

## Лекція 6. Фізико-хімічні (інструментальні) методи аналізу

### План

1. Загальні положення
2. Спектрофотометрія
3. Атомно-адсорбційна спектроскопія
4. Атомно-емісійна спектроскопія
5. Люмінесценція
6. Флуориметричний аналіз
7. Рефрактометричний аналіз
8. Поляриметричний аналіз
9. Інтерферометрія
10. Нефелометричний та турбідиметричний методи аналізу
11. Електрохімічні методи
12. Іонометрія
13. Полярографія
14. Кулонометричний аналіз
15. Електрофоретичні методи аналізу

### 1. Загальні положення

Із різноманітних фізико-хімічних і фізичних методів аналізу найбільше значення мають дві групи:

1. Методи, основані на вивченні спектральних характеристик речовини.
2. Методи, основані на вивченні електрохімічних параметрів.

Загальна характеристика спектральних методів

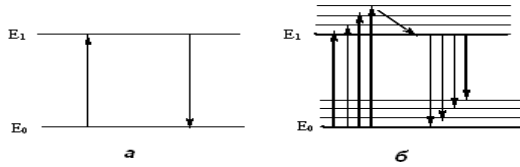
Спектральні методи основані на явищах, що відбуваються при взаємодії речовини з різними видами енергії (електромагнітним випромінюванням, термічною, електричною).

До основних видів взаємодії речовин з променевою енергією відноситься поглинання та випускання (емісія) випромінювання. Характер явищ, обумовлених поглинанням чи випусканням, в принципі однаковий. При взаємодії випромінювання з речовиною частини його (атоми, молекули) переходять у збуджений стан. Через деякий час ( $10^{-8}$  с) частинки повертаються у свій основний стан, випускаючи надлишок енергії у вигляді електромагнітного випромінювання. Ці процеси обумовлені електростатичними переходами у атомі чи молекулі.

Енергія електронів атомів та внутрішня енергія молекул строго квантова, тобто може приймати тільки певне дискретне значення, тому перехід, з одного енергетичного стану в інше можливий у тому випадку, якщо енергія поглинаємого та випромінюваного фотона ( $h\nu$ ) відповідає різності енергії цих двох станів ( $E_2 - E_1$ ):  $h\nu = E_2 - E_1$ . Енергетичні переходи у атомах та молекулах суттєво відрізняються між собою. Енергетичні переходи електронів з одних орбіталей на інші обумовлені електронними переходами. Молекули володіють великими можливостями змінити свій енергетичний стан. Внутрішня енергія молекул складається з енергії електронного переходу ( $E_e$ ), енергії коливань ( $E_v$ ) та енергії молекул у цілому ( $E_r$ ). Тому повна енергія молекули ( $E$ ), що знаходиться на певному енергетичному рівні, є сумою:  
 $E = E_e + E_v + E_r$ .

Вся система виявляється квантовою у відповідності з трьома складниками, котрі відрізняються один від одного приблизно в 10 разів:  $E_e > E_v > E_r$ .

Енергетичний стан молекули зручно подавати у вигляді простої схеми ( мал. 10 ). Кожному електронному рівні основного  $E_0$



Мал. 10. Схема енергетичних рівнів та електронних переходів в атомах ( а ) та молекулах та збудженого  $E_1$  стану молекули відповідає серія коливальних , а кожному коливальному – серія обертальних рівнів. ( на мал. 10 обертальні рівні не зображені.

Молекули в електронно – коливальному збудженому стані при зіткненні з оточуючими їх атомами чи молекулами можуть втрачати частину енергії та безвипромінювально переходити на самий нижчий коливальний рівень збудженого стану. Цей процес зображений на малюнку 10 кутовою стрілкою. Потім йде випромінювання квантового світла. На мал. 10 поглинання квантів світла позначено прямими стрілками, напрямленими вверх, а випромінювання – стрілками, напрямленими вниз. Довжини стрілок пропорційні величинам енергії поглинутих та випромінених квантів  $h\nu$ , тобто пропорційні частотам відповідних ліній у спектрах поглинання чи випромінювання.

Електромагнітне вилучення можна характеризувати довжиною хвилі  $\lambda$ , котра пов'язана з частотою  $\nu$ :

$$\nu = \frac{c}{\lambda},$$

де  $c$  – швидкість світла у вакуумі (  $2,998 \cdot 10^8$  м/с ), частота вимірюється в герцах ( Гц ) чи обернених секундах (  $s^{-1}$  ), довжину хвилі виражають найчастіше в нанометрах ( нм,  $10^{-9}$  ).

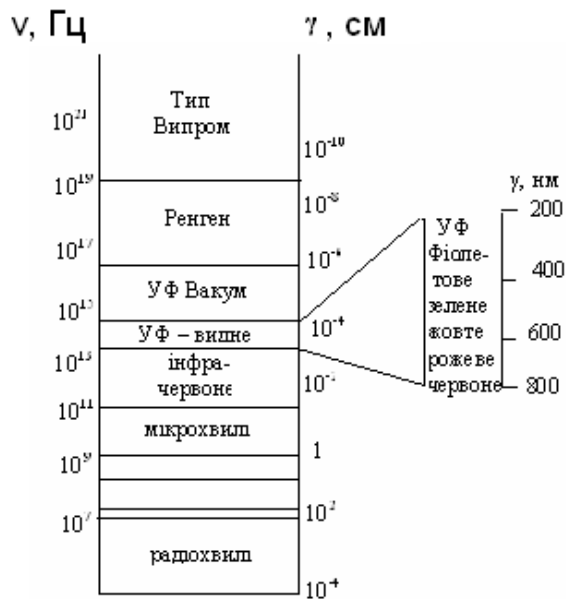
Енергія випромінювання пов'язана з довжиною хвилі співвідношенням

$$E = \frac{hc}{\lambda},$$

де  $h$  – постійна Планка, рівна  $6,62 \cdot 10^{-27}$  ерг/с.

Сукупність усіх довжин хвиль ( частот ) електромагнітного випромінювання складає електромагнітний спектр: від  $\gamma$  – промінів ( короткохвильова область, фотони володіють високою енергією ) до радіохвиль ( довгохвильова область, фотони з низькою енергією ( мал. 11 ).

На практиці мають справу з випромінюванням, що характеризується певним інтервалом частот або довжин хвиль, котрий охоплює деякий інтервал спектра. Для зображення цього інтервала використовують термін інтервал випромінювання. Важливою характеристикою електромагнітного випромінювання є монохроматичність. Мал. 11. Області електромагнітного спектра



Світловий потік, у котрому електромагнітні хвилі мають однакову довжину хвилі, називають монохроматичним, на відміну від поліхроматичного, що складається з хвиль різних довжин.

Вибіркове поглинання атомами та молекулами випромінювання з певними ( у відповідності з енергетичними рівнями ) довжинами хвиль призводять до того, що кожна речовина володіє

власним характерним поглинанням та випусканням, тобто індивідуальними спектральними характеристиками, випромінювання котрих складає основну задачу спектральних методів.

Для аналітичних цілей використовують, як поглинання випромінювання молекулами ( спектрофотометрія ) та атомами ( атомно – адсорбційна спектроскопія ), так і для випускання випромінювання молекулами ( люмінісценція ) та атомами ( емісійна спектроскопія ).

Спектрофотометрія ( молекулярна адсорбційна спектроскопія ) заснована на вибіркового поглинанні електромагнітного випромінювання однорідними нерозсіюючими системами. Вимірюючи поглинання такої системи випромінювання різноманітних довжин хвиль, можна отримати спектр поглинання, тобто залежність поглинання від довжини хвилі. Спектр поглинання – це якісна характеристика речовини. За характером спектра поглинання ( особливо в інфрачервоній області ) можна ідентифікувати речовини.

Кількість поглинутої енергії пропорційна концентрації поглинаючої речовини в розчині та товщі поглинаємого прошарку. Ця залежність виражається законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c,$$

де  $A$  – оптична густина,  $l$  – товщина прошарку,  $c$  – концентрація,  $\epsilon$  – молярний коефіцієнт поглинання ( $\epsilon = A$  при  $l = 1$  см, та  $c = 1$  моль/л).

Оптична густина – вимірювана речовина у спектрофотометрії, вона являє собою логарифм відношення інтенсивностей падаючого та пройшовшого крізь поглинальну систему випромінювання. Величина  $\epsilon$  слугує характеристикою чуттєвості: чим більше  $\epsilon$ , тим меншу кількість речовини можна визначити. Аква-йони металів та більшості аніонів слабо поглинають випромінювання видимої області спектра ( $\epsilon = 10-10000$ ), тому їх зазвичай переводять шляхом хімічної реакції в більш інтенсивно поглинальну сполуку (як правило, комплекси, особливо з органічними лігандами), а потім проводять вимірювання. Багато органічних речовин ( гормони, амінокислоти ) інтенсивно

поглинають в ультрафіолетовій області спектра сполуки з широкою смугою поглинання ( при проведенні серійних аналізів ).

Спектрофотометри здебільшого використовують для вивчення систем та у деяких випадках ( для сполук з вузькою межею поглинання) для визначення концентрації. Визначаємі концентрації-  $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  М похибок складає декілька відсотків.

Атомно-адсорбційна спектроскопія заснована на вибіркового поглинанні атомів. Для переведення речовини в атомарний стан розчин зразка вприскують у полум'я чи поміщують в графітову кювету з електричним підігрівом. У результаті розчинник випаровується або згоряє, а тверда речовина атомізується. Більша частина атомів залишається у незбудженому стані або лише невелика частина збуджується з наступним випусканням вилучення:

$E_1 - E_2$

— ,

$$N_1 = N_0 \cdot A \cdot e^{-\frac{h\nu}{kT}}$$

де  $N_1$  – число атомів в енергетичному стані 1,  $N_0$  – в незбудженому стані,  $T$  – температура,  $A$  та  $K$  – константи. При пропусканні крізь такий атомарний газ випромінювання атоми поглинають фотони з енергією, відповідаючою переходу зі стану  $E_0$  у збуджений, наприклад,  $E_1$  ( тобто резонансне випромінювання ).

Поглинання світла атомами східно з з поглинанням електромагнітного випромінювання йонами та молекулами у розчині. Але спектри поглинання атомів складаються з вузьких ліній (  $\approx 10^{-2}$  нм ), тоді як спектри молекул – з широких смуг ( 1- 100 нм). Це пояснюється , по-перше, більш складною будовою молекул, по- друге, взаємодією їх з розчинником. У результаті число можливих енергетичних переходів в молекулах більше, аніж у атомах, та окремі лінії зливаються у смуги. Не існує апаратури для отримання випромінювання з такою тонкою хроматизацією, як  $\approx 10^{-2}$  нм, тому в атомно-адсорбційній спектроскопії використовують джерело випромінювання, що випускає резонансне випромінювання ( лампи з полим катодом, котрий виготовляють з певного металу).

Метод достатньо селективний. Похибка 1- 5%. Недоліком є необхідність окремого джерела випромінювання для кожного певного елемента.

Атомно-емісійна спектроскопія заснована, на вимірюванні інтенсивності світла, що випромінюється збудженими атомами. Джерелом випромінювання може бути полум'я, заряд, дуговий розряд. Полум'я є зручним джерелом збудження, широко використовуємого на практиці, особливо для визначення лужних та лужноземельних елементів.

Для отримання спектрів випускання пробу порошку чи розчину вводять в джерело збудження спектра ( наприклад, полум'я газової горілки ), де відбувається розчинення речовини в газоподібний стан та частковий розпад на атоми чи молекули типа  $MeO$  чи  $MeOH$ .

