиль від 400 до 10 нм. Область УФ умовно поділяють на близьку (400-200 нм) і далеку, або вакуумну (200-10 нм) області; остання назва пов'язана з тим, що випромінювання цього діапазону дуже поглинається повітрям і його дослідження можливе тільки у вакуумі. Близьке УФ-випромінювання

відкрите І. В. Риттером і У. Волластоном у 1801 р., вакуумне – з 1 до 130 нм - В. Шуманом в 1885-1903 рр., а з 1 до 25 нм - Т. Лайманом в 1924 р.

Як і видиме світло, близький ультрафіолет проходить через атмосферу. Органи чуття людини його не сприймають, але на шкірі близький ультрафіолет викликає появу засмаги, що є захисною реакцією шкіри на певні хімічні порушення під дією ультрафіолету. Чим коротша довжина хвилі, тим більші порушення може викликати ультрафіолетове випромінювання в біологічних молекулах. Спектр УФ-випромінювання може бути лінійним, безперервним або складатися зі смуг.

Оптичні властивості УФ-випромінювання. При взаємодії з речовиною може відбуватися іонізація атомів і фотоефект. Оптичні властивості речовин в УФ-області спектра значно відрізняються від їх оптичних властивостей у видимій та ІЧ-областях. Характерною рисою для УФ-випромінювання є зменшення прозорості (збільшення коефіцієнта поглинання) більшості тіл, прозорих у видимій області.

Джерела УФ-випромінювання. Випромінювання нагрітих до температури ~ 3000 К твердих тіл містить помітну частку УФ-випромінювання безперервного спектра, інтенсивність якого зростає зі збільшенням температури.

Видиме випромінювання. Видиме світло – це видима область електромагнітного спектра випромінювання з діапазоном довжин хвиль від 380 нм (ультрафіолетова межа) до 750 нм (інфрачервона межа), що сприймається людським оком. Хвилі з довжиною меншою за 380 нм відносять до ультрафіолетового випромінювання, з довжиною більшою за 750 нм – до інфрачервоного.

З усього спектра людське око здатне вловлювати випромінювання тільки в дуже вузькому діапазоні видимого світла. Довжини хвиль видимого світла сприймаються людиною як різні кольори – від червоного до фіолетового. Традиційно розподіл видимого діапазону спектра розподіляється на сім кольорів веселки. Ніяких чітких фізичних меж між кольорами немає. Англійці, наприклад, ділять веселку на шість кольорів. За сприйняття всієї різноманітності кольорів і відтінків видимого світла людським оком відповідають усього три типи рецепторів, які чутливі до червоного, зеленого та синього кольору. Це дозволяє відтворювати практично будь-який колір, змішуючи ці три основні кольори. Чутливість людського ока до хвиль різної частоти у видимому діапазоні різна. Максимум чутливості знаходиться у середині діапазону (зелений колір) і зменшується в напрямках границь. Це означає, що серед джерел світла однакової інтенсивності, зелене здаватиметься яскравішим, ніж червоне, або блакитне. В межах діапазону частота випромінювання, довжина хвилі та енергія квантів змінюється менш ніж у два рази. Для порівняння – найдовші радіохвилі в 10^{14} раз довші хвиль видимого випромінювання, а найенергетичніші гамма-кванти – в 10^{20} більшу енергію.

Джерелами видимого світла є розігріті тверді тіла, електричний розряд і лазери (зазвичай, лазери на барвниках). Найпоширенішим детектором видимого випромінювання є око людини, фотопластинки. З фізичної точки зору діапазон видимих електромагнітних променів являє собою лише дуже вузьку смужку в широкому спектрі випромінюваних хвиль (див. рис. 3.2).

Інфрачервоне випромінювання – електромагнітне випромінювання, що займає спектральну область між кінцем видимого світла (з довжиною хвилі $\lambda = 0,74$ мкм) і мікрохвильовим випромінюванням ($\lambda \sim 1-2$ мм). Верхня межа інфрачервоного випромінювання визначається чутливістю людського ока до видимого випромінювання, а нижня – умовна.

Інфрачервоне випромінювання було відкрито в 1800 році англійським астрономом У. Гершелем. Досліджуючи Сонце, Гершель шукав спосіб зменшення нагрівання інструментів, якими проводилися спостереження. Визначаючи за допомогою термометрів дію різних ділянок видимого спектра, Гершель виявив, що «максимум тепла» лежить за насиченим червоним кольором і, можливо, «за видимим заломленням». Це дослідження поклало початок вивченню інфрачервоного випромінювання.

Близьке ІЧ-випромінювання фізично нічим не відрізняється від видимого світла, за винятком того, що не сприймається сітківкою ока. Люди відчувають інфрачервоне випромінювання шкірою як тепло. Завдяки інфрачервоному випромінюванню нам тепло сидіти біля багаття. Більшу частину енергії горіння несе вгору висхідний потік повітря, а інфрачервоне і видиме випромінювання випускається в сторони молекулами газів, продуктів згоряння і розпеченими частками вугілля. Довжини хвиль, випромінювані тілом, залежать від температури нагрівання: чим вища температура, тим коротша довжина хвилі й вища інтенсивність випромінювання.

Область інфрачервоного випромінювання розташована після видимої частини спектра й розділяється на близьку, середню й далеку: близька (0,74 - 2,5 мкм), середня (2,5 - 50 мкм) і далека (50 - 2000 мкм). Спектри інфрачервоного випромінювання (як і видимого) можуть бути лінійними (випромінювання збуджених атомів або іонів, тобто атомні спектри), безперервними (спектри випромінювання нагрітих твердих і рідких тіл) і смугастими (випромінювання збуджених молекул, тобто молекулярні спектри) залежно від джерела, що його випускає.

ІЧ-спектри випускають збуджені атоми або іони при переходах між близько розташованими електронними рівнями енергії.

Смугасті ІЧ-спектри спостерігаються в спектрах випускання збуджених молекул, що виникають при переході між коливальним і обертальним рівнями енергії.

Безперервний ІЧ-спектр випромінюють нагріті тверді та рідкі тіла. При температурах нижче 500 К випромінювання майже цілком розташоване в ІЧ-області (тіло здається темним). Однак повна енергія випромінювання при таких температурах мала. При підвищенні температури частка

випромінювання у видимій області збільшується, тіло стає темно-червоним, потім червоним, жовтим і, нарешті, при температурах вище 5000 К – білим.

Випромінювання Сонця близьке до випромінювання абсолютно чорного тіла з температурою близько 6000 К, причому близько 50% енергії випромінювання розташовано в інфрачервоній області. Розподіл енергії випромінювання людського тіла в інфрачервоній області близький до розподілу енергії чорного випромінювання з максимумом при $1 \sim 9,5$ мкм.

Оптичні властивості речовин в ІЧ-області спектра значно відрізняються від оптичних властивостей у видимій і УФ-областях спектра. Багато речовин, прозорі у видимій області, виявляються непрозорими в деяких областях інфрачервоного випромінювання, і навпаки. Наприклад, шар води товщиною в кілька сантиметрів непрозорий для інфрачервоного випромінювання. Чорний папір прозорий у далекій ІЧ-області.

Найпоширеніші джерела інфрачервоного випромінювання – лампи розжарювання з вольфрамовою ниткою потужністю до 1 кВт, 70 – 80% випромінюваної енергії яких припадає на ІЧ-діапазон (використовуються для сушіння і нагрівання), а також вугільна електрична дуга, газорозрядні лампи, електричні спіралі з ніхромової нитки.

Радіохвилі та мікрохвилі. До інфрачервоного діапазону примикає радіовипромінювання (рис. 3.3), яке охоплює весь довгохвильовий край електромагнітного спектра.

Радіохвилі (від лат. *radio* – випромінюю) – електромагнітні хвилі довжиною від $5 \cdot 10^{-5}$ до 10^8 м. В 1895-1899 рр. А. С. Попов вперше застосував електромагнітні коливання для здійснення бездротового зв'язку на відстані. У міру розвитку радіотехніки розширювався частотний діапазон радіохвиль. У таблиці 3.2 наведено розподіл радіохвиль на діапазони.

Таблиця 3.2

Розподіл радіохвиль на діапазони

Діапазон	Довжина хвилі у вакуумі	Частота коливань
Наддовгі хвилі (НДХ)	100 - 10 км	3-30 кГц
Довгі повні (ДХ)	10 - 1 км	30 - 300 кГц
Середні хвилі (СХ)	1000 - 100 м	300 - 3000 кГц
Короткі хвилі (КХ)	100 - 10 м	3 - 30 МГц
Ультракороткі хвилі (УКХ):		
- метрові	10 - 1 м	30 - 300 МГц
- дециметрові	10 - 1 дм	300 - 3000 МГц
- сантиметрові	10 - 1 см	3 - 30 ГГц
- міліметрові	10 - 1 мм	30 - 300 ГГц
- субміліметрові	1 - 0,05 мм	300 - 6000 ГГц

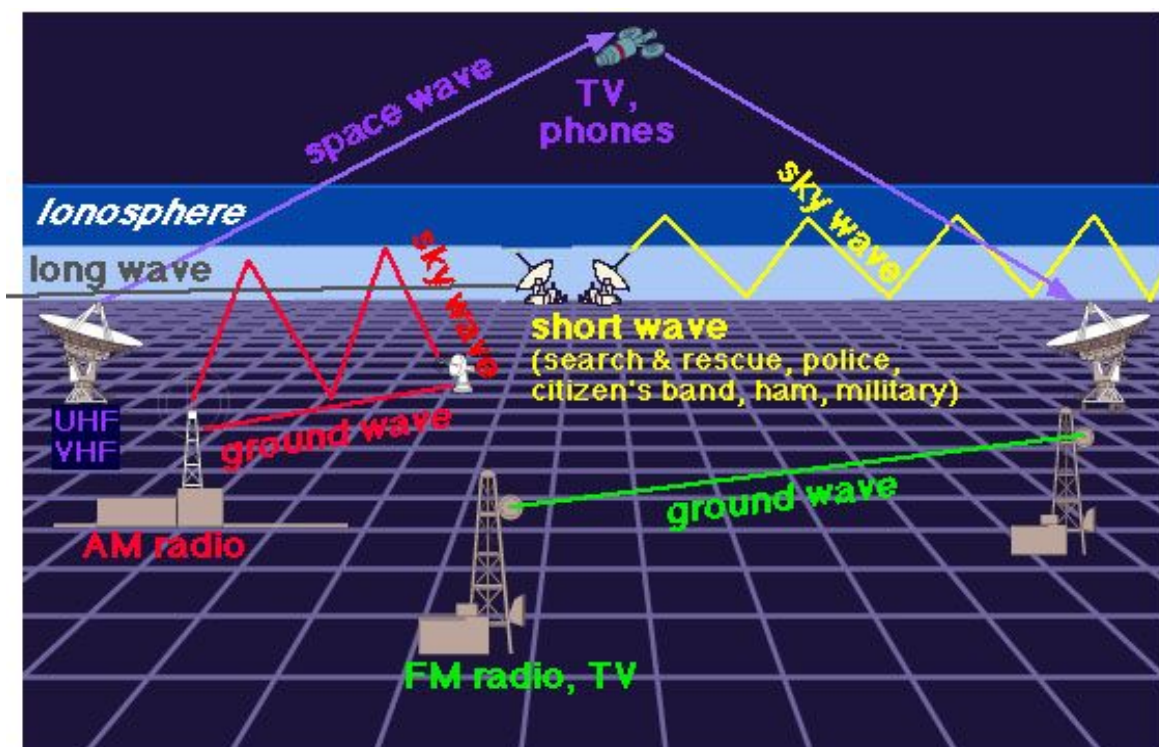


Рис. 3.3. Розповсюдження радіохвиль різного діапазону

Енергія квантів у радіодіапазоні дуже мала. Її звичайно не вистачає для істотних змін у структурі атомів і молекул, але достатньо для взаємодії з обертальними рівнями молекул, наприклад, води. Енергії радіохвиль також достатньо для того, щоб впливати на вільні електрони, наприклад, у провідниках. Коливання електромагнітного поля радіохвилі викликають синхронні коливання електронів в антені, тобто змінний електричний струм.

При високій інтенсивності мікрохвильового випромінювання може відбуватися значне нагрівання речовини. Ця властивість використовується для розігріву продуктів, що містять воду, у мікрохвильових печах. Мікрохвильове випромінювання також називають *надвисокочастотним* (НВЧ) випромінюванням. Воно є самим короткохвильовим піддіапазоном радіовипромінювання з довжиною хвилі від 1 мм до 30 см. НВЧ-випромінювання проникає в товщу продуктів на глибину до декількох сантиметрів, що забезпечує прогрів всього об'єму не тільки з поверхні, як у випадку обробки інфрачервоним випромінюванням на грилі. У мікрохвильовому діапазоні також працюють усі системи стільникових телефонів і локального радіозв'язку, що використовують бездротове електронне обладнання.

Чим більша довжина радіохвилі, тем меншу енергію вона несе і тим важче її зареєструвати. Більша частина мікрохвильового випромінювання (починаючи з довжини хвилі 3–5 мм) проходить через атмосферу. Те ж можна сказати про ультракороткі хвилі (УКВ), на яких працюють місцеві телевізійні та радіостанції і ведеться космічний радіозв'язок. Випромінювання їх передавачів реєструється тільки в межах прямої

видимості антен. Вікно прозорості атмосфери в радіодіапазоні закінчується приблизно на довжині хвилі 10 – 30 м.

Більш довгі радіохвилі відбиваються від іоносфери Землі. Радіохвилі в діапазоні від 10 до 100 м можуть обігнути всю Землю, багаторазово відбиваючись від іоносфери та поверхні Землі. Їх поширення залежить від стану іоносфери, на яку впливає сонячна активність. Середні й довгі хвилі також відбиваються від іоносфери, але швидше згасають із відстанню. Для того щоб сигнал можна було вловити на відстані більше тисячі кілометрів, потрібні дуже потужні передавачі. Наддовгі радіохвилі, з довжиною в сотні й тисячі кілометрів, обгинають Землю вже не завдяки іоносфері, а за рахунок хвильових ефектів, які також дозволяють їм проникати на деяку глибину під поверхню океану. Ця властивість використовується для екстреного зв'язку з бойовими підводними човнами в зануреному стані.

3.2. Квантова теорія випромінювання

Процес випромінювання квантової системи (атома, атомного ядра, молекули) підкоряється квантовим законам. У квантовій теорії електромагнітне поле розглядається як сукупність квантів електромагнітного поля – фотонів. Енергія фотона пропорційна його частоті: $\epsilon = h \cdot \omega$, імпульс p – його хвильовому вектору k : $p = h \cdot k$. Випромінювання одного фотона квантовою системою супроводжується переходом цієї системи зі стану з енергією E_1 у стан з енергією $E_2 = E_1 - h\omega$. Оскільки енергія квантової системи дискретна (переривчаста), така система випускає випромінювання певної частоти – спектр випромінювання, що складається з окремих спектральних ліній певної ширини.

Квантова теорія випромінювання заснована на теорії Бора:

- атом може перебувати тільки в особливих стаціонарних, або квантових станах, кожному з яких відповідає певна енергія. У стаціонарному стані атом не випромінює електромагнітних хвиль;
- випромінювання і поглинання енергії атомом відбувається при стрибкоподібному переході з одного стаціонарного стану в інший, при цьому мають місце два співвідношення:

$$\epsilon = E_{n_2} - E_{n_1} \quad (3.2)$$

де ϵ – випромінена (поглинута) енергія, n_1, n_2 – номер квантового стану. E_{n_1} і E_{n_2} рівні енергії 1 та 2 стану.

Правило квантування моменту імпульсу:

$$m \cdot v \cdot r = n \cdot \hbar \quad (3.3)$$

де, $n = 1, 2, 3, \dots$

Рівні енергії – значення, які може набувати енергія квантової системи (атома, молекули, кристала та ін.). Сукупність рівнів енергії утворює енергетичний спектр системи – безперервний, дискретний або змішаний.

Квантові переходи – стрибкоподібні переходи квантової системи (атома, молекули, атомного ядра, кристала) з основного стану в інший. Характерні для квантової системи (атома, молекули, кристала, атомного ядра, елементарної частки) стрибкоподібні переходи з одного стану в інший відбуваються під впливом якої-небудь взаємодії, властивій часткам даної системи. Найбільш важливий випадок квантових переходів між стаціонарними станами, що відповідають певним значенням енергії системи. При будь-яких квантових переходах виконуються закони збереження енергії, імпульсу, моменту імпульсу, електричного заряду та ін. Квантові переходи між різними стаціонарними станами, що супроводжуються випусканням або поглинанням яких-небудь часток (наприклад, фотона у випадку випромінювальних переходів) зображено на рис. 3.4.

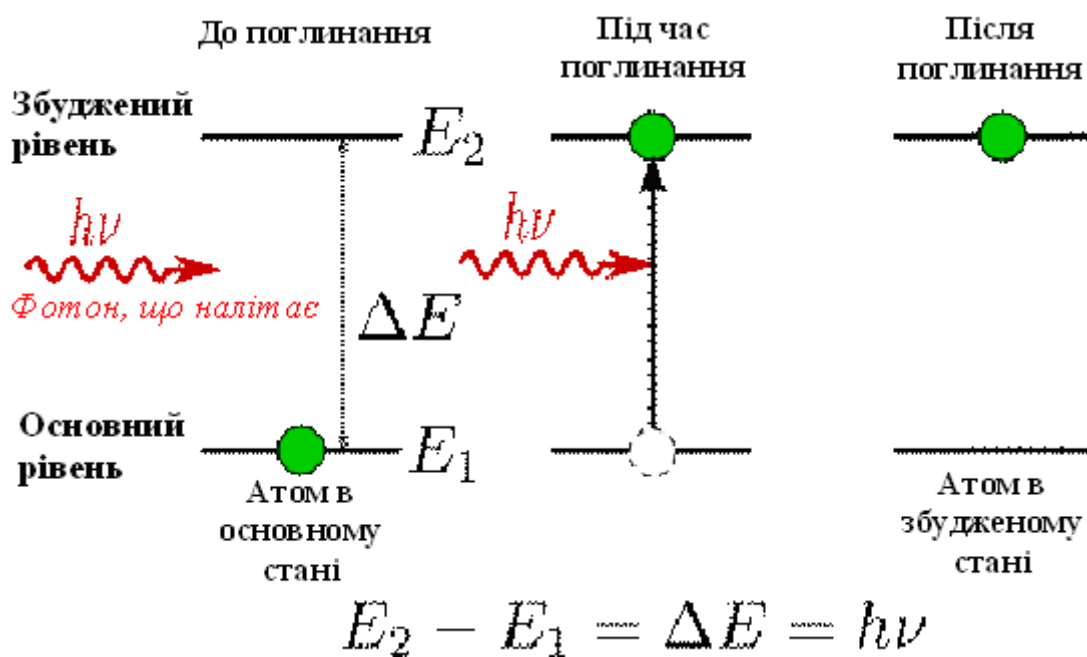


Рис. 3.4. Поглинання фотона.

Квантові переходи можуть бути випромінювальними і безвипромінювальними. При випромінювальних квантових переходах система випускає або поглинає квант електромагнітного випромінювання – фотон енергії $h \cdot n = h \cdot \omega = E_i - E_k$ (n або ω – звичайна або кругова частота випромінювання). Залежно від величини різниці $E_i - E_k$ випускається або поглинається випромінювання в різних частотних діапазонах шкали електромагнітних хвиль.

Сукупність випромінювальних квантових переходів з верхніх рівнів енергії на нижні утворює *спектр випускання* даної квантової системи, а з нижніх рівнів на верхні – *спектр поглинання*. Випромінювальні квантові переходи можуть бути *спонтанними* ("мимовільними"), що не залежать від зовнішнього впливу на квантову систему, та *вимушеними* (індукованими), які відбуваються під дією зовнішнього електромагнітного випромінювання резонансної частоти $n = (E_i - E_k)/h$.

Поняття про вимушене випромінювання було введено А. Ейнштейном в 1916 р. при дослідженні термодинамічної рівноваги часток газу з електромагнітним випромінюванням.

Квантові числа – цілі або дробні числа, що визначають можливі дискретні значення фізичних величин, які характеризують квантові системи (атомне ядро, атом, молекулу та ін.) і окремі елементарні частки.

Вимушене або індуковане випромінювання — генерація нового фотона при переході квантової системи (атома, молекули, ядра і т.д.) зі збудженого в стабільний стан (нижчий енергетичний рівень) під впливом індукуючого фотона, енергія якого дорівнює різниці енергій між рівнями. Створений фотон має ту ж енергію, імпульс, фазу і поляризацію, що й індукований, який при цьому не поглинається. Обидва фотони є когерентними.

Великий внесок у розробку питання про вимушене випромінювання (випускання) зробив А. Ейнштейн. Його гіпотеза полягала в тому, що під дією електромагнітного поля частоти ω молекула (атом) може:

- перейти з більш низького енергетичного рівня E_1 на більш високий E_2 з поглинанням фотона, що має енергією $\hbar \nu = E_2 - E_1$ (див. рис. 3.4);
- спонтанний перехід молекули (атома) з верхнього на нижній рівень із випусканням фотона з енергією $\hbar \nu = E_2 - E_1$ (рис. 3.5);
- вимушений перехід з більш високого енергетичного рівня E_2 на більш низький E_1 з випусканням фотона, що має енергією $\hbar \nu = E_2 - E_1$ (рис. 3.6).

Перший процес прийнято називати поглинанням, другий – спонтанним випусканням, третій – вимушеним (індукованим) випусканням. Швидкість поглинання і вимушеного випускання фотона пропорційна ймовірності відповідного переходу.

Імовірність випромінювальних квантових переходів визначаються коефіцієнтами Ейнштейна і можуть бути розраховані методами квантової електродинаміки та квантової механіки.

