

Міністерство освіти і науки України
Запорізький національний університет

О.А. Бражко, М.М. Корнет, А.С. Євлаш

СУЧАСНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ В ХІМІЇ

Навчальний посібник
для здобувачів ступеня вищої освіти магістра
спеціальності «Хімія» освітньо-професійної програми
102 «Хімія»

Затверджено
вченою радою ЗНУ
протокол № ____ від _____

Запоріжжя
2023

УДК:54:54.06:001.891(075.8)
Б871

Бражко О.А., Корнет М.М., Євлаш А.С. Сучасні методи досліджень в хімії: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти магістра спеціальності «Хімія» освітньо-професійної програми 102 «Хімія». Запоріжжя : ЗНУ, 2023. 118 с.

У навчальному посібнику подано в систематизованому вигляді програмний матеріал дисципліни «Сучасні методи досліджень в хімії» відповідно до робочої програми навчальної дисципліни.

Посібник адресується здобувачам ступеня вищої освіти магістра спеціальності «Хімія», які навчаються за освітньо-професійною програмою «Хімія».

Рецензент

І.Б. Лабенська, канд. біол. наук, доцент кафедри хімії

Відповідальний за випуск

О.А. Бражко, д-р біол. наук, проф., завідувач кафедри хімії

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА РОБОТИ І ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У ЛАБОРАТОРІЇ..	7
Тема 1. Загальні поняття про сучасні методи досліджень.....	9
Тема 2. Рефрактометрія. Поляриметрія.....	19
Тема 3. Коливальна спектроскопія, ІЧ-спектроскопія, Фур'є- спектроскопія, спектроскопія КР.....	29
Тема 4. Електронна спектроскопія. УФ-спектроскопія, флюоресценція, люмінесцентний аналіз	40
Тема 5. Хроматографія. Паперова, тонкошарова, іонообмінна.....	58
Тема 6. Рідинна та газова хроматографія. Гель-фільтрація.....	71
Тема 7. Мас-спектрометрія та хромато-мас-спектроскопія. ЯМР-спектроскопія.....	86
Тема 8. Сучасні хімічні методи досліджень.....	100
Тема 9. Спільне використання хімічних, фізичних методів та ПК для визначення будови молекул.....	110
ГЛОСАРІЙ.....	116
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	117

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ААС	-	атомно-абсорбційна спектроскопія
АЕ	-	атомна емісія
АЕС	-	атомно-емісійна спектроскопія
АФ	-	атомна флуоресценція
ВЕРХ	-	високоєфективна рідинна хроматографія
ГАХ	-	газово-адсорбційна хроматографія
ГХ	-	газова хроматографія
ІОХ	-	іонно-обмінна хроматографія
ІЧ	-	інфрачервоний
КР	-	комбінаційне розсіювання
КССВ	-	константа спін-спінової взаємодії
НФ	-	нерухома фаза
ПМР	-	парамагнітний резонанс
ПХ	-	паперова хроматографія
РФ	-	рухома фаза
РХ	-	рідинна хроматографія
СКР	-	спектроскопія комбінаційного розсіювання
СМД	-	сучасні методи досліджень
СФ	-	спектрофотометр
ТШХ	-	тонкошарова хроматографія
УФ	-	ультрафіолетовий
ФЕК	-	фотоелектроколориметр
ЯМР	-	ядерний магнітний резонанс

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ



— теоретичні відомості



— поняття



— зверніть увагу



— виконайте вправу



— завдання (питання) для самоконтролю

ВСТУП

Мета та завдання навчального курсу «Сучасні методи досліджень в хімії» – дати здобувачам ступеня вищої освіти магістр напряму підготовки «Хімія» знання з сучасних інструментальних методів дослідження складу речовин. Зокрема, дати студентам комплекс теоретичних знань та практичних навичок із принципів роботи дослідної апаратури; навчити самостійно використовувати методики кількісного вивчення хімічних та фізичних процесів, параметрів, що впливають на ці процеси; закріпити знання з фізики, аналітичної, органічної, фізичної та колоїдної хімії, що дозволяє в процесі навчання оволодіти вмінням працювати на сучасних приладах; показати взаємозв'язок фізичних методів дослідження речовин 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 сучасних 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 і неорганічних сполук.

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

- правила техніки роботи у фізико-хімічній лабораторії;
- класифікації фізичних та хімічних методів аналізу;
- теоретичні основи сучасних фізичних та хімічних методів дослідження;
- 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.

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

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

Засвоєння курсу «Сучасні методи досліджень в хімії» забезпечують знання, отримані студентами з дисциплін «Неорганічна хімія», «Фізика», «Органічна хімія», «Основи вищої математики», «Біоорганічна хімія», «Фізична хімія» та «Фізичні методи дослідження речовин».

Метою навчального посібника є допомога здобувачам ступеня вищої

освіти магістра спеціальності «Хімія» освітньо-професійної програми 102 «Хімія» у поглибленні та розширенні теоретичних засад, підготовці та виконанні циклу лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Сучасні методи досліджень в хімії».

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

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

ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА РОБОТИ І ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У ЛАБОРАТОРІЇ

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-вимірювальними 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 "кип'ятильниками" (шматочками подрібненого фарфору). "Кип'ятильники" 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 якомога далі 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 у спеціально призначений для цього посуд із 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.

Тема 1

ЗАГАЛЬНІ ПОНЯТТЯ ПРО СУЧАСНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета: розглянути, розібрати та закріпити на практиці розуміння загальних понять та класифікації сучасних методів досліджень (СМД).

План

1. Загальна характеристика СМД.
2. Класифікація СМД.
3. Особливості вибору, переваги та недоліки СМД

 **Основні терміни та поняття:** СМД, чутливість, точність, вибірковість, експресність, автоматизація.

1. Загальна характеристика СМД

Найважливішою особливістю сучасної хімії є використання нових фізико-хімічних, хімічних та фізичних методів дослідження. Поряд із класичними характеристиками речовин такими, як елементний склад, щільність, температура плавлення і кипіння, показник заломлення активно використовуються структурні методи (рентгеноструктурний аналіз, електронографія), спектроскопічні методи в широкому діапазоні довжин хвиль електромагнітного випромінювання (до нових методів можна віднести радіоспектроскопія і лазерну спектроскопію). Важливе значення в хімії мають мас-спектрометрія, хромато-мас-спектрометрія та інші методи.

Сучасні методи аналізу відрізняються підвищеною, в порівнянні з класичними методами аналізу, чутливістю та вибірковістю. Тому для аналізу сучасними методами, як правило, потрібна незначна кількість речовини, яка аналізується, а вміст елемента, що визначають, у зразку може бути незвичайно малим. При виконанні аналізу сучасними методами в багатьох випадках відпадає необхідність виділення компонентів, що визначають, від інших складових частин досліджуваної речовини, а також необхідність використання індикаторів. Для проведення аналізу сучасними методами інколи потрібні хвилини.

Таблиця 1.1 – Чутливість деяких кількісних методів аналізу

Метод аналізу	Чутливість, %
Об'ємний	10^{-1}
Ваговий	10^{-2}
Спектроскопічний та фотоколориметричний	$10^{-3}-10^{-5}$
Флюорометричний	$10^{-6}-10^{-7}$
Радіохімічний	$10^{-8}-10^{-9}$
Нейтронно-активаційний	$10^{-8}-10^{-9}$

Таким чином, сучасні методи аналізу характеризуються:

- а) швидкістю;
- б) вибірковістю;
- в) високою чутливістю.

Області застосування сучасних методів аналізу

Сучасні методи аналізу використовуються в різноманітних галузях науки і техніки:

1. Хіміко-аналітичний контроль з метою забезпечення оптимізації хіміко-технологічних процесів, автоматизації та збору необхідної інформації про стан окремих ланок фізико-хімічних та технологічних процесів.

2. Виконання науково-дослідницьких робіт в області хімії, хімічної технології з метою одержання об'єктивної інформації про проходження реакцій, оцінювання виходів продукції і чистоти одержуваних сполук, визначення побічних продуктів, наявності домішок у вихідних, проміжних і кінцевих продуктах реакції, вивчення властивостей та будови речовин та ін.

3. Експериментальна перевірка теоретичних положень та розробка нових теорій в різних областях хімічної науки, аналіз речовин високої чистоти та спеціальних технічних матеріалів, що використовуються в різноманітних областях нової техніки.

4. Безіндикаторне титрування водних і неводних розчинів.

5. Масові аналізи мінералів, силікатів, різноманітних корисних копалин неорганічного та органічного походження, метеоритів, рідких та розсіяних елементів, металів, сплавів, неметалів, монокристалів.

2. Класифікація СМД

Усі сучасні інструментальні методи аналізу поділяють на наступні групи:

- I. Електрохімічні.
- II. Спектральні (оптичні).
- III. Хроматографічні.
- IV. Радіометричні.
- V. Мас-спектрометричні.
- VI. Ядерно-фізичні.
- VII. Інші.

I. Електрохімічні методи

1. **Електроваговий аналіз** ґрунтується на виділенні з розчинів електролітів речовин, що осаджуються на електродах при проходженні через розчин постійного електричного струму. Метал (або оксид), який виділювався при електролізі, зважують і по масі осаду роблять висновок про вміст речовини у розчині.

2. **Кондуктометрія** ґрунтується на вимірюванні електропровідності розчинів, яка змінюється у результаті хімічної реакції і яка залежить від природи електроліту, його температури та концентрації розчину.

3. **Потенціометрія** ґрунтується на вимірюванні потенціалу електроду, який змінюється внаслідок хімічної реакції і який занурений у розчин, що аналізується. Потенціал електроду залежить від температури і концентрації розчину. Потенціометричне титрування – різновид потенціометричного аналізу.

4. **Полярографія** ґрунтується на вимірюванні сили струму, яка змінюється у залежності від напруги в процесі електролізу, в умовах, коли один з електродів (катод) має дуже малу поверхню (електрод, що поляризується), а інший (анод) – велику (електрод, що не поляризується). Катодом, що поляризується, являються краплі ртуті, які витікають з тонкого отвору капілярної трубки, а також платиновий (що обертається), графітовий, срібний та інші електроди. Анодом, що не поляризується, є “донна” ртуть або стандартні електроди порівняння з великою поверхнею. Силу струму, при якій досягається повний розряд усіх йонів аналізованої речовини, які поступають у приелектродний простір внаслідок дифузії, називають дифузійним струмом. Величина цього струму пропорційна вихідній концентрації речовини (йонів), що визначається, у розчині. Амперометричне титрування – різновид полярографічного аналізу.

5. **Кулонометрія** ґрунтується на вимірюванні кількості електрики, що витрачається на електроліз певної кількості речовини за постійного потенціалу, що відповідає потенціалу виділення даного елемента. В основі цього методу лежить закон Фарадея. Кулонометричне титрування – різновид кулонометричного аналізу.

II. Спектральні (оптичні) методи

1. **Емісійний спектральний аналіз** ґрунтується на вивченні емісійних спектрів елементів речовини, яка аналізується (спектри випромінювання), що виникають під впливом сильних джерел збудження (електричної дуги, високовольної іскри). Цей метод дає можливість визначати елементний склад речовини, тобто судити про те, які хімічні елементи входять до складу даної речовини.

2. **Абсорбційна спектроскопія** ґрунтується на вивченні спектрів поглинання речовини, яка аналізується, і являються її індивідуальною характеристикою

Абсорбційний спектральний аналіз включає: а) спектрофотометричний, б) фотоколориметричний методи.

Найбільше значення для молекулярного спектрального аналізу мають спектри поглинання в інфрачервоній області. Інфрачервона спектроскопія (ІЧ-спектроскопія) – молекулярна оптична спектроскопія, яка вивчає спектри поглинання та відбиття електромагнітних хвиль в ІЧ-області. ІЧ-спектроскопія в основному застосовується для дослідження будови молекул. Метод широко використовується для якісного та кількісного аналізу речовин у всіх агрегатних станах. Якісний аналіз можливий завдяки високій індивідуальності ІЧ-спектрів та існуванню характеристичних коливань деяких атомних груп.

Ультрафіолетові спектри поглинання звичайно мають дві або три, інколи п'ять і більше смуг поглинання. Для ідентифікації досліджуваної речовини записують її спектр поглинання у різних розчинниках та порівнюють одержанні дані з відповідними спектрами схожих речовин відомого складу.

Ідентифікацію забарвлених речовин у видимій частині спектра також можна проводити, порівнюючи його спектр поглинання у видимій частині зі спектром схожої забарвленої речовини.

3. **Спектроскопія комбінаційного розсіювання світла** ґрунтується на явищі, що обумовлено молекулярною структурою речовини, яка досліджується, та супроводжується зміною довжини хвилі світла розсіяного даним середовищем.

До оптичних методів аналізу також належать:

а) **турбідиметрія** ґрунтується на вимірюванні кількості світла, що поглинається незабарвленою суспензією;

б) **нефелометрія** ґрунтується на використанні явищ відбитку або розсіювання світла незабарвленими або забарвленими частинками суспензованого в розчині осаду;

в) **люмінесцентний** або **флуоресцентний метод** ґрунтується на флуоресценції речовин, опромінених ультрафіолетовим світлом і вимірюванні інтенсивності випромінюваного ними видимого світла.

III. Хроматографічні методи

Хроматографічні методи ґрунтуються на вибіркового поглинанні (адсорбції) окремих компонентів суміші, яка аналізується, різними адсорбентами. Вони широко використовуються для розділення близьких за складом та властивостями неорганічних та органічних речовин, для концентрації окремих компонентів складних сумішей неорганічних та органічних сполук. Виділені компоненти визначають звичайними хімічними, фізичними та фізико-хімічними методами аналізу.

Існує декілька класифікацій хроматографічних методів.

За способами виконання розрізняють:

1. **Фронтальний спосіб**. При фронтальному аналізі досліджуваний розчин суміші речовин безперервно подають у верхню частину колонки і збирають окремі фракції фільтрату.

2. **Витіснювальний спосіб**. При витіснювальному аналізі у колонку вводять порцію розчину суміші і за допомогою речовини, яка більше сорбується, витіснюють раніше сорбовані компоненти.

3. **Елюентний спосіб**. При елюентному аналізі у колонку вводять порцію досліджуваної суміші компонентів. При промиванні сорбенту розчинником уздовж колонки відбувається переміщення компонентів суміші внаслідок взаємного витіснювання у відповідності до їх сорбованості.

За агрегатним станом системи, в якій проводиться розділення суміші на компоненти, розрізняють:

1. **Газова хроматографія.** Газовою хроматографією називається хроматографічний процес, в якому рухомою фазою є газ (чи пар).

Варіанти газової хроматографії:

а) в газо-адсорбційній хроматографії нерухомою фазою є твердий адсорбент, а рухомою – газ;

б) в газо-рідинній хроматографії нерухомою фазою є рідина, яка нанесена на нерухомий носій, а рухомою – газ.

2. **Рідинна хроматографія.** Рідинною хроматографією називається хроматографічний процес, в якому рухомою фазою є рідина.

Варіанти рідинної хроматографії:

а) в рідинно-адсорбційній хроматографії нерухомою фазою є твердий адсорбент, а рухомою – рідина;

б) в рідинно-рідинній хроматографії і нерухомою, і рухомою фазою є рідини.

За механізмом розділення розрізняють:

1. **Адсорбційна рідинна хроматографія** ґрунтується на вибірковій адсорбції (поглинанні) окремих компонентів досліджуваної суміші у рідкому середовищі. Вона обумовлена різною адсорбованістю розчинених компонентів.

2. **Адсорбційна газова хроматографія** ґрунтується на використанні різниці в адсорбованості газів та парів. В залежності від основного чинника, що визначає розділення, розрізняють газорідинну та газоадсорбційну хроматографію.

3. **Розподільна хроматографія** ґрунтується на використанні різниці в розподілі (сорбованості) окремих компонентів аналізованої суміші між двома різними фазами, які не змішуються – рухливим та нерухливим розчинниками. Розподільна хроматографія поділяється на:

а) тонкошарову хроматографію, що являє собою різновидність розподільної хроматографії, яка здійснюється на пластинках вкритих тонким шаром носія (алюміній оксид, кізельгур, силікагель), який утримує нерухомий розчинник;

б) паперова хроматографія – різновид розподільної хроматографії, в якій носієм для нерухомого розчинника є смужки чи аркуші фільтрувального паперу, що не містить мінеральних домішок.

4. **Йоннообмінна хроматографія** ґрунтується на використанні йоннообмінних процесів, що проходять між рухомими йонами адсорбенту та йонами електроліту, які містяться в аналізованому розчині.

5. **Осадова хроматографія** ґрунтується на використанні хімічних реакцій між реагентом, який знаходиться у колонці, та йонами, що містяться в аналізованому розчині.

6. **Адсорбційно-комплексуюча хроматографія** ґрунтується на використанні реакцій комплексоутворення, які відбуваються між комплексоутворюючими компонентами і компонентами, які хроматографують.

За формою проведення розрізняють:

1. **Колонкова хроматографія**, яка відрізняється тим, що процес проводять у хроматографічній колонці:

а) насадочну хроматографічну колонку заповнюють сорбентом (насадкою).

б) внутрішню стінку капілярної хроматографічної колонки покривають шаром рідини чи пилю адсорбенту.

2. **Площинна хроматографія** здійснюється на площині і поділяється на:

а) хроматографію на папері;

б) тонкошарову хроматографію.

В залежності від мети проведення хроматографічного процесу розрізняють 4 види хроматографії:

1. **Аналітична хроматографія** призначена для визначення якісного та кількісного складу досліджуваної суміші.

2. **Неаналітична хроматографія** – це метод фізико-хімічних характеристик речовин при використанні хроматографічної апаратури і на основі параметрів хроматографічних зон.

3. **Препаративна хроматографія** використовується для виділення невеликих кількостей чистих компонентів в лабораторних умовах.

4. **Промислова хроматографія** використовується для одержання чистих речовин в значних кількостях.

IV. Радіометричні методи

Радіометричні методи ґрунтуються на вимірюванні випромінювання атомами радіоактивних елементів. Для реєстрації випромінювання використовують спеціальні прилади з лічильниками Гейгера-Мюллера.

1. Метод ізотопного розведення ґрунтується на розведенні сполуки, яка мічена радіоактивним ізотопом, неактивним компонентом суміші.

2. Принцип методу радіоактиваційного аналізу полягає в переводі стабільних ізотопів елемента у радіоактивні, вимірюванні радіоактивності яких є критерієм вмісту даного елемента в об'єкті, що досліджується.

V. Мас-спектрометричні методи

Мас-спектрометричні методи аналізу ґрунтуються на визначенні окремих йонізованих атомів, молекул та радикалів за допомогою розділення потоку йонів, що містять частинки з різним відношенням маси (m) до заряду (e), в результаті комбінованої дії електричного та магнітного полів. Реєстрація розділених частинок досягається електричним (мас-спектрометрія) чи фотографічним (мас-спектрографія) засобами. Визначення проводять за допомогою спеціальних приладів – мас-спектрометрів або мас-спектрографів.

Мас-спектрометричні методи застосовують у хімічному аналізі для визначення ізотопного складу елементів, вмісту різних радикалів, окремих компонентів в складних сумішах або домішок. Мас-спектрометрія дозволяє виконати кількісні визначення різних елементів методом ізотопного розведення з використанням стабільних ізотопів.

VI. Ядерно-фізичні методи

1. **Метод ядерного магнітного резонансу** (ЯМР) ґрунтується на використанні резонансного поглинання електромагнітних хвиль досліджуваною речовиною у постійному магнітному полі, яке обумовлено ядерним магнетизмом. ЯМР високого розрішення – один з важливих методів якісного та кількісного аналізу складних сумішей, контроль якості поживних продуктів, вологості зерна, а також дослідження будови та реакційної здатності молекул.

2. **Метод ядерної гама-резонансної** (ЯГР) спектроскопії ґрунтується на спостереженні мессбауровського ефекту. Метод ЯГР-спектроскопії використовується для встановлення характеру хімічних зв'язків в речовинах, а також для дослідження комплексних та елементорганічних сполук.

Відомі переваги дає сполучення та комбінування декількох інструментальних методів. Наприклад, хроматографія і мас-спектрометрія, хроматографія і ЯМР-спектроскопія, хроматографія і фотоколориметрія тощо.

3. Особливості вибору, переваги та недоліки СМД

На протязі багатьох десятиріч хіміки-аналітики мали справу переважно з реакціями, що відбуваються у водних середовищах. Тому хімічні та фізико-хімічні методи аналізу, які використовувались в аналітичній практиці, ґрунтувались, головним чином, на вивченні таких реакцій. У теперішній час в хімії набули виключно великого значення нові *методи аналізу в неводних середовищах*, які ґрунтуються на використанні реакцій, що проходять без водного середовища. Ці методи дослідження, як хімічні, так і фізико-хімічні, використовуються для визначення складу різноманітних індивідуальних неорганічних, органічних та елементорганічних сполук та кількісного аналізу сумішей. Кількісні дані, одержані методами хімічного та фізико-хімічного аналізу у неводних середовищах, використовуються для визначення функціональних груп, вивчення кінетики хімічних реакцій, визначення фізико-хімічних констант електролітів та розчинників, вивчення механізмів хімічних перетворень, для розробки, модернізації та інтенсифікації методів синтезу, забезпечення оптимальних режимів хіміко-технологічних процесів тощо.

Потрібно відмітити, не дивлячись на прогрес інструментальних методів аналізу, що дозволяє вирішувати хіміко-аналітичні задачі, які неможливо розв'язати звичайними методами вагового чи об'ємного аналізу, класичні методи аналізу не втратили свого значення. Вони, як і раніше, відіграють важливу роль і є основою сучасної аналітичної хімії.

Неможливо віддати перевагу тому чи іншому методу аналізу, не враховуючи характер досліджуваного об'єкта, його агрегатний стан, концентрацію, наявність домішок, мети аналізу, точність визначення, строк виконання тощо.

Сучасні методи аналізу об'єднують групу методів, що ґрунтуються на вимірюванні за допомогою певних приладів (інструментів) певних фізичних властивостей речовин або їх розчинів, які виникають або змінюються в ході

проведення аналізу. Величина фізичної властивості, яка функціонально пов'язана з концентрацією або масою компонента, що визначається, називається аналітичним сигналом. Як аналітичний сигнал у сучасних методах аналізу можуть використовуватися, наприклад, інтенсивність випромінювання чи поглинання світла, сила струму, електропровідність, різниця потенціалів тощо. Якість вимірів оптичних сигналів характеризується точністю, достовірністю, правильністю, відтворюваністю (збіжністю), розміром похибок вимірів:

- *точність вимірювань* – головна характеристика якості вимірювання, що відображає близькість результатів вимірювання до істинного значення фізичної величини, що вимірюється.

- *правильність вимірювань* – характеристика якості вимірювань, що відображає близькість до нуля середнього значення похибок їх результатів;
- *достовірність вимірювань* – характеризує ступінь довіри до результатів вимірювання;

- *відтворюваність (збіжність) вимірювань* – параметр, який відображає близькість повторних результатів вимірювань однієї величини, виконаних в різних умовах (час, місце, методики);

- *похибка вимірювання* – відхилення результату вимірювання від істинного значення вимірюваної фізичної величини:

$$\Delta = X - X_{\text{іст.}},$$

де x – результат вимірювання величини X ; $X_{\text{іст.}}$ – її істинне значення. Достовірність оцінки похибок визначають на основі законів теорії ймовірності та математичної статистики.

Важливою особливістю даних методів аналізу є:

- *експресність* – високий темп одержання результатів;
- *вибірковість* - точне і надточне виявлення домішок;
- *недеструктивність* – виконання аналізу речовини без руйнування зразка;
- *дистанційність* – можливість проведення аналізу на значній відстані від досліджуваної речовини;
- *локальність* – визначення елемента в даній крапці зразка. (дубляж з перевагами)

Переваги СМД

1. *Низька межа виявлення* від 10^{-5} – $10^{-10}\%$. Хімічними методами аналітичної хімії (гравіметрія чи титриметрія) визначити настільки малі кількості речовин неможливо. Ці методи аналізу дозволяють визначати вміст речовин з межею виявлення 10^{-1} – $10^{-40}\%$.

2. *Висока селективність (вибірковість) методів.* Це дозволяє визначати речовини в сумішах без їх поділу та виділення, що робить сучасні незамінними у виробництві речовин високої і надвисокої чистоти, абсолютно необхідних сучасній науці і техніці.

3. *Висока експресність* методів, що визначається витратами часу на аналіз при його використуванні. Багато фізико-хімічних методів значно швидші (експресніші) хімічних методів.

4. *Можливість автоматизації* та комп'ютеризації аналізів.

5. *Дистанційність аналізу* – можливість проведення аналізу на відстані (наприклад, аналіз ґрунту на Місяці, вимір радіації в Чорнобилі).

6. *Недеструктивність* – можливість виконання аналізу без руйнування зразка, що має велике значення, наприклад, для криміналістики, медицини.

Недоліки СМД

1. *Складність* апаратури та її висока ціна.

2. *Багатоопераційність* – необхідність використання еталонів, юстировки приладів, приготування розчинів, побудова градуйованих графіків, що призводить до зниження точності аналізу, тому що на кожній операції може відбутися збій.

3. *Гірша відтворюваність* у порівнянні з хімічним аналізом.

4. *Похибка* визначення вмісту речовини може сягати від 5 до 10% і навіть 20%, тоді як у класичному хімічному аналізі всього 0,5-1%.

? Контрольні питання та завдання:

1. Назвіть класичні характеристики речовин.

2. В яких галузях науки і техніки використовуються сучасні методи досліджень?

3. Як можна класифікувати сучасні методи досліджень?

4. Перерахуйте відомі вам спектральні методи аналізу.

5. Як можна класифікувати хроматографічні методи аналізу?

6. Охарактеризуйте мас-спектрометричний метод аналізу.

7. Що таке точність, правильність і відтворюваність вимірювань?

8. Дайте визначення похибки вимірювання, як її можна розрахувати?

9. Які переваги сучасних методів досліджень?

10. Які недоліки сучасних методів досліджень?

Тестові завдання:

1. Які з методів аналізу мають чутливість 10^{-3} - 10^{-5} ?

а) об'ємний;

б) ваговий;

в) спектроскопічний та фотоколориметричний;

г) флюориметричний.

2. До електрохімічних методів аналізу належать:

а) кондуктометрія;

б) газова хроматографія;

в) потенціометрія; г) рідинна хроматографія.

3. До площинної хроматографії відносяться:

- а) хроматографія на папері;
- б) тонкошарова хроматографія;
- в) поляриметрія;
- г) кондуктометрія.

4. Експресність – це ...

- а) високий темп одержання результатів;
- б) можливість проведення аналізу на значній відстані від досліджуваної речовини;
- в) точне і надточне виявлення домішок;
- г) виконання аналізу речовини без руйнування зразка.

5. Похибка вимірювання – це ...

- а) точне і надточне виявлення домішок;
- б) відхилення результату вимірювання від істинного значення вимірюваної фізичної величини;
- в) істине значення вимірюваної фізичної величини;
- г) практичне значення отриманих результатів.

6. До оптичних методів аналізу належать:

- а) турбідиметрія;
- б) нефелометрія;
- в) люмінесцентний або флуоресцентний метод;
- г) хроматографія.

7. До спектральних (оптичних) методів відносять:

- а) емісійний спектральний аналіз;
- б) абсорбційна спектроскопія;
- в) хроматографія;
- г) нефелометрія.

8. Сучасні методи аналізу характеризуються:

- а) швидкістю;
- б) вибірковістю;
- в) низькою вартістю;
- г) високою чутливістю.

9. Для швидко визначення абсорбції використовують метод

- а) добавок;
- б) метод калібрувальної кривої;
- в) одного еталону;
- г) метод диференційної спектрофотометрії.

10. Метод калібрувальної кривої застосовують для

- а) точності вимірювання;
- б) простоти виконання;
- в) експресності визначення;
- г) серійних визначень однієї і тієї ж речовини.

Тема 2

РЕФРАКТОМЕТРІЯ. ПОЛЯРИМЕТРІЯ

Мета: розглянути загальні поняття рефрактометрії та поляриметрії, закріпити знання на практиці.

План

1. Фізична сутність і можливості рефрактометрії.
 2. Кількісні визначення вмісту речовин методом рефрактометрії.
 3. Молярна рефракція та ідентифікація речовин за її допомогою.
 4. Залежність показника заломлення деяких розчинів від концентрації.
- Принцип дії промислових рефрактометрів.
5. Поляриметричний метод аналізу.
 6. Визначення оптичного обертання (поляриметрія).

 **Основні терміни та поняття:** абсолютний та відносний показники заломлення, оптично активні речовини, асиметричний атом Карбону, молекулярна рефракція.

1. Фізична сутність і можливості рефрактометрії

Промінь світла, що переходить з одного середовища до іншого, частково відбивається від поверхні розділу, а частково переходить в інше середовище, змінюючи при цьому свій початковий напрям. Зміну напрямку прямолінійного поширення світла при переході з одного середовища в інше називають заломленням або рефракцією. Заломлення світла оцінюється за величиною показника заломлення, що дорівнює відношенню синуса кута падіння α до синуса кута заломлення β (рис. 2.1):

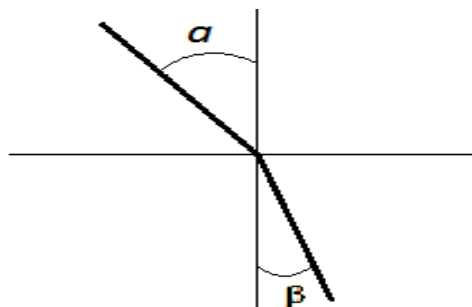


Рисунок 2.1 – Заломлення променя світла

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n \quad (2.1)$$

Метод аналізу, що ґрунтується на визначенні показника заломлення досліджуваного розчину, називається *рефрактометричним*. Величина показника заломлення n залежить від складу індивідуальних компонентів системи, від концентрації окремих молекул, довжини хвилі падаючого світла,

температури. Залежність показника заломлення від довжини хвилі називається дисперсією (рис. 2.2). З рисунку видно, що чим менша довжина хвилі світла, тим більше заломлення. Тому для видимого світла найбільше значення n відповідає фіолетовому випромінюванню ($\lambda=397-424$ нм). Табличні дані показників заломлення, як правило, наводять для жовтої лінії в спектрі натрію ($\lambda=589$ нм) та температури 20°C і позначають n_D^{20} . Метод рефрактометрії характеризується відносною простотою апаратури і техніки виконання аналізу при високій точності вимірів показника заломлення. Прилади, призначені для вимірювання n , називають рефрактометрами і дозволяють встановлювати його значення з точністю до $1 \cdot 10^{-4}$, тобто з відносною похибкою порядку $1 \cdot 10^{-2} \%$

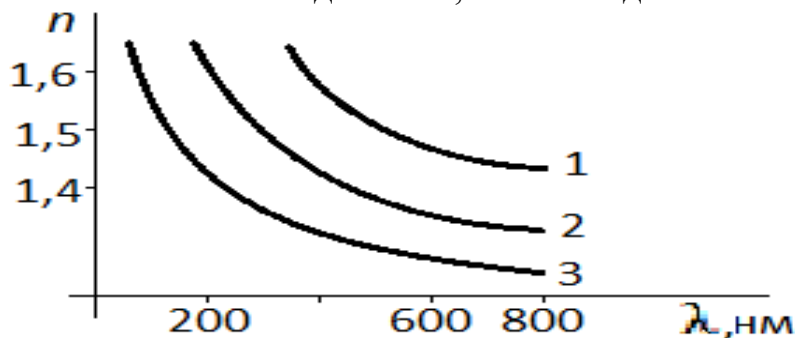


Рисунок 2.2 – Залежність показника заломлення від довжини хвилі називається *дисперсією*

Рефрактометрія – приклад оптичного фізичного експресного мікрометоду: для вимірювання показника заломлення достатньо 1-2 краплі досліджуваної рідини.

2. Кількісні визначення вмісту речовин методом рефрактометрії

Взаємозв'язок між концентрацією бінарного розчину і показником заломлення встановлюють, як правило, за допомогою калібрувального графіка. Для побудови останнього готують стандартні розчини із чистої речовини і вимірюють їх показники заломлення, причому кожен вимір повторюють 3-4 рази і обчислюють середнє арифметичне. Калібрувальний графік будують в координатах показник заломлення – концентрація. Типовий графік наведений на рис. 2.3.

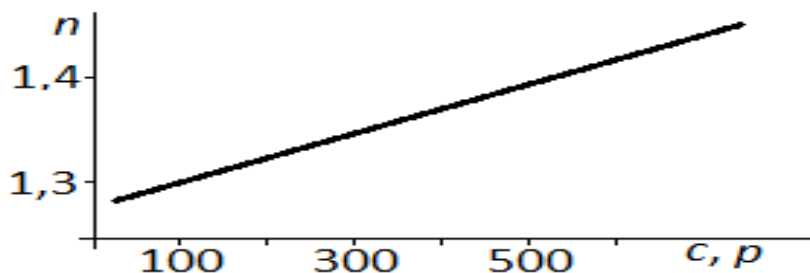


Рисунок 2.3 – Приклад калібрувального графіка

Окрім наведеного прикладу рефрактометрія широко застосовується для визначення концентрації розсолів, розчинів спирту, зв'язаної води тощо.

3. Мольна рефракція та ідентифікація речовин за її допомогою

Шляхом вимірювання показника заломлення і густини речовини **d** може бути визначена мольна рефракція **R**. Для цього використовують формулу Лорентца-Лоренца:

$$R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{\rho} \quad (2.2), \text{ де } M - \text{молярна маса}$$

Вказана величина залежить лише від природи речовини і не залежить від температури, тиску та агрегатного стану. Таким чином мольну рефракцію можна розглядати, як міру поляризованості молекул речовини. Оскільки поляризація молекул відбиває сумарний процес поляризації атомів, які входять до їх складу, то величина мольної рефракції повинна дорівнювати сумі атомних рефракцій. В цьому полягає правило адитивності. Адитивність мольної рефракції використовують для визначення рефракції молекул і атомів. Наприклад, рефракція групи CH_2 може бути визначена за різницею рефракцій C_7H_{16} і C_6H_{14} :

$$R_{\text{CH}_2} = R_{\text{C}_7\text{H}_{16}} - R_{\text{C}_6\text{H}_{14}} \quad (2.3)$$

Атомну рефракцію вуглецю обчислюють за наступною різницею

$$R_{\text{C}} = R_{\text{CH}_2} - 2R_{\text{H}} \quad (2.4)$$

З іншого боку експериментальне визначення мольної рефракції і порівняння її з величиною обчисленою згідно правила адитивності, дає можливість ідентифікувати сполуку. Пояснимо це на прикладі хлоробензолу, скориставшись даними наступної таблиці.

Таблиця 2.1 Атомна рефракція для деяких елементів

Елементи	Атомна рефракція	Елементи	Атомна рефракція
Вуглець	2,418	Хлор	5,967
Водень	1,100	Бром	6,856
Кисень		Йод	13,91
в групах:		Азот у первинних амінах	2,322
-ОН	1,525	Інкременти:	
-О-	1,643	-C=C-	1,733
C=O	2,241	-C≡C-	2,389

Враховуючи, що в молекулі хлоробензолу 6 атомів вуглецю, 5 атомів водню, 1 атом хлору, а також три подвійні зв'язки, одержуємо:

$$R = 6 \cdot 2,418 + 5 \cdot 1,100 + 1 \cdot 5,967 + 3 \cdot 1,733 = 31,2$$

Експериментально знаходимо, що показник заломлення цієї рідини

дорівнює 1,5248, густина хлорбензолу $1,107 \cdot 10^3$ кг/м³. Підставивши ці величини в рівняння Лорентца-Лоренца, одержуємо:

$$R = \frac{(1,5248)^2 - 1}{(1,5248)^2 + 2} \times \frac{112,56}{1,107} = 30,9$$

Незначна різниця двох значень R ($31,2 - 30,9 = 0,3$) свідчить про те, що досліджувана рідина дійсно є хлоробенzenом.

