

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

М.М. Корнет, О.А. Бражко, Л.О. Омелянчик

ФІЗИЧНІ МЕТОДИ В БІОЛОГІЇ

Навчально-методичний посібник
для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності «Біологія»

Запоріжжя
2015

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

М.М. Корнет, О.А. Бражко, Л.О. Омелянчик

ФІЗИЧНІ МЕТОДИ В БІОЛОГІЇ

Навчально-методичний посібник
для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності «Біологія»

Затверджено
вченою радою ЗНУ
Протокол № від

Запоріжжя
2015

УДК
ББК

Корнет М.М. Фізичні методи в біології: навчально-методичний посібник для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності «Біологія» / Корнет М.М., Бражко О.А., Омелянчик Л.О. – Запоріжжя: ЗНУ, 2015. – 102 с.

У навчально-методичному посібнику у відповідності з програмою стисло викладений теоретичний матеріал з основних фізичних методів дослідження, передбачених курсом, описані лабораторно-практичні заняття. Для самостійної роботи до кожної з тем аудиторної та позааудиторної роботи студентів складено запитання, задачі, а також для контролю знань запропоновано тестові завдання.

Для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності «Біологія».

Рецензент *М.П. Завгородній*, кандидат біологічних наук, доцент

Відповідальний за випуск *О.А. Бражко*, доктор біологічних наук, професор

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
Загальні правила роботи і техніка безпеки в фізико-хімічній лабораторії	7
Перша допомога в разі нещасних випадків	8
Тема 1. Загальне поняття про фізичні методи дослідження	9
Тема 2. Рефрактометрія. Поляриметрія	16
Тема 3. Коливальна спектроскопія. ІЧ-спектроскопія, Фур'є-спектроскопія, спектроскопія КР	26
Тема 4. Електронна спектроскопія. УФ-спектроскопія. Люмінесцентний, флуоресцентний аналіз	38
Тема 5. Хроматографія: паперова, тонкошарова, іонообмінна	50
Тема 6. Газова та рідинна хроматографія	63
Тема 7. Мас-спектрометрія та хромато-мас-спектрометрія. ЯМР-спектроскопія	71
Тема 8. Стратегія комбінованого використання фізичних методів для визначення будови молекул	86
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА, ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ	95
ГЛОСАРІЙ	96
ДОДАТКИ	98

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високо ефективна рідинна хроматографія

ГХ – газова хроматографія

ГАХ – газо-адсорбційна хроматографія

ІОХ – іонно-обмінна хроматографія

ІЧ – інфрачервоний

КР – комбінаційного розсіювання

КССВ – константи спін-спінової взаємодії

НФ – нерухома фаза

ПМР – парамагнітний резонанс

ПХ – паперова хроматографія

РФ – рухома фаза

РХ – рідинна хроматографія

СФ – спектрофотометр

СКР – спектроскопія комбінаційного розсіювання

ТШХ – тонкошарова хроматографія

УФ – ультрафіолетовий

ФЕК – фотоелектроколориметр

ФМД – фізичні методи дослідження

ЯМР – ядерний магнітний резонанс

.. - теоретичні відомості

! - поняття

G - зверніть увагу

? - виконайте вправу

' - завдання (питання) для самоконтролю

ВСТУП

Мета та завдання навчального курсу «Фізичні методи в біології» – дати студентам біологічного факультету спеціальності «Біологія» знання з сучасних інструментальних методів досліджень у біології. Зокрема, дати студентам комплекс теоретичних знань та практичних навичок із принципів роботи дослідної апаратури; навчити самостійно використовувати методики кількісного вивчення хімічних та біологічних процесів, параметрів, що впливають на ці процеси; закріпити знання з фізики, аналітичної, органічної та фізколоїдної хімії, що дозволяє в процесі навчання оволодіти вмінням працювати на сучасних приладах; показати взаємозв'язок фізичних методів у біології з іншими дисциплінами фундаментального та професійно-орієнтованого напрямку; дати необхідну базу для подальшого самовдосконалення шляхом самостійної підготовки.

Курс є необхідною складовою частиною вивчення хімічних дисциплін. Він повинен ознайомити студентів із класифікацією фізичних методів аналізу та характеристикою окремих методів; із правилами обробки результатів спостережень; з особливостями вимірювання фізичних і хімічних параметрів систем відповідними приладами; із принципами роботи, можливостями та недоліками апаратів, межами їх використання, можливими похибками та причинами їх виникнення; з особливостями встановлення взаємозв'язку між будовою та властивостями органічних сполук у тому об'ємі, який необхідний для подальшого вивчення й розуміння основних хімічних та біологічних процесів, які відбуваються на молекулярному рівні.

Навчальним планом передбачено проведення лабораторно-практичних занять. Кожне заняття складається з двох частин. Перша частина – теоретична, включає групові семінари та різні форми виявлення ступеня засвоєння теоретичного матеріалу. Друга частина відводиться на виконання лабораторної роботи та оформлення звіту.

Мета теоретичної частини заняття – поглиблення, розширення та закріплення знань, одержаних на лекціях. Цей вид практикуму сприяє розвитку у студентів хімічного мислення, привчає самостійно працювати з літературою і використовувати отримані знання під час виконання лабораторної роботи.

Мета лабораторних робіт – закріплення студентами на практиці знань загальних властивостей, характерних фізичних та фізико-хімічних параметрів різних класів неорганічних та органічних сполук. Лабораторний практикум організовано так, щоб при його виконанні студенти ознайомилися з основними фізичними методами аналізу, виділення, очистки, властивостями, обладнанням, що використовується для аналізу, встановленням взаємозв'язку між будовою і властивостями органічних сполук.

У результаті вивчення курсу студент повинен **знати**:

- правила техніки роботи у фізико-хімічній лабораторії;
- класифікацію фізичних методів аналізу;
- теоретичні основи різних фізичних методів аналізу;

- особливості роботи приладів, які використовують для дослідження;
- особливості обробки дослідного матеріалу, причини виникнення різних видів похибок та їх аналіз;
- особливості обробки результатів експерименту;
- межі використання окремих інструментальних методів аналізу.

Уміти:

- готувати до експерименту об'єкти дослідження, виконувати заміри в межах практикуму з фізичних методів аналізу;
- проводити структурний, якісний та кількісний аналізи за результатами комплексного використання фізичних методів аналізу;
- аналізувати одержані експериментальні результати, оформивши їх у вигляді таблиць, графіків та діаграм.

Засвоєння курсу «Фізичні методи в біології» забезпечують знання, отримані студентами з дисциплін «Неорганічна хімія», «Фізика», «Органічна хімія», «Основи вищої математики», «Біоорганічна хімія», «Фізична хімія» та «Колоїдна хімія».

Метою навчально-методичного посібника є допомога бакалаврам біологічного факультету спеціальності «Біологія» у поглибленні та розширенні теоретичних засад, підготовці та виконанні циклу лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Фізичні методи в біології».

Кожна тема містить теоретичну частину, перелік основних понять та термінів, опис і порядок проведення лабораторної роботи, контрольні питання та завдання для письмового виконання, тести. Ефективність лабораторних занять з дисципліни залежить від рівня попередньо проведеної самостійної роботи студентів.

Самостійну роботу з підготовки до занять необхідно починати з ретельного вивчення теоретичного матеріалу за підручниками і конспектом лекцій, а потім ознайомитись з відповідним навчально-методичним посібником до практикуму. Якість опанування вивченого матеріалу слід обов'язково перевірити, відповідаючи на питання та виконуючи вправи й завдання, які наведено в цьому посібнику до кожного заняття.

Перед початком лабораторного практикуму студентам слід обов'язково ознайомитись з правилами роботи та технікою безпеки в лабораторії.

Кожен студент у робочому зошиті веде протокол занять. При оформленні протоколу вказується дата, назва теми, надається короткий опис фізичних методів дослідження, записуються результати аналізу, за необхідності будуються графіки, діаграми, заповнюються таблиці та робляться висновки.

ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА РОБОТИ І ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ В ФІЗИКО-ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Г Працювати в лабораторії дозволяється тільки в халаті. Заняття проводять у лабораторії з певним устаткуванням і приладами. Фізико-хімічна лабораторія має бути просторою, обладнаною спеціальними меблями і витяжною шафою, контрольно-вимірjuвальними приладами, які встановлюють в окремій кімнаті.

Виконуючи хімічні та фізико-хімічні дослідження, слід дотримуватися таких основних правил:

1. Під час роботи слід точно дотримуватись порядку й послідовності операцій, указаних у методиці дослідження.

2. Склянки з реактивами загального користування повинні знаходитись на визначеному місці; забороняється їх переносити на робочі столи.

3. Працювати в лабораторії слід обережно, без зайвої квапливості, не розливати та не розсипати реактиви. Надлишки реактивів забороняється висипати назад у склянку з чистими реактивами.

4. Досліди з токсичними речовинами або, тими що неприємно пахнуть, слід проводити тільки у витяжній шафі.

5. Усі досліди необхідно виконувати в такій кількості та концентрації реактивів, у тому хімічному посуді та приладах, як це вказано у відповідних методичних вказівках. Забороняється виконувати додаткові досліди без дозволу викладача.

6. Забороняється виливати в раковину залишки кислот, лугів, вогнебезпечних та з сильним запахом рідин; їх треба виливати в спеціальні склянки.

7. Категорично забороняється пробувати на смак чи запах хімічні речовини або пити воду з хімічного посуду. Зі всіма речовинами в лабораторії слід поводитись як з більш-менш шкідливими.

8. Під час нагрівання рідин і твердих речовин у пробірках не спрямовувати їх отвором на себе або в бік студентів, що знаходяться поряд; забороняється нахилитись над склянками або заглядати в пробірку зверху, щоб уникнути нещасного випадку в разі можливого викиду нагрітої речовини.

9. Прилади, які необхідно нагрівати або з яких будуть виділяться гази, не слід залишати закритими.

10. При всіх роботах, коли можливе розбризкування їдких речовин (переливання кислот, лугів, подрібнення чи розтирання в ступках, сплавлення та ін.), необхідно одягати захисні окуляри.

11. Для попередження бурхливого закипання та викиду рідини, яка нагрівається до кипіння, необхідно користуватись "кипілками" (шматочками подрібненого фарфору). "Кипілки" забороняється додавати в нагріту до кипіння рідину, їх слід вносити тільки в холодну рідину.

12. Роботи зі скляними трубками, капілярами та посудом необхідно виконувати обережно, остерігатися поранень. Вставляти скляні трубки в отвори скляного посуду слід без надмірних зусиль.

13. Під час розведення концентрованих кислот, особливо сульфатної, слід лити її у воду, а не навпаки.

14. Усі досліди з легкозаймистими, леткими, вогнебезпечними речовинами слід проводити подалі від відкритого полум'я і по можливості – у витяжній шафі.

15. У разі виникнення непорозумінь стосовно виконання дослідів необхідно припинити роботу та звернутися до викладача.

16. На робочому місці категорично забороняється вживати їжу, пити воду, курити. Після закінчення роботи необхідно ретельно вимити руки.

17. У разі нещасного випадку слід негайно звернутися до викладача!

18. Відпрацьовані розчини аргентум нітрату зливати в спеціально призначений для цього посуд з темного скла.

19. Економно використовувати газ, електричну енергію, дистильовану воду.

20. Працювати в лабораторії обов'язково в присутності іншої особи для надання допомоги тому, хто працює в разі нещасного випадку, пожежі тощо.

21. Після закінчення роботи впорядкувати своє робоче місце і старанно вимити руки з милом.

ПЕРША ДОПОМОГА В РАЗІ НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ

Г При отруєнні шкідливими газами треба негайно припинити досліди та відчинити вікна й двері. Потерпілого винести на свіже повітря, розстебнути одяг, дати понюхати вату, змочену нашатирним спиртом. Коли потерпілий опритомніє, напоїти міцним чаєм.

У разі неглибокого отруєння хлором або випарами бромом дати йому понюхати суміші етилового й нашатирного спиртів.

У разі отруєння йодом потерпілому слід випити крохмаль з водою, молоко, міцний чай або розчин соди.

У разі отруєння лугами потрібно випити молоко або трохи розбавленого розчину ацетатної чи цитратної кислоти.

При отруєнні кислотами потерпілому слід випити води з розтертою крейдою, вапняної води або розбавлений розчин натрій гідроген карбонату. Не вживати блювотних засобів і не промивати шлунок.

При опіках рану слід обробити розчином калій перманганату, таніну або маззю від опіків.

У разі потрапляння на шкіру кислоти або лугу уражене місце промити значною кількістю води, а потім відповідно розчином соди або кислоти.

ТЕМА 1. ЗАГАЛЬНЕ ПОНЯТТЯ ПРО ФІЗИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета: закріпити на практиці знання щодо загальних понять та класифікації фізичних методів дослідження.

План

1. Визначення поняття фізичних методів дослідження (ФМД).
2. Пряма й обернена задача ФМД.
3. Метрологічні характеристики ФМД.
4. Класифікація ФМД.

! **Основні терміни та поняття:** ФМД, пряма й обернена задачі, чутливість, точність, вибірковість, експресність, автоматизація.

1. *Визначення поняття фізичних методів дослідження*

..

Фізичні методи дослідження стали невід'ємною частиною сучасної хімії. Вони широко використовуються для встановлення складу й будови хімічних сполук. Цьому сприяє поява нової сучасної апаратури і комп'ютерних методів обробки спектрів, що значно розширює можливості спектральних методів.

Методом дослідження називають універсальний й теоретично обґрунтований спосіб, який дозволяє дослідити склад, будову, властивості хімічних сполук, субстанції й матеріалів, визначити термодинамічні, кінетичні та інші характеристики процесів безвідносно до досліджуваного об'єкту. Метод дослідження описує основні принципи, що покладені в його основу, прийоми його застосування й кількісні взаємозв'язки. Детальний, поетапний опис дослідження конкретного об'єкту за допомогою цього методу відображено у *методиці дослідження*.

У залежності від природи властивості, що вимірюється, і способу її реєстрації виділяють хімічні, фізичні та біологічні методи дослідження. Хімічні методи базуються на хімічних, у тому числі електрохімічних реакціях. В основу фізичних методів покладено фізичні явища та процеси, наприклад, процеси взаємодії речовини з електромагнітним випромінюванням, потоками частинок, різними фізичними полями. Біологічні методи засновані на використанні явищ життя. Аналітичним сигналом при їх проведенні є реакція живих організмів на зміну складу та властивостей навколишнього середовища. Наприклад, використання живих організмів як різних індикаторів.

Наведена класифікація дуже умовна. Багато методів можуть бути включеними до різних груп. Наприклад, фотометричні, термічні, мас-спектрометричні методи є прикладом ФМД, на різних стадіях проведення вони

супроводжуються протіканням хімічної реакції. Але кожна група методів, в тому числі й фізичні методи, має певне тлумачення.

Фізичними називаються методи дослідження, що базуються на використанні різних фізичних явищ чи процесів - взаємодії сполук із полем, випромінюванням чи частинками, при якій проявляються ті чи інші властивості сполуки.

2. Пряма й обернена задача ФМД

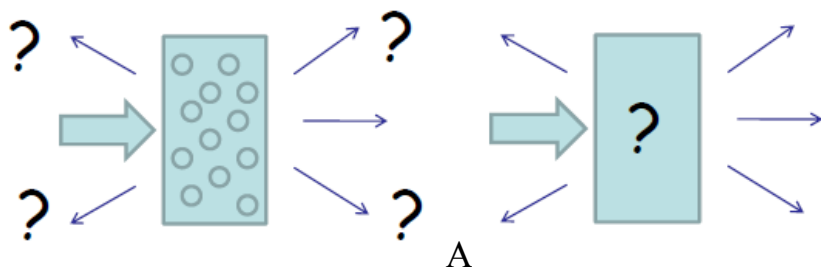
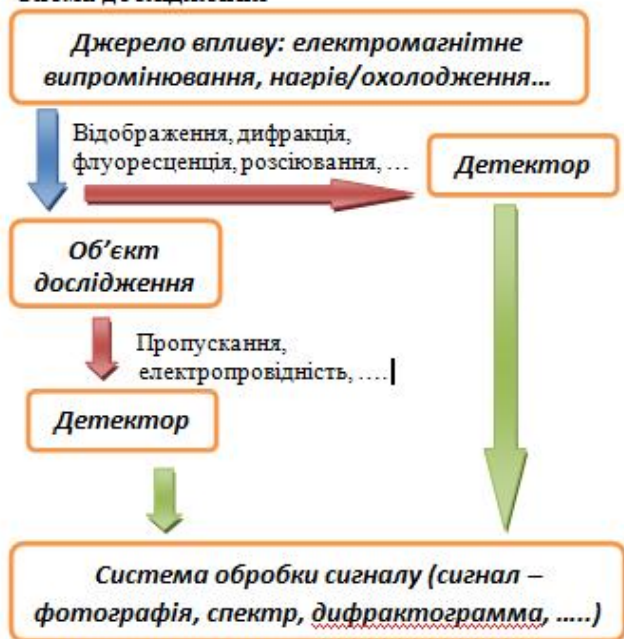


Рис. 1. Пряма (А) та обернена (Б) задачі

Поля, що взаємодіють, можуть бути магнітними, електричними, гравітаційними та ін.; випромінювання – гамма-, рентгенівським, оптичним та ін.; частинки – α -, β - та ін. У результаті взаємодії досліджуваного об'єкту з випромінюванням, полем чи потоком частинок змінюються не тільки властивості речовини, але й характеристики поля, випромінювання й потоку частинок. У зв'язку з цим виділяють пряму й обернену задачі ФМД:

- пряма задача (рис. 1А) – визначення характеристик поля, випромінювання чи потоку частинок після їх дії на речовину;
- обернена задача (рис. 1Б) – визначення фізичних властивостей

Схема дослідження



сполуки на основі вимірювання характеристик поля, випромінювання чи потоку частинок.

Хіміки вирішують обернену задачу. На основі відомих, установлених раніше експериментальним шляхом чи теоретично, взаємозв'язків між властивостями сполуки і характеристиками поля, випромінювання чи потоку частинок роблять висновки про склад, будову, властивості сполук і матеріалів чи про характеристики процесів, що протікають.

Важливим є правильний вибір методу дослідження. Обираючи метод, необхідно чітко представляти мету дослідження, що проводиться, завдання, які при цьому необхідно вирішити, переваги та недоліки методів, які доступні для досягнення поставленої мети.

3. Метрологічні характеристики ФМД

Основними факторами, які необхідно враховувати при виборі методу дослідження, є їх метрологічні характеристики, а саме загальний вміст сполуки, чутливість, точність, вибірковість, експресність, автоматизація, економічний фактор та ін.

Вміст – це одна з основних метрологічних характеристик, яку необхідно враховувати при виборі методу дослідження. При цьому необхідно брати до уваги не тільки вміст компоненту в даному зразку, але й загалом доступну для дослідження кількість речовини.

Чутливість визначається мінімальною кількістю речовини, при дослідженні якої можливе визначення тієї чи іншої властивості цим методом із заданою високою довірчою ймовірністю. Характеристиками чутливості методу є межа виявлення та нижня межа (чи оптимальний інтервал) вмісту, що визначається. Межа виявлення – це найменший вміст, при якому досліджувана сполука проявляє себе за таких умов фізичного впливу. Поняття межі виявлення належить якісному аналізу, воно визначає мінімальну кількість (m_{min} чи C_{min}) компоненту. Межа виявлення може також бути заданою мінімальним аналітичним сигналом, який упевнено відрізняється від сигналу фону.

На відміну від інших методів, ФМД характеризуються високою чутливістю. Найбільш чутливими є мас-спектрометричні та радіоактиваційні методи. Наприклад, чутливість визначення деяких елементів (усереднені величини мінімальних вмістів, що визначаються у пробі, %):

титрометричні методи	– 0,1	кінетичні методи	– 10^{-8} - 10^{-6}
гравіметричні методи	– 0,01-0,1	радіохімічні методи	– 10^{-9} - 10^{-8}
спектроскопічні методи	– 10^{-5} - 10^{-3}	радіоактиваційні	– $\square 10^{-9}$
флюорометричні методи	– 10^{-7} - 10^{-5}		

Точність – збірна характеристика, яка включає правильність і відтворюваність результатів. Говорячи про високу точність методу, припускають, що отримані за допомогою нього результати правильні і їх розкид незначний. Точність характеризується відносною похибкою, вираженою в процентах. *Правильність* – це близькість результатів (\bar{x}) до значення, прийнятого за істинне. Правильність характеризує величину систематичної похибки. *Відтворюваність* – характеризує близькість за абсолютним значенням двох чи більше результатів, отриманих в однакових умовах. Відтворюваність визначає величину випадкової похибки.

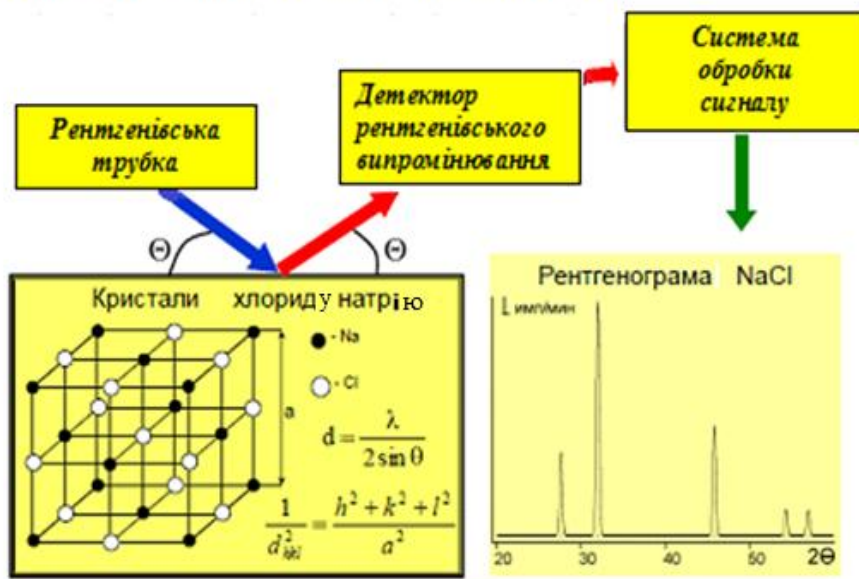
Достатню низька точність визначення, у порівнянні з хімічними методами, є одним з недоліків ФМД. Наприклад, відносна точність визначення складає:

гравіметричні методи	-	(0,05-0,2)%
титрометричні методи	-	(0,1-0,5)%
кулонометричні методи	-	(0,001-0,01)%
спектроскопічні методи	-	(2-5)%
термічні методи	-	(5-10)%

Вибірковість характеризує можливість у даних умовах вивчити певну властивість досліджуваного компонента за наявності інших компонентів, що входять до складу зразка. Якщо метод дозволяє отримати інформацію тільки про один компонент проби, то його називають специфічним (вибірковим), коли сигнал, що реєструється, є результатом дії багатьох компонентів проби – метод відноситься до універсальних. Більшість фізичних методів є універсальними.

Характеристичний час методу. При постановці завдання та виборі методу дослідження слід також враховувати той факт, що акт взаємодії

Приклад: метод «рентгенографія полікристалів»



випромінювання, поля, частинок зі сполукою триває визначений час. Його називають характеристичним часом методу. Якщо система, яку вивчають, за проміжок часу взаємодії встигає зазнати яких-небудь змін, то результат взаємодії буде усередненим за декількома станами системи.

4. Класифікація ФМ

Сьогодні відома велика кількість ФМД. Усі вони за різними характеристичними ознаками об'єднані в різні групи. Розглянемо деякі приклади розподілу методів у групи за рядом кваліфікаційних ознак.

А) Природа взаємодії:

Види впливу	Приклад методу
Поле	<ul style="list-style-type: none"> - Ядерний магнітний резонанс (ЯМР) - Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР)
Випромінювання	<ul style="list-style-type: none"> - Методи електронної спектроскопії: УФ-спектроскопія, люмінесцентні методи - Методи коливальної спектроскопії: ІЧ-спектроскопія (ІЧС), спектроскопія комбінаційного розсіювання (СКР) - Методи обертальної спектроскопії
Потоки (спрямовані пучки) частинок – електронів, нейтронів	<ul style="list-style-type: none"> - Електронографія, нейтронографія, електронно-зондовий мікроаналіз

Б) *Енергія впливу* (на прикладі методів 2-ї групи за першою кваліфікаційною ознакою):

<i>Випромінювання</i>	<i>Енергія</i>		<i>Процеси, які протікають</i>	<i>Приклад методу</i>
	<i>E, eV</i>	<i>λ, см</i>		
Гамма-	$\sim 10^7$	$10^{-11}-10^{-8}$	Зміни в енергетичном у стані ядер, ядерні реакції	Структурні методи, наприклад, гамма-активаційний аналіз
Рентгенівське	$\sim 10^5$	$10^{-8}-10^{-6}$	Зміни в енергетичном у стані внутрішніх електронів	Структурні методи, наприклад, рентгенівська спектроскопія
УФ та видиме (оптичне)	~ 10	$10^{-6}-10^{-4}$	Зміни в енергетичном у складі валентних електронів	Методи електронної спектроскопії, наприклад, УФ-спектроскопія, люмінесцентні методи
Інфрачервоне	Частинки eV	$10^{-4} - 10^{-1}$	Коливання атомів у молекулах	Методи коливальної спектроскопії, наприклад, ІЧС, СКР
Мікрохвильове	$\sim 10^{-3}$	$10^{-1} - 10$	Коливання атомів (іонів) у вузлах кристалічної решітки	Методи обертальної спектроскопії
Радіохвилі	$\sim 10^{-6}$ (10 Гц – 1 ГГц)	$\square 100$	Зміна спінів ядер та електронів	ЯМР, ЕПР, ЯКР (ядерний квадрупольний резонанс)

В) Фізична природа процесу взаємодії:

- Методи, засновані на здатності сполук поглинати, випромінювати, розсіювати (комбінаційне розсіювання) випромінювання. До цієї групи відносять спектроскопічні методи (УФ-спектроскопія, люмінесцентні методи, спектроскопія комбінаційного розсіювання). За допомогою цих методів досліджують електронні, коливальні та обертальні енергетичні стани елементарних систем і переходи між цими станами. На основі отриманих даних роблять висновок про властивості, будову та ін. досліджуваних сполук чи їх складників, про характеристики процесів, що протікають;

- методи, засновані на вивченні пружного (*Релеївського*) розсіювання випромінювання і потоку частинок. До цієї групи відносять дифракційні методи, наприклад:

- рентгенографія, $\lambda_r \sim 10^{-1}$ нм
- електроннографія, $\lambda_e \sim 5 \cdot 10^{-3}$ нм, швидкі електрони
- нейтронографія, $\lambda_n \sim 10^{-1}$ нм, теплі нейтрони

- методи, засновані на дослідженні вторинних ефектів взаємодії випромінювання з речовиною. Цю групу складають оптичні методи, наприклад фотоелектронна спектроскопія – аналіз розподілу вибитих електронів за енергією; мас-спектрометрія – розподіл за масовими числами іонів, утворених при іонізації молекул.

Г) Властивість чи параметр, що визначаються:

- методи визначення геометричної будови, наприклад, мікрохвильовий метод, газова електроннографія, методи дослідження обертальних спектрів комбінаційного розсіювання та ін.;

- методи визначення дипольних моментів молекул, наприклад, методи Дебая, метод Онганзера та ін.

Отже, як бачимо з прикладу, один і той же метод цілком виправдано може входити до різних груп методів.

У сучасних умовах важливим є інтеграція різних методів. При вирішенні складних задач використання тільки одного методу дослідження є недостатнім. Глибина взаємного доповнення і проникнення методів різна. Це може бути просто зіставлення і доповнення результатів декількох методів. У ряді випадків об'єднання методів призводить до виникнення нових методів дослідження. За глибиною взаємного проникнення виділяють комбіновані та гібридні методи дослідження. Наприклад, до гібридних методів належать термогравіметрія і хромато-мас-спектрометрія.

Ділянки використання ФМД дослідження досить широкі. Це, наприклад, виявлення і визначення сполук, встановлення геометричної будови, визначення електричних властивостей, дослідження різних рівноважних і нерівноважних процесів, визначення кінетичних і термодинамічних параметрів, дослідження механізмів процесів, дослідження різних теоретичних питань, наприклад, природи хімічного зв'язку, ізомерії та ін.

Контрольні питання та завдання:

1. Дайте визначення прямої та оберненої задачі фізичного методу.
2. У чому полягає інтеграція ФМД?
3. Які ФМД Вам відомі?
4. Які фізичні явища лежать в основі ФМД?
5. Які переваги і недоліки фізичних методів?
6. Сформулюйте умови коректно поставлених задач, наведіть приклади коректно і некоректно поставлених задач.
7. Назвіть найбільш важливі характеристики спектроскопічних методів.

ТЕМА 2. РЕФРАКТОМЕТРІЯ. ПОЛЯРИМЕТРІЯ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії рефрактометрії та поляриметрії, вивчити основи рефрактометричного аналізу, засвоїти роботу на рефрактометрі на практиці.

План

1. Рефрактометрія.
2. Поляриметрія.

! **Основні терміни та поняття:** рефрактометрія, поляриметрія, рефрактометричний фактор, адитивність, молекулярна рефракція, оптична активність, таблиці Ейзенлора.

1. Рефрактометрія

..
Рефрактометрія (від лат. *Refractus* – переломлений і грец. *Μετρέω* «вимірюю», *refractometry*) заснована на явищі заломлення світла при переході з одного середовища в інше, що називається *рефракцією*. Являє собою сукупність методів дослідження фізико-хімічних властивостей речовин на основі вимірювання їхніх показників заломлення світла.

Показником чи *коефіцієнтом заломлення* (n) називають відношення синуса кута падіння променями світла до синуса кута його заломлення:

$$n = \sin a / \sin b$$

Якщо промінь світла переходить з вакууму чи повітря в інше середовище, то кут падіння завжди більший від кута заломлення. При збільшенні кута падіння, змінюється співвідношення між величиною світлової енергії, що проходить в інше середовище, і відбитої від межі розділу. При кутах падіння вищих від критичного, світло цілком відбивається від поверхні розділу. Цей кут називається *кутом повного внутрішнього відбиття*. Знаючи кут повного внутрішнього відбиття a' , можна визначити показник заломлення: $n = 1 / \sin a'$

Для рідин і твердих тіл n зазвичай визначають щодо повітря, а для газів – щодо вакууму. Показник заломлення залежить від внутрішнього стану речовини, від її температури, тиску, концентрації, природи розчинника. Тому для систематизації отриманих результатів, приймається показник заломлення, визначений при температурі 20°C, у спектрі натрію D (жовта лінія, 589,3 нм), що позначається n_D^{20} . Часто використовують також лінії спектра водню C ($\lambda = 656$ нм) і F ($\lambda = 486$ нм).

Абсолютний показник заломлення (N) – це відношення швидкості поширення світла у вакуумі до його швидкості у даному середовищі:

$$N = c_0 / c$$

Відносний показник заломлення (n) – це відношення швидкості поширення світла в повітрі до швидкості його поширення в даному середовищі:

$$n = c_{\text{нов}} / c$$

Зв'язок між абсолютним і відносним показниками заломлення описується формулою: $N = 1,00027 \cdot n$

Межі вимірювання показників заломлення – 1,3-1,7. У разі газів необхідно також враховувати залежність n від тиску (вказувати його або наводити дані до нормального тиску).

Для рефрактометрії розчинів у широких діапазонах концентрацій користуються таблицями (наприклад, Рота і Ейзенлора, див. додаток 1) або емпіричними формулами, найважливіші з яких (для розчинів сахарози, етанолу та ін.) затверджуються міжнародними угодами і лежать в основі побудови шкал спеціалізованих рефрактометрів для аналізу промислової та сільськогосподарської продукції.

Аналітичні можливості.

За допомогою методу рефрактометрії можна проводити:

1. Якісний аналіз (ідентифікацію індивідуальних речовин), оскільки показник заломлення – характерна для даної речовини константа.

2. Кількісний аналіз, який заснований на залежності показника заломлення від концентрації речовини. Рефрактометрично можна аналізувати 1-, 2- і 3-компонентні системи (лікарські препарати, спирти, цукри та ін.). Однак найчастіше проводять аналіз 2-компонентних розчинів. Наприклад, можна проводити кількісний аналіз солей у водних розчинах (NaCl, NaBr, NaI, KBr, KI, CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, Na₂S₂O₃ і т.д.).

Метрологічні характеристики.

- Низька точність, але чим більша різниця в показниках заломлення компонентів суміші, тим вища точність.

- Низька чутливість, тому метод використовується при аналізі в зоні високих концентрацій (> 1%).

- Низька селективність, оскільки n – «неспецифічна» величина (для різних речовин значення n можуть бути близькі), тому метод використовується тільки для аналізу індивідуальних речовин або найпростіших сумішей (2-3 компоненти).

- Простота виконання й устаткування.

- Експресність.

- Мінімальна кількість проби.

Чинники, які впливають на величину n :

1. Фізико-хімічні властивості речовини (природа речовини):

- ρ – щільність: чим більше ρ , тим більше n ;

- ϵ – діелектрична постійна: $\epsilon = n^2$;

- α – поляризованість.

2. Зовнішні умови:

- λ – довжина хвилі: чим більше λ , тим менше n . Залежність n від λ називається *дисперсією*;

- t° – температура: чим більше t° , тим менше n ;

- p – тиск (для газів).

