

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ)
УНИВЕРСИТЕТ

Биолого-почвенный факультет
Кафедра физиологии человека и животных

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДАМ В
БИОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Яковлева О.В., Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В.

Казань-2010

Печатается по решению учебно-методического совета биолого-
почвенного факультета КФ(П)У протокол № от

Заседание кафедры физиологии человека и животных № от

Рецензент:

Яковлева О.В., Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В.

Практикум по физико-химическим методам в физиологии / Яковлева
О.В., Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В. – Казань: КГУ.- 2007. – 64 с

Курс «Практикум по физико-химическим методам в физиологии» является курсом летней практики. Данное учебно-методическое пособие составлено для студентов очного отделения биологических факультетов.

Цель практикума – ознакомить студентов с основными принципами физико-химических методов применяемых в физиологии. После прохождения данного курса студент должен: ориентироваться в современных методах исследования в физиологии, приобрести навыки работы с приборами.

Каждый раздел практикума начинается с теоретических основ. Практическая часть включает в себя лабораторные работы, где подробно описаны порядок проведения работы и при необходимости инструкция для экспериментатора. Для проверки выполнения работы студентами и уровня освоения ими практических знаний в пособии имеются контрольные вопросы. В конце практикума приведены темы рефератов и вопросы для сдачи зачета.

О Г Л А В Л Е Н И Е

	ВВЕДЕНИЕ	5
1	ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ	6
1.1	Меры безопасности в лабораторной работе	
1.2	Химическая посуда	
1.3	Весы	
1.4	Фильтрование	
1.5	Понятие о растворах	
1.6	Расчет концентраций	
	Практическая часть	
	<i>Работа №1 Приготовление растворов</i>	
2	ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	
2.1	Фотоколориметрический анализ	
	Практическая часть. <i>Общие указания к выполнению лабораторных работ по фотометрическим методам анализа.</i>	
	<i>Работа № 2. Знакомство с устройством и работой приборов для фотоколориметрического анализа на примере КФК-2</i>	
	<i>Работа № 3 Фотоколориметрическое определение содержания железа методом сравнения.</i>	
	<i>Работа № 4 Определение содержания меди методом калибровочного графика</i>	
	<i>Работа № 5 Наблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера и отклонений от него.</i>	
2.2	Спектрометрия	
	Практическая часть. <i>Общие указания к выполнению лабораторных работ по фотометрическим методам анализа.</i>	
	<i>Работа № 6 Знакомство с устройством и работой приборов спектрометрического анализа на примере СФ-26</i>	
	<i>Работа № 7 Измерение спектров поглощения органических и неорганических соединений</i>	
2.3	Люминисцентный анализ	
	Практическая часть. <i>Общие указания к выполнению лабораторных работ по фотометрическим методам анализа</i>	
	<i>Работа № 8 Знакомство с устройством и работой приборов флуоресцентного анализа на примере флуоресцентного микроскопа – ЛОМО</i>	
	<i>Работа № 9 Исследование прижизненного свечения хлорофилла</i>	

	<i>Работа № 10 Исследование свечения растворов различных органических соединений</i>	
	<i>Работа № 11 Знакомство с устройством и работой приборов флуоресцентного анализа на примере флуориметра «Флюорат-02»</i>	
	<i>Работа № 12 Определение концентрации рибофлавина с помощью флуориметра</i>	
	<i>Работа № 13</i>	
3	ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	
3.1	Кондуктометрия	
3.2	Кулонометрия	
3.3	Потенциометрия	
3.4	Электрогравиметрический метод анализа	
3.5	Полярографический метод	
	Практическая часть. <i>Общие указания к выполнению лабораторных работ по электрохимическим методам анализа</i>	
	<i>Работа № 14 Знакомство с устройством и работой приборов на примере рН-метра 150. Измерение рН стандартного раствора.</i>	
	<i>Работа № 15 Исследование содержания уксусной кислоты в сточных водах.</i>	
	<i>Работа № 16 Определение рН буферного раствора (Рингера) и наблюдение его способности удерживать рН при действии окружающей среды.</i>	
4.	ХРОМАТОГРАФИЯ	
4.1	Уравнение Ленгмюра	
4.2	Классификация хроматографических методов	
	Практическая часть	
	<i>Работа № 17 Ознакомление с устройством хроматографа типа АГАТ. Колебровка хроматографа</i>	
5	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ, ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.	
5.1	Электрофорез в полиамидном геле	
5.2	Вискозиметрия белков	
	Практическая часть	
	<i>Работа № 18 Выбор вискозиметра и подготовка его к работе.</i>	
	<i>Работа №19 Измерение вязкости растворов белка.</i>	
	Список использованной литературы	