4. Залежність показника заломлення деяких розчинів від концентрації. Принцип дії промислових рефрактометрів

Принцип дії промислових рефрактометрів базується на використанні явища повного внутрішнього відображення світла в оптичній призмі, що знаходиться в контакті з рідиною. Світло від джерела вводиться в оптичну призму і падає на її внутрішню поверхню, що контактує з досліджуваним розчином. Світлові промені попадають на границю роздільної призми і розчину під різними кутами. Частина променів, кут падіння яких більше критичного, цілком відбивається від внутрішньої поверхні призми і, виходячи з неї, формують світлу частину зображення на фотоприймачі. Частина променів, кут падіння яких менше критичного, частково переломлюється і проходять у розчин, а частково відбивається і формує темну частину зображення на фотоприймачі.

Положення границі розділу між світлом і тінню залежить від співвідношення коефіцієнтів заломлення матеріалу оптичної призми і досліджуваного розчину, а також довжини хвилі випромінювання джерела світла. Оскільки оптичні характеристики призми і довжина хвилі джерела постійні, то по положенню границі розділу світла і тіні на фотоприймачі можна однозначно визначити коефіцієнт заломлення чи оптичну щільність досліджуваного розчину.

Оскільки, оптична схема рефрактометрів побудована на використанні відображення і проходження світла тільки усередині призми, то ні прозорість розчину, ні наявність у ньому нерозчинних включень, що розсіюють світло, газових пухирців не впливають на результат виміру.

Для компенсації впливу температури досліджуваної рідини на результати виміру концентрації в промислових рефрактометрах використовуються теплові датчики.

Рефрактометри можуть застосовуватися:

1. У медичних установах для визначення білка в сечі, сироватці крові, щільність сечі, аналіз мозкової і суглобної рідини, щільності субретинальної і інших рідин ока (прилад значно скорочує час одержання аналізів завідсотковим вмістом білка в сироватці крові, при використанні таблиць Рейса, і не вимагає ніяких хімічних реактивів для пробопідготовки. Використання цих приладів дозволяє значно скоротити витрати часу при масових обстеженнях пацієнтів.

2. У фармацевтичній промисловості може застосовуватися для

дослідження водяних розчинів різних лікарських препаратів: кальцію хлориду (10% і 20%); новокаїну (0,5%, 1%, 2%, 10%, 20%, 40%); ефедрину (5%); глюкози (5%, 25%, 40%); магнію сульфату (25%); натрію хлориду (10%); кордіаміну тощо.

3. У харчовій промисловості:

- на цукрових і хлібних заводах, кондитерських фабриках для аналізу продуктів і сировини, напівфабрикатів, кулінарних і борошняних виробів;
- визначає вологість меду (до 20 %);
- для визначення частки сухих речовин у різних суслах (ДСТ 5900-73), "промочке", цукровоагаровому сиропі, сиропі для мармеладу, зефіру, кремів і пряників, "тиражки" для пряників;
- для визначення масової частки розчинних сухих речовин по сахарозі у продуктах переробки плодів і овочів;
- для визначення процентного вмісту жиру у твердих продуктах харчування (пряники, вафлі чи хлібобулочних виробів);
- концентрації солей.

Рефрактометри можуть використовуватися в кожній лабораторії санітарно-епідеміологічного контролю, ветеринарній лікарні, лабораторії медичної установи, а також метрологічного контролю.

4. При обслуговуванні техніки для визначення з більшою точністю об'ємної концентрації протикристалізаційної рідини, що додається в авіаційне паливо в кількості від 0,1 до 0,3%.

5. Поляриметричний метод аналізу

У відповідності з електромагнітною теорією світла коливання світлових хвиль у природньому пучку світла відбувається у всіх площинах, перпендикулярних до напрямку руху променя. Якщо поперечні коливання здійснюються тільки в одній площині, то такий промінь світла називається поляризованим. Існують речовини, які здатні обертати площину поляризації, вони називаються *оптично-активними речовинами*. Оптична активність речовин обумовлюється двома факторами: особливостями структури кристалічної решітки речовини та особливостями будови її молекули.

До першого типу відносяться тверді речовини, наприклад: кварц, натрію хлорид та інші. Зрозуміло, що при руйнуванні кристалічних решіток, наприклад: при розчиненні, такі речовини втрачають свою оптичну активність.

Речовини другого типу проявляють оптичну активність лише в розчиненому або газоподібному стані. До цієї категорії сполук відносяться, головним чином, органічні речовини, які містять в молекулі несиметричні атоми вуглецю, наприклад, глюкоза, винна кислота, морфін тощо. Так, винна кислота може існувати у вигляді чотирьох форм, дві з яких оптично активні.

Якщо промінь поляризованого світла пропускати через оптично активну речовину, то на виході з неї коливання поляризованого променя будуть проходити вже в іншій площині, яка розташована по відношенню до первинної під деяким кутом. Цей кут називається кутом обертання площини поляризації.

Метод аналізу, який ґрунтується на вимірюванні кута обертання площини поляризації світла, що пройшов через оптично активне середовище, називається *поляриметричним*.

Метод базується на залежності:

$$\beta = \frac{\alpha_D^{20} \cdot l \cdot c}{100} = \alpha \cdot l \cdot c' \quad (2.5)$$

де β – кут обертання площини поляризації;

l – товщина шару, см;

c – концентрація г/100 см³

c' – концентрація г/см³

α_D^{20} – питоме обертання площини поляризації (кут при $c' \cdot c' = 1$ г/мл і $l = 10$ см)

При стандартних величинах температури (20°C), довжині хвилі променя світла (жовта лінія натрію D) для певної речовини при вибраній товщині шару розчину справджується залежність $\beta = f(c)$. Це і дозволяє проводити виміри оптично активних речовин у розчинах, що здійснюється на поляриметрах, схема якого показана на рис. 2.5.

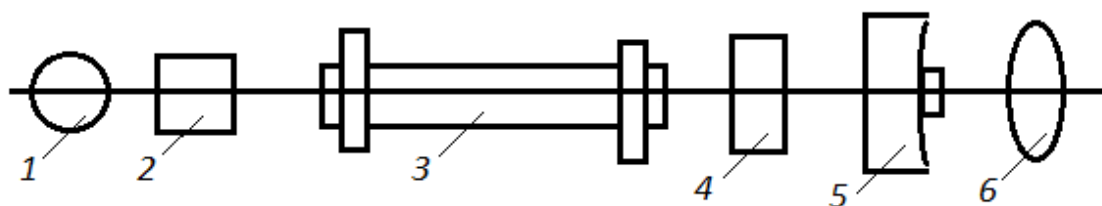


Рисунок 2.5 – Схема поляриметра 1 – джерело світла; 2 – поляризатор; 3 – трубка з досліджуваним розчином; 4 – світлофільтр; 5 – аналізатор; 6 – лінза.

Оптичне обертання – це властивість речовини обертати площину поляризації поляризованого світла. Оптичне обертання вважають позитивним (+) для правообертальних речовин (що обертають площину поляризації за годинниковою стрілкою) і негативним (–) для лівообертальних речовин.

Питоме оптичне обертання $[\alpha_m]_\lambda^t$, виражене в радіанах (рад), являє собою обертання, викликане шаром рідини або розчину завтовшки 1 м, що містить 1 кг/м³ оптично активної речовини, при проходженні через нього поляризованого світла з довжиною хвилі λ при температурі t . Для практичних цілей питоме оптичне обертання $[\alpha_m]_\lambda^t$ – звичайно виражають у мілірадіан-метрах квадратних на кілограм (мрад*м²*кг⁻¹).

У Фармакопеї використовують такі визначення:

Кут оптичного обертання рідких речовин являє собою кут обертання α , виражений у градусах (°), площини поляризації за довжини хвилі D-лінії спектра натрію ($\lambda = 589.3$ нм), виміряний при температурі 20 °C у товщині шару 1 дм. Для розчинів спосіб приготування зазначають в окремій статті.

Питоме оптичне обертання $[\alpha_m]^{20}_D$ рідини являє собою кут обертання α ,

виражений у градусах ($^{\circ}$), площини поляризації за довжини хвилі D-лінії спектра натрію ($\lambda = 589.3$ нм), виміряний при температурі 20°C , розрахований для товщини шару 1 дециметр випробовуваної речовини і поділений на густину, виражену в грамах на кубічний сантиметр.

Питоме оптичне обертання $[\alpha_m]^{20}_D$ речовини в розчині являє собою кут обертання α , виражений у градусах ($^{\circ}$), площини поляризації за довжини хвилі D-лінії спектра натрію, виміряний при температурі 20°C у розчині випробовуваної речовини, і розрахований для шару 1 дм у перерахунку на вміст 1 г речовини в 1 мл розчину. Для питомого обертання речовини у розчині завжди зазначають використовуваний розчинник і концентрацію розчину.

У Фармакопеї питоме оптичне обертання виражають у градус-мілілітрах на дециметр-грам $[(^{\circ})\cdot\text{мл}\cdot\text{дм}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}]$.

Перерахунок питомого обертання за Міжнародною Системою в одиниці, використовувані Фармакопеєю, проводять за формулою:

$$[\alpha_m]_{\lambda}^l = [\alpha]_{\lambda}^l * 0.1745 \quad (2.6)$$

В окремих випадках, зазначених в окремій статті, кут обертання може бути виміряний при температурах, відмінних від 20°C і за інших довжин хвиль.

Використовуваний поляриметр має забезпечувати вимірювання з точністю до 0.01. Шкалу звичайно перевіряють за допомогою сертифікованих кварцових пластинок. Лінійність шкали може бути перевірена за допомогою розчинів сахарози.

Методика. Визначають нуль поляриметра і кут обертання площини поляризації за довжини хвилі D-лінії спектра натрію ($\lambda = 589.3$ нм) при температурі $(20 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Вимірювання оптичного обертання можуть проводитися при інших температурах лише у тих випадках, якщо в окремій статті зазначений спосіб врахування температури. Визначають нуль приладу з закритою трубкою; для рідин – з порожньою трубкою; для розчинів твердих речовин – з трубкою, заповненою зазначеним розчинником.

6. Визначення оптичного обертання (поляриметрія)

Оптичне обертання – це здатність речовини обертати площину поляризації при проходженні крізь неї поляризованого світла.

Кількість оптично діяльних лікарських речовин досить велика. До них належать вуглеводи, окси- та амінокислоти, більшість терпеноїдів, деякі гормони, антибіотики, алкалоїди та ін.

Залежно від природи оптично активної речовини обертання площини поляризації може мати різну величину та напрям (правообертаючі «+» або лівообертаючі «-»).

Величину відхилення площини поляризації від початкового положення називають кутом обертання і позначають літерою α . Ця величина залежить від природи оптично діяльної речовини, довжини шляху поляризованого світла в

оптично діяльному середовищі та довжини хвилі світла, а для розчинів – також від концентрації оптично діяльної речовини та від природи розчинника.

Вплив температури в більшості випадків незначний.

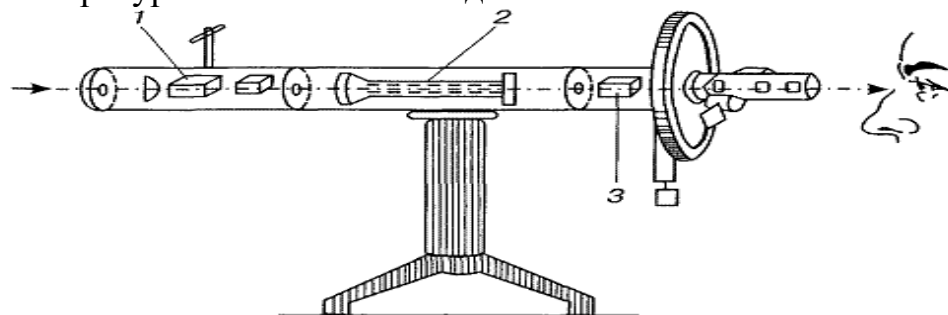


Рис. 4.10. Принципова схема поляриметра:
1 — призма-поляризатор; 2 — трубка з розчином; 3 — призма-аналізатор

Рисунок 2.6 – Принципова схема поляриметра 1-призма поляриметра, 2-трубка з розчином, 3-призма аналізатор

Вимірювання кута обертання речовини проводять на приладах – поляриметрах (рис. 2.6). Спочатку встановлюють нульове положення призм. Для цього в прилад уставляють порожню поляриметричну трубку (якщо досліджують чисту рідку речовину) або трубку, наповнену розчинником. Призму-аналізатор установлюють у положення, при якому два (або три) поля зору мають рівне освітлення (спостерігається рівномірно забарвлене коло). Повторюють цю операцію тричі; з отриманих показників розраховують середнє значення, яке й приймають за нульове положення призм.

Після цього трубку заповнюють рідиною, що досліджується. Якщо трубка не має розширення, то під час наповнення слідкують за тим, щоб не утворилися бульбашки повітря. Трубку вставляють у прилад, знімають показники поляриметра, не менше ніж 3 рази, зі зразком речовини, що досліджується, і розраховують середнє арифметичне значення. Алгебраїчна різниця між цим значенням і нульовою точкою становить кут обертання.

Для порівняльної оцінки здатності різних речовин обертати площину поляризації розраховують величину питомого обертання. Питоме обертання $[\alpha]^{20}_D$ – це обертання площини поляризації, викликане шаром речовини завтовшки 1 дм при перерахунку на вміст 1 г речовини в 1 мл об'єму. Ця величина – найважливіша фізична константа, яка характеризує оптично активні речовини.

Для рідких індивідуальних речовин питоме обертання розраховують за формулою:

$$[\alpha]^{20}_D = \frac{\alpha}{l \cdot \rho}, \quad (4.25)$$

(2.7),

де α – вимірний кут обертання, град;

l – товщина шару рідини (довжина поляриметричної трубки), дм;

ρ – густина рідини, г/мл.

Для розчинів питоме обертання розраховують за формулою:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot C}, \quad (4.26)$$

(2.8),

де α – вимірний кут обертання, град;

l – товщина шару рідини (довжина поляриметричної трубки), дм;

C – концентрація розчину, %.

Величину питомого обертання визначають для підтвердження чистоти й тотожності оптично активної речовини.

Оскільки питоме обертання залежить від концентрації та природи розчинника, умови його визначення наводяться у відповідних монографіях на лікарські засоби.

В інтервалі концентрацій, при яких питоме обертання – постійна величина, за допомогою кута обертання можна розрахувати концентрацію речовини в розчині:

$$C = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot [\alpha]_D^{20}}, \quad (4.27)$$

(2.9)

Поляриметрія дає можливість якісно та кількісно визначати оптично активну речовину в присутності оптично неактивних.

? Контрольні питання та завдання:

1. Дайте визначення аналітичного рефрактометричного фактора. Як він визначається?
2. Яка формула існує для визначення молекулярної рефракції, її розмірність. Які властивості має молекулярна рефракція?
3. Що називається абсолютним і відносним показником заломлення? Від чого він залежить?
4. Що називається екзальтацією молекулярної рефракції?
5. Що таке показник заломлення, від яких факторів він залежить, за якою формулою розраховується?
6. Поясніть залежність кута повороту площини поляризації від довжини хвилі.
7. Що таке поляризація світла, її види та характеристики?
8. Назвіть переваги і недоліки рефрактометричного методу аналізу.
9. Назвіть переваги і недоліки поляриметричного методу аналізу.
10. Яке застосування рефрактометрії та поляриметрії в біології та хімії?

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 застосовується для

- а) аналізу подвійних систем речовин;
- б) визначення концентрації речовин;
- в) визначення будови речовин;
- г) аналізу складних сумішей.

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. Наявність семиполярного зв'язку в молекулі речовини викликає ...

- а) зменшення рефракції;
- б) збільшення рефракції;
- в) зменшення поляризації;
- г) збільшення поляризації.

7. В основі методів поляриметрії лежить оптичне явище

- а) віддзеркалення та заломлення світла;
- б) поглинання світла;
- в) явище оптичної активності.

8. Концентрацію яких речовин можна виміряти за допомогою поляриметра?

- а) прозорих;
- б) забарвлених;
- в) оптично активних;
- г) каламутних.

9. Яке явище описує закон Бугера?

- а) заломлення світла;
- б) поглинання світла речовиною;
- в) дифракцію світла;
- г) поляризацію світла.

10. Який закон описує зміну інтенсивності поляризованого світла від кута повороту площини аналізатора?

- а) закон Малюса;
- б) закон Брюстера;
- в) закон Бугера.
- в) закон Стокса.

Тема 3

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

Мета: розглянути основні принципи коливальної спектроскопії, ІЧ-спектроскопії, Фур'є-спектроскопії, спектроскопії КР, навчитися розшифровувати спектри.

 **Основні терміни та поняття:** коливальна спектроскопія, ближня та дальня інфрачервоні області вимірювання, деформаційні та валентні коливання.

План

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

1. Коливальна спектроскопія

Коливальна спектроскопія – розділ молекулярної спектроскопії, що вивчає спектри поглинання і віддзеркалення, обумовлені квантовими переходами між коливальними рівнями енергії молекул. Коливальні спектри можуть бути отримано або в результаті безпосереднього поглинання речовиною ІЧ випромінювання або при поглинанні видимого та УФ випромінювання, коли частина поглиненої енергії витрачається на збудження молекул, а велика частина реєструється речовиною. Коливальна спектроскопія є методом неструктивного аналізу. Вона молекулярно-специфічна, що дозволяє отримувати інформацію про функціональні групи в молекулах, їх типи, взаємодії та орієнтації; селективна по відношенню до ізомерів, завдяки ділянці «відбитків пальців». Діапазон частот коливальних переходів – від 3×10^{11} до 10^{14} Гц, а в $\lambda = 0,750 - 1000$ мкм (хвильове число від 10 до приблизно 40000 см^{-1}). 1 мкм = 1000 нм.

Розрізняють такі види коливальної спектроскопії:

- *інфрачервона спектроскопія;*
- *спектроскопія комбінаційного розсіювання (раманівська).*

Коливальна спектроскопія складає основу органічного аналізу разом з ЯМР-спектроскопією, мас-спектрометрією та хроматографією. Частоти коливальних спектрів використовуються також для розрахунку силових полів молекул, тобто, для визначення різного типу сил взаємодії атомів у молекулі. Так звані силові константи для значного числа груп атомів мають властивість перенесення, тобто, вони постійні в рядах подібних за будовою молекул. Спектроскопія комбінаційного розсіювання складає основу органічного аналізу разом з ЯМР-спектроскопією, мас-спектроскопією та хроматографією.

Коливальна спектроскопія є:

- 1) молекулярно-специфічною, тобто, дозволяє одержати інформацію про

функціональні групи молекул (їх типи, взаємодії і орієнтації);

2) селективною по відношенню до ізомерів завдяки області «відбитків пальців»;

3) методом якісного аналізу;

4) методом кількісного і недеструктивного (без руйнування зразка) аналізу, при цьому працюють з концентрацією в 0,1%–100%, крім того, визначають мікрокількості речовин після концентрування.

5) визначення базується на законі Бугера-Ламберта-Бера з використанням методу калібрувального графіка та методу базової лінії.

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

Коливальні спектри молекул пов'язані з переходами між коливальними енергетичними рівнями молекули. В класичній інтерпретації їх пов'язують з коливаннями атомних ядер відносно рівноважних положень. Число і положення смуг у спектрі залежать від природи та кількості атомів у молекулі, її геометричної будови, симетрії, а також від потенціального поля внутрішньомолекулярних сил. Інтенсивності смуг визначаються електронними властивостями молекул: дипольним моментом (μ), поляризованістю (α), а також їх змінами в процесі коливань. Методи ІЧ- і КР-спектроскопії відрізняються за способом генерації сигналу. ІЧ-спектри отримують у режимі поглинання, спектроскопія КР заснована на розсіюванні випромінювання.

Спектральні діапазони в ІЧ- та КР-спектроскопії поділяють на 4 ділянки (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 — Спектральні діапазони в ІЧ- та КР-спектроскопії

Ділянка	Довжина хвилі, мкм	Хвильове число, см ⁻¹
Видима	0,4 - 0,8	25000 - 12500
Ближня	0,8 - 2,5	12500 - 4000
Середня	2,5 - 25	4000 - 400
Дальня	25 - 100	400 - 10

2. ІЧ-спектроскопія

Інфрачервоне випромінювання – електромагнітне випромінювання, що займає спектральну область між червоним кінцем видимого випромінювання (з довжиною хвилі $\lambda \approx 0,74$ мкм) і короткохвильовим радіовипромінюванням ($\lambda \sim 1$ -2 мм). При проходженні ІЧ-випромінювання через речовину відбувається його поглинання на частотах, що збігаються з деякими коливальними і обертальними частотами молекул або з частотами коливань кристалічної решітки. В результаті інтенсивність ІЧ-випромінювання на цих частотах падає – утворюються смуги поглинання.

Це поглинання має селективний характер і відбувається, як уже говорилося раніше, на тих частотах, які збігаються з деякими власними

частотами коливань атомів у молекулах речовини і з частотами обертання молекул як цілого, а у випадку кристалічної речовини – з частотами коливань кристалічної решітки. ІЧ-спектри поглинання виникають в результаті переходів між коливальними рівнями молекули, які є в основному електронному стані. Коливальні спектри проявляються в ІЧ-діапазоні електромагнітного випромінювання, яку поділяють на три ділянки:

близька:	0,750 – 2,5 мкм	13000 – 4000 см^{-1}
середня (основна):	2,5 – 50 мкм	4000 – 200 см^{-1}
далека:	50 – 1000 мкм	200 – 10 см^{-1}

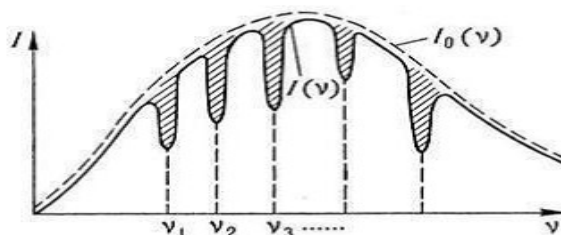


Рис. 3.1 – Залежність інтенсивності вихідного випромінювання I_0 і того, що пройшло через речовину I .

В *середньому* ІЧ-діапазоні розташовані довжини хвиль більшості нормальних коливань (групові частоти та «відбитки пальців»).

У *ближньому* ІЧ-діапазоні розташовані обертони нормальних коливань, які використовуються для рутинного аналізу харчових продуктів та технологічних сумішей.

У *дальньому* ІЧ-діапазоні розташовані частоти, що відповідають коливанням кристалічної решітки та нормальним коливанням слабких зв'язків і зв'язків з важкими атомами. В цю область ІЧ-випромінювання потрапляють практично тільки коливання зв'язків метал-Карбон.

Молекула може поглинати квант ІЧ-випромінювання лише в тому випадку, якщо це призводить до зміни її *дипольного моменту*. Не можуть поглинати ІЧ-спектри молекули з ковалентним зв'язком, це H_2 , N_2 , галогени, молекула CO_2 з симетрично валентними коливаннями атомів.

ІЧ-спектри здебільшого представляють в координатах $T(\%)$, см^{-1} , хвильове число зменшується зліва направо, або в координатах $T(\%)$, нм , довжина хвилі збільшується зліва направо.

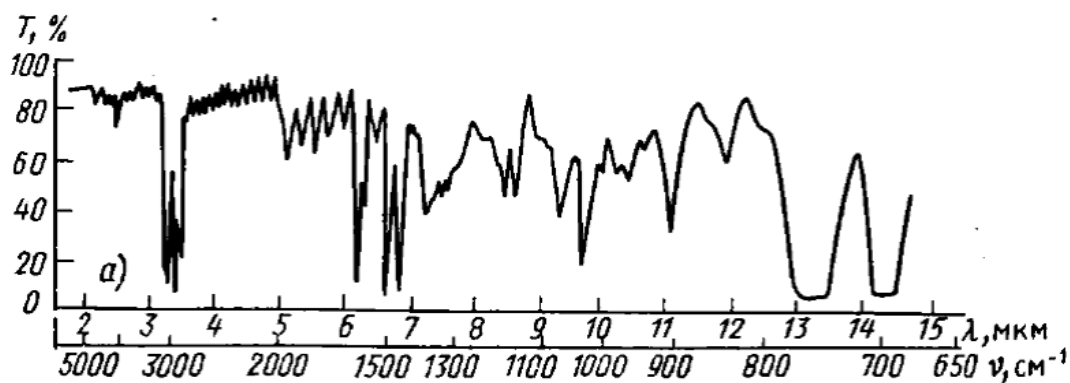


Рисунок 3.2 – ІЧ-спектр полістиролу

У деяких молекулах дипольний момент з'являється при зміні типа коливань атомів. Коливальні переходи обов'язково супроводжуються обертальними, тому коливальна спектральна лінія перетворюється у смугу, що складається з безлічі ліній, а ІЧ-спектр являє собою набір смуг поглинання (ширина коливальних смуг менше електронних, оскільки різниця енергій обертових підрівнів менше, ніж коливальних).

З усіх коливальних переходів найбільш імовірними є перехід на найближчий коливальний підрівень. Йому відповідає спектральна лінія, яка називається основною. Менш імовірними переходами на більш високі коливальні підрівні відповідають спектральні лінії, що називаються обертонами. Їх частота у 2-3 рази більше, ніж частота основної лінії, а інтенсивність набагато менше.

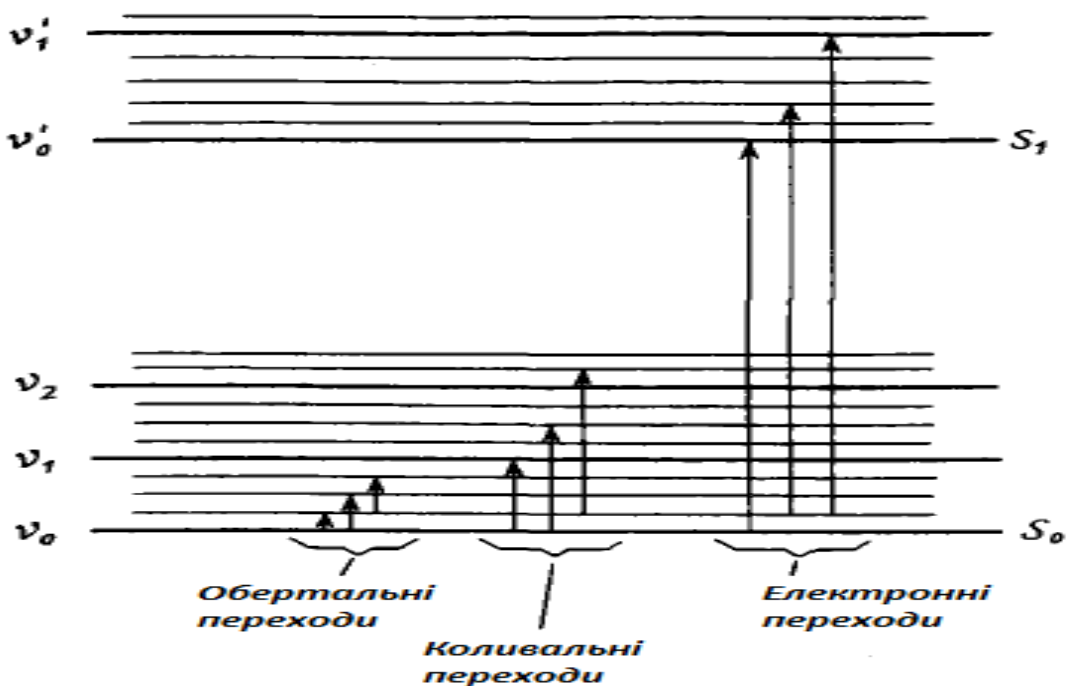


Рисунок 3.3 – Схема енергетичних рівнів в молекулі, яка демонструє поглинання випромінювання.

Інфрачервона спектроскопія – розділ молекулярної оптичної спектроскопії, що вивчає спектри поглинання і віддзеркалення електромагнітного випромінювання в ІЧ області, тобто в діапазоні довжин хвиль від 10^6 – 10^3 , де інфрачервоний спектр являє собою складну криву з великим числом максимумів і мінімумів. Смути поглинання з'являються в результаті переходів між коливальними рівнями основного електронного стану досліджуваної системи.

ІЧ-спектроскопія заснована на тому, що зразок поглинає частину інфрачервоного випромінювання, що проходить крізь нього, а частину – пропускає. Можна зареєструвати випромінювання, яке пройшло крізь зразок та отримати спектр пропускання або спектр поглинання. Спектр містить деякий набір смуг різної інтенсивності, який визначається хімічним складом зразка. Кожна речовина має свій неповторний хімічний склад і будову молекул його утворення і, відповідно, свій унікальний спектр поглинання, який служить так

званим «Молекулярним відбитком» для даної речовини. При поглинанні ІЧ-випромінювання відбуваються переходи між коливальними і оберतालними енергетичними рівнями.

Розрізняють основні три ділянки ІЧ спектру органічних сполук:

- 1) 4000-2500 см^{-1} . Ділянка валентних коливань простих зв'язків Х-Н: О-Н, N-H, C-H, S-H;
- 2) 2500-1500 см^{-1} . Ділянка валентних коливань кратних зв'язків Х=У, Х=У: C=C, C=O, C=C;
- 3) 1500-500 см^{-1} . Ділянка валентних коливань простих Х-У: C-C, C-N, C-O і деформаційних коливань простих зв'язків Х-Н, C-H, О-Н; також називається «ділянкою відбитків пальців».

Кожний тип коливання характеризується певною енергією збудження. Валентні коливання відповідають більш високим енергіям, ніж деформаційні, отже, смуги валентних коливань знаходяться в більш короткохвильовій області.

Виділяють приблизно 4 області спектра, які пов'язані з видами коливань у групах атомів молекул (рис. 3.4).

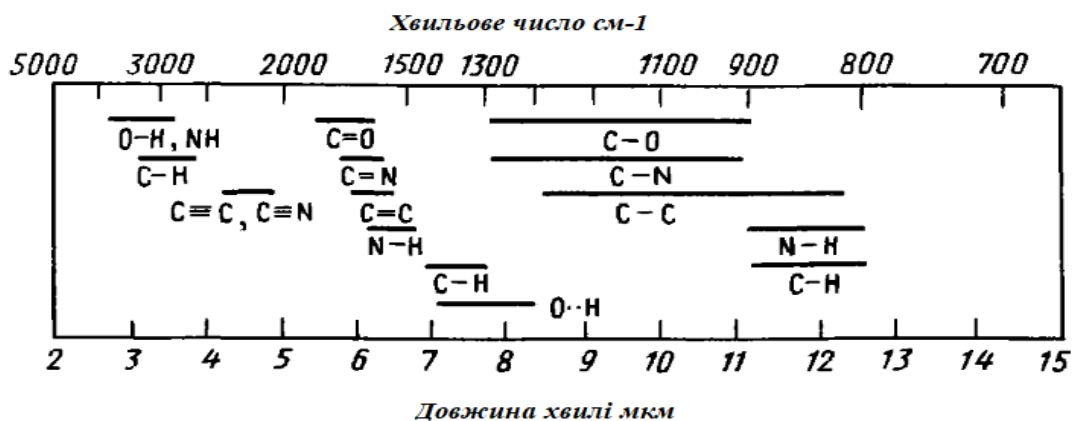


Рисунок 3.4 – Області спектра

- 1) 2,7–4,0 мкм – валентні коливання за участю атомів гідрогену (О-Н, C-H, N-H, S-H);
- 2) 4,0–5,0 мкм – потрійні валентні зв'язки (C≡C, C≡N) і C=C=C;
- 3) 5,0–6,4 мкм – подвійні валентні зв'язки (C=C, C=O, C=N) і групи –COOH, -COOR, -CONH₂;
- 4) 6,0–15 мкм – одинарні валентні зв'язки (C-H, N-H), групи –CH₃, -CH₂-, -NH₂, групи з важкими атомами PO₄³⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, NO₃⁻.

Так як положення та інтенсивність смуг поглинання в цьому діапазоні суто індивідуальні для кожної конкретної органічної сполуки тільки за повним збігом і набором частот та інтенсивностей ліній в цій області ІЧ-спектра можна говорити про ідентичність порівнювальних об'єктів.

У спектрах існують смуги двох типів: характеристичні і нехарактеристичні. *Характеристичні* – смуги, які відповідають валентним коливанням певних груп атомів, зв'язків і майже не залежить від впливу всієї молекули, тобто, кожна група атомів має свою індивідуальну частоту поглинання. До характеристичних відносять смуги коливань таких груп атомів, як C-H, О-Н, =N-H, C=O, C=C, –C≡N– тощо.

Нехарактеристичними називають смуги валентних і деформаційних коливань, що не можуть бути віднесені до конкретних груп атомів або зв'язків. До них належать смуги коливання зв'язків C–C, C–N усієї молекули, а не окремих фрагментів. Тому, незначні зміни в структурі молекули приводять до істотних змін вигляду спектра. Цю ділянку спектра ще називають *ділянкою «відбитків пальців»*, тобто, це набір смуг в інтервалі 600-1500 см^{-1} , який важко інтерпретується і містить характерні максимуми для даної речовини (використовується для ідентифікації речовини).

Для проведення як ідентифікації, так і кількісного аналізу за ІЧ-спектрами необхідно мати спектри чистих компонентів. При порівнянні експериментального спектру зі спектром речовини, присутність якого передбачається (стандарт), знаходять у спектрі суміші всі смуги поглинання еталонної речовини.

Прилади для ІЧ-спектроскопії поділяються на *диспергуючі* (призми з матеріалу з відповідного ІЧ-діапазону дисперсії та дифракційні решітки) і *недиспергуючі* (Фур'є-спектрометри).

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.

Проте ІЧ-спектроскопія має ряд переваг перед спектроскопією у візуальній та УФ-областях, оскільки дозволяє простежити зміну всіх основних типів зв'язків у молекулах досліджуваних речовин. При використанні ІЧ-спектроскопії для визначення якісного або/та кількісного складу природних сумішей не відбувається деструкції речовин, що дозволяє застосовувати їх для наступних досліджень.

Ароматика проявляється в ІЧ-діапазоні помірним піком валентних коливань C–H в області 3030 см^{-1} . Інша характерна риса – валентні коливання ароматичних вуглець-вуглецевих зв'язків спостерігаються зазвичай при 1600 і 1475 см^{-1} . Нарешті, ароматичне кільце виявляє інтенсивне поглинання у діапазоні 800 - 690 см^{-1} , обумовлене деформаційними коливаннями C–H. Всі ці особливості ароматичного кільця спостерігаються в ІЧ-спектрі толуену (рис. 3.5).

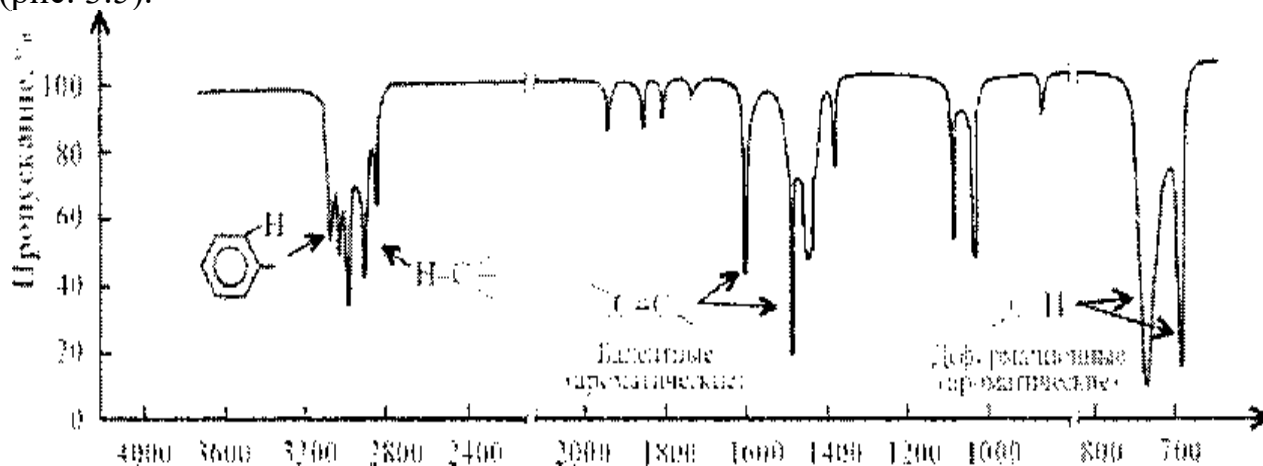


Рисунок 3.5 – ІЧ-спектр толуену

Застосування ІЧ-спектроскопії

Якісний аналіз

Метод застосовують для ідентифікації речовин:

- за характерними максимумами в області "відбитків пальців" при відповідних характеристичних частотах ($600\text{--}1500\text{ см}^{-1}$);
- шляхом порівняння спектру досліджуваної речовини зі спектром речовини-стандарту.