3. Концентрація (для розчинів): при інших постійних умовах показник заломлення лінійно залежить від концентрації:

$$n_p = n_o + F\omega,$$

де n_p – показник заломлення розчину;

n_o – показник заломлення розчинника;

F – аналітичний рефрактометричний фактор;

ω – масова частка речовини в розчині.

4. Тип розчинника (для розчинів).

Усі рефрактометричні вимірювання проводять при постійних зовнішніх умовах: $\lambda = \text{const}$, $t^\circ = \text{const}$.

Питома і молярна рефракція.

Установлено, що не сам показник заломлення, а деяка функція від нього прямо пропорційна щільності:

$$f(n) = r\rho,$$

де $f(n)$ – деяка функція показника заломлення;

r – коефіцієнт пропорційності, названий *питомою рефракцією*;

ρ – щільність.

Відповідно до формули Лоренц – Лорентца, ця функція має вигляд:

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}, \quad \text{тоді} \quad r = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{\rho}.$$

При множенні питомої рефракції на молярну масу отримуємо *молярну рефракцію*:

$$R = r \cdot M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{\rho}.$$

Питома та молярна рефракції не залежать від зовнішніх умов – температури, тиску, агрегатного стану речовини.

Рефракція підкоряється правилу адитивності:

1. Правило адитивності молярної рефракції для індивідуального речовини: рефракція молекули дорівнює сумі атомних рефракцій або сумі рефракцій зв'язків:

$$R_{\text{молекули}} = \sum R_{\text{атомів}};$$

$$R_{\text{молекули}} = \sum R_{\text{зв'язків}}.$$

За допомогою цього правила проводиться ідентифікація органічних сполук.

Прийоми знаходження невідомої концентрації у рефрактометрії:

- метод градуйованого графіка. Можна використовувати навіть у разі нелінійної залежності;

- за спеціальними рефрактометричними таблицями $n - \omega$, які складені для багатьох речовин;

- метод стандартів – за значенням аналітичного рефрактометричного фактора F .

Недоліки методу.

1. Низька чутливість і недостатня точність, незважаючи на порівняно велику точність виміру показника заломлення.

2. Складна та крихка оптична система (рефрактометр Аббе).

3. Після кожного розчину необхідно ретельно протирати поверхневі призми серветкою, змоченою в дистильованій волі, а наприкінці роботи – сухою. (рефрактометр Аббе).

Переваги методу.

До переваг рефрактометричного методу належать його простота і відносно невисока вартість приладів для визначення коефіцієнта заломлення світла. Звичайні рефрактометри забезпечують точність до 3-10%. При застосуванні деяких спеціальних методів рефрактометрії точність може бути збільшена на декілька порядків. Застосовують для контролю чистоти і для ідентифікації індивідуальних речовин, для визначення будови органічних і неорганічних сполук.

2. Поляриметрія

Поляриметрія (polarimetry) – ФМД, заснований на визначенні ступеня поляризації світла і кута повороту площини поляризації світла при проходженні його через оптично активні речовини. Цим методом можна визначати тільки оптично активні речовини, тобто речовини, що обертають площину поляризації світла. Поляризоване світло відрізняється від неполяризованого тим, що коливання світлових хвиль у ньому відбуваються тільки в одній площині, а не у всіх площинах. *Площиною поляризації* називають площину, у якій відбувається коливання хвиль поляризованого світла.

Якщо через кристали, для яких властива оптична неоднорідність, пропускати поляризоване світло, то при розгляданні через них (турмалін, ісландський шпат і ін.) спостерігається подвійне зображення. У кристалі спостерігається роздвоєння променя світла, причому обидва промені поляризовані, однак їхні площини поляризації взаємно перпендикулярні. Тому один промінь заломлюється більшою мірою, інший – меншою. На цьому і заснована дія *поляризатора – призми Ніколя* (рис. 2), яка складається з двох призм з ісландського шпату, склеєних разом. Отже, у призмі Ніколя один промінь піддається внутрішньому відображенню, а інший проходить через призму. Останній, пройшовши через призму Ніколя, цілком поляризований, а його площина поляризації обертається в розчинах оптично активних речовин. Оптична активність властива особливо органічним речовинам, що містять атом вуглецю, зв'язаний з чотирма різними функціональними групами, тобто *асиметричний атом вуглецю*. Під дією асиметричності структури в таких речовинах поляризоване світло відхиляє площину поляризації в порівнянні з первісним положенням.

Відхилення площини поляризації від початкового положення, яке виражається в кутових градусах, називають *кутом обертання* й позначають α (або L). Його величина залежить від природи речовини, концентрації розчину, природи розчинника, товщини шару, довжини хвилі світла і температури. Отже, при сталості всіх параметрів (товщини шару, довжини хвилі, температури) для даної речовини кут обертання залежить тільки від концентрації.

Порівняльну оцінку можливості речовин обертати площину поляризації здійснюють за допомогою величин питомого обертання.

Питоме обертання – це обертання площини поляризації в правий чи лівий бік, що відбувається при проходженні через шар розчину в 1 дм, з концентрацією 1 г/см³ (кг/дм³). Зазвичай питоме обертання визначають за температури 20 °С, використовуючи світло з довжиною хвилі лінії D спектра натрію (589,3 нм). При цьому питоме обертання позначають $[\alpha]_D^{20}$. Праве питоме обертання позначають знаком «+» або індексом d, ліве – знаком «-» або індексом l.

Питоме обертання для розчинів оптично активних речовин визначають за формулою:

$$[\alpha] = \frac{100 \cdot \alpha}{C \cdot l}$$

де α – кут обертання в градусах; l – товщина шару розчину в дециметрах і C – концентрація речовини в г/100 мл розчину.

Для індивідуальних рідких речовин питоме обертання визначають за формулою:

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{r \cdot l}, \quad \text{де } \rho \text{ – густина речовини.}$$

Величина питомого обертання часто залишається сталою тільки у певному інтервалі концентрації. Тому необхідно зазначати, при якій концентрації речовини здійснювали визначення питомого обертання. Знаючи величину й інтервал концентрацій, в якому ця величина постійна, після визначення кута обертання α розчину, який досліджується, можна розрахувати концентрацію цього розчину (*кількісний аналіз*) C – за формулою:

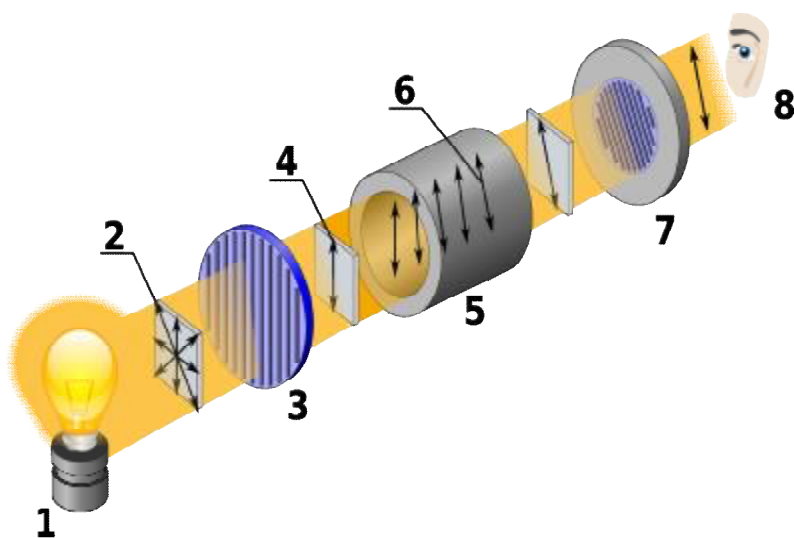
$$C = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha]_c \cdot l}$$

Якісний аналіз – базується на вимірюванні кута обертання площини поляризації випробовуваною речовиною або її розчином і розрахунку питомого обертання.

Концентрацію речовини у розчині можна також визначити, використовуючи градувальний графік (координати α - C).

Вимірювання кута α здійснюють за допомогою приладів, які називають *поляриметрами*. Випускають кілька модифікацій поляриметрів для виміру кута обертання (кругові, клинові). Основними вузлами поляриметра є поляризатор й аналізатор. Перший служить для перетворення природного світла на поляризоване, а другий – для визначення положення площини поляризації. Спочатку встановлюють нульове положення призм. Для цього в прилад ставлять порожню трубку (якщо досліджують чисту рідку речовину) або трубку, наповнену розчинником. Перед приладом встановлюють електричну лампочку (якщо в прилад вмонтований жовтий світлофільтр) чи пальник, в полум'я якого вносять хлорид натрію. Потім приводять призми аналізатора в положення, при якому обидва поля зору мають однакове освітлення. Повторюють цю операцію три рази і беруть середній результат, який і приймають за нульове положення призм. Після цього трубку заповнюють

досліджуваною рідиною (не повинно бути пухирців повітря). Трубку ставлять в



прилад і знімають показники поляриметра як було вказано вище.

Рис. 2 Принципова схема поляриметра:

- 1 – джерело світла,
- 2 – неполяризоване світло,
- 3 – поляризатор (призма Ніколя),
- 4 – поляризоване світло,
- 5 – кювета з розчином оптично активної речовини,
- 6 – оптичне обертання 30° ,
- 7 – аналізатор,

8 – спостерігач

Переваги методу: простота апаратурного оформлення.

Недоліки методу: невисока точність (для підвищення точності поляриметри забезпечені додатковими деталями з кварцу) і низька чутливість.

Застосування: для контролю чистоти субстанції оптично активних речовин (вуглеводи, амінокислоти); для підтвердження тотожності, справжності за величиною питомого обертання (аскорбінова кислота, камфора, левоміцетин, атропіну сульфат, морфін, ефедрин, рибофлавін і т.д.); для кількісного визначення цукрів (сахаридів).

Лабораторна робота № 1

Тема: Кількісний та якісний аналіз органічних сполук за допомогою рефрактометрії

Мета: вивчити основи рефрактометричного аналізу, засвоїти роботу на рефрактометрі RL-3. Навчитися визначати n за допомогою рефрактометра і розрахувати концентрацію речовини за калібрувальним графіком, навчитися проводити структурний аналіз сполук за молекулярною рефракцією.

Завдання № 1. Визначення концентрації розчинів за методом градуовальної залежності.

Прилади та реактиви: рефрактометр RL-3, розчини різної концентрації CaCl_2 , KCl , NaCl , NaBr , KI , етиловий спирт, вата, піпетки, фільтрувальний папір, міліметровий папір.

Хід роботи:

Таблиця № 1. Залежність показника заломлення від концентрації при н.у.

Речовина	2%	4%	6%	8%	10%
CaCl_2	1,3354	1,3377	1,3400	1,3422	1,3445
KCl	1,3357	1,3383	1,3409	1,3434	1,3460

NaCl	1,3364	1,3397	1,3430	1,3462	1,3495
NaBr	1,3350	1,3383	1,3436	1,3462	1,3492
KI	1,3356	1,3382	1,3408	1,3434	1,3460

Після вивчення інструкції з експлуатації рефрактометра RL-3 (рис. 3), і здачі правил роботи викладачеві, виміряти показники заломлення розчинів невідомої концентрації (CaCl_2 , KCl , NaCl , NaBr , KI). Побудувати калібрувальний графік залежності показника заломлення (n) від концентрації (C), використовуючи показники заломлення розчинів речовини відомої концентрації (див. рис. 5, таб. № 1). Використовуючи n розчину з невідомою концентрацією речовини, визначити концентрацію за графіком.

Оптична схема рефрактометра

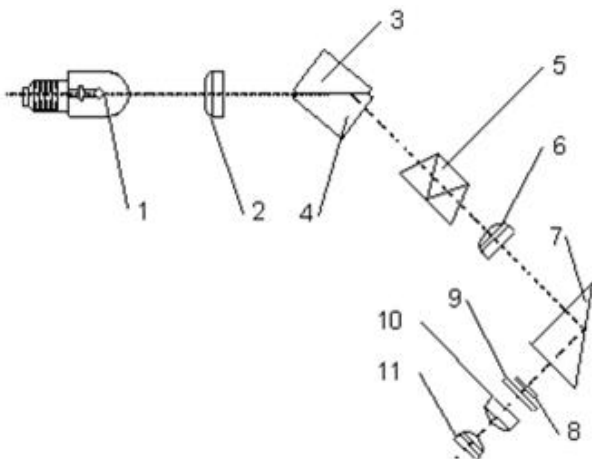
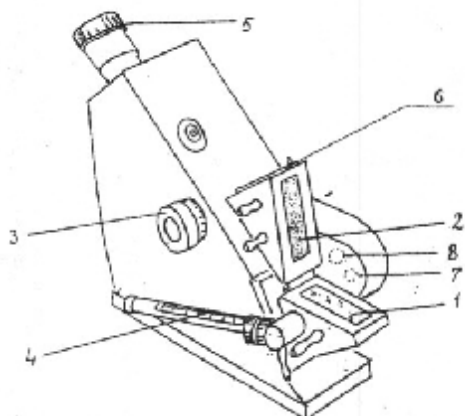


Рис.3 . Схема рефрактометра RL-3

У рефрактометрі на освітлювальну призму 3 від джерела білого світла 1 через лінзу 2 направляється світловий промінь, який, розсіюючись, проходить через тонкий шар досліджуваної рідини і заломлюється на поверхні вимірної призми 4 (рис. 3). Унаслідок дисперсії межа світла й тіні виявляється забарвленою, тому після виходу із вимірної призми на шляху світла встановлюється дисперсійний компенсатор 5, складений із трьох призм з різними показниками заломлення.

Призми підібрані таким чином, щоб монохроматичний промінь з довжиною хвилі 589,5 мкм не відхилявся після проходження компенсатора. Промені інших довжин хвиль відхиляються в різних напрямках. Переміщаючи компенсатор з допомогою спеціальної ручки, добиваються того, щоб межа світла й тіні стала різкою. Далі промені світла через об'єктив 6 і повертаючи призму 7 потрапляють в зорову трубу. При спостереженні межі світла й тіні в окулярі одночасно видно шкалу 9, на якій нанесені значення n .

Принцип роботи на рефрактометрі заснований на визначенні показника заломлення методом граничного кута (кут повного відбиття світла).



- 1 – полірована грань призми
- 2 – освітлювальна призма
- 3 – ручка компенсатора дисперсії
- 4 – термометр
- 5 – окуляр
- 6 – кришка
- 7 – дзеркало підсвічення
- 8 – ручка переміщення шкали

Рис. 4. Зовнішня будова RL-3

Головною деталлю рефрактометра є вимірювальна призма (рис. 4) з оптичного скла, показник заломлення якого відомий. Вхідна грань вимірювальної призми, що стикається з досліджуваною речовиною, служить межею розділу, на якій відбувається заломлення і повне внутрішнє відбиття променя. Через вихідну грань вимірювальної призми в зорову трубу спостерігають переломлення або віддзеркалення світла.

G *Порядок роботи*

1. До початку вимірювань перевіряють чистоту дотичних поверхонь призми.

2. Перевірка нульової точки. На поверхню вимірювальної призми нанести 2-3 краплі дистильованої води, обережно закрити освітлювальну призму. Відкрити освітлювальне віконце і встановити в напрямку найбільшої інтенсивності джерела світла за допомогою дзеркала. Шляхом обертання гвинтів отримати різке, чітке, безбарвне розмежування світлого й темного поля в поле зору окуляра. Обертаючи гвинт, нанести лінію світла і тіні точно до збігу з точкою перетину лінії в верхньому віконці окуляра. Вертикальна лінія в нижньому віконці окуляра вказує результат вимірювання – показник заломлення води при 20 °С дорівнює 1,333. У випадку інших свідчень показник заломлення встановлюють гвинтом на 1,333, а за допомогою ключа (регулювальний гвинт) призводять кордон світла і тіні до точки перетину ліній.

3. Після установки приладу на нульову точку піднімають камеру освітлювальної призми, фільтрувальним папером знімають воду. Потім наносять 1-2 краплі досліджуваного розчину на площину вимірювальної призми, камеру закривають. Обертають гвинти до збігу межі світла й тіні з точкою пересічної лінії. За шкалою в нижньому віконці окуляру роблять відлік коефіцієнта заломлення розчину. Концентрацію розчину визначають за відповідними таблицями. При вимірюванні концентрації розчинів, температура яких відрізняється від 20 °С, слід користуватися іншою таблицею.

4. Після кожного визначення необхідно обидві камери промити водою та витерти насухо фільтрувальним папером або серветкою, між камерами залишити прокладку з тонкого шару вати.

5. Визначення концентрації за таблицями. Існують таблиці для визначення концентрації лікарських засобів, виготовлених ваговим методом. У таблицях наведено коефіцієнти заломлення та відповідні їм концентрації речовин. У деяких таблицях наведені коефіцієнти заломлення з точністю до третього знака. У цьому випадку концентрація, відповідна значенню показника заломлення, взятому з четвертим знаком, визначається інтерполяцією.

Приклад. Коефіцієнт заломлення розчину кальцію хлориду – 1,3453. Найближчі показники в таблиці 1,3450 і 1,3460 – відповідні концентрації 10% і 10,9%, різниця між ними (0,9%) дорівнює одиниці третього знака.

Запобіжні заходи під час роботи. Найшвидше в приладі виходять з ладу призми, тому необхідно дотримуватися наступних правил безпеки:

1. Перед визначенням n призми ретельно очищаються від бруду й пилу.

2. Не допускається вимірювання n кислот і лугів, оскільки вони роз'їдають поверхню призм.

3. Після вимірювань протирають поверхні призм чистою м'якою серветкою, змоченою водою або спиртом, витирають насухо і закладають між призмами невелику суху чисту серветку або вату.

4. Категорично забороняється залишати на тривалий час між призмами досліджувану рідину, особливо розчин кальцію хлориду, оскільки поверхня призм після цього покривається тонким матовим шаром і вимір показника заломлення стає неможливим.

Результати вимірювань заносять в таблицю, за даними якої будують градуйований графік, який має вигляд, представлений на рис. 5.

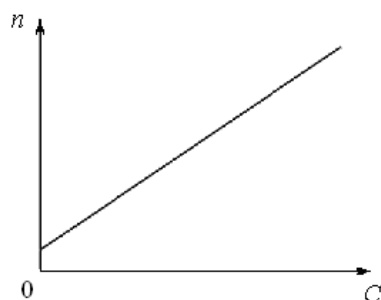


Рис. 5. Градуйований графік

Завдання № 2. Навчіться теоретично проводити структурний аналіз сполук використовуючи формулу молекулярної рефракції.

Приклад 1. Досліджувана сполука має склад $C_6H_{11}Cl$. Показник заломлення та щільність відповідно дорівнюють $n_D^{20} = 1,4626$ і $d_4^{20} = 1,0000$. Обчисліть молекулярну рефракцію за формулою 3:

$$R_D = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{\rho} \quad (3), \text{ де } n - \text{показник заломлення розчину; } \rho - \text{щільність}$$

розчину; M – молекулярна маса.

Оскільки для R властива адитивність, її можна обчислити, сумуючи ряд постійних доданків (формула 4): $R_{add} = \sum_j R_j$ (4)

Визначте структуру даної сполуки. При вирішенні цього завдання використовуйте таблиці Ейзенлора (додаток, табл. 1).

Приклад 2. Встановлено, що сполука має брутто-формулу $C_{10}H_{18}O$. $d_4^{20} = 0,8954$, $n_D^{20} = 1,4505$. Вирахувавши R і використовуючи значення R_{add} (за таблицями атомних рефракцій Ейзенлора), визначте, до якого класу органічних сполук належить досліджуваний розчин.

Контрольні запитання:

1. Що називається абсолютним і відносним показником заломлення? Від чого він залежить?
2. Як визначити показник заломлення на рефрактометрі?
3. Яка будова рефрактометра і принцип його дії? Опишіть оптичну схему рефрактометра.

4. Наведіть формулу для визначення молекулярної рефракції, її розмірність. Якими властивостями володіє молекулярна рефракція?
5. Що називається екзальтацією молекулярної рефракції (EM)?
6. Назвіть переваги та недоліки рефрактометричного методу.
7. Що таке поляризація світла, її види та характеристики?
8. Які джерела світла утворюють поляризоване випромінювання та чому випромінювання нагрітих тіл не є поляризованим?
9. Поясніть залежність кута повороту площини поляризації від довжини хвилі.
10. Перелічіть фактори, які заважають при поляриметричних вимірах.

Тестові завдання:

1. Явище заломлення світла при переході з одного середовища в інше називається
 - А) рефракція
 - Б) внутрішнє відображення
 - В) інтерференція
 - Г) поляризація.
2. Якщо промінь світла переходить із вакууму чи повітря в інше середовище, то кут падіння завжди ... від кута заломлення.
 - А) менший
 - Б) більший.
3. Принцип дії промислових рефрактометрів базується на використанні явища
 - А) внутрішнього поглинання світла
 - Б) повного внутрішнього відображення світла
 - В) інтерференції
 - Г) внутрішнього фотоефекту.
4. Питома рефракція визначається за формулою:
 - А) $r = f(n)/d$;
 - Б) $R_M = r \cdot M$;
 - В) $r = r_A P_A + r_B P_B$;
 - Г) $f(n) = f(n_A) V_A + f(n_B) V_B$.
5. Для монохроматичного променя встановлюється залежність – ...
 - А) кут падіння більше кута заломлення
 - Б) кут падіння менше кута заломлення
 - В) кут падіння дорівнює куту заломлення.
6. Оптичні явища, що лежать в основі методів поляриметрії:
 - А) віддзеркалення і заломлення світла
 - Б) поглинання світла
 - В) явище оптичної активності.
7. Концентрацію яких речовин можна виміряти за допомогою поляриметра?
 - А) прозорих
 - Б) забарвлених
 - В) оптично активних.
8. Яке явище описує закон Бугера?
 - А) заломлення світла
 - Б) поглинання світла речовиною
 - В) дифракцію світла
 - Г) поляризацію світла.
9. Який закон описує зміну інтенсивності поляризованого світла від кута повороту площини аналізатора?

А) закон Малюса Б) закон Брюстера В) закон Бугера.

10. Скільки оптичних осей може мати лінза?

А) нескінченну безліч Б) дві В) три Г) одну.

Література: 1, 2, 5, 8 Інформаційні ресурси: 1-5

ТЕМА 3. КОЛИВАЛЬНА СПЕКТРОСКОПІЯ. ІЧ-СПЕКТРОСКОПІЯ, ФУР'Є-СПЕКТРОСКОПІЯ, СПЕКТРОСКОПІЯ КР

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії коливальної спектроскопії, ІЧ-спектроскопії, Фур'є-спектроскопії, спектроскопії КР, навчитися розшифровувати ІЧ- та КР-спектри мінералів та органічних сполук, освоїти навички якісного аналізу сполук на практиці.

План

1. Коливальна спектроскопія.
2. Інфрачервона спектроскопія.
3. Фур'є-спектроскопія.
4. Спектроскопія комбінаційного розсіювання.

! **Основні терміни та поняття:** електромагнітне випромінювання, фотони, спектри, коливальна спектроскопія, ІЧ-спектроскопія, спектроскопія КР, Фур'є-спектроскопія, спектральні сигнали, спектральні діапазони, закон Ламберта-Бугера-Бера.

1. Коливальна спектроскопія

Електромагнітне випромінювання при взаємодії з речовиною може викликати в ньому процеси різноманітної фізичної природи. Загальний характер цих процесів залежить від енергії фотонів. Весь діапазон енергій електромагнітного випромінювання можна розділити на ділянки, що відповідають тому чи іншому фізичному процесу (табл. 2).

Таблиця 2. Ділянки енергій електромагнітного випромінювання та відповідні методи аналізу

Ділянка, метод	Характеристика енергій		Процес	Об'єкт
	$I, м$	Інші величини		
Радіочастотна (ЯМР, ЕПР)	$10^1 - 10^{-1}$	ν : 10 МГц – 1 ГГц	Зміна спінів ядер і електронів	Молекула
Мікрохвильова	$10^{-1} - 10^{-3}$	$1/\lambda$: 0,1 – 10 $см^{-1}$ ν : 3-300 ГГц	Зміна обертальних станів	Молекула (гази)
Оптична, інфрачервона (ІЧ, КР)	$10^{-3} - 10^{-6}$	$1/\lambda$: 10 – 13000 $см^{-1}$ ν : 300 ГГц-400 ТГц	Зміна коливальних станів	Молекула
Оптична, видима, УФ	$10^{-6} - 10^{-8}$	Видима: $\lambda=750-400$ нм; ν : 400-750 ТГц УФ: $\lambda=400 - 200$ нм; ν : 750ТГц-150 ПГц	Зміна станів валентних електронів	Молекула, Атом
Рентгенівська	$10^{-8} - 10^{-10}$	ν : 30 ПГц-300 ЭГц Е: 0,1 - 100 кэВ	Зміна станів внутрішніх електронів	Молекула, Атом
Гамма – випромінювання (ядерно – фізичні)	$10^{-10} - 10^{-13}$	ν : >30 ЭГц Е: 0,01 - 10 МэВ	Ядерні реакції	Молекула, Атом

Методи досліджень, які ґрунтуються на вивченні коливальних станів молекул чи інших складних частинок та переходів між цими станами, називаються *методами коливальної спектроскопії*. Коливальні переходи спостерігаються при дії на речовину електромагнітного випромінювання. Їх реєструють за допомогою спектральної апаратури і представляють у вигляді спектрів.

Коливальна спектроскопія є методом не деструктивного аналізу, вона молекулярно-специфічна, що дозволяє отримувати інформацію про функціональні групи в молекулі, їх типи, взаємодії та орієнтації; селективна по відношенню до ізомерів, завдяки ділянці «відбитків пальців».

Перевагою методів коливальної спектроскопії є те, що вони допускають дослідження практично будь-якої неорганічної або органічної речовини в будь-якому агрегатному стані (газ, рідина, розчин, кристали).

Переходам частинок між коливальними рівнями енергії в спектрах відповідають *спектральні сигнали*. Інтенсивність спектральних сигналів характеризують пропусканням (T), яке виражене у відсотках. При якісному

описі спектрів інтенсивність сигналів може бути приведена у відносній шкалі, у відповідності з якою спектральні полоси поділяють на дуже сильні (д.с.), сильні (с.), середньої сили (срд.с.), слабкі (сл.), дуже слабкі (д.сл.). Крім інтенсивності, такий підхід дозволяє характеризувати ширину й контур спектральних сигналів. Для цього прийнято позначення широкий (ш.), складний (скл.) сигнали і т.д. Положення сигналів та їх максимумів у коливальних

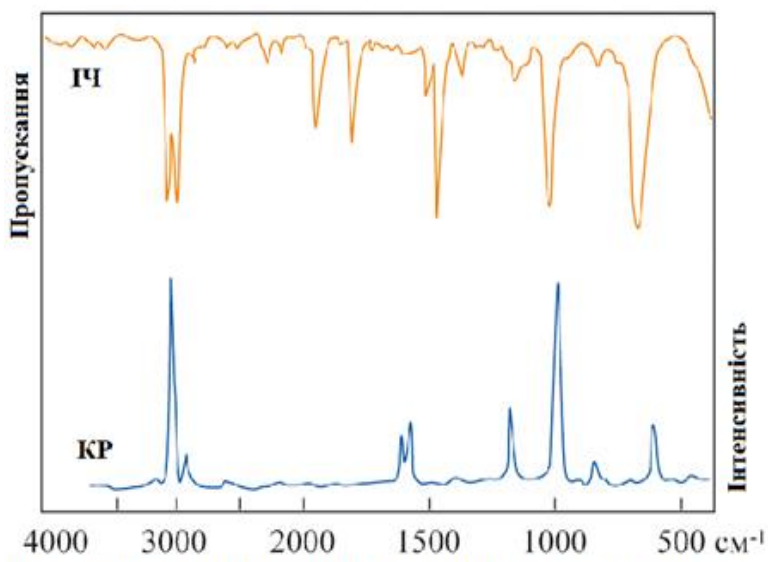


Рис. 6. Приклади ІЧ (зверху) і КР (знизу) спектрів бензену C_6H_6

спектрах прийнято представляти *хвильовим числом* ($\tilde{\nu}$, cm^{-1}) або *частотою*. Класичними методами коливальної спектроскопії є інфрачервона спектроскопія (ІЧ-спектроскопія) і спектроскопія комбінаційного розсіювання (спектроскопія КР, СКР).

Методи ІЧ- і КР-спектроскопії відрізняються за способом генерації сигналу. *ІЧ-спектри отримують у режимі поглинання, спектроскопія КР заснована на розсіюванні випромінювання.*

Спектри КР виникають у результаті взаємодії речовини з монохроматичним випромінюванням УФ чи видимого діапазонів. Повернення частинок з нестійкого збудженого стану в основний стан може відбуватися як на нульовий коливальний рівень (Релеївське розсіювання), так і на коливальні підрівні основного електронного рівня (комбінаційне розсіювання). Різниця частот збуджувального і розсіяного випромінювання відповідає коливальним частотам даної молекули (речовини).

ІЧ-спектри виникають при безпосередньому впливові ІЧ-випромінювання на речовину. Їх виникнення пов'язано з переходами молекул між коливальними рівнями енергії основного електронного стану. Спектральні сигнали з'являються в результаті безпосереднього поглинання сполукою ІЧ-випромінювання, відповідного коливальним частотам молекул.

Принципова відмінність між ІЧ- і КР-спектроскопією:

А) Обов'язковою умовою безпосереднього поглинання сполукою ІЧ випромінювання є зміна постійного дипольного моменту молекул у процесі коливального переходу.

Б) Щоб коливання в спектроскопії КР були активними, повинна змінюватися поляризація при молекулярних коливаннях.

В) Інтенсивність смуг в ІЧ-спектрах тим більша, чим більша полярність відповідних зв'язків, інтенсивність в КР спектрах тим більша, чим менш полярний відповідний зв'язок і чим вища її поляризація.

Через різницю в природі процесів, які призводять до виникнення ІЧ- та КР-спектрів, одні й ті ж коливальні переходи проявляються в них з різною інтенсивністю. У крайніх випадках, в ІЧ-спектрах проявляються коливальні переходи, неактивні в спектрах КР, і навпаки. Для симетричних молекул в ІЧ-спектрах активними є асиметричні коливання, в спектрах КР – симетричні. У міру зниження симетрії молекул багато коливальних переходів достатньо інтенсивно проявляються в тому та іншому спектрах. Отже, ІЧ- та КР-спектри доповнюють один одного.

Спектральні діапазони в ІЧ- та КР-спектроскопії поділяють на 4 ділянки:

<i>Ділянка</i>	<i>Довжина хвилі мкм</i>	<i>Хвильове число, см⁻¹</i>
Видима	0,4-0,8	25 000-12 500
Ближня ІЧ	0,8-2,5	12 500-4000
Середня ІЧ	2,5-25	4000-400
Дальня ІЧ	25-100	400-10

За нижньою межею кількісного визначення методи ІЧ- та КР-спектроскопії в звичайному апаратурному оформленні поступаються деяким іншим ФМД, але використання новітніх Фур'є-спектрометрів дозволяє підвищити концентраційну чутливість у багато разів.

2. Інфрачервона спектроскопія

Інфрачервона спектроскопія (ІЧ-спектроскопія, infrared spectroscopy) – розділ молекулярної оптичної спектроскопії, що вивчає спектри поглинання та віддзеркалення електромагнітного випромінювання в ІЧ ділянці (діапазон довжин хвиль 10^{-6} - 10^{-3} м). У координатах інтенсивність поглиненого випромінювання – довжина хвилі (хвильове число), інфрачервоний спектр представляє собою складну криву з великим числом максимумів і мінімумів.

Інфрачервоний спектр

В ІЧ-спектрах орг. сполук (рис. 7) можна виділити три основні ділянки:

1. 4000-2500 cm^{-1} . Ділянка валентних коливань простих зв'язків Х-Н: О-Н, N-Н, С-Н, S-Н.

2. 2500-1500 cm^{-1} . Ділянка валентних коливань кратних зв'язків Х=У, Х \equiv У: С=С, С=О, С=N, С \equiv С, С \equiv N.

3. 1500-500 cm^{-1} . Ділянка валентних коливань простих Х-У: С-С, С-N, С-О і деформаційних коливань простих зв'язків Х-Н: С-Н, О-Н, N-Н. Ця ділянка також називається "ділянкою відбитків пальців", оскільки положення та інтенсивність смуг поглинання в цьому діапазоні суто індивідуальні для кожної конкретної орг. сполуки. Тільки за умови повного збігу частот та інтенсивності ліній у цій ділянці ІЧ-спектра можна говорити про ідентичність порівнюваних об'єктів.

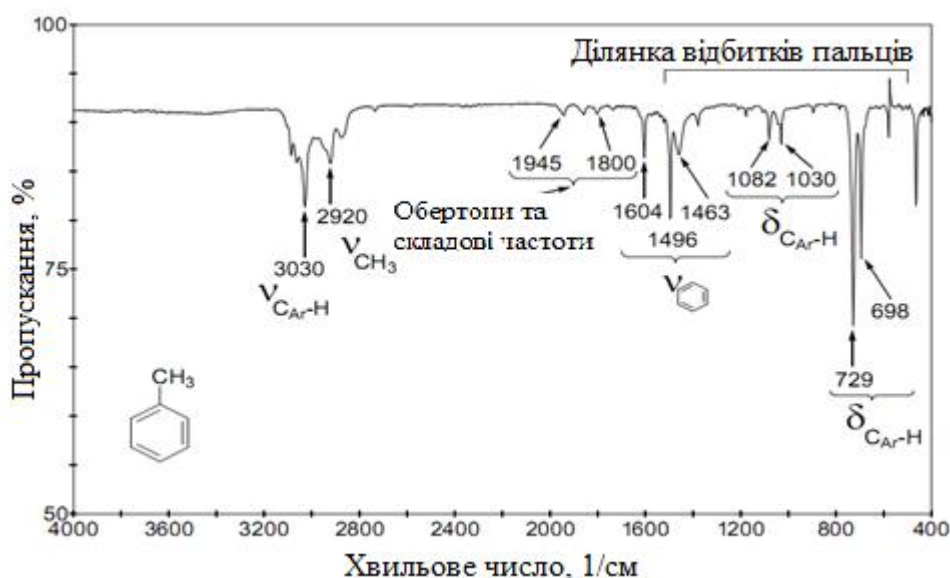


Рис. 7. ІЧ-спектр толуолу.