Випромінюване світло потрапляє в монохроматор, де розпадається на окремі спектральні лінії.

За характерним випромінюванням у видимій області спектра визначають S-елементи (Li, Na, K, Ca, Sr, Ba, V). Найбільшою чуттєвістю володіє реакція на натрій, котрий визначається як домішок у воді, газі реактивах.

В таблиці 4 наведені основні лінії та смуги спектрів елементів, що спостерігаються у полум'ї світильний газ-повітря.

Т а б л и ц я 4

Довжина хвиль та забарвлення полум'я

| елемент | довжина хвилі, нм                  | забарвлення лінії, смуги                                       |
|---------|------------------------------------|--|
| Li      | 670                                | карміново –червона   |
| Na      | 590                                | жовта  |
| K       | 769                                | темно-червона  |
| Ca      | 544; 622                           | зелена та червона<br>(розміщені симетрично відносно лінії Na ) |
| Sr      | 605                                | оранжева   |
| Ba      | Група ліній в області 655 -688     | карміново – червоні  |
|         | 510-580 група досить слабких ліній | зелені   |

Інтенсивність вибраних ліній, що є характеристиками для визначаємого елемента, реєструють за допомогою фотоелемента, що поєднаний з електровимірювальним приладом. За допомогою метода емісійної фотометрії полум'я можна визначати лужні та інші метали в біологічних та медичних об'єктах, ґрунтах, воді, у склі та інших зразках.

Чуттєвість метода залежить від природи визначаємого елемента та висока для лужних металів ( до  $\approx 10^{-7}$  %). Похибка досить висока ( 10-15%).

### Люмінесценція

Люмінесценцією називається властивість речовин випромінювати світло під дією різних збуджуючих факторів. За визначенням С.І. Вавілова, люмінесценцією називають надлишкове свічення тіла над тепловим (температурним) випромінюванням того ж тіла у даній спектральній області при даній температурі та за умови, що це надлишкове свічення продовжується  $10^{-10}$  с і більше, тобто перевищує період світлових коливань.

Існує декілька систем класифікації люмінесценції. С.І. Вавілов та В.Л. Левшин виділяють два типи люмінесценції:

- 1) свічення дискретних (окремих) центрів;

## 2) рекомбінаційні процеси свічення.

У першому випадку у процесі виникнення люмінесценції бере участь лише одна частинка (центр свічення), яка як поглинає енергію, так і випромінює світло. У рекомбінаційних процесах свічення поглинання енергії, як правило, здійснюється не тими частинками, які випромінюють світлові хвилі.

Якщо збудження молекул або атомів здійснюється ультрафіолетовим випромінюванням (або короткохвильовою видимою частиною спектра), то свічення називається фотолюмінесценцією або флуоресценцією, якщо збудження відбувається під дією катодних променів – катодолюмінесценцією, під дією рентгенівських променів – рентгенолюмінесценцією, за рахунок енергії, яка виникає при механічних деформаціях речовини – триболюмінесценцією, за рахунок енергії нагрівання речовини – кандолюмінесценцією, за рахунок енергії хімічної реакції – хемілюмінесценцією. Є й інші види люмінесценції.

### **Флуорометричний аналіз**

Флуорометрія базується на вимірюванні фотолюмінесценції (флуоресценції) досліджуваного розчину.

Є дві групи люмінесцентного аналізу: аналіз, заснований на безпосередньому спостереженні люмінесціюючого матеріалу, і аналіз, який проводиться після переведення досліджуваного компонента в люмінесціюючу сполуку. Друга група методів люмінесцентного аналізу близька до фотометричного аналізу. У обох випадках необхідно перевести досліджуваний компонент у сполуку, яка б у найбільшій мірі поглинала світло. При фотометричному аналізі вимірюють безпосередньо послаблення інтенсивності світлового потоку. У люмінесцентному аналізі цю реакцію можна використати тільки у тому випадку, коли значна частина поглинутої енергії виділяється не у вигляді тепла, а у вигляді світла.

*Флуоресценція* – свічення, яке виникає при опроміненні деяких речовин електромагнітними хвилями і одразу ж зникає після припинення цього опромінення. Під впливом квантів такого опромінення молекули і атоми переходять у збуджений стан. Через деякий проміжок часу (близько  $10^{-12}c$ ) молекули повертаються в основний стан. При цьому відбувається випромінювання енергії у вигляді квантів теплового випромінювання, що призводять до стабілізації молекули на нижньому збудженому рівні, а потім

відбувається випромінювання квантів енергетичним та квантовим виходами внаслідок повернення молекули в люмінесценції. Відношення випромінюваної основний стан. Таким чином, енергія енергії люмінесценції до енергії поглинутого (частота) флуоресцентного світла називається *енергетичним виходом* випромінювання повинна бути меншою, *люмінесценції*, а відношення числа ніж енергія (частота) збуджуючого випромінюваних квантів до числа опромінення: поглинутих називається *квантовим виходом люмінесценції*.

Це явище має назву закону Стокса-Якщо  $B_{en}$  – енергетичний, а  $B_{кв}$  – квантовий Ломмеля. вихід люмінесценції,  $E_{л}$  та  $E_{c}$  – відповідно

Ефективність перетворення енергії енергії люмінесценції та енергія поглинутого поглинутого світла в енергію світла, а  $N_{л}$  і  $N_{c}$  – число випущених та люмінесценції характеризується поглинутих квантів, то

$$B_{en} = \frac{E_l}{E_c} \cdot B_{кс} = \frac{N_l}{N_c}$$

Враховуючи, що енергія  $N$  квантів дорівнює  $E=Nh$

$$B_{en} = \frac{N_l h \nu_l}{N_c h \nu_c} = B_{кс} \frac{\nu_l}{\nu_c}$$

У відповідності із законом Стокса-Ломмеля, спектр флуоресценції та його максимум завжди зсунуті відносно спектра поглинання та його максимуму у довгохвильову область спектра. Тому речовини, що поглинають випромінювання в ультрафіолетовій частині спектра, будуть флуоресцювати світлом видимої області спектра; речовини, флуоресценція яких збуджується світлом видимої частини спектра, будуть флуоресцювати у більш довгохвильовій області спектра.

Відстань між максимумом спектра поглинання та максимумом спектра флуоресценції називається стоксовим зсувом. Чим він більший, тим надійніше визначення речовини флуоресцентним методом.

Кількісний аналіз базується на залежності інтенсивності флуоресценції розчинів від концентрації флуоресціюючої речовини. В області концентрацій  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> ця залежність має лінійний характер – описується рівнянням:

$$F = I_0 \cdot 2,3 \varepsilon \cdot b \cdot c \cdot \varphi,$$

де  $F$  – інтенсивність флуоресценції, *квант/с*;

$I_0$  – інтенсивність збуджуючого світла, *квант/с*;  $\varepsilon$  – молярний коефіцієнт поглинання;

$b$  – товщина флуоресцентного шару, *см*;  $c$  – концентрація розчину, *моль/дм<sup>3</sup>*;

$\varphi$  – квантовий вихід флуоресценції, що залежить від природи речовини.

За умови, що  $I_0$ ,  $\varepsilon$ ,  $b$ ,  $\varphi$  – постійні величини, то:

$$F = K \cdot c.$$

При високих концентраціях розчину ( $>10^{-4}$  *моль/дм<sup>3</sup>*) лінійна залежність не виконується.

Інтенсивність флуоресценції залежить від природи речовини, температури, *pH* середовища, присутності у розчині домішок, що викликають гасіння флуоресценції.

Кількісний флуоресцентний аналіз потрібно проводити при невисоких температурах та певних значеннях *pH*. Метод використовується для визначення малих кількостей неорганічних та органічних речовин: антибіотиків, вітамінів, гормонів тощо.

Інтенсивність флуоресценції досліджуваних речовин визначають за допомогою флуорометрів.

### Рефрактометричний аналіз

Метод базується на вимірюванні показника заломлення досліджуваної речовини.

При переході променя світла з одного оптично прозорого середовища в інше, він змінює свій напрямок, тобто заломлюється.

*Показник заломлення* – це відношення швидкості розповсюдження світла в першому середовищі ( $V_1$ ) до швидкості розповсюдження світла у другому середовищі ( $V_2$ ):

$$n = \frac{V_1 \sin \alpha}{V_2 \sin \beta},$$

де  $\alpha$  – кут падіння світла;

$\beta$  – кут заломлення світла.

Відношення швидкості розповсюдження світла у вакуумі до швидкості розповсюдження світла у даному середовищі або відношення синуса кута падіння до синуса кута заломлення ( $n$ )



називається *абсолютним показником заломлення*; при переході променя світла з повітря у речовину – *відносним показником заломлення* іншого середовища по відношенню до першого. Практично вимірюють  $n$  по відношенню до повітря, тобто вимірюють відносний показник заломлення. Його величина залежить від агрегатного стану речовини, поляризованості, довжини хвилі світла, що проходить, температури. Як правило, рефрактометричні вимірювання виконують при  $t^\circ=20^\circ\text{C}$  і довжині хвилі  $D$  спектра атома Натрію ( $\lambda=589,3\text{нм}$ ).

Показник заломлення, визначений за таких умов, позначають  $n_{20}^D$ .

Рефрактометричний метод використовується для кількісного визначення білків, концентрацій розчинів органічних та мінеральних кислот, солей, етилового спирту, гліцерину, лікарських речовин, а також їх сумішей. В основі таких визначень лежить залежність між концентрацією розчину речовини та показником заломлення, що виражається формулою:

$$n = n_0 + F \cdot c,$$

де  $n$  – показник заломлення розчину;

$n_0$  – показник заломлення розчинника;

$F$  – фактор, який дорівнює величині приросту показника заломлення при збільшенні концентрації на 1%. Встановлюється експериментально.

Величини факторів показників заломлення для багатьох водних розчинів, в тому числі лікарських речовин, наведені в довідниках та спеціальних таблицях.

Визначення концентрації розчинів рефрактометричним методом можна виконувати також за калібрувальним графіком у координатах  $n$ - $C$  або за таблицями.

### **Поляриметричний аналіз**

Поляриметричний метод аналізу заснований на вимірюванні кута обертання площини поляризації поляризованого світла, що пройшло крізь оптично активне середовище.

У неполяризованого світлового променя коливання відбуваються в усіх площинах, перпендикулярних до напрямку його розповсюдження. Промінь, коливання якого відбувається тільки в одній площині, називається *поляризованим*, а площина, в якій він коливається, називається *площиною коливання поляризованого променя світла*; площина, перпендикулярна до неї, називається *площиною його поляризації*.

Речовини, які здатні обертати площину поляризації поляризованого променя світла, називаються *оптично активними*.

Оптична активність пов'язана або з особливостями будови кристалічної ґратки речовини, або з особливостями будови молекул речовин.

Оптична активність, обумовлена особливостями будови кристалічної ґратки речовини, зникає при розчиненні чи розплавленні цієї речовини.

Оптична активність, обумовлена особливостями будови молекул речовини, виявляється лише у розчині цієї речовини або в газоподібному стані. До таких речовин відносяться, у більшості випадків, органічні речовини, в молекулах яких є асиметричні (хіральні) центри.

В залежності від природи речовини, обертання площини поляризації може мати різний напрямок та величину.

Якщо при проходженні поляризованого світла крізь розчин оптично активної речовини у полі зору поляриметра площина поляризації обертається праворуч (за годинниковою стрілкою), то речовину називають *правообертаючою* та перед її назвою ставлять індекс  $d$  або знак  $+$ . Якщо обертання площини поляризації відбувається вліво (проти годинникової стрілки) – *лівообертаючою* і перед її назвою ставлять індекс  $l$  або  $-$ .