Для визначення структури органічних і неорганічних сполук за характерним поглинанням (максимуму в спектрі) для кожної групи атомів.

Кількісний аналіз

Визначення засновані на використанні закону Бугера-Ламберта-Бера, але сам закон у логарифмічному вигляді не використовується у зв'язку з тим, що дослідження проводять в дуже вузькій кюветі. ІЧ-спектроскопія широко застосовується для аналізу біологічних рідин, зокрема крові та її фрагментів, а останнім часом для діагностики та прогнозування різних захворювань все в зростаючій мірі використовується ротова рідина або змішана слина, проте інтерпретація отриманих результатів ускладнюється у зв'язку з багатокомпонентністю об'єктів дослідження. Крім того, останнім часом метод знаходить все більш широке застосування для характеристики конформаційних і структурних змін білків, ліпідів, фосфоліпідів біомембран клітин, досліджуваних в біоптатах, при цьому використовують волоконно-оптичні методики. За допомогою цього методу можна оцінювати фармакінетику різних лікарських препаратів. Доведено можливість використання показників інфрачервоного спектру для ранньої діагностики стоматологічних захворювань та прогнозування карієсу зубів у дітей. ІЧ-спектроскопія застосовується також і в криміналістиці для вивчення мітохондріального геному при ідентифікації особистості та визначенні батьківства (тому, що ідентифікується генетичний фокус DIS80, який містить змінні числа тандемних дуплікацій).

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

3. Фур'є-спектроскопія

Фур'є-спектроскопія є одним з методів оптичної спектроскопії і відрізняється від класичного методу відсутністю диспергуючого елемента. Використовують перетворення Фур'є де спектр обчислюється за відкликом спектроскопа у просторовій області або за відкликом у часі.

Отримання спектра відбувається у 2 етапи: спочатку, реєструється інтерферограма (реєстрований сигнал фотоприймачем в залежності від різниці

ходу) досліджуваного випромінювання, потім шляхом її Фур'є перетворення обчислюється спектр. У даний час завдяки значним перевагам Фур'є-спектроскопія є найбільш широко застосовуваним методом у дослідженнях.

Фур'є-спектрометр відрізняється від інших спектрометрів можливістю одночасної реєстрації усього досліджуваного спектра. У Фур'є-спектроскопії зміна різниці ходу, інтерферуючих пучків призводить до модуляції інтенсивності монохроматичних складових випромінювання, причому частота модуляції однозначно визначається довжиною хвилі. Сигнал, що виникає при цьому на приймачі являє собою Фур'є-перетворення від функції розподілу енергії по частотах, тобто від спектра експериментального випромінювання. Для отримання звичайного спектра необхідно зробити зворотне Фур'є-перетворення, яке виконується на ЕОМСіОІ.

Складність отримання спектрів на ФС перекривається його *перевагами* над іншими спектральними приладами:

- ✓ Мультиплекс фактор: у Фур'є за кожен певний момент часу отримується інформація відразу про весь спектральний інтервал, тому вона має величину співвідношення сигнал/шум вищу, ніж дифракційні або призматичні прилади.

- ✓ Геометричний фактор: у Фур'є можна використовувати великі тілесні кути у джерела та у приймача, тим самим пропускати велику кількість E при високій роздільній здатності.

- ✓ Висока точність визначення хвильових чисел у діапазоні.

- ✓ Широкий діапазон експериментального спектра.

Недоліки: складність виготовлення та висока вартість.

Термін Фур'є-спектроскопія використовується для того щоб підкреслити, що для отримання звичайного спектру потрібно провести зворотне Фур'є-перетворення. Знаходження спектру за допомогою Фур'є-перетворення потребує використання комп'ютерної техніки з великою потужністю. При традиційному вимірюванні спектру чутливість спектрометра в першу чергу визначається шумом детектора, на фоні якого вимірювання слабких сигналів стає неможливими. У Фур'є-спектрометрах вимірювання проводять багаторазово у часі або просторі. Отриману інформацію аналізують, використовуючи зворотне Фур'є-перетворення. Завдяки багаторазовому вимірюванню інформація про сигнал накопичується і стає можливим проведення вимірювань при набагато меншому відношенні сигнал/шум ніж у звичайних спектрометрах. В оптичних Фур'є-спектрометрах основним елементом є інтерферометр Майкельсона. Джерела складного сигналу не є когерентними, приймач фіксує різні довжини хвиль. При переміщенні дзеркала з постійною швидкістю на вході приймача буде спостерігатися електричний сигнал у вигляді синусоїди, при чому кожна хвиля дає свою власну синусоїду на вході у приймач. У результаті на вході приймача ми отримаємо складний сигнал. При виконанні над отриманим сигналом зворотного Фур'є-перетворення отримаємо спектр вхідного сигналу, який є також спектром випромінювання джерела. Стабілізують швидкість руху дзеркала та забезпечують прив'язку спектрометра до абсолютних значень довжин хвиль за

допомогою використання опорного каналу, який складається з лазера та фотоприймача. Лазер для цього випадку працює, як еталон довжини хвилі.

4. Спектроскопія комбінаційного розсіювання

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

Спектри КР світла дозволяють проводити якісний та кількісний аналізи речовин, ідентифікувати сполуки, виявляти їх у сумішах тощо.

У методі КР зразок опромінюють пучком монохроматичного світла і вимірюють інтенсивність світла, розсіяного під прямим кутом. При цьому в спектрі розсіяного світла специфічним чином проявляються коливальні переходи.

Методи КР- та ІЧ-спектроскопії доповнюють, а не повторюють один одне, оскільки визначаються різними правилами відбору переходів, хоч коливальні стани є такими ж. Коливання, що сильно проявляються в ІЧ-спектрі (сильні диполі) зазвичай слабо проявляються у Раман-спектрі. При цьому, неполярні функціональні групи, які дають дуже інтенсивні раманівські смуги, як правило, дають слабкі ІЧ-сигнали. Наприклад, коливання гідроксильних, карбонільних груп та/або аміногруп дуже сильно проявляються в ІЧ-спектрі й дуже слабо – в Раман-спектрі. Однак подвійні та потрійні «вуглець-вуглецеві»-зв'язки і симетричні коливання ароматичних груп дуже сильні в Раман-спектрі. Тому СКР використовується і у поєднанні з ІЧ-Фур'є-спектроскопією для отримання найбільш повного уявлення про природу зразків.

Спектри КР – це спектри розсіювання. Вони проявляються при електронній поляризації молекул, яка викликана УФ або видимим світлом (100-800 нм). При цьому поляризуюче випромінювання (УФ чи видиме) не повинно поглинатися експериментальною речовиною і має бути монохроматичним (лазер).

Переваги спектроскопії КР:

- вимірювання виконується у видимій ділянці, що вимагає використання більш простої вимірювальної апаратури;
- простота пробопідготовки;
- 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;
- просторова роздільна здатність, краще 1 мкм;
- 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.

Інтенсивність стоксівської лінії є вищою порівняно з антистоксівською, бо основний коливальний рівень більш заселений. КР спектри здебільшого представляють в координатах $I - P(\text{см}^{-1})$ чи $I - A, (\text{мкм})$ (рис. 3.6).

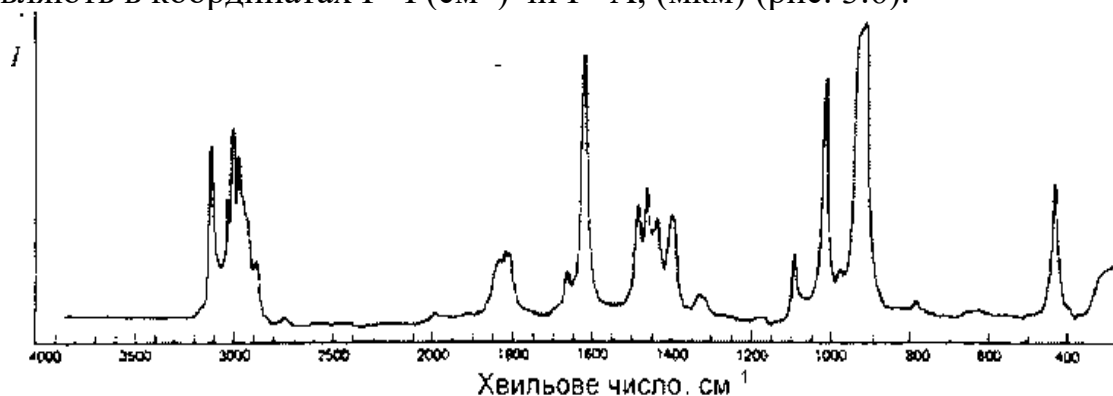


Рисунок 3.6 – Приклад спектру КР

? Контрольні питання та завдання:

1. Дайте визначення таких понять як молекулярна спектроскопія та ІЧ-спектроскопія.
2. Які існують різновиди коливальної спектроскопії та їх відмінність?
3. Які області спектру вам відомі? Які процеси відбуваються в молекулах у різних ділянках спектрів?
4. Для яких агрегатних станів речовин можна застосувати ІЧ-спектроскопічний аналіз?
5. У чому відмінність валентних та деформаційних коливань?
6. ІЧ-спектроскопія відноситься до кількісного чи якісного методу аналізу?
7. На чому заснована ІЧ-спектроскопія?
8. Які переваги ІЧ-спектроскопії над аналізом в УФ- та видимій областях спектру?
9. В якій ділянці інфрачервоного спектру органічних сполук знаходиться область «відбитків пальців»? Чому вона так називається?
10. Застосування коливальних методів аналізу речовин.

Тестові завдання:

1. Які існують види коливальної спектроскопії?

- а) УФ-спектроскопія, спектроскопія КР;
- б) Видима спектроскопія, ЯМР-спектроскопія;
- в) ІЧ-спектроскопія, спектроскопія КР;

г) УФ-спектроскопія, Раманівська спектроскопія.

2. Довжина хвилі 0,8 - 2,5 мкм відноситься до діапазону:

а) Близня 14; б) Середня 14; в) Дальня ГЧ; г) Видима.

3. Для проведення як якісного, так і кількісного аналізу за ГЧ-спектрами необхідно мати спектри ... компонентів.

а) Звичайних; б) Універсальних; в) Не очищених; г) Чистих.

4. Одночасна реєстрація усього досліджуваного спектра можлива завдяки ... і цим він відрізняється від інших спектрометрів.

а) Спектрометра КР;

б) Фур'є-спектрометра;

в) УФ-спектрометра;

г) ЯМР-спектрометра.

5. Методи коливальної спектроскопії допускають дослідження речовин в такому агрегатному стані:

а) Рідина, розчин, кристали;

б) Рідина та розчин;

в) Газ, рідина, розчин, кристали;

г) Тільки кристалічні речовини.

6. Яку ділянку інфрачервоного спектру називають «ділянкою відбитків пальців»?

а) Ділянка валентних коливань простих зв'язків;

б) Ділянка валентних коливань кратних зв'язків;

в) Ділянка валентних коливань простих та валентних коливань кратних зв'язків;

г) Ділянка валентних коливань простих та деформаційних коливань простих зв'язків.

7. Спектральні діапазони в ГЧ- та КР-спектроскопії поділяють на:

а) 4 ділянки; б) 5 ділянок; в) 3 ділянки; г) 2 ділянки.

8. В якому методі аналізу присутній суцільний фон і він є великим недоліком для використання даного методу аналізу?

а) Рефрактометричний аналіз;

б) Фур'є-спектроскопія;

в) УФ-спектроскопія;

г) Спектроскопія КР.

9. Спектроскопія КР заснована на:

а) поглинанні та розсіюванні випромінювання;

б) розсіюванні випромінювання;

в) поглинанні випромінювання;

г) силах струму.

10. Співвідношення сигнал:шум вище у:

а) Фур'є-спектроскопії;

б) ГЧ-спектроскопії;

в) спектроскопії КР;

г) УФ-спектроскопії.

Тема 4

ЕЛЕКТРОННА СПЕКТРОСКОПІЯ. УФ-СПЕКТРОСКОПІЯ. ФЛЮОРЕСЦЕНЦІЯ, ЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Мета: розглянути загальні поняття та принципи електронної спектроскопії. Навчитися аналізувати та користуватися даними електронної спектроскопії, УФ-спектроскопії, флюоресценції, люмінесцентного аналізу.

 **Основні терміни та поняття:** УФ-спектроскопія, молярний та відносний коефіцієнт екстинкції.

План

1. Електронна спектроскопія.
2. Ультрафіолетова спектроскопія.
3. Флюоресцентний метод аналізу.
3. Люмінесценція.

1. Електронна спектроскопія

Електронна спектроскопія – аналітичний метод дослідження електронної структури атомів і молекул та її динаміки, розділ фізики, який вивчає розподіл інтенсивності потоку електронів в залежності від їхньої кінетичної енергії. Електронна спектроскопія поєднує низку експериментальних методів, які дозволяють отримувати спектри електронів для подальшого аналізу. Наприклад, у фотоелектронній спектроскопії реєструють спектр фотоелектронів, що вилетіли із досліджуваного зразка під дією світла.

Молекули речовини володіють певною внутрішньою енергією E , складовими частинами якої є:

- енергія руху електронів E_{el} , що знаходяться в електростатичному полі атомних ядер;
- енергія коливання ядер атомів один щодо одного $E_{кол}$;
- енергія обертання молекули $E_{об}$.

І математично виражається як сума всіх зазначених вище енергій:

$$E = E_{el} + E_{кол} + E_{об} \quad (4.1)$$

При цьому, якщо молекула речовини поглинає випромінювання, то її початкова енергія E_0 підвищується на величину енергії поглинутого фотона, тобто:

$$E_{\Delta} = E_1 - E_0 = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (4.2)$$

З наведеного рівняння випливає, що чим менше довжина хвилі λ , тим більше частота коливань ν , отже, більше E , тобто енергія, повідомлена молекулі речовини при взаємодії з електромагнітним випромінюванням. Тому характер взаємодії променевої енергії з речовиною в залежності від довжини хвилі світла λ буде різний. Енергія, яку повідомляють молекулі речовини випромінювання УФ та видимій частині спектру, достатньо, щоб викликати зміну електронного стану молекули.

Особливістю електронної спектроскопії є мала глибина аналізуючого шару, яка визначається середньою довжиною вільного пробігу електронів від одиниць і десятків атомних шарів для металів до сотень і тисяч шарів для напівпровідників та ізоляторів. Ці можливості методу роблять його незамінним у фізиці, хімії та матеріалознавстві при дослідженні електронної структури, хімічних зв'язків, процесів, які проходять на поверхні в мікроелектроніці, емісійній електроніці, оптиці та інших областях, де визначний вплив на властивості здійснює поверхня.

До електронної спектроскопії належать:

- ✓ Фотоелектронна спектроскопія
- ✓ Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія
- ✓ Фотоелектронна спектроскопія з кутовим розділенням
- ✓ Оже-спектроскопія
- ✓ Дифракція низькоенергетичних електронів
- ✓ Розсіювання низькоенергетичних електронів
- ✓ Тунельна спектроскопія

Методи електронної спектроскопії ґрунтуються на електронних переходах, тобто на переходах між різними електронними станами частинок. Є два основні види цього методу – абсорбційна та емісійна електронна спектроскопія.

Вид електронного спектру залежить від природи частинок, які взаємодіють з електромагнітним випромінюванням. Спектри вільних атомів є лінійчастими і використовуються насамперед для якісного та кількісного елементного аналізу.

Абсорбційний спектральний аналіз включає:

- а) спектрофотометричний,
- б) фотоколориметричний методи.

Спектрофотометричні методи відносяться до числа найстаріших методів аналізу. Поглинання видимого світла деякими речовинами протягом довгого часу використовували для візуальної оцінки їх концентрації. Вже з середини ХІХ століття відомі способи визначення бромід-іонів у природних водах шляхом їх окиснення і подальшої екстракції вільного броду ефіром, методом Несслера для визначення амонію, визначення титану пероксидним і молібдену тіоціанатним методами. Терміном «колориметрія» називали методи визначення елементів шляхом візуального порівняння інтенсивності забарвлення проби з відповідними стандартними зразками із застосуванням мірних циліндрів або візуальних компараторів. Фотоелектрична реєстрація інтенсивності світла, що

пройшов через розчин зразка, розширила можливості методу, дозволивши працювати також в невидимій області спектра.

Спектрофотометричний метод ґрунтується на визначенні спектра поглинання або на вимірюванні поглинання (як в ультрафіолетовій, так і в видимій та інфрачервоній областях спектра) при певній довжині хвилі (монохроматичне випромінювання), яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини.

Сучасна спектрофотометрія – це інструментальний метод, заснований на вимірюванні поглинання електромагнітного випромінювання в ультрафіолетовій (УФ, 200-380 нм), видимій (380-760 нм) і ближній інфрачервоній (ІЧ) областях спектру. У неорганічному аналізі звичайний робочий діапазон – УФ- і видима області спектра, а в органічному – найчастіше УФ-область. Поряд з виконанням кількісних аналітичних визначень спектрофотометричні методи широко застосовуються у фундаментальних дослідженнях, наприклад для визначення складу сполук, величин констант кислотності, основності і стійкості комплексів.

Спектрофотометрія як кількісний метод зобов'язаний своїм бурхливим розвитком технологічному прогресу, створенню нових матеріалів і методів обробки даних. Застосування спеціальної оптики і мікропроцесорної техніки, пов'язаної зі спектрофотометрами, відкрило нові можливості використання приладів при реєстрації та обробці спектрів.

Концентрація речовини може бути визначена безпосередньо, якщо у спектрі є виразно виявлені смуги поглинання в ультрафіолетовій, видимій або інфрачервоній областях спектру. Визначивши коефіцієнт поглинання речовини в певному розчиннику при певній довжині хвилі, яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини, можна визначити її концентрацію.

Фотоколориметрія ґрунтується на визначенні спектра поглинання або вимірюванні світлопоглинання у видимій ділянці спектра і на порівнянні інтенсивності забарвлення досліджуваного забарвленого розчину та стандартного забарвленого розчину певної концентрації. На відміну від спектрофотометрії у фотоколориметричному методі використовують “біле” світло, або “біле” світло, яке попередньо пропускають крізь широкосмужні світлофільтри. Основною перевагою фотоколориметричних методів вимірювання інтенсивності забарвлення є швидкість і легкість визначень при високій їх точності.

2. Ультрафіолетова спектроскопія

Ультрафіолетова спектроскопія (УФ-спектроскопія) – розділ спектроскопії, що займається отриманням, дослідженням і вживанням спектрів випромінювання, поглинання і віддзеркалення в УФ-області спектру від 400 нм до 10 нм. Дослідженням спектрів в області 200-10 нм займається вакуумна спектроскопія. В області спектру 400-200 нм використовують прилади, побудовані на тих же оптичних схемах, що і для видимої області спектру; відмінність полягає лише в заміні скляних призм, лінз і інших оптичних

деталей на кварцеві. При вимірюванні інтенсивності УФ-випромінювання як еталон застосовують джерела, що мають в УФ-області спектру відомий розподіл спектральної яскравості (стрічкова вольфрамова лампа, вугільна дуга, а також синхротронне випромінювання); стандартними приймачами в цій області спектру є термопара і градуйовані фотоелементи.

УФ-спектроскопія застосовується при дослідженні атомів, іонів, молекул і твердих тіл для вивчення їх рівнів енергії, вірогідності переходів та інших характеристик. В УФ-області спектру лежать резонансні лінії нейтральних, одно- й двократно іонізованих атомів, а також спектральні лінії, випромінені збудженими конфігураціями високоіонізованих атомів. Електронно-коливально-обертальні смуги молекул в основному також розташовуються у ближній УФ-області спектру. Тут також зосереджено смуги поглинання у спектрах більшості напівпровідників, що виникають при прямих переходах з валентної зони в зону провідності. Багато хімічних сполук дають сильні смуги поглинання в УФ-області, що створює переваги використання ультрафіолетової спектроскопії в спектральному аналізі. Має велике значення для позаатмосферної астрофізики при вивченні Сонця, зірок, туманностей тощо.

Використання електронних спектрів поглинання для дослідження органічних сполук. Присутність в речовині окремих хромофорних груп можна визначити за електронними спектрами поглинання. Однак ряд різноманітних ауксохормних груп впливає на довжину хвилі смуг переходу та її інтенсивність. Якщо врахувати, що спектральний діапазон для дослідження обмежується довжинами хвиль не меншими як 180-200 нм, то в спектрі відсутні смуги більшості $n \rightarrow \sigma^*$ – переходів, а також $\pi \rightarrow \pi^*$ – переходів ізольованих кратних зв'язків, що залежить від молекулярного оточення. Таким чином, каркас органічних сполук, який складається із одинарних σ - σ -зв'язків, в спектрі не проявляється. Тому метод УФ-спектроскопії для ідентифікації речовин і дослідження їх структури слід застосовувати у поєднанні з іншими методами (ІЧ, ЯМР-, мас-спектрометрії). За допомогою цього методу можна визначити присутність хромофорних груп у молекулі, а для найпростіших сполук вибрати найбільш імовірні варіанти структури.

Якісний аналіз за УФ-спектрами.

Методом електронної спектроскопії можна виявити присутність окремих хімічних сполук шляхом порівняння одержаних спектральних кривих зі стандартними спектрами окремих сполук. При цьому необхідно, щоб усі смуги в спектрі по розташуванні та інтенсивності збігалися зі смугами спектрів еталонних речовин за умови однакових умов зйомки (агрегатний стан речовини, розчинник тощо). Якщо смуги відмінні за інтенсивністю, то це зумовлено зміною молярної маси речовини за рахунок якихось груп, що не проявляються у спектрі. Присутність зайвих смуг свідчить про присутність домішок. Для ідентифікації речовин використовують каталоги спектрів, таблиці смуг поглинання хромофорних груп. Якісний аналіз необхідно виконувати за спектрами проби, взятої у широкому діапазоні довжин хвиль, при різних концентраціях, у різних розчинниках. Якщо проба містить суміш речовин, то

проводити її якісний склад без попередніх даних недоцільно, оскільки можна одержати лише ймовірний результат.

Структурний аналіз за УФ-спектрами.

Проведення структурного аналізу за УФ-спектрами є досить обмеженим, тому потрібно мати додаткову інформацію. Такою інформацією можуть бути дані, одержані іншими спектральними методами, а також не спектральними. Найважливішими з них є такі:

1. Відома брутто-формула. У цьому випадку вдається визначити декілька найімовірніших структур.
2. Відомі дані про синтез, перетворення.
3. Обсяг і вагомість додаткової інформації великі і необхідно лише вибрати одну з двох-трьох альтернативних структур. В останньому випадку структурне дослідження стає реальним.

На розташування та інтенсивність смуг у спектрі сильно впливають розчинник та присутність замісників. Використання даних про вплив цих чинників на електронні переходи допомагає визначити, якому з хромофорів відповідає група.

Критерії віднесення смуг.

Найбільш короткохвильові $\sigma \rightarrow \sigma^*$, а також $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходи характеризуються високою інтенсивністю. Смуги $n \rightarrow \sigma^*$ та найбільш довгохвильового $n \rightarrow \pi^*$ -переходу мають низьку інтенсивність ($\epsilon < 2000$) (рис. 4.1).

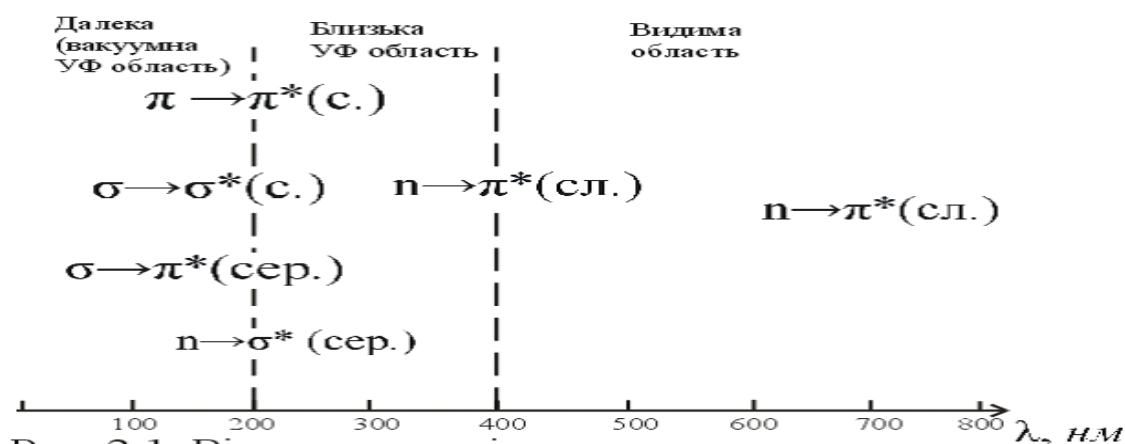


Рис. 2.1. Відносне розміщення смуг електронних переходів у спектрі

Рисунок 4.1 – Відповідне розміщення смуг електронних переходів у спектрах.

На практиці найчастіше досліджують довгохвильові переходи типу $\pi \rightarrow \pi^*$ і $n \rightarrow \pi^*$. Вплив типу замісника у карбоновому ланцюгу біля хромофора та розчинник часто діють на ці два типи переходів протилежно. Для $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу властиве батохромне зміщення смуги при заміні неполярного розчинника на більш полярний, при введенні в молекулу електродонорних груп (CH_3 , OCH_3 та інші).

Гіпсохромне зміщення смуги $n \rightarrow \pi^*$ - переходу спостерігається в розчинниках із високою діелектричною проникністю, при утворенні водневих

зв'язків з молекулами розчинника, приєднанні електродонорної групи до хромофора. У протонних розчинниках внаслідок протонізації пари електронів n-орбіталі смуга $n \rightarrow \pi^*$ - переходу може повністю зникнути.

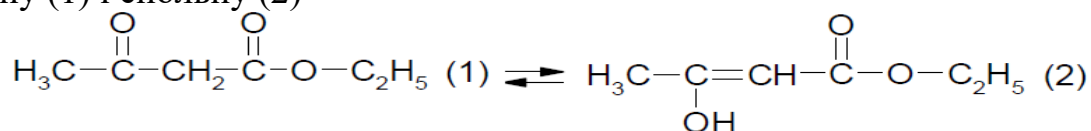
Вибір моделі сполуки за УФ-спектром.

При ідентифікації речовин точно розрізнити вдається лише специфічні хромофори. Поява інтенсивної смуги поглинання у ділянці 210-240 нм є ознакою фрагмента із двох спряжених кратних зв'язків, а при > 670 нм – більше двох спряжених зв'язків. Однак, це не дозволяє встановити природу атомів, вкладених у це спряження.

Дослідження хімічних властивостей речовин часто призводить до декількох структурних формул. При цьому необхідно встановити, які хромофорні групи можуть бути в молекулі речовини. Розглянемо найпростіші приклади використання УФ-спектри для вибору моделі сполуки та визначення ізомера.

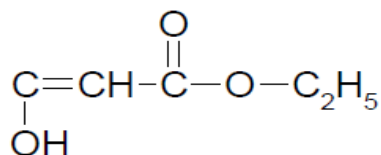
Дослідження ізомерії. При вивченні ізомерії розрізняють ті ізомери, які мають різні хромофорні групи. Приклади:

1. Кето-енольна таутомерія. Ацетооцтовий естер містить дві форми: кетонну (1) і енольну (2)

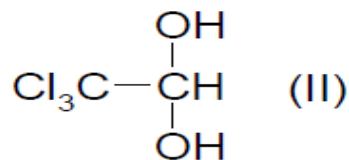
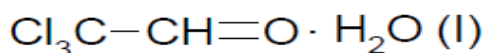


Хромофором у кетоформі є (204 нм) і $\text{C}=\text{O}$ (278 нм).

Енольна форма містить ненасичену естерну групузі спряженими подвійними зв'язками та ауксохромним гідроксильним замісником, який викликає bathochrome зміщення смуги спряження (245 нм). Ця відмінність у спектрах дозволяє виявити, а також визначити кількість фенольної форми в розчині.

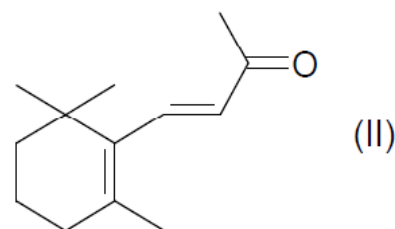
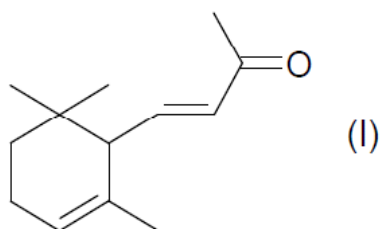


2. Вибір правильної форми хлоральгідрату із двох можливих варіантів (I, II):



Як видно, варіант (II) не містить хромофору. Спектр поглинання молекули хлоралю $\text{Cl}_3\text{C}-\text{CH}=\text{O}$ в гексані має смугу при 290 нм ($\epsilon \approx 33$), яка відповідає карбонільній групі. У водному розчині хлоралю (перехід від хлоральгідрату) ця смуга не спостерігається, отже, правильною є форма (II). Сильно відрізняють ті ізомери, які мають спряжені зв'язки різної довжини.

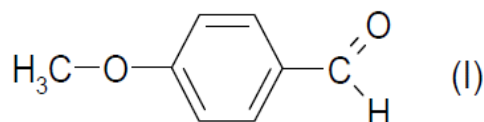
3. У структурі β -іону (II) спряжені три подвійні зв'язки, а у структурі α -іону (I) один подвійний зв'язок ізольований, що зменшує ефект спряження:



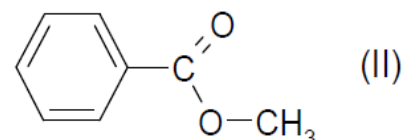
λ : 228 нм ($\epsilon \approx 14000$)

296 нм ($\epsilon \approx 11000$)

4. У молекулі анісового альдегіду (I) у спряження з бензольним кільцем включена пара р-електронів кисню метогрупи ($\text{CH}_3\text{-O}$) і тому спряження сильніше, ніж у молекулі метилбензоату (II):

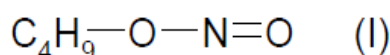


λ : 227 нм ($\epsilon \approx 16000$)

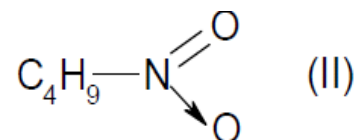


228 нм ($\epsilon \approx 10000$)

Подібний ефект спостерігається в молекулах бутилнітриту (I) і нітробутану (II):



λ : 357 нм ($\epsilon \approx 45$)



277 нм ($\epsilon \approx 25$)

Введено емпіричні правила, що показують, як відрізняються цис- і транс-ізомери. Якщо в молекулі олефінів замісники розташовуються стосовно до подвійного зв'язку в транс-положенні, то часто довжина смуги переходу трохи більша, ніж для цис-ізомеру, а інтенсивність менша. Однак це правило може порушуватись.

У дієнових вуглеводнях дуже відрізняються довжини хвиль смуг переходів для s-цис- та s-транс-положення подвійних зв'язків (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 Смуги $\pi \rightarrow \pi^*$ - переходів ізомерних олефінів та дієнів

Сполука	λ , нм	$lg\epsilon$	Сполука	λ , нм	$lg\epsilon$
цис-2-бутен	175	4,3	s-цис-1,3-бутадієн	253	0,5
транс-2-бутен	177	4,1	s-транс-1,3-бутадієн	214	1
цис-2-гексен (в парах)	176	4,2	цис-2-октен (в гептані)	183	4,1
транс-2-гексен (пари)	179	4,1	транс-2-октен (в гептані)	179	4,1

3. Флюоресцентний метод аналізу

Флуоресценція (від назви мінералу флюорит, у якого вперше була виявлена флуоресценція) – короткочасна (10^{-8} - 10^{-9} с), характерна для рідин і

розчинів. Властивість атомів і молекул поглинати енергію, яка поступає до них із зовні, викликає новий енергійний стан речовини, який називається збудженням. Надлишкова енергія атомів або молекул, отримана при збудженні, може бути витрачена на:

- а) відрив електронів – іонізацію речовини;
- б) будь-які фотохімічні реакції;
- в) нагрівання речовини, тобто перехід надлишкової енергії у теплову;
- г) віддачу всієї енергії або частини її у вигляді світла.

Як правило, більшість твердих речовин при сильному нагріванні світяться. Таке світіння розжарених тіл називають температурним або тепловим випромінюванням. Чим більше енергії за даною температурою поглинає тіло, тим більше воно її випромінює.

Якісний флюоресцентний аналіз.

Флюоресцентний аналіз використовують, як для прямого, так і непрямого визначення.

Прямі визначення ведуть на підставі власної флюоресценції речовини. З неорганічних сполук у розчиненому стані флюоресцюють в УФ світлі солі важких металів Sn^{2+} , Sb^{3+} , Pb^{2+} , Bi^{3+} , In^{3+} тощо. Найбільш яскраву флюоресценцію мають іони лантановидів церієвої групи: самарій, європій, гадоліній, тербій, диспрозій.

Органічні речовини також мають власну флюоресценцію. *Наприклад:* парафін – світло-блакитна люмінесценція; вазелінова олія – світло-бузкова.

Власну флюоресценцію мають адреналін, канцерогенні речовини, багато вітамінів, парафіни

Непрямі визначення.

Використання органічних реагентів для флюоресцентного визначення неорганічних іонів оснований на реакціях 3-х типів:

1) виникнення флюоресценції в присутності досліджуваного іона при використанні нефлюоресцюючого реагента. *Наприклад:* Be^{2+} + морін – яскраво-зелена флюоресценція;

2) зміна спектру флюоресценції в присутності даного катіона. *Наприклад:* морін має власну синьо-зелену флюоресценцію; Al^{3+} + морін – жовто-зелена флюоресценція.

3) гасіння флюоресценції реагенту в присутності досліджуваного катіона. *Наприклад:* Zn^{2+} + родамін-родамінний комплекс – гасіння флюоресценції.

Реагенти для флюоресцентного аналізу приводяться у довідковій літературі. В багатьох випадках для якісної характеристики речовини можна обмежуватися тільки візуальним спостереженням флюоресценції. Задача якісного аналізу стає значно більш складною, якщо розчин складається з кількох флюоресцюючих речовин; в цьому випадку використовують світлофільтри або поєднують флюоресцентний аналіз із хроматографією.

Окрім методи аналізу побудовані на спектральному розкладенні світла флюоресценції та вивченні спектральних характеристик флюоресценції спектрофотометричним методом. Спектральні характеристики дозволяють

відокремлювати одну речовину від інших. Максимум спектру ($\lambda_{\max}$) є якісною характеристикою (рис. 4.2).

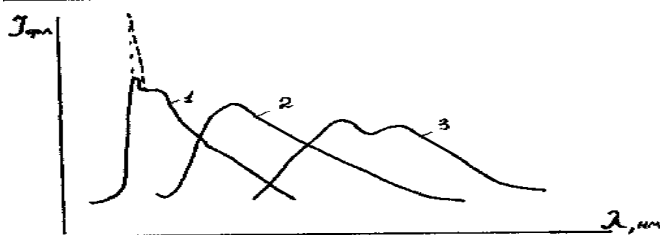


Рисунок 4.2 – Спектри флуоресценції: 1 – стильбену; 2 – α -нафтолу; 3 – дифенілоктатетраєну

Кількісний флуоресцентний аналіз

Кількісний флуоресцентний аналіз (флуориметрія) оснований на залежності між інтенсивністю флуоресценції та концентрацією дослідної речовини. Флуориметричні методи принципово подібні фотометричним й є різновидом оптичних методів аналізу, хоча й мають свої специфічні особливості. Як правило, чутливість флуориметричних методів значно вище фотометричних. Головною умовою успішного використання флуоресцентних реакцій для кількісного аналізу є достатньо повне перетворення поглинутої енергії в флуоресцентне випромінювання. Флуориметричні визначення виконуються як візуально, так і за допомогою приладів.

Візуальний метод визначення.