При інтерпретації ІЧ-спектрів найбільш інформативними є ділянки 2500-1500 cm^{-1} і 4000-2500 cm^{-1} . Аналіз першої із них дозволяє визначити в структурі сполуки неграничні фрагменти: С=С, С \equiv С, С=О, С=N, С \equiv N, ароматичні та гетероароматичні ядра. Смуги поглинання в ділянці 4000-2500 cm^{-1} дозволяють однозначно ідентифікувати такі функціональні групи як, О-Н, N-Н, S-Н, а також різні типи зв'язків «вуглець-водень»: С $_{\text{sp}^3}$ -Н, С $_{\text{sp}^2}$ -Н, С $_{\text{sp}}$ -Н, (О=)С-Н (альдегід). Тому рекомендується починати розгляд ІЧ-спектрів саме з цих двох ділянок. При виявленні в них характеристичних смуг валентних коливань певних типів зв'язків рекомендується додатково знайти смуги відповідних деформаційних коливань в ділянці 1500-500 cm^{-1} , наприклад, у разі зв'язків О-Н, N-Н, С-Н.

Походження поглинання в ділянці основних смуг. Як показує назва, більшість смуг поглинання в цій ділянці є результатом квантованого поглинання енергії при основних коливаннях даної молекули. На рис. 8 показано ділянки поглинання для різних типів основних коливань (включають елементи С, Н, N і О).

Спектральні дані записуються як залежність коефіцієнта поглинання від довжини хвилі, тобто виражаються за допомогою двох змінних величин - фактора інтенсивності і фактора довжини хвилі.

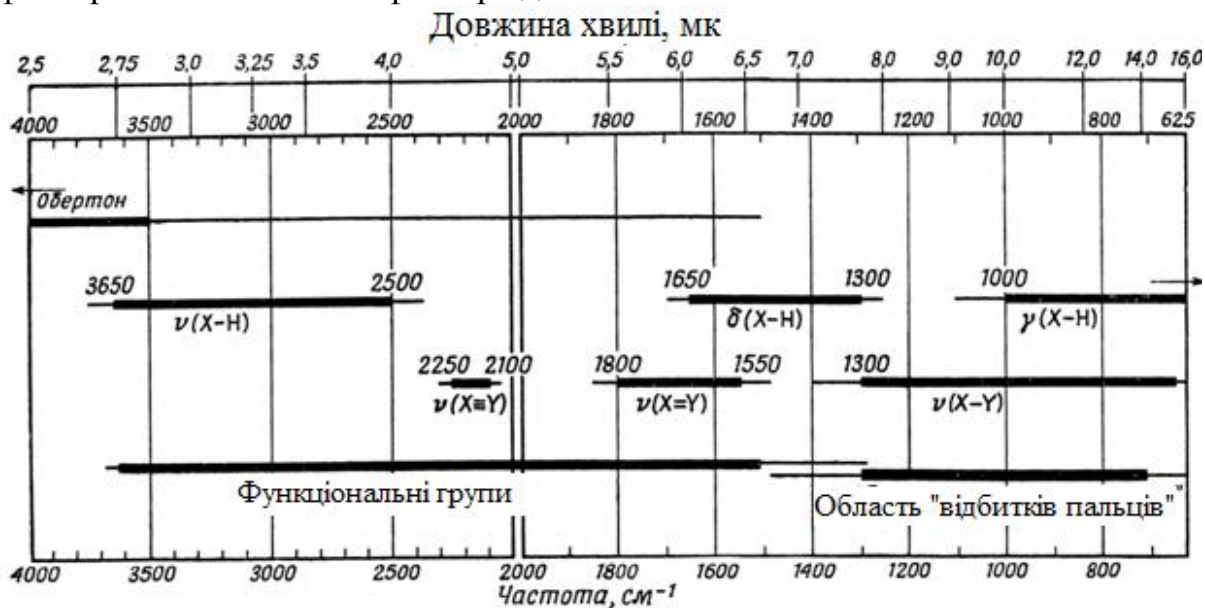


Рис. 8. Ділянка основних коливань в ІЧ-спектрі: ν – валентні, δ – деформаційні (площинні), γ – деформаційні (позаплощинні) коливання; X і Y позначають C і N (або O) відповідно. Ділянки поглинання найбільш важливих коливань показано жирними лініями. Тонкі лінії вказують ділянки, де поглинання, що відповідає даному коливанню, трапляється рідко.

Фактор інтенсивності може бути виражений так: I/I_0 – пропускання, частка пропущеного випромінювання; $I/I_0 \cdot 100$ – пропускання, %; $[I_0 - I/I_0] \cdot 100$ – поглинання, %; $D = \lg I_0/I$ – оптична щільність. При зазначених способах вираження фактору інтенсивності, товщина шару та концентрація можуть бути виміряні в будь-яких одиницях: товщина – в мм, см; концентрація – у вагових і об'ємних відсотках, у г/л, мг/л, г/мл, мг/мл, моль/л і т.д. В ІЧ-ділянці спектра запис проводиться зазвичай у відсотках пропускання або поглинання.

Якісний і кількісний аналіз за ІЧ-спектрами

Для проведення як якісного, так і кількісного аналізу за ІЧ-спектрами необхідно мати спектри чистих компонентів. При порівнянні спектру зі спектром речовини, присутність якого передбачається, знаходять у спектрі суміші всі смуги поглинання еталонної речовини. Сьогодні є атласи й автоматизовані картотеки спектрів, за допомогою яких можна ідентифікувати будь-яку сполуку, якщо вона була раніше відома і для неї отримано коливальний спектр. У разі ІЧ-спектрів, так само як і у випадку ультрафіолетових (УФ) і видимих спектрів поглинання, співвідношення між пропусканням світла системою і концентрацією поглинаючих речовин виражається законом Ламберта-Бугера-Бера: $D = \lg I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$ (6)

де D – оптична щільність; I_0 – інтенсивність падаючого світла; I – інтенсивність пройденого світла; c – молярна концентрація; d – товщина поглинаючого шару; ϵ – молярний коефіцієнт поглинання для даного хвильового числа і температури.

Якщо закон Бугера-Ламберта-Бера виконується, що буває далеко не завжди, то при фіксованій товщині шару оптична щільність лінійно залежить від концентрації речовини, що і дозволяє легко проводити кількісний аналіз.

Прилади для інфрачервоної спектроскопії

За принципом отримання спектру прилади для ІЧ-ділянки можна розділити на дві основні групи: *диспергуючі* і *не диспергуючі*.

Як диспергуючий пристрій використовують призми з матеріалу з відповідного ІЧ-діапазону дисперсією та дифракційні решітки. Зазвичай для середньої ІЧ-ділянки (400-5000 см⁻¹) застосовують призми з монокристалів KBr, NaCl і LiF. Зараз призми знаходять незначне застосування і практично витіснені дифракційними решітками, що створює переваги для енергії випромінювання і дає високу якість. Незважаючи на високу якість цих приладів, вони все частіше замінюються на Фур'є-спектрометри, які відносяться до групи недиспергуючих приладів.

Основні частини класичного спектрофотометра – джерело безперервного теплового випромінювання, монохроматор, неселективний приймач випромінювання. Кювета із речовиною (у будь-якому агрегатному стані) поміщається перед входною (іноді – за вихідною) щілиною. Як диспергуючий пристрій монохроматора застосовують призми з різних матеріалів (LiF, NaCl, KCl, CsF і ін.) і дифракційних ґраток. Послідовне виведення випромінювання різних довжин хвиль на вихідну щілину і приймач випромінювання здійснюється скануванням повороту призми або ґраток. Джерела випромінювання – розжарювані електричним струмом стержні із різних матеріалів. Приймачі: чутливі термопари, металеві та напівпровідникові термоопори (болметри) і газові термоперетворювачі. Вихідний сигнал має вигляд звичайної спектральної кривої.

Переваги приладів класичної схеми: простота конструкції, відносна дешевизна. *Недоліки*: неможливість реєстрації слабких сигналів через мале відношення сигнал:шум, що сильно ускладнює роботу в далекій ІЧ-ділянці; порівняно невисока роздільна здатність (до 0,1 см⁻¹), тривала (протягом декількох хвилин) реєстрація спектрів.

Застосування ІЧ-спектроскопії

1. Дослідження будови – встановлення функціональних груп.
2. Встановлення ідентичності, наприклад, досліджуваної речовини з відомим зразком, які повинні мати тотожні спектри.
3. Визначення чистоти: наявність "сторонніх" піків свідчить про домішки.
4. Кількісний аналіз: інтенсивність поглинання в певних частинах спектру пропорційна концентрації речовини.
5. Вивчення внутрішніх і міжмолекулярних взаємодій.

3. Фур'є-спектроскопія

Термін "ІЧ-Фур'є-спектроскопія" (Fourier-transformed spectroscopy) виник з появою нового покоління приладів, в основі оптичної схеми яких використовуються різного типу інтерферометри. ІЧ-Фур'є-спектроскопія являє

собою один із варіантів методу ІЧ-спектроскопії і по суті не є окремим спектральним методом. Спектри речовин, отримані на ІЧ-Фур'є-спектрометрах, не відрізняються від спектрів, отриманих на диспергуючих ІЧ-спектрометрах.

У Фур'є-спектрометрах відсутні вхідна і вихідна щілини, а основний елемент – *інтерферометр*. Потік випромінювання від джерела ділиться на два промені, які проходять через зразок і інтерферують. Різниця ходу променів варіюється рухомим дзеркалом, що відбиває один з пучків. Для отримання спектру в звичайній формі проводиться відповідне Фур'є-перетворення за допомогою вбудованої ЕОМ.

Спектри за допомогою Фур'є спектрометрів отримують у два етапи. Спочатку реєструється інтерферограма тобто вихідний світловий потік залежно від різниці ходу розділеної на когерентні пучки вхідної хвилі від джерела. Потім шляхом зворотного перетворення Фур'є (за різницею ходу) обчислюється спектр. Друга частина вимагає великого обсягу обчислень, тому метод отримав широке поширення тільки з появою сучасних комп'ютерів. Однак складність отримання спектрів за допомогою Фур'є спектрометрів значно переважає над іншими спектральними приладами:

1) можливість реєстрації одночасно всього спектру;

2) завдяки тому, що в інтерферометрі вхідний отвір має більші розміри, ніж щілина спектральних приладів з диспергуючим елементом такого ж розрешення, то Фур'є спектрометри в порівнянні з ними мають переваги у світлосилі. Це дозволяє: а) зменшити час реєстрації спектрів (за секунди і доли секунд); б) зменшити відношення «сигнал – шум», в) підвищити роздільну здатність (до $0,001 \text{ cm}^{-1}$); г) зменшити габарити приладу;

3) Фур'є-спектрометри мають переваги також у точності відліку довжини хвилі. У дифракційних приладах довжину хвилі можна визначити тільки побічно, а в Фур'є спектрометрах вона визначається безпосередньо.

Недоліки: складність виготовлення та висока вартість.

4. Спектроскопія комбінаційного розсіювання

Спектроскопія комбінаційного розсіювання (спектроскопія КР, СКР, Раман-спектроскопія, раманівська спектроскопія, Raman spectroscopy) – це неруйнівний метод аналізу, який дозволяє визначити сукупність частот нормальних коливань молекули.

Спектри КР світла дозволяють проводити якісний і кількісний аналізи речовини, ідентифікувати хімічні сполуки, виявляти їх у сумішах тощо. *Молекулярні спектри* є однозначною характеристикою молекули і визначаються властивостями самої молекули та атомів, що входять до молекули. Іноді спектроскопія КР – єдине джерело інформації про заборонені переходи в молекулах, яке дозволяє розрізнити просторові (цис- і транс) ізомери молекул. *Обертальні спектри* КР світла дозволяють визначити довжину зв'язків і валентні кути в молекулах.

Методи КР- та ІЧ-спектроскопії доповнюють, а не повторюють один одного, оскільки визначаються різними правилами відбору переходів, хоч

коливальні стани є такими ж. Коливання, які сильно проявляються в ІЧ-спектрі (сильні диполі) зазвичай слабо проявляються в Раман-спектрі. У той же час, неполярні функціональні групи, що дають дуже інтенсивні раманівські смуги, як правило, дають слабкі ІЧ-сигнали. Наприклад, коливання гідроксильних, карбонільних груп або аміногруп дуже сильно проявляються в ІЧ-спектрі й дуже слабо – в Раман-спектрі. Однак подвійні та потрійні «вуглець-вуглець»-зв'язки і симетричні коливання ароматичних груп дуже сильні в Раман-спектрі. Тому СКР використовується і в поєднанні з ІЧ-Фур'є-спектроскопією для отримання найбільш повного уявлення про природу зразка.

Переваги спектрів КР:

– вимірювання виконується у видимій ділянці, що вимагає використання більш простої вимірювальної апаратури;

– простота пробопідготовки: товщина зразка не має значення, зовнішня атмосфера має невеликий вплив, тому не потрібно вакуумування або сушіння кюветного відділення для зразків; немає необхідності розчиняти тверді тіла, пресувати таблетки або іншим чином змінювати фізичну або хімічну структуру зразка; скло, вода, і пластикова упаковка самі по собі мають дуже слабкі раманівські спектри, тому зразки можна аналізувати прямо в скляній пляшці чи пластиковому пакеті, не відкриваючи упаковку і без ризику забруднення;

– отримання великого обсягу інформації;

– ці спектри є більш стабільними та активними при тих частотах, на яких ІЧ-спектр не виявляється (і навпаки);

– СКР працює в широкому діапазоні (від УФ – до ближньої ІЧ-ділянки), дозволяючи вибрати найбільш зручний діапазон для даного зразка та отримувати найкращі результати;

– експериментальні можливості методу СКР не залежать від діапазону частот досліджуваної смуги, в той час як в ІЧ-спектрах розрізнення спектральних ліній значно знижується зі зниженням частоти;

– Раман-спектрометри мають просторову роздільну здатність, краще 1 мкм, працюють з волоконною оптикою, дозволяючи отримувати інформацію про коливальні стани в діапазоні довжин хвиль від 2 до 100 мкм. Отримання таких результатів з використанням власних частот є майже нерозв'язним завданням, але Раман робить це легко;

– Раман-спектри ідеально підходять для пошуку по бібліотеках, завдяки великій спектральній інформації, наявності ділянки «відбитків пальців» для кожного компонента і простоті алгоритмів пошуку.

Недоліки спектроскопії КР:

Низька інтенсивність ліній, яка залежить від частоти збуджувального випромінювання; не може працювати з металами та сплавами; наявність суцільного фону, зумовленого розсіюванням на неоднорідностях середовища і можливістю флуоресценції досліджуваної речовини.

Ці труднощі зводяться до мінімуму шляхом вибору прийнятної лінії газового лазера. Завдяки використанню як джерела світла лазера значно

розширюється коло досліджуваних об'єктів і різко скорочуються вимоги до кількості досліджуваної речовини.

Галузі застосування спектроскопії раманівського розсіювання:

1. У хімії – ідентифікація хімічних речовин.
2. У біології та медицині – вивчення будови білків, поліпептидів, ліпідів, олігосахаридів. Клінічні дослідження біотканин організмів.
3. Аналіз харчових продуктів та медичних препаратів, без розкривання прозорої полімерної упаковки (такі упаковки мають слабкий спектр КР).
4. У техніці – аналіз композиційних і керамічних матеріалів, штучних діамантів тощо.

Особливості методу

У СКР зразок опромінюється монохроматичним світлом (джерелом зазвичай є лазер, рис. 9). Більша частина розсіяного зразком випромінювання буде мати ту ж частоту, що й падаюче – процес відомий як *Релеївське розсіювання* (розсіювання світла тілами, з розмірами, меншими за довжину хвилі). Тим не менш, деяка кількість випромінювання, розсіяного зразком, приблизно один фотон з мільйона (0,0001%) – матиме частоту, зміщену по відношенню до частоти вихідного випромінювання лазера.

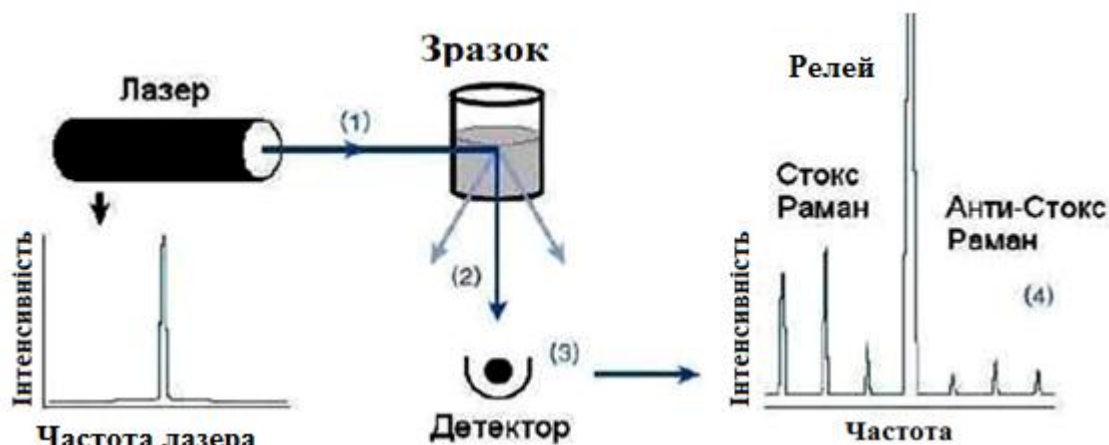


Рис. 9. Діаграма енергетичних станів

- (1) Лазерний промінь збуджує зразок.
- (2) Цей промінь розсіюється у всіх напрямках.
- (3) Частково світло потрапляє на детектор, який реєструє Раман-спектр.
- (4) На спектрі представлено світло на початковій частоті лазера (або Релеївське) і спектральні особливості, характерні для кожного унікального зразка.

Сpektри КР – це спектри розсіювання. Вони проявляються при електронній поляризації молекул, яка викликана УФ або видимим світлом (100-800 нм). При цьому випромінювання (УФ чи вид.), що поляризує, не повинно поглинатися досліджуваною речовиною і має бути монохроматичним (лазер). Сpektри КР здебільшого представляють в координатах $I-\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) чи $I-\lambda$ (мкм). У практиці спектроскопії комбінаційного розсіювання використовують стоксові лінії.

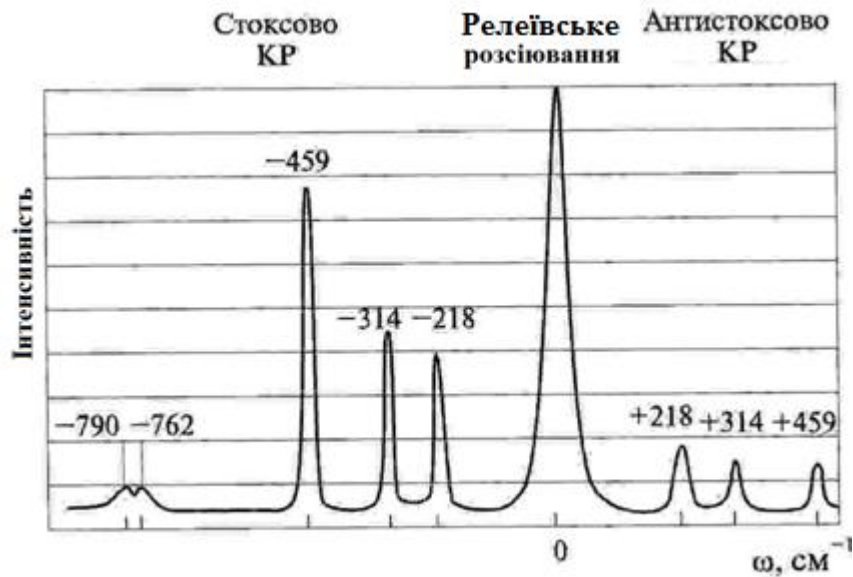
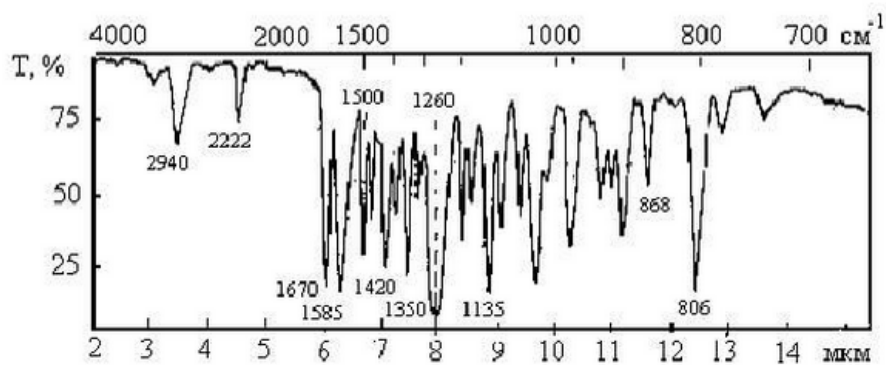
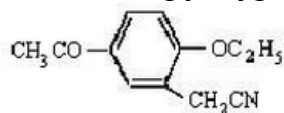


Рис. 10. Ілюстрації спектроскопії КР

? Практична частина:

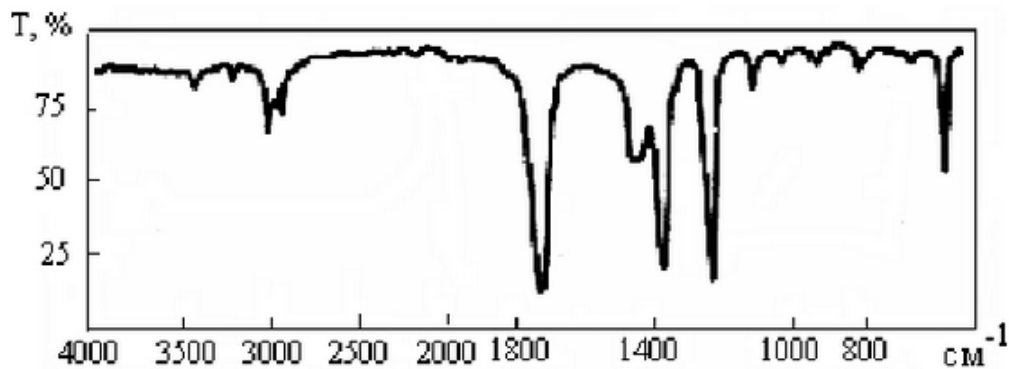
1. Необхідно розв'язати завдання, наведені нижче.

1. Порівняйте спектр поглинання зі структурою сполуки.



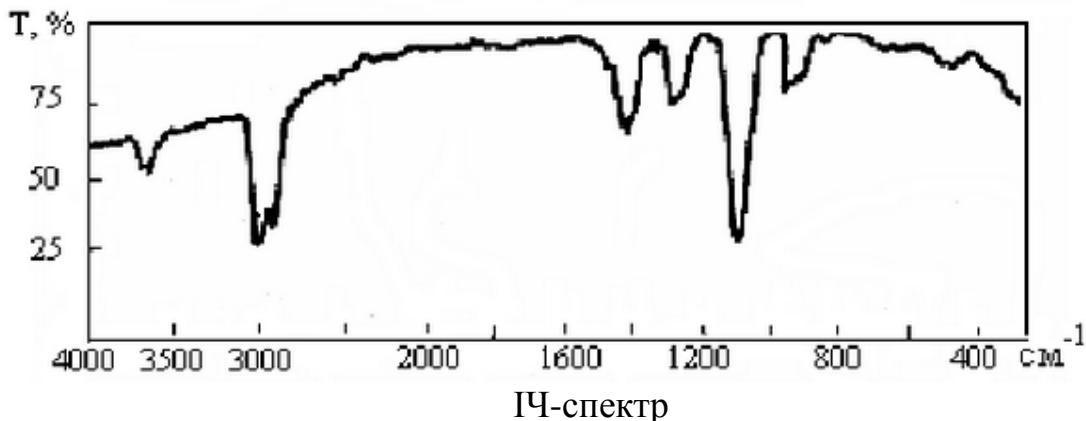
ІЧ-спектр, КВr

2. За наведеним нижче спектром визначте структуру сполуки $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$.



ІЧ-спектр

3. За наведеним нижче спектром визначте структуру сполуки C_2H_6O .



Питання для самопідготовки:

1. Дайте визначення поняттю «інфрачервона спектроскопія».
2. Опишіть алгоритм приготування зразків для проведення ІЧ-спектроскопії. Навіщо при зйомці ІЧ-спектрів поглинання порошкоподібних або дрібнокристалічних речовин використовуються імерсійні середовища (вазелинове масло) або KBr?
3. Сформулюйте основний закон, який використовується для кількісного аналізу в ІЧ-спектроскопії. Як пов'язане хвильове число з довжиною хвилі?
4. У яких ділянках спектру проявляються переходи між оберतालними, коливальними та електронними станами молекули?
5. Переходи між коливальними станами молекул виявляються в межах приблизно від 50 до 4000 см^{-1} . Яка енергія цих переходів, яка спектральна ділянка цих переходів в мкм?
6. Яку інформацію можна отримати з ІЧ-спектрів?
7. Які переваги та недоліки методу ІЧ-спектроскопії Вам відомі?
8. Чому при всій складності отримання спектрів при Фур'є-спектроскопії – вона має переваги над іншими спектральними приладами?
9. Де використовується метод спектроскопії КР?
10. Охарактеризуйте спектри комбінаційного розсіювання органічних сполук.

Тестові завдання:

1. Електромагнітне випромінювання при взаємодії з речовиною може викликати в ньому процеси різноманітної фізичної природи. Загальний характер цих процесів залежить від
- А) руху електронів Б) енергії фотонів В) стану протонів.
2. Коливальні спектри молекул експериментально вивчаються методами
- А) ІЧ-спектроскопії Б) видимої спектроскопії
В) спектроскопії КР.

ТЕМА 4. ЕЛЕКТРОННА СПЕКТРОСКОПІЯ. УФ-СПЕКТРОСКОПІЯ. ЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ, ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії електронної спектроскопії, УФ-спектроскопії, люмінесцентного, флуоресцентного аналізу, навчитися використовувати фотоколориметричний метод на практиці.

План

1. Електронна спектроскопія.
2. УФ-спектроскопія.
3. Люмінесцентний, флуоресцентний аналізи.

! **Основні терміни та поняття:** електронна спектроскопія, УФ-спектроскопія, люмінесценція, флуоресценція.

1. Електронна спектроскопія

..

Електронна спектроскопія (electron spectroscopy) ґрунтується на електронних переходах, тобто на переходах між електронними станами частинок, є дуже чутливим і зручним методом для визначення спектрів поглинання, пропускання або відбиття, вивчення кінетики реакції, що супроводжується спектральними змінами.

У випадку, коли орієнтація частинки (атома, молекули) у просторі й відносне положення ядер є незмінними, атомна система представляє собою систему електронів, які знаходяться в постійному полі позитивних зарядів ядер. Така система, відповідно до постулату Бора, має певний набір енергетичних станів. Вони називаються *стаціонарними електронними станами*, а переходи між ними – *електронними переходами*. Кожному з електронних станів відповідає певний розподіл електронної щільності (хвильова функція). У кожному електронному стані частинка характеризується певним набором фізичних і хімічних властивостей.

Дія на речовину електромагнітного випромінювання оптичного діапазону (120-1100 нм) може призвести до переходу валентних електронів на більш віддалені від ядра орбіталі або їх повернення до основного стану. Процеси першого типу супроводжуються поглинанням енергії. Методи, які вивчають такі переходи, називаються *абсорбційними* (УФ-спектроскопія). Процеси другого типу супроводжуються виділенням енергії. Відповідні методи називаються *емісійними* (люмінесцентна спектроскопія). У залежності від природи частинок, що взаємодіють із випромінюванням виділяють *методи атомної та молекулярної спектроскопії*. У «чистому» вигляді електронні

переходи спостерігаються досить рідко. Спектральні сигнали відповідають електронно-коливальним або електронно-коливально-обертальним переходам.

Частота поглинутого чи виділеного випромінювання представляє собою коливання електронної хмари частинки (атома, молекули) відносно ядерного кістяка, іншими словами частоту коливання її перемінного дипольного

моменту:
$$v_e = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m_e}}$$
, де m_e – маса електрону; K – силова стала, яка характеризує силу взаємодії електронів з ядром.

Інтенсивність сигналів визначається енергією, що поглинається чи випромінюється при коливанні електронної хмари або числом поглинутих (випромінених) квантів енергії за одиницю часу. Інтенсивність залежить від наповненості електронних рівнів і ймовірностей переходів між ними.

Поява того чи іншого електронного переходу й відповідного йому спектрального сигналу залежить від виконання ряду умов, які називають правилом відбору чи заборони, і факторів, які можуть зняти наявні заборони на електронні переходи.

Електронна спектроскопія дозволяє з високою точністю визначати наявність у молекулах певних структурних груп (які називають хромофорними), для яких добре вивчені характеристичні електронні спектри. Метод абсорбційної електронної спектроскопії є дуже чутливим і дозволяє отримувати чіткі смуги поглинання навіть при невеликій концентрації досліджуваної речовини. Через це він частіше використовується для якісного аналізу будови молекул, хоча може бути використаний і для кількісного аналізу за коефіцієнтом екстинкції ϵ (зазвичай – у розрахунку на моль речовини).

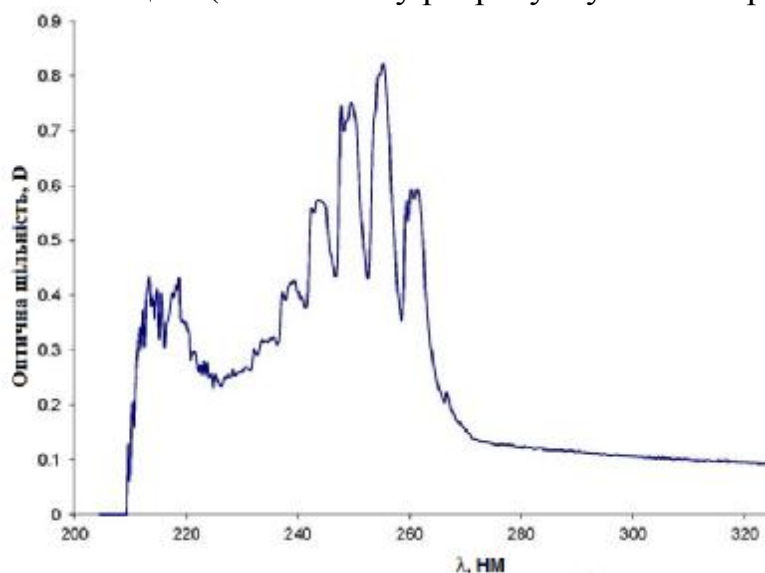


Рис. 11. Електронний спектр поглинання бензену.

Завдяки високій чутливості електронної спектроскопії реєстрація спектрів при одноразовому проходженні світла через кювету отримала досить велике поширення як один з головних методів експрес-аналізу проб речовин на хімічному виробництві. Для більш точного аналізу будови речовини дані електронної спектроскопії повинні бути доповнені результатами коливальної спектроскопії.

2. УФ-спектроскопія

З точки зору енергії переходів у молекулі принципової різниці між УФ та видимою ділянками спектру немає. Відокремлення видимої частини спектру в самостійну ділянку обумовлено суб'єктивними причинами – межами сприйняття електромагнітного випромінювання людським оком.

УФ-спектроскопія (англ. molecular electron spectroscopy або UV-spectroscopy) відноситься до молекулярної абсорбційної електронної спектроскопії. Також молекулярну абсорбційну спектроскопію в УФ і видимій ділянках спектра називають *спектрофотометрією* або *фотометрією*. Це один із розділів оптичної спектроскопії, що базується на отриманні та дослідженні спектрів поглинання в УФ-ділянці спектра (діапазон довжин хвиль $\Delta\lambda$: 190/400 нм; $\lambda < 190$ нм — вакуумна УФ-ділянка малопридатна для роботи через сильне поглинання хвиль повітрям). Поглинання УФ-випромінювання зумовлене електронними переходами в атомах з основного енергетичного стану в більш високий (збуджений); у молекулах — зі зв'язувальної орбіталі (основний стан) на розпушувальну орбіталь (збуджений стан).

Застосування електронної спектроскопії в УФ і видимій ділянках спектра для аналізу функціональних груп обмежене тим, що відповідні спектри мають невелике число смуг поглинання. Їх перевага в порівнянні зі спектроскопією в ІЧ-ділянці спектра полягає в більшій чутливості, що дозволяє досліджувати дуже розбавлені розчини. Наявні недорогі, прості в обігу сучасні записувальні спектрофотометри (СФ) дають можливість швидко виявляти присутність сильних хромофорних груп у зразку.