Відхилення площини поляризації від початкового положення, виражене в кутових градусах, називається *кутом обертання* та позначається літерою  $\alpha$ . Величина кута обертання залежить від природи речовини, концентрації розчину, товщини шару розчину, через який проходить поляризований промінь світла, довжини хвилі світла та температури.

Оптичну активність речовини виражають величиною питомого обертання, яку визначають як кут обертання площини поляризації при проходженні поляризованого світла крізь шар розчину товщиною в  $1\text{ дм}$  з концентрацією речовини в цьому розчині  $1\text{ г/см}^3$ . Величина питомого обертання залежить від природи речовини, довжини хвилі поляризованого світла та температури. Визначення стандартного питомого обертання проводять при температурі  $20^\circ\text{C}$  і довжині хвилі

$D$  спектра атома Натрію ( $\lambda=589,3\text{ нм}$ ) і позначають  $[\alpha]_D^{20}$ . Значення  $[\alpha]_D^{20}$  є постійними для кожної оптично активної речовини і наводяться у довідниках.

Величину питомого обернення для речовин, що являють собою рідини, розраховують за формулою:

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

де  $\alpha$  – кут обернення в градусах;

$l$  – товщина шару рідкої речовини, через який проходить промінь поляризованого світла;

$\rho$  – густина рідкої речовини, кг/дм<sup>3</sup>.

Для розчинів величина питомого обернення залежить від природи розчинника і концентрації оптично активної речовини; розраховується за формулою:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c}.$$

де  $\alpha$  – кут обернення в градусах;

$l$  – товщина шару розчину, через який проходить промінь поляризованого світла;

$c$  – концентрація розчину, г/100см<sup>3</sup> розчину.

Величини стандартного питомого обернення використовують для ідентифікації оптично активних речовин, для визначення концентрації оптично активних речовин у розчині.

Для вимірювання кута обернення використовуються прилади – поляриметри.

## Інтерферометрія

Інтерферометричний метод аналізу базується на вимірюванні зсуву інтерференції світлових променів, що проходять крізь кювети з розчином речовини і розчинником і через щілини коліматора. При цьому виникає різниця у ході променів, у результаті чого на матовому екрані окуляра приладу утворюються інтерференційні смуги, які зміщені відносно оптичної осі інтерферометра. Зміщення смуг пов'язане з показником заломлення досліджуваного розчину

$$n_p - n_0 = \frac{N\lambda}{l}.$$

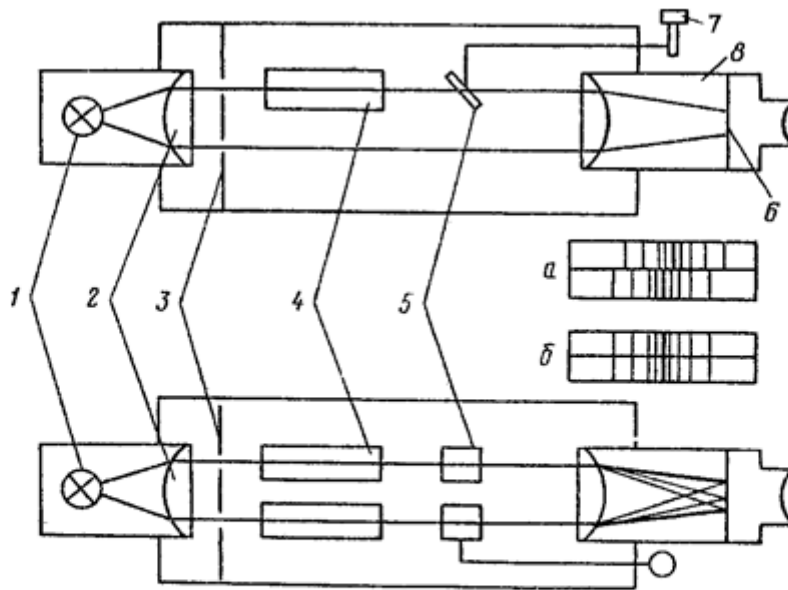
де  $n_p$  – показник заломлення розчину;

$n_0$  – показник заломлення розчинника;

$N$  – зміщення інтерференційних смуг;

$\lambda$  – довжина світлової хвилі;

$l$  – довжина кювет з розчином і розчинником.



Р и с . 4. Схема інтерферометра Релея.

1 – лампи; 2 – лінзи; 3 – щілини; 4 – кювети; 5 – екран; 6 – компенсатори; 7 – мікрометричний гвинт; 8 – зорова труба.

Для вимірювання зміщення інтерференційних смуг застосовують інтерферометри (Р и с . 4). Світло від лампи розжарювання 1 проходить через конденсорну лінзу 2, щілини коліматора 3 і потрапляє на кювети 4 з розчинником та розчином речовини. Причому через кювети проходить верхня половина пучка світла, а нижня частина світла минає кювети і поступає в зорову трубку, де на матовому екрані 5 утворює нижню нерухому систему інтерференційних смуг. Різні середовища (розчин і розчинник) змінюють швидкості світлових променів, що проходять, тому у верхній частині світла, яке проходить крізь кювети, спостерігається різниця їх ходу. Потім промені проходять через пластини компенсатора 6, одна з яких обертається та зв'язана з мікрометричним гвинтом 7 та шкалою відліку. Після компенсатора промінь надходить у зорову трубку 8 і утворює верхню рухливу систему інтерференційних смуг (а). Мікрометричним гвинтом обертають рухому пластину компенсатора до суміщення рухомої системи інтерференційних смуг (б) з нерухомою і за шкалою приладу заміряють зміщення смуг.

Інтерференційним методом можна досліджувати дуже розведені розчини з масовими частками розчинених речовин 0,01-0,02 %.

### Нефелометричний та турбідиметричний методи аналізу

Нефелометричний та турбідиметричний методи застосовують для аналізу суспензій, емульсій і інших мутних середовищ. Інтенсивність світлового потоку, що проходить крізь такі середовища, зменшується внаслідок розсіювання та інших процесів взаємодії світла із завислими частинками.

Суть нефелометричного та турбідиметричного методів аналізу полягає в тому, що досліджуваний компонент переводять у малорозчинну сполуку, яка знаходиться в рідині в завислому стані, та вимірюють інтенсивність розсіяного світла або послаблення світлового потоку цією суспензією.

Якщо вміст речовини знаходять за інтенсивністю розсіяного світла, то такий метод називається *нефелометричним*. Метод визначення вмісту речовини за послабленням суспензіями світлового потоку називається *турбідиметричним*. У даних методах аналізу інтенсивність світлового потоку змінюється, але спектральна характеристика його залишається постійною.

У нефелометрії та турбідиметрії застосовують реакції осадження, основними вимогами до яких є утворення практично нерозчинного продукту реакції, який повинен знаходитися не у вигляді осаду, а у вигляді завислих частинок (суспензії).

Світло розсіюється частинками, розміри яких більші за довжину хвилі світла, яке падає на них. Інтенсивність розсіяного світла цими частинками описується законом Релея:

$$I = I_0 \frac{(n_1^2 - n_2^2)^2 N V_i^2}{\lambda^4 r^2} \cos^2 \beta,$$

де  $n_1$  і  $n_2$  – показники заломлення частинок та середовища відповідно;

$N$  – загальне число світлорозсіюючих частинок

$V_i$  – об'єм частинки, що розсіює світло (форма частинки приймається за кулю);

$\lambda$  – довжина хвилі падаючого світла;

$r$  – відстань до приймача розсіяного світла;

$\beta$  – кут між падаючим та розсіяним світлом.

За наявності в суспензії крупних частинок, діаметр яких вимірюється десятками нанометрів, закон Релея не виконується. У такому разі зв'язок між концентрацією та інтенсивністю світлорозсіювання установлюють за калібрувальними графіками. При дослідженні заданої системи показники заломлення  $n_1$  і  $n_2$  залишаються постійними, величини  $r$  і  $\beta$  визначаються конструкцією приладу і теж не змінюються. За цих умов рівняння набуває вигляду:

$$I = kI_0 \frac{NV_i^2}{\lambda^4}$$

З цієї формули видно, що чим менша довжина хвилі падаючого світла, тим інтенсивніше розсіюється світло частинками суспензії.

Концентрація, за визначенням, є числом частинок в одиниці об'єму:

$$c = \frac{N}{N_A \cdot V}$$

де  $V$  – об'єм суспензії;

$N_A$  – постійна Авогадро;

$N$  – загальне число світлорозсіюючих частинок.

Підставляючи значення  $c$  у рівняння  $I = kI_0 \frac{NV_i^2}{\lambda^4}$ , отримуємо:

$$I = kI_0 \frac{N \cdot c \cdot V \cdot V^2}{\lambda^4}$$

При постійних значеннях об'єму суспензії  $V$ , об'єму світлорозсіюючої частинки  $V_i$ , довжини хвилі падаючого світла  $\lambda$  рівняння набуває вигляду:

$$I = kI_0 c; \text{ або } \frac{I}{I_0} = kc.$$

Рівняння показує, що відношення інтенсивності розсіяного світла до інтенсивності падаючого пропорційно концентрації завислих частинок.

Для вимірювання інтенсивності розсіяного світла користуються приладами нефелометрами, які мало відрізняються від фотоелектроколориметрів, а послаблення світлового потоку в турбідиметрії вимірюється фотоелектроколориметрами.

Методами нефелометрії та турбідиметрії визначають дуже малі концентрації йонів, які утворюють малорозчинні сполуки. Так, сульфат-іони визначають у вигляді суспендованого барій сульфату, хлорид-іони – у вигляді завислого у воді аргентум хлориду та ін.



Нефелометрія та турбідиметрія відзначаються високою чутливістю, що важливо по відношенню до тих елементів або йонів, для яких відсутні кольорові реакції та неможливо застосувати колориметричні методи.

Електрохімічні методи засновані на процесах, що відбуваються або на електродах, або у міжмолекулярному просторі. Більшість методів, найбільш часто використовуються в біологічних дослідженнях, відносяться до першого з трьох типів.

Електродний процес – гетерогенна реакція, що полягає у переносі, заряджених частин ( йона, електрона ) через межу розподілу двох співпадаючих електропровідних фаз. В результаті такого переноса на поверхні електрода виникає різниця потенціалів, що у свою чергу обумовлене утворенням подвійного електронного шару. Як усілякий рівноважний процес, електродна реакція з плином часу приходить до електрохімічної рівноваги, при котрому її швидкість в обидвох напрямках однакова. З цієї причини електричний струм крізь межу розподілу фаз не протікає, та на електроді встановлюється рівноважний потенціал.

Вимірювання величин рівноважних електродних потенціалів входить до задачі потенціометричного методу аналізу. При цьому складають електрохімічну комірку з двох напівелементів. Один з них містить індикаторний електрод, інший – електрод порівняння. Компенсаційним методом вимірюють фактично потенціал електрохімічно ізольованого індикатора електрода відносно електрода порівняння, тобто ЕРС гальванічного елемента у відсутності струму у ланцюзі.

При проходженні струму в електрохімічній комірці спостерігається відхилення величин електродних потенціалів від їх рівноважних значень. В силу ряду причин виникає так звана поляризація електрода. Явище поляризації електрода використовують у ряді електрохімічних методів, насамперед в полярографії.

У тих випадках, якщо визначаема речовина кількісно піддається електролізу та є можливість виміряти кількість електрики, витраченої на це електроперетворення речовини використовують кулонометричний метод аналізу.