При візуальному методі визначення порівнюють інтенсивність випромінювання дослідного розчину з випромінюванням стандартних розчинів в ультрафіолетовому світлі. Для цього готують розчин дослідної проби й шкалу стандартних розчинів з відомим вмістом досліджуваного компонента. У всі розчини додають відповідні реагенти й після проходження часу, необхідного для утворення флуоресцюючої сполуки, порівнюють інтенсивність флуоресценції дослідного розчину з шкалою еталонів.

Визначення за допомогою приладів.

При визначенні інтенсивності флуоресценції користуються приладом флуориметром, принцип роботи на якому подібний до роботи на фотоколориметрі.

Обробку аналітичного сигналу проводять методами :

- А) градуувального графіку (якщо в дослідному розчині відсутнє гасіння люмінесценції (домішками або підвищеною концентрацією солей),
- Б) порівняння, В) додатків (якщо присутня деяка кількість гасників (домішок).

Флуоресцентне титрування.

Особливий інтерес для аналізу представляє метод об'ємного титрування із використанням флуоресцентних індикаторів. Перевага цих індикаторів перед звичайними кольоровими індикаторами полягає у тому, що їх можна використовувати при аналізі мутних та/або забарвлених розчинів. У цих розчинах не видно переходу кольору індикатору, тоді як світіння

флюоресцентного індикатору легко спостерігається. Підібрати необхідний індикатор із певним рН області переходу можна за довідником.

Апаратурне оснащення флюоресцентного методу аналізу.

Для вимірювання флюоресценції використовують спектрофлюориметри й флюориметри. Основні вузли приладів:

- *Джерела збудження.* Для збудження флюоресценції використовують ртутно-кварцеві, ксенонові, вольфрамгалогенідні лампи, які дають випромінювання в УФ та видимій областях;

- *Пристрої для виділення спектрального діапазону.* В оптичних схемах приладів передбачені два таких пристрої. Один з них служить для виділення смуги випромінювання, яке збуджує речовину, другий – для виділення певної довжини хвилі (або інтервалу довжин хвиль) з спектру флюоресценції. Для цих цілей використовують призменні або дифракційні монохроматори та світлофільтри;

- *Детектори.* Для детектування флюоресцентного випромінювання використовують фотоелементи, що перетворюють світловий сигнал на електричний та лічильники фотонів.

На рис. 4.3 представлена оптична схема приладу з розташуванням елементів на одній осі. За такою схемою побудовані, наприклад, прилади ФАС-1 та ФАС-2. Всі елементи схеми розташовані на одній осі. Цю схему, як правило, застосовують при збудженні спектру УФ із використанням достатньо довгої кювети. При цьому збуджене світло практично повністю поглинається дослідним розчином. Прилади, побудовані за цією схемою, мають певні недоліки. У довгій кюветі утворюється подвійне поглинання, що приводить до помилкових результатів. При використанні УФ ділянки спектру для збудження флюоресценції спостерігаються помилки за рахунок флюоресценції матеріалу кювети.

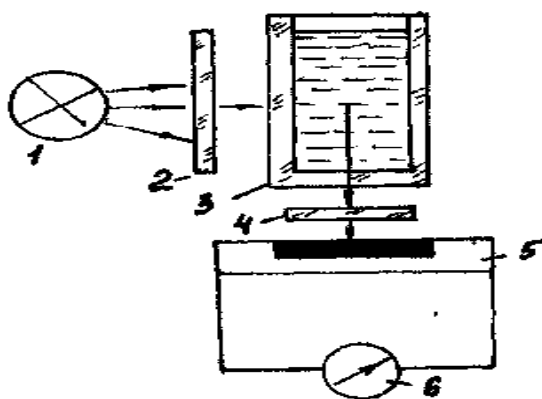


Рисунок 4.3 – Оптична схема приладу з розташуванням елементів на одній осі.

Для візуального спостереження використовують флюоресценції: ртутні, ртутно-кварцеві лампи. Дія їх основана на електричному розряді в парах ртуті, який виникає при певній різниці потенціалів на електродах лампи. За

величиною тиску парів ртуті, лампи поділяють на лампи низького, високого і надвисокого тиску.

4. Люмінесценція

У деяких речовин спостерігається світіння і без нагрівання, при кімнатній температурі, яке називають *холодним світінням* або *люмінесценцією*.

Люмінесценція (лат. *lumen* – світло і *escent* – суфікс, що означає слабку дію) – надлишок над тепловим випромінюванням тіла, тривалість якого перевищує період світлових коливань (10^{-10} с і більше). Люмінесценція здатна проявлятися при нижчих температурах, не використовує теплову енергію випромінюючої системи («холодне світіння»).

На відміну від температурного, люмінесцентне випромінювання є нерівноважним й продовжується відносно тривалий час після припинення дії зовнішнього збуджуючого фактору.

Повне визначення поняття люмінесценції дано С.І. Вавіловим: "*Люмінесценцією* називається надлишок над температурним випромінюванням тіла в тому випадку, якщо це надлишкове випромінювання має кінцеву тривалість приблизно від 10^{-10} сек. й більше". Тривалість післясвітіння для різних люмінесцюючих речовин різна: від мільярдних долей секунди (для окремих атомів та молекул) до годин й навіть кількох діб (для кристалофосфорів).

Явища люмінесценції різні за властивостями й походженням. Різні види люмінесценції визначаються характером енергії збудження, тривалістю і хімічними властивостями люмінесцюючих речовин. У залежності від виду люмінесценції, розглядають наступні види люмінесцентного аналізу:

- фотолюмінесценція (або флюоресценція) – світіння при поглинанні променевої або світлової енергії;
- катодолюмінесценція – визивається бомбардуванням швидкими електронами;
- хемілюмінесценція – світіння в результаті хімічних процесів;
- триболюмінесценція – люмінесценція при терті.

Всі люмінесцюючі речовини мають загальну назву люмінофори. Неорганічні люмінофори називають частіше всього люмінофорами, а органічні – органолюмінофорами. Якщо при виникненні флуоресценції беруть участь кристали, такий вид світіння називають світінням кристалофосфорів. В аналітичній практиці найбільш широке застосування знайшла фотолюмінесценція, точніше, флюоресценція, тобто характерне світіння дослідних розчинів й кристалофосфорів в УФ світлі.

Деякі закономірності люмінесцентного випромінювання

Закон Стокса-Ломмеля: спектр флюоресценції та його максимум завжди зсунутий відносно спектру поглинання та його максимуму в бік довгих довжин хвиль (рис. 4.4). Речовини, які, наприклад, поглинають УФ світло, можуть флуоресцювати будь-яким світлом видимої частини спектру, але речовини, які поглинають синє світло, можуть світитися тільки зеленим, жовтим, червоним,

але не можуть фіолетовим. Крім того, була встановлена дзеркальна симетрія спектрів поглинання та випромінювання для багатьох речовин (*правило Левшина*).

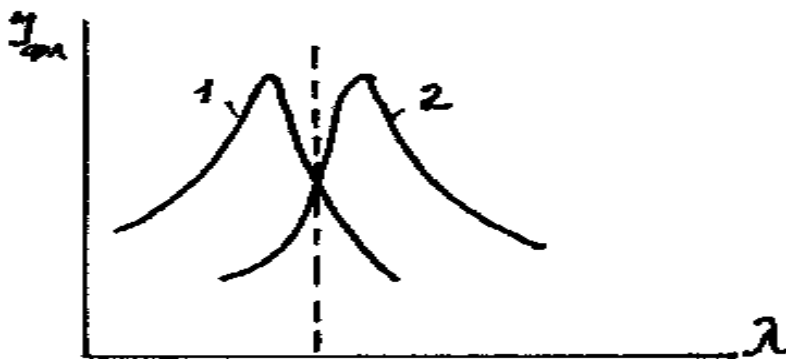


Рисунок 4.4 – Дзеркальна симетрія спектрів

Дзеркальна симетрія спектрів проявляється для складних молекул й відсутня для простих, що зв'язано, можливо, з значними внутрішньомолекулярними взаємодіями складних молекул. Відстань між максимумами спектру поглинання й спектру люмінесценції називають *стоксовим зміщенням*. Чим більша ця величина, тим більш надійне визначення речовини люмінесцентним методом.

Важливою закономірністю люмінесценції є зв'язок між інтенсивністю збуджуючого світла та інтенсивністю люмінесценції, який характеризується енергетичним виходом **B**. Енергетичний вихід – відношення енергії випромінювання (люмінесценції) E_{λ} до поглинутої енергії збудження E_3 :

$$B_e = \frac{E_{\lambda}}{E_3} \quad (4.3)$$

або величиною квантового виходу **B_к**, що дорівнює відношенню числа квантів світла N_{λ} , яке випромінюється до числа поглинутих квантів N_3 при збудженні

$$B_k = \frac{N_{\lambda}}{N_3} \quad (4.4)$$

$$E = h \cdot \nu = h \frac{C}{\lambda} \quad (4.5)$$

Так, як

де **h** – стала Планка, **C** – швидкість світла, то встановлюється залежність між енергетичним виходом **B_е** та квантовим виходом **B_к**:

$$B_e = \frac{E_{\lambda}}{E_3} = \frac{h\nu N_{\lambda}}{h\nu N_3} = \frac{\nu_{\lambda}}{\nu_3} B_k = \frac{\lambda_3}{\lambda_{\lambda}} B_k \quad (4.6)$$

Чим більший вихід люмінесценції для будь-якої певної речовини, тим чутливіша реакція, основана на використанні випромінювання цієї речовини.

С.І. Вавілов встановив залежність енергетичного виходу люмінесценції від довжини хвилі збудженого світла. Вона виражається графічно (рис. 4.5) і формулюється так: при збудженні люмінесценції короткохвильовою частиною

спектру поглинання величина енергетичного виходу зростає пропорційно довжині хвилі збуджуючого світла; потім на певному спектральному інтервалі вихід не змінює своєї величини при зростанні довжини хвилі збуджуючого світла, після чого в області накладання спектрів поглинання й випромінювання відбувається різке падіння виходу.

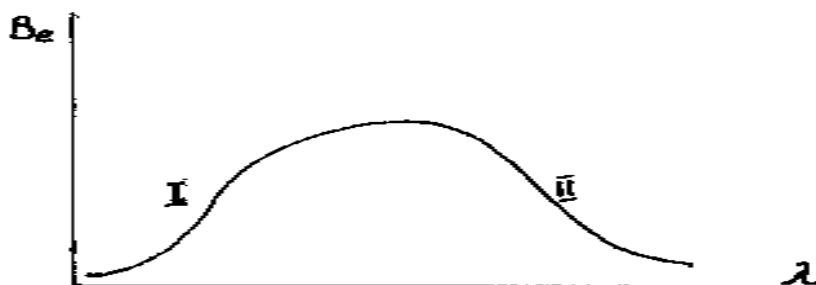


Рисунок 4.5 – Залежність виходу люмінесценції від довжини хвилі збуджуючого світла

Таким чином, квантовий вихід люмінесценції B_k залишається постійним при зростанні довжини хвилі збуджуючого світла до деякого значення, і спектр люмінесценції не залежить від того, якою саме ділянкою спектра збуджується люмінесценція даної речовини.

Ділянка кривої II, яка виражає різке зниження енергетичного виходу люмінесценції, називається *гасінням люмінесценції*.

Гасіння люмінесценції

Концентраційне гасіння.

Енергетичний вихід люмінесценції при малих концентраціях люмінесцюючої речовини пропорційний її вмісту в розчині. Це використовується в кількісному аналізі. Але, з підвищенням концентрації речовини яскравість світіння послаблюється. При досягненні певної концентрації речовини спостерігається повне гасіння люмінесценції. Таким чином, для більшості досліджуваних речовин існує концентраційний бар'єр, що знаходиться в інтервалі концентрацій $10^{-3} - 10^{-4}$ моль/дм³. Із підвищенням концентрації взаємодія між частинками зростає. В результаті збудження при опромінюванні, молекули передають надлишкову енергію іншим молекулам. Змінюються енергетичні рівні молекул, що призводить до можливих не випромінювальних переходів. Концентраційне гасіння зворотнє: при розведенні концентрованих розчинів світіння поновлюється.

Температурне гасіння.

Підвищення температури знижує вихід та інтенсивність люмінесценції органічних молекул і кристалофосфорів, так як при цьому зменшується в'язкість розчинника, підвищується коливальна енергія молекул, послаблюються внутрішньомолекулярні зв'язки, перехід молекули в нормальний стан може відбуватися без випромінювання. Деякі органічні речовини не люмінесцюють при заморожуванні. При зміні температури

випромінювання збудженого кристалофосфору має кілька максимумів, внаслідок переходу електронів у середину кристалічної ґратки.

Гасіння люмінесценції домішками-гасниками. Гасіння люмінесценції при взаємодії люмінофора з гасниками виникає внаслідок утворення нових продуктів і передачі енергії збудження молекулою речовини молекулі гасника. Гасіння в значній мірі залежить від розчинника. Для люмінесцюючих сполук, активними гасниками є: елементарний йод, іони Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ag^+ . Істотно впливають на величину енергетичного виходу й інтенсивність люмінесценції розчинені гази. Гасяща дія кисню найбільш сильно проявляється по відношенню до ароматичних сполук. За силою гасіння можна порівняти з киснем оксид азоту. Азот, аргон, деякі інші гази не впливають на люмінесценцію й навіть запобігають небажаному переходу E в теплоту.

Вплив рН середовища. Інтенсивність флуоресценції та її забарвлення залежать від рН розчину. Загальних закономірностей для цієї залежності навести неможливо. Для деяких флуоресцюючих речовин з підвищенням рН вихід флуоресценції падає, для інших – зростає. Для багатьох речовин з зміною реакції середовища, змінюється й спектральна характеристика флуоресцюючої речовини.

Критерій тривалості, введений Вавіловим, дозволяє відрізнити люмінесценцію від інших видів нетеплового випромінювання: розсіювання і відбивання світла. Тривалість їх менше періоду коливання світлової хвилі ($<10^{-10}$ с). Раніше поняття «люмінесценція» відносили тільки до випромінювання видимого світла, сьогодні воно застосовується до випромінювання у ближньому УФ та ІЧ діапазонах. Фізична природа люмінесценції – випромінювальні переходи електронів зі збудженого стану у стійкий стан. Люмінофори – речовини, що здатні до світіння. Люмінесцентний метод аналізу заснований на здатності речовин випромінювати електромагнітні хвилі певної довжини під дією різноманітних чинників. Довготривала люмінесценція – фосфоресценція, короткотривала – флуоресценція (піко секунди-мілісекунди); за механізмом: резонансна, спонтанна, вимушена, рекомбінаційна; за типом збудження: фотолюмінесценція, кріо-, рентгено- (дія рентгенівських променів), катодо- (збудження електронним пучком), хемі- (в результаті хімічних реакцій); електро- (електричним полем); трібо- (механічними деформаціями), радіо- (проникаючою радіацією), йоно- (прискореними йонами), альфа-люмінесценція (збудження альфа-частинками).

Фосфоресценція виникає внаслідок опромінення речовини світлом, йонізуючим промінням, проходження крізь неї електричного струму, при хімічних реакціях, механічному впливі; пов'язана з існуванням в кристалі таких електронних станів, з яких можливі тільки заборонені оптичні переходи, які характеризуються великим часом життя. Флуоресценція (флюоресценція) виникає внаслідок опромінення речовини світлом, йонізуючим промінням, проходження крізь неї електричного струму, при хімічних реакціях, механічному впливі.

Фотолюмінесценція – світіння, яке виникає під дією світлових променів видимих і УФ частот (жорстке УФ випромінювання 200 нм). Фотозбудження

застосовується для отримання люмінесценції рідких кристалів, скла, твердих порошків (кристалофосфорів), воно зручне для об'єктів з малими і середніми концентраціями люмінесцентної активної речовини. За значних концентрацій активаторів або в розчинах з поглинаючим розчинником воно збуджує тільки поверхневі шари речовини. Щільність УФ і видимих потоків випромінювання в сучасних джерелах збудження люмінесценції відносно невелика. Тому для фотолюмінесценції характерні середні і малі яскравості. Світло рідко використовується для збудження газів, оскільки щільність поглинаючих центрів незначна і при відносно малих потужностях фотозбудження інтенсивність люмінесценції слабка. Найпоширеніша – фотолюмінесценція. Окрім традиційних ефектів поглинання, відбивання та заломлення світла для цього методу характерні також резонансний ефект, флуоресценція і фосфоресценція. Резонансний ефект (резонансна флуоресценція) спостерігається в атомних парах (ртуті, натрію) у деяких простих молекул та в більш складних системах. Випромінювання має спонтанний характер, відбувається з того самого енергетичного рівня, який досягається при поглинанні енергії збуджуючого світла. При збільшенні щільності парів резонансна люмінесценція переходить у резонансне розсіювання.

Чим більший квантовий вихід, тим інтенсивніша люмінесценція, і тим менша кількість люмінісуючої речовини може бути визначена за її світінням. Це пов'язано з процесами гасіння люмінесценції. Лінійна залежність інтенсивності люмінесценції від концентрації буде зберігатися при сталості квантового виходу, інтенсивності збуджуючого світла і ін. Суттєва умова – низька концентрація речовини. Під дією різноманітних факторів можливе відхилення від лінійності, що зменшує квантовий вихід.

Дуже чутливими є люмінесцентні якісні реакції, коли додавання деяких органічних реагентів до розчину неорганічних речовин викликає яскраву люмінесценцію (додавання саліцилової кислоти до розчину солі цинку). Якісний люмінесцентний аналіз заснований на здатності досліджуваної речовини у відповідних умовах люмінесцирувати або гасити люмінесценцію. Виникнення або зникнення люмінесценції зазвичай спостерігається візуально. Перевагою люмінесцентних реакцій є їх винятково низька межа визначення. Також низьку межу визначення і селективність мають так звані реакції отримання кристалофосфорів (реакція утворення перлів бури і фосфатів).

Кількісний люмінесцентний аналіз заснований на використанні співвідношення, яке зв'язує інтенсивність флуоресценції з концентрацією флуоресцируючої речовини. В межах концентрації речовин 10^{-4} - 10^{-6} г/мл залежність інтенсивності від концентрації прямолінійна. Кількісні виміри у флуориметрії засновані на використанні стандартних розчинів речовин (спосіб порівняння або калібрувального графіку). Якщо в якості розчину порівняння застосовується стандартний розчин речовини, то концентрацію досліджуваного розчину (C_x) розраховують за формулою:

$$C_x = \frac{(n_1 - n_2) \cdot C_{\text{std}}}{n_{\text{std}} - n_2} \quad 4.7),$$

де n_1 , n_2 , $n_{ст}$ – відповідно показання флуориметру для досліджуваного розчину; контрольного розчину; стандартного розчину; $C_{ст}$ – концентрація стандартного розчину.

Люмінесцентні індикатори (α -нафтіламін, акридин) змінюють колір або інтенсивність люмінесценції в залежності від властивостей учасників реакції, рН розчину або присутності окисника. Їх застосування дозволило вирішити ряд складних аналітичних задач, пов'язаних з аналізом мутних і забарвлених середовищ (фруктові соки, вина). Збільшується інтенсивність люмінесценції при заморожуванні розчинів, органічних речовин і комплексів металів з органічними лігандами. Для вивчення люмінесценції широко застосовують методи спектрофотометрії. На цих методах засновуються не тільки вимірювання спектрів люмінесценції, а й визначення виходу люмінесценції. Для дослідження люмінесценції велике значення має вимірювання релаксаційних характеристик, наприклад, загасання люмінесценції. Для вимірювання короткого часу загасання (10^{-8} - 10^{-9} с), застосовують **флуориметри**, різноманітні імпульсні методи. Вивчення релаксації тривалої люмінесценції, наприклад, кристалофосфорів, проводиться за допомогою **фосфороскопів** і **тауметрів**. Щоб спектри збудження і спектри світіння не накладалися один на одного, спостереження проводять під кутом 90° .

Схема флуориметра представлена на рис. 4.6. Світло від джерела випромінювання (ртутно-кварцева лампа) проходить через первинний світлофільтр **1** (увіюлеве скло) **2** і падає на кювету **3** з досліджуванним розчином. Приймач світла **5** вимірює люмінесцентне випромінювання під прямим кутом до напрямку збуджуючого світла. Вторинний світлофільтр **4** пропускає світло люмінесценції та поглинає розсіяне світло від джерела збудження.

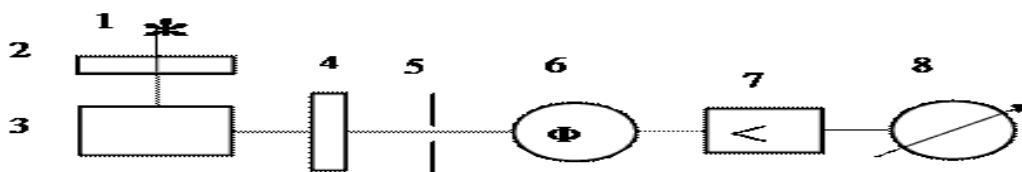


Рис. 10. Схема флуориметра:

Рисунок 4.6 – Схема флуориметра 1 – ртутно-кварцева лампа; 2 – первинний світлофільтр; 3 – кювета; 4 – вторинний світлофільтр; 5 – діафрагма; 6 – фотоелемент; 7 – посилювач; 8 – гальванометр.

Досліджувану речовину освітлюють жорсткими УФ променями (200 нм). Найбільше розповсюдження серед різноманітних джерел випромінювання, які викликають люмінесценцію, отримали газоразрядні лампи (ртутно-кварцеві і ксенонові). Реєстратором може бути око людини, в сучасних пристроях в якості приймача випромінювання використовують фотопомножувачі.

Переваги методу:

– можливість визначення майже всіх елементів, багатьох органічних, біологічно активних та інших речовин (твердих, рідких), вивчення сумішей та визначення мікродомішок;

– різноманітні галузі застосування аналізу (ядерна фізика, рентгеноскопія, фармакологія, вітамінологія, біохімія, криміналістика, сільське господарство, харчова промисловість); створення люмінесцентних фарб, люмінесцентних джерел випромінювання з високим ККД, для кінозйомки, дефектоскопії та електронних приладів; люмінесценція деяких речовин лежить в основі роботи лазерів;

– можливість визначення 10^{-4} мг/л речовини.

Недолік методу – обмежений концентраційний діапазон визначення через гасіння люмінесценції.

? Контрольні питання та завдання:

1. Опишіть взаємодію електромагнітного випромінювання зі сполукою.
2. Дайте визначення УФ-спектроскопії.
3. З чим пов'язано формування широких смуг, а не чітких ліній у молекулярних абсорбційних спектрах в УФ-ділянці?
4. Для чого потрібен диспергуючий елемент?
5. Який принцип роботи спектрофотометра?
6. Дайте загальну характеристику спектральним приладам, назвіть принципи їх класифікації.
7. Яке випромінювання застосовуються в електронній спектроскопії?
8. Яке застосування електронної спектроскопії?
9. Які фактори впливають на інтенсивність люмінесценції?
10. Дайте характеристику наступним поняттям – флуоресценція, фосфоресценція, загальмована флуоресценція.

Тестові завдання:

1. Спектроскопія в оптичній ділянці спектру (ультрафіолетова, видима, інфрачервона) використовується перш за все в наступних випадках:

- а) для визначення концентрації;
- б) ідентифікації речовини;
- в) визначення числа частинок в розчині;
- г) усіх зазначених.

2. Спектрофотометри – прилади для...

- а) аналізу як забарвлених, так і безбарвних речовин з вибіркоvim поглинанням монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- та ІЧ-ділянках спектру;
- б) аналізу забарвлених речовин з вибіркоvim поглинанням монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- та ІЧ-ділянках спектру
- в) аналізу безбарвних речовин з вибіркоvim поглинанням монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- та ІЧ-ділянках спектру.

3. 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;
- г) від 0 до 450 нм.

4. Робочий діапазон більшості спектрофотометрів складає:

- а) 120 – 950 нм;
- б) 190 - 750 нм;
- в) 170 – 700 нм;
- г) 600 – 700 нм.

5. 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.

6. Джерелом випромінювання СФ в діапазоні 190-450 нм є ...

- а) тільки дейтерієва розрядна лампа;
- б) тільки лампа розжарювання;
- в) дейтерієва розрядна лампа + лампа розжарювання.

7. Лінійчатий спектр характерний для.....

- а) газів, пари, рідин, що складаються з багатоатомних молекул;
- б) газів при низькому тиску, що складається з одноатомних молекул;
- в) розжарених твердих і рідких тіл.

8. УФ спектроскопія належить до

- а) оптичної спектроскопії;
- б) молекулярної спектроскопії;
- в) інфрачервоної спектроскопії;
- г) резонансної спектроскопії.

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

- а) хромофорні групи;
- б) ауксохромні груп;
- в) альдегідні групи;
- г) фенольні групи.

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

- а) вид електронних переходів;
- б) структуру молекул
- в) розміри молекули;
- г) масу молекули.

Тема 5

ХРОМАТОГРАФІЯ. ПАПЕРОВА, ТОНКОШАРОВА, ІОНООБМІННА

Мета: розглянути основні принципи хроматографії, навчитися використовувати хроматографічні методи.

 **Основні терміни та поняття:** хроматографічні константи, хроматографічна система, елюент, ряд Штала.

План

1. Хроматографічні методи аналізу.
2. Паперова хроматографія.
3. Тонкошарова хроматографія.
4. Іонообмінна хроматографія.

1. Хроматографічні методи аналізу

Одне з важливих завдань сучасної хімії – надійний і точний аналіз органічних та неорганічних речовин, часто близьких за будовою і властивостями. Без цього неможливе проведення хімічних, фізико-хімічних, біохімічних і медичних досліджень, на цьому значною мірою базуються криміналістична експертиза, екологічні методи аналізу довкілля, а також хімічна, нафтова, газова, харчова, медична та багато інших галузей народного господарства.

Хроматографічні методи посідають особливе місце серед ефективних методів аналітичного аналізу, оскільки найбільш широко використовуються завдяки своїй універсальності – дозволяють провести аналіз складних неорганічних та органічних речовин, що перебувають у газовому, рідкому або навіть твердому агрегатному стані.

Хроматографічні методи аналізу ґрунтуються на різноманітних фізичних і хімічних процесах, які дають змогу розв'язувати складні аналітичні задачі розділення та наступного визначення малих концентрацій близьких за хімічними властивостями речовин.

У якісному аналізі для розділення і виявлення катіонів та аніонів часто використовують площину (паперову, тонкошарову) і йонний обмін у колонках. Перевагою площинних варіантів хроматографії є простота, експресність, наглядність розділення, легкість виявлення хроматографічних зон, можливість аналізувати мікрооб'єкти. Йонний обмін у колонках використовують для відділення катіонів від аніонів у сумішах складного складу.

2. Паперова хроматографія

Принцип методу полягає у розподілі речовин між двома рідкими фазами, одна з яких закріплена на поверхні паперової смуги (нерухома фаза), а друга є

рухомою. Здебільшого нерухомою фазою є вода, яка добре адсорбується на гідрофільній целюлозі, а рухомою – органічний розчинник або суміш розчинників. Отже, хроматографія *на папері* належить до *рідинної розподільної хроматографії*.

Папір для хроматографії має бути хімічно чистим, однорідним і мати певну структуру, яка полягає в орієнтації волокон паперу в одному напрямку. Така структура забезпечує рівномірний рух речовин і розчинника вздовж смуги паперу й отримання чітких хроматограм. Можна використовувати папір марки ватман, щільний фільтрувальний папір тощо. Звичайні сорти паперу є гідрофільними і в повітряно-сухому стані містять 20-22 % води. Тому при використанні води як нерухомої фази спеціальне зволоження паперу не потрібне.

Для розділення нерозчинних або малорозчинних у воді органічних сполук потрібно провести попередню гідрофобізацію паперу просоченням його гідрофобною речовиною або методом ацеталювання. Просочування паперу проводять 1%-м розчином парафіну в петролейному етері, 0,5%-м розчином каучуку в бензолі або 1-2%-м розчином олії у діетиловому етері. Гідрофобний папір зберігають у герметичній посудині в атмосфері парів того розчинника, який буде використовуватися як нерухома фаза. Ацетилують папір обробкою такою сумішшю: 90 мл ацетатного ангідриду, 10 мл петролейного етеру та 8-10 крапель концентрованої сульфатної кислоти. Папір занурюють у цю суміш на 40-45 хв, виймають і промивають проточною водою упродовж 15 хв, потім на 10-15 хв занурюють у дистильовану воду, після чого висушують. Отримання хроматограм на гідрофобному папері називають методом "обернених" фаз. У цьому разі нерухомою фазою є неполярний розчинник (вуглеводень), а рухомою – полярний (спирти, органічні кислоти тощо).

Ефективність розділення речовин методом хроматографії на папері залежить від правильного вибору рухомої і нерухомої фаз, оскільки коефіцієнт розподілу залежить від відносної розчинності речовин у двох фазах. Рідкі фази (розчинники) для хроматографії на папері мають задовольняти певним вимогам, основними з яких є такі:

- рухома і нерухома фази не повинні змішуватись або взаємна розчинність їх має бути обмеженою;
 - компоненти суміші, які розділяються, повинні мати меншу розчинність у рухомій фазі, ніж у нерухомій;
 - коефіцієнти розподілу компонентів суміші між рухомою і нерухомою фазами мають бути різними;
 - склад рухомої фази під час хроматографування не повинен змінюватися.
- Установлено, що використання як рухомої фази суміші розчинників ефективніше, ніж індивідуальних розчинників.

У методі паперової хроматографії розділення речовин відбувається внаслідок розподілення їх між водною фазою, яка міститься в целюлозі, і будь-якою іншою рухомою фазою. У якості рухомої фази застосовують органічні розчинники, воду або розчини електролітів.

Для оцінки хроматографічної поведінки речовин в певних умовах використовують величину R_f , яка дорівнює відношенню відстані l , яку пройшла речовина, до відстані, що пройшов розчинник, L :

$$R_f = \frac{l}{L} \quad (5.1)$$

Зазвичай для розрахунку, R_f вибирають точку у центрі плями. Розділення речовин можливе практично, якщо

$$R_{f(1)} - R_{f(2)} \geq 0,1 \quad (5.2)$$

На величину R_f впливають такі фактори як природа речовини, склад рухомої фази, тип паперу, температура, час хроматографування.

Паперові хроматограми можна одержати шляхом висхідного, нисхідного, горизонтального або радіального руху розчинника. При висхідній хроматографії рухома фаза переміщується знизу догори; рух рідини зумовлений капілярними силами. При нисхідній хроматографії рух відбувається у протилежному напрямку під дією сил гравітації. У горизонтальній або радіальній хроматографії розчинник підводиться до центру паперового диску, куди попередньо нанесена крапля аналізуемого розчину. Кільця на таких хроматографах мають форму еліпсів, оскільки швидкість руху розчинника залежить від орієнтації волокон паперу. Методику проведення аналізу методом паперової хроматографії пояснимо на прикладі розділення і виявлення катіонів одномірним висхідним способом.

Розділення проводять в циліндрах з притертою пробкою, оскільки треба уникати випаровування розчинника зі смужки хроматографічного паперу. Розчинник (суміш HCl-ацетон) завчасно вносять у циліндр для насичення атмосфери камери його парами. На відстані 2 см від краю паперової стрічки (2 x 20 см) олівцем проводять стартову лінію. З капіляра в середині цієї лінії наносять краплю аналізуемого розчину. Діаметр плями звичайно складає 2-3 мм. Пляму обводять олівцем і висушують над пісочною банею.

Стрічку хроматографічного паперу з нанесеною краплею розчину, що досліджується, опускають в циліндр так, щоб її кінець був занурений у розчинник не більше ніж 0,5 см. Процес припиняють після того як розчинник пройде від лінії старту не менше як 10 см. Після цього паперову стрічку виймають, відмічають положення фронту розчинника і ретельно висушують стрічку над пісочною банею. Вимірюють відстань між стартовою лінією і фронтом розчинника L і обчислюють експериментальне значення R_f для кожної плями. Ідентифікацію кожного катіона проводять шляхом порівняння експериментального значення R_f з табличним.

Таблиця 5.1 – Величини R_f деяких катіонів

Катіон	R_f	Катіон	R_f
Cr ³⁺	0,023	Cu ²⁺	0,7
Ni ²⁺	0,13	Zn ²⁺	0,94
Al ³⁺	0,15	Cd ²⁺	1,0
Mn ²⁺	0,25	Bi ³⁺	1,0
Co ²⁺	0,54	Fe ³⁺	1,0

Pb^{2+}	0.70		
-----------	------	--	--

Крім того, таблиця дозволяє визначити, які катіони неможливо ідентифікувати за їх спільної присутності ($R_f < 0,1$). Це, наприклад, суміші Ni^{2+} - Al^{3+} , Zn^{2+} - Cd^{2+} - Bi^{3+} - Fe^{3+} .

Для більшої переконливості у присутності деяких катіонів відповідні зони на хроматограмі обробляють розчинами органічних і неорганічних реагентів-проявників (табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Реагенти для виявлення катіонів на хроматограмі

Катіон	Реагенти	Колір зони
Ni (II)	Диметилгліоксим, пари амоніаку	Червоний
Mn (II)	Бензидин, 2М NaOH	Синій
Co (II)	Насичений калію тіоціонат	Синій
Cu (II)	Калію гексаціаноферат (II)	Червоно-бурий
Pb (II)	Калію йодид	Жовтий
Zn (II)	Дитизон в CCl_4	Червоний
Cd (II)	Натрію сульфід	Жовтий
Fe (III)	Калію гексаціаноферат (II)	Синій
Bi (II)	Суміш 8-гідроксихіноліну і калію йодиду	Помаранчевий
Cr (III)	2 М NaOH, 3% розчин H_2O_2 , бензидин	Синій
Al (III)	Алізарин, пари амоніаку	Рожевий

Капіляром з реагентом для виявлення катіона торкаються тільки до області хроматограми на висоті розміщення зони даного компонента. Поява характерного забарвлення підтверджує присутність катіона в розчині, який аналізується.



Рисунок 5.1 – Прилад для отримання радіальної хроматограми:

1 – паперовий диск, 2 – розчинник, 3 – хвостик

Радіальна хроматографія – різновид одновимірної паперової хроматографії. Як у випадку висхідної хроматографії, швидкість просування речовини по паперу можна охарактеризувати величиною R_f , яка у даному випадку визначається як відношення відстаней, які пройшли речовина і розчинник від центру паперового диска по радіусу.

Радіальну хроматограму одержують в камері, яка складається з двох чашок Петрі однакового діаметра, між якими розміщують паперовий диск дещо більшого діаметра (рис. 5.1).

3. Тонкошарова хроматографія

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) відрізняється від паперової тим, що тонкий шар сорбенту міцно зв'язаний з підложкою зі скла, пластмаси, алюмінієвої фольги. Рухома фаза і компоненти аналізованої суміші з різними швидкостями переміщуються по тонкому (0,1 – 0,5 мм) шару сорбента (силікагель, целюлоза, оксид алюмінію, поліамід, іонообмінники) в одному напрямку під дією капілярних сил. Оскільки в стандартних умовах R_f постійні для даної речовини, їх використовують для ідентифікації компонентів у суміші. Частіш за все метод ТШХ застосовують в органічній хімії для розділення, визначення ступеня очистки та ідентифікації амінокислот, ліпідів, пептидів, вуглеводів, лікарських препаратів тощо. Однак можливим є визначення катіонів практично усіх груп елементів, багатьох аніонів, деяких елементів у різновалентних станах. За технікою виконання хроматографування ТШХ аналогічна паперовій хроматографії.

У тонкошаровій хроматографії розділення речовин ґрунтується на їх розподілі в системі тверда нерухома фаза (адсорбент) – рідка рухома фаза (розчинник) або в системі твердий носій – рідка нерухома фаза – рідка рухома фаза. У першому випадку закономірності розподілу практично аналогічні рідинній адсорбційній хроматографії, у другому – рідинній розподільній.

Розробка нового обладнання для нанесення проб, методів елюювання та кількісного визначення на пластинках увінчалася створенням вискоєфективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ). Швидкість рухомої фази задається зовнішнім пристроєм, хроматографування проводиться у спеціальних камерах. Переваги ВЕТШХ – зменшення тривалості аналізу, мінімальне розмивання плям, максимальна чутливість – зумовлені тими ж факторами, що й у вискоєфективної рідинній хроматографії: зменшенням діаметра зерен адсорбенту і товщини його шару, збільшенням швидкості просування рухомої фази, мінімальним розміром плями на старті (аналогічно розмиванню зони при введенні проби в колонку).