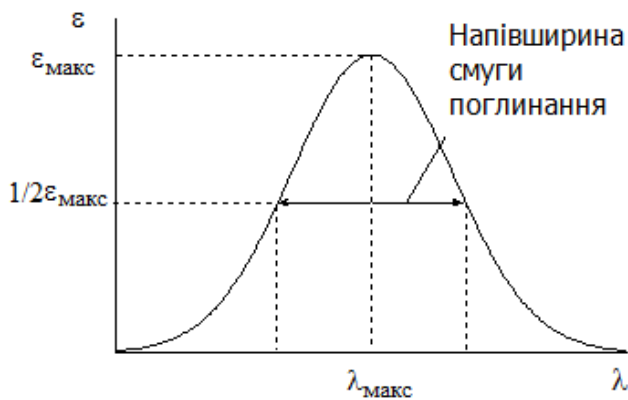
УФ-спектри, що містять дві або більшу кількість інтенсивних смуг поглинання, дозволяють надійно довести ідентичність зразка, особливо якщо є спектр еталонного зразка. Вивчення молекулярних спектрів — це найважливіший спосіб кількісного хімічного аналізу. Тут досить виміряти аналітичний сигнал на заздалегідь обраній довжині хвилі. Спектри потрібні для вирішення більш складних завдань:

– за спектром індивідуальної речовини вибирають ту довжину хвилі, на якій надалі, в ході кількісного аналізу, вимірюватимуть аналітичний сигнал цієї речовини. У молекулярно-абсорбційному (спектрофотометричному) аналізі аналітичний сигнал зазвичай вимірюють на довжині хвилі, що відповідає максимуму на спектральній кривій;

– зіставляючи спектри передбачуваних компонентів проби, з'ясовують можливість визначення одних речовин у присутності інших. Якщо спектри компонентів проби накладаються один на одного, результати аналізу суміші будуть завищеними.

Слід відзначити, що молекулярні абсорбційні спектри в УФ і видимій ділянці складаються не з окремих чітко визначених ліній, а з широких смуг. Енергія електромагнітного випромінювання УФ- та видимого діапазону відповідає енергії збудження валентних електронів.

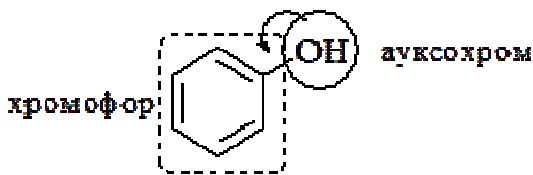
Положення максимуму смуги поглинання ($\lambda_{\text{макс}}$) відповідає довжині хвилі такого електромагнітного випромінювання, енергія якого дорівнює енергії



необхідної для електронного переходу. Для характеристики ширини смуги поглинання використовується величина *півширини смуги поглинання*. Інтенсивність поглинання, яку можна охарактеризувати за допомогою молярного коефіцієнта поглинання, залежить від імовірності даного електронного переходу. Поглинання з

$\epsilon_{\text{макс}} > 10^4$ вважається інтенсивним (максимально можливе значення ϵ складає приблизно 2×10^5), поглинання з $\epsilon_{\text{макс}} < 10^3$ вважається мало інтенсивним. Об'єктами дослідження в спектрофотометрії найчастіше є органічні речовини.

Групи, які обумовлюють появу смуг поглинання в молекулярних спектрах, називаються *хромофорами*. Атоми або групи атомів, які самі по собі не зумовлюють появу смуг поглинання, але впливають на характер поглинання хромофорів, називаються *ауксохромами*.



Ауксохроми мають неподілені електронні пари, які знаходяться в сполученні з р-електронною системою хромофора, і можуть зміщувати смугу поглинання хромофора в більш

довгохвильову ділянку (*батохромний зсув*) або в більш короткохвильову ділянку (*гіпохромний зсув*), збільшувати її інтенсивність (*гіперхромний ефект*) або зменшувати її (*гіпохромний ефект*).

Вимірювання аналітичного сигналу

Об'єктами дослідження в фотометрії зазвичай є розчини. Принцип вимірювання аналітичного сигналу полягає в порівнянні інтенсивності двох світлових потоків, один з яких проходить через досліджуваний розчин, а другий — через розчин порівняння.

Принципова схема однопроменевого приладу наведена на рис. 12.

Джерела випромінювання, використовувані в фотометрії, дають безперервні спектри. Залежно від того, яким чином відбувається виділення з безперервного спектру випускання джерела потрібного спектрального інтервалу, абсорбційні спектрометри можна поділити на 2 класи: *фотоелектроколориметри (ФЕК)* і *спектрофотометри (СФ)*.

У ФЕКах для виділення потрібного інтервалу довжин хвиль застосовують *набір світлофільтрів*. Величина півширини пропускання використовуваних світлофільтрів становить у середньому 25-45 нм. Нижня межа робочих довжин хвиль становить для більшості моделей ФЕКів приблизно 315 нм.

ФЕКи використовують зазвичай для проведення серійних вимірів концентрації речовин, що поглинають у видимій або довгохвильовій УФ-ділянці.



Рис. 12. Принципова схема однопроменевого приладу для вимірювання поглинання світла в УФ та видимій областях спектру.



У СФ для виділення із спектру випромінювання джерела випромінювання з потрібною довжиною хвилі застосовують *монохроматори*: дифракційні ґрати або призми. Монохроматор дозволяє отримати електромагнітне випромінювання з набагато вищим ступенем монохроматичності, ніж світлофільтр. СФ мають більш складну будову, ніж ФЕК, і використовуються для отримання спектрів поглинання речовин, визначення концентрації речовин, що поглинають при довжинах хвиль менше 300 нм, мають вузькі смуги поглинання і т.д.

Розчини речовин, поглинання яких вимірюється, поміщають у спеціальні посудини прямокутної або, рідше, циліндричної форми – *кювети*. Кювета, що містить розчин досліджуваної речовини, називається *робочою*, а кювета, що містить розчин порівняння – *кюветою порівняння*.

Кювети, які використовують для роботи у видимій ділянці спектра, можуть бути зроблені зі скла. Для роботи в ділянці довжини хвиль менше ніж 325 нм необхідні кварцеві кювети. Матеріалом для виготовлення кювет є також органічні полімери. Як правило, кожен прилад для фотометричних вимірювань забезпечений набором кювет (товщиною від 0,1 до 5 см). Найчастіше в роботі, особливо для СФ, використовуються кювети товщиною 1 см. Крім звичайних кювет, існують кювети спеціальної конструкції, наприклад, термостатовані, проточні.

В однопроменевих приладах у потік випромінювання спочатку поміщають кювету порівняння і налаштовують за нею прилад на нуль оптичної щільності. Потім у потік випромінювання поміщають робочу кювету. При зміні налаштувань приладу дослід слід повторити. В двопроменевих спектрометрах потік, що виходить з монохроматора, за допомогою дзеркала спеціальної

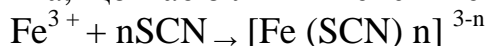
конструкції розщеплюється на два однакових потоки: один спрямовується на кювету порівняння, а другий – на робочу кювету. Потоки, що виходять з кювет, спрямовується на один і той же детектор. Двопроменеві прилади зручні при автоматичній реєстрації спектрів поглинання, оскільки їх не потрібно повторно налаштовувати при зміні довжини хвилі.

Практичне застосування та основні прийоми фотометричного аналізу

Спектрофотометрія є одним з найбільш застосовуваних і розроблених інструментальних методів аналізу. До її переваг відносять досить високу чутливість (для речовин, що добре поглинають, вона становить приблизно 10^{-6} – 10^{-7} моль/л), універсальність, просте апаратне оформлення, можливість автоматизації аналізу і т.д. Нижня межа визначуваних концентрацій зазвичай характеризується значеннями порядку 0,1-1,0 мкг/мл. Відносна похибка результату аналізу (при традиційному способі фотометричних вимірювань) становить 2-5%, а в деяких випадках може бути знижена до 1%.

Пряма фотометрія. Використовується для визначення речовин, що мають досить інтенсивне власне поглинання. У прямій фотометрії вимірюють оптичну щільність розчину речовини при довжині хвилі, що відповідає максимальному поглинанню, і далі одним із способів визначають концентрацію речовини в цьому розчині. Пряма фотометрія зазвичай використовується для аналізу матриць відносно простого складу, в яких відсутні речовини, що володіють таким же характером поглинання, що й речовина, яка визначається, або компоненти, що заважають можна легко відокремити в процесі пробопідготовки.

Значно частіше в фотометрії, особливо у разі визначення неорганічних речовин, що мають незначне власне поглинання, вимірюванню оптичної щільності передують проведення хімічної реакції, в якій утворюється нова речовина, що має більш інтенсивне поглинання. Наприклад:



В основі отримання забарвлених продуктів можуть лежати реакції комплексоутворення, окислювально-відновні реакції, різні реакції за участю функціональних груп органічних сполук і т.д.

До фотометричних реакцій ставляться такі вимоги: чуттєвість, контрастність, надійність, вибірковість.

До недоліків фотометричних методів слід віднести невисоку селективність багатьох реакцій, які використовують у фотометрії, необхідність попереднього розведення проби. Часто потрібно попередньо відокремити компоненти, що заважають визначенню. Це збільшує час проведення аналізу та зменшує точність.

Фотометричний аналіз широко застосовують у контрольно-аналітичних лабораторіях на підприємствах хімічної, харчової, нафтопереробної промисловості, в криміналістиці, в сільському господарстві, в клінічному аналізі та наукових дослідженнях, в моніторингу стану навколишнього середовища.

3. Люмінесцентний, флуоресцентний аналізи



За певних умов частина поглиненої речовиною енергії може виділитися у вигляді вторинного випромінювання. Це явище називають **люмінесценцією**. Кванти вторинного випромінювання, що випускається атомами, які люмінесцюються, молекулами або іонами, мають меншу енергію, ніж кванти, які ті ж частинки поглинали при своєму збудженні.

Види люмінесценції класифікують за способом збудження. Найбільш відомі з них такі:

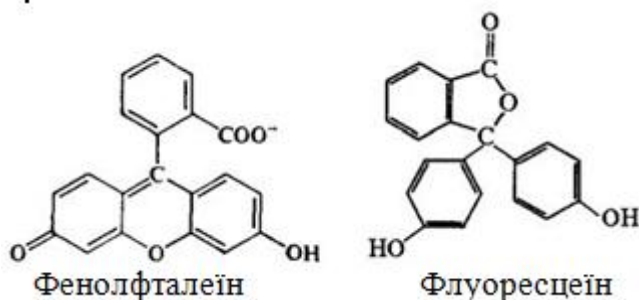
1. *Катодолюмінесценція* (свічення під дією потоку електронів, наприклад, світіння екрана кінескопа або рідкокристалічного екрана, світіння ламп денного світла).

2. *Хемілюмінесценція* (свічення за рахунок хімічної реакції, наприклад, у світлячків).

3. *Фотолюмінесценція*. У цьому випадку проба світиться за рахунок опромінення невидимим УФ-світлом від зовнішнього джерела. Саме цей вид люмінесценції зазвичай застосовують у хімічному аналізі.

Види люмінесценції класифікують і за часом життя збудженого стану. В аналізі переважно використовують *флуоресценцію* – у цьому випадку збуджений стан молекули нестійкий, і вторинне випромінювання проби в УФ- або видимій ділянці спектра припиняється відразу після видалення джерела порушення. Іноді використовують і *фосфоресценцію* – у цьому випадку світіння речовини триває протягом декількох секунд, хвилин або навіть годин після припинення збудження.

За спектрами люмінесценції впізнають особливо небезпечні органічні речовини в об'єктах довкілля (на рівні $10^{-6}\%$ і нижче), токсиканти (діоксини, нітрозаміни, пестициди), біологічно активні речовини (вітаміни, гормони, антибіотики). Люмінесцентні детектори застосовують у хроматографічному аналізі. Люмінесцентний аналіз застосовують у криміналістичній експертизі та для діагностики захворювань.



Давати люмінесценцію можуть далеко не всі молекули, які поглинають світло. Велика частина органічних речовин, здатних на це, є ароматичними сполуками, що мають жорстку структуру молекули. Зокрема, фенолфталеїн і флуоресцеїн мають схожу будову молекул, але у

фенолфталеїну всі три бензольних кільця можуть вільно коливатися один щодо одного, і ця сполука не дає люмінесценцію. У флуоресцеїну ж можливість внутрішньо молекулярних коливань набагато менша (кисневий місток жорстко

фіксує два бензольних кільця), і це з'єднання інтенсивно світиться у видимій ділянці при опроміненні його розчину УФ-світлом.

Апаратура для люмінесцентного аналізу

Для ідентифікації індивідуальних сполук та вибору оптимальних умов вимірювання їх аналітичного сигналу треба вивчити спектри збудження й спектри випромінювання люмінесценції. З цією метою використовують різні

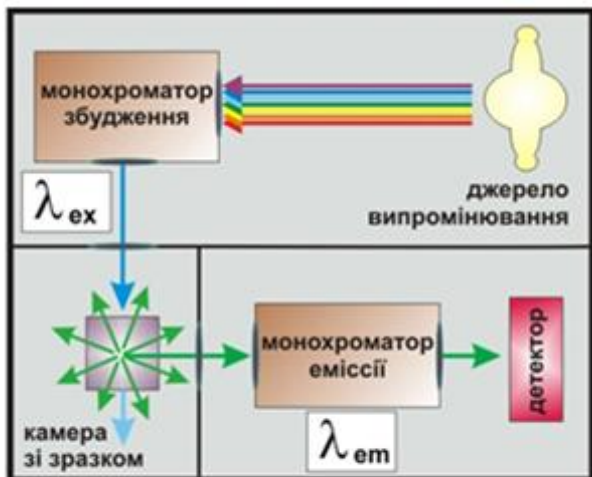


Рис. 13. Спрощена схема спектрофлуориметру

спектрофлуориметри (рис. 13). Це більш складні й дорожчі прилади, ніж СФ.

Як джерело збудження найчастіше використовують потужні УФ-лампи (ртутні, ксенонові та ін.), а також лазери. Первинні та вторинні монохроматори включають дифракційні решітки або призми, виготовлені з кварцу, а також щілини регульованої ширини. Первинний монохроматор потрібен, щоб задати оптимальні умови збудження для сполуки (X), яка визначається, а також затримати світло лампи з тією ж довжиною хвилі, що буде випускати X

при люмінесценції. Вторинний монохроматор потрібен, для того, щоб створити оптимальні умови реєстрації аналітичного сигналу X і не допустити потрапляння збуджувального світла на фотоприймач. Без цих монохроматорів фоновий фотопотік виявився б настільки сильним, що зафіксувати аналітичний сигнал X (люмінесцентне випромінювання) було б неможливо.

У спрощених і дешевих приладах для люмінесцентного аналізу (флуориметр) замість монохроматорів використовують змінні світлофільтри (первинний і вторинний). Приймачем люмінесценції, як і в спектрофлуориметрі, зазвичай служить фотоелемент або фотопомножувач. Фотострум підсилюють, а потім вимірюють за допомогою мікроамперметру.

Спектри люмінесценції

У звичайних умовах спектри люмінесценції індивідуальних речовин є широкосмуговими. Спектри випромінювання люмінесценції схожі на спектри поглинання відповідних молекул. Однак збуджені молекули X встигають розтратити деяку частину раніше поглиненої енергії (на так звані безвипромінювальні переходи), перш ніж випустити квант вторинного випромінювання. Саме тому спектр випускання люмінесценції зміщений по відношенню до спектру поглинання в більш довгохвильову ділянку. Найчастіше речовина поглинає збуджувальне світло в УФ-ділянці, а люмінесціює – у видимій.

Якщо речовина здатна флуоресціювати і фосфоресціювати, то її спектр випускання фосфоресценції зрушать в довгохвильову сторону ще сильніше, ніж спектр флуоресценції.

За появою люмінесценції при УФ-опроміненні проби, а також за характерним кольором люмінесценції можна візуально впізнавати деякі

елементи, наприклад, уран, що знаходиться в розчині у вигляді іонів. Відомий цілий ряд якісних реакцій, що призводять до утворення люмінесціювальних сполук (можна відкривати субмікрограмову кількість іонів кадмію за реакцією з кальцеїном, іони цинку – з саліциловою кислотою, іони алюмінію – з 8-оксихинолином). Присутність деяких органічних сполук виявляють за характерним кольором люмінесценції, сполуки, не здатні до лімінісценції, при цьому не заважають.

Метрологічні характеристики люмінесцентного аналізу

Основна перевага люмінесцентного аналізу – його висока чутливість і висока селективність. Так можна визначати концентрації порядку 10^{-7} - 10^{-8} г/л, а в окремих випадках – до 10^{-12} г/л.

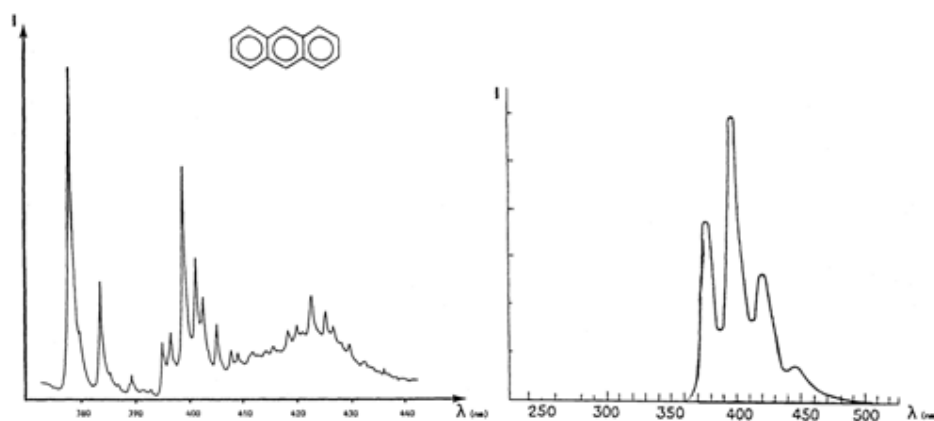


Рис. 14. Спектр люмінесценції розчину антрацену в н-гексані при кімнатній температурі (праворуч) і при -196°C (ліворуч)

Лабораторна робота № 2

Тема: Дослідження вмісту вітаміну С в природних об'єктах

Мета: Дослідити вміст вітаміну С в природних об'єктах і простежувати залежність вмісту аскорбінової кислоти в залежності від умов вирощування та зберігання.

Завдання:

1. Побудувати калібрувальний графік.
2. Провести екстрагування аскорбінової кислоти з природного об'єкту.
3. Фотоколориметрично визначити концентрацію вітаміну С в екстракті.
4. Розрахувати вміст вітаміну С в різних біологічних об'єктах.

Обладнання та реактиви: Фотоколориметр КФК-2, кювети $l = 10$ мм, мірні колби об'ємом 25 см^3 та 100 см^3 , ступка з товкачиком, лійка, розчин реактиву Фоліна, стандартний розчин аскорбінової кислоти ($\text{C (1/2 AK)} = 0,00125\text{ моль/дм}^3$), рослинний об'єкт, багатий на вітамін С, дистильована вода.

Хід роботи

I. Побудова калібрувального графіку

У колби об'ємом 25 см³ відібрати 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 3; 4 см³ стандартного розчину аскорбінової кислоти (C(1/2AK)=0,00125 моль/дм³), додати по 12,5 см³ розчину реактиву Фоліна й довести до мітки дистильованою водою. Колби нагрівати на водяній бані протягом 10 хвилин. Розчини охолодити й виміряти оптичну густина при довжині хвилі 670 нм, чутливість 2.

Розрахувати вміст аскорбінової кислоти за формулою:

$$C(AK) = \frac{V_{ал.} \cdot C_{ст.} (1/2 AK) \cdot M(1/2 AK)}{V_{м.к.}}, \text{ де}$$

C_{ст.} (1/2 AK) – молярна концентрація еквіваленту стандартного розчину аскорбінової кислоти, моль/дм³;

V_{ал.} – об'єм розчину аскорбінової кислоти, взятий для побудови калібрувального графіка, см³;

V_{м.к.} – об'єм мірної колби, 25 см³;

M (1/2AK) – молярна маса еквіваленту аскорбінової кислоти, г/моль.

Результати занести в таблицю для побудови калібрувального графіка :

Val., см ³	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2	3	4
C (AK), мг/см ³									
D									

II. Приготування екстракту з рослинного об'єкту

Взяти наважку 10 г рослинного об'єкту й ретельно розтерти з кварцевим піском у ступці, додаючи 50 см³ розчину HCl (ω (HCl) = 2%). Суміш кількісно перенести в колбу об'ємом 100 см³ і довести до риски дистильованою водою, добре перемішати й відфільтрувати через складчастий фільтр. Отриманий екстракт повинен бути прозорим.

III. Визначення вмісту вітаміну С в рослинному об'єкті

Відібрати аліквоту екстракту об'ємом 10 см³, перенести в мірну колбу об'ємом 25 см³, додати 12,5 см³ реактиву Фоліна й довести до мітки дистильованою водою. Колбу нагрівати на водяній бані протягом 10 хвилин. Розчин охолодити й виміряти оптичну густина при λ = 670 нм, чутливості 2. Концентрацію вітаміну С визначити за калібрувальним графіком. Вміст вітаміну С в об'єкті розрахувати за формулою :

$$C(vitC) = \frac{C_k(vitC) \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{m \cdot 1000 \cdot 10}, \text{ де}$$

C_к(віт. С) – концентрація вітаміну С, визначена за калібрувальним графіком, мг/дм³;

V₁ – об'єм мірної колби, 25 см³;

V₂ – об'єм мірної колби, 100 см³;

100 – маса об'єкта, г;

10 – об'єм аліквоти екстракту, см³;

m – наважка природного об'єкта, г.

Всі дані звести у загальну таблицю "Вміст вітаміну С у рослинних об'єктах":

Природний об'єкт	Частина природного об'єкту	Концентрація вітаміну С, мг/см ³	Вміст вітаміну С, мг/100 г

Зробити узагальнюючий висновок про вміст вітаміну С в природних об'єктах та вплив різних факторів на його вміст.

Контрольні запитання:

1. Що таке спектроскопія? Яке випромінювання застосовується в електронній спектроскопії?
2. Дайте визначення УФ-спектроскопії. З чим пов'язано формування широких смуг, а не чітких ліній у молекулярних абсорбційних спектрах в УФ-ділянці?
3. Класифікація спектрів.
4. Спектральний сигнал та його основні характеристики.
5. Опишіть взаємодію електромагнітного випромінювання зі сполукою.
6. Метрологічні характеристики спектрофотометричного методу.
7. Загальне уявлення про люмінесценцію: визначення, класифікація в залежності від способу збудження, від природи люмінесцюювальних речовин та ін.
8. Дайте визначення поняттям: флуоресценція, фосфоресценція, загальмована флуоресценція.
9. Розрахуйте частоту, хвильове число та енергію квантів світла з довжиною хвилі: 50 нм; 120 нм; 220 нм; 300 нм; 450 нм; 550 нм; 620 нм; 780 нм; 900 нм.
10. Розрахуйте молярний коефіцієнт світлопоглинання міді (II), якщо оптична щільність розчину, який містить 0,24 мг міді в 250 мл, при довжині кювети 0,050 м складає 0,14.

Тестові завдання:

1. Спектроскопія – це ...

А) галузь біології, використовується для дослідження структури та особливості будови живих організмів.

Б) галузь фізики, використовується для ідентифікації сполук, дослідження складу, будови й кількісного аналізу індивідуальних речовин і багатокомпонентних систем.

В) галузь хімії, використовується для вивчення органічних та неорганічних сполук.

2. Спектроскопія в оптичній ділянці спектру (УФ, видима, ІЧ) використовується перш за все в наступних випадках:

- А) для визначення концентрації
Б) ідентифікації речовини
В) визначення числа частинок в розчині
Г) усіх зазначених.

3. Залежно від агрегатного стану речовини спектри розподіляються на три групи:

- А) лінійчатий, смугастий, перериваний
Б) лінійчатий, смугастий, суцільний
В) суцільний, смугастий, перериваний.

4. Спектрофотометри – прилади для...

А) аналізу як забарвлених, так і безбарвних речовин з вибірковою поглинанням монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- та ІЧ-ділянках спектру.

Б) аналізу забарвлених речовин з вибірковою поглинанням монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- та ІЧ-ділянках спектру.

В) аналізу безбарвних речовин з вибірковою поглинанням монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- та ІЧ-ділянках спектру.

5. Апаратура дозволяє вимірювати УФ спектри в ділянці ...

- А) від 380 до 450 нм Б) від 190 до 380 нм В) від 120 до 190 нм.

6. Робочий діапазон більшості спектрофотометрів складає:

- А) 120 – 950 нм Б) 190 - 750 нм В) 170 – 700 нм.

7. Що лежить в основі молекулярного спектрального аналізу?

А) Якісне порівняння спектру досліджуваного зразка із спектрами інших речовин.

Б) Кількісне порівняння спектру досліджуваного зразка із спектрами інших речовин.

В) Обидва варіанти правильні.

8. Застосування спектрофотометрії в УФ і видимій областях спектра засновано на поглинанні електромагнітного випромінювання сполуками, які містять

- А) хромофорні групи Б) ауксохромні групи
В) альдегідні групи Г) фенольні групи.

9. Спектрофотометричні дослідження спектрів молекул у видимій і УФ-ділянках дозволяє встановити

- А) вид електронних переходів Б) структуру молекул
В) розміри молекули Г) склад молекули.

10. Як джерела випромінювання в УФ-ділянці застосовують

- А) дейтерієву (або водневу) лампу
Б) вольфрамову лампу розжарювання В) галогенну лампу.

Література: 3, 5, 6, 8, 10 Інформаційні ресурси: 1-5

ТЕМА 5. ХРОМАТОГРАФІЯ: ПАПЕРОВА, ТОНКОШАРОВА, ІОНООБМІННА

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії паперової, тонкошарової, іонообмінної хроматографії, навчитися використовувати метод паперової хроматографії на практиці.

План

1. Загальна характеристика хроматографічних методів та їх класифікація.
2. Паперова хроматографія.
3. Тонкошарова хроматографія.
4. Іонообмінна хроматографія.

! **Основні терміни та поняття:** хроматографія, рухома фаза, нерухома фаза, елюент, сорбат, сорбент, адсорбція, хроматограма.

1. Загальна характеристика хроматографічних методів та їх класифікація

..

Хроматографія, хроматографічний аналіз (з грецьк. *Chroma* – колір + *grapho* – пишу) – високоефективний фізико-хімічний метод розділення та аналізу, що ґрунтується на різному розподілі речовин в динамічних умовах між рухомою (РФ) і нерухомою фазами (НФ). НФ може бути твердою, рідкою, нанесеною на твердий носій, гель, може бути упакована в колонку, нанесена як шар або як плівка. РФ (елюент) може бути газом, рідиною або флюїдом (газом у надкритичному стані). Розділення може ґрунтуватися на адсорбції, розподілі, іонному обміні та їх комбінації, на відмінностях у фізико-хімічних властивостях молекул (розмір, маса, об'єм тощо).

В основу класифікації численних хроматографічних методів покладено такі ознаки:

1. Агрегатний стан фаз.
2. Механізм взаємодії «сорбент-сорбат».
3. Способи проведення хроматографічного аналізу.
4. Апаратурне оформлення (техніка виконання) процесу хроматографування.
5. Мета хроматографування.

За агрегатним станом фаз хроматографію поділяють на газову та рідинну. Газова хроматографія включає газорідинну та газотвердофазну, рідинна – рідинно-рідинну та рідинно-твердофазну. Перше слово в назві методу характеризує агрегатний стан РФ, друге – НФ.

За механізмом взаємодії сорбенту та сорбату можна виділити кілька видів хроматографії:

§ Адсорбційна – заснована на різній адсорбованості речовин твердим сорбентом. При цьому навіть близькі за складом чи будовою речовини по-різному поглинаються сорбентами, відбувається вибіркова адсорбція, сильно сорбуючі речовини поглинаються у верхній частині колонки, а слабо сорбуючі просуваються далі. Досягається розділення суміші на окремі компоненти по довжині колонки при повторюваних процесах сорбції та десорбції в елементарних шарах.

§ Розподільна – заснована на різній розчинності речовин, що розділяються в НФ (газорідина хроматографія) або на різній розчинності речовин в РФ і НФ (рідина хроматографія).

§ Іонообмінна – базується на різній здатності речовин до іонного обміну.

§ Ексклюзивна – базується на розходженні в розмірах і формах молекул речовин, що розділяються.

§ Афінна – заснована на специфічних взаємодіях, характерних для деяких біологічних і біохімічних процесів (наприклад, антитіло і антиген, гормон і рецептор та ін.).

§ Осадова хроматографія – заснована на утворенні відмінних за розчинністю осадів речовин, що розділяються з сорбентом.

§ Адсорбційно-комплексоутворювальна – заснована на утворенні координаційних сполук різної стійкості у фазі або на поверхні сорбенту.

Слід пам'ятати, що класифікація за механізмом взаємодії досить умовна: її використовують у тому випадку, якщо відомий домінуючий механізм; часто процес поділу протікає відразу за кількома механізмами.

За технікою виконання виділяють колонкову хроматографію (поділ проводиться в спеціальних колонках) і площинну хроматографію, коли поділ проводиться на спеціальному папері (паперова хроматографія) або в тонкому шарі сорбенту (тонкошарова хроматографія). У колонковій хроматографії використовують насадкові або капілярні колонки. Насадочну колонку заповнюють сорбентом (насадкою), а внутрішню стінку капілярної колонки покривають плівкою рідини або пилом адсорбенту.

Залежно від мети проведення хроматографічного процесу розрізняють:

- аналітичну хроматографію (якісний і кількісний аналіз);
- препаративну хроматографію (для отримання речовин у чистому вигляді, для концентрування і виділення мікродомішок);
- промислову (виробничу) хроматографію для автоматичного управління процесом (при цьому цільовий продукт з колонки надходить в датчик).

Хроматографію часто використовують із дослідницькою метою при вивченні розчинів, каталітичних процесів, кінетики хімічних процесів тощо

За способами проведення аналізу виокремлюють три види хроматографії: 1) фронтальна, 2) проявляюча, 3) витіснювальна.

За допомогою хроматографічного методу можна:

- провести якісний і кількісний аналіз досліджуваної речовини;
- провести концентрування речовин з дуже розбавлених розчинів;

- розділити складні суміші органічних і неорганічних речовин на окремі компоненти;
- очистити речовину від домішок (препаративна хроматографія);
- визначити фізико-хімічні характеристики розділених речовин, зокрема молекулярну структуру деяких сполук шляхом встановлення зв'язку між здатністю до сорбції і будовою даної речовини.

<http://ua-referat.com/%D0%A5%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D1%96%D1%87%D0%BD%D1%96%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8> Хроматографічні методи мають найбільш ефективні розподільні можливості за рахунок використання великої кількості типів міжмолекулярних взаємодій. Стадія поділу в хроматографічній колонці або шарі сорбенту забезпечує отримання відносно простих сумішей, аналізованих потім звичайними хімічними, фізико-хімічними чи фізичним методами або спеціально створеними для хроматографії методами або прийомами.

Популярним та доступним методом є площинна (планарна) хроматографія. Це спосіб аналізу, в якому процеси розділення суміші сполук здійснюються у плоскому шарі сорбенту (НФ). Вона ділиться на паперову (ПХ) та тонкошарову хроматографію (ТШХ), які схожі за технікою виконання аналізу. Ці два види рідинної хроматографії прості за технікою виконання, експресні, не вимагають дорогого устаткування. Тонкошарову хроматографію використовують частіше, ніж паперову.

2. Паперова хроматографія

Паперова хроматографія (ПХ, paper chromatography) є різновидом розподільної хроматографії, розділення речовин відбувається внаслідок їх розподілу між волокнами целюлози (НФ) і розчинником (РФ).

У НФ речовина може утримуватися завдяки:

- розчиненню в адсорбованій папером воді (зв'язана вода навіть у висушеному папері міститься у значній кількості);
- адсорбційним ефектам на папері;
- іонообмінному механізму, бо целюлоза може частково окислюватись.

Для ПХ застосовується якісний папір, який може бути модифікованим відповідно до поставлених завдань. Хроматографічний папір має бути хімічно чистим, нейтральним, інертним по відношенню до компонентів розчину і РФ, бути однорідним по щільності. Розчинники РФ і НФ не повинні змішуватися, склад розчинника в процесі хроматографування не повинен змінюватися, розчинники повинні легко віддалятися з паперу. Індивідуальні розчинники використовуються досить рідко. Для поділу водорозчинних речовин, наприклад, неорганічних іонів, як РФ зазвичай беруть органічний розчинник, а як НФ – воду (папір заздалегідь змочують водою).

Розчинниками є спирти (метанол, етанол, н-пропанол, бутанол), прості ефіри (етилловий, метиловий), кетони (ацетон, ацетил-ацетон), ефіри органічних

кислот (метилацетат, етилацетат), піридин, хлороформ. Частіше використовуються суміші розчинників.

Для поділу компонентів, добре розчинних в органічних розчинниках використовують *метод обернених фаз*. У цьому методі для надання паперу гідрофобного характеру його просочують нафталіном, парафіном, розчином каучуку, силіконом та ін., а як РФ використовують воду, водний розчин якої-небудь кислоти чи лугу, буферний розчин. Такий папір є носієм для неполярних розчинників. Обернено фазова ПХ використовується, наприклад, для розділення й ідентифікації полінасичених жирних кислот при вивченні складу ліпідів, виділених із тканин тварин.