## Іонометрія

Електродні процеси надзвичайно багатообразні. Їх можна класифікувати у відповідності з механізмом наступним чином:

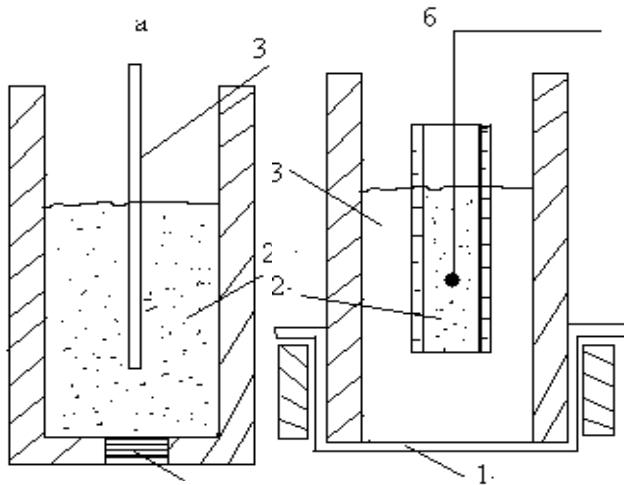
1) процеси, що відбувається з переносом електронів, особисто електрохімічні процеси. У цьому випадку електрод володіє електронною провідністю.

2) процеси, пов'язані з перенесом йонів. При цьому електроду притаманна йонна провідність. Таким властивостями володіють йоноселективні мембранні електроди, що широко використовують у наш час в іонометрії. Мембрана, як правило, проникаюча для одного чи декількох типів йонів, що забезпечує її достатньо високу селективність. В той же час, знайшовши необхідний матеріал, можна скласти мембранний електрод, обернено функціонуючий відносно будь – якого типу йонів.

Йоноселективні електроди конструюються на основі різноманітних речовин неорганічного, органічного та природного походження: моно- та полікристалів, різноманітних осадів та деяких мінералів, скла, хелатів, рідких та твердих йонообмінників, макроциклічних сполук, наприклад, антибіотиків, ферментів та інше.

Нараховується близько 30 типів різноманітних мембранних електродів, більше половини котрих використовують для дослідження складних систем. Область використання йонометрії дуже велика. До неї відносяться насамперед, рН – метрія – визначення рН у різних неорганічних, органічних, біологічних та інших системах. А також методи встановлення концентрації багатьох катіонів та аніонів, що містяться у розчинах, у тому числі природного характеру. Тому йонометрія стає незамінним інструментом при контролі технічної сировини та технологічних процесів, що забруднюють навколишнє середовище, біохімічних, медико-біологічних, клінічних дослідженнях, аналізі природних та стічних вод, в геології, ґрунтознавстві, агрохімії, океанології та інше.

Йоноселективні електроди зручні для здійснення постійного безперервного контролю за зміною концентрацій випромінюваних компонентів, за дистанційного керування процесами. Розробка надійних мембранних електродів селективних до йонів



Мал. 12 схематична будова електродів а – з твердою мембраною: 1- тверда мембрана, 2- внутрішній розчин, 3 – внутрішній електрод порівняння, б – з рідкою мембраною: 1- мембрана, 2 – внутрішній розчин та електрод порівняння, 3 – рідкий органічний йонообмінник

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , призвела до можливості випромінювати такі фізіологічні процеси, як дифузія йонів через нервові та м'язові мембрани, коагуляція крові, внутрішня секреція, функції ферментів, утворення кісток, виділення гормонів з ендокринних залоз, та інше. Фторид – селективний електрод використовується для визначення вмісту фториду

у питній воді, у зубній пасті, фармацевтичних препаратах, слині, сечі, зубах, кістках, вітамінах, добривах та

багатьох інших мінералах. Спеціальні ферментні електроди необхідні для аналізу біологічних рідин на сечивину, глюкозу, амінокислоти та інше.

Йоноселективні мембранні електроди систематизують за різноманітними класифікаційними показниками: за

агрегатним станом, призначенням, типам активного компонента, механізму йонного переносу. Зазвичай розрізняють два типи мембранних електродів ( мал.12 ):

1. Електродні системи з твердими мембранами
2. електродні системи з рідкими мембранами.

У свою чергу тверді мембранні електроди можуть бути гомогенними та гетерогенними. Гомогенні конструюють на основі моно- та полікристалів: наприклад,  $\text{Zn}(\tau)$  – селективний електрод ). Гетерогенні – складаються з активної електродної речовини, поміщеного до інертного носія. Активним компонентом можуть бути кристалічні речовини, мінерали, хелати, тверді йонообмінники.

Рідкі мембранні електроди являють собою розчин електродно- активної речовини ( хелат, йонообмінник, біологічно активна речовина) в органічному розчиннику. Органічна фаза замкнена у підходячу трубку та віддалена від водного досліджуємого розчину напівпроникною інертною мембраною.

Незалежно від типу мембрани, поведінка йонселективних електродів підпорядкована одним і тим самим принципово загальним закономірностям. Різниця заключається у деталях механізму переносу йонів, котрий складається з двох стадій: 1)



переніс йона крізь межу розподілу двох фаз ( розчин – мембрана ), 2) переміщення йона чи заряду всередині мембрани.

В загальному випадку, якщо напівпроникаючу мембрану помістити між двома розчинами електроліта, то через неї дифундують відповідні йони до тих пір, доки не встановиться електрохімічна рівновага. За законами мембранної рівноваги створюється різниця в концентраціях йонів ( припустимо катіонів, що містяться у розчинах, які розділяються мембраною, розчинах ), що призводить до різниці потенціалів, що має назву мембранний потенціал  $E_M$ :

$$E_M = K + \frac{RT}{Z_i \tau} \ln \frac{a_1}{a_2},$$

де  $Z_i$  – заряд потенціалвизначаємого йона;  $a_1$  та  $a_2$  – його активності в двох розчинах, до чого  $a_1 > a_2$ .

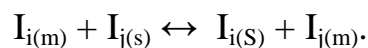
Якщо один з розчинів – стандартний та активність йонів в ньому постійна ( зазвичай зовнішній розчин ), то величину  $E_M$  можна виразити

$$E_M = K + \frac{RT}{Z_i \tau} \ln a_i.$$

Тверда мембрана складається з активної речовини з фіксованими йоногенними групами, що містять йоновмісні вузли чи центри, в котрих розміщені йони.

Йонообмінна теорія мембранних електродів була розроблена спочатку для скляного електрода.

Ця теорія виходить з пропозицій, що мембранний потенціал виникає в результаті йонообмінного процесу, що відбувається на межі розподілу : мембрана,  $m$  ( скло )-розчин,  $S$ :



Рівноважний мембранний потенціал у розчині, що містить основний визначаємый йон  $I_i$  та побічний -  $I_j$ , описується рівнянням:

$$E_M = \text{const} \pm \frac{RT}{Z_i \tau} \ln \left( a_i + \frac{u_j}{u_i} K_{ij} a_j^{Z_j/Z_i} \right),$$

де  $u_i$  та  $u_j$  – рухомості йонів у фазі мембрани;  $K_{ij}$  – константа йонного обміну;  $\pm$  - в залежності від того, який обмін відповідно відбувається - катіонний чи аніонний. Член  $u_i/u_j$  виражають однією величиною  $K$  чи  $K_{i/j}$ , називається коефіцієнтом селективності мембранного електрода. Чим менший цей коефіцієнт, тим більш селективна мембрана до основних потенціалвизначаючих йонів.

Найбільша різниця рідких мембран полягає у тому, що вони містять рухомі йоногенні групи. Дію такої мембрани наведено на мал. 13. Катіони  $A^+$  та  $B^+$  вільно проникають у мембрану. Органофільні аніони  $R^-$  затримуються в мембрані і зазвичай орієнтовані таким чином, що полярні групи молекул ( наприклад, -  $\text{COOH}$ , -  $\text{POOH}$ ) напрямлені у сторону водної фази. Аніони  $X^-$  практично не потрапляють з розчину в мембрану.

Теорія виникнення потенціала у випадку рідких мембран базується на законі розподілення речовини між двома незмішуваними рідинами

Рівняння мембранного потенціала має наступний вигляд:

$$E_M = \text{const} + \frac{RT}{T} \ln \left( a_A + \frac{D_B}{D_A} \frac{U_B}{U_A} \cdot a_B \right),$$

Таким чином, у випадку рідких мембран найважливішим параметром селективності є співвідношення коефіцієнтів розподілення визначеного та побічного йона.

Основними характеристиками йоноселективних електродів є наступні:

1) основна електродна функція – зворотність мембранного електрода відносно основних потенціал-визначаємих йонів – виражається залежністю  $E_M = f(p_{a_i})$  та графічно являє собою пряму з кутовим коефіцієнтом або рівним теоретичному значенню  $RT/Z_i \tau \ln 10$

чи декілька що відхиляється від останнього (

електроди з «неповною функцією» ).

2) селективність електрода обумовлена впливом на електродну функцію побічних йонів;

3) час життя електрода;

4) час відгуку – тривалість встановлення значення рівноважного потенціала;

5) стабільність показників електрода;

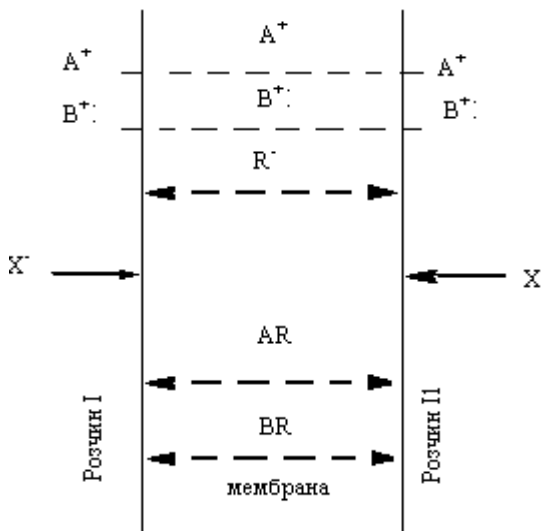
б) поляризація - стійкість його показників за наявності потоків у ланцюгу.

Розглянемо найважливіші типи йоноселективних електродів

Скляні електроди. Скляний електрод займає проміжне положення між твердими та рідкими мембранами. Скло, що використовують для його виготовлення повинно мати певний хімічний склад та володіти спеціальними фізичними властивостями. Крім давно відомих скляних електродів, функціонуючих як водневі, створюються цінні сорти скла для виготовлення електродів, чутливих до йонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Li}$  та інше.

За структурою скло – тримірна решітка, побудована з кремнійкисневих ланцюгів. Порожнини у такій решітці зайняті катіонами ( наприклад, лужних металів ), що утримуються електростатичними полями сусідніх йонів кисню. Ці катіони можуть зворотно заміщуватись. Тому скляна мембрана провідна виключно для катіонів та функціонує, як катіонообмінник.

Скло, що містить  $\text{SiO}$  –обмінні центри, володіють сильним електростатичним полем та значною схожістю з водневим катіоном. Напроти, натрійалюмосілікатне скло з  $\text{AlOSi}$  –центрами, що мають менш сильне електростатичне поле, виявляють більшу спорідненість з катіонами металів. Переміщення йонів відбувається лише в



Мал. 13 схематичне зображення рідкої мембрани.