Адсорбент для тонкошарової адсорбційної хроматографії отримують у вигляді часточок діаметром 11-40 мкм або 2-7 мкм для ВЕТШХ і закріплюють у вигляді тонкого шару (200-300 мкм, 100-200 мкм для ВЕТШХ) на інертній підкладці: алюмінієвій фользі, скляній або пластмасовій пластинці. Зазвичай використовують пластинки довжиною 10-20 см і шириною 4-20 см, у ВЕТШХ – відповідно 6 і 6 см. Хроматографію на "мікропластинках" проводять на предметному склі мікроскопів (2,5×7,6 см).

У тонкошаровій хроматографії використовують такі ж самі адсорбенти і рідкі нерухомі фази, що й у колонковій хроматографії для молекулярного розподілу і для іонного обміну. Розчинник (рухома фаза) обирають з урахуванням полярності адсорбенту й компонентів суміші, яка аналізується.

До вимог до рухомої фази додається леткість, тому що рухома фаза має швидко випаровуватись після розділення для подальшого проведення аналізу. У тонкошаровій хроматографії часто застосовують нерухомі рідкі фази, наприклад, воду при розділенні на силікагелевих сорбентах.

Якісний та кількісний аналіз у тонкошаровій хроматографії

Забарвлені сполуки детектують візуально за їх положенням на пластинці. Речовини, здатні до флуоресценції, детектують як плями, що світяться на темному тлі при опроміненні УФ-випромінюванням. Випускаються пластинки, які містять флуоресцентні індикатори. На них можна визначати наявність на хроматограмі безбарвних речовин, які поглинають УФ-випромінювання при 254 нм. Як флуоресцентні індикатори до сорбенту додають силікат цинку, активований манганом, сульфід цинку/кадмію, вольфрамат лужноземельних металів. При ультрафіолетовому опроміненні останні світяться блідо-блакитним світлом, в той час як цинкові сполуки – жовто-зеленим. Органічні індикатори пірен, морин, флуоресцеїн збуджуються при 366 нм. При опроміненні сорбенту індикатори світяться, а речовини поглинають випромінювання й ідентифікуються у вигляді темних плям. Так можна визначати ароматичні сполуки і сполуки зі спряженими подвійними зв'язками. Якщо речовини безбарвні і не здатні флуоресцювати, їх проявляють обробкою хроматограми відповідним реагентом, який утворює з компонентами суміші забарвлені сполуки.

Найчастіше ТШХ використовують у хімічному синтезі та фармацевтиці для підтвердження ідентичності речовин. Для цього на одну пластинку наносять поряд пробу досліджуваної речовини й еталона. Основну пляму на хроматограмі досліджуваного розчину, порівнюють візуально з відповідною плямою на хроматограмі розчину еталона за забарвленням (кольором флуоресценції), розміром і **R_f** обох плям.

Тонкошарова хроматографія має кілька способів, пов'язаних, в основному, з видом руху розчинників.

- Висхідна тонкошарова хроматографія.
- Низхідна тонкошарова хроматографія.
- Горизонтальна тонкошарова хроматографія.
- Радіальна тонкошарова хроматографія.

Види хроматографій зображено на рисунку 5.2.

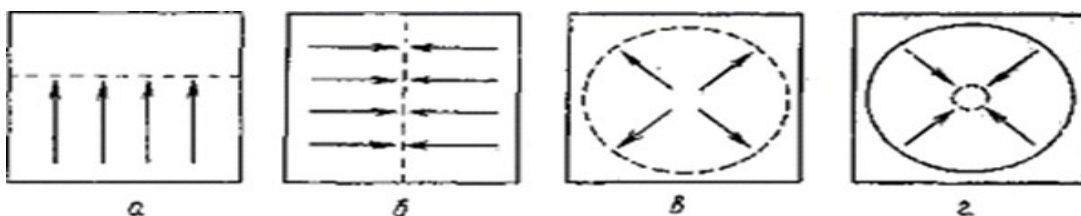


Рисунок 5.2 – Типи елюювання в ТШХ: а – лінійне; б – лінійне (горизонтальне); в – круговий; г – антикругове з подачею на неї елюента з однієї або з обох сторін.

Висхідна тонкошарова хроматографія

Цей вид хроматографії найбільш поширений і заснований на тому, що фронт хроматографічної системи піднімається по платівці під дією капілярних сил, тобто фронт хроматографічної системи рухається знизу–вверх. Для цього методу використовується найбільш просте устаткування, так як у якості хроматографічної камери можна використовувати будь-яку ємність з плоским дном і яка щільно закривається кришкою, в яку вільно поміщається хроматографічна пластинка.

Метод висхідної тонкошарової хроматографії має ряд своїх недоліків. Наприклад, швидкість підняття фронту по платівці відбувається нерівномірно, тобто в нижній частині вона найвища, а в міру підняття фронту зменшується. Це пов'язано з тим, що у верхній частині камери насиченість парами розчинника менше, тому розчинник з хроматографічної пластинки випаровується інтенсивніше, отже зменшується його концентрація і швидкість руху сповільнюється. Для усунення цього недоліку по стінках хроматографічної камери прикріплюють смужки фільтрувального паперу, за яким піднімається хроматографічна система насичує камеру по всьому об'єму.

Деякі хроматографічні камери мають на дні поділ на дві ванни. Це удосконалення дозволяє не тільки зменшити витрату хроматографічної системи (для отримання необхідної висоти хроматографічної системи потрібно менший обсяг) але і використовувати додаткову кювету для розчинника, що збільшує тиск насичених парів в камері.

Недоліком також можна вважати необхідність стежити за фронтом розчинника, так як можливо "втікання" лінії фронту розчинника до верхнього краю. У такому випадку визначити дійсне значення R_f вже не представляється можливим.

Низхідна тонкошарова хроматографія

Цей метод хроматографії заснований на тому, що фронт хроматографічної системи опускається по платівці в основному під дією сил тяжіння, тобто фронт рухомої фази рухається зверху вниз.

Для цього методу у верхній частині хроматографічної камери кріпиться кювета з хроматографічною системою з якої за допомогою гнота на хроматографічну пластинку надходить розчинник, який стікає і відбувається хроматографування досліджуваного зразка.

До недоліків цього методу можна віднести ускладнення обладнання. Цей метод використовується в основному в паперовій хроматографії.

Горизонтальна тонкошарова хроматографія

Цей метод найбільш складний в апаратурному оформленні але найбільш зручний. Так, в хроматографічній камері пластинка розміщується горизонтально і подача системи відбувається на один край пластинки за допомогою гнота. Фронт розчинника рухається у протилежний бік.

Є ще один прийом, що дозволяє гранично спростити камеру. Для цього хроматографічну пластинку на алюмінієвій основі злегка згинають і поміщають в камеру. У даному випадку система буде надходити з двох сторін одночасно.

Для цієї мети підходять лише пластинки з алюмінієвою підкладкою, оскільки пластикова та скляна основа "непохитні", тобто не змінюють форму.

До переваг цього методу можна віднести те, що в горизонтальній кюветі насичення парами системи відбувається набагато швидше, швидкість руху фронту постійна. А при хроматографуванні з двох сторін, фронт не "тікає".

Радіальна тонкошарова хроматографія

Радіальна тонкошарова хроматографія полягає в тому, що в центр пластинки наноситься досліджувана речовина і туди ж подається система, яка рухається від центру до краю пластинки.

4. Іонообмінна хроматографія

До методів розділення, які ґрунтуються на реакціях іонного обміну між твердою або рідкою нерухомою фазою і рідкою рухомою фазою, належать класична іонообмінна хроматографія та високоефективна рідинна хроматографія на іонообмінних сорбентах – йонна хроматографія. До цієї групи методів можна також віднести іон-парну, лігандообмінну, осадову та адсорбційно-комплексоутворювальну хроматографію іонів. Переважна більшість неорганічних і значна частина органічних сполук у водних розчинах дисоціює з утворенням простих гідратованих катіонів, простих і складних аніонів та комплексних іонів. Для їх розділення використовують сорбенти, до складу яких входять іони, здатні обмінюватись на інші іони, що містяться в розчині.

Особливості розподілу іонів між фазами

Позначимо символом R частину іонообмінного сорбенту, яка має один негативний (R^-) або один позитивний (R^+) заряд. Ці заряди на сорбенті компенсовані протиіонами, наприклад іонами H^+ (RH), OH^- (ROH) або іншими катіонами чи аніонами. У першому випадку маємо катіонообмінний сорбент (катіоніт), у другому – аніонообмінний (аніоніт).

Обмін іонів на катіонітах та аніонітах є оборотним процесом і відбувається в еквівалентних співвідношеннях.

Рискою вгорі позначено тверду фазу іонообмінного сорбенту. У загальному вигляді обмін $M^{m\pm}$ на $N^{n\pm}$ можна зобразити рівноважним рівнянням:

Стан іонообмінної рівноваги залежить від сорбційної здатності іонів $M^{m\pm}$ та $N^{n\pm}$ і від їх концентрації в розчині та у фазі іонообмінного сорбенту. Тому рівновага може бути зміщена вправо або вліво зміною активності (концентрації) іонів $M^{m\pm}$ та $N^{n\pm}$ у розчині або у фазі сорбенту. При цьому концентрацію іонів у розчині виражають у моль/л, а у фазі сорбенту – у ммоль/г або в моль/кг. За хімізмом сорбції методи іонообмінної та іонної хроматографії відрізняються від методів, які ґрунтуються на міжфазовому розподілі молекул. Проте загальні закономірності просування зон іонів у фазі сорбенту (в колонці) аналогічні розглянутим для молекулярної хроматографії і, як правило, описуються загальними положеннями теорії хроматографічного аналізу.

Класифікація та властивості іонообмінних сорбентів

Іонообмінники можна розглядати як сорбенти, що складаються з двохчастин – "каркаса" (матриці), котрий не бере участі безпосередньо в реакції іонного обміну, та іоногенних груп, до складу яких входять здатні до обміну іони. Залежно від природи "каркаса" іонообмінники поділяють на дві групи: неорганічні іонообмінні сорбенти (природні мінеральні іонообмінники, синтетичні неорганічні іоніти, окиснене вугілля тощо) та органічні іонообмінні сорбенти (іонообмінні смоли, целюлозоіоніти, рідкі високомолекулярні іоніти тощо). Залежно від природи іоногенних груп іонообмінні сорбенти поділяють на катіоніти, аніоніти, біполярні (амфотерні) іонообмінники та комплексоутворювальні іоніти. Неорганічні іонообмінні сорбенти.

За будовою "каркаса" неорганічні іонообмінники поділяють на два типи: з кристалічною будовою (алюмосилікати, солі гетерополікіслот та ін.) та аморфні сполуки (гідроксиди багатовалентних металів, їх солі тощо). Вони відрізняються між собою за стійкістю до дії кислот, лугів і комплексоутворювальних органічних реагентів, а також за деякими фізичними властивостями. У катіонообмінних сорбентах рухомими іонами найчастіше є Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ та H^+ , а в аніонообмінних – іони OH^- .

Позитивними властивостями неорганічних іонітів є їх стійкість до високих температур і до дії потужного радіоактивного випромінювання. Проте їх обмінна ємність досить мала і як правило не перевищує 0,3-0,5 ммоль/г. Як іонообмінні сорбенти можна використовувати матеріали, розглянуті для молекулярної хроматографії, оскільки один і той самий твердий сорбент часто виявляє як адсорбційні, так і іонообмінні властивості. Нижче наведено короткі характеристики-сорбентів, що виявляють іонообмінні властивості.

Силікагель ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) має кислотні властивості та здатний до обміну катіонів внаслідок заміщення іонів гідрогену гідроксильних груп. Недоліком силікагелю як іоніту є його руйнування в разі використання високоіонних рухомих фаз або рухомих фаз із високим і низьким значеннями рН. А це умови, типові для іонообмінної хроматографії. В цьому випадку застосовують матеріали на полімерній основі. Ємність немодифікованого силікагелю невисока, кількість OH^- -груп залежить від ступеня дегідроксилування поверхні і може помітно змінюватися. Тому доцільніше використовувати модифікований для іонообмінної хроматографії силікагель.

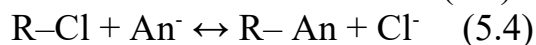
Органічні іонообмінні сорбенти. До цього класу сорбентів належать синтетичні високомолекулярні органічні сполуки – іонообмінні смоли, до складу яких входять іонообмінні (іоногенні) групи, а також целюлозоіоніти – продукти хімічно модифікованих целюлозних порошків та волокнистих целюлоз.

Іонообмінні смоли (іоніти) складаються з вуглеводневого "каркаса" (матриці) та іоногенних груп, хімічно зв'язаних з матрицею. Структура матриці значно впливає на фізичні властивості іонітів, зокрема на їх здатність набухати в різних розчинниках та на кінетику іонного обміну. Перевагами органічних іонітів є стійкість до дії високоіонних, сильнокислих і сильноосновних рухомих фаз; більша обмінна ємність, ніж неорганічних іонітів; більша швидкість

обміну; велика механічна стійкість. Недоліком їх є те, що полімерна структура здатна по-різному набухати або усаджуватись при вбиранні рухомої фази чи при її втраті.

Іонна хроматографія

Іонний обмін полягає в тому, що деякі речовини при контакті з розчином електроліта поглинають з нього катіони або аніони, виділяючи у розчин еквівалентне число інших іонів із зарядом того ж знака. До природних іонообмінників відносяться глини і цеоліти. Синтетичні іонообмінними уявляють собою високомолекулярні матеріали. Майже усі вони мають у якості основи матриці з шитого полістирола. В матриці закріплені іоногенні групи – у катіонообмінників кислотного характеру ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{AsO}_3\text{H}_2$), у аніонообмінників основного характеру ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, $=\text{NH}_2^+$, $\equiv\text{NH}^+$ та інші). Якщо матрицю з фіксованим іоном позначити R, оборотній процес обміну протиіонів на іони розчину можна записати у вигляді реакцій:



Сутність іонообмінної хроматографії можна показати на прикладі аналітичного розділення аніонів і катіонів. Розчин пропускають через колонку з катіоно-обмінником в Н-формі (наприклад КУ 2Х8), при цьому катіони сорбуються, а аніони залишаються в розчині. Після промивання колонки водою проводять елюацію катіонів 4 М HCl.

Класична йонообмінна хроматографія – це метод розділення та аналізу іонних сполук, в якому використовують сорбенти високої ємності (2-5 ммоль/г).

Для елюювання досліджуваних речовин з такого сорбенту необхідні великі об'єми елюенту високої концентрації. У класичній іонообмінній хроматографії, як і в класичній рідинній молекулярній хроматографії застосовують колонки з великим внутрішнім діаметром 10-20 мм, довжиною 10-50 см, з великим діаметром зерна сорбенту 100-200 мкм. Елюент крізь колонку рухається при атмосферному тиску. Як у разі молекулярної хроматографії, так і при розділенні іонів більш результативним є розділення способом високоефективної хроматографії із застосуванням спеціальних хроматографів, які можуть працювати при різних швидкостях потоку рухомої фази під високим тиском.

Іонна хроматографія – це метод високоефективної іонообмінної хроматографії, в якому використовують хроматографи, що дають змогу проводити високоефективні розділення іонів на мікроколонках, заповнених щільно упакованим сорбентом з малим діаметром зерен. Іонна хроматографія реалізується у двох варантах: двоколонковому і одноколонковому. В обох випадках розділення відбувається під тиском до 60 МПа. Детектування виконують за допомогою кондуктометричного детектора, який вимірює електропровідність елюенту й елюату. Електропровідність елюенту має значно відрізнятися від електропровідності досліджуваної речовини для забезпечення

високої чутливості визначення. Якщо елюент має електропровідність меншу, ніж досліджуваний іон, то детектування називають прямим, якщо навпаки – зворотнім.

? Контрольні питання та завдання:

1. Які властивості повинні мати адсорбенти, що використовуються в тонкошаровій хроматографії? Назвіть найпоширеніші адсорбенти в цьому виді хроматографічного аналізу.
2. Який зв'язок існує між коефіцієнтом рухомості R_f і коефіцієнтом розподілу D ?
3. Опишіть техніку виконання площинного хроматографічного аналізу.
4. Як пояснюють самочинне просування рухомої фази вздовж шару сорбенту?
5. Поясніть суть висхідної, низхідної, кругової та двовимірної хроматографії.
6. Яким показником характеризується швидкість переміщення речовини в тонкому шарі сорбенту і як визначають цей показник?
7. В якому агрегатному стані можуть перебувати сорбенти, що використовуються в рідинній колонковій хроматографії?
8. Поясніть принцип приготування нерухомої рідкої фази.
9. Які різновиди хроматографічних методів включає рідинна колонкова хроматографія?
10. У чому полягає суть високоефективної рідинної хроматографії?

Тестові завдання:

1. *Хроматографічні методи аналізу розрізняють за механізмом взаємодії сорбенту і сорбату. Підберіть відповідний механізм розділення для йоннообмінної хроматографії:*
 - а) На різній здатності речовин до йонного обміну.
 - б) На різниці в адсорбційності речовин твердим сорбентом.
 - в) На разній розчинності розділяючих речовин в нерухомій фазі.
 - г) На утворенні відмінних по розчинності осадів речовин, що розділяються з сорбентом.
2. *В газорідинній хроматографії аналізуюча речовина вводиться в потік газу-носія, який повинен відповідати вимогам:*
 - а) Інертністю по відношенню до нерухомої фази і аналізуючих речовин.
 - б) Високій теплопровідності.
 - в) Великій молекулярній масі.
 - г) Швидкістю руху по колонці.
 - е) Спорідненістю до нерухомої фаз.
3. *У методі хроматографії поділ речовин заснований:*
 - а) На здатності розподілятися між рухомою і нерухомою фазою.

- б) На здатності розподілятися між двома рухомими фазами.
- в) На здатності розподілятися між двома нерухомими фазами.
- г) На здатності розчинятися.
- д) На здатності осаджуватися.

4. Для ідентифікації лікарського препарату методом тонкошарової хроматографії використовують параметр:

- а) R_f
- б) n
- в) E, mV
- г) I, A

5. Вкажіть метод хроматографічного аналізу, в якому при дослідженні компонентів лікарської субстанції в якості сорбенту використовують іоніти:

- а) Іонообмінна
- б) Газова
- в) Паперова
- г) Тонкошарова

6. Розділення речовин у методі газо-рідинної хроматографії відбувається за рахунок різної швидкості руху речовин у колонці. Що є рухомою фазою у цьому методі аналізу?

- а) Газ-носій
- б) Твердий носій
- в) Рідкі фази
- г) Вода

7. Рідка нерухома фаза (РНФ) в методі газорідинної хроматографії має відповідати всім нижче перерахованим вимогам крім:

- а) Високий тиск пари РНФ у колонці
- б) Сили взаємодії досліджуваних речовин з молекулами РНФ мають підвищувати селективність фази
- в) Має бути нелеткою, малов'язкою
- г) Має бути термостійкою

8. Проба містить суміш глюкози і маннози. Для ідентифікації цих речовин в суміші доцільно обрати метод:

- а) Хроматографії в тонкому шарі
- б) Поляриметрії
- в) Спектрофотометрії
- г) Полярографії

9. Вкажіть метод хроматографічного аналізу, в якому при дослідженні компонентів лікарської субстанції в якості сорбенту використовують гелі за однаковим діаметром:

- а) Молекулярних сит
- б) Розподільча хроматографія
- в) Паперова хроматографія
- г) Тонкошарова хроматографія

10. Які величини характеризують ефективність колонки у методі газорідинної хроматографії.

- а) Число теоретичних тарілок і ВЕТТ
- б) Час утримування
- в) Утримуваний об'єм
- г) Об'ємна швидкість газу-носія

11. Необхідно виявити, який спирт знаходиться у водному розчині методом ГРХ. Які величини використовують для ідентифікації речовин у методі газо-рідинної хроматографії?

- а) Параметри утримування
- б) Висота хроматографічного піка
- в) Висота еквівалентна теоретичній тарілці
- г) Площа хроматографічного піка

12. Провізор-аналітик проводить аналіз лікарського препарату. У Фармакопейній статті наведено значення величини R_f . Величина R_f є:

- а) Показником рухливості речовини.
- б) Абсолютною характеристикою речовини.
- в) Показником швидкості руху розчинника по шару сорбенту.
- г) Показником сорбційної здатності твердої фази.

13. Для концентрування речовин та розділення їх сумішей застосовують хроматографічний метод. Хроматографія – це метод аналізу, який базується на перерозподілі речовини між:

- а) Рухомою і нерухомою фазами.
- б) Двома рідкими фазами, які не змішуються між собою.
- в) Рідкою і твердою фазами.
- г) Рідкою і газовою фазами.

14. В колоночних (проточних) хроматографічних методах аналізу кількість досліджуваної речовини визначається за:

- а) Площею хроматографічного піка.
- б) Шириною хроматографічного піка.
- в) Часом утримування.
- г) Об'ємом утримування.

15. В основі кількісного аналізу в газовій хроматографії лежить залежність:

- а) Висоти хроматографічного піка і його площі від концентрації речовини.
- б) Часу утримування від концентрації речовини.
- в) Об'єму утримування від концентрації речовини.
- г) Ширини хроматографічного піка від концентрації.

Тема 6

РІДИННА ТА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ. ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ

Мета: розглянути основні принципи рідинної, газової хроматографії та гель-фільтрації, навчитися використовувати дані методи.

 **Основні терміни та поняття:** колоночна хроматографія, капілярна хроматографія, гель.

План

1. Високоефективна рідинна хроматографія.
2. Використання газової хроматографії в аналізі.
3. Гель-хроматографія.

1. Високоефективна рідинна хроматографія

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, англійською мовою – HPLC) – це метод розділення речовин, у якому рухомою фазою є рідина, а нерухомою фазою є тонкодисперсна тверда речовина, або рідина, нанесена на твердий носій, або твердий тонкодисперсний носій, хімічно модифікований введенням органічних груп. Розділення речовин у рідинній хроматографії базується на механізмах сорбції, розподілу, іонного обміну або розділення за розмірами молекул. Воно відбувається у колонці рідинного хроматографа, куди під високим тиском подається рідина.

Колонкова хроматографія – розділення, яке проводять у спеціальних колонках.

Капілярна хроматографія – розділення, яке проводять у спеціальних капілярних колонках (в газорідинній або в газо-твердофазній хроматографії). Рідка фаза або активна тверда речовина наносяться на внутрішні стінки капілярів і діють як нерухома фаза. Ефективність розділення сумішей суттєво підвищується у капілярній хроматографії. Капілярні колонки в газорідинній хроматографії бувають двох типів:

1. Капілярні колонки, що не містять носія. У цьому випадку нерухома рідка фаза розподілена на стінках капіляра. Це можна виконати пропускаючи через колонку капіляр концентрований розчин рідкої фази або випарюючи розчинник із колонки, що повністю заповнена сильно розведеним розчином. Товщина плівки складає 0,01–1 мкм.

2. Капілярні колонки з пористим шаром носія, просоченого рідкою фазою (товщина шару 1–5 мкм). Капілярні колонки можуть бути довжиною 10–100 м і внутрішнім діаметром 0,25–0,35 мм і менше. Приготування капілярних колонок в лабораторії пов'язано з великими труднощами, тому їх доцільно купувати в готовому вигляді. Проба для аналізу в капілярних колонках зменшується в 1000 разів і більше, порівняно з набивними колонками; значно скорочується витрата газу-носія і тривалість аналізу.

Рідинний хроматограф (рис.6.1, 6.2) складається з системи подачі рухомої фази, блока вводу проби, хроматографічної колонки, детектора і реєструючого пристрою. Рухома фаза звичайно подається під тиском із однієї або декількох посудин і протікає через блок вводу проби, колонку, а потім через детектор із заданою швидкістю. Сигнал від детектора перетворюється, підсилюється і реєструється у вигляді хроматограми, аналогічно до хроматограми у газовій хроматографії. Для вводу проби використовують петлеві дозатори, спеціальні мікрошприци або систему автоматичного пробовідбору.

Рідинний хроматограф – це складніший ніж газовий хроматографічний прилад. Це пов'язано з тим, що система подачі елюента містить деякі додаткові вузли: систему дегазації, пристрій для створення градієнту, насоси та вимірювачі тиску. Насоси повинні забезпечити швидкість потоку від 0,1 до 10 мл/хв при тиску до 400 атм.

Температуру хроматографічної колонки підтримують постійною. Склад рухомої фази може або залишатись постійним протягом всього аналізу (*ізократичне елюювання*), або може змінюватись відповідно до заданої програми (*градієнтне елюювання*).

У ВЕРХ звичайно використовують прямі колонки довжиною 10, 15, 25 см з внутрішнім діаметром 4-5,5 мм. У мікроколонкових хроматографах використовують колонки довжиною 5-6 см і діаметром 1-2 мм. Колонки виготовляють зі скла або нержавіючої сталі.

Колонки заповнюють частинками сорбенту або твердого носія, на поверхню частинок якого нанесена тонка плівка рідкої нерухомої фази. Розмір частинок твердого носія становить 5-10 мкм. Твердий носій готують з поверхнево-пористих матеріалів – силікагелю з привитими на поверхні різними функціональними групами, алюмогелю, пористого скла, полімерних сорбентів.

Рідка нерухома фаза, нанесена на поверхню твердого носія, становить 0,75-1,5 % від маси твердого носія. Звичайно для розділення полярних речовин використовують полярні нерухомі фази і малополярні рухомі фази. Неполярні речовини ділять на неполярних нерухомих фазах з використанням полярних рухомих фаз. Рідкими нерухомими фазами служать речовини різної хімічної природи: гліколі, нітрили, силікони тощо.

У ВЕРХ використовують як нормально-фазовий, так і обернено-фазовий варіанти. У першому випадку полярність нерухомої фази вища за полярність рухомої фази, у другому, навпаки, полярність нерухомої фази є нижчою від полярності рухомої фази. Для безперервного контролю складу елюату, який витікає з колонки, у рідинній хроматографії звичайно використовують диференційні рефрактометри, фотометричні, УФ-спектрофотометричні, люмінесцентні і кондуктометричні детектори.

Диференційний рефрактометр – це універсальний детектор. Він дозволяє визначити загальний показник заломлення системи проба-елюент, тобто сигнал дають усі компоненти, показник заломлення яких відрізняється від показника заломлення елюенту. Його чутливість 10^{-6} г, діапазон лінійності становить 4 порядки. Цей детектор чутливий до зміни температури, тому вимагає термостатування.



Рисунок 6.1 – Система високоефективної рідинної хроматографії

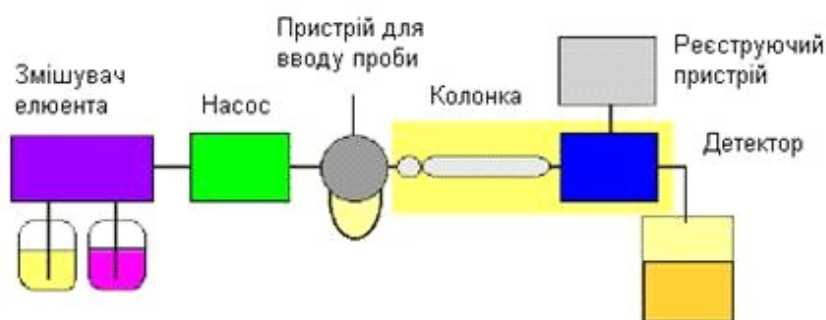


Рисунок 6.2 – Схема рідинного хроматографа

УФ-детектор – працює при одній і тій же довжині хвилі, що відповідає найбільш інтенсивній лінії ртутної лампи низького тиску $\lambda = 253,7$ нм. Флуоресцентна приставка дозволяє збуджувати випромінювання з $\lambda = 280$ нм. УФ-детектор найбільш чутливим є у випадках, коли молярні коефіцієнти світлопоглинання компонентів високі, а елюент не поглинає в ультрафіолетовій області спектру. У цьому випадку можна використовувати метод градієнтного елюювання. При $\lambda = 254$ нм можна визначати будь-які ароматичні сполуки, більшість кетонів та альдегідів ($\epsilon = 20 \cdot 10^4$). УФ-детектор селективний, дає можливість визначати 10^{-9} г, його діапазон лінійності 5 порядків.

Фотометри та спектрофотометри дають можливість працювати при будь-якій довжині хвилі (190-650 нм), вони реєструють зміну поглинання в часі при певній довжині хвилі або в зупиненому потоці елюенту знімають спектр. Швидкозаписуючий спектрофотометр записує всю спектральну область за 20 с. Спектрофотометричний детектор з лінійкою із 211 діодів на підкладці із кремнію дає можливість вимірювати одночасно велику кількість смуг у вузькому інтервалі довжин хвиль. Отриману інформацію обробляє комп'ютер і зберігає в пам'яті для побудови графіка. Флуоресцентні детектори чутливіші від спектрофотометричних приблизно у сто разів. Їх застосовують для визначення мікродомішок.

Кондуктометричний детектор використовують у іонообмінній хроматографії для вимірювання провідності розчинів (Ом^{-1}), пропорційної до числа іонів у розчині, їх рухливості. Сигнал детектора лінійно залежить від концентрації іонів у широкому інтервалі – від $0,01 \text{ мкг/мл}$ до 100 мкг/мл . Високочутливе кондуктометричне детектування з автоматичним записом сигналу дає межу визначення $\approx 10^{-3} \text{ мкг/мл}$. Використання концентруючої колонки дає можливість знизити межу визначення на 2-3 порядки.

Проточний лазерний нефелометр, а також мікрокомп'ютери, які видають результати визначення середніх молекулярних мас за спеціальними програмами, використовують у ексклюзійній хроматографії для аналізу полімерів.

Ідентифікацію речовин у ВЕРХ звичайно проводять одним із таких способів:

- порівняння часу утримування досліджуваної речовини у випробовуваній пробі і розчині порівняння. Розчин порівняння – це розчин чистої досліджуваної речовини, присутність якої передбачається у випробовуваній пробі.

- порівняння відносного часу утримування аналізованої речовини у випробовуваній пробі і розчині порівняння. **Відносний час утримування** – це відношення часу утримування аналізованої речовини до часу утримування речовини, взятої за стандарт;

- порівняння хроматограми випробовуваної проби з хроматограмою розчину порівняння або хроматограмою, наведеною у окремій статті.

Найчастіше використовують перший спосіб. Другий спосіб доцільно використовувати, якщо умови хроматографування є важко відтворюваними. Третій спосіб доцільно застосовувати для препаратів рослинного і тваринного походження.

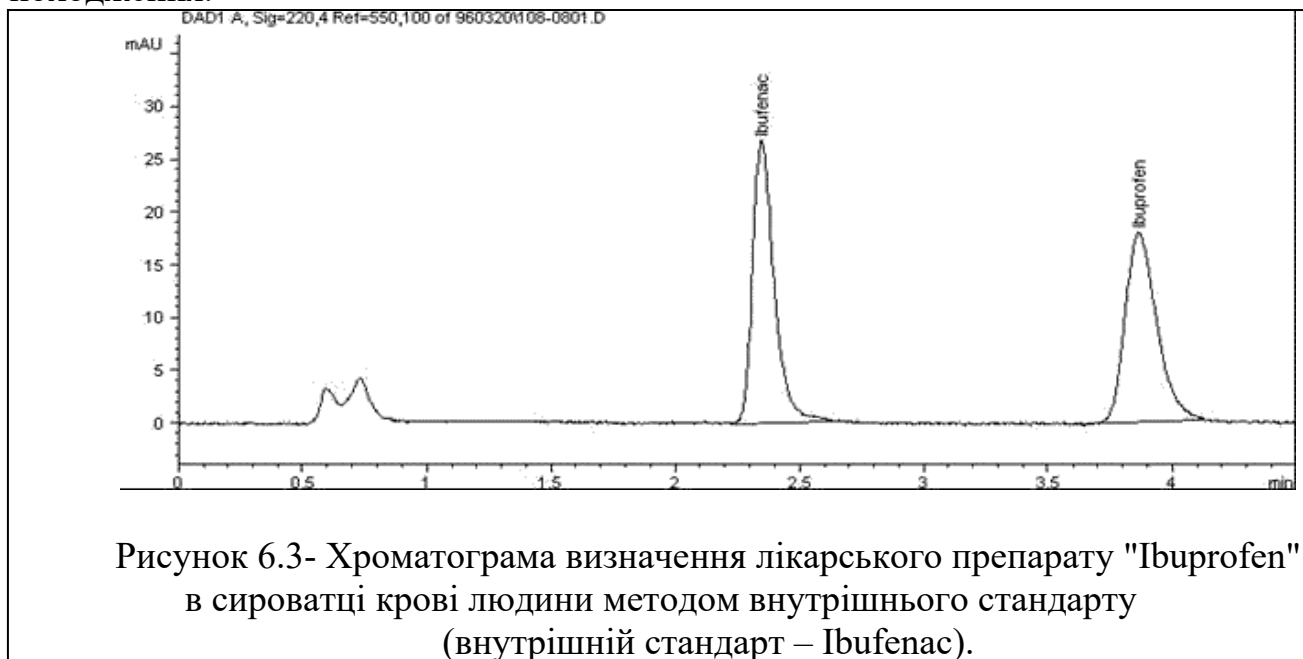


Рисунок 6.3- Хроматограма визначення лікарського препарату "Ibuprofen" в сироватці крові людини методом внутрішнього стандарту (внутрішній стандарт – Ibufenac).

Кількісне визначення проводять методом абсолютного калібрування та методом внутрішнього стандарту.

Абсолютне калібрування. Цей метод полягає у побудові калібрувального графіку залежності площі піків досліджуваної речовини від її вмісту (концентрації) в пробі. Для цього готують ряд стандартних розчинів з різною концентрацією досліджуваної речовини (не менше 5 розчинів кожної концентрації) і аналізують на хроматографі. Для кожного значення концентрації розраховують середнє значення площі піків і будують градувальний графік – графік залежності площі хроматографічного піку досліджуваної речовини від концентрації або вмісту цієї сполуки у розчині. Після цього у тих самих умовах хроматографують досліджувану пробу з невідомою концентрацією (декілька паралельних досліджень), вимірюють площу піку досліджуваної речовини і розраховують середні значення площі піків. За градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованої речовини у випробовуваному розчині.

Метод внутрішнього стандарту. Цей метод полягає у внесенні до розчину досліджуваної речовини внутрішнього стандарту. Внутрішній стандарт (речовина-стандарт) – це, як правило, близька за хімічною структурою до досліджуваної речовини сполука, пік якої на хроматограмі знаходиться поруч з піком досліджуваної речовини (рис. 6.3).

Градувальним графіком цього методу є графік залежності відношення площ піків досліджуваної речовини до площ піків внутрішнього стандарту від вмісту (концентрації) досліджуваної речовини в пробі. Для цього готують ряд стандартних розчинів з різною концентрацією досліджуваної речовини (не менше 5 розчинів кожної концентрації) і однакової концентрації внутрішнього стандарту. З цих розчинів готують проби змішуванням однакових об'ємів розчинів досліджуваної речовини і внутрішнього стандарту, які аналізують на хроматографі. Для кожного значення концентрації розраховують середнє значення площі піків і будують градувальний графік – графік залежності відношення площі піків досліджуваної речовини і внутрішнього стандарту від концентрації або вмісту досліджуваної речовини у розчині. Для випробовуваного розчину пробу готують аналогічно. За градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованої речовини у випробовуваному розчині.

Дані, отримані в результаті аналізу методом ВЕРХ, представляють, вказуючи, звичайно, наступні характеристики: розміри хроматографічної колонки і матеріал, з якого вона виготовлена, тип нерухомої фази, розмір частинок нерухомої фази, температуру колонки, швидкість і склад рухомої фази, тип детектора.

Обов'язковою умовою є попередня перевірка придатності хроматографічної системи для розділення досліджуваної суміші, зокрема:

- відносні часи утримування досліджуваних речовин мають бути близькими до зазначених у методиці величин;
- число теоретичних тарілок (ефективність хроматографічної системи), розраховане за зазначеним піком, має бути не меншим зазначеної величини;
- коефіцієнт розділення зазначених піків, розрахований з хроматограм розчину порівняння, має бути не менше зазначеної величини;

- відносне стандартне відхилення, розраховане для висоти або площі зазначеного піка або їхніх відношень до висоти або площі піка внутрішнього стандарту з хроматограм розчину порівняння, має бути не більше зазначеної величини; для розрахунку відносного стандартного відхилення використовують дані звичайно п'яти паралельних хроматограм.