Для оцінки хроматографічної поведінки речовини в певних умовах використовують величину R_f , яка дорівнює відношенню відстані L_2 , пройденої речовиною, до відстані L_1 , пройденої розчинником:

$$R_f = \frac{L_2}{L_1}$$

R_f можуть мати значення від 0 до 1. При $R_f=0$ компонент суміші залишається на лінії старту, а при $R_f=1$ – рухається разом з фронтом розчинника. Значення R_f залежить від розподілу речовини, складу рухомої фази, типу паперу, температури, часу хроматографування, техніки експерименту.

За технікою виконання розрізняють такі види ПХ: одновимірні (висхідна і спадна), двовимірні, кругові й електрофоретичні.

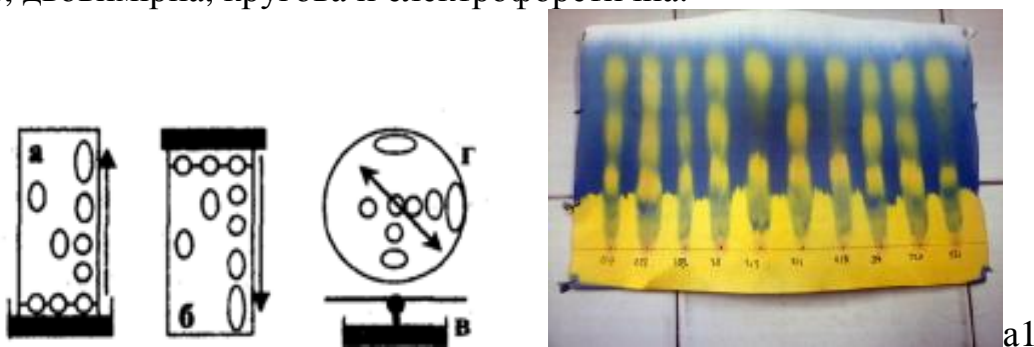


Рис.15. Види паперової хроматографії

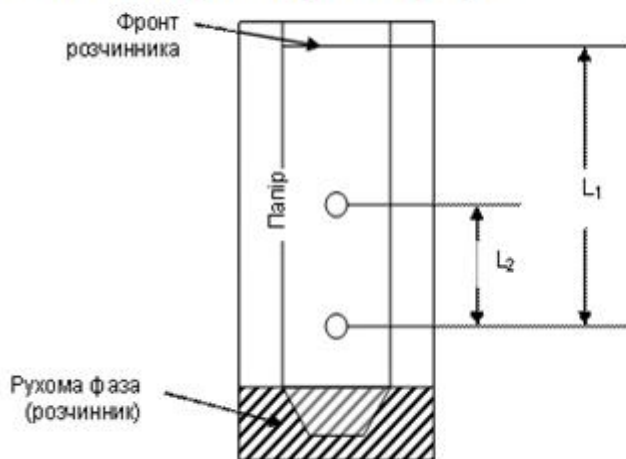
1) Одновимірні хроматографії

Для одновимірної хроматограми використовують скляні герметичні камери, паперові смуги шириною 4,5-5 см і завдовжки 30-50 см. Якщо елюент рухається на паперу вгору, метод називають висхідною ПХ (рис. 15., а, а1); при його русі зверху вниз – спадною ПХ (рис. 15, б).

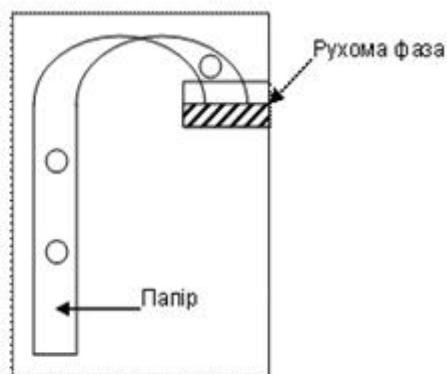
На нижню частину смужки фільтрувального паперу наносять краплину досліджуваного розчину. Папір уміщують у циліндр, на дно якого наливають РФ – розчинник. Нижній край паперової смужки занурюють у розчинник так, щоб нанесена пляма знаходилася трохи вище від рівня розчинника. Циліндр закривають кришкою. Під впливом капілярних сил РФ піднімається вгору. Завдяки різній розчинності компонентів суміші в розчиннику та їх різній адсорбційній здатності на папері утворюються зони, що відрізняються за складом. Коли рівень підйому досягне 2 см від верхнього краю, смужку паперу виймають, відзначають рівень фронту розчинника й висушують. Після цього,

якщо потрібно, зони проявляють певними реагентами. Після проявлення розраховують значення R_f , для визначення L_2 знаходять відстані між точками в центрі плям. Для розділення іонів металів зазвичай використовують РФ, що складається з ацетону та соляної кислоти.

Висхідна паперова хроматографія



Спадна хроматографія



2) Двомірна хроматографія

Іноді при складному вмісті проби не вдається розділити її компоненти за допомогою одного розчинника, тоді застосовують *двомірну хроматографію*. Для цього методу застосовують листи паперу розміром $\approx 20 \times 25 - 40 \times 45$ см. Використовуючи принцип висхідної хроматографії, розділяють суміш на ряд зон. У кут квадратного аркуша наносять розчин проби і хроматографують спочатку в одному елюенті, папір висушують. Потім, повернувши хроматограму на 90° , щоб одержані зони знаходились над розчинником, – в іншому. При цьому кожна зона знову розділяється на плями (рис. 16). Методика дозволяє проводити більш точний поділ суміші.

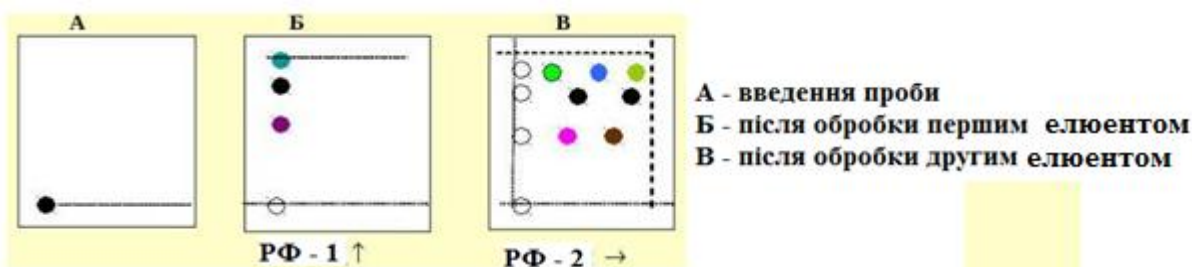


Рис. 16. Двомірна хроматографія суміші барвників

3) Радіальна хроматографія

Дуже швидко можна здійснити хроматографічний аналіз методом радіальної ПХ (рис.15, в), в якому використовується паперове коло (рис.15, г) з гнотом, опущеним у елюент. Краплину досліджуваного розчину вміщують в центр кола зверху і висушують. Потім папір поміщають у герметичну камеру і один її кінець занурюють в розчинник, який є РФ. Розчинник підводиться знизу до центру за допомогою паперової смужечки, він переміщується від центру кола до периферії, розчиняючи і захоплюючи за собою компоненти зразка. Після того, як розчинник пройде певну відстань, лист виймають і сушать. Плями, які утворилися, можуть бути як видимими, так і невидимими, виявляють і відзначають. Радіальну хроматографію можна проводити в чашці

Петрі. Окремі зони розташовуються навколо плями у вигляді концентричних кіл, як показано на рис. 17.



Рис. 17. Кругова хроматографія:

а) вигляд приладу збоку;

б) вигляд хроматограми зверху.

4) Електрофоретична хроматографія

Електрофоретичні хроматограми на папері отримують шляхом поєднання розподільної хроматографії з електрофорезом при проведенні їх одночасно або роздільно. Додатковий вплив електричного поля призводить до більш чіткого розподілу, особливо для іонів з різними зарядами.

Якісний склад проби в методі ПХ так само, як і в ТШХ, може бути встановлений або за специфічним забарвленням окремих плям на хроматограмі, або за чисельним значенням кожного компоненту. Кількісні визначення в ПХ виконуються за хроматографічними характеристиками (за площею плями на хроматограмі та інтенсивності її забарвлення) або після вимивання відповідним фізико-хімічним методом.

Метод ПХ застосовують для якісного аналізу суміші катіонів, амінокислот та інших органічних кислот, пептидів, пестицидів, фенолів, барвників, синтетичних ПАВ та ін.

3. Тонкошарова хроматографія

Тонкошарова хроматографія (ТШХ, Thin-layer chromatography, TLC) є площинним різновидом рідинної хроматографії, в якій елюент (РФ) рухається в шарі сорбенту за рахунок так званих капілярних сил. ТШХ може бути адсорбційного (більш поширений) і розподільного типів. ТШХ зайняла особливе місце серед інших хроматографічних методів завдяки простоті методики та доступності обладнання, великій швидкості проведення експерименту, широкій зоні застосування, високій економічності, достатньо високій селективності та чутливості. ТШХ єдиний хроматографічний метод, який дозволяє проводити повний аналіз невідомої суміші, оскільки дослідник може перевірити, чи не залишилося на старті нерозділених компонентів. ТШХ, маючи високий ступінь чутливості (низький поріг виявлення) та вибірковості, дозволяє визначати 10-20 мкг речовин з точністю до 7%, що є дуже високим показником. Вона посідає провідне місце в питаннях кількісного та напівкількісного аналізу складних фармацевтичних, природних, медико-біологічних, технологічних, хімічних і багатьох інших речовин. ТШХ найдоступнішим методом масового аналізу практично для будь-яких класів речовин.

Можливості ТШХ як аналітичного або дослідницького методу можуть бути істотно розширені завдяки поєднанню з інструментальними методами, такими, наприклад, як спектрофотометрія, полярографія, радіоактиваційний і кінетичний методи. Крім того, дуже корисним є поєднання ТШХ з колоночною хроматографією.

Адсорбція здійснюється за рахунок сил Ван дер Вальса, що є основою фізичної адсорбції, полімолекулярних взаємодій (утворення декількох шарів адсорбата на поверхні адсорбенту) і хемосорбції (хімічної взаємодії адсорбенту та адсорбату).

У ТШХ тверда фаза (силікагель, оксид алюмінію, целюлоза, кизельгур, гіпс) наноситься на підкладку – пластину зі скла (найменш використовувана), алюмінієвої фольги, полімеру (в основному використовуються пластини заводського виготовлення). Аналізована рідка проба наноситься на лінію старту (2-3 см від краю пластинки). Платівку занурюють у рухому фазу – розчинник. Розчинник під дією капілярних сил рухається вздовж шару сорбенту і з різною швидкістю переносить компоненти суміші, розділяючи їх.

Спільні компоненти на платівці утворюють окремі зони (плями), положення яких на хроматограмі характеризується величиною R_f . Вибір розчинника визначається властивостями аналізованих речовин і природою сорбенту. Найчастіше застосовують такі розчинники: петролейний ефір, бензол, ацетон, етиловий спирт та інші спирти, діетиловий ефір, етилацетат, вода. Використовуються також суміші з декількох розчинників.

У ТШХ використовують висхідний, спадний і горизонтальний спосіб отримання хроматограм.

Після закінчення хроматографування безбарвні зони на хроматограмі проявляють хімічним або фізичним способом. При хімічному способі пластинку обприскують розчином реактиву, який з компонентом суміші утворює забарвлену сполуку. Фізичний спосіб прояву заснований на здатності деяких речовин флюоресциувати під дією ультрафіолетового випромінювання.

Для якісної ідентифікації речовин найбільш надійним способом є метод свідків, коли на стартову лінію поруч з пробкою наносять індивідуальні речовини, відповідні тим, які очікують виявити в суміші. Збіг R_f компонента проби і свідка є підставою для ототожнення речовин.

Кількісне визначення вмісту компонентів у пробі здійснюють двома способами: спеціальними приладами (хроматографами) або після видалення речовини з пластини. Для визначення кількості речовини безпосередньо на платівці використовують фотометричний метод кількісного детектування за допомогою спектроденсітометра.

Спектроденсітометр визначає вміст речовини в плямі шляхом вимірювання інтенсивності відбитого світла: білий шар сорбенту відбиває практично все світло, а пляма поглинає частину світлового потоку.

Більш простим методом визначення кількості речовини в плямі є вимірювання її площі (за допомогою міліметрової кальки). При вмісті речовини в межах від 1 до 80 мкг залежність площі плями від маси речовини носить лінійний характер.

4. Іонообмінна хроматографія (ІОХ, Ion exchange chromatography)

В основі методу лежить зворотній процес обміну між іонами аналізованої речовини (РФ, розчин) та іоногенними групами сорбентів (іонітів) у результаті електростатичних взаємодій

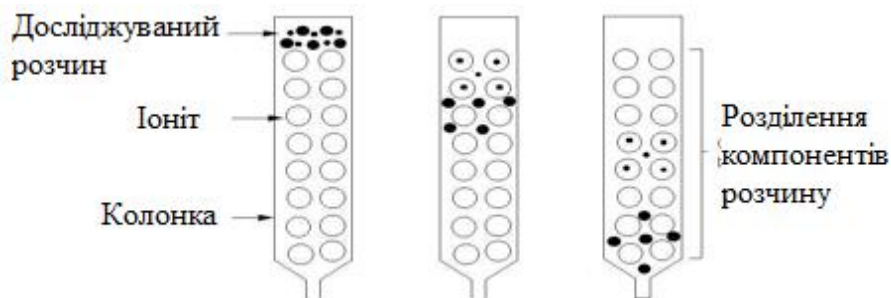


Рис. 18. Розділення компонентів у ІОХ

Іоніти (іоннообмінники) – це тверді речовини мінерального або органічного походження, практично нерозчинні у воді та органічних розчинниках, але здатні до набухання в них. За характером іоногенних груп іоніти розподіляють на *катіоніти* (катіонообмінники), *аніоніти* (аніонообмінники). Катіоніти обмінюються з розчином катіонами, а аніоніти – аніонами. Існують також *амфотерні іоніти*, здатні обмінюватися і катіонами, і аніонами. Такі іоніти називаються *амфолітами*.

Іоніт складається з каркасу (*матриці*), який має позитивний або негативний заряд, що компенсується зарядом іонів протилежного знаку, тому загалом іоніт електронейтральний. Іони іонообмінника, які компенсують заряд каркаса і здатні до обміну, мають назву *протиіони*. Здатність іоніту до обміну протиіонів на іони з розчину обумовлена тим, що протиіони мають певну рухливість у межах каркасу. У порах іоніту містяться не тільки протиіони, але й розчинник та розчинені речовини. Тому поряд з обміном в іоніті відбуваються такі процеси, як *набрякання*, що пов'язане з поглинанням розчинника, і *адсорбція* розчинених речовин.

Процеси іонного обміну на іонітах можна проілюструвати наступними реакціями:



аніонний обмін: $\text{RKt}^+ \text{OH}^- + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{RKt}^+ \text{Cl}^- + \text{OH}^-$, де R – каркас іоніту, що містить іоногенну групу An^- або Kt^+ , яка обумовлює заряд каркасу; H^+ і OH^- – протиіони.

У зв'язку з тим, що властивості іоніту залежать від природи його протиіона, при характеристиці іоніту вказують, який іон є протиіоном. Якщо, наприклад, протиіонами будь-якого катіоніту є іони H^+ , то вважається, що цей катіоніт знаходиться у гідрогенній формі (H^+ -формі). Аніоніт, для якого протиіоном є, наприклад, хлорид-іон, буде знаходитись в хлоридній формі (Cl^- -формі).

Властивості іонітів має велика кількість різноманітних природних і синтетичних речовин. Найбільше практичне значення мають синтетичні орг. іоніти. За своєю хімічною будовою матриці іонообмінника поділяють на:

- синтетичні смоли на основі полістиролу або поліакриламідю;
- сефадекси на основі зшитого декстрану;
- сефарози (на основі агарози);
- целюлозні іонообмінники;
- неорганічні іоніти на основі поверхнево-модифікованих сілікагелей.

Іонний обмін, як правило, проводять в *динамічних* умовах шляхом пропускання розчину, який містить іони, що обмінюються, через колонку з іонітом. Іонний обмін можна також провести в *статичних* умовах, коли наважку іоніту вносять у розчин, який містить іони, що обмінюються, і витримують при струшуванні до повного обміну (тонкошарова іонообмінна хроматографія).

Усередині зерен іоніту розділення залежить ще й від швидкості дифузії іонів, яка визначається щільністю іоніту (частотою зшивань). Спорідненість іоніту до іону пропорційна заряду іона й обернено пропорційна радіусу гідратованого іона.

Для близьких за властивостями іонів, що мають однаковий заряд, іонний обмін буде тим повніший, чим більший радіус іона. Оптимальне розподілення відповідає стану рівноваги, тому всі фактори (зменшення зерен іоніту, підвищення температури, оптимальна швидкість потоку рухомої фази), які прискорюють досягнення рівноваги, сприяють покращанню розділення.

При виборі іоніту користуються таблицями, в яких наведено характеристики іонітів різноманітних типів (розмір і форма зерен, обмінна ємність, кислотно-основні властивості; густина, ступінь набухання).

Час і порядок елюювання катіонів і аніонів визначається їх зарядом і розміром гідратованого іона. Іони затримуються тим сильніше, чим більший їх заряд та розмір гідратованого іона. Елюювальна здатність рухомої фази зростає з підвищенням концентрації іонів, які містяться в ній, та їх спорідненістю з іонообмінником.

Основні стадії технологічної процедури аналізу при проведенні іонообмінної хроматографії такі:

1. Підготовка проби. Уміст солей в пробі має бути мінімальним, тому при необхідності проводиться її знесолення за допомогою гель-хроматографії чи діалізу або її розбавлення.

2. Підготовка іоніту. Необхідну кількість іоніту розраховують за його ємністю, але не більше 10% обсягу сорбенту, оскільки в іншому обсязі здійснюється власне процес поділу. Перед кожним циклом поділу іоніт обов'язково піддається повній регенерації (переводиться в активну форму).

3. Заповнення колонки.

4. Внесення проби. Невеликі обсяги вносять за допомогою шприца. Якщо обсяг проби становить кілька літрів, то розчин подається на колонку за допомогою насоса.

5. Поділ. Проводять градієнтне елюювання, причому формують рухливу фазу з градієнтом іонної сили (за допомогою градієнтного змішувача). При цьому сумарний обсяг елюенту повинен дорівнювати приблизно п'яти обсягам колонки.

Іонна хроматографія – високоефективний варіант колонкової іонообмінної хроматографії з кондуктометричним детектуванням розділених іонів.

Методом ІОХ можна розділяти катіони й аніони, четвертинні основи, аміни, амінокислоти, білки, продукти гідролізу пептидів, фізіологічні рідини, гідролізати клітинних оболонок мікробів, антибіотики, вітаміни, нуклеїнові кислоти або очищувати воду.

Хроматографія – сучасний і високоефективний метод, який дозволяє достатньо швидко та надійно визначати вміст окремих компонентів у сумішах, концентрувати та ідентифікувати ці компоненти. Вона ефективна не тільки в хімічному аналізі, але й у хімічній технології. У біології та агропромисловій сфері хроматографічне розділення та концентрування використовують перед кількісним визначенням мікроелементів, а також для виявлення пестицидних сполук у навколишньому середовищі. При технологічному контролі харчових виробництв хроматографія служить для очищення речовин, аналізу сумішей органічних кислот, амінокислот та інших продуктів.

Лабораторна робота № 3

Тема: Розділення амінокислот за допомогою розподільної хроматографії на папері

Мета: Оволодіти методами розподільної хроматографії як одним із методів якісного аналізу на прикладі розділення суміші амінокислот паперовою хроматографією.

Завдання:

1. Засвоїти методику визначення якісного складу суміші речовин за допомогою паперової хроматографії.
2. Провести розділення суміші амінокислот хроматографією на папері.
3. Розрахувати R_f кожної плями і визначити склад контрольної суміші амінокислот.

Обладнання та реактиви: прилад для виконання висхідних хроматограм, хроматографічний папір, набір амінокислот, суміш амінокислот, олівець, лінійка, скляні капіляри, суміші розчинників: а) н-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:5); б) ацетон-вода (3:2); в) н-бутанол-бензиловий спирт (1:1), розчин нінгідрину в ацетоні.

Хід роботи

На початку заняття одержати у викладача контрольну задачу – розчин суміші невідомих амінокислот, а в лаборанта – аркуш хроматографічного паперу, відрізати за розміром циліндра і розкреслити, як вказано на рис. 19.

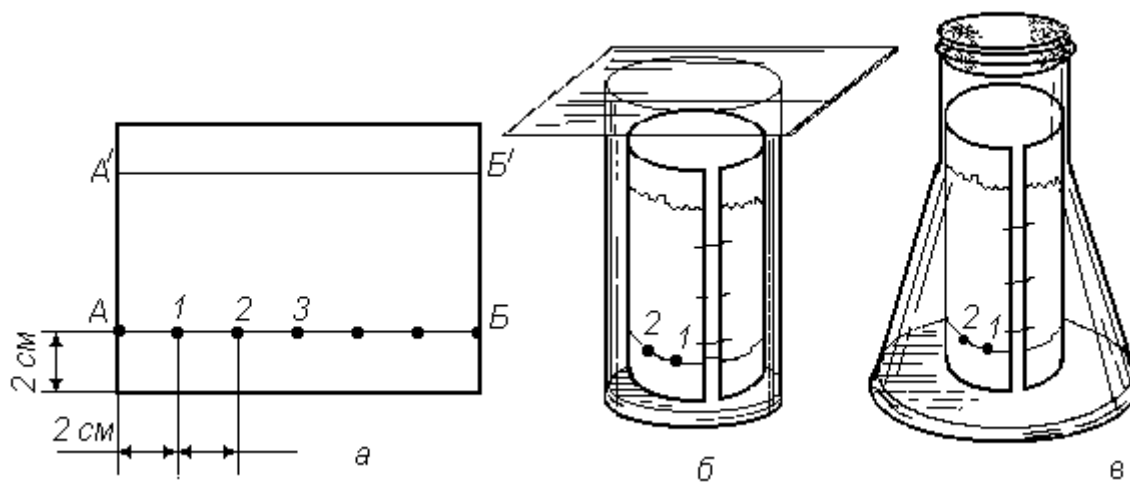


Рис. 19. Прилади для висхідної паперової хроматографії.

Г За допомогою лінійки провести на відстані 2 см від нижнього краю горизонтальну пряму АБ (лінія старту). Намалювати кільця діаметром 3 мм на відстані 2 см одне від одного та проставити над ними порядкові номери. Від лінії старту на відстані 10 см провести пряму А'Б' (лінія фінішу).

На окремому столі нанести розчини амінокислот на папір. Папір покласти на попередньо ретельно вимите скло. Під його нижній край підкласти скляну пластинку чи зошит так, щоб та частина паперу, де намальовані кільця, знаходилася в повітрі, не торкалась поверхні скла. Капілярами, що спеціально виготовлені для кожного розчину, на папір в кільця послідовно нанести краплі розчинів сумішей, що досліджуються, та “свідків”. Капля, яку наносять, не повинна поширюватися за межі намальованого кільця. Розчин на кожне кільце нанести 5-6 разів після висихання попередньої краплі.

Після висихання нанесених крапель ретельно вимити руки з милом, згорнути папір у циліндр та зшити аркуш через край так, щоб одержати більш чи менш правильний циліндр. Особливу увагу звернути на те, щоб при зшиванні крапки А та Б збігалися. На дно скляного циліндра (обережно, не змочити стінки) налити суміш н-бутанолу, оцтової кислоти, води (4:1:5). Висота шару розчинника не повинна бути вища, ніж 1 см від дна циліндра.

Паперовий циліндр обережно вставити вертикально в скляний циліндр так, щоб він не торкався стінок і щоб нанесені краплі знаходились на нижньому кінці паперового циліндра.

Скляний циліндр щільно закрити кришкою з гумовою прокладкою і залишити стояти до тих пір, доки розчинник підніметься до лінії фінішу. Після цього обережно вийняти паперовий циліндр, розрізати шов, розправити папір та висушити його під тягою чи в сушильній шафі (70-80°C).

Коли розчинник повністю випариться, хроматограму проявити. Як проявник для α -амінокислот використовувати розчин нінгідрину ($\omega(\text{нінгідрин})=0,5\%$) в ацетоні. Цим розчином обприснути хроматограму декілька разів з пульверизатора так, щоб папір став тільки слабо вологим та на ньому не утворювались би розмиті струмені розчину. Потім висушити папір на

повітрі та прогріти в сушильній шафі при 110°C до появи лілових плям. Значно краще висушити хроматограму поступово в темряві. Плями, що проявилися, легко обвести олівцем та при бажанні закріпити розчином нікелю сульфату, після чого ще раз просушити хроматограму на повітрі.

Якісний склад контрольної суміші амінокислот визначити за значенням R_f кожної плями, порівнюючи з R_f , що обчислені за хроматограмою для “свідків”. Значення R_f амінокислот цієї системи: гліцин 0,13; аланін 0,18; валін 0,36; фенілаланін 0,46.

У цьому варіанті задачу можливо виконати і для інших амінокислот, а також для простіших вуглеводів. При хроматографуванні вуглеводів їх проявляють амоніачним розчином аргентум нітрату (чорна пляма).

Контрольні запитання:

1. Наведіть класифікацію хроматографічних методів за агрегатним станом фаз, апаратним оформленням процесу, механізмом розподілу та способом отримання хроматограм.

2. Яка роль рухомої та нерухомої фаз?

3. Дайте визначення поняттю «паперова хроматографія». Назвіть позитивні та негативні риси паперової хроматографії.

4. Як отримують одно- та двовимірну хроматограми?

5. Опишіть метод тонкошарової хроматографії (ТШХ).

6. Наведіть приклади рухомих та нерухомих фаз в ТШХ.

7. Коротко охарактеризуйте види ТШХ (висхідна, спадна радіальна, двовимірна та ін.).

8. Що можна розділити методом іонообмінної хроматографії?

9. При хроматографуванні в тонкому шарі амідопірин, бутадіон і димедрол мають величини R_f рівні 0,05; 0,60; 0,95 відповідно. Які з перерахованих лікарських речовин містяться в аналізованій суміші, якщо при її хроматографуванні в тих же умовах отримано дві плями на відстані 4,8 см та 4 мм від стартової лінії, а розчинник пройшов 8,0 см?

10. При аналізі методом ТШХ двокомпонентної суміші, яка містить пропазин і дипразин, на хроматограмі виявлено дві плями зі значеннями R_f , які відповідно дорівнюють 0,40 і 0,78 (висота підйому фронту розчинника 10,0 см). Діаметри плям складають 6,2 і 7,8 мм відповідно. Розрахувати коефіцієнт селективності та ступінь розділення речовин.

Тестові завдання:

1. На чому заснований метод ПХ?

А) На явищі обміну іонів між іонітом і розчином.

Б) На розподілі іонів між рідкою рухомою і нерухомою фазами.

В) На явищі безперервного обміну хроматографічної речовини між нерухомою твердою фазою і фазою, що рухається.

2. Під впливом яких сил рухома фаза підіймається вгору при хроматографії?

А) капілярні сили Б) гравітаційні сили В) сила Архімеда.

3. Носієм нерухомої фази у ПХ виступає:

А) електрод Б) розчинник В) папір.

4. Основою тонкошарової хроматографії є

А) адсорбційний метод Б) метод розподільної здатності
В) метод коагуляції.

5. Основними перевагами тонкошарової хроматографії є ... :

А) висока вартість обладнання Б) низька точність аналізу
В) простота і легкість проведення аналізу
Г) застосування дешевих розчинників.

6. Яким способом проявляють безбарвні зони при ТШХ?

А) біологічним, фізичним Б) фізичним, хімічним
В) колориметричним, фотохімічним Г) хімічним, фотохімічним.

7. Найбільш поширеними елюентами при визначенні аніонів є

А) оксид натрію, гідроксид карбону Б) нітратні кислоти
В) гідроксид калію, оксид алюмінію Г) карбонат, гідроксид натрію.

8. Для розділення біополімерів застосовують

А) високопористі іоніти Б) іоніти середньої пористості
В) низькопористі іоніти Г) стабільні іоніти.

9. За допомогою чого наносять органічну пробу на пластину в ТШХ?

А) піпетки Б) мірні колби В) капіляри Г) мікропіпетки.

10. До площинних видів хроматографії відносять

А) ПХ і рідинну колоночну Б) ПХ, ТШХ, ВЕРХ
В) ПХ і ТШХ Г) ТШХ та іонообмінну.

Література: 2, 4-8, 9 Інформаційні ресурси: 1-5

ТЕМА 6. ГАЗОВА ТА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії газової та рідинної хроматографії, навчитися використовувати метод тонкошарової хроматографії на практиці.

План

1. Загальна характеристика хроматографії.
2. Газова хроматографія.
3. Рідинна хроматографія.

! **Основні терміни та поняття:** газова хроматографія, рідинна хроматографія, хроматограф, колонка, детектор.

1. Загальна характеристика хроматографії

..

Хроматографія – це метод розподілу та визначення речовин, заснований на розподілі компонентів між двома фазами – рухомою і нерухомою. НФ (стаціонарною) служить тверда пориста речовина (сорбент) або плівка рідини, нанесена на тверду речовину. РФ являє собою рідину або газ, що протікає через НФ, іноді під тиском. Компоненти аналізованої суміші (сорбат) разом із РФ пересуваються вздовж НФ. Її зазвичай поміщають в скляну або металеву трубку, яка називається колонкою. Залежно від сили взаємодії з поверхнею сорбенту (за рахунок адсорбції або за іншим механізмом) компоненти будуть переміщуватися вздовж колонки з різною швидкістю. Одні з них залишаться у верхньому шарі сорбенту, інші, що менше взаємодіють із сорбентом, виявляться в нижній частині колонки, а деякі й зовсім залишать колонку разом із РФ (це компоненти, що не утримуються, а період їх утримування визначає "мертвий час" колонки). Отже, відбувається швидкий поділ складних сумішей компонентів.

Сучасні хроматографи оснащені комп'ютерами, що дозволяє прискорити аналіз речовин (за рахунок створення бібліотеки речовин), зробити аналіз більш достовірним, точним, а також простим у виконанні. Перераховані факти роблять метод хроматографічного аналізу одним із найбільш використовуваних у сучасних експертних лабораторіях, оскільки він дозволяє швидко та якісно розділити й проаналізувати суміші близьких за властивостями речовин.

2. Газова хроматографія

Газова хроматографія (ГХ, gas chromatography) є методом поділу летких, термостабільних сполук (РФ – газ). Цим вимогам відповідає до 5% відомих

органічних сполук, але саме вони складають 70-80% сполук, які використовує людина в сфері виробництва й побуту. РФ служить інертний газ (газ-носій), він протікає через НФ, яка має велику поверхню. Як РФ можна використовувати водень, гелій, аргон, вуглекислий газ, але найчастіше використовують азот. Газ-носій забезпечує перенесення у пароподібній формі зразка, що аналізується за хроматографічною колонкою, він не взаємодіє ні з поділюваними речовинами, ні з НФ. Розділення сумішей проводять у спеціальних приладах – *хроматографах*.

Розрізняють *газо-адсорбційну* і *газо-рідинну* хроматографію. У першому випадку НФ є твердий носій (силікагель, вугілля, оксид алюмінію), у другому – в'язка, нелетка рідина, нанесена на поверхню інертного носія.

Газо-рідинна хроматографія (gas-liquid chromatography) – розділення газової суміші внаслідок різної розчинності компонентів проби в рідині або різної стабільності комплексів, що утворюються. НФ служить рідина, нанесена на інертний носій, РФ – газ. Поділ ґрунтується на відмінності в летючості і розчинності (або адсорбованості) компонентів поділюваної суміші, в колонці відбувається процес розчинення газів або парів, що розділяються по всій масі тонкого шару рідини НФ і виділення їх. Цей метод можна використовувати для аналізу газоподібних, рідких і твердих речовин з молекулярною масою менше 400, які повинні відповідати певним вимогам, головні з яких – летючість, термостабільність, інертність, легкість отримання. Цим вимогам повною мірою відповідають, як правило, органічні речовини, тому газову хроматографію широко використовують як серійний метод аналізу органічних сполук.

Газо-адсорбційна хроматографія (gas-solid chromatography, газотвердофазна хроматографія, ГАХ). Особливість методу ГАХ полягає в тому, що як НФ застосовують адсорбенти з високою питомою поверхнею ($10-1000 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$), і розподіл речовин між НФ і РФ визначається процесом адсорбції. Це метод аналізу сумішей газів і легколетких речовин. Розділення речовин у ГАХ відбувається за рахунок численних актів адсорбції на твердій поверхні фази та десорбції з неї. Адсорбція молекул із газової фази може бути обумовлена неспецифічними (орієнтаційними, індукційними, дисперсійними) і специфічними взаємодіями (комплексоутворенням або утворенням водневого зв'язку), а також залежить від природи адсорбенту й сорбату.

За адсорбент беруть пористі носії, які мають хімічну, фізичну та термічну стабільність; однорідну поверхню, рівномірний розподіл за розміром пор і відому адсорбційну активність. Адсорбційна активність залежить від питомої поверхні (визначається геометричною структурою носія) і питомої поверхневої енергії (визначається хімічною структурою поверхні). Перевагами таких адсорбентів є здатність витримувати високі температури, відсутність фонового сигналу при роботі з іонізаційними детекторами та висока селективність.

Адсорбенти діляться на неорганічні, полімерні (органічні) та модифіковані. Серед неорганічних адсорбентів особливо важливі сорбенти на основі вуглецевих матеріалів (неполярні сорбенти). Широко використовуються полярні неорганічні сорбенти на основі двоокису кремнію (цеолітові молекулярні сита ($M_2/nO \cdot Al_2O_3 \cdot xSiO_2 \cdot yH_2O$)).