поверхневому гідратованому прошарку скла. Схему гальванічного елемента, до складу котрого входить скляний електрод, можна зобразити:

|                                  |  |                   |  |   |
|----------------------------------|--|-------------------|--|---|
| Електрод<br>порівняння<br>(0,1М) | НСІ<br>внутріш-<br>ньо гідра-<br>тований<br>прошарок | сухий<br>прошарок | зовнішній<br>гідратова-<br>ний проша-<br>рок | дослід-<br>жуваний<br>розчин<br>порів-<br>няння |
|                                  |  |                   |  | елект-<br>род                                   |
|                                  |  |                   |  | II  |
|                                  |  |                   |  | мембрана  |

ЕРС отриманого елемента складається з алгебраїчної суми потенціалів, що виникають на окремих поверхнях розподілу фаз та може бути записано в скороченій формі:

$$ЕРС = K + V \text{ рН} .$$

До величини константи  $K$  входить так називаємий потиенціал асиметрії (декілька одиниць мВ), що виникає через різні властивості внутрішнього та зовнішнього прошарків скла. Тому при роботі з скляними електродами потрібно їх градуювання за стандартними буферними розчинами.

Тверді мембранні електроди з кристалічних матеріалів (монокристалів, змішаних кристалів, полікристалічних речовин та інше) володіють достатньо високою йонною провідністю та селективністю. Це зумовлене тим, що у вузлах кристалічної решітки розміщуються йони певного заряду та розміру, заміщені лише відповідними за даними чинниками йонами. Йонний обмін може бути пов'язаний з хемосорбцією та ізоморфним заміщенням, а переніс заряду у кристалі відбувається за рахунок дифектів кристалічної решітки, коли вакансії займаються вільними сусідніми йонами. Механізм функціонування подібних мембран досить простий, та, як правило, вони володіють теоретичною йонною функцією. До них висувають певні вимоги: мембрани повинні бути механічно простими, хімічно стійкими та володіти малою розчинністю. В якості прикладів можна навести наступні мембрани.

Фторид-селективний електрод з  $\text{LaF}_3$  з доданим  $\text{EuF}_2$  володіє високою провідністю за рахунок великої рухомості йона  $\text{F}^-$  в кристалічній решітці. Фторидна функція зберігається в межах  $10^{-6} - 10^0$  г-йон/л  $\text{F}^-$ , на котру не впливають йони  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ . Найбільший вплив виявляють йони  $\text{OH}^-$  ( $K_{\text{F}^-/\text{OH}^-} = 10^{-1}$ ). Відхилення, спостерігаються у кислому середовищі, обумовлені утворенням  $\text{HF}$  та  $\text{HF}_2^-$ .

$\text{Ag}^+$  чи  $\text{S}^{2-}$  -селективна мембрана у вигляді стиснутої капсули на основі  $\text{Ag}_2\text{S}$  провідна за рахунок йонів  $\text{Ag}^+$  та дозволяє визначити в  $10^{-8}$  г-йон/л  $\text{Ag}^+$  чи  $\text{S}^{2-}$ .

$\text{I}^-$  ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ),  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$  –селективні електроди виготовляються диспергуванням відповідних солей у  $\text{Ag}_2\text{S}$  (для  $\text{CN}^-$  використовують  $\text{AgI}$ ). Аналогічно, на основі  $\text{Ag}_2\text{S}$  з додаванням відповідного сульфїда розроблені  $\text{M}^{2+}$  ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) – мембранні електроди.

У геторенних мембранних електродах нерозчинний осад ( $\text{AgI}$ ) заточений в інертний зв'язуючий твердий матеріал (силіконовий каучук). Це – осадочні мембранні електроди. До рідких мембранних

електродів відносяться  $\text{Ca}^{2+}$  -селективна мембрана на основі додецилфосфата кальція в діоктилфталаті. Електронна функція зберігається у межах  $10^{-5} - 10^{-1}$  г-йон/л. Коефіцієнти селективності складають  $10^{-4}$  відносно йонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  та  $1,5 \cdot 10^{-2}$  -  $\text{Mg}^{2+}$

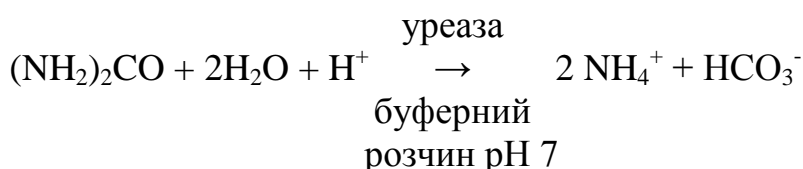
Рідкі йонообмінники на основі високомолекулярних сполук тетра-алкіламонію, -фосфонія, -арсонія загальної формули  $R_4\text{Э-An}(\text{Э-N, P, As, An} - \text{різноманітні аніони неорганічних кислот})$  слугують електродним матеріалом для виготовлення багаточисельних аніон-селективних мембран. Так, мембрана з тетрадециламонія рекомендована для визначення  $\text{NO}_3^-$  ( $10^{-6} - 2 \cdot 10^0$  г-йон/л) в присутності 100-1000-кратного надлишка багатьох аніонів, з трикаприлметиламонію – для  $\text{CO}_3^{2-}$  ( $10^{-6} - 10^{-1}$  г-йон/л) з коефіцієнтом селективності  $10^{-2}$  (до  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ).

Особливий інтерес заслуговують мембранні електроди, засновані на використанні «нейтральних носіїв» - макроциклічних молекул (полієфірів), наприклад антибіотиків (валіноміцин). Молекула останнього, виконуючі роль сольватної системи навколо катіона, є споріднена з  $\text{K}^+$  за рахунок координації 6-ти карбонільних кисневих атомів. Калієва функція виконується у діапазоні концентрацій  $10^{-6} - 10^{-1}$  г-йон/л з коефіцієнтами селективності:  $K_{\text{K/Na}} = 10^{-4}$ ;  $K_{\text{K/Ca та Mg}} = 5 \cdot 10^{-3}$ ;  $K_{\text{K/NH}_4} = 2 \cdot 10^{-2}$ . Валіноміциловий електрод, так само, як і  $\text{Ca}^{2+}$  - електрод, широко використовується біологами та медиками для дослідження різних біохімічних систем, фізіологічних розчинів та інших біологічних об'єктів.

Більш зручним та надійним у роботі стали плівкові чи матричні електроди, виготовлені на основі тих самих матеріалів, що й рідкі мембрани. Для отримання достатньо еластичної механічно міцної плівки розчинник, у котрому розчинений йонообмінник, повинен бути одночасно пластифікатором полімерної речовини з йонообмінником. Так, полівінілхлоридна матриця, що пластифікована трибутилфосфатом, селективна до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Плівковий калієвий електрод на основі валіноміцина володіє більшою стійкістю й тривалістю дії (до 3-6 місяців).

Ферментні електроди являють собою електродні пристрої, що дозволяють встановлювати концентрацію речовини, що бере участь у ферментативних реакціях. Для цієї мети поверхню йоноселективного електрода, наприклад скляного, покривають плівкою геля чи полімера з ферментом. При зануренні такого електрода в

досліджуваний розчин, що містить субстрат, останній проникає у гель. У результаті протікає реакція, що каталізується ферментом, з утворенням продуктів, один з котрих - потенціалвизначаємий компонент. Так, визначають вміст сечовини у розчині, використовуючи реакцію



та використовуючи  $\text{NH}_4^+$  -селективний електрод. Подібним чином вивчають процеси окислення амінокислот.

Якщо у ході ферментативної реакції змінюється рН середовища, то можна використовувати звичайний скляний електрод, чуттєвий до  $\text{H}^+$ . Створення ферментних електродів відкриває більші можливості у вивченні відповідних процесів, оскільки багато ферментів каталізують перетворення речовин досить вибірково. У зв'язку з цим можна здійснити визначення окремих речовин, що знаходяться у суміші з близькими хімічними та біологічними властивостями.

Біологічні мембрани. Мембранні процеси широко використовуються у живій природі. Живим системам властиві різні фізико-хімічні механізми переноса розчинника та розчинених речовин. Одне з явищ – «активний транспорт» - здійснюється тільки в живих мембранах. Природні мембрани різні за складом, структурою, вибірковістю, призначенням. Так, клітинні чи плазменні мембрани відділяють внутрішню частину клітини від зовнішнього середовища. При цьому мембрани володіють вибірковою проникністю, у результаті чого склади розчинів всередині та зовні клітини різні. Перенос речовини через мембрану підпорядковується електрохімічним закономірностям. Відповідно, аналогічно штучним у живих мембранах відбувається нерівномірне розподілення йонів, що викликає проявлення електричних мембранних потенціалів, що мають важливу фізіологічну дію. Властивість деяких мембран концентрувати йони. Наприклад, у деяких морських птахів мембрани носових сольових заліз здійснюють переніс NaCl з внутрішніх тканин в таких високих концентраціях, що з кінця клюва капає 5%-й розчин солі.

Вивчення мембранних явищ на живих організмах – складна наукова задача. Створення моделей клітинних природних мембран, використання живих тканин для розробки мембранних біоелектродів дозволяє здійснювати модельне дослідження йонного перенесення через мембрани та його значення в елементарній природі основних біологічних процесів.

## **Полярографія**

Полярографічний метод дослідження запропонував у 1922р. чеський хімік Ярослав Гейровський.

Метод ґрунтується на вивченні явищ, які відбуваються на крапельно-ртутному катоді. Назва методу пов'язана з процесами поляризації, які виникають при пропусканні електричного струму крізь розчини електролітів.

У досліджуваній розчин опускають два електрода; один з них, як правило катод, має малу поверхню, наприклад краплю ртуті, що витікає з дуже тонкого капіляра. Анод являє собою шар ртуті з великою поверхнею на дні електролітичної посудини. Електроди сполучають з джерелом постійного струму і поступово підвищують напругу, спостерігаючи за зміною сили струму в залежності від прикладеної напруги. Ця залежність має нерівномірний характер і виражається кривою з перегинами – хвилями. Напруга, при якій виникають ці хвилі, залежить від складу електроліту і характерна для того чи іншого катіона. Висота цих хвиль залежить від концентрації йона, який відновлюється на катоді. Таким чином, за кривою залежності сили струму від прикладеної напруги в даних умовах можна визначити склад і концентрацію електроліту, тобто провести якісний та кількісний аналіз розчину.

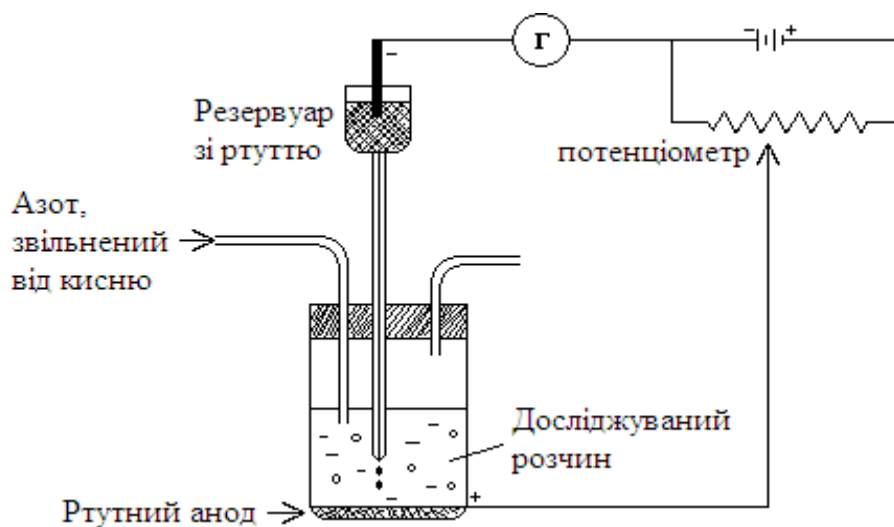
В основі полярографії лежить автоматична реєстрація сили струму при поступовому збільшенні напруги на електродах, занурених у досліджуваний розчин. У полярографічному методі використовується явище концентраційної поляризації, яка виникає на електроді з малою поверхнею при пропусканні електричного струму крізь розчин електролітів. Зі збільшенням різниці потенціалів між електродами зростає сила струму, що проходить крізь розчин, та щільність струму на малому електроді. При цьому швидкість збіднення розчину в безпосередній близькості до поверхні малого електрода зростає, як і зростає опір проходженню струму на межі електрод – розчин.