Результати кількісного аналізу потребують їх статистичної обробки.

Апаратура для рідинної хроматографії. У сучасній рідинній хроматографії використовують прилади різного ступеня складності – від найпростіших систем, до хроматографів високого класу, забезпечених різними додатковими пристроями. На рис. 6.4 представлена блок-схема рідинного хроматографа, що містить мінімально необхідний набір складових частин, у тому чи іншому вигляді, присутніх у будь-якій хроматографічній системі.

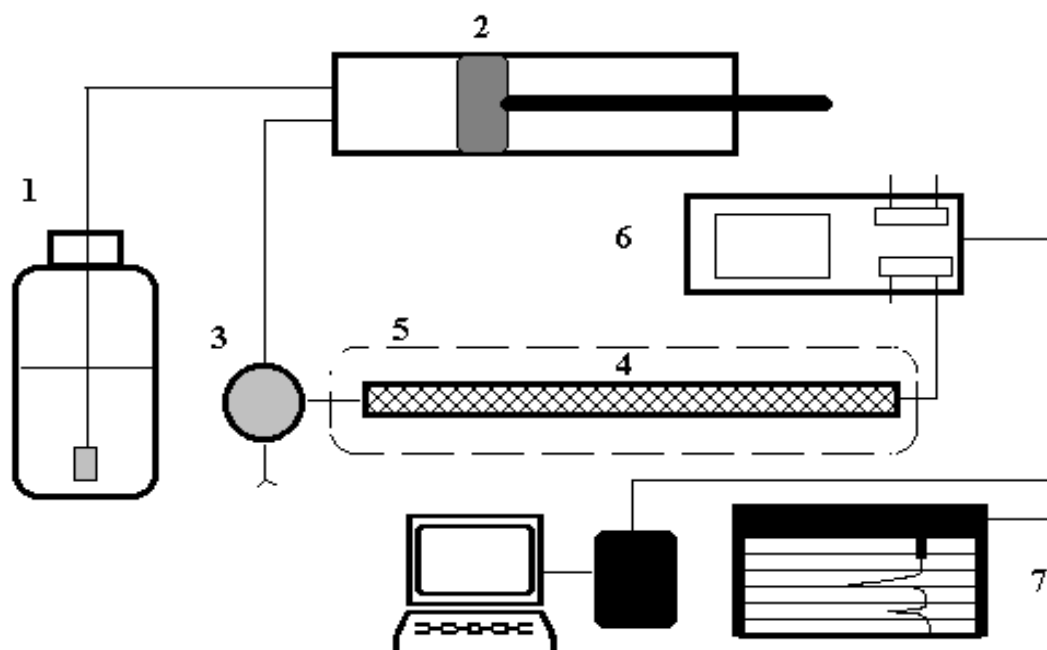


Рисунок 6.4 Блок-схема рідинного хроматографа.

Насос (2) призначений для створення постійного потоку розчинника. Його конструкція визначається, перш за все, робочим тиском у системі. Для роботи в діапазоні 10-500 МПа використовуються насоси плунжерного (шприцевого), або пістоного типів. Недоліком перших є необхідність періодичних зупинок для заповнення елюентом, а друге – велика складність конструкції і, як наслідок, висока ціна. Для простих систем із невисокими робочими тисками 1-5 МПа з успіхом застосовують недорогі перистальтичні насоси, але так як при цьому важко домогтися сталості тиску та швидкості потоку, їх використання обмежене препаративних завданнями. Інжектор (3) забезпечує введення проби суміші поділюваних компонентів у колонку з досить високою відтворюваністю. Прості системи введення проби – "stop-flow" вимагають зупинки насоса і, тому, менш зручні, ніж петльові дозатори, розроблені фірмою Reodyne. Колонки (4) для ВЕРХ представляють собою товстостінні трубки з нержавіючої сталі, здатні витримати високий тиск.

Велику роль відіграє щільність і рівномірність набивання колонки сорбентом. Для рідинної хроматографії низького тиску з успіхом використовують товстостінні скляні колонки. Постійність температури забезпечується термостатом (5). Детектори (6) для рідинної хроматографії мають проточну кювету, в якій відбувається неперервне вимірювання якої-небудь властивості протікає елюента. Найбільш популярними типами детекторів загального призначення є рефрактометри, що вимірюють показник заломлення, і спектрофотометричні детектори, що визначають оптичну щільність розчинника на фіксованій довжині хвилі (як правило, в ультрафіолетовій області). До переваг рефрактометрів (і недоліків спектрофотометрів) слід віднести низьку чутливість до типу визначається з'єднання, яке може і не містити хромофорних груп. З іншого боку, застосування рефрактометрів обмежено ізократическіми системами (з постійним складом елюента), так що використання градієнта розчинників у цьому випадку неможливо. Колонки для ВЕРХ, які найчастіше використовують в аналізах забруднювачів навколишнього середовища, мають довжину 25 см і внутрішній діаметр 4,6 мм, Заповнюються вони сферичними частинками силікагелю розміром 5-10 мкм з прищепленими октадецильними групами. В останні роки з'явилися колонки з меншим внутрішнім діаметром, заповненими частками меншого розміру. Використання таких колонок призводить до зменшення витрат розчинників і тривалості аналізу, збільшення чутливості та ефективності поділу, а також полегшує проблему підключення колонок до спектральним детекторів. Колонки з внутрішнім діаметром 3,1 мм постачають запобіжним картриджем (форколонкой) для збільшення терміну служби та поліпшення відтворюваності аналізів. Як детектори в сучасних приладах для ВЕРХ використовуються зазвичай УФ-детектор на діодній матриці, флуоресцентний і електрохімічний. Слід мати на увазі, що в практичній роботі поділ часто протікає не за одним, а за декількома механізмами одночасно.

2. Використання газової хроматографії в аналізі

Методи газової хроматографії доповнюють можливості ВЕРХ і навпаки. Методом газової хроматографії можна розділяти і аналізувати *термічно стійкі та леткі речовини*, тобто речовини з температурами кипіння до 400 С, молекулярною масою до 400 а.о. В основному це органічні сполуки. Нелеткі та полярні сполуки аналізують методом ВЕРХ. Деякі органічні сполуки з помірною леткістю та полярністю, можна аналізувати як ГХ, так і ВЕРХ. Це ароматичні аміни, триазини, фталати, вітаміни, гліколі, бензидини, антиоксиданти, нітрили, альдегіди, кетони.

Методом ГХ можна проводити розділення, якісний і кількісний аналіз, препаративне розділення. Також можна досліджувати фізико-хімічні параметри та властивості речовин: коефіцієнти розподілу, ізотерми сорбції, структуру сполук, пружність пари, температуру кипіння, площу поверхні, полярність тощо.

Будова та принцип роботи газового хроматографа

Лабораторні газові хроматографи призначені для аналізу газових і рідких сумішей органічного та неорганічного походження. Розділення компонентів може відбуватися в ізотермічному або програмованому режимах нагріву колонок. Для детектування використовуються різноманітні детектори. Сигнал детектора за допомогою відповідного інтерфейсу перетворюється в цифрову форму для наступної комп'ютерної обробки.

Принципова схема хроматографа наведена на рис. 6.5. Газ-носіє із балону через стандартний балонний редуктор потрапляє на вхід пневматичного модуля і далі – у випарник. Проба (рідка або газова) вводиться у випарник, там підхоплюється газом-носієм і потрапляє до колонки.

Серцем будь-якого хроматографа є хроматографічна колонка, яка розташовується у термостаті. Через колонку постійно тече потік газу-носія. Цей потік можна регулювати вручну або автоматично. В колонці сполуки розділяються і по черзі потрапляють у детектор на виході з колонки. Сигнал детектора обробляється комп'ютером і подається як залежність сигналу від часу розділення.

Термостат може підтримувати температуру від -80 до 450°C. Температура термостату під час хроматографування може бути або сталою, або програмованою, тобто змінюватися з певною швидкістю.

Сучасний газовий хроматограф керує газовими потоками випарників, детекторів за допомогою вмонтованої системи *електронного керування потоками газів* (ЕКПГ).



Рис. 1.2. Схема будови газового хроматографа

Рисунок 6.5 – Схема будови газового хроматографа

Треба зауважити, що хроматографа як окремого приладу не існує, так як і комп'ютера. Існує хроматографічна система в певній конфігурації або комплектації.

Характеристики хроматограми

Під час хроматографування на екрані комп'ютера записується *хроматограма* – залежність сигналу детектора від часу аналізу. Хроматограму інакше ще називають кривою елюювання. На рис. 6.6 схематично зображено хроматограму одного компонента, що утримується, і одного, що не утримується.

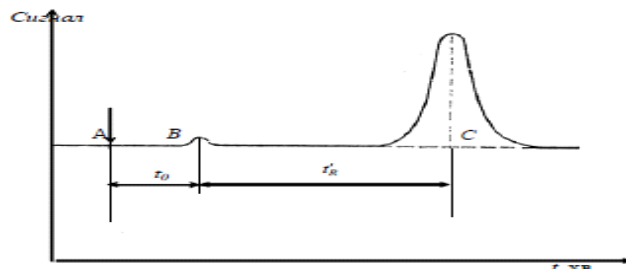


Рис. 1.3. Хроматограма:
А – момент введення проби; **В** – пік речовини, яка не сорбується;
Сигнал – сигнал детектора

Рисунок 6.6 – Хроматограма: а-момент введення проби; в-пік речовини, яка не сорбується; сигнал-сигнал детектора

В деякий момент часу **А** ($t=0$) у колонку вводять речовину і пропускають газ-носії з сталою швидкістю. Інтервал часу від моменту введення проби до досягнення максимуму піку називають часом утримування t_R . Час утримування аналіту визначається не тільки часом його перебування у сорбенті, але й часом перебування поза сорбентом (t_0) у мертвому об'ємі: між зернами сорбенту або в порожнині капіляру, у випарнику, у детекторі. Це не ефективний час, тому його називають мертвим. Він дорівнює часу виходу з колонки компонента, який зовсім не утримується. Вільний час (t_0) хроматографічної системи в цілому залежить від геометричних розмірів колонки: довжини, діаметру, для набивних колонок – від діаметру зерна сорбенту та щільності його упакування, для капілярних – від величини порожнини колонки. Також t_0 прямо пропорційно залежить від об'єму лайнеру і об'єму комірки детектора. Через це в хроматографічних системах з однаковою нерухомою фазою, але з різними геометричними розмірами колонки, інжектора і детектора, вільний час може бути різним. Тому справжню сорбційну здатність даної хроматографічної системи, від якої залежить швидкість просування речовини, характеризують так званим виправленим часом утримування t'_R .

Знаючи об'ємну швидкість потоку рухомої фази **F**, можна обчислити утримуваний об'єм **VR**:

$$VR = t_R F \quad (6.1).$$

За дотримання однакових умов проведення хроматографічного виправлений час утримування t'_R є характеристичною величиною для кожної речовини. Його використовують для ідентифікації компонентів суміші.

Для кількісного хроматографічного аналізу використовують висоту (**h**) хроматографічного піку або його площу (**S**).

3. Гель-хроматографія

Гель-хроматографія – особлива форма хроматографії, що дозволяє розділити молекули за їх розміром, формою і молекулярною масою. Як сорбент використовують пористе скло, частки силікагелю або полімеру, полісахариди. Розмір часток сорбенту 5-10 мкм, а розмір пор, в залежності від природи сорбенту, в межах 102-106 Å.

Вибір рухомої фази залежить від типу нерухомої фази. Гель-хроматографічні системи розділяють на гель-фільтраційну і гель-проникаючу хроматографію. В гель-фільтраційній хроматографії проводять розділення водорозчинних речовин на гідрофільних сорбентах; в гель-проникаючій хроматографії застосовують гідрофобні сорбенти, і відповідно, неполярні органічні розчинники і проводять розділення сполук, малорозчинних у воді.

На відміну від усіх методів рідинної хроматографії, гель-хроматографія не базується ні на хімічній, ні на фізичній взаємодії з нерухомою фазою. В гель-хроматографії розподілення молекул між нерухомою і рухомою фазами ґрунтується на розмірі молекул та частково на їх формі і полярності.

При взаємодії молекул з пористою нерухомою фазою розрізняють два крайніх випадки. Молекули з діаметром, більшим, ніж середній діаметр пор, повністю виключаються з сорбенту і рухаються в потоці елюенту. Молекули з діаметром, значно меншим, ніж пори сорбенту, можуть вільно проникати крізь нього і залишаються в нерухомій фазі найдовший проміжок часу і тому виходять останніми. Молекули середнього діаметру проникають в пори сорбенту в залежності від розміру і, в певній мірі, від форми молекули. Вони виходять з різним часом утримування між піками двох крайніх випадків.

Принцип гель-хроматографії приведений на рис. 6.7.

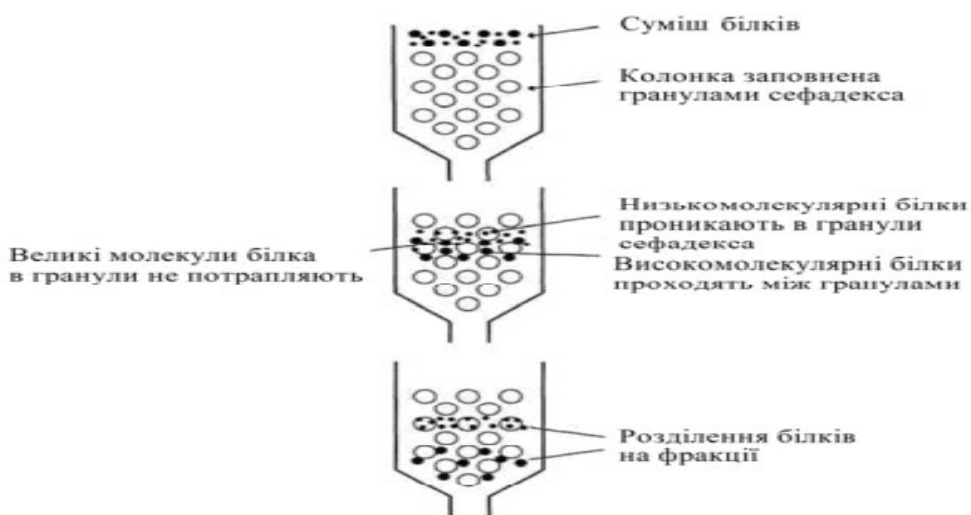


Рисунок 6.7 – Принцип гель-хроматографії

Гель-хроматографія використовується для визначення речовин з відносною молекулярною масою більше 2000. У випадку гель-фільтрації розділяють природні високомолекулярні речовини від більш низькомолекулярних сполук і солей. Наприклад, білки можуть бути відділені

від амінокислот та низькомолекулярних пептидів. Гель-проникаюча хроматографія використовується для розділення гомологів і олігомерів. Наприклад, можна розділити жирні кислоти з відносною молекулярною масою між 100 і 350.

Гель-хроматографія (ексклюзійна, молекулярно-ситова) є різновидом рідинної хроматографії, в якій розділення компонентів суміші ґрунтується на розподілі молекул відповідно до їхніх розмірів між розчинником, який знаходиться в порах сорбенту, і тим самим розчинником, який тече між його гранулами. Отже, на відміну від усіх інших методів хроматографічного аналізу, в гель-хроматографії нерухомою і рухомою фазами є одна й та сама речовина-розчинник.

Механізм розділення компонентів суміші. У процесі розділення невеликі за розміром молекули дифундують у сорбент, у порах якого знаходиться рідка нерухома фаза, а великі молекули, розмір яких перевищує діаметр пор (каналів) сорбенту, не проникають у нього і вимиваються з колонки рухомою фазою. Отже, ефективність розділення речовин залежить від розміру їх молекул та розміру пор сорбенту.

Носії. Хроматографію, яка ґрунтується на розподілі молекул відповідно до їх розмірів, у літературі називають по-різному: молекулярно-ситовою, якщо для розділення молекул використовують цеоліти, які інакше називають молекулярними ситами; гель-проникною, якщо для розділення застосовують полімерні сорбенти, які набухають в органічних розчинниках (полістирол), або гель-фільтраційною у випадку використання сорбентів, які набухають у воді (сефадекс). Носії, які застосовують у гель-хроматографії, повинні мати строго певний розподіл розміру пор, що дає змогу використати їх для розділення сумішей речовин, молекули яких мають певний розмір. Адсорбційна здатність носія має бути мінімальною. Час утримування речовин повинен визначатися лише так званою *інклюдзією* (проникненням) або *ексклюзією* (непроникненням) молекул у пори.

Характеристикою пористості гелю є ступінь набухання (ємність за розчинником) S_r , тобто кількість розчинника у г, яку поглинув 1 г сухого гелю. У гель-хроматографії як носії використовують: м'які гелі – органічні полімери, такі як целюлоза, полістирол, полідекстран, агароза, поліакриламід, які сильно набухають і мають високу ємність за розчинником; жорсткі гелі, такі як силікагель, скло, які мало або зовсім не набухають і мають фіксований розмір пор. Перевагу віддають органічним гелям, на яких сорбція речовин відсутня або незначна. Процес розділення зумовлений практично тільки розмірами пор сорбенту і розмірами молекул сорбатів. Носії на основі силікагелів менш зручні, через те що на розділення речовин впливає також їхня адсорбційна здатність, яку важко передбачити.

Для розділення речовин із водних розчинів зазвичай використовують гідрофільні гелі на основі декстрину – поліатомного спирту, який складається із залишків глюкози. Декстрини, зшиті нитками епіхлоргідрину, підготовлені для хроматографії мають фірмову назву – сефадекси. Розділення з органічних розчинників проводять на гідрофобних полістиролах, що мають різний ступінь

зшивання (стирогель, поражель тощо). Для детектування сполук у гель-хроматографії можна використовувати спектрофотометричний і рефрактометричний детектори. Частіше застосовують рефрактометричний детектор, оскільки він є універсальним і витримує високі температури, необхідні для аналізу високомолекулярних важкорозчинних полімерів.

Використання гель-хроматографії

Передусім гель-хроматографію застосовують для відокремлення дуже великих молекул, розміри яких значно більші за розміри пор сорбенту, від малих молекул (іонів), які вільно проникають у фазу сорбенту. Такий процес відбувається, наприклад, при знесоленні білків та інших природних високомолекулярних сполук або при очищенні гемоглобіну від кухонної солі. Гель-хроматографія знайшла широке застосування для розділення близьких за розмірами молекул органічних речовин, наприклад, тригліцеридів. Цей різновид хроматографії використовують також для розділення комплексних сполук металів, зокрема тих, що утворюються в природних водах з органічними лігандами різної молекулярної маси. Нарешті, гель-хроматографію застосовують для визначення молекулярних мас органічних сполук, полімерів синтетичного та природного походження і комплексів металів з високомолекулярними органічними лігандами.

Афінна хроматографія

Очищені білки широко використовують у фармацевтиці і дослідницькій діяльності, тому отримання високочистих білкових препаратів є важливою лабораторною задачею. Ензим, що цікавить дослідника, знаходиться у клітинах у невеликих кількостях разом з іншими білками, які часто мало відрізняються один від одного за фізико-хімічними властивостями. Це робить процес їх розділення можливим лише при застосуванні низки різнорідних трудомістких операцій (осадження, екстракція, гель-хроматографія тощо).

Ензимам притаманна певна активність, наприклад ферментативна, імунологічна, або вони мають специфічну спорідненість до іншого білка чи небілкової сполуки, з якою вони взаємодіють у ході біохімічної реакції. Біохімічні реакції специфічні. Ферменти, які прискорюють певну реакцію, взаємодіють тільки з тими субстратами, які задовольняють їхнім структурним вимогам, тобто ферменти розпізнають лише "свої" субстрати. Так само антитіла розпізнають лише "свої" антигенні детермінанти з дуже високим ступенем вибірковості.

Отже, ферменти, антитіла, цукри – органічні сполуки природного походження – можуть селективно і зворотно взаємодіяти одна з одною за рахунок точної стеричної придатності і паралельно діючих полярних, неполярних, іонних та водневих взаємодій, тобто ці сполуки розпізнають одна одну у природних рідинах. Цю особливість біохімічних реакцій використовують в афінній хроматографії, яку ще називають хроматографією за біоспецифічною спорідненістю.

Один із компонентів біохімічної реакції, його називають афінним лігандом, прищеплюється до поверхні сорбента. Афінними лігандами можуть бути різноманітні сполуки: білки (антигени, інгібітори ферментів, антитіла,

білки-репресори), нуклеїнові кислоти, нуклеотиди, стероїди. Носії та способи прищеплення афінного ліганду до них. Носії мають задовольняти таким вимогам:

- нерозчинність;
- адсорбційна інертність;
- достатня пористість і велика питома поверхня;
- механічна стійкість;
- хімічна стійкість в умовах, необхідних для сорбції і десорбції;
- стійкість до дії ферментів і мікробів.

Як носії використовують целюлозу, декстранові гелі, агарозу, поліакриламід, скло, силікагель тощо.

Отже, в афінній хроматографії до поверхні носія прищеплюють *афінний ліганд*, який за рахунок біоспецифічної спорідненості може приєднувати певну органічну сполуку природного походження. Особливості поведінки біополімерів у розчинах зумовлюють специфічні особливості афінної хроматографії та її переваги. Молекули певного білка мають сталу конфігурацію. Вона задана первинною структурою білка, тобто послідовністю амінокислот, поєднаних пептидними зв'язками.

Активна конфігурація білкових молекул підтримується великою кількістю слабких (нековалентних) вандерваальсових і водневих зв'язків, що зумовлює термодинамічну стабільність системи. Біологічно важливі взаємодії виникають на малих відстанях (0,3-0,5 нм). Якщо конфігурація двох молекул така, що їхні поверхні можуть стикатися великою кількістю атомів, то виникає сильна взаємодія. Послідовність розділення в афінній хроматографії включає: пропускання проби крізь колонку, вимивання речовини, яка не взаємодіє із сорбентом, елюювання досліджуваної сполуки з колонки. Для оптимальної сорбції нерозчинний носій повинен мати достатньо пористу поверхню, щоб макромолекула мала достатній простір для взаємодії з афінним лігандом. Важливими є також стеричний фактор, концентрація ліганду, іонна сила, рН, швидкість потоку. Елюювання є особливим етапом в афінній хроматографії, оскільки більшість звичайних розчинників не забезпечує вимивання речовин із колонки.

Органічні розчинники, які спричинюють денатурацію білків, є несумісними з більшістю матеріалів афінної хроматографії на основі ферментів. Процес денатурації часто є незворотним. Тому на етапі елюювання слід застосовувати конкуруючий ліганд або звільняючий реагент, який не викликає денатурацію, наприклад сечовину за малих концентрацій. Конкурентний ліганд витісняє досліджувану молекулу з комплексу. Білки, які мають біоспецифічну спорідненість до певних сполук, швидко і зворотно змінюють свою просторову конфігурацію у розчині за наявності відносно низьких концентрацій цих сполук навіть у тому випадку, коли їх наявність не змінює рН, іонну силу або температуру розчину. Ця обставина дає змогу елюювати білок зв'язаний з афінним лігандом, уведенням до складу елюенту невеликої кількості вільного ліганду без зміни рН, іонної сили або температури розчину. Інший спосіб вилучення речовини з колонки – зміна температури або рН розчину.

Для контролю елюювання речовин можна застосовувати радіоактивно мічені зразки. Для цього використовують ^{14}C , ^{125}I . Радіоактивність вимірюють сцинтиляційним лічильником, γ -лічильником. Детектування також можна проводити за світлопоглинанням розчинів в УФ ділянці спектра.

Використання афінної хроматографії.

Методом афінної хроматографії можна розділяти широкий спектр біологічних сполук: антитіла, антигени, клітинні органели, кофактори, вітаміни, ферменти, гормони, інгібітори, пектини, ліпіди, білки, пептиди, амінокислоти, віруси. Крім того, у фармацевтичній промисловості важливим завданням є розділення і кількісне визначення хіральних сполук. У багатьох випадках терапевтичний ефект забезпечує лише один із набору енантіомерів лікарського засобу.

Тому, важливо їх розділяти й отримувати у чистому вигляді.

? Контрольні питання та завдання:

1. Які речовини використовують у газовій хроматографії як рухому фазу?
2. На чому ґрунтується поділ у газо-адсорбційній хроматографії?
3. На які види ділиться рідинна хроматографія за механізмом розділення речовин нерухомою фазою?
4. На скільки (нм) детектори ВЕРХ органічних речовин поглинають світло?
5. Опишіть основні елементи обладнання, яке використовується для визначення ВЕРХ.
6. Які переваги методу гель-фільтрації порівняно з іншими методами хроматографії?
7. Який вид рідинної хроматографії найбільш ефективний для поділу оптичних ізомерів?
8. Чим відрізняються між собою газова та рідинна хроматографія?

Тестові завдання:

1. При переносі речовин, які розділяють, газ-носії

- а) не взаємодіє ні з поділюваними речовинами, ні з нерухомою фазою;
- б) взаємодіє з нерухомою фазою;
- в) взаємодіє з поділюваними речовинами та рухомою фазою;
- г) взаємодіє з поділюваними речовинами.

2. Які функції виконує хроматографічна колонка?

- а) розділяє компоненти аналізованої суміші;
- б) кількісно визначає компоненти суміші;
- в) реєструє аналітичний сигнал;
- г) перетворює аналітичний сигнал.

3. Афінна хроматографія використовується при розділенні

- а) оптичних ізомерів;

- б) при розділенні суміші газів;
- в) при розділенні високомолекулярних і низькомолекулярних речовин;
- г) при розділенні насичених і ненасичених вуглеводнів.

4. *Рухома фаза в рідинній хроматографії –*

- а) рідина;
- б) суміш кислотних оксидів;
- в) інертний газ;
- г) атмосферне повітря.

5. *Основні системи будь-якого газового хроматографа:*

- а) колонка;
- б) детектор;
- в) реєстратор;
- г) пристрій для введення проби.

6. *На чому ґрунтується поділ в газо-адсорбційній хроматографії?*

- а) на відмінності в адсорбції на поверхні твердого носія;
- б) на відмінності розміру молекул аналізованої суміші;
- в) на взаємодії рухомої фази з аналізованою сумішшю;
- г) на утворенні осаду в порах сорбенту.

7. *Який прилад використовують найчастіше в газовій хроматографії?*

- а) газовий хроматограф;
- б) спектрометр;
- в) хроматометр.

8. *Хроматографія – це метод аналізу, який базується на перерозподілі речовини між*

- а) рідкою і твердою фазами;
- б) двома рідкими фазами, що не змішуються між собою;
- в) рухомою і нерухомою фазами;
- г) рідкою і газовою фазами;
- д) твердою та газовою фазами.

9. *Виберіть гази, які можуть використовуватися в газовій хроматографії як рухома фаза:*

- | | |
|------------|--------------|
| а) гелій; | г) ацетилен; |
| б) ксенон; | е) аргон; |
| в) кисень; | ж) азот. |

10. *Гель-хроматографія – це один із різновидів ... хроматографії.*

- а) рідинної;
- б) газової;
- в) адсорбційної;
- г) тонкошарової.

11. *У методі гель-фільтрації першими вільно проникають у пори*

- а) молекули з меншою молекулярною масою;
- б) молекули з більшою молекулярною масою;
- в) одночасно молекули з більшою та меншою молекулярними масами;
- г) усі молекули одночасно.

Тема 7

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

Мета: розглянути основні принципи мас-спектрометрії, хромато-мас-спектрометрії, ЯМР-спектроскопії, навчитися використовувати дані методи та розшифровувати спектри.

 **Основні терміни та поняття:** мас-спектр, електронний удар, ізотопи, резонанс, ЯМР-спектр, ПМР-спектр, хімічний зсув, дейтеровані розчинники.

План

1. Мас-спектрометрія.
2. Хромато-мас-спектрометрія.
3. ЯМР-спектроскопія

1. Мас-спектрометрія

Мас-спектрометрія – метод дослідження речовин шляхом визначення відносини маси до заряду (якості) і кількості заряджених частинок, що утворюються при тому чи іншому процесі впливу на речовину. Історія мас-спектрометрії ведеться з основоположних дослідів Джона Томсона на початку ХХ ст. Закінчення "*метрео*" термін отримав після повсюдного переходу від детектування заряджених частинок за допомогою фотопластинок до електричним вимірюванням іонних струмів.

Істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні, рентгенівські і деякі інші методи детектують випромінювання або поглинання енергії молекулами або атомами, а мас-спектрометрія безпосередньо детектує самі частинки речовини.

Мас-спектрометрія у широкому сенсі – це наука отримання та інтерпретації мас-спектрів, які, у свою чергу, виходять за допомогою мас-спектрометрів.

Мас-спектрометр - це вакуумний прилад, що використовує фізичні закони руху заряджених частинок у магнітних і електричних полях, необхідний для отримання мас-спектра.

Мас-спектр, як і будь-який спектр, у вузькому сенсі – це залежність інтенсивності іонного струму (кількості) від ставлення маси до заряду (якості). Зважаючи квантування маси і заряду типовий мас-спектр є дискретним. Зазвичай (в рутинних аналізах) так воно і є, але не завжди. Природа аналізованого речовини, особливості методу іонізації, і вторинні процеси в мас-спектрометрії можуть залишати свій слід в мас-спектрі. Так, іони з однаковими відносинами маси до заряду можуть виявитися в різних частинах спектра і навіть зробити частину його безперервним. Тому мас-спектр у широкому сенсі це щось більше, несучий специфічну інформацію і робить процес його інтерпретації більш складним і захоплюючим. Іони бувають

однозарядні і багатозарядні, як органічні, так і неорганічні. Більшість невеликих молекул при іонізації набуває тільки один позитивний або негативний заряд. Атоми здатні набувати більше одного позитивного заряду і тільки один негативний. Білки, нуклеїнові кислоти і інші полімери здатні набувати множинні позитивні і негативні заряди. Атоми хімічних елементів мають специфічну масу. Таким чином, точне визначення маси аналізованої молекули дозволяє встановити її елементний склад. Мас-спектрометрія також дозволяє отримати важливу інформацію про ізотопний склад аналізованих молекул. В органічних речовинах молекули являють собою певні структури, утворені атомами. Природа і людина створили справді незліченна різноманіття органічних сполук. Сучасні мас-спектрометри здатні фрагментувати йони та визначати масу отриманих фрагментів. Таким чином можна отримувати дані про структуру речовини.

Принцип роботи мас-спектрометра.

Прилади, які використовуються в мас-спектрометрії, називаються мас-спектрометри або мас-спектрометричні детектори. Ці прилади працюють з матеріальним речовиною, яка складається з найдрібніших частинок – молекул і атомів. Мас-спектрометри встановлюють, що це за молекули (тобто які атоми їх складають, яка їхня молекулярна маса, яка структура їх розташування) і що це за атоми (тобто їх ізотопний складу). Істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні, рентгенівські і деякі інші методи детектують випромінювання або поглинання енергії молекулами або атомами, а мас-спектрометрія має справу з самими частинками речовини. Мас-спектрометрія вимірює їх маси, вірніше, співвідношення маси до заряду. Для цього використовуються закони руху заряджених частинок матерії в магнітному або електричному полі. Мас-спектр – це сортування заряджених частинок відповідно до їхніх мас (відносин маси до заряду).

По-перше, для того щоб отримати мас-спектр, необхідно перетворити нейтральні молекули й атоми, складові будь-якої органічної або неорганічної речовини, в заряджені частинки – йони. Цей процес називається іонізацією і по-різному здійснюється для органічних і неорганічних речовин. В органічних речовинах молекули являють собою певні структури, утворені атомами.

По-друге, необхідно перевести йони в газову фазу у вакуумній частині мас-спектрометра. Глибокий вакуум забезпечує безперешкодний рух іонів всередині мас-спектрометра, а при його відсутності йони розсіюються і рекомбінують (перетворюються назад в незаряджені частки).

Умовно способи іонізації органічних речовин можна класифікувати по фазах, в яких знаходяться речовини перед іонізацією.

Газова фаза:

- електронна іонізація (EI, EI – Electron ionization);
- хімічна іонізація (CI, CI – Chemical Ionization);
- електронне захоплення (EC, EC – Electron capture);
- іонізація в електричному полі (FI, FI – Field ionization).

Рідкафаза:

- термоспрей;
- іонізація при атмосферному тиску (АДІ, АР – Atmospheric Pressure Ionization);
- електроспрей (ЕС, ESI - Electrospray ionization);
- хімічна іонізація при атмосферному тиску (ХІАД, АРСІ – Atmospheric pressure chemical ionization);
- Фотоіонізація при атмосферному тиску (ФІАД, АРРІ – Atmospheric pressure fotoionization).

Твердафаза:

- пряма лазерна десорбція – мас-спектрометрія (ПЛДМС, LDMS – Direct Laser Desorption – Mass Spectrometry);
- матрично-активованалазерна десорбція (іонізація) (Малда, MALDI – Matrix Assisted Laser Desorbition (Ionization));
- мас-спектрометрія вторинних іонів (МСБІ, SIMS – Secondary-Ion Mass Spectrometry);
- бомбардування швидкими атомами (ББА, FAB – Fast Atom Bombardment);
- десорбція в електричному полі (ПД, FD – Field Desorption);
- плазмова десорбція (ПД, PD – Plasma desorption).

У неорганічній хімії для аналізу елементного складу застосовуються жорсткі методи іонізації, так як енергії зв'язку атомів у твердому тілі на багато більше, значить, і значно більш жорсткі методи необхідно використовувати для того, щоб розірвати ці зв'язки і отримати іони:

- іонізація в індуктивно-зв'язаній плазмі (ІСП, ІС – Pinductively coupled plasma);
- термо іонізація або поверхнева іонізація;
- іонізація в тліючому розряді і іскрова іонізація;
- іонізація в процесі лазерної абляції.

Історично першими методи іонізації були розроблені для газової фази. На жаль, дуже багато органічних речовин неможливо випаровувати, тобто перевести в газову фазу, без розкладання. Тому їх не можна йонізувати електронним ударом. Але серед таких речовин майже все, що становить живу тканину (білки, ДНК тощо), фізіологічно активні речовини, полімери, тобто все те, що сьогодні представляє особливий інтерес. Мас-спектрометрія не стояла на місці і в останні роки були розроблені спеціальні методи іонізації таких органічних сполук. Сьогодні використовуються в основному два з них – іонізація при атмосферному тиску і її підвиди – електроспрей (ЕС), хімічна іонізація при атмосферному тиску і фотоіонізація при атмосферному тиску, а також іонізація лазерною десорбцією за сприяння матриці (Малда).

Отримані при іонізації іони за допомогою електричного поля переносяться в мас-аналізатор. Там починається другий етап мас-спектрометричного аналізу – сортування іонів по масах (точніше, по відношенню маси до заряду).

Існують наступні типи мас-аналізаторів.

1. *Безперервні мас-аналізатори:*

- магнітний і електростатичний секторний мас-аналізатор;
- квадрупольний мас-аналізатор.

2. Імпульсні мас-аналізатори:

- часопролітний мас-аналізатор;
- іонна пастка;
- квадрупольна лінійна пастка;
- мас-аналізатор іонно-циклотронного резонансу з Фур'є-перетворенням;
- орбітреп.

Різниця між *безперервними* і *імпульсними мас-аналізаторами* полягає в тому, що в перші іони надходять безперервним потоком, а в другі – порціями, через певні інтервали часу.

Мас-спектрометр може мати два мас-аналізатора. Такий мас-спектрометр називають *тандемним*. ТанDEMні мас-спектрометри застосовуються, як правило, разом з "м'якими" методами іонізації, при яких не відбувається фрагментації іонів аналізованих молекул (молекулярних іонів). Таким чином перший мас-аналізатор аналізує молекулярні іони. Залишаючи перший мас-аналізатор, молекулярні іони фрагментуються під дією зіткнень з молекулами інертного газу або випромінювання лазера, після чого їх фрагменти аналізуються в другому мас-аналізаторі. Найбільш поширеними конфігураціями тандемних мас-спектрометрів є квадруполь-квадрупольний і квадруполь-часопролітний.