Метод ГАХ зазвичай використовують для оцінки вмісту в атмосферному повітрі O_2 , H_2 , CH_4 , CO_2 , CO , оксидів азоту, Cl_2 , SO_2 , H_2S , CS_2 .

Перевагами газової хроматографії є:

- порівняно просте апаратне оформлення;
- широкі межі застосування (можна визначати сполуки, для яких досягається тиск насиченої пари 0,001-1 мм рт.ст.);
- можливість визначення з високою точністю малих кількостей газів органічних сполук;
- швидкість аналізу та висока гнучкість зміни умов поділу;
- широкий вибір сорбентів і НФ;
- можливість здійснення хімічних реакцій у хроматографічній колонці або детекторі, що розширює коло аналізованих сполук (реакційна ГХ);
- підвищення інформативності при поєднанні з різними інструментальними методами (мас-спектрометрією, ІЧ(Фур'є)-спектрометрією та ін.).

Апаратура

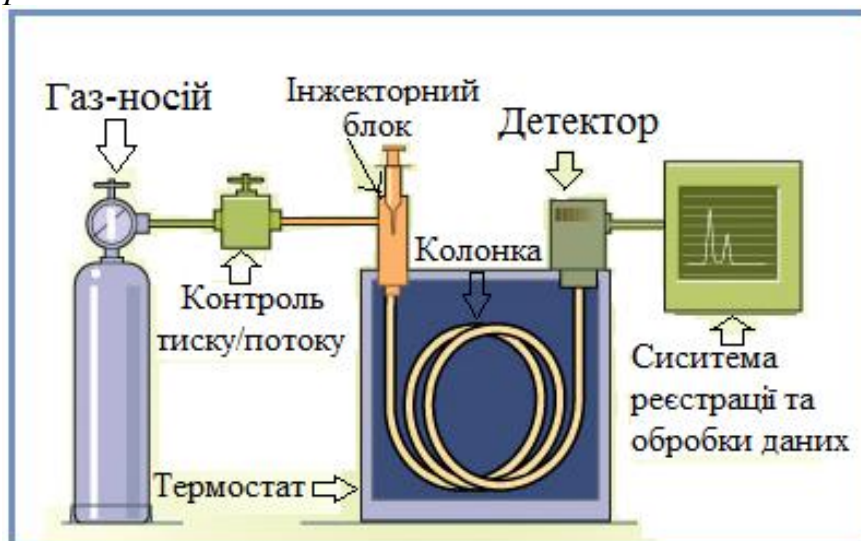


Рис. 20. Схема газового хроматографу

Газ-носіє подається з балона під певним постійним тиском, який встановлюється за допомогою спеціальних клапанів (рис. 20). Швидкість потоку в залежності від розміру колонки, як правило, становить $20-50 \text{ мл}\cdot\text{хв}^{-1}$. Пробу перед введенням у колонку дозують, рідкі проби вводять спеціальними інжекційними шприцами ($0,5-20 \text{ мкл}$) в потік газу-носія (у випарник) через мембрану із силіконової гуми, яка сама ущільнюється. Проба повинна випаровуватися практично миттєво, інакше піки на хроматограмі розширюються і точність аналізу знижується. Тому дозувальний пристрій хроматографа забезпечено нагрівачем, що дозволяє підтримувати температуру дозатора приблизно на 50°C вище, ніж температура колонки. При проходженні отриманої газової суміші вздовж сорбенту в колонці відбувається поділ. З колонки газовий потік, що несе в певній послідовності розділені компоненти, надходить у детектор. Електричний сигнал від детектора реєструється у вигляді хроматограми.

Отже, основними системами будь-якого газового хроматографа є колонка і детектор. Хроматографічна колонка розділяє, а детектор кількісно визначає компоненти газової суміші, які проходить через неї.

У газовій хроматографії використовують насадочні (набивні), капілярні та полікапілярні колонки. Використання капілярних колонок дозволяє істотно підвищити ефективність розділення, а полікапілярних – не тільки отримати високу ефективність, але й провести поділ за дуже короткий час.

У ГХ використовують широке коло детекторів, які можна поділити на інтегральні та диференціальні. *Інтегральні* – реєструють зміну в часі сумарної кількості всіх компонентів, *диференціальні* – вимірюють миттєву концентрацію компонентів.

Метод газової хроматографії *не дозволяє автоматично ідентифікувати* піки на кривій елюювання. Крива, наведена на рис. 26, лише показує, що зразок, який аналізується, містить 20 компонентів. Ідентифікація компонентів проводиться за *часом утримування tR* – період від моменту введення проби до моменту елюювання речовини щодо її максимальної концентрації.

Якщо час утримування компонента невідомий, то цей компонент збирають по мірі виходу його з колонки та ідентифікують, наприклад, за ІЧ-спектром. Іноді для ідентифікації речовину виводять із колонки безпосередньо в ІЧ-спектрометр або мас-спектрометр.

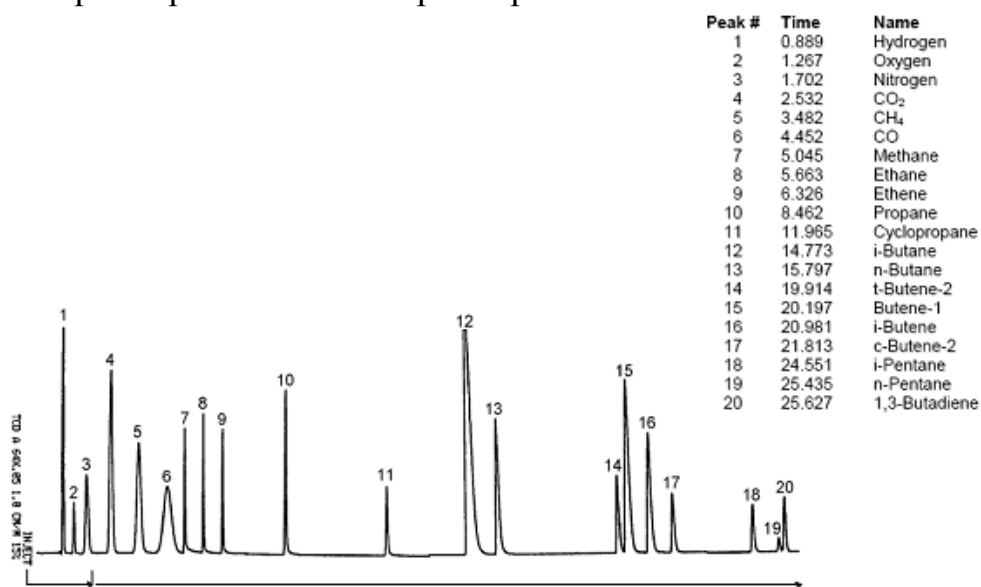


Рис. 21. Приклад розділення суміші газів із використанням газової хроматографії

3. Рідинна хроматографія

Рідинна хроматографія (liquid chromatography, РХ) – вид хроматографії, в якій РФ (елюентом) служить рідина. НФ може бути твердий сорбент, твердий носій з нанесеною на його поверхню рідиною або гелем. Метод РХ застосовується для розділення ширшого кола речовин, ніж ГХ, оскільки панівна більшість частина речовин не леткі та не стійкі при високих температурах. В РХ поділ зазвичай відбувається при кімнатній температурі.

Розрізняють *колонкову РХ*, у якій через колонку, заповнену НФ, пропускають порцію суміші, речовин у потоці елюенту (під тиском або під дією сили тяжіння), і *тонкошарову РХ*, у якій елюент переміщується під дією капілярних сил плоским шаром сорбенту, нанесеним на скляну пластинку або металеву фольгу, уздовж пористої полімерної плівки, поверхнею циліндричної кварцевої або керамічної палички, смужкою хроматографічного паперу.

Сучасним варіантом РХ є ***високоєфективна РХ*** (high-performance liquid chromatography, HPLC, рідинна хроматографія високого тиску, ВЕРХ). Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску та дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм, часто до 1,8 мкм). Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко й повно (середній час аналізу від 3 до 30 хвилин). У ВЕРХ використовують колонки діаметром до 5 мм, щільно упаковані сорбентом; тиск для прокачування елюенту – до 3.107 Па. Варіанти ВЕРХ – *мікроколонкова хроматографія* на наповнених колонках малого діаметру і *капілярна хроматографія* на порожніх і наповнених сорбентом капілярних колонках.

До РХ зазвичай відносять також *гідродинамічну хроматографію*, де НФ відсутня. У цьому випадку використовують той факт, що швидкість потоку елюенту максимальна в центрі порожнього капіляра й мінімальна біля його стінок, а колективні компоненти розподіляються між рухомими з різною швидкістю шарами елюенту відповідно до своїх розмірів або під впливом накладеного в поперечному напрямку зовнішнього силового поля (відцентрового, електричного, магнітного).

За механізмом утримування поділюваних речовин НФ рідинна хроматографія ділиться на осадову, адсорбційну, розподільну, іонообмінну (в т.ч. іонну), лігандообмінну, ситову та афінну (біоспецифічну).

Осадова рідинна хроматографія заснована на різниці між розчинністю осадів, що утворюються при взаємодії компонентів аналізованої суміші з реагентом-осаджувачем. Переваги методу виявляються в тому, що отримувані вздовж сорбенту зони мають різні межі, містять осади тільки однієї речовини й часто розділені зонами чистого сорбенту.

Адсорбційна рідинна хроматографія в залежності від відносної полярності сорбенту та елюенту поділяється на *нормально-фазну* та *обернено-фазну*.

У першому випадку адсорбція речовин відбувається на полярному сорбенті (напр., силікагелі, що містить гідроксильні (силанольні) групи) з неполярного елюенту завдяки донорно-акцепторним взаємодіям або утворенню водневих зв'язків. У другому – на поверхні гідрофобного сорбенту з полярного елюенту завдяки дисперсійним (гідрофобним) взаємодіям поділюваних молекул з поверхнею (утворення водневого зв'язку уможлиблюється в РФ з молекулами елюенту, який, як правило, містить воду).

У розподільній рідинній хроматографії поділ ґрунтується на розподілі речовин між двома рідкими фазами: нерухомою, нанесеною на поверхню носія, і рухомим елюентом. У залежності від полярності рідких фаз можливі *нормально-фазний* і *обернено-фазний* варіанти.

В іонообмінній рідинній хроматографії поділ ґрунтується на різниці між здатністю поділюваних іонів до реакції іонного обміну з фіксуєчими іонами сорбенту, що утворюються в результаті дисоціації іоногенних ґруп останнього. У залежності від знаку заряду фіксуєчих іонів розрізняють катіоніти (закріплений аніон) і аніоніти (закріплений катіон). Поділ іонів регулюють підбором оптимальних значень рН елюенту та його іонної сили.

Лігандообмінна рідинна хроматографія заснована на різній здатності поділюваних сполук утворювати комплекси з катіонами перехідних металів – Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II) тощо – і фіксованими ґрупами (лігандами) нерухомої фази. Частина координаційної сфери іонів металу зайнята молекулами води або іншими слабкими лігандами, які можуть витіснитися молекулами поділюваних сполук.

Найбільш ефективна для поділу оптичних ізомерів – **афінна рідинна хроматографія** (біоспецифічна), заснована на утворенні міцного зв'язку зі специфічними ґрупами НФ (лігандами, афінантами). Взаємодія лігандів з речовинами, що розділяються, заснована на біологічній функції останніх. Зокрема, при поділі ферментів лігандами служать їх субстрати, інгібітори або коферменти, токсинів – рецептори, білків – антитіла і т. д. Цей вид хроматографії досить ефективний у біотехнології та біомедицині для виділення ферментів, білків, гормонів.

В ексклюзивній (ситовій, гель-проникаючій, гель-фільтраційній) рідинній хроматографії поділ ґрунтується на відмінностях у розмірах молекул; молекули малих розмірів проникають у порівняно тонкі пори сорбенту (молекулярні сита) і затримуються в них, великі молекули або не проникають в пори, або проникають лише в широкі пори і проходять колонку з незначним утримуванням.

Сучасна модифікація методу – високоефективна рідинна хроматографія, дозволяє провести аналіз, ідентифікацію і поділ дуже малих кількостей речовин (~ 0.000001 р.) за дуже короткий час – 15-20 хвилин.

Апаратура

У залежності від методу РХ використовують різні модифікації хроматографів (прилади або установки для хроматографічного розділення і аналізу сумішей речовин). Основними частинами хроматографа є: система для введення досліджуваної суміші речовин (проби); хроматографічна колонка; детектувальний пристрій (детектор); системи реєстрації та термостатування; пристосування і приймачі для розділених компонентів. Сучасний прилад для ВЕРХ має модульний тип, який дозволяє швидко змінити конструкцію приладу для певних потреб.

Хроматографічні методи широко використовують для розділення речовин дуже близької будови, природних сполук, білків, нуклеїнових кислот, і навіть деяких біологічних об'єктів. Метод хроматографічного аналізу є одним із найбільш використовуваних у сучасних експертних лабораторіях, оскільки він дозволяє швидко та якісно розділити й проаналізувати суміші близьких за властивостями речовин. Рідинна хроматографія застосовується як аналітична і препаративна.

ТЕМА 7. МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ ТА ХРОМАТО-МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ. ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЯ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії мас-спектрометрії, хромато-мас-спектрометрії, ЯМР-спектроскопії, навчитися розшифровувати ЯМР та Мас-спектри органічних сполук на практиці.

План

1. Мас-спектрометрія та хромато-мас-спектрометрія.
2. ЯМР-спектроскопія.

! **Основні терміни та поняття:** мас-спектрометрія, хромато-мас-спектрометрія, ЯМР-спектроскопія, ЯМР- та мас-спектри.

1. *Мас-спектрометрія та хромато-мас-спектрометрія*

..

Мас-спектрометрія (mass spectrometry) – метод дослідження речовин, який заснований на іонізації атомів і молекул, що входять до складу проби речовини і реєстрації спектру мас утворених іонів. Мас-спектрометрію описували як найдрібніші ваги у світі, які можуть зважити молекули. За останній час мас-спектрометрія зазнала приголомшливого технологічного підйому, що дозволяє застосовувати її для білків, ДНК, ліків та багатьох інших біологічно активних молекул. Завдяки таким способам іонізації, як іонізація електроспрею (ESI) або лазерна десорбція/іонізація з матриці (MALDI), мас-спектрометрія стала незамінним інструментом для біохімічних досліджень.

Мас-спектрометрія є одним з найбільш ефективних експресних методів аналізу й установлення будови як індивідуальних органічних сполук, так і синтетичних, природних сполук та їхніх сумішей. Завдяки своїй винятково високій чутливості й можливості використання в комбінації з газовою й рідинною хроматографією цей метод широко застосовується в органічній, біоорганічній, біологічній, фізичній, аналітичній, медичній хімії, у нафтохімії, фармакології, токсикології, охороні навколишнього середовища, судово-медичній експертизі й у контролі виробництва. Традиційно органічна мас-спектрометрія використовується для рішення двох основних проблем: ідентифікації речовин та вивченні фрагментації іонізованих молекул органічних сполук в газовій фазі в іонному джерелі.

Для отримання мас-спектру достатньо 10^{-2} - 10^{-12} г індивідуальної речовини. Для отримання звичайного спектру електронного удару індивідуальної сполуки необхідно затратити усього 1-2 хв., а час аналізу складної суміші органічних сполук у режимі хромато-мас-спектрометрії визначається винятково хроматографічним часом утримання компонентів.

Варіації ізотопного складу елементів можуть бути визначені з відносною похибкою $\pm 10^{-2}\%$, а маси ядер – з відносною похибкою $\pm 10^{-5}\%$ для легких і $\pm 10^{-4}\%$ – для важких елементів.

Цей метод принципово відрізняється від інших спектрометричних методів, оскільки структурна мас-спектрометрія заснована на руйнуванні органічної молекули в результаті іонізації тим чи іншим способом. Ще одна істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні, рентгенівські та деякі інші методи детектують випромінювання або поглинання енергії молекулами чи атомами, а мас-спектрометрія детектує безпосередньо самі частинки речовини.

Теоретичні основи методу мас-спектрометрії

Мас-спектрометр визначає масу молекули, вимірюючи відношення маси до заряду (m/z) її іона. Мас-спектрометр є вакуумним приладом, що використовує фізичні закони руху заряджених частинок у магнітних і електричних полях, необхідного для отримання мас-спектра.

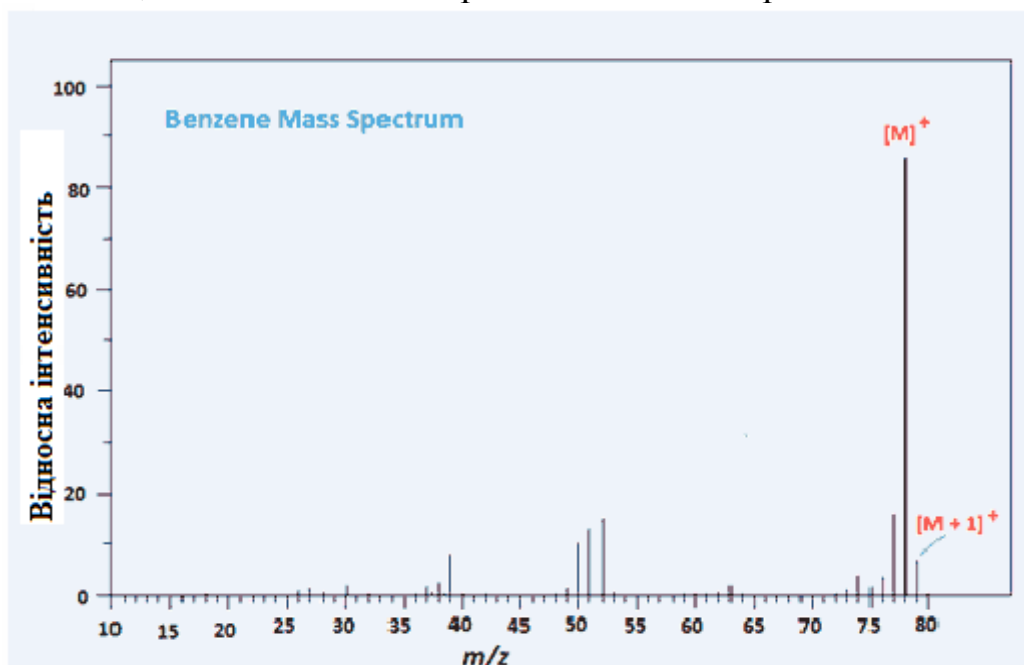


Рис. 22. Мас-спектр бензену

Ідею методу можна описати наступною схемою:

1. Перетворити нейтральні частинки – атоми або молекули – в заряджені частинки – іони. Цей процес називається **іонізацією**. Він по-різному здійснюється для органічних і неорганічних речовин. Частіше досліджуються позитивні іони, тому що наявні методи іонізації дозволяють одержувати їх більш простими шляхами й у більших кількостях, ніж негативні.

2. Розділити іони, що утворилися в просторі, відповідно до їх m/z за допомогою електричного або магнітного поля, частіше у вакуумі.

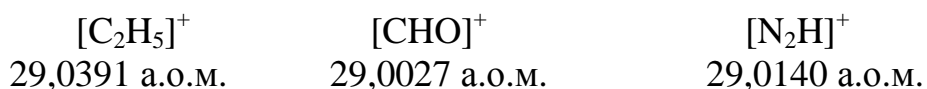
3. Провести детектування. Вимірюючи електричний струм, утворений направлено рухомими іонами, можна говорити про ізотопний, атомарний та молекулярний склад аналізованої речовини на якісному та кількісному рівнях.

Результатом іонізації молекул, поділу іонів і детектування іонів є спектр, за яким можна визначити молекулярну масу і навіть отримати деяку

інформацію про будову речовини. Мас-спектр, як і будь-який спектр, у вузькому сенсі – це залежність інтенсивності іонного струму (кількості) від відношення маси до заряду (якості). Мас-спектр з характерною структурою фрагментації є «відбитком пальців» молекули і може служити для ідентифікації невідомих сполук шляхом бібліотечного пошуку. На рис. 22 представлено вигляд мас-спектру бензену.

Крім наданої вище графічної форми, мас-спектри можуть бути представлені алгебраїчно у вигляді m/z (I), наприклад, спектр метилсаліцилату: 153(3), 152(60), 121(31), 120(98), 93(12), 92(59), 65(18), 64(12), 63(9), 53(2), 33339(14). Перше із значень у спектрі характеризує відношення m/z частинки, а інше (у лапках) – відносний вміст частинок, які характеризуються даним відношенням. Для рішення багатьох задач достатньо скороченої форми мас-спектру, на якому представлені найбільш інтенсивні сигнали (5-10), розташовані за зменшенням інтенсивності.

Здатність мас-спектрометра розділяти іони описується величиною R , яка називається *роздільною здатністю*, вона визначається як: $R = M/\Delta M$, де M – максимальна маса, для якої перекриття піків менше, ніж за 10%, а ΔM – одна атомна одиниця маси. Ця величина визначає максимальну масу іонів, які відрізняються на одну атомну одиницю, для яких прилад розділяє піки не менш, ніж на 90%. Ділянка значень R зазвичай знаходиться в інтервалі між 100 і 500 000. Роздільна здатність є важливою характеристикою мас-спектрів. У залежності від роздільної здатності розрізняють спектрометри низької ($R \approx 5000/1$) і високої (10 000/1 – 100 000/1) роздільної здатності. Завдяки приладам високої роздільної здатності можна визначити різницю в молекулярній масі іону до 0,0001 а.о.м. Наприклад, можна розрізнити наступні іони:



У спектрах низької роздільної здатності цим частинкам відповідає один сигнал з масою, яка дорівнює 29 а.о.м.

Чутливістю в мас-спектроскопії є величина, що показує, яку кількість речовини потрібно ввести в мас-спектрометр для того, щоб її можна було із високою мірою достовірності виявити.

Типова величина порогу виявлення хорошого хромато-мас-спектрометра, який використовують для аналізу органічних сполук, становить 1 пікограм при введенні 1 мікролітра рідини. Це значить, що чутливість приладу достатня, щоб детектувати 1 кілограм металу (наприклад, ртуті, свинцю), розчиненого в озері Байкал (за умови його перемішування й повного розчинення). Вона дозволяє виявити всі елементи періодичної системи із чутливістю 10^{-12} г.

Апаратура для проведення мас-спектроскопії

Кожен мас-спектрометр незалежно від деталей конструкції складається з наступних основних елементів:

- 1) системи введення речовини в прилад;
- 2) джерела іонів, призначеного для отримання іонів з аналізованих речовин;

3) мас-аналізатора, призначеного для поділу іонів за масами (вірніше, по відношенню маси до заряду – t/z);

4) детектора і реєстру вального пристрою, призначеного для реєстрації кількості іонів різної маси.

Розшифровка мас-спектрів

Зазвичай органічні сполуки дають складні мас-спектри, в яких удається виділити найбільш характерні та найбільш інтенсивні піки, що відповідають основним шляхам розпаду досліджуваної сполуки. «Читають» спектри справа наліво – від більших мас до менших. Великі фрагменти найбільш інформативні, для них можлива обмежена кількість шляхів утворення.

Перший пік у спектрі – пік молекулярного іона (іонізованої вихідної молекули). При описі спектру його позначають буквою **M**. Уже з цього піку можна отримати багато корисних відомостей. Імовірність утворення **M** підвищується зі зростанням стійкості вихідної молекули. Розпад **M** відбувається значно легше за вихідну молекулу, оскільки він менш стабільний. У спектрах ароматичних і поліциклічних сполук молекулярні іони мають інтенсивні сигнали, низька інтенсивність сигналу – у алканів та спиртів. За відносною величиною інтенсивності сигналу можливо відносно судити про клас, до якого відноситься сполука. Наприклад, значення молекулярної маси **M** дає можливість визначити в молекулі непарну кількість атомів N («азотне правило»), у цьому випадку молекулярна маса сполуки непарна. Для молекул, які не містять атоми азоту чи містять парну його кількість, значення маси завжди парне.

Вони можуть мати тільки дискретні значення, що підкоряються цілком певним закономірностям. Зокрема, будь-яка сполука складу $C_xH_yO_z$ може мати тільки парну молекулярну масу. Значення молекулярної маси відразу різко обмежує число можливих структур, а більш докладний аналіз спектра в області піку молекулярного іона дозволяє отримати ще цілий ряд додаткових даних. Наприклад, природний бром складається з двох ізотопів ^{79}Br і ^{81}Br у співвідношенні 1:1. Тому молекулярний іон будь-якої сполуки, що містить один атом бромову, дає в мас-спектрі два піки однакової інтенсивності, що розрізняються на дві одиниці маси. Такий дуплет у спектрі дуже характерний і відразу вказує на наявність в аналізованій сполуці одного атома бромову. А якби в ньому було два атоми бромову, то відповідні іони дали б пік у вигляді триплетів з відстанню між компонентами в дві одиниці маси і співвідношенням інтенсивностей 1: 2: 1.

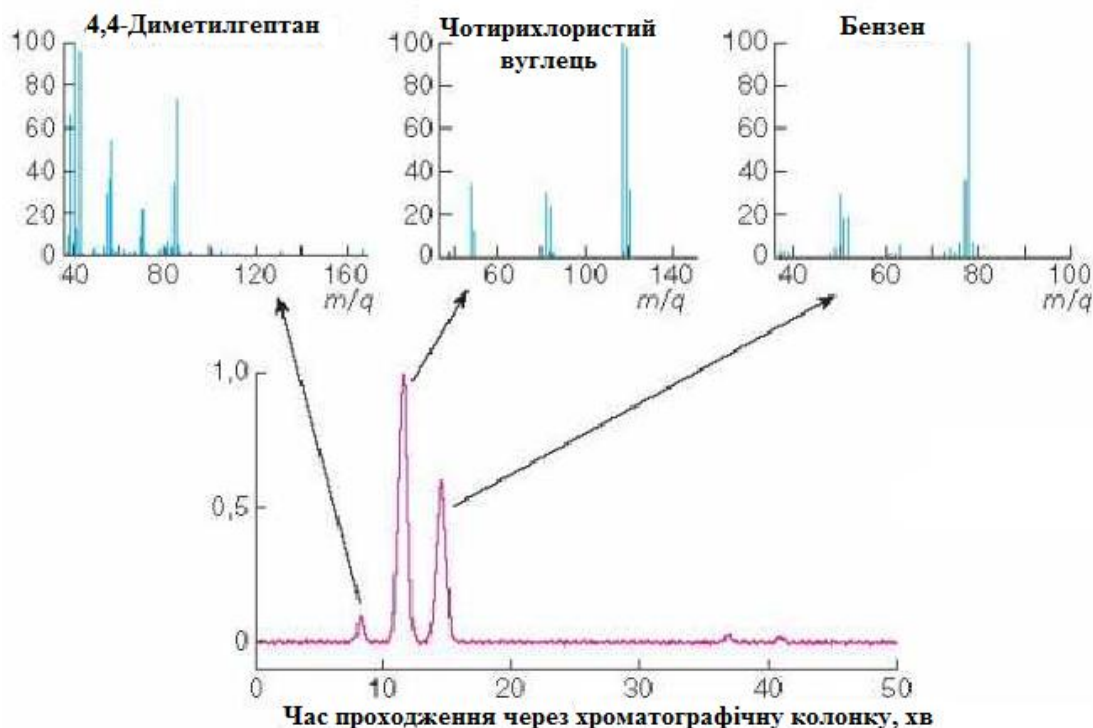
Далі за спектром ідуть піки осколків. Молекулярний іон розпадається на дві частки: заряджену та нейтральну. Остання часто виявляється стійкою малою молекулою типу H_2O , CO і т.п. Ці фрагменти нейтральні, проте їх можна ідентифікувати побічно – за різницею мас молекулярного іона і зарядженого осколка. Тому останні часто описують у різницевому виразі, наприклад: MH_2O , або $M-18$; M-CO , або $M-28$; M-CH_3 , або $M-15$; $\text{M-H}_2\text{C=C=O}$, або $M-42$ і т.д. Склад таких великих осколків зазвичай легко ідентифікувати, оскільки число варіантів складу малих осколків досить невелике. Наприклад, для звичайних органічних сполук $M-18$ – це завжди MH_2O . Таких первинних осколків, тобто

тих, які виникають безпосередньо за розпадом молекулярного іона, може бути декілька, тому що розпад може протікати за декількома напрямками. Первинні осколки, в свою чергу, підлягають розпаду, а продукти розпаду теж розпадаються. Так виникають серії іонів, що відповідають певним шляхам розпаду, або, як частіше говорять, фрагментації молекулярного іона. Мистецтво розшифровки спектра значною мірою полягає в умінні з великого числа піків виділити такі, які об'єднуються в певні серії – послідовності фрагментації вихідного іона.

Великі принципові можливості мас-спектрометрії з'являються при поєднанні її з іншими методами. Поєднання методів значно розширює можливості кожного з них, дозволяючи одержувати більше інформації про об'єкт дослідження.

Хромато-мас-спектрометрія (chromato-mass-spectrometry) – гібридний метод аналізу сумішей головним чином органічних речовин та визначення слідових кількостей речовини в об'ємі рідини.

Хромато-мас-спектр промислових газових викидів



Метод заснований на комбінації двох самостійних методів – *хроматографії* та *мас-спектрометрії*. За допомогою першого здійснюють розділення суміші на компоненти, за допомогою другого – ідентифікацію та визначення будови речовини, кількісний аналіз. Спочатку сполуки розділяються на колонці хроматографа з послідовним виходом компонентів з колонки в іонне джерело мас-спектрометра, де відбувається їх іонізація. Процеси розділення та аналізу тут протікають абсолютно незалежно один від одного. Відомо 2 варіанти хромато-мас-спектрометрії, що представляють собою комбінацію мас-спектрометрії з газовою хроматографією (gas chromatography-mass spectrometry), або з високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ, high-performance liquid chromatography, HPLC).

Поєднання газової хроматографії з мас-спектрометрією дає метод, за допомогою якого всі компоненти складної трьохсоткомпонентної суміші можна розділити й ідентифікувати, якщо навіть їх вміст у пробі становить до 10^{-12} м. Незважаючи на вражаючі можливості, фізичні принципи обох методів досить прості.

Метод **хромато-мас-спектрометрії** використовують при структурно-аналітичних дослідженнях в органічній хімії, нафтохімії, біохімії, медицині, фармакології, для охорони навколишнього середовища та ін.

Хромато-мас-спектрометр

Хроматографічні детектори забезпечують отримання інформації про аналізовані речовини за часом утримування, амплітудою та площі піків. Мас-спектрометричний детектор розширює можливості аналізу за рахунок отримання додаткової спектральної інформації про хроматографічні піки.

Будова газового хромато-мас-спектрометра



2. ЯМР-спектроскопія

Ядерним магнітним резонансом (ЯМР) називається явище вибіркового поглинання електромагнітних хвиль певної частоти речовиною, яка знаходиться в магнітному полі, внаслідок переорієнтації магнітних моментів ядер (ядер з ненульовим (нецілим) спіном – ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P та ін.).

Спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР-спектроскопія, Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR spectroscopy) – спектроскопічний метод ідентифікації та вивчення хімічних об'єктів, який використовує явище ядерного магнітного резонансу. ЯМР-спектроскопія відноситься до неруйнівних методів аналізу, найчастіше застосовується для органічних сполук. Найбільш важливими для хімії та практики є спектроскопія протонного магнітного резонансу (ПМР-спектроскопія), а також спектроскопія ЯМР на ядрах вуглецю-13 (^{13}C ЯМР-спектроскопія), фтору-19 (^{19}F ЯМР-спектроскопія), фосфору-31 (^{31}P ЯМР-спектроскопія). Одні й ті ж ядра атомів перебуваючи в

різних фрагментах молекули органічної сполуки, дають різні сигнали ЯМР. Відмінність такого сигналу ЯМР від сигналу стандартної речовини дозволяє визначити так званий хімічний зсув, який обумовлений хімічною будовою досліджуваної речовини.

На сьогодні ЯМР-спектроскопія дозволяє ідентифікувати сполуку маючи менше 1 мг речовини. Зразок розчиняють у непротонному (часто дейтерованому) розчиннику, далі тонкостінну скляну трубку (ампулу) зі зразком поміщають у магнітне поле ЯМР-спектрометру, де ЯМР-активні ядра (такі як ^1H чи ^{13}C) поглинають електромагнітну енергію. Резонансна частота, енергія абсорбції та інтенсивність випроміненого сигналу пропорційні силі магнітного поля. Після нетривалого (для простих сполук біля 30 сек.) накопичення сигналу отримують спектр, де за положенням піків (частотою поля збудження) окремих протонів (для ПМР) характеризують сполуку.

У звичайному спектрі ПМР кожен наявний у молекулі протон дає свій сигнал (сигнали двох або більше протонів можуть накладатися один на одного). Цей сигнал характеризується трьома параметрами:

➤ *інтенсивністю*, яка прямо пропорційна вмісту протонів даного типу в зразку;

➤ *величиною хімічного зсуву*, вимірюваного від деякого внутрішнього стандарту (найчастіше в ЯМР ^1H і ^{13}C застосовують тетраметилсилан (ТМС), $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) в одиницях м.ч. (тобто в мільйонних частках частоти приладу);

➤ *величиною константи спин-спінової взаємодії (КССВ)* з іншим (чи іншими) протонами в тій же молекулі. Ця константа, що виявляється в спектрі у вигляді розщеплення сигналів на окремі компоненти, вимірюється в герцах.