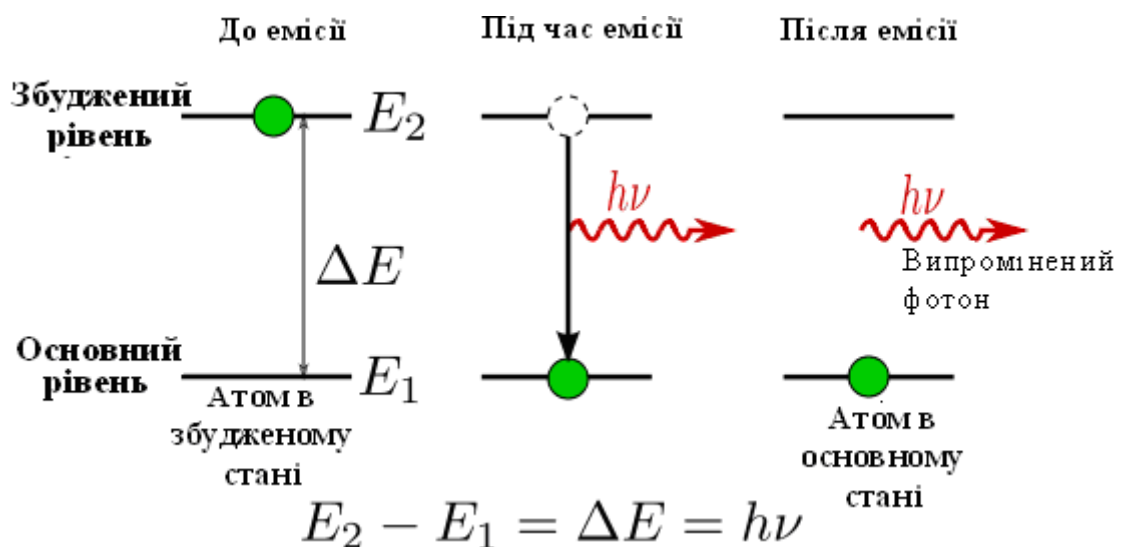


Рис. 3.5. Спонтанне випускання фотона.

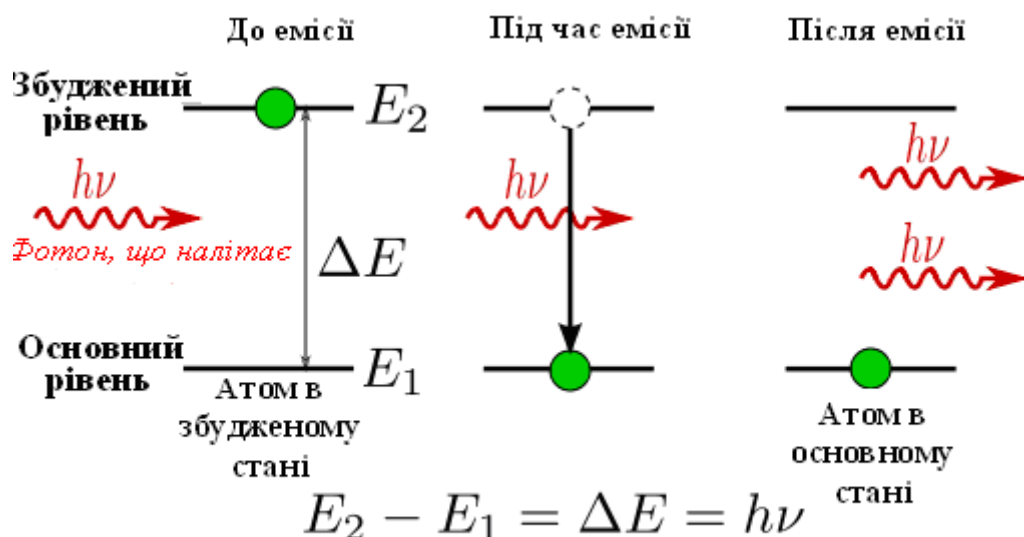


Рис. 3.6. Вимушене випускання фотона.

Крім вимушених безвипромінювальних квантових переходів, що супроводжуються зміною енергії системи, можливі спонтанні безвипромінювальні квантові переходи (Оже-ефекти), що відбуваються при наявності в атомі вакансії на внутрішній електронній оболонці. Такий стан нестійкий і електронна система прагне заповнити вакансію електроном з вищого рівня енергії атома. Енергія, що виділяється при переході на нижчий рівень може бути випромінена у вигляді кванта рентгенівського випромінювання, або передана третьому електрону, який вимушено залишає атом. Перший процес більш імовірний при енергії зв'язку електрона більше 1 кеВ, другий – для легких атомів з енергією зв'язку електрона, що не перевищує 1 кеВ.

Другий процес називають іменем його відкривача П'єра Оже – «ефектом Оже», а електрон, що вивільняється при цьому, якому був переданий надлишок енергії, – *Оже-електрон*. Енергія Оже-електрона не залежить від енергії збуджуючого випромінювання, а визначається структурою енергетичних рівнів атома.

Оже-спектроскопія – це область електронної спектроскопії, в основі якої лежить вимірювання енергії та інтенсивності струму оже-електронів, а також аналіз форми ліній спектрів оже-електронів, емітованих атомами, молекулами і твердими тілами в результаті оже-ефекта.

Когерентність – направлене протікання в часі та просторі кількох випадкових коливальних або хвильових процесів, що дозволяє одержати при їх додаванні чітку інтерференційну картину. Поняття когерентність можна визначити як необхідну стабільність випадкових фазових співвідношень за час реєстрації картини інтерференції.

Когерентність світла – взаємна узгодженість протікання в часі світлових коливань у різних точках простору і/або часу їх здатності до інтерференції. Електромагнітні хвилі від різних випромінювачів приходять у

точку спостереження із різними фазами і взаємно погашаються. Такі випромінювачі називаються взаємно некогерентними.

Емісія – випромінювання пружних хвиль, що виникає в процесі перебудови внутрішньої структури твердих тіл. Емісія з'являється при пластичній деформації твердих матеріалів.

Абсорбція те саме, що і *поглинання*.

Спін – власний момент кількості руху елементарних часток, що має квантову природу і не пов'язаний з переміщенням частки. Спіном також називають власний момент кількості руху атомного ядра або атома. В такому випадку спін визначається як векторна сума (обчислена за правилами додавання моментів у квантовій механіці) спінів елементарних часток, що утворюють систему, і орбітальних моментів цих часток, обумовлених їх рухом усередині системи. Електрон можна розглядати як «обертний вовчок» із власним механічним моментом $1/2$ і власним спіновим магнітним моментом, рівним магнетону Бора. Наявність в електрона спіна, рівного $1/2$, пояснило мультиплетну структуру атомних спектрів, особливості розщеплення спектральних ліній магнітного поля (ефект Зеемана), порядок заповнення електронних оболонок у багатоелектронних атомів.

Спін-орбітальна взаємодія – взаємодія часток, що залежить від величин і взаємної орієнтації їх орбітального і спінового моментів кількості руху, що і призводить до тонкого (мультиплетного) розщеплення рівнів енергії системи.

Тонка структура (мультиплетне розщеплення) рівнів енергії – розщеплення рівнів енергії атома, молекули або кристала, обумовлена, головним чином, спін-орбітальною взаємодією. Тонке розщеплення рівнів – причина виникнення спектральних ліній.

Спектральна лінія – вузький (майже монохроматичний) пік у спектрі випускання (спектральна лінія випускання) або провал у спектрі пропускання (спектральна лінія поглинання) атомів, молекул та інших квантових систем. Кожна спектральна лінія відповідає певному квантовому переходу. Відповідно до напрямку переходу розрізняють спектральні лінії поглинання та випускання. Положення спектральних ліній у спектрі звичайно визначається довжиною хвилі, частотою або енергією фотона $h \cdot \nu$.

Сpektри флуоресценції виникають при переходах зі збудженого триплетного стану в основний синглетний стан. Триплетний та синглетний стан – це мультиплетні (багаторазові) стани орієнтації у просторі повного спіна атома або молекули.

Коливальні спектри спостерігаються при зміні коливальної енергії (електронна і обертова енергії при цьому не повинні змінюватися). Вивчення коливальних молекулярних спектрів дозволяє встановити гармонійні частоти коливань. Коливальна спектроскопія – ефективний метод якісного і кількісного спектрального аналізу в хімії, біології, медицині.

Обертальні спектри формуються при квантових переходах між обертовими рівнями енергії молекули. Їх спостерігають звичайно при

поглинанні методами мікрохвильової спектроскопії, рідше – при випусканні і комбінаційному розсіюванні.

Оптичні спектри – спектри електромагнітного випромінювання в інфрачервоному, видимому та ультрафіолетовому діапазонах шкали електромагнітних хвиль. Оптичні спектри поділяють на спектри випускання (їх називають також спектрами випромінювання або емісійними спектрами), спектри поглинання (абсорбційні спектри), спектри розсіювання та спектри відбиття. Оптичні спектри одержують від джерел світла при розкладанні їх випромінювання за довжиною хвилі λ (частотою $\nu = c/\lambda$ і хвильовим числом $1/\lambda$) за допомогою спектральних приладів. Оптичні спектри поглинання і розсіювання звичайно одержують при проходженні світла через речовину з наступним його розкладанням. Оптичні спектри поглинання, розсіювання та відбиття характеризуються частиною енергії світла кожної довжини хвилі, відповідно до поглиненої, розсіяної або відбитої речовиною. При розсіюванні молекулами монохроматичного світла довжиною хвилі λ може відбуватися комбінаційне розсіювання світла, спектр якого характеризується розподілом енергії розсіяного світла за зміненими (комбінаційними) довжинами хвиль.

Оптичні спектри можуть бути *лінійчатими*, що складаються з окремих спектральних ліній з певними значеннями λ , *смугастими*, що складаються з окремих смуг, кожна з яких охоплює деякий інтервал λ , і *суцільними* (безперервними), що охоплюють широкий діапазон λ (рис. 3.7 а, б і в, відповідно).

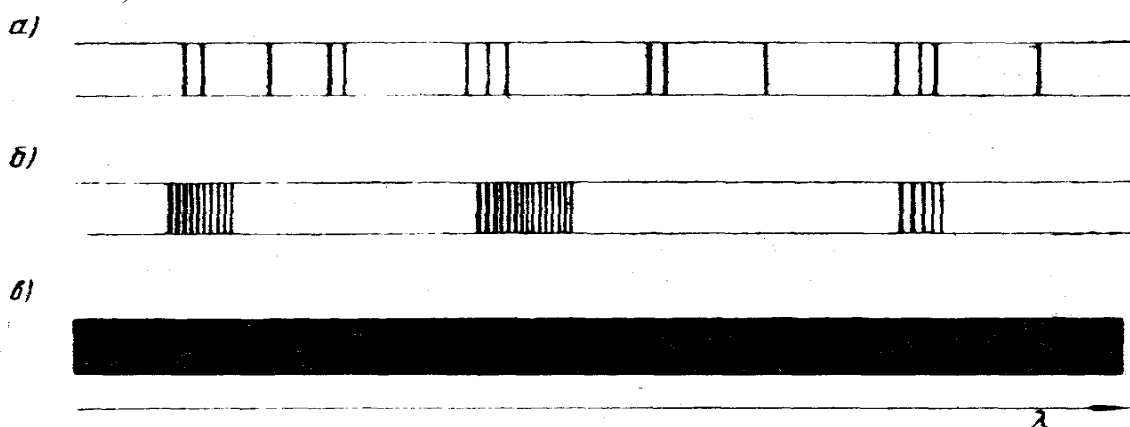


Рис. 3.7. Типи спектрів: а – лінійчатий; б – смугастий (видні окремі лінії, що становлять смугу); в – суцільний.

Оптичні спектри складаються з окремих ліній (рис. 3.7. а). У випромінюванні розжарених твердих або рідких тіл присутнє світло будь-якої довжини хвилі. Окремі лінії в спектральному апараті зливаються одна з одною. Таке випромінювання має суцільний спектр (рис. 3.7. в). На відміну від лінійчатого спектра атомів, молекулярні спектри випускання речовин, які не розпалися при високій температурі, є смугастими (рис. 3.7. б). Кожна смуга утворена великою кількістю близько розташованих ліній.

Оптичні спектри виникають при квантових переходах між рівнями енергії атомів, молекул, твердих і рідких тіл. Спектри випускання

відповідають можливим квантовим переходам з верхніх збуджених рівнів енергії на нижні, спектри поглинання – з нижніх рівнів на верхні.

Вид спектра залежить від стану речовини. Якщо при заданій температурі речовина перебуває в стані термодинамічної рівноваги з випромінюванням, вона випускає суцільний спектр. Якщо термодинамічна рівновага випромінювання з речовиною відсутня то оптичні спектри можуть мати різний вигляд. Зокрема, для атомів характерні лінійчаті спектри енергії, що виникають при квантових переходах між електронними рівнями, для найпростіших молекул типові смугасті спектри, що виникають при переходах між електронними, коливальними та обертальними рівнями енергії. Різним оптичним діапазонам відповідає різна енергія фотонів $h\nu = E_1 - E_2$, де E_1 і E_2 - енергії рівнів, між якими відбувається перехід. Оптичні спектри використовують для визначення будови і складу речовини.

Атомні спектри – оптичні спектри, що утворюються при випусканні або поглинанні електромагнітного випромінювання вільними або слабко зв'язаними атомами (наприклад, у газах або парах).

На рис. 3.8 зображено перехід електрона з рівня E_0 на рівень E_2 . Звідти він може повернутися назад на рівень E_1 або E_0 . Одержувана емісійна лінія характеризується частотою ν або довжиною хвилі λ .

$$\Delta E_{21} = E_2 - E_1 = h \cdot \nu_{21} = h \cdot \frac{c}{\lambda_{21}} \quad (3.4)$$

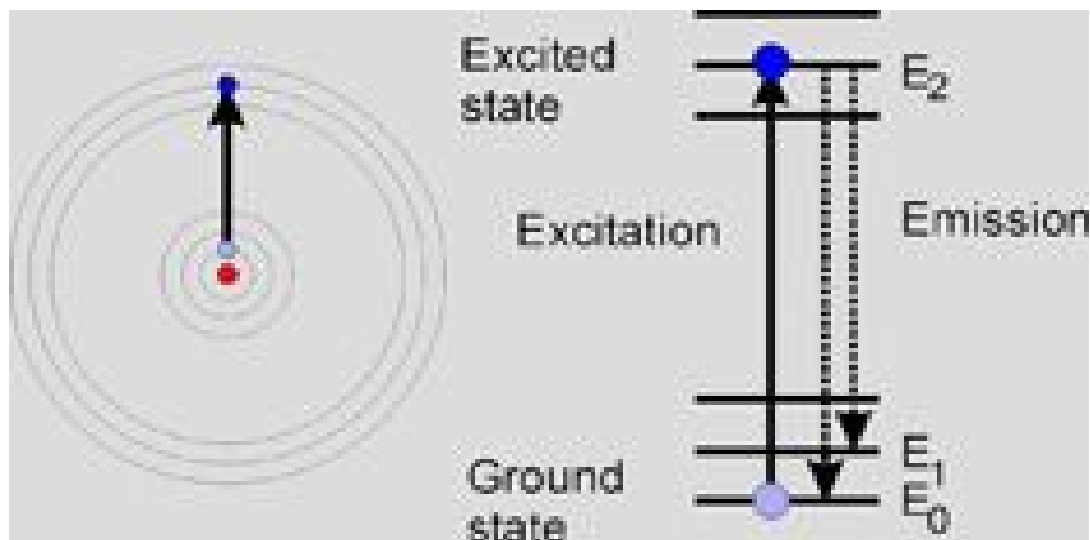


Рис. 3.8. Перехід електрона по енергетичних рівнях.

Атомні спектри можна пояснити на прикладі моделі атома Н. Бора та квантово-механічної (орбітальної) теорії. Атоми складаються з одного позитивно зарядженого ядра, на його орбіті втримуються негативно заряджені електрони. Чим далі від ядра, тим більш високий енергетичний рівень цих електронів. При підведенні термічної або електричної енергії (наприклад, полум'я або іскри) електрони приймають додаткову енергію і

потрапляють на наступний орбітальний рівень. Через короткий час (наносекунди) електрони повертаються назад і віддають при цьому зайву енергію, наприклад, у вигляді випромінювання.

Атомні спектри є лінійчатими, тобто складаються з окремих спектральних ліній, що характеризуються частотою випромінювання ν , яка відповідає квантовому переходу між рівнями енергії E_i і E_k атома згідно зі співвідношенням: $h \cdot \nu = E_i - E_k$, де h -постійна Планка. Спектральні лінії можна характеризувати також довжиною хвилі $\lambda = c/\nu$ (c – швидкість світла), хвильовим числом $1/\lambda = \nu/c$ і енергією фотона $h \nu$. Частоти спектральних ліній виражають у сек^{-1} , довжини хвиль – у нм і мкм, хвильові числа – у см^{-1} , енергії фотонів – в еВ. Типові атомні спектри спостерігаються у видимій, УФ- і близькій ІЧ-областях спектра. Спектри випускання, або емісійні, одержують при збудженні атомів різними способами (фотонами, електронним ударом і т.д.), спектри поглинання або абсорбційні – при проходженні електромагнітного випромінювання.

Атомні спектри мають виражену індивідуальність: кожному елементу відповідає свій спектр нейтрального атома (так званий дуговий спектр).

Вид спектра залежить як від електронної будови даного атома, так і від зовнішніх умов: температури, тиску, напруженості електричного і магнітного полів і т.п.

Індивідуальність атомних спектрів використовують для якісного визначення елементного складу речовини, а залежність інтенсивності ліній від концентрації випромінюючих атомів – для кількісного аналізу.

Молекулярні спектри – спектри поглинання, випускання або розсіювання, що виникають при квантових переходах молекул з одного енергетичного стану в інший. Молекулярні спектри визначаються складом молекули, її структурою, характером хімічного зв'язку і взаємодією із зовнішніми полями, навколишніми атомами та молекулами. Відповідно з трьома системами рівнів енергії в молекулі (електронна, коливальна і оберտальна), молекулярні спектри складаються із сукупності електронних, коливальних і обертальних спектрів і лежать у широкому діапазоні електромагнітних хвиль – від радіочастот до рентгенівської області спектра.

Електронні переходи супроводжуються зміною коливальної енергії молекули, а при коливальних переходах змінюється і обертальна енергія. Тому найчастіше електронний спектр являє собою систему електронно-коливальних смуг. Інтенсивність ліній і смуг у молекулярних спектрах визначається імовірністю відповідного квантового переходу. Найбільш інтенсивні лінії відповідають переходу, дозволеному обома правилами. До молекулярних спектрів відносять також і рентгенівські спектри молекул.

Чисто **електронні молекулярні спектри** виникають при зміні електронної енергії молекул, якщо при цьому не змінюється коливальна та обертальна енергії. Електронні молекулярні спектри спостерігаються як при поглинанні (спектри поглинання), так і при випусканні (спектри люмінесценції). При електронних переходах звичайно змінюється

електричний дипольний момент молекули. В спектрах поглинання спостерігаються переходи з основного електронного стану в збуджений електронний стан. Оскільки електричний дипольний момент не залежить від спіна, то при електронному переході спін повинен зберігатися, тобто дозволені тільки переходи між станами з однаковою мультиплетністю.

3.3. Спектральний аналіз

Спектральний аналіз – це сукупність методів визначення елементного і молекулярного складу та будови речовин за їх спектрами. За допомогою спектрального аналізу визначають як основні компоненти, що становлять 50-60% речовини аналізованого об'єкту, так і незначні компоненти. Це розповсюджений аналітичний метод, що застосовується у багатьох галузях промисловості.

Спектральний аналіз класифікують за метою аналізу і типами спектрів. В атомному спектральному аналізі (АСА) визначають елементний склад зразка за атомними (іонними) спектрами випускання і поглинання. В молекулярному спектральному аналізі (МСА) – молекулярний склад речовини за молекулярними спектрами поглинання, випускання, відбиття, люмінесценції і комбінаційного розсіювання світла. Емісійний спектральний аналіз проводять за спектрами випускання збуджених атомів, іонів і молекул. Абсорбційний спектральний аналіз здійснюють за спектрами поглинання аналізованих об'єктів.

Атомний спектральний аналіз. Розрізняють два основних варіанти атомного спектрального аналізу – атомно-емісійний (АЕСА) і атомно-абсорбційний (ААА).

Атомно-емісійний спектральний аналіз заснований на залежності інтенсивності спектральної лінії випускання (емісії) певного елемента від його концентрації в аналізованому об'єкті.

Атомно-емісійна спектроскопія (спектрометрія) або атомно-емісійний спектральний аналіз — спектральний метод елементного аналізу, заснований на вивченні спектрів випромінювання вільними атомами та іонами у газовій фазі в області довжин хвиль 150-800 нм. Це метод визначення хімічного складу речовини за спектром випромінювання його атомів під впливом джерела збудження. Збудження атомів відбувається при переході одного або кількох електронів на більш віддалений енергетичний рівень. У нормальному стані (незбудженому) атом має найменшу енергію E_0 . У збудженому (нестійкому) стані атом може перебувати дуже короткий час ($\approx 10^{-7} - 10^{-8}$ с) і завжди прагне повернутися в нормальний незбуджений стан. При цьому атом віддає надлишкову енергію у вигляді випромінювання фотона.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (3.5)$$

де E_2 , E_1 – енергія верхнього і нижнього рівня; ν – частота; c – швидкість світла; λ – довжина хвилі випромінювання; h – постійна Планка.

Для переходу атома на більш високий енергетичний рівень йому

необхідно передати енергію, яка називається потенціалом збудження. Найменша енергія необхідна для відриву від незбудженого атома його зовнішнього валентного електрона називається *потенціалом іонізації* (енергія збудження).