У цілому, настає такий період, коли подальше підвищення різниці потенціалів не викликає помітного зростання сили струму, що проходить крізь розчин.

При сталій рухомій рівновазі, коли кількість відновлених йонів починає дорівнювати кількості йонів, що продифундували до ртутного катода, сила струму стає постійною. Таку силу струму, при якій досягається повний розряд усіх йонів досліджуваної речовини, які надходять у приелектродний простір за рахунок дифузії, називають *дифузійним або граничним струмом*. Швидкість дифузії речовини з розчину з вищою концентрацією у розчин з нижчою концентрацією пропорційна різниці концентрацій обох розчинів. Тому дифузійний струм пропорційний концентрації йона, що визначається, в розчині.

Чутливість полярографічного методу визначається величиною ємнісного струму та становить  $10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup>, а відносна похибка визначень становить 3%. Це дозволяє досліджувати значно розведені розчини та невеликі об'єми – до 0,1-0,02 см<sup>3</sup>. Висока чутливість методу та швидкість аналізу дає можливість одночасно визначити якісний та кількісний склад досліджуваного розчину.

Полярографічний метод можна застосовувати при дослідженні сумішей без попереднього розділення речовин.



Р и с . 8 . Принципова схема полярографічної установки.

Вихідний отвір капіляра – 0,02-0,03 мм.

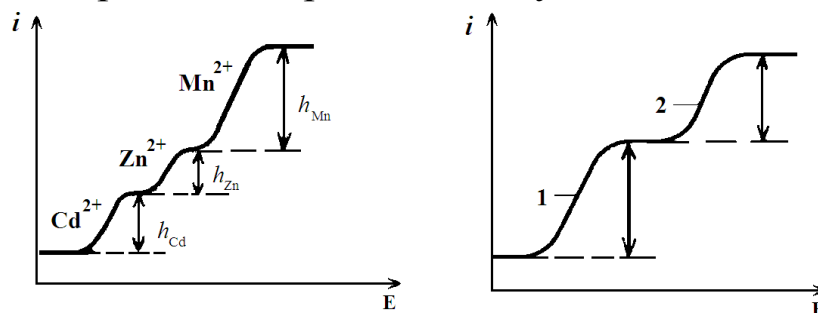
Швидкість витікання ртуті з капіляра – 1 крапля за 3-5 с.

Поверхня ртуті на дні електролізера значно більша за поверхню краплі катода, і при проходженні невеликих за величиною струмів потенціал анода залишається постійним, тобто електрод не поляризується.

Для полярографічних досліджень, як правило, використовуються автоматичні електронні полярографи, в яких полярографічні криві

записуються за допомогою самописця. Ці прилади мають високу чутливість, роздільну здатність і точність.

Залежність сили струму від напруги (полярограма) складається з декількох етапів. Спочатку сила струму незначна, але в міру зростання напруги вона зростає, оскільки заряджається ртутно-крапельний електрод, і електроліз не відбувається.



Р и с . 9. Типові полярографічні хвилі.

Невелике збільшення різниці потенціалів до значення, при якому відновлюється йон, призводить до того, що в цій частині невелике зростання напруги супроводжується значним збільшенням сили струму. При більш значному збільшенню напруги сила струму досягає деякої постійної величини. Пов'язано це з тим, що всі йони речовини, що їх аналізують, у приелектродному шарі встигають розрядитися, і при цьому швидкість дифузії йонів відстає від швидкості розрядження йонів на катоді. У випадку, коли потенціал продовжує зростати до величини, при якій починається розрядка іншого різновиду йонів, виникає нова хвиля. Таким чином, висота полярографічної, або вольтамперної, хвилі характеризує граничний (дифузійний) струм, прямо пропорційний концентрації речовини, яка визначається.

При якісному аналізі зручним є використання потенціалу напівхвилі (потенціал середини полярографічної кривої,  $E_{1/2}$ ), величина якого не залежить від концентрації досліджуваного електроліту, а залежить від природи йона, що відновлюється, і його можна використати для ідентифікації досліджуваної речовини.

Полярографічні хвилі властиві тим речовинам, які здатні відновлюватися чи окиснюватися на ртутно-крапельному електроді й утворювати солі з ртуттю.

Для аналізу інших речовин використовуються електроди іншої природи (вугільні, срібні, платинові) або застосовуються певні хімічні реакції, які відбуваються на електроді та здатні змінювати силу струму (кінетична хвиля).



Для збільшення електропровідності досліджуваного розчину, а також для пригнічення міграційного струму (переміщення йонів під дією електростатичного поля катода) застосовується індиферентний електроліт (фон), електроліз якого настає при більшій різниці потенціалів, ніж це потрібно для речовини, що визначається. Такі електроліти, що додаються до розчину, який аналізується, називаються *полярографічним фоном*. Застосування того чи іншого індиферентного електроліту залежить від розчинності та стійкості в ньому досліджуваної речовини. Індиферентний електроліт не повинен реагувати з досліджуваною речовиною і брати участь у електрохімічних процесах на електроді. Як індиферентні електроліти використовуються розчини солей лужних та лужноземельних металів, амонію, луги, кислоти в концентраціях, які набагато перевищують концентрацію речовини, що визначається.

Полярографічний метод дозволяє досліджувати як неорганічні, так і органічні речовини, здатні окиснюватися або відновлюватися на поверхні електродів при проходженні постійного електричного струму. За допомогою полярографії можна виявляти наявність і концентрацію амінокислот, гормонів, вітамінів, багатьох фармацевтичних препаратів.

## Кулонометричний аналіз

Цей аналіз заснований на тому, що проводиться електроліз досліджуваної речовини в розчині і при цьому визначається кількість електрики, яка витрачається на електрохімічне окиснення чи відновлення йонів, що визначаються. Результати аналізу розраховують за законом Фарадея:

$$m = \frac{M \cdot I \cdot t}{F \cdot n}$$

де  $m$  – маса речовини, що виділяється на електроді,  $g$ ;  
 $M$  – молярна маса речовини,  $g/моль$ ;  
 $I$  – сила струму,  $A$ ;  
 $t$  – час електролізу,  $s$ ;  
 $F$  – число Фарадея,  $96500K$ ;  
 $n$  – кількість електронів, що беруть участь в електрохімічному окисненні-відновленні.

Оскільки  $I \cdot t$  (ампер-секунда) це кулон, то:

$$m = \frac{M \cdot Q}{F \cdot n}$$

де  $Q$  – кількість електрики, Кулон.

Гальванометри здатні вимірювати дуже малі струми –  $10^{-7}$ - $10^{-8}A$ . Тому кулонометричним методом можна визначати ультрамікрокількості речовини, соті та тисячні частки мікрограма.

При кулонометричному визначенні необхідно створювати такі умови електролізу, щоб струм витрачався тільки на основну електрохімічну реакцію, тобто щоб повністю були виключені побічні процеси, що протікають із затратою електрики. Слід строго контролювати зовнішню напругу, яка повинна забезпечити електроліз речовини, що аналізується, і в той же час бути недостатньою для проходження побічних електрохімічних реакцій. Необхідно також уникати електрохімічного розкладення води.

У кулонометричному аналізі важливим є те, що необхідно точно встановити момент, коли окиснення чи відновлення досліджуваної речовини практично повністю закінчено.

Момент кількісного завершення даної електрохімічної реакції встановлюється різними способами.

1. *Метод кольорових індикаторів.* У досліджуваній розчин вводять реактив, який утворює забарвлену сполуку з речовиною, що аналізується. Тоді закінчення електролізу буде відмічено зникненням характерного забарвлення розчину.

2. *Потенціометричний метод.* У досліджуваній розчин занурюють електрод, потенціал якого залежить від концентрації

одного з реагуючих компонентів. Під час електролізу вимірюють потенціал цього електрода, включеного в окремий ланцюг. У кінці електролізу потенціал індикаторного електрода різко змінюється; в цей момент струм вимикають.

Окрім прямих кулонометричних методів широко розповсюджений метод кулонометричного титрування. Суть методу полягає у тому, що паралельно з електрохімічною реакцією, що протікає під дією електричного струму, у розчині відбувається також хімічна реакція між речовиною, що визначається, та продуктом електрохімічної реакції. Електроліз проводять у присутності великого надлишку сторонніх йонів, здатних до більш легкого електрохімічного окиснення – відновлення, ніж йони, що визначаються. Таким засобом виключають небажані побічні реакції, головна з яких – електрохімічне розкладання води.

Кулонометричне титрування має у ряді випадків значні переваги над звичайним титруванням. Не треба заздалегідь готувати робочі розчини та встановлювати їх точну концентрацію. Як генеруючі титрувальні речовини можуть застосовувати речовини, які малостійкі при звичайних умовах і тому непридатні для приготування робочих розчинів. Різні окисники легко визначати генерованими йонами  $\text{Sn}^{2+}$ ,

$\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  та ін. Для титрування відновників застосовують генеровані вільний бром і йод, фериціанід та ін.

Кількість електрики в кулонометрії вимірюють кулонометрами, які включають у ланцюг послідовно з коміркою для електролізу, а також хронометричним методом. Останній ґрунтується на тому, що протягом усього електролізу підтримують силу струму незмінною, а тривалість електролізу визначають секундоміром. Кількість електрики розраховують як добуток сили струму на час електролізу:

$$Q = I \cdot t.$$

Цей спосіб більш чутливий, ніж вимірювання кулонометрами.

## Електрофоретичні методи аналізу

*Електрофорезом* називається рух заряджених колоїдних частинок чи молекул високомолекулярних сполук під дією зовнішнього електричного поля. Цей метод дозволяє розділити молекули, що різняться між собою за величиною і знаком заряду високомолекулярних сполук, а також золі колоїдних систем з метою ідентифікації і кількісного їх визначення, а також для встановлення їх молекулярної маси та структури.

Електричні заряди молекул високомолекулярних сполук виникають в результаті дисоціації чи протонізації йоногенних груп. Так, заряд молекул білків являє собою сумарний заряд дисоційованих карбоксильних груп та протонованих аміногруп амінокислот – структурних одиниць білків. Цей загальний заряд може бути позитивний чи негативний. Більшість білків мають у нейтральному розчині негативний заряд. Заряд колоїдних частинок обумовлюється адсорбцією потенціалвизначальних йонів на поверхні ядра. Є колоїди, частинки яких мають позитивний заряд, а інші – негативний.

Величина і знак заряду молекул високомолекулярних речовин і колоїдних частинок залежить від рН середовища.

При пропусканні крізь буферний розчин постійного електричного струму між катодом і анодом створюється градієнт електричної напруги. Заряджені частинки починають рухатися в електричному полі до відповідного електрода.