Останнім елементом описуваного нами спрощеного мас-спектрометра є детектор заряджених частинок. Перші мас-спектрометри використовували як детектор фотопластинку. Зараз використовуються діодні вторинно електронні помножувачі, в яких іон, потрапляючи на перший диод, вибиває з нього пучок електронів, які, у свою чергу, потрапляючи на наступний диод, вибивають з нього ще більшу кількість електронів і т.д. Інший варіант - фотопомножувачі, реєструючи світіння, що виникає при бомбардуванні іонами люмінофора.

Найбільш широке поширення отримав мас-аналізатор, що дозволяє найбільш точно поміряти масу іона, і володіє дуже високою роздільною здатністю. Висока роздільна здатність дозволяє працювати з поліпротонованими іонами, що утворюються при іонізації білків і пептидів в електроспрей, а висока точність визначення маси дозволяє отримувати брутто-формулу іонів, роблячи можливим визначати структуру послідовностей амінокислотних залишків у пептидах і білках, а також детектувати після трансляцію модифікацію білків. Це зробило можливим секвенування білків без їх попереднього гідролізу на пептиди. Такий спосіб отримав назву "Top-down" протеоміки. Отримання унікальної інформації стало можливо завдяки застосуванню мас-аналізатора іонно-циклотронного резонансу з Фур'є-перетворенням. У цьому аналізаторі йони влітають в сильне магнітне поле і обертаються там по циклічним орбітах (як в циклотроні, прискорювачі елементарних частинок). Такий мас-аналізатор володіє певними перевагами: має дуже високий дозвіл, діапазон вимірюваних мас досить широкий, може аналізувати іони, які одержуються всіма способами. Однак для своєї роботи він вимагає сильного магнітного нуля, а значить, і використання сильного магніту

зі зверхпровідним соленоїдом, підтримуваним при дуже низькій температурі (рідкого гелію, приблизно 270°С).

Найважливішими технічними характеристиками мас-спектрометрів є чутливість, динамічний діапазон, дозвіл, швидкість сканування.

Найважливіша характеристика при аналізі органічних сполук – це чутливість. Для того щоб досягти якомога більшої чутливості при поліпшенні відношення сигналу до шуму, вдаються до детектування по окремих обраним іонам. Виграш у чутливості і селективності при цьому колосальний, але при використанні приладів низького дозволу доводиться приносити в жертву інший важливий параметр – достовірність. Використання високого дозволу на приладах з подвійною фокусуванням дозволяє домагатися високого рівня достовірності, не жертвуючи при цьому чутливістю.

Для досягнення високої чутливості ще можна використовувати тандемну мас-спектрометрію, коли кожен пік, відповідний одиночного іону, можна підтвердити мас-спектром дочірніх іонів. Абсолютним рекордсменом по чутливості є органічний хромато-мас-спектрометр високої роздільної здатності з подвійним фокусуванням.

За характеристикою поєднання чутливості з достовірністю визначення компонентів слідом за приладами високого дозволу йдуть іонні пастки. Класичні квадрупольні прилади нового покоління мають покращені характеристики завдяки ряду інновацій, застосованих в них, наприклад використанню з метою зниження шуму викривленого квадрупольного префільтру, запобігає попаданню нейтральних частинок на детектор.

Мас-спектроскопія – метод дослідження речовини шляхом визначення мас іонів цієї речовини (частіше відношення мас іонів до їхніх зарядів) і їхніх кількостей. Сукупність значень мас й їхніх відносних вмістів (концентрацій) називається мас-спектром (рис. 7.1).

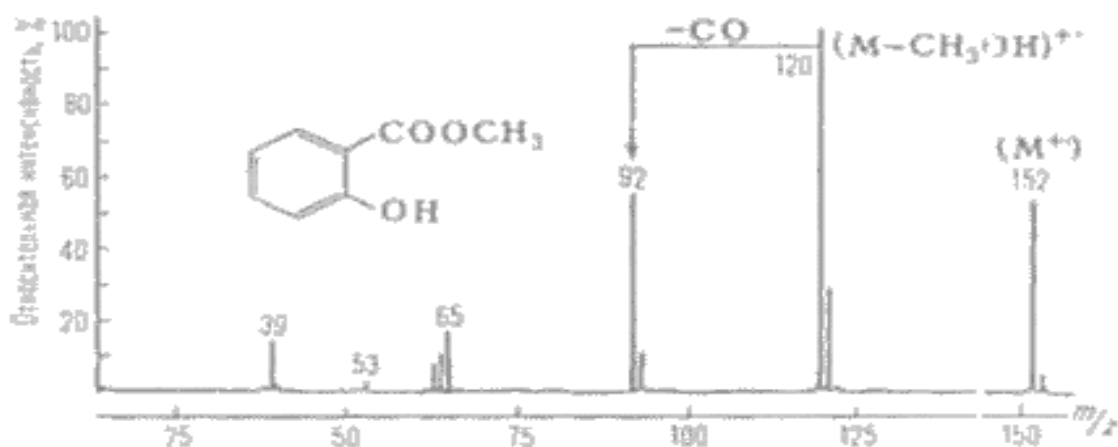


Рисунок 7.1 – Мас-спектр метилсаліцилату

Мас-спектрометричний аналіз речовин полягає у наступному. Невелика кількість речовини у виді пари у вакуумі, звичайно під дією пучка електронів, переводиться в іони чи іонізовані фрагменти молекул; потім позитивно заряджені частки прискорюються і направляються в магнітне поле Н. Ці частки

(іони) рухаються по колу, радіус якого залежить від відношення маси частки, що рухається, до її заряду.

Змінюючи напруженість магнітного поля, іонізовані частки (чи іони) фокусують на детектор, що входить у вимірювальну систему. Сигнали детектора записують у виді мас-спектра; по отриманому мас-спектрі ідентифікують речовини, визначають їхні маси і будову. По інтенсивності іонних струмів визначають кількості речовини. Розподіл і розпізнавання іонів у мас-спектрометрах засновано на залежності їхнього руху в електричному та магнітному полях від власної маси і швидкості.

Можливість використання мас-спектрометрії для визначення структури органічних молекул заснована на наступних особливостях мас-спектра.

1. У мас-спектрах багатьох молекул (але не усіх) маються піки молекулярних іонів M^+ , маси яких дорівнюють масам вихідних молекул. Точний вимір маси молекулярного іона (до 10^{-6} а.о.м.) дозволяє визначити елементний склад молекули (чи значно звужити коло можливих його варіантів).

2. Відповідно до ізотопного складу іона йому відповідають різні піки у мас-спектрі, які відрізняються набором ізотопів атомів, що входять в іон. Характерні розподіли інтенсивностей піків різних ізотопних наборів атомів, що входять у даний іон, дозволяють визначити наявність тих чи інших атомів (наприклад сірки, галогенів і ін.) чи оцінити ступінь штучного збагачення тими чи іншими ізотопами.

3. Розпад молекулярного іона, часто супровідна іонізація, призводить до утворення осколкових іонів, що утворюються як при простому розриві зв'язків, так і з протіканням процесів перегрупування атомів.

Маси цих іонів, як правило, відповідають визначеним структурним фрагментам молекули. Таким чином, за мас-спектром можна визначити молекулярну масу, елементний склад, функціональні групи і структурні фрагменти молекули, а за їхній сукупністю – структуру молекули.

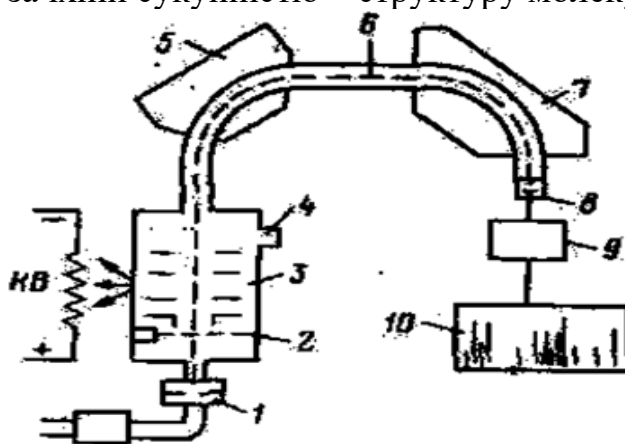


Рисунок 7.2 – Блок-схема мас-спектрометра. 1 – Діафрагма з отвором; 2 – іонізаційна камера; 3 – іонно-оптична система; 4 – відвід до вакуумного насоса; 5 – електростатичний аналізатор; 6 – пучок іонів; 7 – магнітний аналізатор; 8 – колектор; 9 – підсилювач; 10 – реєструючий пристрій.

Для аналізу неорганічних об'єктів складного складу перспективні методи іскрової, лазерної і мас-спектрометрії вторинних іонів. Аналітичні

характеристики цих методів унікальна: універсальність (визначення до 40 елементів); низькі абсолютні (10^{-10} - 10^{-14} г, у деяких випадках до 10^{-20} г) і відносні (до 10^{-7} % (ат.)) межі виявлення; малопомітний вплив основи; простота пробопідготовки.

Обробка одержуваного набору даних пов'язана з проведенням великого числа обчислювальних операцій і тому має потребу в автоматизації. Однак автоматизація обробки первинної інформації зумовлена не тільки прагненням до скорочення трудомісткої обчислювальної роботи, але і необхідністю виміру вихідних сигналів на малих рівнях і при високих швидкостях розгорнення мас-спектра, коли графічна реєстрація стає неможливою, тому що не забезпечує достатню точність. Першим етапом автоматизації стало об'єднання спектрометра з ЕОМ для одержання мас-спектрів у реальному масштабі часу. Наступний етап передбачає включення проміжної ланки – запам'ятовуючого пристрою (магнітна стрічка, магнітний диск) і обробку мас-спектра після завершення зйомки. Важливим етапом в удосконалюванні систем мас-спектрометр – ЕОМ з'явилося застосування електронних схем для відображення інформації, що забезпечують діалог «людина-ЕОМ», у якому оператор-дослідник, за необхідністю, може підбирати найбільш придатні для аналізу програми, змінювати їхні параметри. Використання режиму діалогу забезпечує оперативну зміну схеми наступного аналізу. Успішному аналізу сприяє можливість звертання до банку мас-спектрів індивідуальних хімічних сполук.

Останнім часом розвивається новий напрям – двовимірна (тандемна) мас-спектрометрія (МС – МС, мас-спектрометр – мас-спектрометр). Метод включає іонізацію молекул і розподіл за масами іонів, що утворюють мас-спектр, вибір з цього спектру визначеного іона-попередника й одержання мас-спектра продуктів його фрагментації в результаті мономолекулярного розкладання метастабільних іонів з малим часом життя чи в результаті подальшого порушення іона-попередника зіткненнями з інертним газом. Одержувані спектри можуть використовуватися і для вирішення аналітичних задач, і для ідентифікації окремих сполук у складних матрицях. У порівнянні зі сполученням газової і рідинної хроматографії з мас-спектрометрією МС-МС має перевагу в селективності, чутливості і швидкості аналізу. Найбільша перевага мас-спектрометричного поділу компонентів суміші - менш строгі вимоги до летючості зразків.

2. Хромато-мас-спектрометрія

Мас-спектрометри використовуються для аналізу органічних і неорганічних сполук. Органічні речовини в більшості випадків являють собою багатокомпонентні суміші індивідуальних компонентів. Наприклад, показано, що запах смаженої курки становлять 400 компонентів (тобто 400 індивідуальних органічних сполук). Завдання аналітики полягає в тому, щоб визначити, скільки компонентів складають органічну речовину, дізнатися, які це компоненти (ідентифікувати їх) і скільки кожного з'єднання міститься в суміші. Для цього ідеальним є поєднання хроматографії з мас-спектрометрією.

Газова хроматографія якнайкраще підходить для поєднання з іонним джерелом мас-спектрометра з іонізацією електронним ударом або хімічної іонізацією, оскільки в колонці хроматографа з'єднання вже знаходяться в газовій фазі. Прилади, в яких мас-спектрометричний детектор скомбінований з газовим хроматографом, називаються хромато-мас-спектрометрами ("Хромасс").

Багато органічних сполук неможливо розділити на компоненти за допомогою газової хроматографії, але можна розділити за допомогою рідинної хроматографії. Для поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометрією сьогодні використовують джерела іонізації в електроспрес та хімічної іонізації при атмосферному тиску, а комбінацію рідинних хроматографів із мас-спектрометрами називають ЖХ/МС. Найпотужніші системи для органічного аналізу, затребувані сучасної протеомікою, будуються на основі надпровідного магніту і працюють за принципом іонно-циклотронного резонансу.

Хромато-мас-спектрометрія (ХМС) є одним із сучасних гібридних методів, який поєднує можливості хроматографічного і мас-спектрометричного аналізів. Мас-спектрометрія дає найкращі результати, коли проба містить одну речовину, а хроматографія стикається з великими труднощами при ідентифікації компонентів складних сумішей, передусім сумішей органічних і неорганічних сполук, однак є найефективнішим методом розділення. Поєднання можливостей мас-спектрометрії і хроматографії у рамках єдиного хромато-мас-спектрометричного методу дає змогу як детектувати, так і ідентифікувати невеликі концентрації органічних сполук у комплексних сумішах, притаманних, зокрема, різним забруднювачам навколишнього середовища.

Практична реалізація ідеї гібриду хроматографії з мас-спектрометрією вимагала конструктивного і технологічного об'єднання хроматографа і мас-спектрометра у єдину установку, а також створення єдиної системи отримання та обробки потоків інформації від різних вузлів цієї установки. Вирішення інформаційних проблем, наприклад, розшифровки даних аналізу, здійснено завдяки залученню засобів електронно-обчислювальної техніки. Як вирішувались проблеми об'єднання інструментальних засобів, розглянемо на прикладі тандему газовий хроматограф – мас-спектрометр (ГХ/МС).

Із різних задач, які виникають при створенні тандему ГХ/МС, візьмемо одну із найважливіших: естафету проби від хроматографа у мас-спектрометр.

Потік газу, який виходить із газового хроматографа, має тиск близько 10^5 Па; тиск газу, який входить у йонне джерело мас-спектрометра, не повинен перевищувати при різних методах йонізації 10^{-3} – 10 Па. Оскільки компоненти проби у газі є незначної концентрації, просте зменшення тиску неможливе, необхідне відокремлення газу-носія. Здійснюють це за допомогою сепаратора. Газову суміш (газ-носії і проба) пропускають через пористу трубку (рис. 7.3), у якій газ-носії (зазвичай водень або гелій), із незначною молекулярною масою, дифундує через шпари трубки і відсмоктується насосом, а дещо важчі молекули взірця надходять у мас-спектрометр.

Тандем ГХ/МС може діяти у двох режимах. Вимірний блок МС настроюють на певне масове число, яке відповідає у шуканій сполуці йонам

одного типу. У цьому випадку ідентифікують пік на хроматограмі, яка відповідає цій сполуці. Можливо здійснити ідентифікацію і декількох речовин, якщо запрограмувати дії вимірних блоку на послідовну реєстрацію декількох специфічних масових чисел.

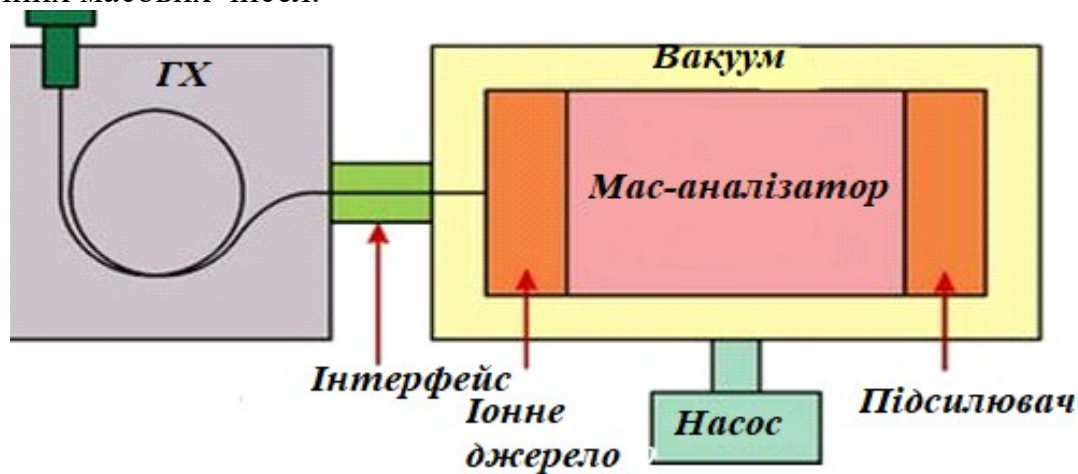


Рисунок 7.3 – Тандем ГХ/МС

В іншому варіанті режиму записують повний мас-спектр для кожного компонента проби і розташовують у пам'яті комп'ютера для подальшої обробки.

Можливості хромато-мас-спектрометрії ілюструє такий випадок: дослідження цим методом слідів органічних сполук у виносках із міських печей для спалювання сміття дало змогу виявити 99 різних сполук.

3. ЯМР-спектроскопія

ЯМР-спектроскопія (Ядерна магнітно-резонансна спектроскопія; англ. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*) – метод ідентифікації та вивчення речовин, що базується на ядерному магнітному резонансі (ЯМР). Найчастіше застосовується для органічних сполук. На сьогодні ЯМР-спектроскопія дозволяє ідентифікувати сполуку маючи менше 1 мг речовини. Зразок розчиняють в непротонному (часто дейтерованому) розчиннику, ампулу вміщують в ЯМР-спектрометр, після нетривалого (для простих сполук порядку 30 сек) накопичення сигналу отримують спектр, де по положенню піків (частоті поля збудження) окремих протонів (для ПМР – протонного магнітного резонансу) характеризують сполуку. Широкому використанню заважає тільки висока ціна пристроїв (від 1 мільйона гривень та вище). Для методу доступні всі ядра, що мають нецілий спин, зокрема ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P .

Застосування ЯМР спектроскопії в біохімії.

1. ЯМР малих молекул.

Віднесення всіх резонансних ліній і необхідний дозвіл в спектрах досягається досить просто:

- хімічний аналіз;
- визначення невідомих хімічних структур;
- неінвазивне визначення концентрацій;

- дослідження шляхів протікання реакцій і продуктів реакцій;
- визначення констант зв'язку;
- конформації субстата на активному центрі.

2. ЯМР макромолекул.

Віднесення резонансних ліній і досягнення необхідного дозволу:

- достатньо складне завдання;
- зміна конформації молекул під впливом зовнішніх дій (рН, температура, іонна сила, тиск тощо);
- конформаційні зміни при утворенні зв'язку з субстратом;
- структура активного центру ферментів, просторове розташування бічних ланцюгів щодо субстрату, іонізація функціональних груп;
- визначення тимчасових характеристик (часу кореляції) і характеру руху при локальних і глобальних конформаційних змінах;
- взаємодія між молекулами фермент-субстрат, протеїн-протеїн, протеїн-нуклеїнова кислота;
- визначення вторинної структури в розчині;
- визначення третинної структури в розчині.

Перевагою методу ЯМР, що особливо істотно в медичних застосуваннях, є низька енергія використовуваних квантів РЧ. Навіть при максимальних значеннях магнітних полів, вживаних в даний час, енергія цих квантів близько $4 \cdot 10^{-25}$ Дж, що набагато менше енергії, необхідної для руйнування ковалентних хімічних зв'язків; типове значення енергії хімічних зв'язків по порядку рівного 10^{-17} Дж. На відміну від методів, в яких використовується іонізуюче випромінювання, ЯМР є неруйнівним методом.

ЯМР як аналітичний метод

На різноманітних прикладах показано, яким чином ЯМР може бути використано як аналітичний метод.

Застосування методу ЯМР як аналітичного можна продемонструвати на прикладі простої молекули – молекули етанолу, оскільки, протонам 3-х функціональних груп в етанолі (метильна, метиленова і гідроксильна) відповідають три різні резонансні лінії, що спостерігаються у спектрі. Особливість методу ЯМР перш за все полягає в тому, що по положенню резонансних ліній в спектрах можна судити про взаємне розташування окремих атомів або груп атомів у молекулах, причому це вдається виявити навіть для еквівалентних атомів. ЯМР за інформативністю вигідно відрізняється від багатьох інших аналітичних методів, що конкурують з ним.

У той же час ЯМР є досить малочутливим методом, не дивлячись на те що в сучасних спектрометрах значення максимально досяжного магнітного поля складає 14 Тл, що відповідає робочій частоті для ^1H 600 МГц. Мінімальна кількість речовини, яка може бути зареєстрована за допомогою методу ЯМР ^1H , варіює у широких межах залежно від умов експерименту. Для малих молекул типове значення, що визначає межу чутливості, складає 10 нмоль, тобто ту кількість речовини, яку може бути проаналізовано простими біохімічними методами, наприклад, за допомогою ТШХ. При використанні інших, досить широко використовуваних методів, таких, як газова хроматографія або

радіоімунометрія, стають доступними принципово інші з погляду чутливості області такі, як фемто- і атоммолярна. Таким чином, якщо мова йде тільки про реєстрацію спектрів речовин відомої структури, то ці методи за чутливістю перевершують ЯМР. Перевага ЯМР стає очевидним лише тоді, коли виникає необхідність в отриманні додаткової інформації, яку може надати тільки цей метод. Це стосується тих випадків, коли структура досліджуваної речовини ще не відома. Тоді з аналізу спектру ЯМР можна побудувати ряд можливих структур і вибрати серед них правильну. Слід зазначити також ще одну особливість методу ЯМР: у спектрах ЯМР можуть бути присутні сигнали молекул-домішок, ідентифікація яких можлива тільки у разі застосування спеціальних методів.

Ідентифікація відомих і невідомих речовин.

Використання методу ЯМР як аналітичного в простому випадку полягає у порівнянні положень ліній спектрів зразка невідомої структури та стандартного зразка відомої структури: збіг спектрів стандартної речовини і досліджуваної дозволяє провести ідентифікацію останньої. На підставі такого роду зіставлень можна дати навіть кількісну оцінку концентрації речовин, що містяться в зразку. Ця оцінка в простому вигляді може бути сформульована таким чином: речовина А міститься в зразку в концентрації, достатній для його реєстрації. Правда, такий спосіб оцінки справедливий лише тоді, коли обидва порівнювані спектри отримано за ідентичних умов. Реальний спектр, відповідний певній речовині, істотно залежить від умов його реєстрації. Вид спектру визначається не тільки зовнішніми чинниками (температурою в датчику ЯМР, напруженістю поля і використовуваною імпульсною послідовністю), тобто тими параметрами, які експериментатор може контролювати самостійно, але й розчинником, який використовується. Не дивлячись на це, все ж таки вдається провести ідентифікацію невідомої речовини, оскільки завжди можна обмежитися певним абстрактним рівнем і порівняти характерні особливості спектрів.

Розглянемо ще раз фрагмент спектру ЯМР етанолу, знятого на сучасному ЯМР-спектрометрі з високим значенням постійного магнітного поля (рис. 7.4).

Параметри, що повністю характеризують спектр: положення спектральних ліній, структура мультиплетів і відносні інтенсивності резонансних ліній. Положення ліній визначається значенням хімічного зрушення, а розщеплювання ліній – скалярною спін-спіновою взаємодією. Площа під резонансним сигналом, яка може бути отримана чисельною інтеграцією, пропорційна числу спінів, що відповідає даній групі в молекулі.

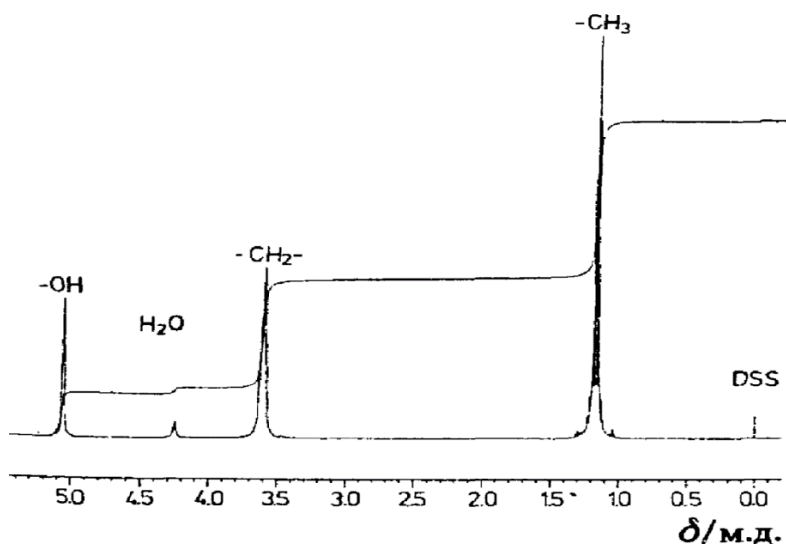


Рис.2.1. Спектр ^1H 500 МГц 95%-ного етанолу. Сигнал при 0 м.д. соответствует метильной группе стандарта ДСС относительно которого приводятся значения химических сдвигов в шкале δ . На рис. приведен также интеграл спектральных линий

Рисунок 7.4 – Спектр ^1H 500 МГц 95%-відсоткового етанолу. Сигнал при 0 м.д. відповідає метильній групі стандарта DSS відносно якого приводяться значення хімічних зсувів в шкалі δ .

Хімічне зрушення можна розуміти як посилення або послаблення зовнішнього магнітного поля в точці простору, в якій розташоване досліджуване ядро. Основний внесок у величину цієї локальної зміни поля дають електронні оболонки даних молекул, тому можна стверджувати, що хімічне зрушення відображає структуру молекул. Якщо оцінювати вплив заступників на величину хімічного зрушення, то із зростанням числа зв'язків між даним атомом і замісником цей вплив зменшується. Проте характер електронного розподілу, а значить, і вид спектру ЯМР, залежить і від просторової структури молекул, і від взаємодії з іншими молекулами в розчині, тобто від тих чинників, які вже не представляються такими очевидними.

Для ЯМР ^1H область значень хімічних зрушень невелика, а ефекти, пов'язані з просторовою структурою і викликані взаємодією з іншими молекулами, бувають настільки великі, що часто із спостереження спектрів ЯМР вельми скрутно зробити однозначний вивід про хімічну структуру речовини.

Для більшості молекул в розчині конформація їх при кімнатній температурі не є жорсткою, вони можуть існувати у вигляді декількох різних конформацій. Встановлювана конформаційна рівновага залежить від складу розчинника, температури і тиску. Крім того, досліджувані молекули можуть взаємодіяти між собою або з іншими молекулами і утворювати при цьому більш менш стабільні комплекси. Вірогідність виявлення цих взаємодій залежить від концентрації всіх компонентів, присутніх у розчині.

На відміну від спектрів ЯМР ^1H діапазон значень хімічних зсувів у спектрах ^{13}C істотно більше (див. табл. 7.1), так що положення резонансних ліній у спектрах ^{13}C визначається в основному хімічною будовою. Значення хімічних зсувів характеристичні за умови, що вплив замісників враховується у вигляді аддитивної поправки до величини хімічного зсуву.

Таблиця 7.1. Хімічні зсуви в спектрах ^1H і ^{13}C ЯМР

Група	Область значень хімічних зсувів, м.ч. відносно ТМС	
	^1H ЯМР	^{13}C ЯМР
-C-CH ₃ (звичайний метил)	0,1-1,8	5-35
-S-CH ₃ (тіометил)	1,5-3,8	10-20
-O-CH ₃ (метокси)	2,6-4,2	45-60
-C-CH ₂ -C (метиленовий)	0,3-3,9	15-55
-S-CH ₂ -C (метиленовий)	1,6-4,8	25-45
-O-CH ₂ -C (метиленовий)	3,2-4,8	40-70
-C ₂ -CH-C (метиновий)	0,8-2,6	30-60
-C ₃ -C-C (третинний вуглець)	-	25-50
-CH=CH-C (алкеновий вуглець)	5,0-7,0	105-145
-CH=CH-C- (ароматичний)	5,0-10,0	115-145
-C-CH=N- (гетероциклічний)	5,0-10,0	145-155
-C $\equiv$ C-C- (алкиновий)	—	75-95
-C-CHO (альдегідний)	9,4-11,0	185-210
-C-COOH (кислотний)	4,6-14,0	170-185
-C-CO-NH (пептидний зв'язок)	6,5-11,0	170-185

Спектроскопія ЕПР – метод дослідження парамагнітних частинок і центрів, кінетики і механізмів процесів, що відбуваються з їх участю.

? Контрольні питання та завдання:

1. У чому сутність методу ЯМР-спектроскопії?
2. У чому полягає явище ядерного магнітного резонансу?
3. Дайте визначення поняття «хімічний зсув». Які фактори впливають на величину хімічного зсуву?
4. Чим характеризують положення сигналу в спектрах ЯМР?
5. Що таке мас-спектроскопія? Наскільки точним і чутливим є метод?
6. На чому засновані якісний та кількісний мас-спектральний аналіз сумішей?
7. Яка межа виявлення (чутливість) мас-спектрометрії?
8. Опишіть спектроскопію протонного магнітного резонансу та ПМР-спектр.
9. Які речовини-еталони в спектроскопії ЯМР, яким вимогам вони повинні відповідати?
10. Для яких досліджень використовують ЯМР-спектроскопію?

Тестові завдання:

1. Хімічний зсув вимірюється в

- а) см б) кг в) м.д. г) м

2. Яке з наведених тверджень вірне?

- а) Метод ЯМР заснований на магнітних властивостях атомних ядер.
б) Метод ЯМР заснований на електричних властивостях атомних ядер.

3. 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.

8. У спектроскопії ЯМР високої роздільної здатності – такі головні джерела інформації про будову й динаміку молекул:

- а) хімічний зсув; константи спин-спінової взаємодії.
б) фізичний зсув; константи спин-спінової взаємодії.
в) біологічний зсув; константи спин-спінової взаємодії.

9. 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.

10. Мас-спектрометр – це

а) прилад для вимірювання кута обертання площини поляризації монохроматичного світла в оптично активних речовинах.

б) прилад для випромінювання показника заломлення речовин.

в) оптичний прилад для отримання і одночасної реєстрації спектру випромінювання.

г) прилад для розділу і онізованих частинок речовини за їхніми масами.

11. 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.

Тема 8

СУЧАСНІ ХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мета: розглянути сучасні хімічні методи досліджень, особливості та застосування.

 **Основні терміни та поняття:** гравіметрія, титриметрія, комплекси, хелати, ліганди, координаційне число, йон-комплексоутворювач, кавітація.

План

1. Загальна характеристика сучасних хімічних методів.
2. Комплексиметрія. Комплексонометрія.
3. Електрохімічні методи досліджень
4. Ультразвукові методи досліджень
5. Мікрохвильовий синтез

1. Загальна характеристика сучасних хімічних методів

До сучасних хімічних методів аналізу відноситься:

Гравіметрія (ваговий аналіз) – хімічний кількісний метод аналізу, заснований на точному вимірюванні маси визначуваної речовини, або її складових частин, які виділяються в хімічно чистому стані, чи у вигляді відповідних сполук точно відомого сталого складу.

Титриметрія – метод кількісного хімічного аналізу, який засновано на вимірюванні об'єму розчину реактиву точно відомої концентрації, яка необхідна для взаємодії з даною кількістю речовини, що визначається. Розчин реактиву точно відомої концентрації зветься стандартним, титрованим, робочим розчином, чи титрантом. Титрування – поступове, контролюємо додавання стандартного розчину до розчину, що аналізується, до досягнення точки еквівалентності (точки кінця титрування) – моменту у якому кількості речовин, що взаємодіють, еквівалентні. В титриметрії в залежності від типу рівноваги реакцій, виділяють:

- кислотно-основне титрування (метод нейтралізації);
- окисно-відновне титрування (оксидиметрія, редоксиметрія);
- метод осадження (седиметрія);
- метод комплексоутворення.

Реакції, що використовуються у титриметрії, повинні відповідати таким вимогам: бути стехіометричними, перебігати швидко і бажано при кімнатній температурі, перебігати кількісно (константа рівноваги 10^8), зайві речовини, які присутні у розчині, не повинні заважати титруванню, точка еквівалентності повинна фіксуватися тим чи іншим чином різко і точно.

2. Комплексиметрія

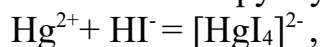
Комплексиметричним титруванням, або комплексиметрією, називають титриметричні методи, які базуються на реакціях утворення розчинних комплексів. Комплексометричним титруванням можна визначати як іони-комплексоутворювачі, так і іони або молекули, які виступають лігандами.

В методі комплексометричного титрування виділяють такі методи:

- меркуриметрія;
- фторидометрія;
- ціанідометрія;
- комплексонометрія.

Ця класифікація базується на використанні різних титрантів, за назвою яких і називається метод.

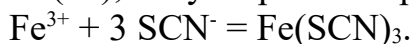
Меркуриметричне визначення йодидів ґрунтується на такій реакції:



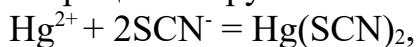
В точці еквівалентності іони Hg^{2+} реагують з іонами I^- , утворюючи осад йодиду ртуті (II) червоного кольору:



При **визначенні роданідів**, як індикатор використовують розчин солей Fe(III) , які утворюють з роданід-іонами сполуку червоного кольору:



В процесі титрування іони Hg^{2+} зв'язують SCN^- – іони:



В результаті чого червоне забарвлення Fe(SCN)_3 зникає, що є ознакою кінця титрування. Аналогічно визначають добре дисоційовані солі ртуті (II), титруючи їх розчином роданіду калію в присутності іонів Fe (III) . У точці еквівалентності виникає червоне забарвлення роданіду заліза.

Найбільш практичне значення має **визначення хлоридів**. Гарні результати при цьому отримують навіть при таких малих концентраціях хлоридів, які зустрічаються в питній воді. Бромід-, ціанід-, і роданід-іони можна визначати аналогічно, а титрування йодид-іонів слід проводити в присутності етанолу для підвищення розчинності HgI_2 , який утворюється.

Головний недолік меркуриметрії – висока токсичність сполук ртуті.

У меркуриметрії, фторидометрії і ціанідометрії застосовують монодентатні ліганди. Таких лігандів відомо багато, але їх застосовування в титриметрії обмежена тим, що ступінчасті константи відповідних комплексів близькі одна до другої. Тому області концентрації вільних лігандів, в яких утворюються окремі комплекси, перекриваються і криві титрування не мають стрибків.

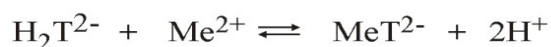
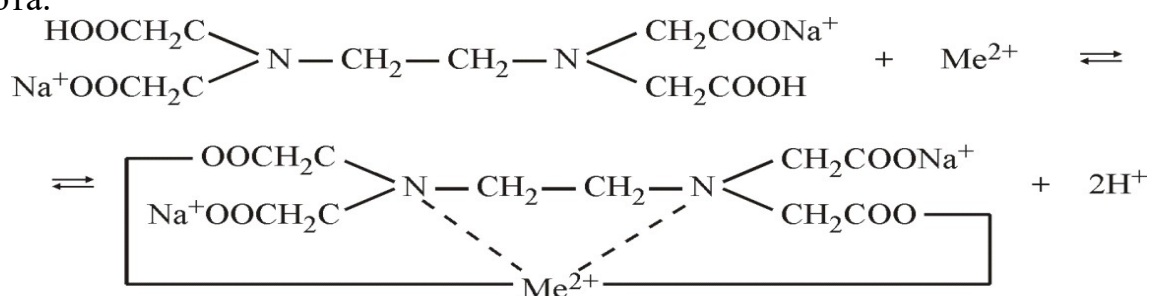
При використанні полідентатних лігандів спостерігається інша картина. По-перше, завдяки хелатному ефекту значно зростає стійкість комплексів. По-друге, зменшується число приєднаних лігандів (отже, відсутнє ступінчасте комплексоутворення) і при достатньо високій дентатності ліганди з іонами металу реагують у співвідношенні 1:1. Внаслідок цього в багатьох випадках криві титрування мають стрибки.

Титриметричні визначення, які базуються на взаємодії іонів-комплексоутворювачів з полідентатними лігандами, що приводять до утворення розчинних хелатів, називають *хелатометрією*. З хелатометричних методів найбільш широке застосування знайшло титрування розчинами комплексонів – комплексонометрія.