В основі оптичної спектроскопії лежать відкриття Ньютона (розклав біле світло в райдужну смужку – спектр), і роботи німецького фізика Фраунгофера (виявив у спектрі Сонця вузькі темні лінії, та встановив, що вони викликані поглинанням світла у верхніх шарах сонячної атмосфери, а також уперше точно виміряв довжину світлових хвиль).

Атомно-абсорбційний аналіз (ААА) заснований на залежності аналітичного сигналу від концентрації (закон Бугера - Ламберта - Бера). Абсорбційний спектральний аналіз – вивчення спектрів поглинання досліджуваної речовини. Розрізняють дослідження в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях спектра. Абсорбційний спектральний аналіз включає методи:

- спектрофотометричний;
- колориметричний.

Спектрофотометрія – визначення спектра поглинання або вимірювання світлопоглинання при певній довжині хвилі, яка відповідає максимальному поглинанню досліджуваної речовини.

ААА з полум'яною атомізацією широко застосовується в промисловості для визначення лужних, лужноземельних металів, срібла, міді, заліза, марганцю, при визначенні мікрокількостей металів. За допомогою цього методу реєструються $\sim 10^{-13}$ - 10^{-14} г, при масі проби 0,001 - 0,005 г це становить 10^{-8} - 10^{-9} %. Найбільш чутливим є аналіз з лазерним збудженням спектра (для цього застосовують лазери на барвниках). Чутливість виявлення елементів при лазерному збудженні надзвичайно висока.

Молекулярний спектральний аналіз. За допомогою молекулярного спектрального аналізу (МСА) здійснюють якісне (ідентифікація) та кількісне визначення індивідуальних речовин або речовини в сумішах. Це можуть бути відома молекулярна речовина, нові стабільні і нестабільні молекули та частки (іони, радикали та ін.). Методом МСА досліджують речовини в будь-яких агрегатних станах, розчинах, плазмі, адсорбційному шарі і т.д. в широкому діапазоні температур (від близьких до абсолютного нуля – до сотень і тисяч градусів). Інформативність методу визначається строгою індивідуальністю спектра молекул, а комбінація методів аналізу за кількома видами спектрів ще більше підвищує надійність визначення сполуки аналізованої проби.

Молекулярний спектр є однозначною характеристикою молекули, визначається її властивостями в цілому, її структурою та властивостями атомів, що входять до складу молекули. У МСА використовують електронні спектри (спектри поглинання в УФ-й, видимій областях, спектри люмінесценції), коливальні спектри (ІЧ-спектри поглинання і випускання, спектри рентгенівські, спектри ядерного магнітного резонансу (ЯМР), електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) та інші види спектрів.

Вимірювання можуть проводитися в широкому діапазоні довжин хвиль – від 10^{-12} м (γ -випромінювання) до 10^3 м (радіохвилі; діапазон частот 10^{18} - 10^6 Гц).

Чутливість МСА зросла завдяки застосуванню лазерів, а також за рахунок використання нових методів реєстрації спектрів (багатоканальні методи, у першу чергу фур'є-спектроскопія, фотоакустична спектроскопія) і застосування низьких температур (матрична ізоляція, надзвукові молекулярні пучки та ін.). У деяких випадках МСА дозволяє визначати речовини в кількості до 10^{-12} г.

Люмінесцентний МСА – методи дослідження об'єктів, при яких реєструється або власне світіння досліджуваного об'єкта, або світіння люмінофорів, якими обробляється досліджуваний об'єкт.

Люмінесценція — нетеплове світіння речовини, що відбувається після поглинання нею енергії збудження. Важливою особливістю люмінесценції є здатність проявлятися при більш низьких температурах, тому що не використовує теплову енергію випромінюючої системи. За це люмінесценцію часто називають «холодним світінням».

Типи люмінесценції. Люмінесцентне світіння тіл прийнято поділяти на наступні види:

- *фотолюмінісценція* – світіння під дією світла (видимого або УФ-діапазону), яке поділяється на:
 - флуоресценцію (час життя 10^{-9} - 10^{-6} с) – утворення люмінісціюючих комплексних сполук елементів з органічними реагентами;
 - фосфоресценцію (10^{-3} -10 с) має велику селективність, оскільки лише деякі катіони утворюють із органічними реагентами фосфоресціюючі комплекси;

- *хемілюмінісценція* – заснована на світінні, що виникає в результаті окисно-відновних реакцій органічних речовин з катіонами перехідних металів. Межа виявлення $10^{-7}\%$. Застосування лазерів дозволяє знизити межі виявлення елементів до $10^{-13}\%$;

- *катодолюмінісценція* – викликана опроміненням швидкими електронами (катодними променями);

- *сонолюмінісценція* – люмінесценція, викликана звуком високої частоти;

- *рентгенолюмінесценція* – світіння під дією рентгенівських променів; радіолюмінісценція – при збудженні молекул речовини γ -випромінюванням.

Люмінісценція вперше була описана в 1577 р. іспанським лікарем і ботаніком Ніколасом Монардесом як специфічне світіння розчину. В 1852 р. Стокс встановив зв'язок між інтенсивністю флуоресценції і концентрацією. Він же запропонував використання флуоресценції для хімічного аналізу. Перший приклад практичного визначення Al (III) за люмінесценцією його комплексів з морином опублікував Гоппельшредер в 1867 р. Він запропонував термін «люмінісцентний аналіз».

Багато форм природної люмінесценції були відомі людям здавна. Наприклад, світіння комах (світлячки), світіння морських риб і планктону, полярне сяйво, світіння дерева, що гниє, та інших органічних речовин при розкладанні. Існує багато штучних способів збудження люмінесценції.

Тверді та рідкі речовини, здатні люмінісцювати, називають *люмінофорами* (від лат. *lumen* – світло й грец. *phoros* – несучий).

Спектр люмінесценції, як правило, зміщений щодо спектра поглинання в сторону довгих хвиль. Дане правило прийнято пояснювати втратою на тепловий рух молекул деякої частини поглинутої енергії. Незалежно від способу збудження і довжини хвилі світла, що викликала збудження, спектр люмінесценції залишається незмінним при даній температурі.

Люмінесцентний МСА складається з якісного і кількісного хімічного люмінесцентного аналізу, при якому виявляють присутність або визначають вміст окремих речовин у суміші, а сортовий люмінесцентний аналіз дозволяє розділяти об'єкти по наявності або відсутності люмінесценції. У люмінесцентному аналізі використовують всі види збудження люмінесценції, але найчастіше – фотозбудження, що здійснюється за допомогою газорозрядних ламп, електричної іскри або лазерного випромінювання.

Чутливість хімічного люмінесцентного аналізу дуже велика і дозволяє виявляти домішки деяких, зокрема органічних, речовин у концентрації до 10^{-10} - 10^{-11} г/см³. У газовій фазі вдається реєструвати окремі атоми.

Люмінесцентний метод аналізу охоплює широке коло методів визначення різноманітних об'єктів: від простих іонів і молекул – до високомолекулярних сполук і біологічних об'єктів. Для складних зразків люмінесцентний аналіз поєднується з хімічними методами (хроматографія, електрофорез) або з біологічними методами (імуноаналіз, метод полімеразної ланцюгової реакції).

Цей метод застосовується для кількісного визначення вітамінів, антибіотиків, хлорофілу, поліциклічних ароматичних вуглеводнів в екстрактах рослин, ґрунтів, продуктів харчування з межею виявлення 10^{-7} – 10^{-8} %. Використовується також для люмінесцентної мікроскопії при імунохімічному аналізі визначення антитіл, гормонів, лікарських препаратів, антигенів за концентрацією комплексу антиген-антитіло.

Флуоресцентний МСА заснований на порівнянні спектрів світіння розчину досліджуваної речовини зі світінням еталонних розчинів близької концентрації. Метод має високу чутливість.

Флуоресценція – це короткотривала люмінесценція. Тривалість існування такого збудженого стану складає 10^{-11} – 10^{-6} с. Флуоресценцією звичайно називають випромінювальний перехід збудженого стану із самого нижнього синглетного коливального рівня S_1 в основний стан S_0 . Виникає внаслідок опромінення речовини світлом, іонізуючим промінням, при хімічних реакціях.

Застосування. Флуоресцентний аналіз рідких, твердих та порошкоподібних проб використовується в фармацевтичній, харчовій промисловості та при виробництві косметичних препаратів:

- для контролю виробничих процесів очищення та сепарації;
- при виробництві рослинних олій, спиртів та ін.;
- при керуванні технологічними процесами, стабільністю виробництва.

3.4. Спектрометрія кругового дихроїзму

Дихроїзм, інтерференційний дихроїзм – здатність матеріалу або оптичної системи ділити світловий потік на дві або більше частини за довжиною хвилі світлового випромінювання (кольору) з малими щодо величини вихідного потоку втратами.

Круговий дихроїзм оптично активних молекул — залежність коефіцієнта поглинання світла від напрямку кругової поляризації. Ефект відкритий в 1911 році, іноді називається «ефектом Коттона».

Метод кругового дихроїзму заснований на вимірюванні різниці поглинання ліво- і правополяризованого світла. Така оптична активність є мірою хіральності молекул, або мірою їх асиметрії. У далекій ультрафіолетовій області (від 190 до 240 нм) круговий дихроїзм визначається в основному поглинанням амідів карбонільних груп поліпептидного кістяка. При наявності ділянок вторинної структури спектр кругового дихроїзму має певні характеристики, пов'язані з особливостями електронного оточення амідних груп у цих структурах.

Застосування методу кругового дихроїзму:

- вивчення згортання білків;
- конформаційних досліджень білків;
- взаємодії ДНК/РНК;
- у ферментативній кінетиці;
- визначення чистоти оптично активних субстанцій;
- кількісного аналізу фармацевтичних препаратів;
- дослідження макромолекул.

3.5. Рентгенівський структурний аналіз

Рентгенівський структурний аналіз (рентгеноструктурний аналіз) – методи дослідження атомної будови речовини за розподілом в просторі та інтенсивністю розсіяного на аналізованому об'єкті рентгенівського випромінювання. За допомогою рентгеноструктурного аналізу досліджують неорганічні та органічні сполуки, білки, нуклеїнові кислоти, віруси.

Рентгенофлуоресцентна спектрометрія – метод аналізу, що використовується для визначення концентрації елементів від берилію до урану в діапазоні від 0,0001% до 100% у речовинах різного походження.

При аналізі однієї речовини методом рентгенівської спектрометрії можуть бути отримані результати різного типу.

- Кількісний аналіз (визначення концентрації заданого набору елементів) характеризується високою відтворюваністю результатів при дуже високій чутливості. В основі кількісного аналізу лежить залежність інтенсивності характеристичного випромінювання від довжини хвилі.

- Якісний аналіз (знаходження елементів, що входять до складу проби). Основою якісного аналізу є присутність або відсутність ліній характеристичного випромінювання елемента в спектрі проби. Елемент вважається присутнім у зразку в тому випадку, коли в спектрі виявлені як мінімум дві лінії його характеристичного випромінювання. Виявлення ліній елементів проводиться шляхом знаходження довжин хвиль піків спектра й пошуку знайдених значень у базі даних рентгенівських ліній.

- Напівкількісний аналіз (експрес-визначення якісної і кількісної характеристики проби) проводиться у випадку невідомої речовини, коли за дуже короткий час потрібно з'ясувати зразкові концентрації всіх елементів, що присутні у пробі.

- Ідентифікація речовини (співставлення невідомої речовини з еталоном). Даний вид аналізу проводиться при необхідності ототожнення сполуки й деяких фізичних властивостей двох зразків, один з яких є еталоном. Такий вид аналізу важливий при пошуку будь-яких відмінностей у складі двох зразків. У рентгенівській спектрометрії є можливості провести детальне порівняння зразків не тільки по характеристичних спектрах елементів, але і за інтенсивністю фоновому випромінювання.

Рентгенофлуоресцентний аналіз (РФА) – один із сучасних методів дослідження речовини з метою одержання її елементного складу, тобто елементного аналізу. Метод РФА оснований на аналізі спектра, отриманого шляхом впливу на досліджуваний матеріал рентгенівського випромінювання.

Рентгенофлуоресцентний аналіз широко використовується в різних галузях промисловості. У харчовій промисловості цим методом користуються для визначення токсичних металів у харчових інгредієнтах.

3.6. Ультрафіолетова спектроскопія

Ультрафіолетова спектроскопія (УФ-спектроскопія) – розділ оптичної спектроскопії, що включає одержання, дослідження та застосування спектрів випускання, поглинання та відбиття в УФ-області спектра (400 – 10 нм). Дослідженням спектрів в області 200 – 10 нм займається *вакуумна спектроскопія*.

Поглинання в близькій УФ- і видимій областях спектра пов'язане з наявністю в молекулі ненасичених зв'язків і атомів з неподіленими парами електронів. Групи атомів, які призводять до поглинання в близькій УФ-області (200 – 400 нм) і видимої (400 – 750 нм) області спектра, називаються *хромофорами*.

У якості джерел освітлення для УФ-області у спектрофотометрах використовують лампи з дуговим розрядом, наповнені дейтерієм або воднем. Водневі або дейтерієві лампи випромінюють енергію у вигляді безперервного спектра в області 185 – 375 нм. Для роботи у видимій області використовують лампи розжарювання, випромінювання яких лежить в області 320 – 1100 нм.

Спектрофотометр призначений для вимірювання пропускання або оптичної щільності різних рідких і твердих прозорих речовин в області спектра від 220 до 1100 нм.

Лампа випромінювання за допомогою системи дзеркал фокусується на вхідну щілину монохроматора. Далі пучок світла потрапляє на диспергуючу поворотну призму, виготовлену з високоякісного оптичного кварцу, яка розкладає випромінювання в спектр. Випромінювання з потрібною довжиною хвилі "вирізається" із суцільного спектра вихідною щілиною. Обертаючи призму монохроматора, можна одержувати на виході з нього світло різних довжин хвиль, яке, пройшовши через зразок або еталон, потрапляє на світлочутливий шар фотоелемента.

Застосування УФ-спектроскопії. Вивчення спектрів випускання, поглинання та відбиття в УФ-області дозволяє визначати електронну структуру атомів, молекул, іонів, твердих тіл. На фотоефекті, що викликається УФ-випромінюванням, заснована *фотоелектронна спектроскопія*. УФ-промені можуть порушувати хімічні зв'язки в молекулах, у результаті чого можуть виникати різні фотохімічні реакції (окиснення, відновлення, полімеризація і т.д.), що є основою фотохімії.

УФ-випромінювання поглинається верхніми шарами тканин рослин, шкірою людини або тварин. При цьому відбувається хімічна зміна молекул біополімерів. Малі дози УФ-випромінювання сприяють утворенню вітамінів групи D.

Спектрофотометрія у видимій області та УФ-областях дозволяє оцінювати ступінь чистоти речовини, ідентифікувати різні сполуки, визначати константи дисоціації кислот і основ, досліджувати процеси комплексоутворення.

Фізичним методом технологічної обробки м'ясопродуктів є *ультрафіолетове опромінення*. Стерилізуюча дія ультрафіолетових променів проявляється в основному на поверхні продукту (на глибині до 0,1 мм), що має особливе значення для м'яса, яке відразу після забою всередині не містить мікроорганізмів і є промислово-стерильним, але ззовні вже обнасінене небажаною мікрофлорою.

Тому УФ лампи найчастіше використовують на холодильниках для опромінення туш м'яса, призначених для тривалого зберігання. Застосовують ультрафіолетове опромінення і для стерилізаційної обробки ковбас, води, повітря та розсолів.

3.7. Інфрачервона спектроскопія

Інфрачервона спектроскопія – один з фізичних методів дослідження будови і аналізу органічних та неорганічних речовин. Інфрачервоний спектр характеризується комбінаційними обертовими коливаннями С-Н, N-Н, О-Н зв'язків, що є особливістю інфрачервоної спектроскопії. Тому інфрачервоні спектри більшої частини речовин індивідуальні – так само, як і спектри сумішей з різним вмістом компонентів. Особливо цікава і зручна для кількісного аналізу спектроскопія близької інфрачервоної області. Саме ці спектри використовують для одночасного визначення вмісту кількох компонентів. Кожна речовина поглинає ІЧ-випромінювання специфічно. Інакше кажучи, ІЧ-спектр є однозначною характеристикою речовини.

Ступінь поглинання ІЧ-випромінювання визначається коефіцієнтом поглинання k у законі Ламберта-Бера:

$$I_0 = I \cdot e^{-k \cdot c \cdot l} \quad (3.6)$$

Інтенсивність спектральних смуг оцінюється або максимумом смуги поглинання, або площею під кривою поглинання (інтегральна інтенсивність). Можна одержати ІЧ-спектри речовин, що перебувають у будь-якому агрегатному стані.

Застосування ІЧ-спектроскопії. В інфрачервоній спектроскопії найбільш широкого поширення набуло дослідження ІЧ-спектрів поглинання, які виникають у результаті поглинання ІЧ-випромінювання при проходженні через речовину. Це поглинання носить селективний характер і відбувається на тих частотах, які збігаються з деякими власними частотами коливань атомів у молекулах речовини або із частотами обертання молекул як цілого, а у випадку кристалічної речовини — із частотами коливань кристалічної решітки. У результаті інтенсивність ІЧ-випромінювання на цих частотах різко падає — утворюються смуги поглинання.

Інфрачервоні (ІЧ) спектри є характеристичними. Наявність в спектрах смуг поглинання дозволяє розшифрувати структуру молекул речовини, їх хімічний склад. Внаслідок однозначності зв'язку між будовою молекули і її молекулярним спектром ІЧ-спектроскопія широко використовується для якісного і кількісного аналізу сумішей різних речовин.

Інфрачервона спектроскопія знаходить застосування в дослідженні будови полімерів, біологічних об'єктів і безпосередньо живих клітин, а також з медичною метою. Швидкодіючі спектрометри дозволяють одержувати спектри поглинання за долю секунди і використовуються при вивченні хімічних реакцій.

Інфрачервоні аналізатори призначені для дослідження зразків, типових для харчової (спирти, м'ясо, оливки, жирівмісні, м'ясні та молочні продукти), фармацевтичної, косметичної промисловостей, полімерів, побутової хімії та інших матеріалів. Ці прилади працюють в близькому інфрачервоному діапазоні та здатні проникати в капілярно-пористі продукти на глибину 7 мм і призначені для аналізу хімічного складу й вимірювання вологості цільного

зерна, круп, борошна, насіння олійних культур, харчових продуктів, хімічних речовин і фармацевтичних матеріалів.

Розроблена аналітична система з використанням інфрачервоного випромінювання для швидкісного сортування гібридного насіння (кукурудзи, сої, кави, кавунів, арахісу), що сортує зі швидкістю до 60 насінин на хвилину за такими критеріями як вміст у насінні масла, білку, крохмалю, вологи, цукру, ненасичених органічних кислот, причому вимірювання проводиться паралельно за всіма параметрами. Аналізатор дозволяє прогнозувати проростання насіння сільськогосподарських культур. Такий аналізатор використовується в харчовій промисловості для потокового сортування плодів і фруктів (яблук, груш), визначення цукристості плодів.

За допомогою інфрачервоного випромінювання проводять стерилізацію харчових продуктів з метою їх дезінфекції.

Найбільш актуальним і перспективним у промисловому застосуванні є сушильне устаткування із використанням інфрачервоного випромінювання. Сфера застосування такого устаткування досить велика: сушіння овочів, фруктів, м'яса, риби, круп, макаронів, комбікормів, сировини фармацевтичної промисловості тощо.

У харчовій промисловості ІЧ-спектроскопію також застосовують для визначення змісту транс-ізомерів жирних кислот (ненатуральні жири рослинного походження зі зміненою структурою молекул).

Інфрачервоні Фур'є-спектрометри являють собою ефективний аналітичний прилад для дослідження хімічного складу та контролю якості субстанцій і готових лікарських форм, що дозволяє визначити:

- автентичність (істинність) субстанції за стандартним спектром;
- якісний та кількісний аналіз вихідних речовин і продуктів синтезу;
- провести ідентифікацію і контроль якості сировини;
- провести контроль якості готових лікарських форм.

ІЧ-нагрівання. Більшість видів готової продукції перед випуском у реалізацію піддають різним способам теплової обробки. Термічні процеси, як правило, дуже тривалі і скоротити їх не можливо. Саме тому технологи та фізики постійно займаються вдосконаленням умов термообробки м'ясопродуктів на базі використання електрофізичних методів. До таких методів у першу чергу відносять нагрівання продуктів енергією інфрачервоного випромінювання (ІЧ-нагрівання).

Комплексні дослідження з вивчення теоретичних характеристик і кінетики процесів теплової обробки м'ясопродуктів, а також визначення впливу ІЧ-випромінювання різного спектрального діапазону на фізико-хімічні, мікробіологічні та структурно-механічні властивості готових виробів дозволяють використовувати ІЧ-обробку для одержання запечених м'ясопродуктів. При цьому досягається не тільки скорочення загальної тривалості термообробки, високий вихід та якість виробів, але й зниження витрат на їх виготовлення.

3.8. Фотометричний аналіз

Фотометричний аналіз – це сукупність методів якісного і кількісного аналізу за інтенсивністю інфрачервоного (ІЧ), видимого та ультрафіолетового (УФ) випромінювання, що включає атомно-абсорбційний аналіз, люмінесцентний аналіз, молекулярно-абсорбційний спектральний аналіз, спектрофотометрію, фотометрію полум'я, турбідиметрію, нефелометрію.

Закони поглинання світла.

Закон Бера. Вивчаючи поглинання світла розчинами, Бер встановив, що коефіцієнт поглинання k пропорційний концентрації поглинаючої речовини:

$$k = E \cdot c \quad (3.7)$$

де, E – коефіцієнт, що не залежить від концентрації;

c – концентрація речовини.