Інтенсивність руху частинок визначається добутком напруженості електричного поля ( $E$ ) і сумарного заряду частинки ( $Q$ ), якому протистоїть сила в'язкості ( $F_v$ ), що дорівнює  $F_v = 6\pi\eta r v$  ( $\eta$ -

коефіцієнт в'язкості,  $r$ -радіус частинки,  $v$ -швидкість руху). В стаціонарному стані  $E \cdot Q = 6\pi\eta r v$ , питома рухливість  $U = V/E = Q/6\pi\eta r v$ .

Залежно від величини заряду молекули ВМС чи частинки колоїду, їх розмірів, вони мають різну швидкість руху, і це дозволяє розділити суміш досліджуваних речовин на зони однакових частинок, які в електричному полі рухаються з однаковою швидкістю.

$V = R \cdot E$ , де:  $R$ -коефіцієнт пропорційності, який називається *електрофоретичною рухливістю* і чисельно дорівнює швидкості руху частинки при  $E = 1 \text{ В/см}$ .

Якщо припинити дію електричного поля до того, як йони суміші, що досліджується, досягнуть електродів, компоненти цієї суміші розподіляться відповідно до їхньої електрофоретичної рухливості.

Електрофоретична рухливість зростає із збільшенням заряду частинки, величина якого залежить від рН середовища. Чим більші за розмірами (молекулярними масами) молекули ВМС чи частинки колоїдних систем, тим менша їх електрофоретична рухливість. Це пов'язано із зростанням сил тертя та електростатичної взаємодії між частинками менших розмірів. На рухливість частинок також впливає їх форма. Молекули однакових розмірів, однакової величини заряду, але різної форми рухаються в процесі електрофорезу з різною швидкістю.

Параметри електричного поля – напруга, сила струму, опір – також впливають на рухливість молекул ВМС та колоїдних частинок.

При проведенні електрофорезу сила струму повинна бути постійною в даному конкретному випадку розділення речовин, так як це забезпечує відтворюваність результатів. При різних значеннях сили струму положення зон розділених речовин буде різним. Довжина шляху, пройденого зарядженими частинками в електричному полі при постійному значенні сили струму буде залежати від часу проходження струму.

Електрофоретична рухливість пропорційна прикладеній напрузі або градієнту напруги, що вимірюється у В/см. Електрофорез буває низьковольтний ( $E = 100\text{-}500 \text{ В}$ ) та високовольтний ( $E = 500\text{-}10000 \text{ В}$ ) з градієнтами напруги від 20 до 200 В/см.

Електричний опір залежить від йонної сили буферного розчину, в якому відбувається розділення речовин, кількості заряджених частинок, що розділяються, типу та розмірів носія.

У процесі електрофорезу виділяється тепло, кількість якого визначається добутком квадрату сили струму на опір. При постійній

напрузі буде збільшуватися електричний струм, якщо електричний опір буде зменшуватися.:

$$I = \frac{E}{R},$$

що призведе до підвищення температури і випаровування буфера, а також до взаємодії між частинками, що розділяються. Для відведення тепла при електрофорезі апарати обладнуються системою охолодження. Часто для охолодження використовують циркулюючу охолоджену воду.

На електрофоретичну рухливість впливає характер буфера. Для ефективного відведення тепла доцільно застосовувати буфер з низькою електропровідністю, хоча при цьому знижується швидкість міграції частинок в електричному полі.

Зазвичай, використовують буфери з йонною силою, яка лежить в межах концентрації 0,05-0,15 моль/дм<sup>3</sup>. Це дає можливість вибрати оптимальні значення напруги і сили струму, щоб при цьому нагрів системи не був критичним. Найпоширеніші форміатний, ацетатний, цитратний, фосфатний, трис-буфер та ЕДТА-буфер.

Буфери, які наливають у дві камери, в яких розміщені електроди, як правило, такі ж, які використовують для просочення носія.

Як носії, в порах яких відбувається електрофорез, використовують однорідні і відносно інертні речовини, які просочуються відповідним буфером. Недоліком носіїв є те, що вони проявляють адсорбційну активність і тим самим стримують переміщення зразка в електричному полі. Це призводить до розмивання зон на електрофореграмах, внаслідок чого зразок рухається не у вигляді компактної смуги, а має видовжену форму – з «хвостом», що зменшує чіткість розділення.

Негативно впливає на процес розділення речовин і електроосмос, обумовлений виникненням відносного електричного заряду між молекулами води буферного розчину і поверхнею носія. Внаслідок цього йони гідроксонію з води захоплюють нейтральні речовини. Отримавши позитивний заряд йона  $\text{H}_3\text{O}^+$ , ці речовини починають рухатись до катода, а швидкість руху аніонів при цьому знижується. Необхідно вживати заходів для того, щоб потік рідини не виніс досліджувані речовини за межі носія. Крім того, електроосмос спричиняє розширення зон, а це погіршує розділення речовин.

Якщо в якості носіїв використовуються гелі, то в таких носіях негативний вплив на переміщення досліджуваних речовин при

електрофорезі має ефект молекулярного сита носія. Гелі мають пори різного розміру, через які можуть проскакувати частинки досліджуваних речовин тільки певних розмірів. Так, у крохмальному, агаровому, поліакриламідному гелі молекули великого розміру рухаються крізь гель тим повільніше, чим менші розміри пор. У такому випадку накладаються як ефект електрофорезу, так і ефект просіювання частинок через молекулярне сито.

Прилади для електрофорезу складаються з джерел постійного струму та електрофоретичного блоку.

Від джерела живлення, що має систему стабілізації напруги і сили струму, високостабільний постійний струм надходить до електрофоретичного блоку. Електрофоретичний блок складається з електродів, герметичної камери із органічного скла, буферних камер, а також інших пристроїв у залежності від типу електрофоретичного блоку.

Якщо досліджувані речовини безбарвні, то для визначення їх положення на електрофореграмі їх необхідно фарбувати. Є багато різних барвників для конкретних речовин. Так, білки можна фарбувати бромфеноловим синім з оцтовою кислотою, амідочорним В, дансилхлоридом і ін., полісахариди можна виявляти за реакцією з йодом, ліпопротеїни – суданом чорним в етанолі та ін.

Для кількісного визначення фракції її після забарвлення змивають з електрофореграми відповідним розчинником і визначають оптичну густину екстракту спектрофотометричним чи фотоколориметричним методом. Інколи застосовують сканування електрофореграми за допомогою денситометра. Цей прилад дозволяє вимірювати інтенсивність світла, яке пройшло крізь смужку носія. Інтенсивність цього світла зв'язана оберненою залежністю з кількістю забарвленої речовини у даній фракції на електрофореграмі. Прилад калібрують з використанням таких електрофореграм, які містять відому кількість досліджуваної речовини, нанесеної на носій і обробленої барвником.

Залежно від розмірів частинок, а також завдань їх розділення, електроміграцію поділяють на безпосередньо електрофорез – розділення молекул ВМС та колоїдних частинок; іонофорез – переміщення в електричному полі низькомолекулярних сполук через біологічні мембрани (введення лікарських препаратів у йонному стані крізь шкіру та слизові оболонки); електродіаліз – відділення високомолекулярних сполук від низькомолекулярних; електроосмос – рух йонів крізь напівпроникну перетинку під впливом електричного поля.

*Препаративний* електрофорез застосовують для виділення значної кількості препарату для подальшого його застосування. *Аналітичний* електрофорез застосовують для визначення компонентів у суміші, контролю чистоти речовини та ін. За способом розміщення носіїв розрізняють горизонтальний та вертикальний електрофорез.

Залежно від мети досліджень найчастіше застосовують фронтальний електрофорез (або метод рухомої межі), зональний електрофорез (або електрофорез на носії), ізоелектрофокусування, ізотахофорез, імуноелектрофорез.

Кожний з цих методів має ряд модифікацій, які в деяких випадках набувають певної самостійності. Основні з них: електрофорез у градієнті густини, в колонках, в блоці і неперервний (проточний), диск-електрофорез, на носіях –папері, ацетат целюлозі, в тонких шарах, гелях та ін.

*Фронтальний електрофорез* (метод рухомої межі) полягає в тому, що речовини, які досліджуються, знаходяться в усьому об'ємі буферного розчину, у який занурені електроди. Розташування досліджуваної речовини у міжелектродному просторі в певний час електрофорезу визначають оптичним методом. Визначають у часі розташування межі яка відділяє речовину від розчинника, тобто визначають швидкість руху межі.

Більш широко використовується *зональний електрофорез* – електрофорез на носії – завдяки високій роздільній здатності, великій швидкості, можливості розділення як частинок колоїдних систем і молекул високомолекулярних сполук, так і неорганічних сполук. Суть методу полягає в тому, що процес електрофорезу відбувається на поверхні та в порах твердого носія. Матеріал носія повинен мати однорідні пори, бути механічно стійким, хімічно інертним по відношенню до буфера та компонентів суміші, що розділяється, мати незначну адсорбційну та електроосмотичну здатність.

Використання носіїв у зональному електрофорезі дуже поширене, але не обов'язкове. Існує електрофорез із стабілізацією зон на певній модифікації проточного електрофорезу, де носії не використовуються.

Адсорбція речовин, що рухаються в електричному полі, на носії призводить до уповільнення їх руху і утворення «хвостів» в електрофоретичних зонах, що ускладнює розділення і кількісний аналіз.

Визначити адсорбційну здатність носія можна попередньо провівши хроматографічне дослідження поведінки даної речовини на



носії без впливу електричного поля і встановити кількість речовини, яка утримується на носії.

Як вже зазначалось, існує багато різновидностей носіїв: хроматографічний папір, плівки ацетат целюлози, тонкі шари целюлози, порошки  $\text{SiO}_2$  та  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , крохмальні, агарозні, поліакриламідні і інші гелі.

Як носій для електрофорезу найпростішим є хроматографічний папір, але він має дуже незначну роздільну здатність у порівнянні з гелями.

Ацетат целюлоза має незначну адсорбційну здатність, що дає можливість розділяти навіть дуже незначні кількості речовин. Цей носій менш гідрофільний, ніж папір, тому він утримує меншу кількість буфера. На цьому носії розділення речовин відбувається швидко.

Тонкі шари целюлози, оксидів Силіцію, Алюмінію та інші наносять на скляні пластинки і просочують буфером. Найбільш високе розділення речовин досягається при застосуванні у якості носіїв гелів. При гель-електрофорезі є незначними адсорбція, електроосмос та розмивання електрофоретичних зон в результаті дифузії. Гель-електрофорез, зазвичай, проводять з аналітичною, а не препаративною метою.

Крохмальні гелі готують при нагріванні й охолодженні частково гідролізованого крохмалю з буфером. Високопористі гелі утворюються при додаванні до буфера менше 2% крохмалю, а низькопористі – від 8 до 15%. У більшості випадків крохмальні гелі наносять на пластинки з поліметилметакрилату для горизонтального чи вертикального електрофорезу.

Агароза – полісахарид, що містить залишки  $\beta$ -D-галактопіранози та 3,6-ангідрідо- $\alpha$ -галактопіранози. Гелі утворюються при вмісті агарози в буфері більше 0,3%. Звичайно використовують 2% гелі для електрофорезу, а з вищим вмістом – для гель-фільтрації (як молекулярне сито).

Агар – суміш галактозних полімерів агарози і агаропектину. Вміст цих полімерів у гелі становить 1%. Агарові гелі містять велику кількість води.

Поліакриламідні гелі є найбільш розповсюдженими завдяки дуже добрим характеристикам:

- розміри пор у цих гелях можна змінювати в широких межах;
- їх можна використовувати з різноманітними буферами;

- вони мають дуже низьку адсорбційну здатність і електроосмос;
- на цих гелях розподіл досліджуваних речовин відбувається швидко з високим розділенням.