Якщо прийняти сигнал тетраметилсилану за 0, а зсув сигналу в слабке поле вважати позитивним хімічним зсувом, то ми отримаємо так звану шкалу δ .

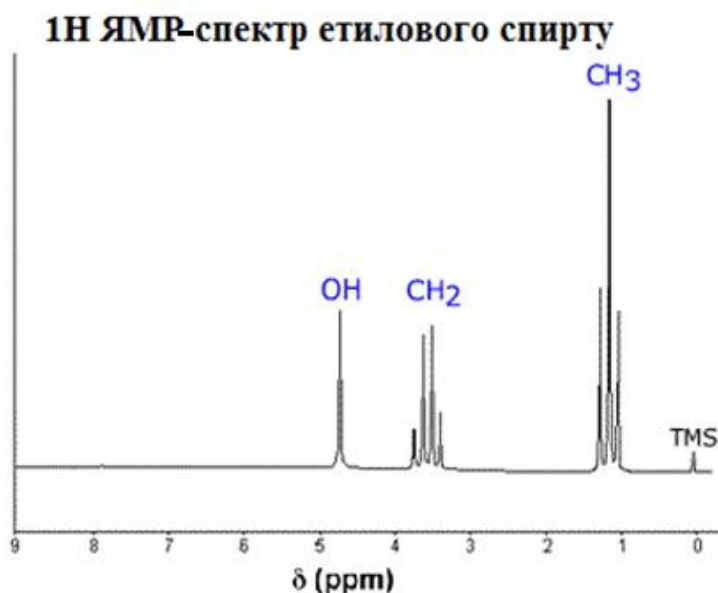
Подібно ІЧ-спектроскопії, ЯМР виявляє інформацію про молекулярну будову хімічних речовин. Однак, він забезпечує більш повну інформацію, ніж ІЧ, дозволяючи вивчати динамічні процеси в зразку – визначати константи швидкості хімічних реакцій, величину енергетичних бар'єрів внутрішньомолекулярні обертання. У методиках ЯМР є багато можливостей визначати хімічну будову речовин, конформації молекул, ефекти взаємного впливу, внутрішньомолекулярні перетворення. Ці особливості роблять ЯМР-спектроскопію зручним інструментом як теоретичної органічної хімії, так і для аналізу біологічних об'єктів. Широкому використанню методу заважає тільки висока ціна пристроїв (від 1 мільйона гривень та вище).

Хімічний зсув

Величина хімічного зсуву визначається багатьма особливостями структури органічної молекули, а також низкою зовнішніх чинників (у першу чергу застосовуваного для зйомки спектру розчинника). Найбільший внесок у цю величину робить щільність електронної хмари навколо даного протону (ядра): чим більшою мірою електронна пара, що утворює зв'язок даного протона з найближчим атомом, відтягнута до цього останнього, тим більшою буде величина хімічного зсуву. У дуже грубому наближенні можна сказати, що чим більш кислим є даний протон, тим більший його хімічний зсув. Оскільки

зсув електронів зв'язку визначається, в першу чергу, природою включеного в цей зв'язок атома, а в другу – найближчим оточенням цього атома, величина хімічного зсуву відображає положення даного протона в молекулі й тому знаходить досить різноманітне застосування у встановленні структури органічних сполук.

Залежно від місцевого електронного оточення різні протони в молекулі



резонують на частотах, які незначно відрізняються. Оскільки це зміщення частоти і основна резонансна частота прямо пропорційні силі магнітного поля, то це зміщення перетворюється в незалежну від магнітного поля безрозмірну величину відому, як хімічний зсув. Хімічний зсув визначається як відносна зміна щодо деяких еталонних зразків. Частотний зсув екстремально малий у порівнянні з основною ЯМР-частотою. Типовий зсув частоти

дорівнює 100 Гц, тоді як базова ЯМР-частота має порядок 100 МГц. Хімічний зсув часто виражається в частинах на мільйон (м.ч. (укр.), м.д. (рос.), ppm (анг.)). Для того щоб виявити таку маленьку відмінність частоти, прикладене магнітне поле має бути постійним усередині об'єму зразка.

Оскільки хімічний зсув залежить від хімічної будови речовини, він застосовується для отримання структурної інформації про молекули у зразку. Наприклад, спектр для етанолу дає 3 відмінні сигнали, тобто 3 хімічні зсуви: один для групи CH_3 , другий для CH_2 -групи і останній для OH . Типовий зсув для CH_3 -групи приблизно дорівнює 1 м.ч., для CH_2 -групи, приєднаної до OH , – 3-4 м.ч. і OH – приблизно 5 м.ч.

Через молекулярний рух при кімнатній температурі сигнали трьох метилових протонів усереднюються протягом ЯМР-процесу, який триває лише кілька мілісекунд. Ці протони вироджуються і формують піки при тому ж хімічному зсуві. Програмне забезпечення дозволяє проаналізувати розмір піків для того, щоб зрозуміти, як багато протонів роблять внесок у ці піки.

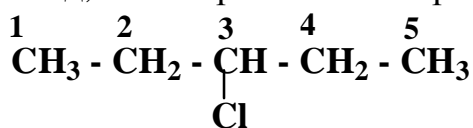
Сpektри ЯМР, зокрема спектри ПМР

Для якісного аналізу за допомогою ЯМР використовують аналіз спектрів, заснований на таких властивостях даного методу:

- сигнали ядер атомів, що входять у певні функціональні групи, лежать у суворо визначених ділянках спектра;
- інтегральна площа, обмежена піком, суворо пропорційна кількості атомів, що резонують;
- ядра, що лежать через 1-4 зв'язки, здатні давати мультиплетні сигнали в результаті розщеплення один на одному.

ПМР-спектр дає п'ять основних аналітичних критеріїв: *загальне число сигналів* – дозволяє визначити число груп нееквівалентних протонів у зразку, який аналізується; *інтенсивність сигналів* – пропорційна числу протонів даного типу; *хімічний зсув* – дозволяє визначити положення протонів даного виду в молекулі; *мультиплетність сигналу* – дозволяє визначити число протонів у сусідніх вуглеводневих атомів; *константи спін-спінової взаємодії* – характеризують просторове розташування протонів даного типу.

Розглянемо більш детально особливості інтерпретації ПМР-спектрів. Піки у спектрі ПМР є сигналами поглинання енергії зовнішнього магнітного поля, яке прикладається, протонами речовини. Хімічно еквівалентні протони (з однаковим оточенням) поглинають енергію в одній ділянці спектра. Наприклад, в спектрі ПМР 3-хлорпентана:



є три набори сигналів від трьох груп еквівалентних протонів: а) $^1\text{CH}_3$ - та $^5\text{CH}_3$; б) $^2\text{CH}_2$ - та $^4\text{CH}_2$ -; в) $^3\text{CHCl}$ -.

Хімічним зсувом (δ) називають зміщення сигналу спектра на шкалі в залежності від хімічного оточення протону. Електроноакцепторні атоми і групи атомів поблизу поглинального протона (через один-два хімічних зв'язки) зрушують поглинання в зону слабкого поля (великі значення δ). Сигнали ПМР досліджуваної речовини в спектрі проявляються зліва від сигналу еталону (ТМС), який приймають за 0 м.д. Відносно великим значенням величини δ відповідає зона слабкого магнітного поля, і навпаки, малим значенням цієї величини – зона сильного магнітного поля, що показано на рис. 23.

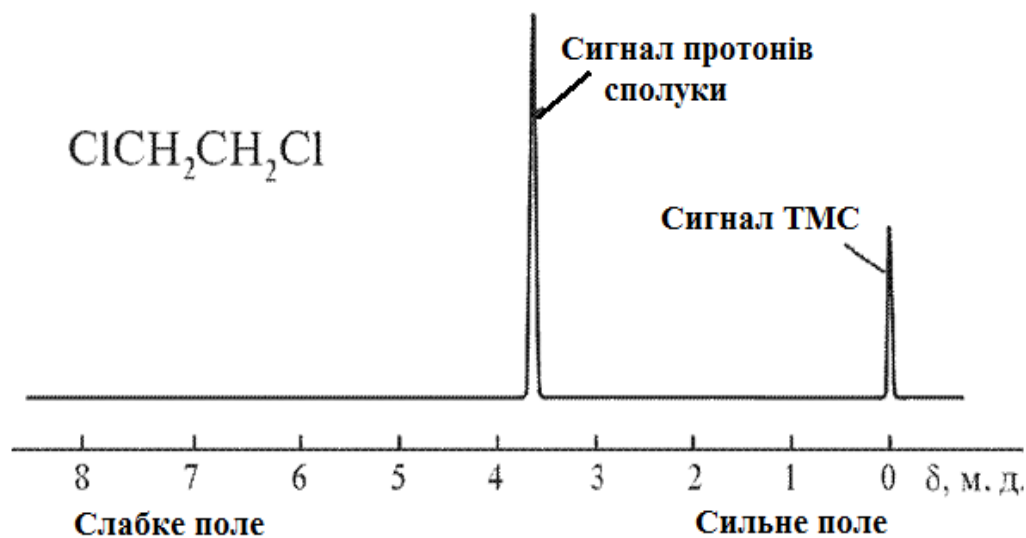


Рис. 23. Спектр ПМР 1,2-дихлоретану

Площа піку сигналу (окреслена самописцем) – інтенсивність сигналу – показує відносний вміст протонів кожного виду в молекулі.

Розщеплення сигналу на декілька піків свідчить про взаємодію розглянутого протона з іншими нееквівалентними протонами (з різним оточенням) або деякими іншими ядрами з непарними масовими числами (^{19}F , ^{31}P та ін.).

Існують довідкові таблиці, в яких зазначено діапазон хімічних зсувів протонів різних видів. За ними можна визначити, в якій ділянці спектра дає сигнал той чи інший протон (табл. 3).

Таблиця 3. Хімічні зсуви протонів різних видів у спектрах ПМР

Вид протону	Хімічний зсув, м.ч.	Вид протону	Хімічний зсув, м.ч.
$\text{H}-\text{C}-\text{R}$	0,9-1,8	$\text{H}-\text{C}-\text{NR}$	2,2-2,9
$\text{H}-\text{C}-\text{C}=\text{C}$	1,6-2,6	$\text{H}-\text{C}-\text{Cl}$	3,1-4,1
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{C}- \\ \quad \quad \parallel \\ \quad \quad \text{O} \end{array}$	2,1-2,5	$\text{H}-\text{C}-\text{Br}$	2,7-4,1
$\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-$	2,5	$\text{H}-\text{C}-\text{O}$	3,3-3,7
$\text{H}-\text{C}-\text{Ar}$	2,3-2,8	$\text{H}-\text{NR}$	1-3*
$\text{H}-\text{C}=\text{C}-$	4,5-6,5	$\text{H}-\text{OR}$	0,5-5*
$\text{H}-\text{Ar}$	6,5-8,5	$\text{H}-\text{C}-\text{Cl}$	6-8*
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}- \\ \quad \quad \parallel \\ \quad \quad \text{O} \end{array}$	9-10	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{O}-\text{C}- \\ \quad \quad \parallel \\ \quad \quad \text{O} \end{array}$	10-13*

* Хімічні зсуви протонів, з'єднаних з азотом і киснем, залежать від температури та концентрації розчину.

Часто в спектрах ПМР сигнал від еквівалентних протонів проявляється не окремим піком (синглет), а їх набором. Сигнал може розщеплюватися на два (дублет), три (триплет), чотири (квартет) і більше число піків. Таке розщеплення сигналів обумовлено взаємодією нееквівалентних ядер водню (протонів). Ця спіно-спінова взаємодія здійснюється через електрони хімічних зв'язків, що з'єднують ядра атомів.

Число піків, на які розщеплюється сигнал від еквівалентних протонів, називають **мультиплетністю**. У простих випадках використовують правило: мультиплетність сигналу від еквівалентних протонів дорівнює $n + 1$, де n – число протонів, які знаходяться при сусідніх атомах вуглецю. Такі протони виду $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$, розділені трьома зв'язками, називають **віцинальними** протонами. За мультиплетністю сигналу можна судити про кількість протонів, віцинальних по відношенню до протонів, відповідальних за конкретний сигнал.

Приклад 1. 1,1,2-Трихлоретан $\text{Cl}_2\text{CH}-\text{CH}_2\text{Cl}$ містить два типи протонів – метиленові (у групі $-\text{CH}_2\text{Cl}$) і метиновий (у групі $-\text{CHCl}_2$), які характеризуються в спектрі двома сигналами: $\delta(\text{CH}_2\text{Cl})=3,5$ м.ч. і $\delta(\text{CHCl}_2)=5,5$ м.ч., як показано на рис. 24. Сигнал від $-\text{CH}_2\text{Cl}$ має два піки (дублет), сигнал від $-\text{CHCl}_2$ – три піки (триплет). Скористаємося правилом: мультиплетність сигналу дорівнює $n + 1$, де n – число віцинальних протонів.

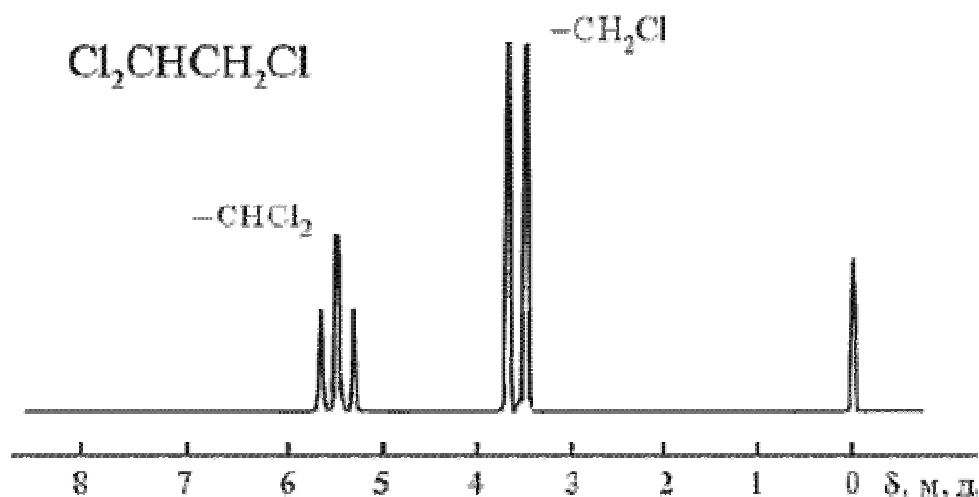


Рис. 24. Спектр ПМР 1,1,2-трихлоретану

Приклад 2. На рис. 25 спектр ПМР 1,1-дихлоретану. Метильні протони в спектрі характеризуються дублетом з центром при $\delta=2,0$ м.ч., метиновий протон дає кватрет з центром при $\delta=5,9$ м.ч.

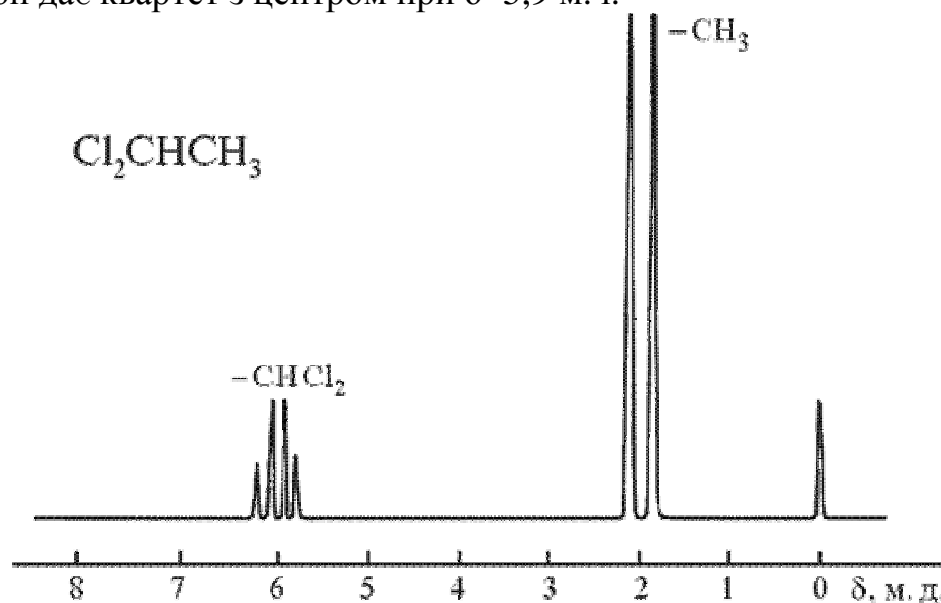


Рис. 25. Спектр ПМР 1,1-дихлоретану

Важливою особливістю спін-спінової взаємодії є те, що протони з однаковим хімічним зсувом (еквівалентні протони) не розщеплюють сигнали один від одного, що підтверджується наступними прикладами.

Приклад 3. У 1,2-дихлоретану $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ усі протони еквівалентні, в спектрі буде один сигнал у вигляді синглету. Значення хімічного зсуву $\delta(\text{CH}_2\text{Cl})=3,69$ м.ч. (див. рис. 25).

Для полегшення інтерпретації спектрів ЯМР доцільно побудувати теоретичні спектри, використовуючи сучасний хімічний софт (наприклад ChemDraw, ISIS та ін.).

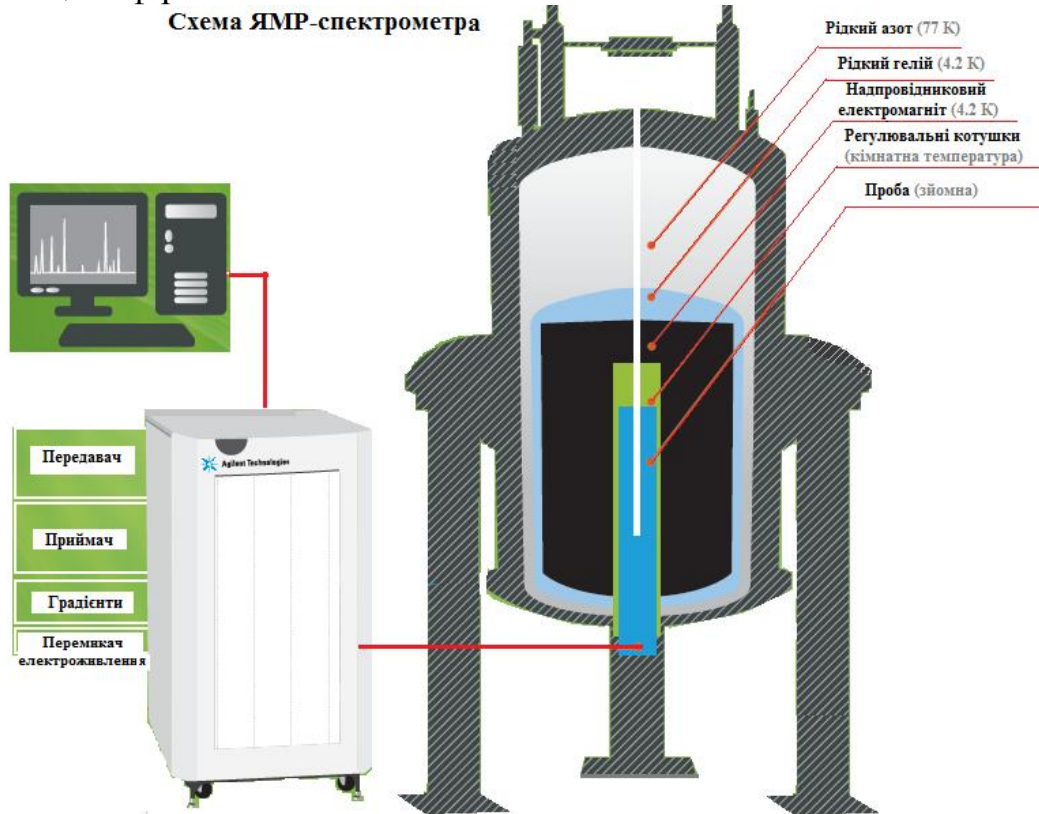
ЯМР-спектрометри

Для реєстрації спектрів ЯМР можуть бути використані 2 принципово різні типи спектрометрів:

1. Спектрометри з безперервною розгорткою радіочастоти або магнітного поля.

2. Імпульсні спектрометри ЯМР із Фур'є-перетворенням (їх іноді називають просто Фур'є-спектрометрами ЯМР).

На малюнку зображено 400 МГц імпульсний ЯМР-спектрометр 400 MR виробництва фірми AGILENT.



? Практичні завдання:

Завдання 1. Ідентифікуйте наступні спирти за їхніми спектрами ПМР:

а) Сполука А – $C_{14}H_{14}O$ (рис. 26) і сполука Б – $C_9H_{11}BrO$ (рис. 27).

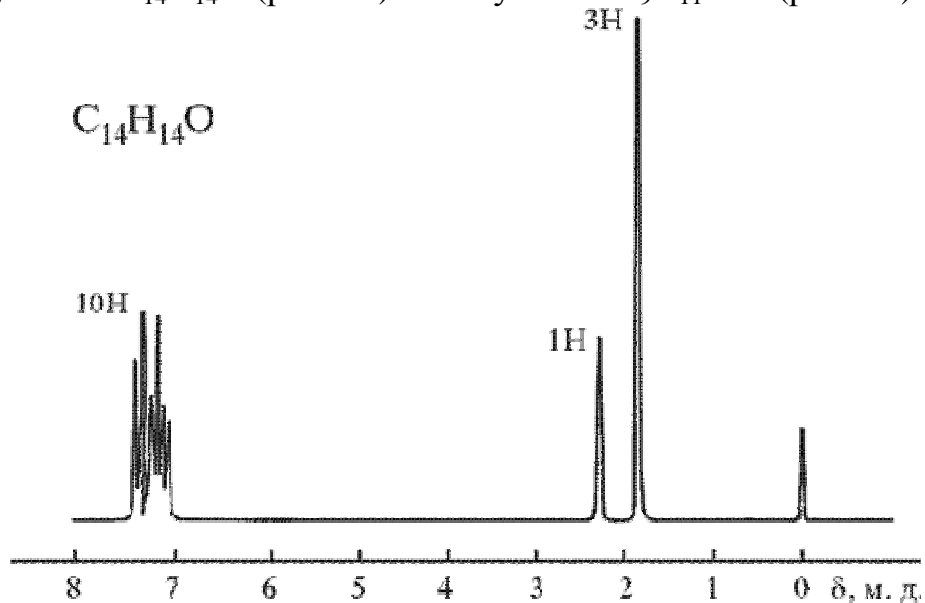


Рис. 26. Спектр ПМР сполуки А ($C_{14}H_{14}O$)

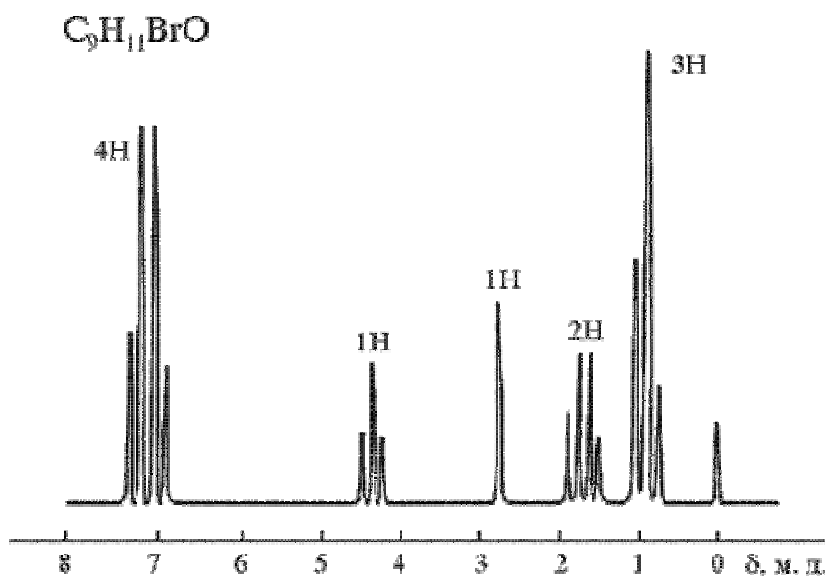


Рис. 27. Спектр ПМР сполуки Б ($C_9H_{11}BrO$)

Завдання 2. Діол $C_8H_{18}O_2$ не реагує з періодною кислотою, його спектр ПМР містить три синглети при (м.ч.) $\delta=1,2$ (12 Н), $\delta=1,6$ (4 Н) і $\delta=2,0$ (2 Н). Яку будову має діол?

Завдання 3. Дайте відповідь на наступні питання, що стосуються спектрів ПМР ізомерних ефірів з молекулярною формулою $C_5H_{12}O$.

а) Який з ефірів містить тільки синглети в спектрі ПМР?

б) Серед інших сигналів заданий ефір має систему взаємодії дублет-гептет. Назвіть ефір.

в) Поряд з іншими сигналами в спектрі ПМР цього ефіру є два сигнали у відносно слабкому полі, причому один – синглет, інший – дублет. Яка будова цього ефіру?

г) Особливістю спектра є два сигнали у відносно слабкому полі: один – триплет, інший – кватет. Назвіть ефір.

Завдання 4. Спектр ПМР сполуки $C_{10}H_{13}BrO$ показаний на рис. 28. Ця сполука при нагріванні з HBr утворює два продукти реакції: бензилбромід $C_6H_5CH_2Br$ і дибромпропан $C_3H_6Br_2$. Визначте вихідну речовину.

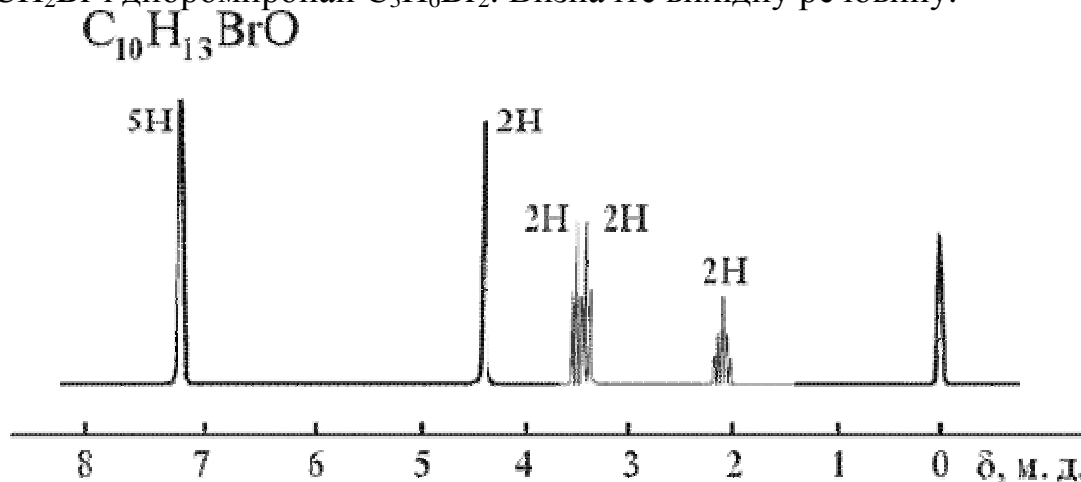


Рис. 28. Спектр ПМР сполуки $C_{10}H_{13}BrO$. (Цифрами при піках зліва направо вказана інтегральна інтенсивність сигналів, що дорівнює 5: 2: 2: 2: 2. Сигнали при $\delta = 3,5$ м.ч. і $\delta = 3,6$ м.ч. представляють два триплети).

Завдання 5. Спектри ПМР кислот мурашиної НСООН , малеїнової цис- $\text{НООССН} = \text{СНСООН}$ і малонової $\text{НООССН}_2\text{СООН}$ цікаві тим, що в кожному містяться два синглети однакової інтенсивності. Позначимо спектри цих сполук наступним чином:

спектр А: $\delta = 3,2$ і $\delta = 12,1$ м.ч. ;

спектр Б: $\delta = 6,3$ і $\delta = 12,4$ м.ч. ;

спектр В: $\delta = 8,0$ і $\delta = 11,4$ м.ч.

Визначте, який спектр відповідає кожній кислоті.

Контрольні запитання:

1. До яких методів відноситься мас-спектрометрія?
2. На чому засновані якісний та кількісний мас-спектральний аналіз сумішей?
3. Яка чутливість мас-спектрометрії?
4. Назвіть способи іонізації, за якими класифікують мас-спектрометри.
5. З якими іншими методами можна поєднати мас-спектрометрію?
6. Що таке хромато-мас-спектрометрія?
7. Який найбільш зручний газ-носіє для методу і які функції газу-носія?
8. У яких галузях використовується хромато-мас-спектрометрія?
9. У чому полягає явище ядерного магнітного резонансу?
10. Дайте визначення поняття «хімічний зсув». Які фактори впливають на величину хімічного зсуву? Чим характеризують положення сигналу в спектрах ЯМР?

Тестові завдання:

1. *Мас-спектроскопія – це*

А) метод дослідження речовини шляхом визначення мас-іонів цієї речовини і їхньої кількості

Б) фізико-хімічний метод дослідження розчинів і твердих тіл, заснований на випромінюванні спектрів поглинання

В) метод, заснований на вимірюванні поглинання монохроматичного випромінювання атомами елемента, який визначається в газовій фазі після атомізації в полум'ї або графітовій печі з використанням монохроматичного джерела світла

Г) метод, заснований на вимірюванні розсіювання світла часточками світла дисперсної системи.

2. *Що називається роздільною силою?*

А) залежність величини іонного струму I від маси m

Б) мінімальний вміст речовини, що може бути виявлений за допомогою мас-спектрометрії в суміші речовин

В) величина, що показує, яку кількість речовини потрібно ввести в мас-спектрометр для того, щоб її можна було із високою мірою достовірності виявити

Г) відношення маси іона до ширини піка.

3. Чутливість у мас-спектрометрії – це... .

А) величина, що показує відношення абсолютної похибки до дійсного значення вимірюваної величини

Б) величина, що приймається за дійсне значення

В) величина, що показує, яку кількість речовини потрібно ввести в мас-спектрометр для того, щоб її можна було із високою мірою достовірності виявити

Г) це межа, яка визначає значущі та незначущі відмінності.

4. Яка межа виявлення чутливості мас-спектрометрії?

А) 10^{-6} ; 10^{-8} ; 10^{-15} ; 10^{-12} .

5. Для чого видаляють розчинник?

А) для зменшення кількості рідини

Б) для більш чіткої відповіді

В) для збереження вакууму.

6. Хімічний зсув вимірюється в

А) см

Б) кг

В) м.д.

7. Яке з наведених тверджень правильне?

А) метод ЯМР заснований на магнітних властивостях атомних ядер

Б) метод ЯМР заснований на електричних властивостях атомних ядер.

8. Метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР) заснований на

А) часі релаксації ядерного магнітного резонансу, розподілі швидкостей потоку рідини, дифузії молекул і на біохімічних процесах обміну речовин у живих тканинах.

Б) взаємодії зовнішнього магнітного поля з ядрами, що мають магнітний момент, тобто для ядер з ненульовим спіном.

В) хімічному зсуві щодо еталонного сигналу.

9. На чому заснований метод так званої імпульсної спектроскопії на сучасних приладах ЯМР?

А) заснований на Фур'є-перетвореннях отриманого сигналу

Б) заснований на квантово-хімічних методах розрахунку констант екранування.

10. Що дозволяє визначити відмінність сигналу ЯМР досліджуваної речовини від сигналу стандартної речовини?

А) атомний внесок в екранування, залежний від замісника, що стоїть близько резонуючого атома

Б) хімічний зсув, який обумовлений хімічною будовою досліджуваної речовини.

Література: 2, 3, 5, 6, 8, 10 Інформаційні ресурси: 1-5

ТЕМА 8. СТРАТЕГІЯ КОМБІНОВАНОГО ВИКОРИСТАННЯ ФІЗИЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ БУДОВИ МОЛЕКУЛ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії комбінованого використання фізичних методів для визначення будови молекул, навчитися коректно обирати фізичні методи для вирішення конкретних задач з ідентифікації будови молекул на практиці.

План

1. Зв'язок складу та будови органічних сполук з фізичними властивостями.
2. Ідентифікація органічних сполук.

! **Основні терміни та поняття:** комбіноване використання ФМД, ідентифікація будови молекул.

1. Зв'язок складу та будови органічних сполук з фізичними властивостями

..

Вуглеводні складу C_1-C_4 – гази; C_5-C_{13} – рідини; C_{14} та вище – тверді речовини, парафіни. При додаванні до вуглецевого ланцюга метиленової різниці CH_2 температура кипіння підвищується на $25-30$ °С. Найбільш високі температури кипіння та щільність спостерігається в ряду ізомерів, які мають нормальну будову вуглецевого радикалу. Це пояснюється більш щільним “пакуванням” молекул. Із розгалуженою будовою нормальні вуглеводні кристалізуються з сечовиною зі спиртів та ацетону. Починаючи з пентену та бутилу ненасичені вуглеводні – рідини. Введення в вуглеводневі ланцюги замісників, які містять гетероатоми, значно змінює фізичні властивості речовин.

Температури кипіння органічних речовин різної будови:

Формула	Назва речовини	t кип.,
C_2H_6	етан	-88
$C_2H_5-O-CH_3$	диметиловий ефір	-24
$H_3C-CH_2-O-CH_2-CH_2$	диетиловий ефір	35
CH_3COH	ацетальдегід	21
C_2H_5OH	етанол	79
CH_3-COOH	оцтова кислота	118
$C_2H_5NH_2$	етиламін	17
C_2H_5S	етантіол	35
H_3C-CN	ацетонітрил	-

Міжмолекулярну взаємодію посилює підвищення полярності зв'язків і молекул. Особливо це спостерігається під час утворення міжмолекулярних водневих зв'язків, введенні карбоксильних, гідроксильних і аміногруп.