Якщо концентрація c виражена в г-моль/л, а товщина поглиненого шару l – у см, то коефіцієнт E називають молярним коефіцієнтом погашення. Він являє собою постійну величину, що залежить від довжини хвилі падаючого світла, природи розчиненої речовини, природи розчинника, температури розчину і відповідає погашенню молярного розчину аналізованої речовини.

Якщо світловий потік пропустити через кювету з розчином (рис. 3.9), який поглинає світло, то вихідний світловий потік буде менш інтенсивним, ніж вхідний.

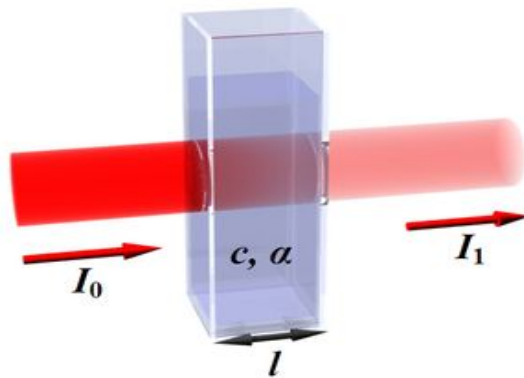


Рис. 3.9. Проходження світлового потоку через кювету з розчином

Ослаблення світлового потоку пов'язане із частковим поглинанням та частковим відбиттям. Співвідношення між інтенсивністю падаючого світлового потоку I_0 , світлового потоку що пройшов через розчин I , поглинутого I_t і відбитого $I_{\text{відб}}$ можна виразити в такий спосіб:

$$I_0 = I + I_t + I_{\text{відб}} \quad (3.8)$$

Інтенсивність відбитої частини світлового потоку невелика і нею можна зневажити. Тоді

$$I_0 = I + I_t \quad (3.9)$$

Звідси можна виміряти інтенсивність падаючого світлового потоку і світлового потоку, що пройшов через розчин.

Закон Бера розглядає зміну поглинання світлового потоку шаром постійної товщини при зміні концентрації, а закон Бугера-Ламберта – зміну поглинання світлового потоку розчином постійної концентрації при зміні товщини поглинаючого шару.

Ці закони аналогічні один одному. Поєднуючи ці закони ($I_t = I_0 e^{-k'l}$ і $k = E \cdot c$), одержимо рівняння основного закону поглинання світла - закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$I_t = I_0 e^{-kcl} \quad (3.10)$$

де, I_t – інтенсивність паралельного монохроматичного пучка світла на виході з розчину;

I_0 – інтенсивність вхідного пучка,

l – довжина оптичного шляху променя, що проходить через розчин, в см (товщина кювети),

k – коефіцієнт поглинання,

c – концентрація,

a – показник поглинання розчину – коефіцієнт, що показує властивості речовини і залежний від довжини хвилі λ світла, що поглинається.

За законом Бугера-Ламберта-Бера інтенсивність паралельного монохроматичного пучка світла, тобто світла певної довжини хвилі, при поширенні його в поглинаючому середовищі зменшується.

Із закону Бугера-Ламберта випливає, що:

а) відношення світлового потоку, що пройшов через шар розчину, до інтенсивності падаючого світлового потоку не залежить від абсолютної інтенсивності падаючого світлового потоку;

б) якщо товщина шару розчину збільшується в арифметичній прогресії, інтенсивність світлового потоку, що пройшов через нього, зменшується в геометричній прогресії.

Відношення інтенсивності світлового потоку, що пройшов через розчин I_t , до інтенсивності падаючого світлового потоку називається коефіцієнтом пропускання, і позначається буквою T :

$$T = \frac{I_t}{I_0} = 10^{-\epsilon c l} \quad (3.11)$$

Значення коефіцієнта пропускання залежить не тільки від властивостей вимірюваного розчину (показника заломлення і показника поглинання, однорідності, форми та стану поверхні), але й від довжини хвилі та умов вимірювання.

Логарифм величини, зворотної пропусканню, називається поглинанням (екстинкція) (E) або оптичною щільністю (D):

$$E = D = \lg \frac{I_0}{I_t} = \lg \frac{I_0}{I_t} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (3.12)$$

де, ε – молярний коефіцієнт світлопоглинання;

c – концентрація розчину, моль/л;

l – товщина шару розчину, через який проходить світловий потік, см.

Отже, поглинання (екстинкція) E або оптична щільність D прямо пропорційна концентрації речовини в розчині.

Молярний коефіцієнт світлопоглинання ε залежить від довжини хвилі, температури розчинника і не залежить від товщини поглинаючого шару та концентрації розчиненої речовини. Він відображає індивідуальні властивості речовини та має різне значення для різних речовин. Величина молярного коефіцієнта світлопоглинання є найбільш важливою й об'єктивною характеристикою чутливості фотометричного методу.

Законом Бугера - Ламберта - Бера, звичайно, можна користуватися для кількісних визначень у будь-якій області електромагнітного спектра, але найчастіше його застосовують до області електронних переходів, тобто до видимої та УФ-областей спектра. Звичайно спектральними методами вдається провести кількісні визначення концентрації з помилкою близько 2%. Інтервал концентрацій, зручний для цих вимірів, залежить від величини коефіцієнта молярного поглинання аналізованої речовини.

3.9. Спектрофотометрія

Спектрофотометрія – метод дослідження та аналізу речовин, заснований на вимірюванні спектрів поглинання в області електромагнітного випромінювання. Іноді під спектрофотометрією розуміють розділ фізики, що поєднує спектроскопію (науку про спектри електромагнітного випромінювання), фотометрію і спектрометрію (теорію та практику вимірювання інтенсивності та довжини хвилі (або частоти) електромагнітного випромінювання). На практиці спектрофотометрію часто ототожнюють із оптичною спектроскопією. За типом досліджуваних систем спектрофотометрію, звичайно, поділяють на молекулярну і атомну. Розрізняють спектрофотометрію в ІЧ, видимій і УФ областях спектра.

Застосування спектрофотометрії в *УФ і видимій областях* спектра засноване на поглинанні електромагнітного випромінювання сполуками, що містять хромофорні або ауксохромні групи. Поглинання випромінювання в цих областях пов'язане зі збудженням електронів s-, p- і n-орбіталей основного стану та переходами молекул у збуджений стан.

В *ІЧ області* проявляються переходи між коливальними й обертальними рівнями. Серед частот коливань молекул виділяють характеристичні, які практично постійні за величиною і завжди проявляються в спектрах хімічних сполук, що містять певні функціональні групи. Теорія коливань складних молекул дозволяє розрахунковим шляхом передбачити коливальний спектр сполук, тобто визначити частоти та інтенсивність смуг поглинання.

Для вимірювання спектрів використовують спектральний прилад – *спектрофотометр*, основною частиною якого є: джерело випромінювання, диспергуючий елемент, кювета з досліджуваною речовиною та реєструючий пристрій. У якості джерела випромінювання застосовують дейтерієву лампу (в УФ-області) або вольфрамову лампу розжарювання (у видимій і близькій ІЧ областях). Диспергуючим елементом приладу є призменний монохроматор або монохроматор з дифракційними решітками. Спектр одержують у графічній або цифровій формах.

Для дослідження спектрів в далекій ІЧ-області використовують спектрофотометри, що працюють в інтервалі від 1,0 до 50 мкм (від 10000 до 200 см^{-1}). Основними джерелами випромінювання в них є стрижень із кремнію, штифт із суміші оксидів цирконію, торію та ітрію та спіраль із ніхром. Приймачами випромінювання служать термопари (термоелементи), різні моделі оптико-акустичних приладів і піроелектричні детектори. У спектрофотометрах, сконструйованих за класичною схемою, у якості диспергуючих елементів застосовують призменний монохроматор або монохроматор з дифракційними решітками.

Виготовляють також ІЧ фур'є-спектрофотометри, які мають унікальні характеристики: роздільну здатність – до 0,001 см^{-1} , точність визначення хвильового числа до 10^{-4} см^{-1} , час сканування спектра може досягати 1 с, відношення сигнал/шум перевищує 10^5 . Ці прилади дозволяють вивчати зразки масою менше 1 нанограма.

Полум'яна фотометрія – оптичний метод кількісного елементного аналізу за атомними спектрами випускання. Для одержання спектрів аналізовану речовину переводять в пари, що складаються з атомів досліджуваної речовини, які знаходяться в полум'ї.

Термічна полум'яна фотометрія – різновид атомного емісійного спектрального аналізу. У цьому методі аналізований розчин у вигляді аерозолі вводять у полум'я горючої суміші повітря або N_2O з вуглеводнями (пропаном, бутаном, ацетиленом). При цьому розчинник і солі металів випаровуються та дисоціюють на вільні атоми. Атоми металів, що й утворювали молекули оксидів і гідроксидів збуджуються й випромінюють світлову енергію. Із усього спектра випускання виділяють характерну для конкретного елемента лінію за допомогою світлофільтра або монохроматора і вимірюють її інтенсивність, яка служить мірою концентрації даного елемента.

Метод полум'яної фотометрії застосовують для визначення лужних, лужноземельних, а також деяких інших металів, наприклад Ga, In, Tl, Pb, Mn. Межі виявлення лужних металів становлять 0,1 - 0,001 мкг/мл.

Колориметрія (кольорове вимірювання) – методи кількісного вимірювання сили забарвлення розчинів.

Слід відрізнити від калориметрії (від лат. *calor* – тепло і грец. *metreo* – вимірюю) – сукупності методів виміру теплових ефектів (кількості теплоти), що супроводжують фізичні, хімічні та біологічні процеси.

У більшості випадків кольорове відчуття виникає в результаті впливу на око видимого електромагнітного випромінювання з довжинами хвиль λ від 380 до 760 нм. У загальному випадку колір обумовлюється забарвленням і властивостями поверхні предмета, оптичними властивостями джерел світла і середовища, властивостями аналізатора. В таблиці 3.3 наведено довжини хвиль, що використовуються в фотоелектроколориметрах, та колір відповідного фільтра.

Таблиця 3.3

**Довжини хвиль, що використовуються в фотоелектроколориметрах,
та колір фільтра, що їм відповідає**

Спектральний діапазон, нм	Колір
625-740	Червоний
590-625	Оранжевий
565-590	Жовтий
500-565	Зелений
485-500	Блакитний
440-485	Синій
380-440	Фіолетовий

Фотоколориметричне визначення засноване на тому, що світловий потік проходить через кювету з забарвленим аналізованим розчином і, пройшовши через розчин, сприймається фотоелементом. Сила електричного струму, що виникає при дії світлової енергії на фотоелемент, прямо пропорційна інтенсивності освітлення.

Приладами для фотоколориметрії служать фотоелектроколориметри (ФЕК), що характеризуються простотою оптичної та електричної схем. Це двопроменеві прилади, у яких пучок світла від джерела випромінювання (лампа розжарювання або ртутна лампа) проходить через світлофільтр і дільник світлового потоку (призму), який поділяє пучок на два, що направляються через кювети з досліджуваним розчином та з розчином порівняння. Після кювет паралельні світлові пучки проходять через діафрагми, призначені для урівноваження інтенсивності світлових потоків, і потрапляють на два приймачі випромінювання (фотоелементи), підключені за диференціальною схемою до нуля-індикатора. Вимірюваний діапазон оптичної щільності становить близько 0,05 - 3,0, що дозволяє визначати елементи і їх сполуки в широкому інтервалі від $\sim 10^{-6}$ до 50% по масі. Похибка визначення становить близько 5%.

При диференціальному фотометричному аналізі оптична щільність аналізованого розчину вимірюється відносно оптичної щільності (яка повинна бути не менше 0,43) розчину порівняння. Останній містить обумовлений компонент у концентрації, близькій до концентрації цього компонента в аналізованому розчині. Це дозволяє визначати порівняно

більші концентрації речовин з похибкою 0,2 - 1% (у випадку спектрофотометрії). При фотометричному титруванні одержують залежність оптичної щільності розчину, що титрується, від об'єму титранта, який додається (криву титрування). По зламу на цій кривій визначають кінцеву точку титрування та концентрацію досліджуваного компонента в розчині.

Фотометричний метод кількісного аналізу заснований на переведенні обумовленого компонента в сполуку, здатну поглинати світло. Кількість цього продукту реакції встановлюють шляхом вимірювання світлопоглинання.

У фотометричному аналізі застосовують реакції різних типів. Для визначення неорганічних компонентів найчастіше використовують реакції утворення кольорових комплексних сполук, що мають характерні смуги поглинання у видимій, ультрафіолетовій або інфрачервоній областях спектра. Для фотометричного визначення органічних компонентів найчастіше використовують реакції синтезу кольорових сполук.

Час, витрачений на проведення фотометричного аналізу, чутливість методу, його точність і вибірковість залежать, в основному, від вибору хімічної реакції та оптимальних умов утворення забарвленої сполуки.

Розрізняють три групи способів вимірювання концентрації забарвлених сполук в розчині:

1. Візуальне порівняння. Візуально можна встановити рівність інтенсивності забарвлення двох розчинів. Такий спосіб встановлення вмісту забарвленого продукту реакції називають колориметричним аналізом.

2. Поглинання світла вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК). Такий спосіб називають фотоколориметричним аналізом.

3. У спектрофотометрах, крім фотоелемента, за допомогою якого вимірюється ослаблення інтенсивності світлового потоку, є призма або дифракційна решітка, а також щілина. Це дозволяє виділити вузьку ділянку спектра, саме ту його частину, де оптично виявляється зафарбована сполука. Такий спосіб вимірювання поглинання світла спектрофотометром називають спектрофотометричним аналізом.

Існує ряд причин відхилення від закону Бугера-Ламберта-Бера для забарвлених розчинів:

1. Вплив сторонніх електролітів, що змінюють деформацію електронних оболонок іонів, внаслідок чого змінюється поглинання світла і, відповідно, оптична щільність.

2. В забарвлених розчинах сполуки дисоціюють: $AB \leftrightarrow A^+ + B^+$, причому забарвлення іона може відрізнитися від забарвлення молекули. Інтенсивність забарвлення, що залежить від співвідношення концентрацій забарвлених і безбарвних часток, змінюється зі зміною загальної концентрації розчину, тому що при цьому відбувається зміна ступеня дисоціації. У результаті при розведенні або при концентруванні розчинів спостерігаються відхилення від основного закону колориметрії.

3. Багато забарвлених сполук чутливі до концентрації іонів водню і змінюють своє забарвлення зі зміною рН середовища. При колориметрії точне дотримання рН середовища має виняткове значення.

4. Велике значення у відхиленні від основного закону колориметрії має процес комплексоутворення. Одночасно із цим змінюється й молярний коефіцієнт поглинання.

5. Забарвлення сполуки часто змінюється в часі.

6. Інтенсивність забарвлення залежить від температури, яка повинна підтримуватися в межах $\pm 1 - 3^{\circ}\text{C}$.

7. Утворення забарвленої сполуки часто залежить від кількості, порядку додавання і концентрації реактиву.

Оскільки розчини однієї забарвленої речовини при однаковій концентрації і товщині шару поглинають рівну кількість світлової енергії, то, порівнюючи покази чутливого гальванометра у фотоелектроколориметрі (ФЕК) при вимірюванні поглинання стандартного та досліджуваного розчинів, можна за калібрувальною кривою або за законом Бугера - Ламберта - Бера визначити концентрацію речовини в аналізованому зразку.

Для визначення концентрації речовини за допомогою калібрувальної кривої готують серію стандартних забарвлених розчинів, концентрації яких охоплюють область можливих змін концентрації досліджуваного розчину. Потім вимірюють величини їх оптичних щільностей і будують графік залежності оптичної щільності розчину від концентрації розчиненої речовини в координатах $D = f(C)$.

Побудовану криву називають калібрувальним графіком. Для побудови калібрувальної кривої звичайно використовують 5-8 точок зі значеннями концентрації, що відрізняються не менш ніж на 30% (при дотриманні основного закону світлопоглинання).

Концентрації стандартних розчинів вибирають такими, щоб величина оптичної щільності досліджуваного розчину перебувала приблизно в середині калібрувальної кривої. Побудовану калібрувальну криву періодично перевіряють (раз у тиждень, іноді рідше) кількома свіжоприготовленими стандартними розчинами. Визначивши оптичну щільність досліджуваного розчину D_x , знаходять її значення на осі ординат, а потім на осі абсцис – відповідне значення C_x . Вміст речовини g_x (мг) у досліджуваному розчині обчислюють за формулою:

$$g_x = C_x \cdot \frac{V_x}{V_l} \cdot V_{\text{заг}} \quad (3.13)$$

де V_x – об'єм забарвленого досліджуваного розчину, мл;

V_l – об'єм аліквотної частини досліджуваного розчину, узятій для приготування забарвленого розчину, мл;

$V_{\text{заг}}$ – загальний об'єм досліджуваного розчину, мл.

3.10. Рефрактометрія

Рефрактометрія (від лат. *refractus* – переломлений і грец. *metreo* – вимірюю) – метод аналізу, заснований на явищі заломлення світла при проходженні з одного середовища в інше. Заломлення світла, тобто зміна його первісного напрямку, обумовлена різною швидкістю розподілу світла в різних середовищах. При цьому відношення синуса кута падіння променя (α) до синуса кута заломлення (β) для двох дотичних середовищ є величина постійна, та називається показником заломлення (n).

Показник заломлення також дорівнює відношенню швидкостей поширення світла в цих середовищах:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{V_1}{V_2} \quad (3.14)$$

Визначають так званий відносний показник заломлення речовини стосовно повітря приміщення, де проводиться вимірювання.

Показник заломлення n , являє собою відношення швидкостей світла в середовищах, що межують. Для рідин і твердих тіл n звичайно визначають щодо повітря, а для газів – щодо вакууму.

Залежність показника заломлення водяних розчинів деяких речовин від концентрації показано на рис. 3.10.

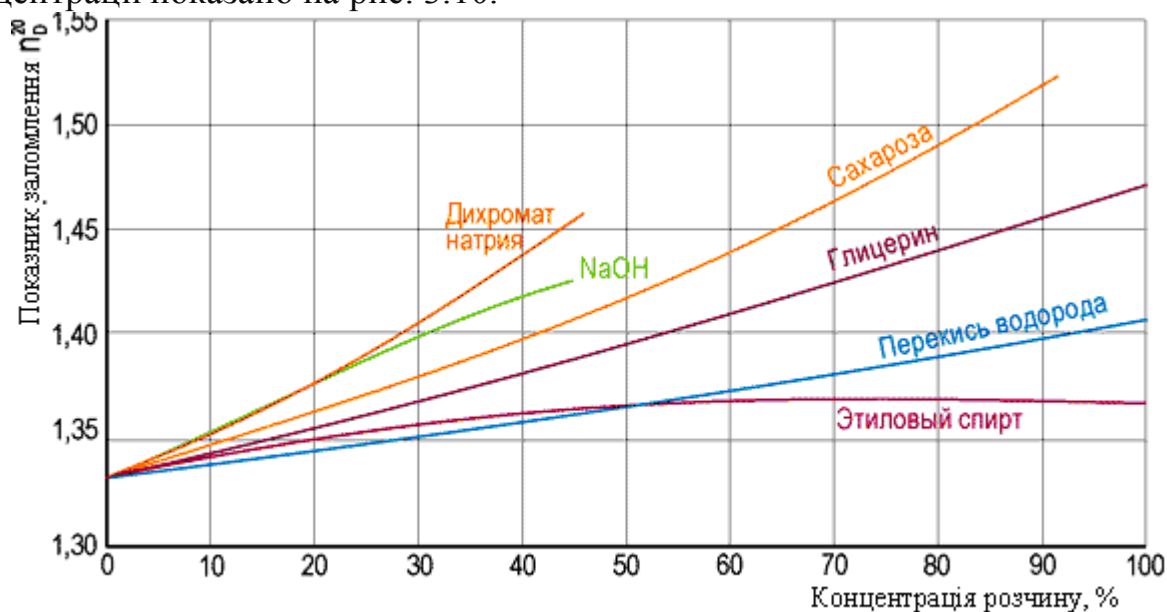


Рис. 3.10. Залежність показника заломлення від природи речовини

Величина показника заломлення залежить від природи речовини, довжини хвилі світла, температури, при якій проводиться вимірювання і концентрації речовини в розчині. Вимірювання показника заломлення проводиться при довжині хвилі світла 589,3 нм (лінія D спектра натрію). Обов'язковою умовою визначення показника заломлення є дотримання температурного режиму. Звичайне визначення виконується при $20 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$.

При підвищенні температури величина показника заломлення зменшується, при зниженні – збільшується.

Вплив температури на показник заломлення визначається двома факторами: зміною кількості часток рідини в одиниці об'єму та залежністю поляризованості молекул від температури. Другий фактор стає істотним лише при дуже великій зміні температури.

Температурний коефіцієнт показника заломлення пропорційний температурному коефіцієнту щільності. Оскільки всі рідини при нагріванні розширюються, то їх показники заломлення зменшуються при підвищенні температури. Температурний коефіцієнт залежить від величини температури рідини, але в невеликих температурних інтервалах може вважатися постійним.

Найпоширеніші рефрактометри Аббе із призменними блоками та компенсаторами дисперсії, що дозволяють визначати n_D в "білому" світлі за шкалою або цифровим індикатором. В основу принципу дії цих приладів покладене явище повного внутрішнього відбиття при проходженні світлом межі розподілу двох середовищ із різними показниками заломлення.

Рефрактометрія є одним із розповсюджених методів ідентифікації хімічних сполук, кількісного та структурного аналізу, визначення фізико-хімічних параметрів речовин.

Застосування. У харчовій промисловості для вимірювання вмісту спирту в алкогольних продуктах, встановлення якості харчових продуктів. Рефрактометрія у фармацевтичному аналізі широко використовується для кількісного визначення речовин у розчині.