Поліакриламідні гелі отримують при полімеризації акриlamіду з N,N,N',N'-тетраметилендіаміном та N,N'-метилен-біс-акриlamідом у присутності каталізатора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_5$  (0,1-0,3%). Поліакриламідні гелі готують із загальним вмістом акриlamіду від 3% (пори мають діаметр 0,5 нм) до 30% (пори – 0,2 нм.).

Електрофорез у поліакриламідному гелі проводять у колонках (вертикальних трубочках) або на пластинках.

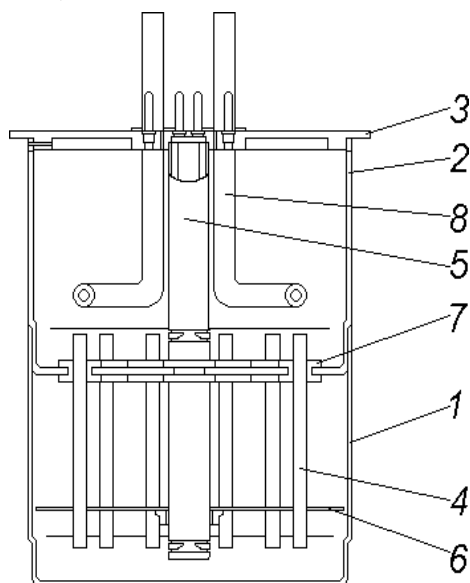


Рис. 10. Камера електрофоретична.

1-стакан; 2-верхня камера; 3-кришка; 4-трубка; 5-стержень; 6-диск; 7-втулка; 8-змійовик.

Гель, що застосовується для електрофорезу, полімеризується безпосередньо в скляних трубочках, які знизу закриваються гумовими втулками і встановлюються у спеціальному штативі. Готовий стовпчик гелю має два шари: нижній – дрібнопористий для розділення суміші на фракції, верхній – крупнопористий для звуження зони суміші перед фракціонуванням. Скляні трубочки в приладі для вертикального гель-електрофорезу, як правило, мають довжину 10см і діаметр 6-8мм. Розчин досліджуваної суміші речовин наносять на поверхню стовпчика гелю або зразок включають у крупнопористу частину гелю при його полімеризації.

Перевагами поліакриламідного гель-електрофорезу є те, що можна варіювати концентрацію складових частин гелю системою буферів та їх складом, концентрацією досліджуваних речовин, рН системи, електричними параметрами процесу та ін.

Як вже зазначалось, роздільна здатність гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі дуже велика. Якщо, наприклад, у разі електрофорезу на папері білків сироватки крові виявляється п'ять зон, то електрофорез цього зразка в поліакриламідному гелі дає більше 20 фракцій білків, а кількість досліджуваної проби при цьому треба в 20 разів менше, ніж для електрофорезу на папері.

Поліакриламідний гель є носієм у *диск-електрофорезі*. В цьому методі використовується неоднорідне переривчасте середовище гелю. На відміну від електрофорезу в однорідному середовищі, при диск-електрофорезі значення рН та розміри пор гелю неоднакові в різних частинах колонки. Верхній шар гелю (концентруючий) має меншу концентрацію і більші розміри пор і готується у буфері з низькою йонною силою та різними значеннями рН. Нижній шар гелю (розділюючий) має малі розміри пор та інші значення рН. У верхньому шарі молекули речовин, що розділяються, завдяки більшим порам рухаються швидше і затримуються менше, ніж у нижньому. Крім того, у верхньому шарі напруженість електричного поля більша завдяки більшому електричному опору, який створює менша йонна сила. Різниця значень рН теж створює ефект більшої швидкості руху речовин, які розділяються, у верхньому шарі.

Все це забезпечує утворення в гелі зон відповідно до компонентів, що розділяються, а саме до концентрації молекул з близькою рухливістю.

Метод диск-електофорезу в поліакриламідному гелі має переваги над іншими методами зонального електрофорезу тому, що в ньому використовується розділення речовин не тільки за їхньою рухливістю в гелі під дією електричного поля, а також в результаті ефекту молекулярного сита та ефекту концентрації.

Для препаративного розділення суміші речовин застосовують також *низьковольтний проточний електрофорез*. Суть цього методу полягає в наступному. У човник, розташований у верхній частині електрофоретичної камери, вносять забуферений розчин суміші досліджуваних речовин. З човника цей розчин безперервно поступає у верхню частину вертикально розташованого листка фільтрувального паперу певної щільності. Папір попередньо просочується цим же буферним розчином. До боків паперу приєднуються електроди – катод і анод. Розчин речовин, які треба розділити, стікає по паперу вниз під дією сили тяжіння. Проходячи через електричне поле, що діє в перпендикулярному напрямку до руху розчину, вниз,

заряджені частинки речовин переміщуються в горизонтальному напрямку до відповідних електродів у залежності від величини їх зарядів з різними швидкостями. Зразок на нижньому краї паперу капає із вирізаних у папері зубців у ряд розміщених пробірок, тобто в пробірках збираються певні фракції розділених речовин.

Цей метод потребує експериментального підбору умов проведення електрофорезу: швидкості току буферного розчину, його складу, рН, визначення місця нанесення зразка та ін. За цим методом отримують фракції білків, пептидів, амінокислот, інших невеликих молекул.

Для того, щоб виключити можливу адсорбцію речовин на папері, застосовують метод проточного електрофорезу без носія. Для цього буферний розчин з розчиненими в ньому речовинами, які треба розділити, постійно тече з резервуару між дуже близько розташованими скляними пластинками, до боків яких приєднуються електроди, з'єднані з відповідними полюсами джерел постійного струму. Через ряд конічних отворів на нижньому кінці пластинок відбираються різні фракції.

Таким чином, електрофорез у тонкому шарі рідини (проточний електрофорез у вільному середовищі) є різновидністю зонального електрофорезу без середовища підтримки.

При розділенні речовин методом електрофорезу низькомолекулярних речовин доцільно використовувати високовольтний електрофорез (електрична напруга – до 10000 В, сила струму – до 500 мА). За таких умов значно поліпшується розділення і процес протікає швидше. Однак при високовольтному електрофорезі виділяється велика кількість тепла і це потребує спеціальних методів охолодження. Найчастіше для охолодження використовують дві алюмінієві пластини, які через ізолюючі прокладки з поліетилену притискаються з двох боків до листка носія. Розміри цих пластин досягають 50×50 см, мають канали для циркуляції води на зразок пластин морозильних камер холодильників.

У методі *ізотахофорезу* всі заряджені молекули в електричному полі рухаються з однаковою швидкістю. Спочатку вони розподіляються відповідно до величини заряду і рухливості, а потім переміщуються в електричному полі з однаковою і постійною швидкістю. Цей метод має дуже високу розподільну здатність і використовується як для аналітичного, так і для препаративного розділення речовин. В основі цього методу лежить принцип

фронтального електрофорезу (метод рухомої межі). В залежності від конструкції наявного обладнання, розділення проводять у горизонтальному або вертикальному напрямках. Розчин, в якому відбувається розділення, містить, як правило, сахарозу для забезпечення більшої щільності. Суть ізотахофорезу полягає в наступному. Зразок вводять між *ведучим електролітом*, який містить йони з більшою рухливістю, ніж йони досліджуваних речовин, і *замикаючим електролітом*, який містить йони з меншою рухливістю, ніж йони зразка. Йони речовин, які розділяються, а також йони ведучого і замикаючого електролітів мають однаковий знак заряду. Для досягнення необхідних значень рН і буферної ємності розчину зразка, ведучого та замикаючого електролітів мають відповідні протиіони. В електричному полі всі заряджені йони спочатку рухаються зі швидкістю, яка визначається напруженістю електричного поля, величиною заряду і рухливістю. Ведучі йони, які мають високу рухливість, рухаються з більшою швидкістю і накопичуються в зоні анода (якщо вони заряджені негативно). Зона ведучих йонів характеризується підвищеною концентрацією йонів з високою рухливістю. Відповідно до цього вона матиме найменший електричний опір, що спричинить низьку напруженість електричного поля. Зона ведучих йонів має також низьке значення рН і меншу температуру.

Внаслідок зменшення концентрації ведучих йонів за межами їхньої зони підвищується електричний опір у системі, що призводить до підвищення напруженості електричного поля, у зв'язку з чим підвищується швидкість міграції йонів досліджуваних речовин, які рухаються слідом за ведучими йонами.

Ведучі йони та йони речовин, які розділяються, майже не змішуються. Коли певна частина йонів досліджуваного зразка все ж таки потрапить у зону ведучих йонів, яка характеризується низькою напруженістю електричного поля через велику концентрацію йонів з високою рухливістю, то швидкість йонів зразка різко зменшиться і вони відстануть від ведучих йонів; якщо ж ведучі йони попадуть у зону йонів зразка, то внаслідок високої напруженості електричного поля в цій зоні швидкість руху їх різко збільшиться, і вони опиняться в характерній для них зоні. Таким чином, внаслідок того, що зона йонів речовин, які розділяються, характеризується нижчою концентрацією йонів і меншою, ніж у ведучих йонів рухливістю, але

більшою напруженістю електричного поля і вищим значенням рН, відбувається автоматична стабілізація між зонами.

За йонами досліджуваного зразка рухаються замикаючі йони, які мають менший електричний заряд і рухливість, ніж йони зразка. Для них йони зразка є ведучими, тому вони не здатні їх випередити і також спричиняють звуження зони зразка.

У міру звуження зони зразка концентрація йонів у ній підвищується, відповідно зменшується її електричний опір, що призводить до падіння напруженості електричного поля в цій зоні. Такий процес буде відбуватися до моменту стабілізації системи, коли швидкість руху всіх йонів – ведучих, зразка і замикаючих – стане рівною. Йони зразка будуть «стиснутими» між ведучими і замикаючими йонами у вузькій зоні, ширина якої та концентрація в ній йонів значною мірою залежить від концентрації та рухливості ведучих йонів.

Якщо зразок містить декілька йонів з різною рухливістю, то вони будуть розміщуватися між замикаючими і ведучими йонами в міру зменшення їхньої рухливості у вигляді дискретних зон, які контактують між собою, але містять тільки певні йони. Після досягнення рівноваги і розділення йонів зразка в системі виникає градієнт рН, напруженості електричного поля і температури.

У випадку, коли рухливості йонів зразка близькі, роздільну здатність ізотахофореzu можна підвищити шляхом внесення у зразок амфолітів. Їх підбирають таким чином, щоб вони мали проміжну рухливість порівняно з йонами зразка і розміщувалися між ними, що підвищує розділення.

Для аналізу низькомолекулярних йонів органічних речовин використовують, як правило, аналітичний ізотахофорез у скляних або пластмасових трубочках (капілярах) завдовжки 50-100см і з внутрішнім діаметром 0,4-0,6мм. Як розділяючі йони використовують відповідні амфоліти, а також валін, аланін та інші речовини.

Оскільки в зонах розділення створюються різні градієнти електричної напруги, в них виділяється неоднакова кількість тепла – чим менша напруженість електричного поля, тим менше виділяється тепла. Це явище використовується для виявлення зон при ізотахофорезі, для чого вимірюють їхню температуру термометром, термопарою, термістором тощо. Для визначення зон при ізотахофорезі використовують також детектори провідності градієнта електричного потенціалу (мікроелектроди). Речовини, які здатні поглинати

ультрафіолетове випромінювання, можна  
реєструвати високочутливими  
детекторами в цій області.