Комплексонометрія

Комплексонами називають органічні речовини, які містять одну або декілька амінодикарбоксильних груп

В 1945 р. швейцарський вчений Г. Шварценбах запропонував органічні реагенти комплексони, які представляють собою поліамінокислоти. Комплексони утворюють міцні, розчинні у воді, внутрішньокмплесні сполуки з катіонами різних металів. Найпростіший комплексон – імінодіоцтова кислота.



Комплексони утворюють численні і міцні, тобто з високими константами стійкості, внутрішньокмплесні сполуки з катіонами різних металів. Ці сполуки почасти рекомундувалися для пом'якшення води (зменшення жорсткості) у друкарській справі та фотографії.

Комплексони вступають в реакції з катіонами багатьох металів у співвідношенні 1:1, утворюючи розчинні у воді комплекси. Комплексонометричне титрування дозволяє скоротити час аналізу і є дуже простим і точним. У державній фармакопеї є розділ комплексонометрії.

Зараз синтезовано і досліджено декілька сотень комплексонів. Однак у комплексонометрії головним чином застосовують комплексон, який називається етилендіамінтетраоцтовою кислотою (комплексон I, II, ЕДТА):

Переваги комплексонів.

1. Добре розчинні у воді та деяких інших органічних розчинниках.
2. Легко реагують з багатьма катіонами металів з утворенням розчинних у воді стійких комплексних сполук.
3. Комплекси, які утворюються, дуже стійкі.
4. Реакції протікають стехіометрично (немає ступінчастого комплексоутворення).
5. Деякі комплексони є специфічними реагентами на окремі іони металів (вибіркова дія).

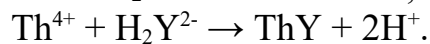
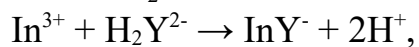
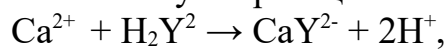
6. Широко застосовуються як маскуючі агенти. Цьому застосуванню сприяє те, що комплексонати металів мають різні константи нестійкості ($pK_{\text{нест}}$) і утворюються при певних значеннях рН розчинів.

7. Етилендіамінтетраоцетат-іон Y^{4-} з іонами багатьох металів утворює розчинні хелати, які називаються комплексонатами:

Комплексони широко використовуються для комплексометричного титрування багатьох катіонів й аніонів.

Комплексометрія – титриметричний метод аналізу, який базується на використанні реакцій іонів-комплексоутворювачів з комплексонами, які супроводжуються утворенням стійких малодисоційованих розчинних у воді внутрішньоконкомплексних солей.

При титруванні $NaEDTA$ солей металів-комплексоутворювачів протікають наступні реакції:



Отже, не залежно від ступеня окислення іона й його заряду, 1 моль реагуючих катіонів зв'язується з 1 молем $NaEDTA$.

Умови комплексометричного титрування

1. Висока стійкість комплексонатів металів ($\beta_{\text{ст.}}$ велика).
2. Витримування конкретного значення кислотності середовища.
3. Застосування буферних розчинів (для зв'яз. H^+ , які виділятимуться).
4. Тільки окремі катіони ($Fe^{3+}, In^{3+}, Sc^{3+}, Zn^{IV}, Th^{IV}$), які утворюють дуже міцні комплекси з комплексоном, титруються в кислому середовищі.

Класифікація методів комплексометрії

Прямим комплексометричним титруванням можна визначати багато іонів металів: магнію, кальцію, стронцію, барію, скандію, ітрию, лантанодів, титану, Zr, Hf, Th, V, Mo, U, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ag, Zn, Cd, Hg, Ga, In, Tl, Pb, Bi. Стрибок кривої титрування при цьому знаходять за допомогою відповідного індикатора або шляхом вимірювання відповідної фізичної величини.

Якщо розчин, який титрують містить декілька іонів металів і умовні константи стійкості відповідних комплексонатів мало відрізняються між собою, ці йони титруються разом. Коли логарифми умовних констант відрізняються більше ніж на 4 одиниці, йони металів можна титрувати послідовно, маючи похибку при встановленні першого стрибка титрування не більшу $\pm 1\%$. На практиці ця умова виконується достатньо рідко і можливості прямого комплексометричного титрування розширюють маскуванням.

Найбільш простий спосіб маскування – встановлення відповідної кислотності середовища в розчині, який титрують. Так, наприклад, йони $Fe(III)$, $Ga(III)$, $In(III)$, $Tl(III)$, $Bi(III)$, $Zn(IV)$, $Th(IV)$, комплексонати яких мають

$\lg \beta^C > 20$, можна титрувати у порівняно кислих розчинах ($pH \sim 2$), для яких константи стійкості інших комплексонатів є малі. Аналогічно при $pH 5$ розчином комплексону можна титрувати такі йони, як Al^{3+} , Co^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , в присутності іонів лужно-земельних металів.

Маскувати можна також за допомогою речовин, з якими іони металів утворюють комплекси. Тобто часто застосовують на практиці іони F^- , $Tart^{2-}$, CN^- , $P_2O_7^{2-}$, тирон, ацетилацетон, тіомочевину, унітіол та ін. Так, наприклад, при титруванні іонів лужно-земельних металів іони $Co(II)$, $Ni(II)$, $Zn(II)$, $Cd(II)$ і $Hg(II)$ можуть бути замасковані ціанід-іонами.

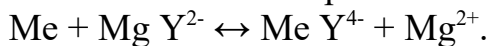
В окремих випадках маскувати можна зміною ступеня окиснення. Так, наприклад, якщо титрування виконують в сильно-кислому середовищі, Fe^{3+} маскують відновленням до Fe^{2+} . Деякі йони повільно реагують з комплексонами, тоді їх присутність не заважає визначенню. Наприклад, Cr^{3+} повністю реагує з Na EDTA при кімнатній температурі, тому в присутності йонів Cr^{3+} можна титрувати інші йони металів.

Зворотнє титрування застосовують коли:

1. неможливо підібрати індикатор або якусь фізичну величину для знаходження стрибка кривої при прямому титруванні;
2. комплексонати утворюються повільно;
3. при рН розчину, яке необхідне для виконання прямого титрування, визначувані іони металу утворюють осад відповідного гідроксиду або основної солі.

Непряме титрування (титрування замісника) застосовують у двох варіантах:

1. до розчину визначуваних іонів додають менш стійкий комплексонат магнію. Проходить реакція обміну, утворюється більш стійкий комплексонат визначуваного металу і вивільняється стехіометрична кількість іонів Mg^{2+} .



Іони Mg^{2+} відтитровують розчином комплексона III так визначають іони Ca^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} та інші.

2. визначуваний іон спочатку осаджують у вигляді малорозчинної сполуки. В якості осаджувача при цьому вибирають іон, який зручно визначати комплексонометричним титруванням. Аналіз завершують або визначенням іона-осаджувача в осаді або визначенням його надлишку в розчині після виділення осаду.

Точка еквівалентності – момент у титриметричному аналізі, коли кількість доданого титранту є хімічно еквівалентною до кількості визначуваного компонента. Наприклад, для кислотно-основного титрування така точка досягається в момент $[H^+] = [OH^-]$. Визначення точки еквівалентності дозволяє встановити точну кількість цільового компонента у розчині. Її знаходження найчастіше здійснюється на основі спостережень за візуальними ефектами (зміною кольору хімічних індикаторів, помутнінням розчину, випадінням осаду) або фізичними характеристиками (зміною електропровідності, рН тощо). Момент зміни ефекта будь-якого з типів і, відповідно, момент припинення додавання титранту, називається кінцевою точкою титрування (КТТ). В ідеальному випадку точка еквівалентності і КТТ збігаються, однак на практиці між ними завжди присутня певна розбіжність, і що вона є більшою, то більшою є похибка визначення. Це впливає на вибір методу детекції (наприклад, конкретного хімічного індикатора).

3. Електрохімічні методи досліджень

Електрохімічні методи аналізу – сукупність методів якісного та кількісного аналізу речовин, заснованих на процесах, які протікають на електродах або у міжелектродному просторі. При цьому вимірюється ряд параметрів, наприклад, електродний потенціал, ампераж, кількість електрики, повний електричний опір, ємність, електропровідність, діелектрична проникність, значення яких пропорційні концентраціям речовин, які визначаються.

Розрізняють три типи методів:

- методи, які базуються на електродній електрохімічній реакції (потенціометрія, полярографія, вольтамперометрія, амперометрія, хронопотенціометрія, електроліз, кулонометрія та ін.);
- методи, не пов'язані з електродною електрохімічною реакцією (кондуктометрія, діелектрометрія);
- методи, пов'язані зі змінами структури подвійного електричного шару (тензометрія).

Електрохімічні методи аналізу використовують для визначення понад 60 елементів у різних природних і пром. матеріалах, в рудах, мінералах.

Переважає більшість відомостей про речовини, їх властивості та хімічних перетвореннях отримано за допомогою хімічних або фізико-хімічних експериментів. Тому основним методом, застосовуваним хіміками, слід вважати хімічний експеримент.

Методи вивчення речовини стали не тільки більш універсальними, але і набагато більш різноманітними. Все більшу роль в роботі хіміка грають фізичні і фізико-хімічні методи дослідження, призначені для виділення і очищення сполук, а також для встановлення їх складу і будови.

Тому знання основ хімії необхідно кожній людині незалежно від його професії, а подальший розвиток її методів – одне з найважливіших напрямів науково-технічної революції.

Ультразвукові методи дослідження

Ультразвук (УЗ) – механічні коливання і хвилі з частотами більше 20 кГц. Верхньою межею УЗ частот умовно можна вважати 10^9 – 10^{10} Гц. Ця межа визначається міжмолекулярними відстанями і тому залежить від агрегатного стану речовини, в якій розповсюджується УЗ хвиля.

Для генерування УЗ використовують пристрої, які називаються УЗ-випромінювачами. Найбільше розповсюдження отримали електромеханічні випромінювачі, робота яких заснована на явищі оберненого п'єзоелектричного ефекту. Обернений п'єзоефект полягає у механічній деформації тіл під дією електричного поля. Основною частиною такого випромінювача є пластина або стержень з речовини з добре вираженими п'єзоелектричними властивостями (кварц, сегнетова сіль, керамічний матеріал на основі титанату барію ті ін.). На поверхню пластини у вигляді провідних шарів нанесені електроди. Якщо до електродів прикласти змінну електричну напругу від генератора, то пластина

завдяки оберненому п'єзоефекту почне вібрувати, випромінюючи механічну хвилю відповідної частоти.

Найбільший ефект випромінювання механічної хвилі виникає при виконанні умови резонансу. Так, для пластин товщиною 1 мм резонанс виникає:

1. для кварцу – на частоті 2.87 МГц,
2. для сегнетової солі – 1,5 МГц,
3. для титанату барію – 2,75 МГц.

Приймач УЗ можна створити на основі п'єзоелектричного ефекту (прямий п'єзоефект). В такому випадку під дією механічної хвилі (УЗ-хвилі) виникає деформація кристалу, яка при п'єзоефекті призводить до генерації змінного електричного поля. Відповідну електричну напругу можна виміряти.

Фізична природа УЗ, як і звуку, механічна (пружна) хвиля. Однак, довжина хвилі УЗ суттєво менша довжини звукової хвилі.

Швидкість розповсюдження УЗ-хвиль та їх поглинання суттєво залежать від стану середовища. На цьому принципі засноване використання УЗ для дослідження молекулярних властивостей речовини. Дослідження такого роду є предметом молекулярної акустики.

Стискання та розрідження, створювані УЗ, призводять до утворення розривів суцільності середовища – кавітацій. Кавітації існують недовго і швидко закриваються. При цьому у невеликих об'ємах виділяється значна енергія, відбувається розігрів речовини, а також іонізація та дисоціація молекул.

Здатність УЗ подрібнювати тіла, розміщені у рідину, та створювати емульсії використовується у фармацевтичній промисловості при виготовленні лікарняних препаратів.

Ультразвукова мікроскопія використовує можливості просторового розділення акустичних хвиль з частотами від 10 МГц до 1 ГГц. При цьому довжина хвилі ультразвуку у м'яких та водомістких біосередовищах співвимірна з досліджуваними структурами. Для отримання зображення можуть бути використані як амплітуда, так і фаза акустичних хвиль, що пройшли через об'єкт.

У порівнянні з оптичними та рентгенівськими мікроскопами, ультразвукова мікроскопія дає підвищену контрастність, що дозволяє спостерігати мікрооб'єкти у природному середовищі проживання.

Ультразвукова дефектоскопія, група методів дефектоскопії, в яких використовують проникаючу здатність пружних хвиль ультразвукового діапазону частот (інколи звукового). Це один з найбільш універсальних способів неруйнівного контролю, методи якого дозволяють виявляти поверхневі і глибинні дефекти – тріщини, раковини, розшарування в металевих і неметалічних матеріалах (у тому числі зварних і паяних швах, клеєних багатошарових конструкціях), визначати зони корозії металів, вимірювати товщину (резонансний метод).

Мікрохвильові методи дослідження

Мікрохвильова спектроскопія, область радіоспектроскопії, в якій досліджуються спектри речовин у сантиметровому і міліметровому діапазонах довжин хвиль (мікрохвилі або надвисокі частоти). Тобто, у цей діапазон потрапляє більшість обертальних і обертально-інверсійних спектрів молекул, спостереження яких у твердих тілах і рідинах неможливе, то мікрохвильову спектроскопію часто ототожнюють з радіоспектроскопією газів. Мікрохвильова спектроскопія – ефективний метод фізичних і хімічних досліджень. Вимір частот обертальних спектрів молекул дозволяє з великою мірою точності визначити структуру молекул і вивчити природу хімічного зв'язку. Обертальний спектр поглинання молекули залежить від її конфігурації, тобто від приналежності молекули до типу лінійних, сферичних, симетричних або асиметричних дзиг. Обертальний спектр будь-якої молекули може бути розрахований, якщо відомі її моменти інерції, які залежать від конфігурації і розмірів молекули. Порівняння теоретично розрахованих обертальних спектрів молекул з експериментально спостережуваними дозволяє визначити конфігурацію молекули, довжини зв'язків і кути між ними.

Мікрохвильове, або надвисокочастотне (СВЧ), випромінювання – це електромагнітні хвилі довжиною від одного міліметра до одного метра (від 30 ГГц до 0,03 ГГц відповідно). Діапазон хвиль мікрохвильового випромінювання лежить між довжинами хвиль інфрачервоного світла і радіохвилями (див. рис. 8.1.). Мікрохвильове випромінювання використовуються в мікрохвильових печах, радіолокації, радіонавігації, системах супутникового телебачення, стільникової телефонії тощо. Мікрохвилі існують у природі, їх випромінює Сонце.



Рисунок 8.1. – Схема мікрохвильового синтезу

Кухонні і промислові мікрохвильові печі працюють на частоті 2,45 ГГц. Ця частота було обрано як оптимальну за швидкістю нагріву води.

Давно відомо, що різні матеріали можна нагрівати за допомогою СВЧ електромагнітних хвиль. Це нагрівання є слідством взаємодії електричної компоненти електромагнітної хвилі із зарядженими або полярними частинками. У електричному полі такі частинки упорядковуються, і якщо поле асцилює, то їх орієнтація змінюється з кожної асциляцією. А тепер пригадаємо, що частота мікроволн 2450 МГц. Один герц – це одне коливання в секунду, мегагерц – один мільйон коливань в секунду. За один період хвилі поле міняє свій напрям двічі. Значить, поле, в якому знаходяться полярні частинки, міняє полярність 4 900 000 000 разів в секунду. Під дією мікрохвильового випромінювання молекули перекидаються з скаженою частотою і в буквальному значенні труться одна об іншу при переворотах.

1. Ультразвук (УЗ) – механічні коливання і хвилі з частотами більше 20 кГц. Верхньою межею УЗ частот умовно можна вважати 109- 1010 Гц. Ця межа визначається міжмолекулярними відстанями і тому залежить від агрегатного стану речовини, в якій розповсюджується УЗ хвиля.

2. Ефективність ультразвукового контролю залежить від цілого ряду чинників. Велике значення при цьому має частота ультразвукових хвиль. Зі збільшенням частоти зменшується їх довжина, а отже, підвищується чутливість методу, тобто розширюється діапазон виявлення більш дрібних дефектів.

3. Мікрохвильова спектроскопія, область радіоспектроскопії, в якій досліджуються спектри речовин в сантиметровому і міліметровому діапазонах довжин хвиль (мікрохвилі або надвисокі частоти). Мікрохвильова спектроскопія – ефективний метод фізичних і хімічних досліджень.

4. Поглинання відбувається в результаті обертання всієї молекули навколо різних інерційних осей. Тому кожна окрема лінія обертального спектра є характеристичною для досліджуваної сполуки, так що для ідентифікації останнього досить точної вказівки частоти такої лінії. Але, з іншого боку, це не дозволяє встановлювати певні угруповання атомів або структурні елементи, як це можливо за допомогою УФ- або ІЧ-спектроскопії.

? Контрольні питання та завдання:

1. Дайте загальну характеристику сучасних хімічних методів.
2. Дайте визначення комплексиметрії та комплексонометрії.
3. Назвіть переваги та недоліки комплексиметрії та комплексонометрії.
4. Опишіть електрохімічні методи досліджень.
5. Перерахуйте переваги та недоліки електрохімічних методів досліджень.
6. Дайте визначення ультразвуковим методам досліджень.
7. Переваги та недоліки ультразвукових методів досліджень.
8. Дайте визначення мікрохвильового синтезу.
9. Опишіть принцип проведення мікрохвильового синтезу.
10. Назвіть переваги та недоліки мікрохвильового синтезу.

Тестові завдання:

1. Гравіметрія – це

- а) ваговий метод аналізу.
- б) спектральний метод аналізу.
- в) теоретичний метод аналізу.
- г) об'ємний метод аналізу.

2. Титриметрія – це

- а) ваговий метод аналізу.
- б) спектральний метод аналізу.
- в) теоретичний метод аналізу.
- г) об'ємний метод аналізу.

3. В методі комплексометричного титрування виділяють такі методи:

- а) меркуриметрія;
- б) фторидометрія;
- в) ціанідометрія;
- г) комплексонометрія.

4. Головний недолік меркуриметрії –

- а) висока токсичність сполук ртуті.
- б) висока вартість.
- в) складність обладнання.
- г) необхідність великої кількості людей.

5. Комплексонами називають органічні речовини, які містять...

- а) одну амінодикарбоксильну групу.
- б) декілька амінодикарбоксильних груп.
- в) одну або декілька амінодикарбоксильних груп.
- г) одну або декілька дикарбоксильних груп.

6. Комплексонометрія – титриметричний метод аналізу, який базується на використанні

- а) реакцій іонів-комплексоутворювачів з комплексонами.
- б) реакцій з сполуками що містять амінодикарбоксильну групу.
- в) реакцій з сполуками ртуті.
- г) реакцій з сполуками фтору.

7. Зворотнє титрування застосовують коли:

- а) неможливо підібрати індикатор або якусь фізичну величину для знаходження стрибка кривої при прямому титруванні.
- б) комплексонати утворюються повільно.
- в) при рН розчину, яке необхідне для виконання прямого титрування, визначуванні іони металу утворюють осад відповідного гідроксиду або основної солі.
- г) при рН більше 7.

8. Розрізняють три типи електрохімічних методів:

- а) методи, які базуються на електродній електрохімічній реакції
- б) методи, не пов'язані з електродною електрохімічною реакцією
- в) методи, пов'язані зі змінами структури подвійного електричного шару
- г) методи з використанням ртуті.

Тема 9

СПІЛЬНЕ ВИКОРИСТАННЯ ХІМІЧНИХ, ФІЗИЧНИХ МЕТОДІВ ТА ПК ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ БУДОВИ МОЛЕКУЛ

Мета: дослідження будови та структури молекул.

 **Основні терміни та поняття:** віртуальні, хемометричні дослідження, молекулярний докінг, дескриптори, кореляція.

План

1. Зв'язок складу та будови сполук з фізичними властивостями.
2. Ідентифікація органічних сполук.
3. Віртуальні методи досліджень.
4. Комп'ютерний прогноз на основі дескрипторів молекулярної будови.
5. Молекулярний докінг.

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

Вуглеводні складу $C_1 - C_4$ - гази; $C_5 - C_{13}$ - рідини; C_4 та вищі - 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. Парафінові вуглеводні нормальної будови утворюють кватратні сполуки зі сечовиною, вони завантажують кристалічну решітку - для виділення нормальних вуглеводнів та їх похідних від близьких за будовою сполук. З розгалуженою будовою нормальні вуглеводні кристалізуються з сечовиною зі спиртів та ацетоні. Починаючи з пентану та бутилу, ненасичені вуглеводні - рідини. Введення в вуглеводневі ланцюги замісників, які містять гетероатоми значно змінює фізичні властивості речовин. У зв'язку із підвищеною полярністю зв'язків і молекул взагалі посилює міжмолекулярну взаємодію. Особливо це спостерігається під час утворення міжмолекулярних водневих зв'язків, введення карбоксильних, гідроксильних і аміногруп.

Меркаптани - мало асоційовані 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 комплексні: воду, спирти, кислоти.

Розгалуження карбонового скелету в ряду ізомерних похідних вуглеводнів знижує температуру кипіння. 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 у зв'язку з тим, що функціональна група має значний внесок.

Зі збільшенням алкільного радикалу розчинність зменшується.

Високомолекулярні похідні близькі за своїми властивостями до відповідних алканів: нерозчинні у воді та багатьох органічних розчинниках. Введення в алкани та алкени галогенів призводить до різкого підвищення щільності та температур кипіння. Хлороформ і тетрахлорокарбон – важкі рідини, їх щільність: 1,498 та 1,595. Температура кипіння галогеноалканів підвищується зі збільшенням карбонового ланцюга та накопичення в молекулі атомів галогену (підвищується атомна маса). Наприклад, бромформ важче хлороформу.

2. Ідентифікація органічних сполук

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

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

У деяких випадках, особливо стосовно нових сполук, визначають молекулярну масу. Для твердої речовини достатньо ідентифікувати через $t^{\circ}_{пл.}$, яка не змінюється після повторної кристалізації, при відсутності депресії (змінюється $t^{\circ}_{пл.}$), проби змішування синтезованої речовини з вже 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 $t^{\circ}_{кип.}$ високо киплячої речовини ($t^{\circ}_{кип.} \approx 100^{\circ}C$), щоб зменшити ступінь розкладання. Тверді речовини очищують під час кристалізації.

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

Молекулярну масу визначають за методом мас-спектрометрії: здійснюють елементний аналіз речовин на основі даних про масову долю карбону, кисню, сірки, галогену і виводять бруто-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 час для встановлення кількісного складу та структури речовини (це стосується тонких стереохімічних особливостей) найбільш важливими є спектроскопічні методи: ІЧ-, УФ-, ЯМР-спектроскопії, спектроскопія електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), мас-спектрометрія.

Оптична спектроскопія. ІЧ-спектроскопія використовується у діапазоні 4000-500 см^{-1} . Вона використовується 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.

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: $O-H$, $N-H$, $C=O$, $C=C$, $C-H$, CH_2 , CH_3). Зокрема, характеристичними є коливання груп, що містять легкий атом гідрогену або водневі 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. Добрим доповнюючим методом є спектроскопія КР. КР-спектри дають можливість ідентифікувати за інформацією про симетричні валентні коливання у симетричній молекулі (етилен, циклогексан тощо).

Спектроскопія ЯМР заснована на можливості деяких ядер атомів, які володіють спиновим магнітним елементом, поглинати кванти випромінювання радіохвильового діапазону. Такими властивостями володіють ядра атомів з масою, яка виражена непарним числом: 1_1H , $^{13}_6C$, $^{17}_8O$, $^{31}_{15}P$, ядра з непарними порядковими номерами і масою, що виражена парним числом: 2_1H , $^{14}_7N$.

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

Мас-спектрометрія

У газовому стані молекула починає атакуватися пучком електронів середніх енергій (30 еВ). Атака може бути (70 еВ) швидко летючими електронами. Молекула стає позитивно зарядженою – M^+ (молекулярний йон). При високому бомбардуванні молекула розкладається. Цей метод єдиний, який приводить до деструкцій молекул.

Для повного аналізу та ідентифікації молекул найчастіше використовують ІЧ-, ЯМР-спектроскопію, мас- або хромато-мас-спектрометрію із додаванням рентгено-структурного аналізу.

3. Віртуальні методи досліджень

Хеометричні (віртуальні, поза експериментальні, *in silico*) методи досліджень останім часом широко використовуються в хімії.

Базовий принцип хеометричних методів досліджень – віртуальний скринінг та молекулярний докінг. Розробка нових біологічно активних речовин – пестицидів, рістрегуляторів, лікарських та ветеринарних препаратів із селективним, швидкодіючим механізмом дії і мінімальними побічними ефектами, складають основні критерії відбору та орієнтири у сучасному дизайні біорегуляторів.

З технологічної точки зору даний аспект – використання обчислювальних потужностей для біоорганічної та медичної хімії – покладено на хемоінформатику – область знань, комплекс програмно-технічних рішень для розв’язання хімічних проблем за допомогою одночасного використання методів математики, фізики та інформатики. Основа даного підходу – трансформація об’єктів хімії та медицини у математичні моделі, якими може оперувати інформатика, та зворотня конвертація результатів моделювання у прийнятні для реальних дослідів масиви даних, які можливо осмислити, зробити висновки та прогнози. Зважаючи на відсутність жорстких меж у даній сфері найбільш повноцінний результат у застосуванні комп’ютерних технологій у медичній хімії досягається за одночасного використання біо- та хемоінформатики, молекулярного моделювання та математичної статистики.

Прикладною сферою хемоінформатики є використання методів квантово-хімічного моделювання та молекулярної механіки разом із додатковими програмованими фільтрами та математичними моделями на основі вже існуючих експериментальних результатів, систематизованих у базах даних, прикладом чого є віртуальний скринінг.

4. Комп’ютерний прогноз на основі дескрипторів молекулярної будови

Віртуальний скринінг (*Virtual Screening*) – це підхід у раціональному дизайні нових лікарських препаратів, що представляє з себе обчислювальну процедуру, яка полягає у налаштованому автоматизованому пошуку серед відомих хімічних сполук таких (які занесені у гомогенну базу даних), що відповідають певним заздалегідь обраним критеріям. У загальному випадку VS представляє автоматизований пошук у базі даних таких хімічних сполук (можуть бути синтезовані та досліджені як експериментально, так й бути лише віртуальними прототипами не синтезованих сполук), що мають найвищу вірогідність зв’язування із обраною біологічною мішенню. Найчастіше у ролі біологічної мішені виступає білковий рецептор або ензим.

Прогнозування біологічної активності (БА)

Було проведено прогнозування БА за допомогою різноманітних комп’ютерних програм (PASS, TEST, GUSAR тощо) більш 1000 тілохідних хіноліну. Прогноз БА похідних (2-R-хінолін-4-ілтїо)карбонових кислот показав, що заміна метильного радикалу на фенільний у 2-му положенні гетероциклу, введення замісників, модифікація залишку меркаптокарбонової кислоти у 4-му положенні хіноліну має певний вплив на зміну біологічної дії. Однак ці зміни були нерівноцінні і природа залишку кислоти більш впливала на БА ніж замісники у хіноліновому циклі. Досліджені сполуки виступають перспективними у ролі протитуберкульозних, антибактеріальних, діуретичних, антизапальних препаратів та нейропротекторів з антиоксидантним механізмом дії для лікування інсульту і неврологічних розладів. Подальші експериментальні дослідження показали ефективність прогнозу та можливість його використання для інших гетероциклічних систем. Так, було показано, що:

- комп'ютерний прогноз біологічних ефектів S-гетерилзаміщених тіокислот та їх похідних продемонстрував досить широкий спектр біологічної активності досліджуваних сполук, які можуть мати дерматологічну, гіполіпідемічну, протиалергічну, антикоагулянтну, мембранопротекторну, протипухлинну, антибактеріальну та протизапальну корисну дію;
- перспективним вважається пошук речовин з антирадикальною, ноотропною, нейропротекторною та антидепресивною активністю;
- для досліджуваних сполук прогнозується відсутність у них високої токсичності, канцеро-, мутагенності та ембріотоксичності;
- за рахунок зміни гетероциклічної системи для кожної сполуки зникають та з'являються індивідуальні види БА, величина вірогідності яких для кожної сполуки також індивідуальна, що значно розширює можливості пошуку нетоксичних і селективних препаратів;
- використання цього методу дало можливість встановити, що синтез S-гетерилзаміщених тіокислот та їх похідних представляється перспективним, а створення комбінаторної бібліотеки оптимізує процес подальшої цілеспрямованої розробки досліджуваних сполук.

5. Молекулярний докінг (MD)

Сутність докінгу полягає у використанні методів квантової та молекулярної механіки для пошуку можливих просторових конформацій досліджуваних сполук при їх зв'язуванні із обраною мішенню, найчастіше – ензимами.

У сфері молекулярного моделювання MD представляє з себе метод, який використовується для передбачення найбільш ймовірних просторових орієнтацій однієї молекули до іншої, коли вони зв'язуються одна з одною (стикуються) з утворенням стабільного комплексу. Отримані даним методом знання щодо взаємної просторової орієнтації у свою чергу можуть бути використанні для прогнозування міцності асоціації або афінітету зв'язування між двома молекулами з використанням, наприклад, скорингової функції.

Здійснюється за допомогою операції, при якій одну молекулу наближають до іншої, неперервно обчислюючи енергію взаємодії між ними при різних орієнтаціях та конформаціях, поступово встановлюючи найвигіднішу взаємну орієнтацію. При обчисленнях найчастіше враховують лише кулонівські та вандерваальсові взаємодії між атомами молекул.

Основна мета MD – отримання оптимальних (згідно з установленими критеріями) просторових структур комплексів. Їх аналіз дозволяє виявити ділянки «взаємного розпізнання» молекул, визначити рушійні сили, які сприяють зв'язуванню. В результаті з'являється можливість цілеспрямованого впливу на характеристики зв'язування шляхом модифікації однієї або декількох взаємодіючих молекул – наприклад, за рахунок введення точкових мутацій в білок, зміни фізико-хімічних властивостей L тощо. Як правило, при виконанні розрахунків на систему накладають певні обмеження. Наприклад, часто враховують конформаційну рухливість L, тобто при обчисленні і подальшій

мінімізації повної енергії системи координати атомів L варіюють. Навпаки, молекулу протейну, як правило, вважають нерухомою, або конформаційно лабільною є лише невелика область сайту зв'язування з L.

Основні ознаки MD.

- У загальному випадку число молекул довільне.
- Парний докінг – стикування однієї молекули (ліганда) до іншої (мішені).
- Моделювання дає тільки кінцевий стан комплексу (нічого не відомо про траєкторії утворення комплексу).
- У процесі роботи формується велике число проміжних варіантів надмолекулярних структур (комплексів).

Існують два підходи при моделюванні MD. Один підхід використовує техніку відповідності, яка описує білок і L як додаткові поверхні. Другий підхід моделює фактичний процес докінгу, в якому обчислюються попарні енергії взаємодії. У обох підходах є істотні переваги, а також деякі обмеження. MD є одним з найбільш часто використовуваних методів в конструюванні лікарських препаратів за особливостями їх просторової будови (structure-based drug design), завдяки своїй здатності передбачувати зв'язування – конформації – невеликих молекул L до відповідних сайтів зв'язування мішені. Характерною особливістю розвитку QSAR на сьогоднішній день взагалі є:

1) Його більша інтеграція з іншими методами (наприклад, MD), що дозволяє проводити одночасно комплексне моделювання із врахуванням більшої кількості факторів.

2) Створення великої БД побудованих моделей робить можливим не тільки порівнювати та прогнозувати заздалегідь відомий вид активності, але й за молекулярною структурою визначати потенційні вид БА, що реалізовано у методі PASS. Однак точність та достовірність результатів зараз ще досить низька.

? Контрольні питання та завдання:

1. Який зв'язок складу та будови сполук з фізичними властивостями?
2. Що таке молекулярний докінг?
3. Як провести ідентифікацію новосинтезованих сполук?
4. Які комп'ютерні програми можна використовувати для проведення віртуального докінгу?
5. Чи потрібно проводити очистку речовин перед проведенням аналізу, для чого це необхідно, як її провести?
6. Як ви розумієте визначення хемоінформатика?
7. Що таке PASS прогноз, як його отримати?
8. Для чого використовують такі програми як TEST та GUSAR?
9. Які комп'ютерні чи онлайн програми ви можете запропонувати для використання?
10. Опишіть повністю схему проведення експерименту.

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.

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.

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-СПЕКТРОСКОПІЯ – 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 оберतालними станами молекул.

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.

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.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

Основна література:

1. Класифікація та номенклатура електрохімічних методів // Журн. аналіт. хімії. 2013. Т. 33, вип. 8. С. 1647-1665.
2. Променева діагностика / під ред. Сергєєва І.І., Мн.: БДМУ, 2007р. 250 с.
3. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry / Lindon J. - 2nd Ed. - Academic Press, 2010. - 312 p.
4. Безуглий П.О., Гриценко І.С., Українець І.В., та ін. Фармацевтична хімія. /За заг. ред. П.О. Безуглого. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2008. – 560 с.
5. Державна Фармакопея України /Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
6. Державна Фармакопея України /Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
7. Державна Фармакопея України /Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. — Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”, 2008. – 620 с.
8. Державна Фармакопея України /Державне підприємство „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 1-е вид. — Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2009. – 280 с.
9. Державна Фармакопея України /Державне підприємство „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 1-е вид. — Доповнення 4. – Харків: Державне підприємство „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2011. – 540 с.
10. Ghosh P. K. Introduction to Protein Mass Spectrometry / P. K. Ghosh. - New York: Elsevier Science & Technology Books, 2015. - 350 p.
11. Agilent 7890B Gas Chromatograph: [operation manual / developed by Agilent GC specialists and engineers] - Wilmington, DE: Agilent Technologies, Inc., 2013. - 196 p.

Додаткова література:

1. Lakowitz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3 ed. Singapore: Springer Science + Business Media. 2006
2. Fedorova O. A., Chernikova E. Y., Fedorov Y. V., Gulakova E. N., Peregudov A. S., Lyssenko K. A., Jonusauskas G., Isaacs L. Cucurbit[7]uril Complexes of Crown-Ether Derived Styryl and (Bis)styryl Dyes. // The Journal of Physical Chemistry B. 2009. V. 113. No 30. P. 10149-10158.
3. Grob R. L. Modern Practice of Gas Chromatography / R.L. Grob, E.F. Barry. - Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. - 1045 p.

4. Hiraoka K. Fundamentals of Mass Spectrometry / K. Hiraoka. - New York: Springer Science, 2013. - 231 p.
5. HPLC - High Performance Liquid Chromatography [Електронний ресурс] // Waters. - 2016. - Режим доступу до ресурсу: "http://www.waters.com/waters/en/US/HPLC—High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?locale=en US&cid= 10048919.
6. Janssen H. Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography H. Janssen, G. Alkema, E. Kaal. - Eindhoven: GL Sciences B.V., 2014. - 27 p.
7. McMaster M. C. LC/MS: A Practical User's Guide / M. C. McMaster. - New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. - 184 p.
8. Measuring Volatile Organic Compounds by Headspace Trap GC-MS in the Beijing Food Laboratory / [M. Yuan, H. Xiao, Y. Lu et al.]. // American Laboratory. - 2009. - P. 1-7.
9. Медична хімія. Під ред. проф. В.О.Калібабчук. - Київ: Інтермед. - 2013.- 240 с.
10. Габ А. І. Аналітична хімія. Якісний аналіз : навч. посіб. / А. І. Габ, Д. Б. Шахнін. - Київ : Університет "Україна", 2017. -112 с.
11. Сидорчук М. В. Спектральний аналіз / М. В. Сидорчук- Луцьк: ПВД «Твердиня», 2012.-128 с.
12. Тихомирова Т.Ф. Технологія променевої діагностики, Мн.: БДМУ, 2008 р.
13. Stuart B. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. - Wiley, 2004. - 242 p.
14. Boyd R. K. Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry / R. K. Boyd C. Basic, R. A. Bethem. - New Jersey: Wiley, 2008. - 748 p.

Електронні ресурси

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є. [Електронний ресурс]. - Режим доступу до ресурса: <https://inconsulting.com.ua/uk/ekspertyza-organichnykh-spoluk/infrachervona-spektroskopiya.html>.