Автоматичні рефрактометри з мікропроцесорним керуванням призначені для дослідження концентрації широкого діапазону рідких середовищ як низької, так і високої в'язкості, незалежно від прозорості та кольору, застосовують для керування і регулювання промислових установок з рідкими матеріалами однорідного хімічного складу де потрібне досягнення певної концентрації або щільності рідини. При цьому рефрактометри безпосередньо вбудовуються в потік продукції або в лінію потоку. Оскільки рефрактометри чутливі до температури, а температура потоку продукції звичайно змінюється, вимірюють поточну дійсну температуру на місці установки приладу та корегують результати вимірювання автоматично. Промислові рефрактометричні установки успішно застосовують на цукрових і великих пивоварних заводах, у виробництві згущеного молока та маргарину.

Застосовуються також на цукрових і хлібних заводах, кондитерських фабриках для аналізу продуктів і сировини, напівфабрикатів, кулінарних і борошняних виробів, визначення вологисті меду (до 20 %), для визначення частки сухих речовин у суслах, цукрово-агаровому сиропі, для визначення масової частки розчинних сухих речовин за сахарозою, в продуктах переробки плодів і овочів, для визначення відсоткового вмісту жиру у

твердих продуктах харчування (пряники, вафлі або хлібобулочні вироби), концентрації солей.

Робота рефрактометричного детектора третього типу заснована на *інтерферометричному принципі зсуву*. Промені світла від джерела видимої області спектра розділяються дільником на дві частини, фокусуються лінзою і проходять через робочу та порівняльну комірку об'ємом 5 мкл. Промені світла потім поєднуються за допомогою іншої лінзи та дільника і потрапляють на чутливий елемент.

Відмінність показників заломлення робочого та порівняльного потоку елюента призводить до різниці в довжині оптичного шляху, яка вимірюється інтерферометричним детектором як зміна довжин хвиль світла. При оптимальних робочих умовах можливо детектування близько 3 мкг/ моль розчиненої речовини.

3.11. Інтерферометрія

Інтерферометрія – метод дослідження, заснований на явищі інтерференції (додавання) хвиль. Інтерференція хвиль – це взаємне посилення або ослаблення амплітуди двох або кількох когерентних хвиль, що одночасно поширюються в просторі. Супроводжується чергуванням максимумів і мінімумів інтенсивності.

Інтерферометри – це вимірювальні прилади, принцип дії яких ґрунтується на явищі інтерференції хвиль. Окремий випадок загального явища інтерференції хвиль – інтерференція світла. Це нелінійне додавання інтенсивностей двох або декількох світлових хвиль. Це явище супроводжується мінімумами, що чергуються в просторі з максимумами інтенсивності, які називаються *інтерференційною картиною*.

Принцип дії всіх інтерферометрів однаковий, і різняться вони лише методами одержання когерентних хвиль і тим, яка величина безпосередньо вимірюється. В основі роботи інтерферометра лежить просторовий поділ пучка світла за допомогою обладнання з метою одержання двох або більше взаємно когерентних променів, які проходять різні оптичні шляхи, а потім зводяться разом. Спостерігається результат їх інтерференції.

Вид інтерференційної картини залежить від способу поділу пучка світла на взаємно когерентні промені, від їх числа, відносної інтенсивності, розмірів джерела, спектрального складу світла.

Інтерферометр (рис. 3.11) складається із двох однакових товстих плоскопаралельних пластин зі скла, установлених майже паралельно одна одній.

Пучок світла S падає на першу пластинку під кутом i , близьким до 45° . Кожен промінь пучка після відбиття на поверхнях пластинки ділиться на 2 когерентних промені S_1 і S_2 , які йдуть на деякій відстані один від одного, що залежить від товщини пластинок d .

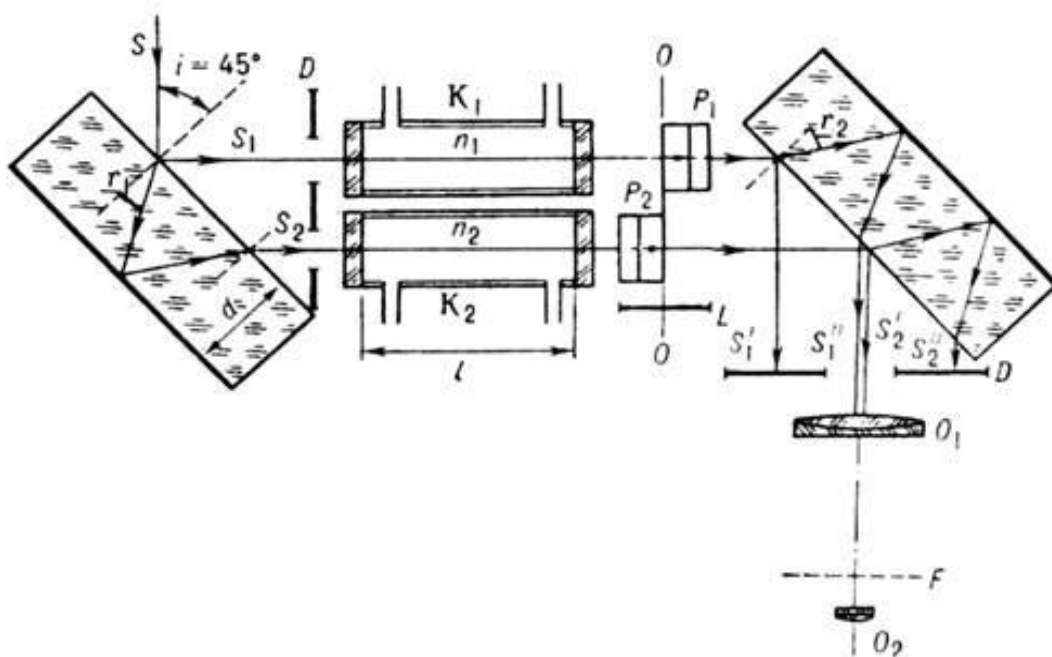


Рис. 3.11. Схема інтерферометра Жамена: OO – вісь обертання компенсаторних пластинок; $P_1 P_2$ – компенсатор; O_1 і O_2 – об'єктив і окуляр зорової труби.

Далі на другій пластинці кожен з них знову розділяється на два промені. У результаті від другої пластинки йдуть 4 паралельних когерентних променя S_1' , S_1'' , S_2' , S_2'' ; промені S_1' і S_2'' перекриваються діафрагмою D , а промені S_1'' і S_2' потрапляють у зорову трубу і інтерферують у фронтальній площині об'єктива O_1 . При використанні джерела білого світла спостерігаються тільки інтерференційні смуги низького порядку, які мають форму прямих ліній з білою ахроматичною смугою в центрі, оточеною системою забарвлених смуг. Порівняно велика відстань між променями S_1 і S_2 дозволяє встановити на їх шляху дві кювети K_1 і K_2 однакової довжини l з досліджуваними речовинами, показники заломлення яких n_1 і n_2 . Виникаюча різниця ходу $D = (n_2 - n_1) l$ призводить до зсуву ахроматичної смуги в полі зору зорової труби. Вимірювання D роблять за допомогою компенсатора $P_1 P_2$, який створює додаткову різницю ходу, зворотну тій, що викликана відмінністю n_1 і n_2 . Компенсатор складається із двох однакових плоско паралельних пластинок P_1 і P_2 , встановлених у ході променів S_1 і S_2 і закріплених на осі OO під кутом одна до одної. Внесена ними різниця ходу залежить від кутів падіння променів на пластинки і може змінюватися при обертанні пластинок. Повертаючи компенсатор, приводять зміщену ахроматичну смугу на перехрестя труби та відраховують величину зсуву D . Знаючи D і l , визначають різницю $n_2 - n_1$.

Відповідно до природи хвиль існують інтерферометри акустичні для звукових хвиль і інтерферометри для електромагнітних хвиль: оптичних (ультрафіолетової, видимої й інфрачервоної областей спектра) і радіохвиль різної довжини. Оптичні інтерферометри одержали найбільше поширення.

Застосування. За допомогою інтерферометра Жамена проводять кількісний аналіз газових сумішей, визначають концентрацію деяких газоподібних домішок. Застосовують також для вимірювання показників заломлення газів і рідин та для визначення концентрації домішок у повітрі.

3.12. Поляриметрія

Поляриметрія (від грец. *polos* – полюс і *metreo* – вимірюю), фізико-хімічний метод дослідження, заснований на вимірюванні ступеню поляризації світла та оптичної активності, тобто величини обертання площини поляризації світла при проходженні його через оптично активні речовини. Величина такого обертання в розчинах залежить від їх концентрації, тому поляриметрія широко застосовується для вимірювання концентрації оптично активних речовин.

Вимірювання проводяться за допомогою оптичних приладів – поляриметрів і спектрополяриметрів. Кут повороту площини поляризації залежить також від довжини хвилі світла, що проходить через розчин. Ця властивість використовується для вивчення будови біополімерів.

Застосовують для дослідження вуглеводів з метою ідентифікації, кількісного аналізу, вивчення будови та стереохімічного аналізу.

У біологічних дослідженнях поляриметрію застосовують для визначення цукрів і крохмалю в рослинних кормах, білків і амінокислот у розчинах, для виявлення й кількісного визначення глюкози, а також при визначенні активності ферментів, що розщеплюють вуглеводи.

3.13. Нефелометрія. Турбідиметрія

Нефелометрія. Турбідиметрія. При проходженні світла через дисперсні системи спостерігається його розсіювання або поглинання твердими завислими частинками. Це явище покладене в основу нефелометрії та турбідиметрії.

Практичні спроби кількісно виміряти мутність відносяться до 1900 року, коли Уіпл і Джексон розробили стандарт суспензії, що містить 1000 мільйонних частинок кізельгуру (діатомітової землі) у дистильованій воді. Розведення цієї суспензії дозволило створити так звану "кремнеземну" шкалу мутності на основі ряду стандартних суспензій для калібрування турбідиметрів того часу.

Нефелометрія (від грец. *nephelos* – туман) сукупність методів аналізу і вивчення дисперсних систем, заснованих на вимірюванні інтенсивності світлового потоку, розсіяного суспензією досліджуваної речовини. Ця величина пропорційна числу диспергированих частинок та кількості речовини. Інтенсивність розсіяного світла визначають за допомогою нефелометрів.

Турбідиметрія (від лат. *turbidus* – мутний), метод кількісного хімічного аналізу. Заснований на вимірюванні інтенсивності світла, що пройшло через суспензію, утворену частками речовини в рідкій фазі.

Інтенсивність пучка світла, що проходить через мутне середовище, зменшується за рахунок розсіювання та поглинання світла зваженими частками.

На рис. 3.12. наведено криві нефелометричного та турбідиметричного титрування.



Рис. 3.12. Криві нефелометричного та турбідиметричного титрування

Інтенсивність розсіяного потоку прямо пропорційна концентрації часток, що перебувають у розчині.

Інтенсивність розсіяного світла підкоряється закону Релея:

$$I_n = I_0 \cdot \frac{N v^2}{\lambda^4} \quad (3.15)$$

де I_n і I_0 - інтенсивності розсіяного та падаючого світла; N - загальна кількість світлорозсіюючих часток; v - об'єм однієї частки; λ - довжина хвилі падаючого світла. Множник $1/\lambda^4$ указує на швидке зростання інтенсивності розсіяного світла зі зменшенням довжини хвилі падаючого світла. Оскільки червоне світло розсіюється менше, ніж будь-яке інше, сигнальні вогні (стоп-сигнали, вогні маяка і т.д.) бувають тільки червоними.

Серйозні труднощі в практиці нефелометрії полягають в тому, що інтенсивність розсіяного світла залежить від об'єму часток.

Відношення інтенсивності розсіяного світла до інтенсивності падаючого пропорційно концентрації (c) зважених часток:

$$I_n / I_0 = k c \quad (3.16)$$

Інтенсивність розсіяного світла визначають за допомогою нефелометрів, у яких на окуляр потрапляє розсіяне світло, спрямоване під кутом 90° до пучка падаючого світла.

Метод турбідиметрії дуже схожий на метод нефелометрії, однак на відміну від нього, аналітичним сигналом служить інтенсивність не відбитого світла, а того що пройшло через суспензію.

Турбідиметричний метод заснований на вимірюванні інтенсивності світла I_t , яке пройшло через аналізовану суспензію, зменшеного за рахунок поглинання і розсіювання зваженими частками. При достатньому розведенні інтенсивність світла, яке пройшло через аналізовану суспензію, описується рівнянням:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = k \cdot l \cdot c \quad \text{або} \quad D = k \cdot c \cdot l \quad (3.17)$$

де k - молярний коефіцієнт мутності розчину; l - товщина шару.

Турбідиметричні визначення виконують за допомогою фотоелектричних колориметрів-нефелометрів (ФЭК).

Вважається, що кут в 90° дозволяє забезпечити найбільшу чутливість розсіювання на частках. Більшість сучасних приладів визначають розсіювання під кутом 90° (рис. 3.13). Такі прилади називаються нефелометрами або нефелометричними турбідиметрами.

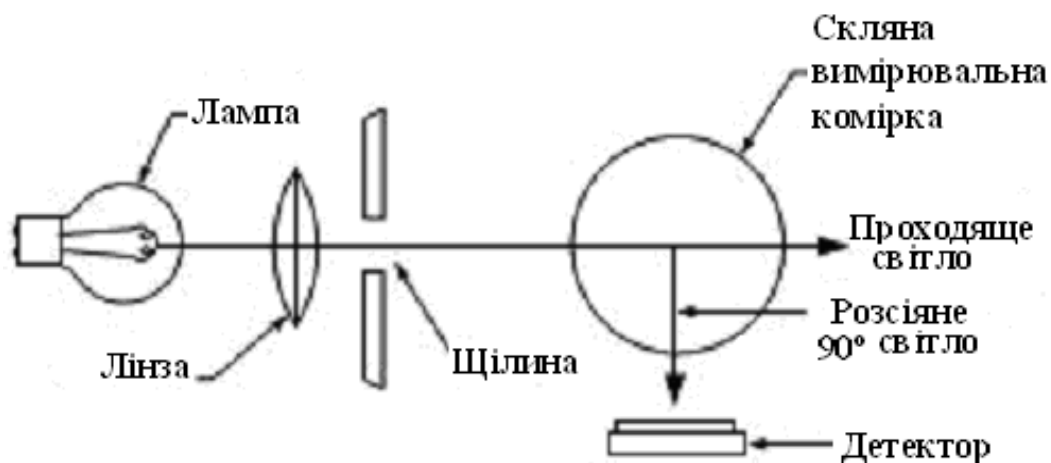


Рис. 3.13. Оптична схема мутномерів

Завдяки своїй чутливості, точності і застосуванню в широкому діапазоні вимірювання розміру і концентрації часток, прилад був визнаний у Стандартних методах як кращий прилад для визначення мутності. Також кращими одиницями вираження мутності стали нефелометричні одиниці мутності NTU.

Застосування. Нефелометричний і турбідиметричний методи застосовуються для аналізу суспензій, емульсій та інших мутних середовищ в області концентрацій 10^{-5} — 10^{-4} %. Основною перевагою нефелометричних і турбідиметричних методів є їх висока чутливість, що особливо важливо у випадку елементів або іонів, для яких відсутні кольорові реакції.

У суспензіях із надвисокою мутністю неможливо визначити концентрацію часток нефелометричним способом. Для визначення мутності таких зразків існують інші способи: за проходженням світла, за прямим та зворотним розсіюванням. Кількість світла, що пройшло, та розсіяного світла

обернено пропорційні зростанню мутності і дають достовірні результати до значення мутності порядку 4000 NTU. При визначенні зразки розбавляють і визначають мутність у кожному розведенні.

Визначення надвисокої мутності звичайно використовується для контролю вмісту жиру в молоці, для керування виробничим процесом.

До недоліків турбідиметрії та нефелометрії відносяться, головним чином, труднощі одержання суспензій, що мають однакові за розмірами частинки, їх стабільність в часі і т.д.

3.14. Спектроскопія комбінаційного розсіювання

Спектроскопія комбінаційного розсіювання або Рамановська спектроскопія – спектроскопічний метод вивчення коливальних, обертальних та інших низькочастотних мод досліджуваної речовини в інтервалі приблизно від 2 до 4000 cm^{-1} , заснований на явищі непружного (комбінаційного, Рамановського) розсіювання монохроматичного світла у видимому, близькому УФ або близькому ІЧ діапазонах.

Теорія комбінаційного розсіювання світла. Монохроматичне світло, що падає на зразок, може бути відбитим, поглинутим або розсіяним. Процес розсіювання світла може бути пружним (тобто відбуватися без обміну енергією між світлом і речовиною) і непружним (тобто між світлом і речовиною може відбуватися перерозподіл енергії).

Пружне розсіювання світла називається Релеєвським. Воно переважає при розсіюванні: у середньому, лише один фотон з десяти мільйонів розсіюється непружно.

Непружне розсіювання світла називається комбінаційним або Рамановським. При комбінаційному розсіюванні світло і речовина обмінюються енергією. У результаті, частота розсіяного світла може як зменшуватися (при цьому енергія переходить від світла до речовини – це Стоксове розсіювання), так і збільшуватися (при цьому енергія переходить від речовини до світла – це анти-Стоксове розсіювання).

Розсіювання можна розглядати як дуже швидкий процес поглинання і випускання фотона. При подібному поглинанні фотона молекула не переходить у стійкий збуджений електронний стан, якщо енергія фотона недостатня для цього процесу. Вона переходить у нестабільний збуджений стан, з якого випромінює фотон через дуже короткий час. Як правило, під спектром комбінаційного розсіювання розуміють саме його більш інтенсивну, Стоксову частину.

У загальному випадку процес розсіювання світла конкурує із процесом його поглинання. При поглинанні випромінювання молекула переводиться в нижчий збуджений електронний стан. Зворотний перехід в основний стан може бути або повністю без випромінювання, або супроводжуватися випромінюванням світла меншої частоти. Таке випромінювання називається *фотолюмінесценцією*. Залежно від спінової конфігурації збудженого

електронного стану фотолюмінесценцію підрозділяють на *флуоресценцію* й *фосфоресценцію*.

Лінії фотолюмінесценції значно інтенсивніше ліній комбінаційного розсіювання. Спектр комбінаційного розсіювання більшості органічних молекул складається з ліній, що відповідають деформаційним і валентним коливанням хімічних зв'язків вуглецю (C) з іншими елементами, як правило, воднем (H), киснем (O) і азотом (N), а також характеристичним коливанням різних функціональних груп (гідроксильної -OH, аміногрупи -NH₂ і т.д.). Ці лінії проявляються в діапазоні від 600 см⁻¹ (валентні коливання одинарних C-S зв'язків) до 3600 см⁻¹ (коливання гідроксильної -OH групи).

На відміну від ІЧ спектра, у якому проявляються лінії, що відповідають коливальним переходам зі зміною дипольного моменту, у спектрі комбінаційного розсіювання проявляються лінії, що відповідають коливальним переходам зі зміною поляризації молекули. Таким чином, ІЧ і комбінаційне розсіювання є спектроскопічними методами, що взаємно доповнюють один одного.

Спектри комбінаційного розсіювання дуже чутливі до природи хімічних зв'язків – як в органічних молекулах і полімерних матеріалах, так і в неорганічних кристалічних решітках та кластерах. З цієї причини кожна речовина, кожен матеріал має свій власний, індивідуальний комбінаційний спектр розсіювання, який є для нього аналогом «відбитка пальців».

Застосування. Рамановські спектрометри та мікроскопи знаходять широке застосування:

- у нанотехнологіях для дослідження будь-яких типів наноструктур;
- в органічній хімії для вивчення механізмів реакцій і характеристики продуктів синтезу;
- при розробці та контролі різних виробничих процесів;
- у фармацевтичній промисловості при розробці та контролі виробництва таблетованих лікарських форм і кремів;
- у косметології для оцінки ефективності косметичних засобів;
- у біології для вивчення культур мікроорганізмів, клітинних культур, тканин і природних волокон;
- для дослідження та розробки нових матеріалів.

Рамановські мікроскопи (рис. 3.14) застосовуються на стадіях процесу синтезу і розробки лікарських препаратів. Область застосування різноманітна: від моніторингу нових поліморфів, що утворюються під час розробки препаратів, до виявлення причин поганої розчинності таблеток.

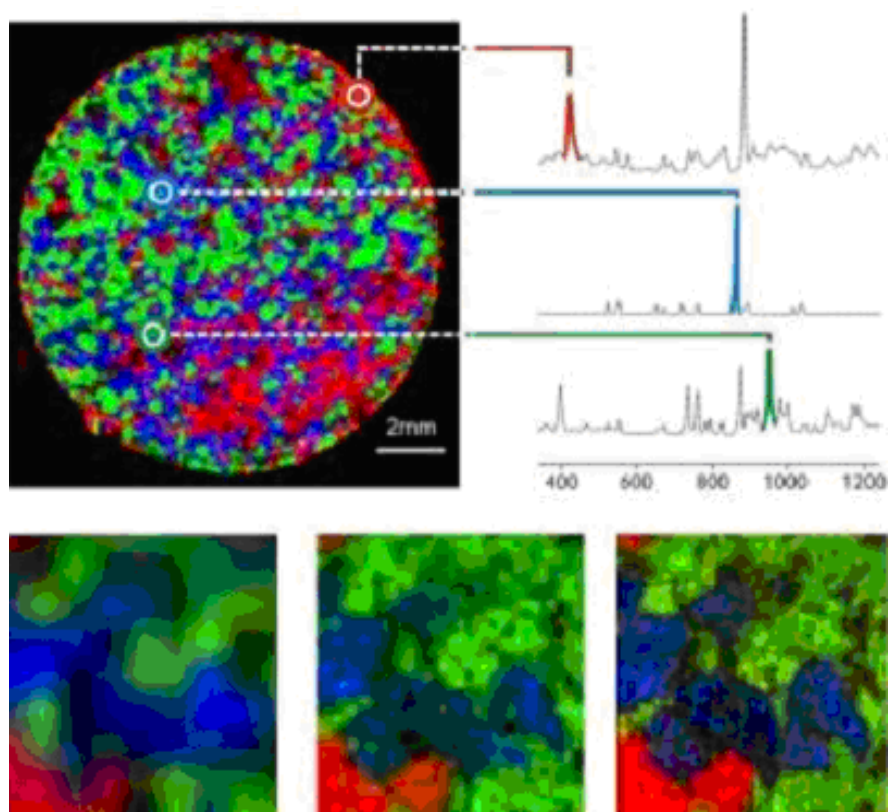


Рис. 3.14. Рамановське зображення таблетки (ліворуч), що складається з трьох компонентів. Праворуч показані спектри комбінаційного розсіювання кожного компонента. Внизу: звичайний, середній та високий дозвіл зображення ділянки 0,4x0,4 мм (час аналізу 3, 36 і 21,5 хв).