Дипольні моменти деяких органічних сполук:

диетиловий естер: $m = 4.2 \cdot 10^{-30} \text{ Кл} \cdot \text{м}$

оцтовий альдегід: $m = 5.6 \cdot 10^{-30} \text{ Кл} \cdot \text{м}$

етанол: $m = 8.9 \cdot 10^{-30} \text{ Кл} \cdot \text{м}$

Меркаптани – малоасоційовані сполуки, киплять при більш низьких температурах. Висока полярність та можливість утворювати водневі зв'язки обумовлені доброю розчинністю речовин у більшості розчинників. Особливо це стосується тих сполук, які можуть утворювати водневі зв'язки: вода, спирти, кислоти.

Розгалуження карбонового скелету в ряду ізомерних похідних вуглеводнів знижує температуру кипіння.

Температура кипіння спиртів різної будови:

Формула	Назва спирту	$t_{\text{кип}}, ^\circ\text{C}$
$\text{HOCH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2$	первинний бутиловий	117
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_3$	вторинний бутиловий	100
$(\text{H}_3\text{C})_3\text{C} - \text{CH}_2 - \text{OH}$	третинний бутиловий	83
$\text{CH}_2\text{OH} - \text{CH}_2\text{OH}$	етиленгліколь	197
$\text{CH}_2\text{OH} - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$	гліцерин	290

Розгалуження алкільного радикалу молекули спирту екранує гідроксильну групу та зменшує ступінь можливості утворення водневих зв'язків.

Нижчі представники спиртів, кислот, альдегідів, кетонів, амінів, розчинні у воді завдяки своїм функціональним групам. Зі збільшенням алкільного радикалу розчинність зменшується.

Високомолекулярні похідні близькі за своїми властивостями до відповідних алканів: нерозчинні у воді та багатьох органічних розчинниках. Уведення в алкани та алкени галогенів призводить до різкого підвищення щільності та температур кипіння.

Хлороформ і тетрахлоркарбон – важкі рідини, їх щільність – 1,498 та 1,595 відповідно. Температура кипіння галогеналканів підвищується зі збільшенням карбонового ланцюга та накопичення в молекулі атомів галогену. Наприклад, бромформ важчий від хлороформу.

2. Ідентифікація органічних сполук

Найчастіше дана речовина вже відома. Якщо синтезуємо сполуку, її треба ідентифікувати за трьома параметрами:

- 1) температурою кипіння
- 2) коефіцієнтом заломлення
- 3) щільністю (ρ або D).

У деяких випадках, особливо стосовно нових сполук, визначають молекулярну масу. Для твердої речовини достатньо ідентифікувати через $t_{пл}^0$ яка не змінюється після повторної кристалізації, при відсутності депресії (змінюється $t_{пл}^0$), проби змішування синтезованої речовини з уже відомими продуктами.

Для встановлення будови також можна використовувати хід самого синтезу, зустрічний синтез (незалежний) та хімічні перетворення отриманої речовини.

Перед тим, як приступати до ідентифікації хімічної речовини, необхідно її ретельно почистити. Для рідинних продуктів використовують перегонку (звичайний тиск або вакуум). Використання вакууму дозволяє знизити $t^{°кун}$ висококиплячої речовини ($t^{°кун} \approx 100^\circ C$), щоб зменшити ступінь розкладання. Тверді речовини очищують під час кристалізації екстракцією або воронкою.

У лабораторній практиці для розділення й очищення речовин часто використовують колоночну хроматографію, газорідинну, рідинну хроматографію на папері або на пластині.

Молекулярну масу визначають за методом мас-спектрометрії: здійснюють елементарний аналіз речовин на основі даних про масову частку карбону, кисню, сірки, галогену та виводять брутто-формулу. З метою визначення будови речовин проводять функціональний аналіз. Існує багато різноманітних хімічних методів якісного та кількісного аналізу різних функціональних груп: гідроксильної, карбоксильної, епоксидної, аміної, кратних зв'язків. На сьогоднішній день для встановлення кількісного складу та структури речовини (це стосується тонких стереохімічних особливостей) найбільш важливими є спектроскопічні методи: ІЧ- та УФ-спектроскопії, спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР), спектроскопія електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), мас-спектроскопія. Однак всі методи мають обмеження. Результати, отримані кожним з методів, доповнюють і уточнюють один одного.

Оптична спектроскопія. ІЧ-спектроскопія використовується в діапазоні $500\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. ІЧ-спектроскопію використовують для ідентифікації, встановлення будови та кількісного визначення речовини, оскільки ІЧ-спектри мають багато смуг поглинання, які характеризують кожний тип зв'язку або функціональну групу. Метод ґрунтується на вивченні коливальних та обертальних спектрів поглинання в ІЧ-ділянці спектра. Виникнення спектру поглинання в ІЧ-ділянці $400\text{--}600\text{ см}^{-1}$ ($\lambda=2,5\text{--}167\text{ мкм}$) пов'язане з коливаннями атомів у молекулі, тобто ІЧ-спектри зумовлені переходом між двома

коливальними рівнями молекул. У спектрі виявляють коливання, що супроводжуються зміною моменту молекули.

Експериментальні дослідження значної кількості речовин, молекули яких містять однакові хімічні групи, показують, що вони поглинають ІЧ-промені у вузькому інтервалі частот (називається характеристичними або груповими: ОН, NH, C=O, C=C, CH, CH₂, CH₃). Зокрема, характеристичними є коливання груп, що містять легкий атом гідрогену або кратні зв'язки.

Групи, що складаються з атомів, близьких за масою або містять хімічні зв'язки, що мають однакові силові коефіцієнти, не містять характерних смуг поглинання в ІЧ-ділянці спектра.

Коливання, за яких змінюється довжина зв'язків, є валентними коливаннями і позначаються $\nu_{(c-e)}$. Якщо під дією ІЧ-випромінювання змінюються кути між зв'язками, такі коливання називають деформуючими і позначають літерою δ . Кожна хімічна сполука має свій характерний спектр поглинання.

Характеристичні частоти поглинання

<i>Функціональна група</i>	<i>Клас сполуки</i>	<i>ν, см⁻¹</i>	<i>Інтенсивність</i>
<i>C – H</i>	Алкани	2850-2960	сильна
<i>C – C</i>		600-1500	слабка
<i>C = C</i>	Алкени	1620-1680	змінна
<i>C ≡ C</i>	Алкіни	2100-2260	змінна
<i>C – O</i>	Оксирани, ефіри, спирти	2000-1300	сильна
<i>C = O</i>	Альдегіди, кислоти	1705-1740 1700-1750	сильна сильна
<i>OH</i>	Сирти, феноли, кислоти	3590-3650 асоційовані 3200-3400 3500-3000 асоційовані	змінна вузька сильна широка змінна широка
<i>NH₂</i>	Аміни	3400-350	сильна, подвійний пік
<i>CONH₂</i>	Аміди, N-заміщені аміди, вторинні	3300-3400 3280-3500	сильна, одинарний пік
<i>C – Hal</i>	Алкілхлориди Алкілброміди	550-850 500	середня середня
<i>C – S</i>	Меркаптани	650-750	
<i>S – H</i>	Меркапто	2550+50	

Частоти базових коливань органічних молекул звичайно припадають на ділянку $1400\text{-}1700\text{ см}^{-1}$, і часто важко приписати окремі частоти якому-небудь із можливих для молекул коливань, хоча сукупність смуг досить однозначно вказує на приналежність до певної молекулярної структури. У таких випадках смуги називають «відбитками пальців» молекули в спектрі.

ІЧ-спектри дозволяють визначити присутність або відсутність у молекулі тих або інших груп і функціональних угруповань, про особливості їх розташування у просторі, а також, у деяких випадках, про екзо- та ендомолекулярну взаємодію.

Додатковим методом є спектроскопія комбінаційного розсіювання (КР). КР-спектри дають можливість ідентифікувати сполуки за інформацією про симетричні валентні коливання в симетричній молекулі (етилен, циклогексан).

Спектроскопія ЯМР заснована на можливості деяких ядер атомів, які мають спіновий магнітний елемент, поглинати кванти випромінювання радіохвильового діапазону. Такі властивості мають ядра атомів з масою, яка виражена непарним числом: ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$, $^{17}_8\text{O}$, $^{31}_{15}\text{P}$., ядра з непарними порядковими номерами і масою, що виражена парним числом: ^2_1H , $^{14}_7\text{N}$.

Найбільш широке застосування отримала спектроскопія ПМР (^1H , часто використовують ^{13}C).

Мас-спектрометрія.

У газовому стані молекула починає атакуватися пучком електронів середніх енергій (30 еВ). Атака може бути (70 еВ) з боку швидколетючих електронів. Молекула стає позитивно зарядженою – M^+ (молекулярний йон).

При високому бомбардуванні молекула розкладається. Це єдиний метод, що призводить до деструкції молекул.

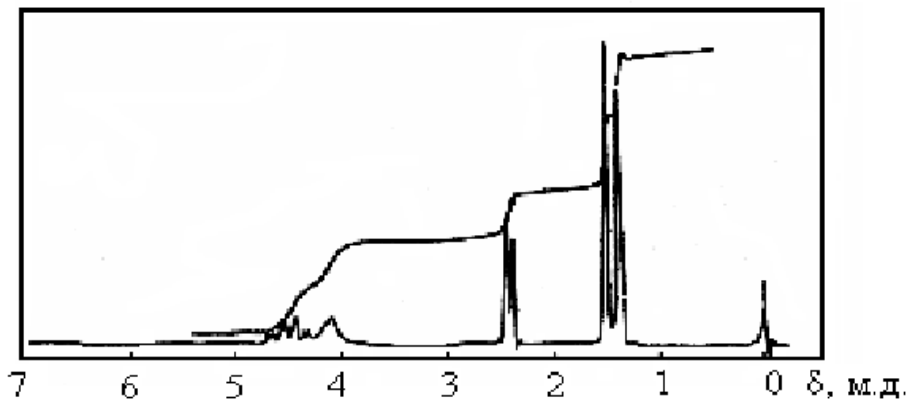
Спільне використання методів УФ-, ІЧ-, КР-спектроскопії, спектроскопії ЯМР та мас-спектрометрії у більшості випадків дозволяє вирішити багато дослідницьких завдань. Безсумнівно, що більш інформативними є методи, які з'явилися в результаті глибокого взаємного проникнення. Такі методи називаються комбінованими або гібридними.

До гібридних методів можна віднести, наприклад, метод хромато-мас-спектрометрії. У результаті поєднання хроматографічного методу та методу мас-спектрометрії вдалося значно покращити метрологічні характеристики методу мас-спектрометрії, розширити об'єм отриманої інформації, перелік та складність об'єктів, що вивчаються.

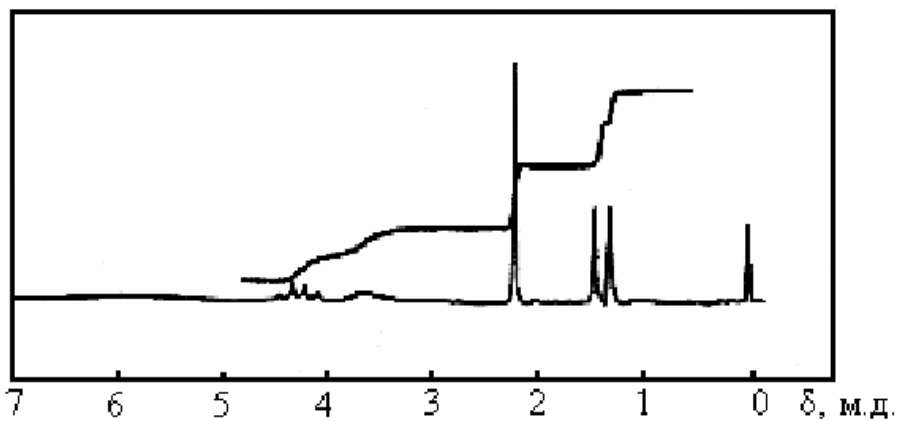
Незалежно від того, який чи які методи використовуються для дослідження, важливою є обробка первинної інформації та стадія пробопідготовки.

? Практичні завдання:

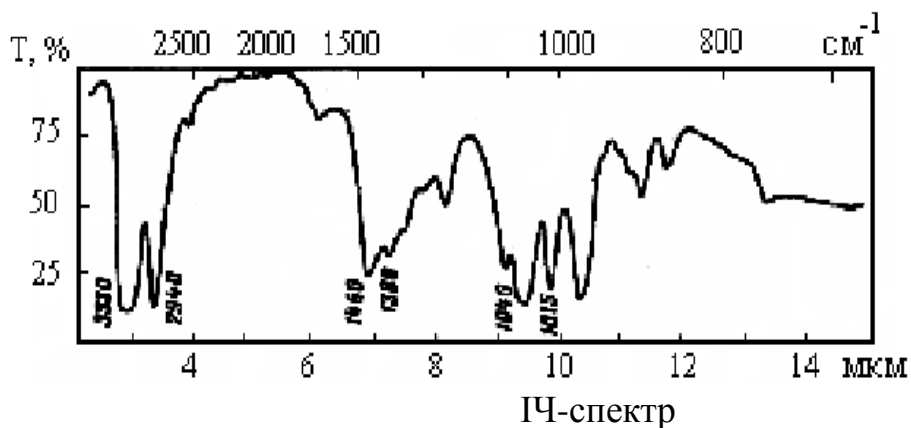
1. Визначте структуру сполуки $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$ за наступними даними: ПМР-спектр наведено на малюнку, в ІЧ-спектрі розчину в CCl_4 спостерігають полоси поглинання, см^{-1} : 3610, 3300, 2140.

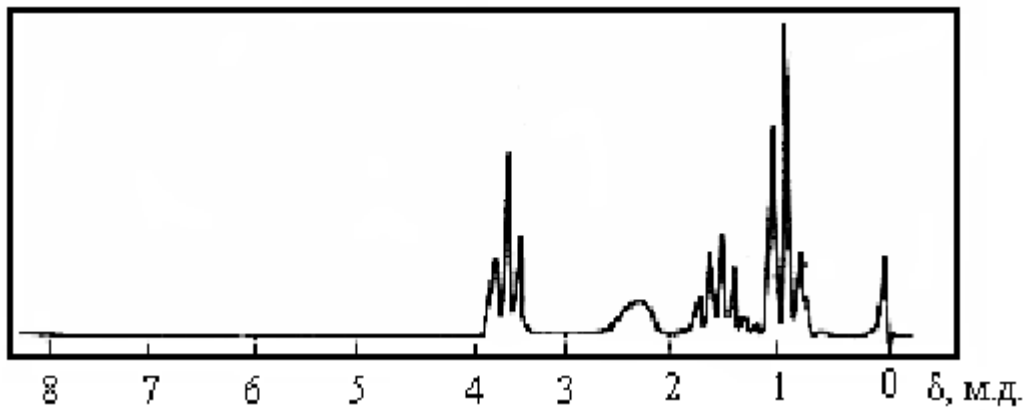


2. Сполука $C_4H_8O_2$ в ІЧ-спектрі має широку полосу поглинання середньої інтенсивності при 3400 см^{-1} , інтенсивну полосу поглинання при 1712 см^{-1} . В УФ-спектрі в розчині етанолу спостерігається поглинання при $\lambda_{\text{макс}}=282\text{ нм}$ ($\epsilon=18$). ПМР-спектр наведено на рисунку нижче. Визначте структуру сполуки.



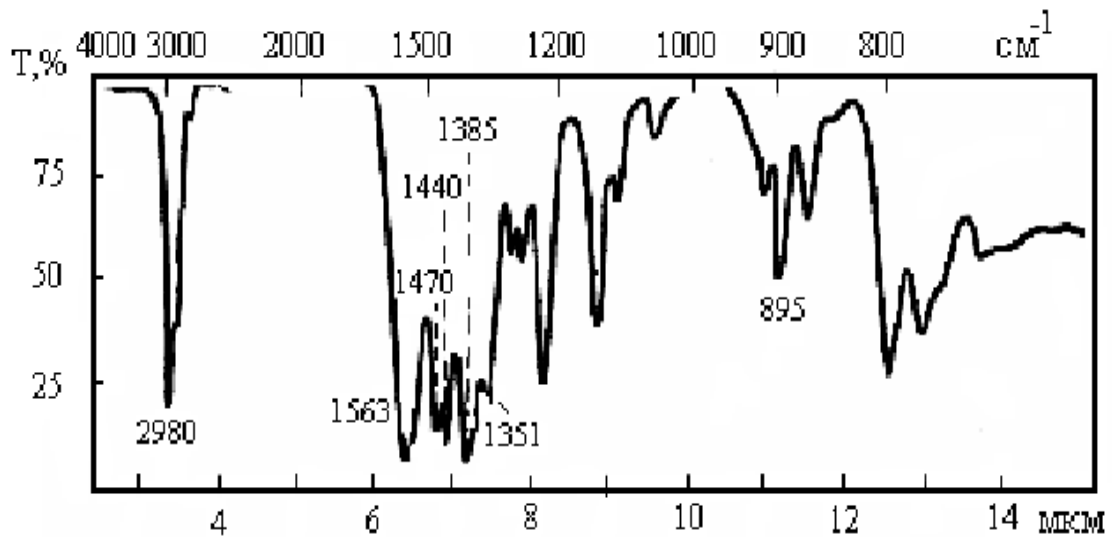
3. Сполука C_3H_8O – прозора в УФ-спектрі. Мас-спектр сполуки містить наступні сигнали, $m/z(I)$: 27(14), 28(11), 29(17), 31(100), 39(6), 41(10), 42(13), 43(4), 45(5), 58(5), 59(15), 60(11). ІЧ- та ПМР-спектри сполуки наведені нижче. Визначте структуру сполуки.



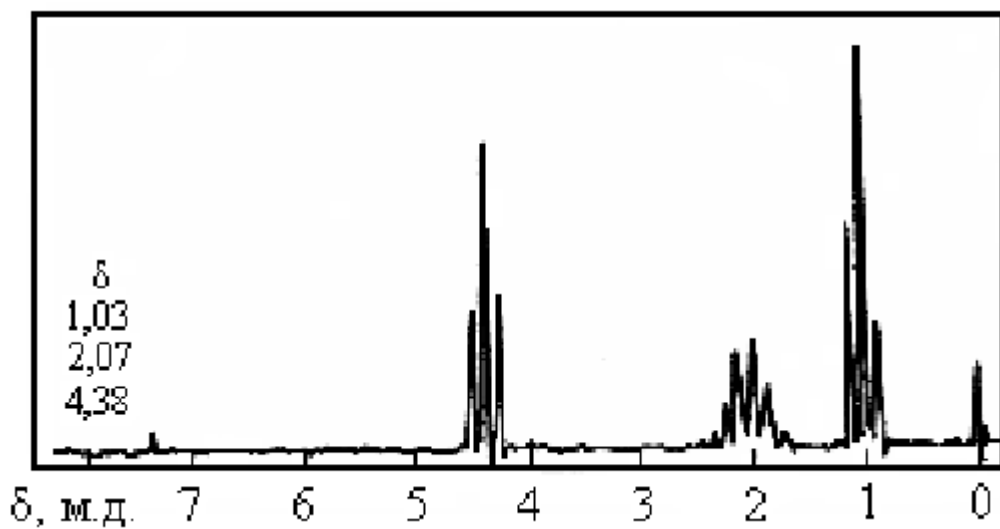


ПМР-спектр

4. Сполука $C_3H_7O_2N$ у розчині петролейного ефіру має малоінтенсивну смугу поглинання з максимумом 280 нм ($\lg \epsilon = 1.34$). ІЧ- та ПМР-спектри сполуки наведені нижче. Установіть структурну формулу сполуки.



ІЧ-спектр



ПМР-спектр

Контрольні запитання:

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Васильев В. П. Аналитическая химия: лабораторный практикум / В. П. Васильев, Р. П. Морозова, Л. А. Кочергина. – 3-е изд., стер. – М. : Дрофа, 2006. – 414 с.
2. Луганська О. В., Омелянчик Л. О. Навчальний посібник з фізико-хімічних методів аналізу. – Запоріжжя: ЗНУ, 2008. – 238 с.
3. Луцик В. И. Физико-химические методы анализа: учебн. пос. / В. И. Луцик, А. Е. Соболев, Ю. В. Чурсанов. – 1-е изд. – Тверь: ТГТУ, 2008. – 208 с.
4. Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз: підручник для студентів вищих навчальних закладів. – Черкаси: Вид. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 284 с.
5. Отто М. Современные методы аналитической химии. – М.: Техносфера, 2008. – 543 с.
6. Пентин Ю. А., Вилков Л. В. Физические методы исследования в химии. – М.: Мир, ООО «Издательство АСТ», 2003. – 683 с.
7. Рудаков О. Б. Востров И. А. Спутник хроматографиста. – Воронеж: Водолей, 2004. – 528 с.
8. Смагин В. П. Физические методы исследования в химии [Текст]: учебное пособие / В. П. Смагин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Барнаул: Изд-во Алт. Ун-та, 2014. – 342 с.
9. Столяров Б. В. Практическая газовая и жидкостная хроматография: учебное пособие / Б. В. Столяров, И. М. Савинов, А. Г. Витенберг и др. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998. – 612 с.
10. Торосян В. Ф. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа. Практическое руководство: учебно-методическое пособие / В. Ф. Торосян – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. – 195 с.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

1. <http://medulka.ru/himiya-biohimiya/books-page>
2. <http://lib.e-science.ru/book>
3. <http://www.medliter.ru>
4. Новая электронная библиотека: <http://www.newlibrary.ru>
5. Дом электронных книг: <http://www.dom-eknig.ru>

ГЛОСАРІЙ

Абсорбент – твердий або рідкий сорбент, який розчиняє у собі гази, пари або компоненти рідких сумішей.

Адсорбент – твердий сорбент, який концентрує на своїй поверхні гази, пари або розчинені речовини.

Детектор – пристрій для реєстрації концентрації компонентів суміші на виході з колонки.

Діод [від грец. *dyn(amis)* – сила і (електр)од], – електрод у фотоелектропомножувачі, що володіє високим коефіцієнтом вторинної електронної емісії.

Елюат – вихідний з колонки потік рухомої фази з компонентами поділюваної суміші.

Елюент – рідина, флюїд або газ, що використовуються як рухома фаза.

Інфрачервона спектроскопія (ІЧ-спектроскопія) – розділ молекулярної оптичної спектроскопії, який вивчає спектри поглинання та відбиття.

Іон – заряджена частинка речовини.

Коливальні спектри – спектри обумовлені квантовими переходами між коливальними рівнями енергії молекул.

Колонка – містить хроматографічний сорбент, виконує функцію розділення суміші на індивідуальні компоненти.

Мас-спектр – залежність інтенсивності іонного сигналу від m/z (графік або таблиця).

Мас-спектрометр – прилад для отримання мас-спектра.

Мас-спектрометрія – метод дослідження речовини за допомогою розділення іонів за відношенням маси до заряду (m/z).

Нерухома фаза – тверда фаза або рідина, зв'язана з інертним носієм, в адсорбційній хроматографії – сорбент.

Обертальні спектри – молекулярні спектри, обумовлені квантовими переходами між дискретними обертальними станами молекул.

Орбіталь (від лат. *orbitalis* – шлях, колія) – хвильова функція, що описує стан одного електрона в атомі, молекулі чи ін. квантовій системі.

Речовина – форма матерії, яка складається з ядер і електронів.

Сорбент – тверда речовина, рідина або їх суміші, здатні поглинати або утримувати гази, пари або розчинені речовини і використовуються в хроматографії в якості нерухомої фази.

Сорбіт – речовина, яка утримувалась сорбентом (у хроматографії – компонент поділюваної суміші).

Спектроскопія (від лат. *Spectrum* – образ, уявлення і грец. *skopeo* – дивлюся) – розділ фізики, що вивчає спектри електромагнітного випромінювання.

Ультрафіолетова спектроскопія (УФ-спектроскопія) – розділ оптичної спектроскопії, що включає одержання, дослідження і застосування спектрів випромінювання, поглинання та відображення в ультрафіолетовій ділянці, тобто в діапазоні довжин хвиль 10-400 нм (хвильових чисел $2,5 \cdot 10^4 - 10^6 \text{ см}^{-1}$).

Хроматограма – результат реєстрування залежності концентрації компонентів на виході з колонки від часу.

Хроматограф – прилад для проведення хроматографії.

Хроматографія – метод розділення сумішей речовин або частинок, заснований на відмінностях у швидкостях їх переміщення в системі незмішуваних і рухомих відносно один одного фаз.

ДОДАТКИ

Таблиця 1. Дані атомних рефракцій (за Ейзенлором)

Елемент	Атомна рефракція				$H_\gamma - H_\alpha$
	Для ліній натрію D	Для ліній водню			
		H_α	H_β	H_γ	
Вуглеводень (з простими зв'язками)	2,418	2,413	2,413	2,438	0,056
Водень	1,100	1,092	1,115	1,122	0,029
Кисень:					
у гідроксилі	1,525	1,522	1,531	1,541	0,015
в ефірах	1,643	1,639	1,649	1,662	0,019
у карбонільній групі	2,211	2,189	2,247	2,267	0,078
Азот:					
в аліфатичних амінах:					
первинних	2,322	2,309	2,368	2,397	0,086
вторинних	2,499	2,475	2,561	2,603	0,119
третинних	2,840	2,807	2,940	3,000	0,186
у нітрилах	3,070	3,054	3,108	3,129	0,065
в імідах ($-N = C <$	3,776	3,740	3,847	3,962	0,220
Хлор	5,967	5,933	6,043	6,101	0,168
Бром	8,865	8,803	8,999	9,152	0,340
Йод	13,900	13,757	14,224	14,521	0,775
Інкремент					
етиленового зв'язку	1,733	1,686	1,824	1,893	0,200
ацетиленового зв'язку	2,398	2,328	2,506	2,538	0,171

Таблиця 2. Значення Rf для деяких катіонів третьої та четвертої аналітичних груп (фільтр “жовта стрічка”, розчинник: ацетон : HCl = 7: 1 (2 моль/л)) Розділення речовин можливе, якщо $Rf(1) - Rf(2) \geq 0,1$

№	Катіон	Rf	№	Катіон	Rf
1	Ni (II)	0,13	7	Cd (II)	0,86
2	Al (III)	0,15	8	Zn (II)	0,94
3	Mn (II)	0,25	9	Bi (III)	1,00
4	Co (II)	0,54	10	Fe (III)	1,00
5	Pb (II)	0,70	11	Hg (II)	1,00
6	Cu (II)	0,77			

Таблиця 3. Маса та відносна поширеність ізотопів деяких елементів

<i>Ізотоп</i>	<i>Маса</i>	<i>Відносна поширеність, %</i>
¹ H	1,0078	100
² H	2,0141	0,015
¹⁰ B	10,0129	24,668
¹¹ B	11,0093	100
¹² C	12,0000	100
¹³ C	13,0034	1,12
¹⁴ N	14,0031	100
¹⁵ N	15,0001	0,366
¹⁶ O	15,9949	100
¹⁸ O	17,9992	0,240
²⁸ Si	27,9769	100
²⁹ Si	28,9765	5,110
³⁰ Si	29,9738	3,385
³² S	31,9721	100
³³ S	32,9715	0,789
³⁴ S	33,9679	4,433
³⁵ Cl	34,9689	100
³⁷ Cl	36,9659	32,399
⁷⁹ Br	78,9183	100
⁸¹ Br	80,9163	97,940

Таблиця 4. Важливі осколочні іони з характерними значеннями мас

<i>Масове число</i>	<i>Фрагмент</i>	<i>Можлива структура</i>
29	CHO ⁺ C ₂ H ₅ ⁺	О-вмісні алкільні групи
30	NO ⁺ CH ₂ =NH ₂ ⁺	нітросполуки аміни
31	CH ₂ =OH ⁺	алканоли, прості ефіри
33	HS ⁺	тіоли
36/38	HCl ⁺	Cl-вмісні
39	C ₃ H ₃ ⁺	бензоїдні, гетероциклічні
43	C ₃ H ₇ ⁺ CH ₃ CO ⁺	алкільні групи ацетильні групи
44	CO ₂ ⁺ C ₂ H ₆ N ⁺	(продукт розпаду проби) аміни
45	CH ₃ -CH=OH ⁺ CH ₃ -O-CH ₂ ⁺	алканоли метилові прості ефіри

	COOH ⁺ CHS ⁺	карбонові кислоти тіоли, тіоефіри
46	CH ₂ S ⁺	тіоли, тіоефіри
47	CH ₂ =SH ⁺	тіоли, тіоефіри
51	C ₄ H ₃ ⁺	ароматичні сполуки
55	C ₄ H ₇ ⁺ CH ₂ =CH-CO ⁺	алкени, циклоалкени циклоалканони
57	C ₄ H ₉ ⁺ CH ₃ -CH ₂ -CO ⁺ CH ₂ =CH-CH=OH ⁺	алкільні групи етилкетони циклоалканолі
58	CH ₂ =C(OH)-CH ₃ ⁺ (CH ₃) ₂ N=CH ₂ ⁺	алканолі аміни
59	CH ₃ -C(CH ₃)=OH ⁺	алканолі, прості ефіри
60	CH ₂ =C(OH) ₂ ⁺ CH ₂ -O- NO ⁺	карбонові кислоти, нітри
61	C ₂ H ₅ S ⁺	тіоли
65	C ₆ H ₅ ⁺	бензильні групи
69	C ₅ H ₉ ⁺	алкени, циклоалкени
71	C ₅ H ₁₁ ⁺ C ₃ H ₇ CO ⁺	алкільні групи, пропілкетони, ефіри масляної кислоти
72	C ₃ H ₇ -CH= NH ₂ ⁺	аміни
73	C ₄ H ₉ O ⁺ (CH ₃) ₃ SI ⁺	карбонові кислоти, прості ефіри, алканолі триметилсилільні групи
74	CH ₂ =C(OH)OCH ₃ ⁺	метиліві складні ефіри
77	C ₆ H ₅ ⁺	ароматичні сполуки
79/81	Br ⁺	Br-вмісні
80	C ₅ H ₆ N ⁺	похідні піролу
81	C ₅ H ₅ O ⁺	похідні фурану
85	C ₆ H ₁₃ ⁺ C ₅ H ₉ O ⁺	алкільні групи, похідні тетрагідрофурану
86	C ₄ H ₉ CH= NH ₂ ⁺	аміни
89	C ₇ H ₅ ⁺	гетероциклічні сполуки
91	C ₇ H ₇ ⁺	бензильні групи
92	C ₆ H ₆ N ⁺	алкілпіридини
91/93	C ₄ H ₈ Cl ⁺	алкілхлориди
94	C ₆ H ₆ O	ефіри фенолу
97	C ₆ H ₆ S ⁺	алкілтіофени
99	C ₇ H ₁₅ ⁺ C ₅ H ₈ O ₂ ⁺	алкільні групи, кеталі
105	C ₈ H ₉ ⁺ C ₆ H ₅ CO ⁺	алкілбензоли бензоїльні групи
121	C ₈ H ₉ O ⁺	алкілфеноли

Таблиця 5. Найважливіші осколочні іони з характерними значеннями різниці мас

$(M-X)^{+*}$, $(M-X)^{+*}$	X, X*	Можлива структура
M-14	CH ₂	гомологи
M-16	O NH ₂	нітросполуки, сульфоксиди аміди
M-17	OH NH ₃	O-вмісні, аміногрупи
M-18	H ₂ O	спирти, кетони, альдегіди
M-19	F	F-вмісні
M-20	HF	F-вмісні
M-26	C ₂ H ₂	ароматичні сполуки
M-27	HCN	N-гетероцикли, нітрили
M-28	C ₂ H ₄ CO	O-гетероцикли, феноли хінони, арилкетони
M-29	CHO C ₂ H ₅	ароматичні альдегіди, феноли алкани, циклоалкани
M-30	C ₂ H ₆ NO CH ₂ O	алкільні групи нітроароматичні сполуки метоксиарени
M-31	OCH ₃	метилкові складні ефіри
M-32	S	S-вмісні
M-33	H S	S-вмісні
M-34	H ₂ S	тіоли
M-36	HCi	CI-вмісні
M-41	C ₃ H ₃	пропилові складні ефіри
M-42	CH ₂ CO C ₃ H ₆	ацетоксиарени пропільні групи
M-43	C ₃ H ₇ CH ₃ O	алільні групи метилкетони
M-44	CO ₂	складні ефіри, ангідриди
M-45	COOH	карбонові кислоти
M-46	NO ₂	нітроароматичні сполуки
M-47	H NO ₂	нітроалкани
M-57	C ₄ H ₉ C ₂ H ₅ CO	бутилові складні ефіри етилкетони
M-60	CH ₃ COOH	ацеталі
M-64	SO ₂	сульфони
M-79/81	Br	Br-вмісні
M-93	C ₆ H ₅ O	феноксигрупи
M-127	I	I-вмісні

Навчально-методичне видання
(українською мовою)

Корнет Марина Миколаївна
Бражко Олександр Анатолійович
Омельянчик Людмила Олександрівна

ФІЗИЧНІ МЕТОДИ В БІОЛОГІЇ

Навчально-методичний посібник
для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності «Біологія»

Рецензент *М.П. Завгородній*
Відповідальний за випуск *О.А. Бражко*
Коректор *Н.О. Зубець*