Рамановська спектроскопія відображає вібрації молекул і кристалів. На підставі цієї інформації, можна ідентифікувати речовини, а також визначати інші важливі характеристики. Оскільки Рамановська спектроскопія забезпечує одержання спектрів часток розміром біля 1 мкм, проведення безконтактних та вилучених визначень, і при цьому повністю сумісна з аналізом водних зразків та зразків в прозорих упаковках, даний метод оптимальний:

- для визначення розподілу компонентів у таблетованих формах і кремах при контролі процесу їх виготовлення;
- для підтвердження ідентичності вихідної сировини;
- у дослідженнях *in vivo*, наприклад при вивченні розподілу лікарських сполук у товщі шкіри.
- для контролю сполук: розчинів і реакційних сумішей, емульсій, паст і суспензій, парогазових сумішей у реакторах і на поверхні твердого речовини.

Рамановський мікроскоп дозволяє спостерігати тонкі молекулярні ефекти безпосередньо, співвідносити зображення оптичного або електронного мікроскопа із двовимірною або тривимірною картою, побудованою за лініями у спектрі комбінаційного розсіювання.

Косметичні креми можуть бути проаналізовані на вміст органічних складових (наприклад, колагену і масел), неорганічних компонентів (таких,

як пігменти), а спектральне зображення допоможе оцінити розподіл часток за розміром в емульсіях і суспензіях.

Комбінаційне розсіювання може застосовуватися при контролі різних технологічних процесів, в органічній хімії та хімії полімерів для:

- on-line спостереження за проходженням реакцій органічного синтезу і полімеризації в режимі реального часу;

- у комбінаторній хімії;
- для дослідження нових покриттів і контролю процесу їх нанесення;
- для визначення ступеня кристалічності і орієнтації в полімерних плівках;

- для дослідження структури композиційних полімерних матеріалів, багатошарових полімерних плівок;

- для вимірювання розподілу напруг у штучних волокнах і плівках;
- для профілювання глибини полімерних покриттів;
- дослідження кінетики висихання (набрякання) полімерних плівок.

3.15. Мікрохвильове, або надвисокочастотне випромінювання

Мікрохвильове, або надвисокочастотне (НВЧ) випромінювання являє собою електромагнітні хвилі (область радіочастот) із частотою коливань від 300 МГц до 30 ГГц, що відповідає довжині хвилі від 1м до 1мм. Охоплює дециметрові, сантиметрові та міліметрові хвилі. По шкалі частот мікрохвилі розташовані між радіохвилями і тепловим випромінюванням, тому їх властивості є проміжними між цими видами випромінювання. Наприклад, від радіохвиль мікрохвилі успадкували більшу глибину проникнення в матеріал, ніж у інфрачервоного випромінювання. У той же час, перетворення електромагнітної енергії в тепло при мікрохвильовому випромінюванні набагато ефективніше, ніж при використанні радіохвиль.

Відомо кілька способів перетворення електричної енергії в теплоту: нагрівання при проходженні струму, індукційне нагрівання, нагрівання струмами високої частоти, нагрівання електричною дугою.

Історія. Перша у світі НВЧ піч «Radarange» була випущена в 1947 році фірмою Raytheon і була призначена не для готування їжі, а для швидкого розморожування продуктів і використовувалася винятково військовими. Її висота приблизно дорівнює людському росту, маса 340 кг, потужність - 3 кВт, що приблизно у два рази більше потужності сучасної побутової НВЧ-печі. В 1949 р. почалося їх серійне виробництво. Коштувала ця піч близько 3000 \$.

25 жовтня 1955 року американська компанія «Tappan Company» уперше представила побутову мікрохвильову піч. Перша серійна побутова мікрохвильова піч була випущена японською фірмою Sharp в 1962 році.

Механізм нагрівання. За характером взаємодії з НВЧ випромінюванням тверді матеріали можна розділити на три групи:

- до першої групи відносяться метали, які, завдяки наявності електронів провідності, практично повністю відбивають НВЧ хвилі. При цьому метал майже не нагрівається, тому що хвилі відбиваються в дуже тонкому поверхневому шарі і не проникають углиб провідника;

- до другої групи відносяться діелектрики, через які НВЧ хвилі проходять майже без зміни (кварц, поліетилен, полістирол, тефлон);

- до третьої групи відносяться речовини, при проходженні через які відбувається поглинання НВЧ випромінювання та нагрівання матеріалу. Такі речовини називаються *діелектриками*. Діелектрики відносно погано проводять електричний струм у порівнянні із провідниками. Електропровідність діелектриків мала, однак вона завжди відмінна від нуля.

Діелектричне нагрівання – це нагрівання діелектриків у змінному електричному полі (рис. 3.15).

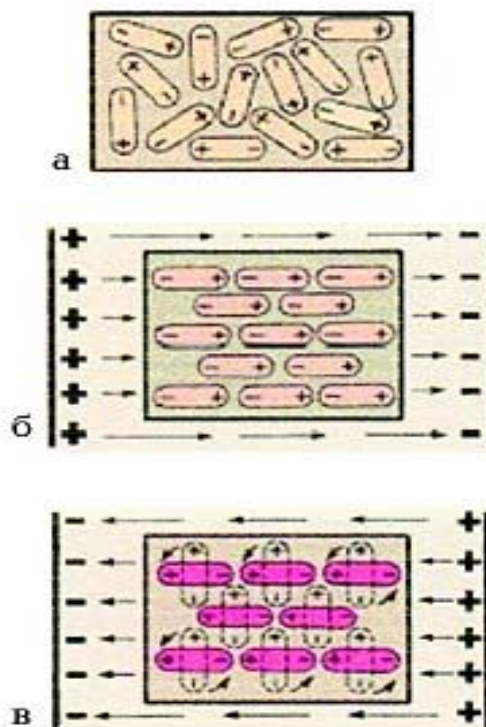


Рис. 3.15. Дипольні молекули: а – у відсутності електричного поля; б – у постійному електричному полі; в – у змінному електричному полі.

За відсутності електричного поля молекули розташовані хаотично (рис. 3.15, а). При накладенні електричного поля молекули вибудовуються за напрямком силових ліній поля. Якщо поле змінює напрям на протилежний, то молекули відразу перевертаються на 180^0 (рис. 3.15, б) з частотою мікрохвиль 2450 Мгц (1 герц – це одне коливання в секунду, мегагерц - один мільйон коливань у секунду). За один період поле змінює свій напрям двічі. Отже, поле, у якому перебувають молекули, змінює полярність $49 \cdot 10^{-8}$ раз за секунду. Під дією мікрохвильового випромінювання молекули змінюють напрям з величезною частотою і труться одна з іншою при переворотках (рис. 3.15, в). Тепло, що виділяється при цьому служить причиною розігріву.

У звичайних способах нагрівання речовин шляхом конвекції та теплопровідності енергія надходить на поверхню матеріалу, виникає градієнт температури, який забезпечує перенесення тепла у внутрішні області. Температура на поверхні буде максимальною. При НВЧ або мікрохвильовому нагріванні тепло виділяється в повному обсязі матеріалу, тому, на відміну від нагрівання зовнішніми джерелами тепла, утворюється так званий інверсний профіль температури, що особливо корисно для сушіння матеріалів і нагрівання реагуючих хімічних сумішей. Оскільки НВЧ нагрівання не вимагає перенесення тепла з поверхні матеріалу на глибину, а здійснюється шляхом перетворення електромагнітної енергії в теплову в об'ємі проникнення НВЧ хвиль, то час нагріву можна збільшити в багато разів порівняно з традиційними методами.

Надвисокочастотне електромагнітне випромінювання поглинається рядом речовин і тому широко використовується для нагрівання. Таке нагрівання дає можливість прогріти продукт одночасно і рівномірно по всьому об'єму в дуже короткий час (1 кг фаршу можна нагріти за 3-5 хвилин до 70°C), здійснювати місцеве та вибіркове нагрівання.

Таким чином, нагрівання діелектричних матеріалів у НВЧ хвилях кількісно визначається діелектричними властивостями матеріалу та параметрами електромагнітного поля – напруженістю і частотою. Переваги НВЧ-нагрівання відносно традиційних методів:

- нагрівання всього об'єму зразка, а не тільки поверхні;
- вибіркове нагрівання залежно від матеріалу зразка;
- швидке включення і вимкнення нагріву;
- високий темп нагрівання (до кількох сотень °C/хв проти ~10°C/хв при звичайному нагріванні);
- самообмежувані реакції (наприклад, сушіння);
- високий ККД перетворення НВЧ-енергії в теплову (близько 100%);
- високий ефект стерилізації. При НВЧ-обробці загинуть мікроорганізмів відбувається не тільки завдяки об'ємному нагріванню, але в багатьох випадках і в результаті прямого впливу випромінювання на мікробні клітини.

Багато речовин, що зазнають теплової обробки, містять у собі значну кількість води або мають схожий з водою механізм поляризації. Пружна дипольна поляризація, характерна для води та інших полярних рідин, дозволяє використовувати енергію механізму поляризації для нагрівання речовин. Під дією цієї енергії дипольні моменти прагнуть орієнтуватися за напрямом поля, при цьому їм необхідно подолати *опір тертя в'язкого середовища*. У результаті енергія поляризації з деякими втратами переходить у теплову енергію речовини, що використовується в техніці діелектричного нагрівання.

НВЧ-випромінювання застосовується для термообробки харчових продуктів у домашніх умовах і в харчовій промисловості. До складу харчових продуктів входять багато речовин: мінеральні солі, жири, цукор,

вода. Щоб нагріти ці продукти за допомогою мікрохвиль, необхідна присутність у ній дипольних молекул таких як молекули жирів і цукрів, але головне, що диполем є молекула води – найпоширенішої речовини в природі.

Вибіркове нагрівання засноване на залежності втрат у діелектрику від довжини хвилі.

Діелектричні втрати – це частина енергії змінного електричного поля в діелектричному середовищі, яка перейшла в тепло.

Величина діелектричних втрат визначається природою діелектрика і є функцією довжини хвилі НВЧ-випромінювання. Чим вища величина діелектричних втрат, тим вища температура нагріву конкретного діелектрика. При максимальній величині діелектричних втрат для даного діелектрика температура нагріву буде максимальною. При цьому в багатокомпонентній суміші діелектриків буде нагріватися тільки той компонент, для якого діелектричні втрати будуть максимальними.

Рівномірне нагрівання. За допомогою НВЧ енергії можна не тільки рівномірно нагрівати діелектрик по всьому об'єму, але і одержувати заданий розподіл температур.

Надчисте нагрівання. Якщо при нагріванні газовим полум'ям, а також за допомогою дугових пальників відбувається забруднення матеріалів, то НВЧ енергію можна підводити до оброблюваного матеріалу через захисні оболонки діелектриків з малими втратами. Забруднення практично повністю усуваються.

Саморегульовальне нагрівання. При нагріванні для цілей сушіння якість одержуваного матеріалу суттєво поліпшується за рахунок того, що нагрівання висушених місць автоматично припиняється. Тому зі зменшенням вологості в процесі сушіння втрати НВЧ енергії зменшуються, а нагрівання триває тільки в тих ділянках оброблюваного матеріалу, де ще збереглася підвищена вологість.

Стерилізація. Мікрохвильове випромінювання має стерилізуючу дію відносно стафілококів, кишкових паличок та інших мікроорганізмів. Причина цього ефекту полягає в тому, що температура усередині продукту зростає дуже швидко, при одночасному діелектричному нагріванні білків мікроорганізмів. Відбувається, так званий, «тепловий удар», що знищує мікроорганізми.

Сушіння. Використання НВЧ енергії при сушінні має ряд переваг перед іншими методами. Головна відмінність від традиційних способів сушіння полягає в характері нагрівання. Тепло проникає в продукт не з поверхні, а утворюється відразу в повному обсязі. Оскільки поверхня продукту охолоджується, за рахунок випарювання, температура усередині продукту завжди трохи вища, ніж на поверхні. Це призводить до того, що волога прагне вийти із внутрішніх областей на поверхню, чому сприяє тиск пари усередині продукту.

Для якісного сушіння харчових продуктів, їх температура не повинна перевищувати 70⁰ С. Лікарські трави й коріння сушаться при ще нижчій

температурі (40°C і нижче). За таких умов у продукті зберігається більшість вітамінів, а лікарські рослини не втрачають своїх лікувальних властивостей. При наявності вакууму інтенсивність сушіння практично нічим не обмежена, тому що при зниженні тиску знижується і температура сушіння. Комбінація мікрохвиль і вакууму дозволяє забезпечити високу якість продукту, оскільки процес сушіння відбувається дуже швидко та без доступу кисню, що не допускає окиснення продукту. В результаті зовнішній вигляд сушених продуктів практично не відрізняється від свіжих.

Ліофілізація (сублімаційне сушіння). Останнім часом розширюється виробництво нових високоефективних медикаментів на білковій основі, що ставить нові вимоги до технологічного процесу. Білки являють собою комплексні структури, які можуть змінюватися при фізичному або хімічному впливі, наприклад денатурації, агрегації, окисненні і гідролізі. Щоб цього уникнути, в асептичному виробництві успішно використовується ліофілізація (сублімаційне сушіння).

Сублімаційне сушіння засноване на здатності льоду за певних умов випаровуватися, минаючи рідку фазу. Сублімаційне сушіння – це один із способів консервації продуктів, що забезпечує максимальне збереження смакових властивостей і якості. При такому сушінні добре зберігаються вітаміни, білки та ароматичні речовини, продукти мають малу масу і в герметичній упаковці можуть без погіршення якості зберігатися багато років.

Застосування НВЧ-нагрівання дозволяє значно інтенсифікувати технологічні процеси харчових виробництв, пов'язані з нагріванням продукції, такі як варіння, сушіння, розігрів, стерилізація, пастеризація, розморожування, сублімація тощо, та реалізувати безвідхідні і енергозберігаючі технологічні процеси в харчовій технології.

Використання надвисокочастотного (діелектричного) нагрівання в харчовій технології дозволяє інтенсифікувати процес теплової обробки, підвищити якість і вихід готової продукції.

3.16. Радіоспектроскопія

Радіоспектроскопія – область фізики, що досліджує процеси поглинання та випромінювання електромагнітних хвиль. Це сукупність методів дослідження сполуки, будови, реакційної здатності речовин, заснованих на вивченні спектрів електромагнітного випромінювання в діапазоні радіохвиль від $5 \cdot 10^{-5}$ до 10 м (частоти від $6 \cdot 10^{12}$ до кількох Гц). Радіохвилі можуть випромінюватися речовинами в твердому, газоподібному і рідкому стані.

Радіоспектроскопія відрізняється від оптичної спектроскопії, інфрачервоної спектроскопії малими енергіями квантів, що поглинаються. Порівняно з оптичною спектроскопією й інфрачервоною спектроскопією радіоспектроскопія має ряд особливостей, які дозволяють одержувати

інформацію про речовину. Ширина ліній у радіоспектроскопії змінюється в дуже широких межах: від ~ 1 Гц для ЯМР до $\sim 10^{10}$ Гц для ЕПР.

Радіоспектроскопія вивчає кілька типів переходів: переходи між рівнями енергії, відповідними до обертового руху молекул з постійним електричним моментом; переходи, обумовлені взаємодією електричного квадрупольного моменту ядра із внутрішнім електричним полем у твердих тілах і взаємодією електронів провідності із зовнішнім магнітним полем; переходи, обумовлені взаємодією магнітних моментів електронів або ядер із зовнішнім магнітним полем у газах, рідинах і твердих тілах.

Самостійним розділом радіоспектроскопії, що відрізняються від інших головним чином апаратурою і методами спостережень, є резонансні дослідження в молекулярних і атомних пучках. Метод був розроблений І. Рабі в 1937 р. для вимірювання магнітних моментів атомних ядер.

Резонансне поглинання в діапазоні сантиметрових хвиль обумовлене, головним чином, обертовими рухами молекул і магнітними властивостями електронних оболонок ряду атомів та іонів, а резонансне поглинання в діапазоні коротких радіохвиль (десятки метрів) викликається магнітними властивостями атомних ядер.

Атомне ядро можна уявити собі як обертову систему елементарних часток, тому воно подібно обертовому вовчку має запас обертової енергії. Істотний внесок у цю енергію вносять власні обертальні моменти елементарних часток, що входять у ядро. Обертальний момент (спін) є однією з основних характеристик ядра. Другою важливою характеристикою ядра є його магнітний момент, завдяки якому ядро поводить себе в зовнішньому магнітному полі подібно маленькому магнітику. Ядро має також деякий позитивний електричний заряд, який визначає кількість електронів, що входять до складу нейтрального атома.

Метод резонансного дослідження заснований на тому, що траєкторії часток, які мають магнітний момент при проходженні через неоднорідне магнітне поле залежать від величини цього моменту. Магнітний момент ядер, що становить кратну величину від половини елементарного магнітного моменту, називається *ядерним магнетонам*.

Якщо спін ядра дорівнює нулю, то і його магнітний момент дорівнює нулю. Такі ядра, природно, не реагують на наявність зовнішнього магнітного поля, і магнітне поле не здатне відхилити їх траєкторію від прямої.

Якщо спін ядра рівний $1/2$, то проекція магнітного моменту ядра на напрямок зовнішнього магнітного моменту може мати тільки два значення ($\pm 1/2$). Інакше кажучи, у цьому випадку магнітний момент ядра може бути орієнтований тільки вздовж поля або проти нього.

Пучок часток, магнітний момент яких визначається тільки таким магнітним моментом ядра, буде розщеплюватися в неоднорідному магнітному полі на два пучки. При пропусканні цього пучка через інше неоднорідне магнітне поле, що відрізняється від першого лише напрямком, можна знову звести їх в одну точку і, помістивши в ній відповідний детектор,

оцінити число падаючих на нього часток. Якщо у проміжку між магнітами подіяти на пучки високочастотним полем резонансної частоти, то орієнтації магнітних моментів часток може змінитися. При цьому друге магнітне поле не буде фокусувати частки пучка в одну точку, а, навпаки, ще більше розведе їх у сторони. Кожна частка, що поглинула на шляху між магнітами квант електромагнітної енергії, змінює свою траєкторію в другому магнітному полі і пролітає повз детектор. Тому число часток, що потрапляють на детектор, зменшується тим більше, чим сильніша взаємодія між частками і електромагнітним полем. При постійній величині цього поля взаємодія тим сильніша, чим ближче частота поля до резонансної. Резонансна частота у свою чергу, залежить від магнітних властивостей часток речовини і величини постійного магнітного поля в тій області, де частки взаємодіють із радіохвилею.

Перевагою радіоспектроскопів є величезна чутливість, що дозволяє працювати з незначними кількостями зразка досліджуваної речовини. У поглинаючих гніздах найпоширеніших радіоспектроскопів утримуються лише мікрограми речовини.

Електронний парамагнітний резонанс – явище резонансного поглинання електромагнітної енергії в сантиметровому або міліметровому діапазоні довжин хвиль речовинами, що містять парамагнітні частки. Один з методів радіоспектроскопії. Парамагнітними частками можуть бути атоми та молекули, як правило, з непарним числом електронів.

Фізика явища. Під час відсутності постійного магнітного поля H магнітні моменти неспарених електронів спрямовані довільно. При накладенні поля H , проекції магнітних моментів на напрямок поля приймають певні значення і відбувається розщеплення рівня енергії електронів E_0 (рис. 3.16).

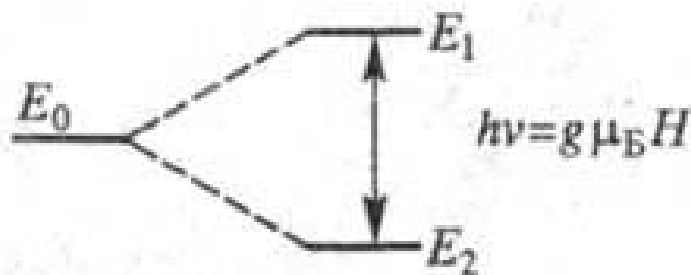


Рис. 3.16. Розщеплення енергетичного рівня електрона у постійному магнітному полі. E_0 – рівень під час відсутності поля, E_1 і E_2 – рівні, що виникають у присутності поля H .

Розподіл електронів на підрівнях підкоряється закону Больцмана. Якщо на зразок подіяти змінним магнітним полем із частотою ν (частота електромагнітного випускання), такою, що $h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot H$ (h – постійна Планка), і спрямованим перпендикулярно H , то індукуються переходи між сусідніми підрівнями, причому переходи з поглинанням і випусканням кванта $h\nu$ однаково імовірні. Оскільки на нижньому рівні число електронів

більше, відповідно до розподілу Больцмана, то буде відбуватися резонансне поглинання енергії змінного магнітного поля.

Відстань між новими підрівнями залежить від напруженості поля H і дорівнює $\Delta E = E_1 - E_2 = g \cdot \mu_B \cdot H$

де g - фактор спектроскопічного розщеплення; μ_B – магнітон Бора; H – величина напруженості магнітного поля, ерстед.

Цей вираз являє собою основне рівняння ЕПР, що характеризує умови резонансного поглинання енергії електромагнітного випромінювання в полях з напруженістю порядку 3-4 тис. ерстед. Поглинання електромагнітної енергії спінової системи зафіксоване реєструючим пристроєм являє собою спектр ЕПР.

Основні характеристики спектра ЕПР. Якщо електрон не взаємодіє з іншими ядрами, у спектрі спостерігається одиночна симетрична лінія. Ця синглетна лінія поглинання характеризується трьома основними параметрами: інтегральною інтенсивністю, шириною лінії і значенням g -фактора (рис. 3.17).

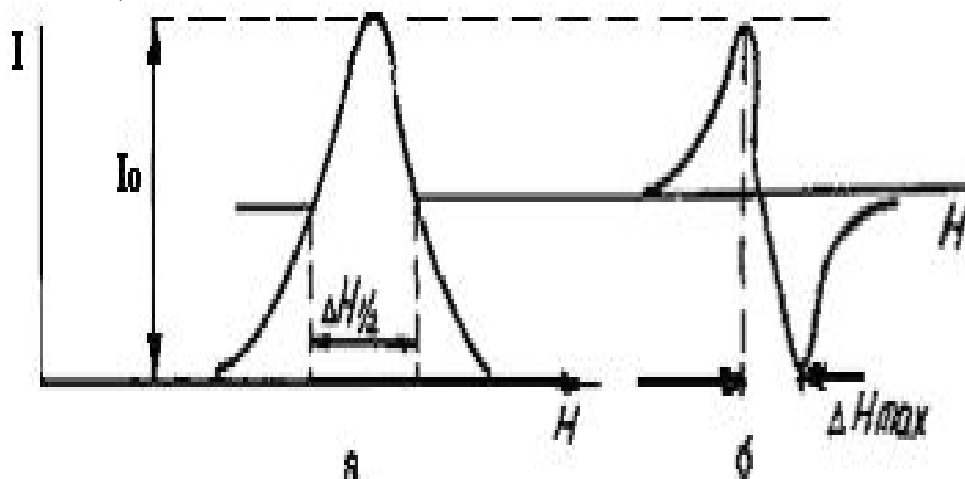


Рис.3.17. Одиночна симетрична лінія: a – лінія поглинання спектра ЕПР, b – перша похідна лінії поглинання; I_0 – інтенсивність лінії, $\Delta H_{1/2}$ – ширина лінії на напіввисоті, ΔH_{max} – ширина лінії між максимумами.

Інтегральна інтенсивність лінії поглинання дозволяє, при наявності еталонного зразка, визначити кількість неспарених електронів у зразку, тобто концентрацію радикалів як у кристалічному стані, так і в розчині.

Ширина лінії, пов'язана з її формою, несе інформацію про взаємодію неспарених електронів з оточенням і вимірюється в одиницях магнітного поля.

Основні параметри спектрів ЕПР – інтенсивність, форма та ширина резонансної лінії, g -фактор, константи тонкої і надтонкої структури. На практиці реєструється одна, рідше дві похідні кривої поглинання, що дозволяє підвищити чутливість приладу.

Інтенсивність лінії визначається площею під кривою поглинання, яка пропорційна числу парамагнітних часток у зразку. Оцінку їх абсолютної

кількості здійснюють порівнянням інтенсивності спектрів досліджуваного зразка і еталона.

Сpektри ЕПР являють собою картину, обумовлену магнітною і хімічною взаємодіями радикалів один з одним і з середовищем. Наслідком цих ефектів є кінцева ширина лінії ЕПР. Розширення ліній пов'язане із двома основними типами взаємодій спін-решітковим і спін-спіновим.

Техніка експерименту. В спектроскопії ЕПР використовують радіоспектрметри, принципова блок-схема яких представлена на рис. 3.18.

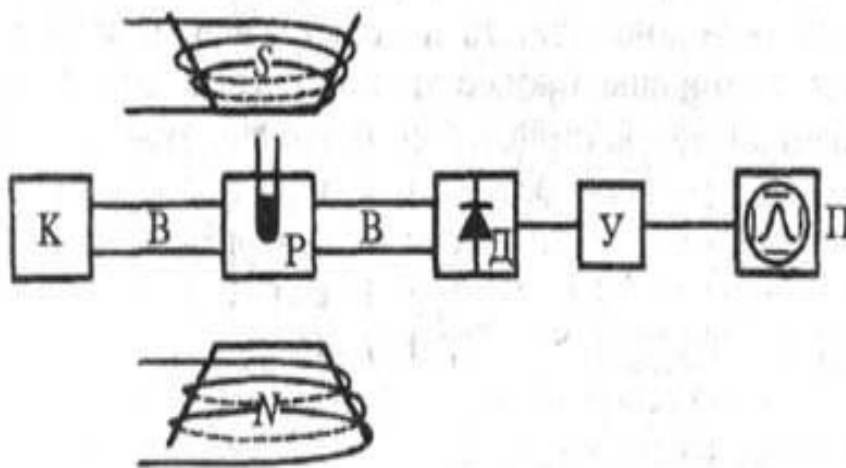


Рис. 3.18. Блок-схема ЕПР-спектрметра. *K* – джерело НВЧ випромінювання; *B* – хвилеводи; *P* – об'ємний резонатор; *Д* – детектор НВЧ випромінювання; *У* – підсилювач; *NS* – електромагніт; *П* – обладнання, що реєструє.

Частота електромагнітного випромінювання задається постійною, а резонанс досягається шляхом зміни напруженості магнітного поля. Більшість ЕПР-спектрметрів працює на частоті 9000 МГц, довжина хвилі 3,2 см, магнітна індукція 0,3 Тл. Електромагнітне випромінювання надвисокої частоти (НВЧ) від джерела *K* по хвилеводу *B* надходить в об'ємний резонатор *P*, що містить досліджуваний зразок розміщений між полюсами електромагніту *NS*.

В умовах резонансу НВЧ випромінювання поглинається спіновою системою. Модульоване поглинанням НВЧ випромінювання по хвилеводу (*B*) надходить на детектор *Д*. Після детектування сигнал підсилюється на підсилювачі *У* і подається на реєструюче обладнання *П*. У цих умовах реєструється й інтегральна лінія поглинання ЕПР. Чутливість сучасних ЕПР-спектрметрів досягає 10^{-9} М (10^{11} часток у зразку) при оптимальних умовах реєстрації й ширині лінії 10^{-4} Тл.

Застосування. Методом ЕПР можна визначати концентрацію та ідентифікувати парамагнітні частки в будь-якому агрегатному стані, визначити валентність парамагнітного іона, симетрію його оточення, що в комбінації з даними рентгенівського структурного аналізу дає можливість визначати положення парамагнітного іона в кристалічній решітці. Знання

енергетичних рівнів парамагнітного іона дозволяє порівнювати результати ЕПР із даними оптичних спектрів і обчислювати магнітну сприйнятливість парамагнетиків.

Метод ЕПР дозволяє визначати природу і локалізацію дефектів решітки кристалів, наприклад центрів забарвлення. Метод ЕПР широко застосовується в хімії і біології, де в процесі хімічних реакцій або під дією іонізуючого випромінювання можуть утворюватися молекули з незаповненим хімічним зв'язком — вільні радикали.

У біології методом ЕПР вивчаються ферменти, вільні радикали в біологічних системах і металорганічних сполуках.

Спектроскопія ЕПР — один з найбільш інформативних методів дослідження, що використовується для встановлення будови стабільних радикалів та іонів-радикалів з нетривалим часом існування, вивчення механізму реакцій, в гомо- і гетерогенному каталізі, радіаційно-хімічних і біологічних процесах.

Секторметри ТПР Х-діапазону — це малогабаритні настільні прилади, призначені для розв'язування широкого кола завдань і використовуються для:

- високодозової дозиметрії іонізуючих випромінювань;
- контролю опромінених харчових продуктів і технологічних процесів, що проходять за участю вільних радикалів;
- проведення досліджень у фізиці, хімії, біології та медицині.

3.17. Ядерний магнітний резонанс

Ядерний магнітний резонанс (ЯМР) уперше спостерігали в 1946 р. Блох у США і Роллін в Англії. ЯМР — це явище резонансного поглинання радіочастотних хвиль речовинами, що містять ядра з ненульовим спіном і непарним числом протонів в зовнішньому магнітному полі, обумовлене переорієнтацією магнітних моментів ядер.

Магнітні властивості речовини. Спектроскопія ЯМР заснована на поглинанні речовиною, поміщеною в сильне однорідне магнітне поле, енергії радіочастотного випромінювання. Взаємодія речовини з однорідним магнітним полем приводить до зміни цього поля відповідно до рівняння магнітостатики: $H = H_0 (1 + X_0)$, де H і H_0 — величини напруженості результуючого і вихідного магнітних полів; X_0 — об'ємна магнітна сприйнятливості речовини.

Магнітна сприйнятливості (об'ємна або молярна X_m) може бути позитивною або негативною величиною, тобто речовина може, як підсилювати, так і зменшувати зовнішнє магнітне поле, проявляючи парамагнітні або діамагнітні властивості. Перший випадок реалізується при наявності в молекулах речовини неспарених електронів (метод ЕПР). Методом ЯМР досліджуються в основному *діамагнітні речовини*.

Діамагнетизм є макроскопічною властивістю речовини. Макроскопічні магнітні властивості речовини складаються з магнітних властивостей складових його елементарних часток (ядер і електронів). Ядра багатьох ізотопів мають позитивну магнітну сприйнятливність. Ядерний парамагнетизм обумовлений тим, що ядра деяких ізотопів мають магнітний момент. Квантова механіка зв'язує магнітні моменти ядер з наявністю в них моменту кількості руху. Величина I , називається спіновим квантовим числом, характеризує найбільше виміряне значення моменту кількості руху ядра. При $I=0$ ядро не має магнітного моменту, а отже, і парамагнетизму. Такі ядра (C^{12} , O^{16} , Si^{28} , S^{32} і ін.) не проявляються безпосередньо в спектрі ЯМР.

Найбільше значення для ЯМР-спектроскопії мають магнітні ядра зі спіном рівним $1/2$, у першу чергу протони, що володіють найбільшим серед стабільних ядер магнітним моментом, а також ядра F^{19} , P^{31} , C^{13} , Si^{29} , кожне з яких може перебувати в 2 станах. При внесенні речовини, що містить магнітні ядра зі спіном $1/2$, в однорідне магнітне поле досить високої напруженості, обидва стани стають енергетично нерівноцінними. Величина ΔE , що характеризує різницю їх енергій, пропорційна напруженості зовнішнього поля H_0 і залежить від магнітних властивостей ядра:

$$\Delta E = 2 \cdot \mu \cdot H_0 = j \frac{h}{2\pi} \cdot H_0 \quad (3.18)$$

де j – фактор пропорційності, називається гідромагнітним відношенням. Величина j характеризує відношення магнітного моменту до моменту кількості руху.

При переході магнітного ядра з нижнього енергетичного рівня на верхній – енергія поглинається, а при зворотному переході – виділяється. Енергія переходу рівна різниці енергій двох станів $\Delta E = h \cdot \nu_0$. Такі переходи – основа явища ядерного магнітного резонансу.

Можливість експериментально спостерігати ядерний магнітний резонанс пов'язана з тим, що число магнітних ядер, які населяють кожний з рівнів, неоднакова. Система звичайно прагне перейти в стан з нижчою енергією, що веде до збільшення населеності нижчого рівня. Встановлюється рівновага, але, якщо поряд з однорідним магнітним полем прикласти до системи спінів високочастотне поле із частотою ν_0 , то буде відбуватися поглинання енергії радіочастотного поля. Експеримент ЯМР полягає в реєстрації цього поглинання радіотехнічними засобами.

ЯМР - спектрометри. Зразок досліджуваної речовини розміщують як сердечник у котушку генеруючого контуру (поле B_1), розташованого в зазорі магніту, що створює поле B_0 так, що B_1 перпендикулярне полю B_0 (рис. 3.19). При $\nu_0 = \omega_0$ настає резонансне поглинання, що викликає спад напруги на контурі, який детектується і подається на записуюче обладнання.

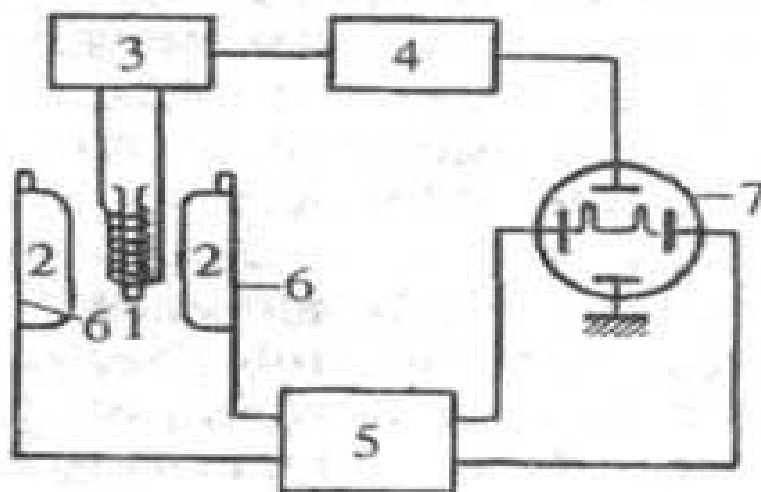


Рис. 3.19. Схема спектрометра для спостереження ядерного парамагнітного резонансу: 1 – котушка з досліджуваним зразком; 2 – полюси магніту; 3 – генератор радіочастотного поля; 4 – підсилювач і детектор; 5 – генератор модулюючої напруги; 6 – котушка модуляції магнітного поля; 7 – самописець.

У момент проходження через резонанс на стрічці залишається слід у вигляді вузького піка певної амплітуди. На рис. 3.20 показано типовий спектр речовини.

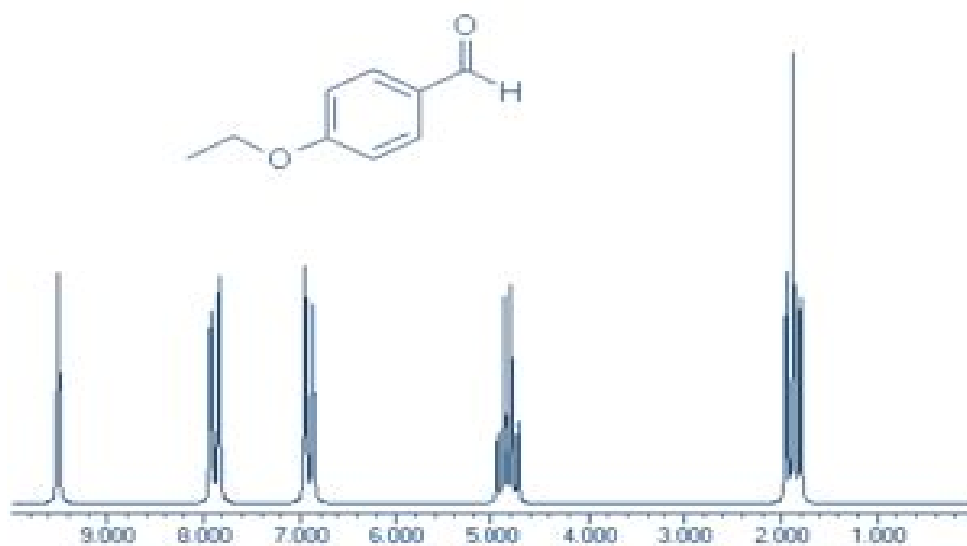


Рис. 3.20. Спектр ЯМР ^1H 4-етоксибензальдегіду

Застосування ЯМР-спектроскопії. Можливості методу ЯМР високої роздільної здатності пов'язані з тим, що ядра одного виду в різному хімічному оточенні при заданому прикладеному постійному полі поглинають енергію високочастотного поля при різних частотах, що обумовлено різним ступенем екранування ядер від прикладеного магнітного поля. Інтенсивність сигналу спектрів пропорційна числу магнітних ядер у кожному угрупованні, що дає можливість проводити кількісний аналіз за спектрами ЯМР.

ЯМР як метод дослідження ядер, атомів і молекул одержав застосування у фізиці, хімії, біології. Досліджені механічні, електричні та магнітні властивості багатьох ядер, визначені з високою точністю деякі фізичні константи, отримані дані про властивості речовин у рідкому і кристалічному станах, про будову молекул, металів, поведінку речовин у живих організмах, розроблено методи контролю над ходом хімічних реакцій.

Головне завдання спектроскопії ЯМР – визначення структури чистих органічних сполук. Метод особливо важливий для вивчення конфігурації основного ланцюга, ізомерії і просторової геометрії молекули. Можливість порівняно простого визначення просторової будови дозволила широко застосовувати ЯМР-спектроскопію для дослідження природних сполук.

Друге, і не менш важливе, завдання ЯМР-спектроскопії – це функціональний аналіз. За допомогою ЯМР він спрощується для груп, утримуючих магнітні ядра (функціональні групи -аміно, оксикарбоксильна і карбонільна, альдегідна, а також фтор і фосфорвмісні групи).

ЯМР-спектроскопія використовується і для кількісного органічного аналізу. Пропорційність між площами піків і числом ядер, що резонують при даній частоті, відкриває шлях до використання ЯМР для кількісного елементарного і функціонального аналізу.

Спектроскопія ЯМР допомагає встановленню:

- кількісного і якісного аналізу індивідуальних сполук і багатокомпонентних систем;
- точної хімічної структури;
- ідентичності та визначення ступеню чистоти хімічних сполук;
- стереохімічної будови молекул.

ЯМР-спектроскопія використовується для біологічних досліджень. Зокрема, це уточнення хімічного складу новоутворень без хірургічного втручання, а також дослідження різноманітних органічних сполук.

Існують лабораторії, які займаються дослідженням твердих нерозчинних сполук. В якості об'єкта для дослідження методом спектроскопії ЯМР твердого тіла можуть виступати розчини речовин або тверді речовини:

- полімери, біополімери;
- молекулярні сита (цеоліти, нанокристалічні цеоліти та ін.);
- лікарські засоби (мультикристалічний поліморфізм фармацевтичних сполук, структура і активність фармакологічних агентів в полімерних матрицях, фазові переходи між кристалічними і аморфними формами, зміна структури при виробництві й стабільність лікарських сполук);
- природні сполуки;
- продукція харчової промисловості.

ЯМР-спектроскопічні методи аналізу спиртів широко використовуються для вмісту алкоголю.

В дослідженні вуглеводів ЯМР-спектроскопія дає інформацію про природу та кількість залишків певних цукрів та замінників неуглеводної

природи, дозволяє визначити ступінь регулярності досліджуваного полісахариду.

Імпульсні ЯМР аналізатори низького дозволу знайшли успішне застосування як рутинні аналізатори в харчовій промисловості для:

- аналізу напоїв – визначення вмісту алкоголю, цукру, води;
- визначення масової частки цукрів, харчових волокон, кислотності в соках;
- визначення вмісту білків, жирів, зольних речовин, оцінки гранулометричного складу борошна;
- контролю процесу ферментації;
- мікробіологічних досліджень продуктів харчової промисловості.

Настільний ЯМР – релаксометр відноситься до області імпульсного ЯМР низького дозволу. Він широко застосовується для контролю виробничих процесів і якості продукції, для аналітичних досліджень (визначення вмісту твердих компонентів у жирах, вмісту масла в насіннях олійних культур), у фармацевтичній промисловості для контролю якості лікарських засобів.

3.18. Мас-спектроскопія

Мас-спектроскопія (мас-спектрометрія, мас-спектрографія, мас-спектральний аналіз) – фізичний метод вимірювання відношення маси заряджених часток матерії (іонів) до їх заряду.

Істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що мас-спектрометрія має справу із частками речовини. Мас-спектрометрія вимірює їх масу, вірніше – відношення маси до заряду. Мас-спектр – це розсортування заряджених часток за їх масою (точніше відношенням маси до заряду).

Перші мас-спектри були отримані у Великобританії Дж. Дж. Томсоном (1910 р.), а потім Ф. Астоном (1919 р.). Вони привели до відкриття стабільних ізотопів. Спочатку мас-спектроскопія застосовувалася переважно для визначення ізотопного складу елементів і точного виміру атомних мас. Мас-спектр речовини є його характеристикою і несе інформацію про молекулярну масу та структуру вихідної молекули.

Варіації ізотопного складу елементів можуть бути визначені з відносною похибкою 10^{-2} %, а маси ядер з відносною похибкою 10^{-5} % для легких і 10^{-4} % для важких елементів.

Іонізація. Для того, щоб одержати мас-спектр, необхідно перетворити нейтральні молекули і атоми, що входять до складу будь-якої органічної або неорганічної речовини, у заряджені частки – іони. Цей процес називається іонізацією. Іонізація здійснюється по різному для органічних і неорганічних речовин.

В сучасній мас-спектрометрії широко застосовується метод іонізації молекул органічних сполук, так званий, електронний удар. Електрони з

енергією кілька десятків eV не тільки вибивають електрони з молекули речовини, але і збуджують молекулярний іон, що утворився, надаючи йому енергію достатню для розпаду на іони-осколки (рис. 3.21)

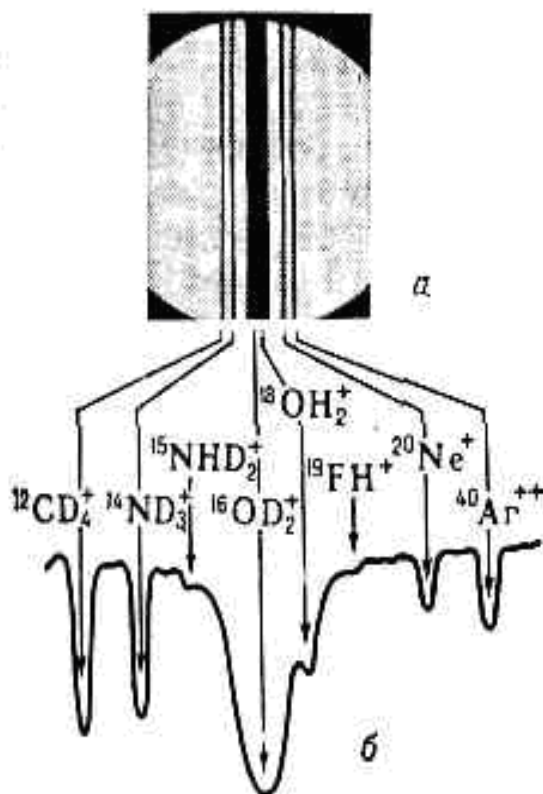


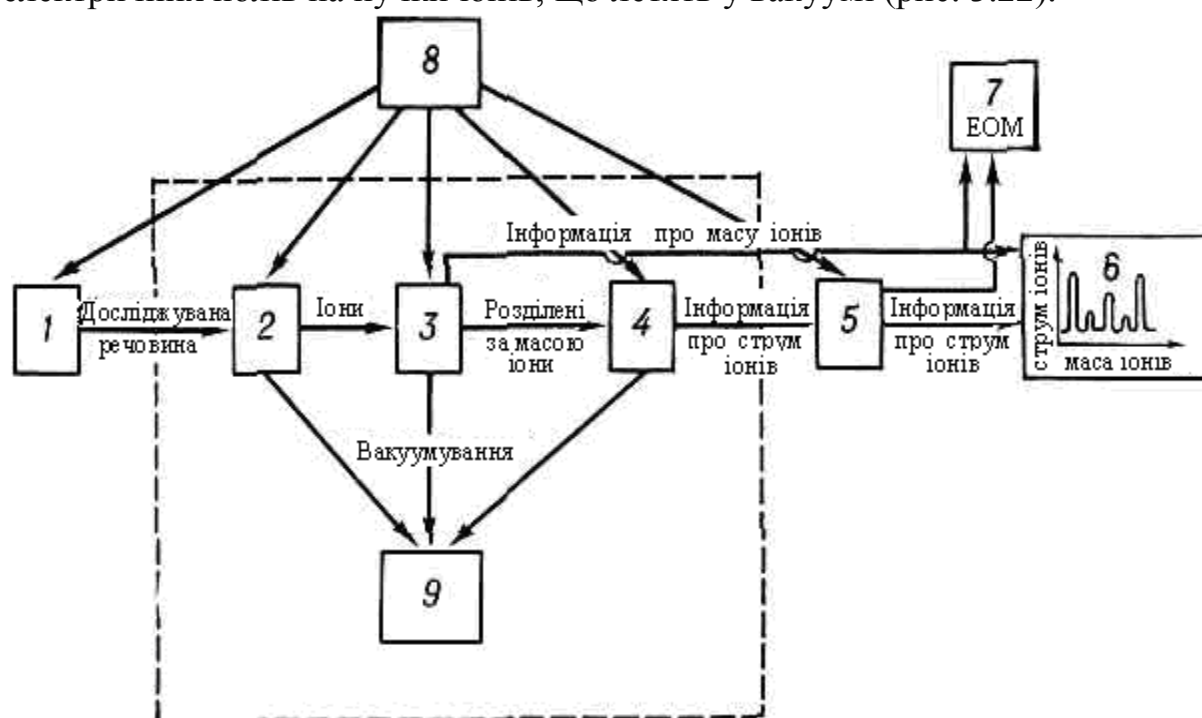
Рис. 3.21. Мас-спектрограма (а), отримана на мас-спектрографі з подвійним фокусуванням. Фотометрична крива цієї спектрограми (б) в області масового числа 20.

Для того, щоб іонізувати органічну речовину необхідно спочатку перевести її з рідкої фази або зі стану твердого тіла в газову фазу і ввести в джерело іонів, де вони зазнають бомбардування пучком електронів, що мають високу кінетичну енергію. Речовину вміщують в конденсованій фазі в джерело іонів і там її випаровують.

Електрони електронного пучка стикаються з молекулами, вибивають з їх електронних оболонок електрони і перетворюють молекули в іони. При цьому молекули часто розпадаються на заряджені фрагменти за певним для кожної сполуки механізмом. У результаті цього процесу одержуємо мас-спектр. Мас-спектр – це набір розподілених за масою іонів, що несе інформацію про структуру молекули. Така інформація характерна для кожної органічної сполуки. Цей процес відбувається у вакуумі, інакше електрони швидко зарядять молекули, що входять до складу повітря, й іони знову перетворюються в нейтральні молекули.

Інший спосіб іонізації – це іонізація в іонно-молекулярних реакціях, яка називається хімічною іонізацією. Джерело іонів заповнюється яким-небудь газом при підвищеному тиску (звичайно використовується метан або ізобутан, дуже рідко – аміак або інші газы), який іонізується електронним

Мас-спектрометри – це прилади для розділення іонізованих частинок речовини (молекул, атомів) за їх масою, заснований на впливі магнітних та електричних полів на пучки іонів, що летять у вакуумі (рис. 3.22).



Слід відзначити, що починаючи від іонного джерела і до детектора мас-спектрометр являє собою вакуумний прилад. Досить глибокий вакуум

забезпечує безперешкодний рух іонів усередині мас-спектрометра, а в його відсутності іони просто розсіюються і рекомбінують (перетворюються знову у незаряджені частки).

У мас-аналізаторі заряджені частки (іони) сортуються за масою (точніше за відношенням маси до заряду m/z).

Згідно з фізичними законами траєкторія заряджених часток у магнітному полі викривляється, а радіус кривизни залежить від маси частки. Саме це використовується для аналізу іонів за масою. Для того, щоб збільшити робочий дозвіл приладу, на шляху іонів встановлюється електростатичний аналізатор. Усі мас-аналізатори використовують фізичні закони руху заряджених часток.

Іони, утворені в іонному джерелі, виходять із щілини S_1 у вигляді пучка, що у магнітному полі розділяється на пучки іонів з різною величиною відношення маси іона до його електричного заряду m/z (рис. 3.23).

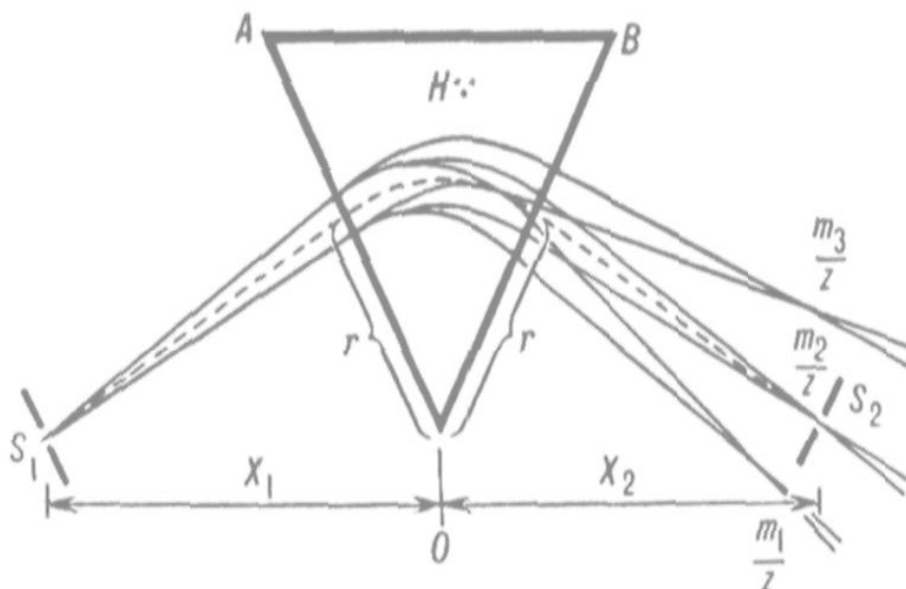
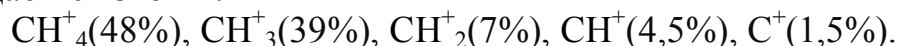


Рис. 3.23. Схема мас-аналізатора з однорідним магнітним полем: S_1 і S_2 – щілини джерела і детектора іонів, відповідно; OAB – область однорідного магнітного поля H , перпендикулярного пучку іонів; тонкі суцільні лінії – границі пучків іонів з різними m/z ; r – радіус центральної траєкторії іонів.

Далі іони з різними значеннями m/z рухаються в аналізаторі з різними радіусами кривизни і фокусуються на щілину детектора іонів. Мас-спектр утворюється (розгортається) при зміні магнітного або електричного поля, у результаті того, що в прийомну щілину послідовно потрапляють пучки іонів з різними величинами m/z . Сукупність значень m/z і величин струмів цих іонів, представлена у вигляді графіка, називається мас-спектром речовини.

Ідентифікація речовини. Набір іонів, що утворилися, являє собою молекулярний мас-спектр вихідної молекули. Наприклад, мас-спектр метану складається з іонів:



Мас-спектр речовини є його характеристикою і несе інформацію про молекулярну масу і структуру вихідної молекули (рис. 3.24).

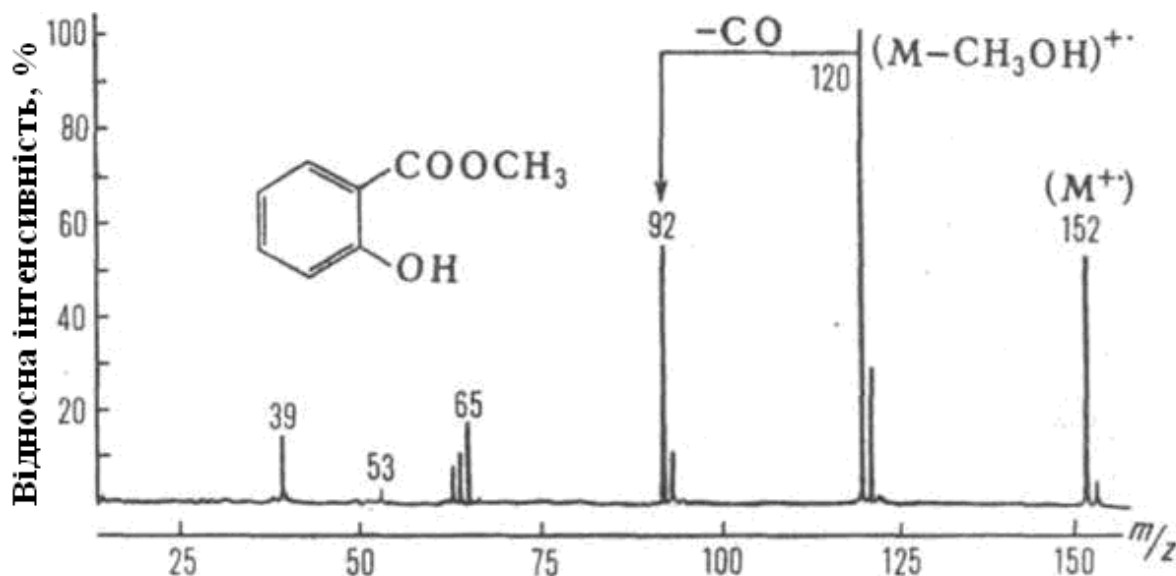


Рис. 3.24. Мас-спектр метилсаліцилату

Існують бібліотеки мас-спектрів, що містять молекулярні мас-спектри біля 10^5 речовин. Їх програмне забезпечення дозволяє ідентифікувати речовину, порівнюючи зареєстрований мас-спектр із каталогом, а у випадку відсутності молекулярного мас-спектра каталог "підказує", до якого класу сполук відноситься речовина.

На характеристичності мас-спектрів речовин заснований як якісний, так і кількісний аналіз хімічного складу сумішей.

Останнім часом широкого поширення набув мас-аналізатор на основі іонно-циклотронного резонансу. У цьому аналізаторі іони влітають у сильне магнітне поле і обертаються там по циклічних орбітах (як у циклотроні, прискорювачі елементарних часток). Цей тип мас-аналізатора дозволяє найбільш точно визначити масу іона.

При дослідженні сполук, які не можна перевести в газову фазу, також популярні "час-прольотні" мас-аналізатори. У звичайних мас-аналізаторах іони сортуються по масі за рахунок закономірностей руху заряджених часток у поле (магнітному або електростатичному). У час-прольотних аналізаторах іони із джерела розганяють електричним полем, здобуваючи досить велику кінетичну енергію, і вилітають у безпольовий простір. На вході в цей простір усі іони мають однакову кінетичну енергію, виражену через масу і швидкість $E = mv^2/2$. Залежно від маси іони будуть рухатися з різними швидкостями і у різний час досягнуть детектора, розташованого в кінці прольоту. Зареєструвавши їх і вимірявши час, можна порахувати і їх масу.

Новий вид мас-аналізатора був представлений в 2005 році. Цей аналізатор – орбітальний уловлювач іонів, який базується на електростатичному аксиально-гармонійному орбітальному уловлювачу іонів.

Орбітальна іонна пастка використовує симетричне статичне електричне поле між зовнішнім і внутрішнім електродами спеціальної форми. Іони, що потрапляють у поле, починають рухатися по стабільних циклічних траєкторіях навколо центрального електрода і детектуються на зовнішніх електродах. Частоти, що відповідають різним m/z , виділяються за допомогою Фур'є-перетворювача, а потім, конвертуються в мас-спектр.

Для аналізу елементної сполуки застосовуються мас-спектрометри з індуктивно-пов'язаною плазмою. За допомогою цього приладу визначають із яких атомів складається речовина. Цей же метод аналізу може показувати і ізотопний склад речовини.

Ізотопи. Атоми складаються з ядра і електронних оболонок. Властивості атомів визначаються тим, скільки протонів (позитивно заряджених елементарних часток) містить ядро. Ядро крім протонів містить ще і нейтрони. При рівній кількості протонів ядро може містити різну кількість нейтронів. Атоми з однаковою кількістю протонів у ядрі, але з різною кількістю нейтронів відрізняються за масою на одну або кілька одиниць атомної маси (а.е.м.) і називаються *ізотопами*. Більшість хімічних елементів мають певний набір стабільних ізотопів. Радіоактивні ізотопи не є стабільними і розпадаються з утворенням стабільних ізотопів. Природна поширеність ізотопів для кожного елемента відома. Деякі елементи в природі є моноізотопними, тобто 100 % природної поширеності припадає на один ізотоп (наприклад, Al, Sc, Y, Rh, Nb і т.д.), а інші мають безліч стабільних ізотопів (S, Ca, Ge, Ru, Pd, Cd, Sn, Xe, Nd, Sa і т.д.).

Оскільки маси ізотопів відрізняються, а мас-спектрометрія вимірює масу, то мас-спектрометри з індуктивно-пов'язаною плазмою є зручними для визначення ізотопного складу. Інформація про ізотопний склад допомагає ідентифікувати органічні сполуки і дозволяє дати відповіді на питання, пов'язані з фальсифікації багатьох продуктів і встановлення місця походження товарів та сировини.

Застосування. Широке використання мас-спектроскопічних методів аналізу обумовлене необхідністю проведення точних і швидких досліджень вмісту діючої речовини в препараті при фармацевтичному аналізі.

Мас-спектрометричний аналіз, досить часто в сукупності із хроматографією, дозволяє швидко визначати вміст органічних речовин у препаратах. При необхідності визначення чистоти препарату застосовується ізотопна мас-спектрометрія, яка вивчає природні та техногенні варіації ізотопного складу хімічних елементів. Вона дозволяє виявити всі елементи періодичної системи із чутливістю до 10^{-12} г.

Мас-спектрометричний аналіз застосовується при розробці нових лікарських засобів. Без мас-спектрометрії неможливий контроль виробництва лікарських засобів, контроль над незаконним поширенням наркотичних і психотропних засобів, криміналістичний і клінічний аналіз токсичних препаратів.

Мас-спектри використовуються для визначення структури молекул та ідентифікації речовин, тобто для проведення якісного аналізу складних органічних сполук.

Мас-спектрометри застосовуються для вивчення послідовності амінокислот у пептидах. Оскільки амінокислоти відрізняються молекулярною вагою, то різна маса відповідає різним пікам мас-спектра і дає змогу ідентифікувати амінокислоту.

Мас-спектрометрія застосовується для дослідження природи та ступеню гетерогенності ліпополісахаридів, будови олігосахаридів, розміщення жирних кислот у ліпідах.

За допомогою мас-спектрометрії проводиться аналіз токсичних препаратів і вибухових речовин, присутності слідових кількостей хімічних речовин (наприклад, пестицидів) у харчових продуктах, а також техногенних (тобто не існуючих у природі, таких, що з'явилися в результаті індустріальної діяльності людини) речовин, які є супертоксикантами, та мають отруйну, канцерогенну або іншу шкідливу для здоров'я людини дію в гранично низьких концентраціях.

Мас-спектрометрія дозволяє ідентифікувати білки, визначити зміни структури при їх виробництві, визначити шляхи метаболізму різних лікарських засобів та інших сполук, й ідентифікувати метаболіти.

Ефективність мас-спектрометрії, як методу молекулярного аналізу, різко зростає при його комбінації з іншими методами, особливо із хроматографією (поєднання мас-спектрометра з газовим або рідинним хроматографом). Високоєфективна рідинна хроматографія разом з мас-спектроскопічним аналізом є основним аналітичним інструментом при розробці нових лікарських засобів. Без цього методу не можливо обійтися при контролі якості вироблених ліків і виявлення такого розповсюдженого явища як їх фальсифікація.

Такі системи застосовуються у фармакології, біології. При цьому мінімальна кількість речовини для визначення становить 10^{-12} г. В табл. 3.4 наведено деякі області застосування мас-спектрометрії.

Таблиця 3.4

Деякі області застосування мас-спектрометрії

Хімічний та структурний аналіз	Ізотопний аналіз	Елементарний аналіз
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Хромато-мас-спектрометри	Мас-спектрометри для аналізу стабільних ізотопів у газовій фазі	Мас-спектрометри з іонізацією в Індуктивно пов'язаній плазмі

Продовження табл. 3.4

1	2	3
Біохімія Косметика Допінги, наркотики Продукти харчування Фармацевтична промисловість Полімери Токсикологія	Медична діагностика Продукти харчування Ароматичні речовини Алкогільні напої Допінг-контроль	Продукти харчування Медицина й токсикологія Продукти харчування

Запитання для самопідготовки

1. На чому оснований метод спектроскопії?
2. Що таке електромагнітне випромінювання? Охарактеризуйте різні види випромінювання.
3. У чому полягає квантова теорія випромінювання? Що таке вимушене випромінювання?
4. Охарактеризуйте оптичні спектри електромагнітного випромінювання.
5. З якою метою використовують спектральний аналіз? Які є види спектрального аналізу?
6. На чому оснований метод кругового дихроїзму? Де його застосовують?
7. Порівняйте методи ультрафіолетової та інфрачервоної спектроскопії. Яке практичне значення цих методів?
8. Які наукові основи фотометричного аналізу?
9. У чому суть спектрофотометричного методу аналізу? Які є різновиди цього методу?
10. З якою метою застосовують рефрактометричний аналіз?
11. Охарактеризуйте принцип дії інтерферометра Жамена? Де використовують цей прилад?
12. У чому відмінність нефелометричних і турбідиметричних методів аналізу? З якою метою застосовують ці методи?
13. Який метод аналізу оснований на теорії комбінаційного розсіювання світла?
14. З якою метою використовують Рамановські спектрометри та мікроскопи?
15. Де застосовується НВЧ-випромінювання?
16. У чому відмінність радіоспектроскопії від оптичної спектроскопії?
17. З якою метою застосовують ЯМР-спектроскопію?
18. У чому полягає принцип методу мас-спектрометрії? Де застосовуються мас-спектрометричні методи аналізу?

Список літератури

1. Айвазов, Б.В. Введение в хроматографию – М.: Высшая школа, 1983. – 240 с.
2. Основы аналитической химии / Под ред. Ю.А. Золотова. В 2 кн. Общие вопросы. Методы разделения. Серия "Классический университетский учебник". Кн.1. М.: Высшая школа, 2004. – 360 с.
3. Основы аналитической химии / Под ред. Ю.А. Золотова. В 2 кн. Методы химического анализа. Серия "Классический университетский учебник". Кн.2. М.: Высшая школа, 2004. – 504 с.
4. Карасек Ф., Клемент Р. Введение в хромато-масс-спектрометрию, пер. с англ., М.: Мир, 1993. – 237 с.
5. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980. – 472 с.
6. Дорохова Е.Н Прохорова Г.В. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. М.: Высшая школа, 1991. – 256 с.
7. Барковский В.Ф., Городенцева Т.Б., Тодорова Н.Б. Основы физико-химических методов анализа / Под ред. В.Ф. Барковского. – М.: Высшая школа, 1983. – 247 с.
8. Брицке М.Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ. М.: Химия, 1982. – 250 с.
9. Агасян П.К., Николаева Е.Р. Основы электрохимических методов анализа. М.: Химия, 1986. – 192 с.

Навчальне видання

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія»
денної та заочної форм навчання

СХВАЛЕНО

на засіданні кафедри
біотехнології і мікробіології
як конспект лекцій
Протокол № 7
від 22.11.2011 р.

Укладачі: Волошина Олена Семенівна

Антонюк Марія Миколаївна

Видання подається в авторській редакції

Підп. до друку 24.01.12. Ум. друк. арк. 9,3. Наклад 80 пр.
Зам. № 006-11А

НУХТ. 01601 Київ-33, вул. Володимирська, 68
www.book.nuht.edu.ua

Свідоцтво про реєстрацію серія ДК № 1786 від 18.05.04 р.