	Темы рефератов	
	Вопросы для зачета	59

ВВЕДЕНИЕ

С помощью физических и физико-химических методов в настоящее время выполняется большинство массовых химических анализов в химической, металлургической промышленности, электронике, сельском хозяйстве, биологии, медицине, в службе контроля загрязнения окружающей среды. Использование физико-химических методов позволяет решить целый ряд новых задач, вызванных потребностями современной науки и техники: снижение предела обнаружения, повышения точности аналитических, увеличение скорости, повышение избирательности определений.

Электрофизиологические и фотометрические методы медико-биологических исследований относятся к наиболее популярным, широко распространенным на практике. Более 60 % выпуска медицинской электронной техники составляют приборы и системы, с помощью которых реализуются методы этих двух групп. Такое положение объясняется широкими диагностическими возможностями электрофизиологических и фотометрических методов, простотой и доступностью технических средств, используемых для выполнения исследований с их помощью.

Распространение этих методов объясняется также и тем, что они позволяют как сложные системы для тончайшего анализа различных сред, так и простые, компактные и дешевые приборы, которые измеряют целый ряд важнейших медико-биологических показателей, характеризующих свойства, состав или концентрацию отдельных компонентов сложных биосубстратов и жидкостей.

Цель практикума – закрепление знаний в области химии и физики с учетом биологической направленности студентов, получение навыка пользования лабораторными приборами.

В каждый раздел пособия входит минимум теоретических знаний по конкретной теме. Лабораторные работы подробно описаны, даны порядок проведения работы и при необходимости инструкция для экспериментатора. Для проверки осознанности выполнения работы студентами и уровня освоения ими практических знаний в пособии имеются контрольные вопросы.

Требование к оформлению и оценке лабораторных и практических работ

Лабораторные работы оформляются студентами в отдельной тетради по следующему плану:

1. Дата и номер лабораторной или практической работы.
2. Тема.
3. Цель.

4. Ход работы (краткое описание этапов выполнения работы и инструкция испытуемому).

5. Данные, полученные в ходе проведения исследования, представленные в виде таблиц, графиков.

6. Выводы.

Зачет проходит в виде сдачи лабораторных работ. При проведении зачета учитываются следующие критерии:

- знание теории, предвещающей каждое практическое задание;
- активность работы студентов во время проведения экспериментов;
- правильность оформления работы;
- обоснованность выводов.

1 ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

1.1 Меры безопасности в лабораторной работе

Спецодежда. При работе в любой лаборатории необходимо всячески защищать одежду и тело от воздействия химических реактивов. Это достигается, во-первых, аккуратностью и четкостью в работе, во-вторых, применением спецодежды и средств индивидуальной защиты, к которым относят: халаты, фартуки, косынки или шапочки, резиновые перчатки, очки и противогазы. Халаты и шапочки должны быть изготовлены из плотной белой хлопчатобумажной ткани.

Меры пожарной безопасности. При аккуратном обращении с нагревательными приборами и правильном пользовании реактивами возможность пожара сводится к минимуму, но в каждой лаборатории должны быть принадлежности необходимые для принятия мер в случае пожара. К ним относятся: огнетушитель, песок вместе с совком или лопатой.

Первая помощь при ожогах кислотами и щелочами. При химических ожогах очень опасно длительное воздействие реактива, поэтому, чем быстрее будут приняты меры, тем они действеннее. При попадании в глаз реактива следует промыть его струей воды. При попадании реактива на кожу также смыть его сильной струей воды из-под крана в течение 10-15 минут. Затем, если был кислотный ожог, нужно промыть пораженное место 3% раствором бикарбоната натрия. При щелочном ожоге – 2% раствором борной или уксусной кислоты.

1.2 Лабораторная посуда

Наиболее широкое применение при работе в лаборатории имеют пробирки (рис. 1). Они представляют собой отрезки стеклянных трубок, запаенные с одного конца. Они бывают различных размеров и предназначены для работы с небольшим количеством реактива. Пробирки можно нагревать

на открытом пламени, соблюдая все правила нагревания. Бывают пробирки и специального назначения: центрифужные, градуированные.

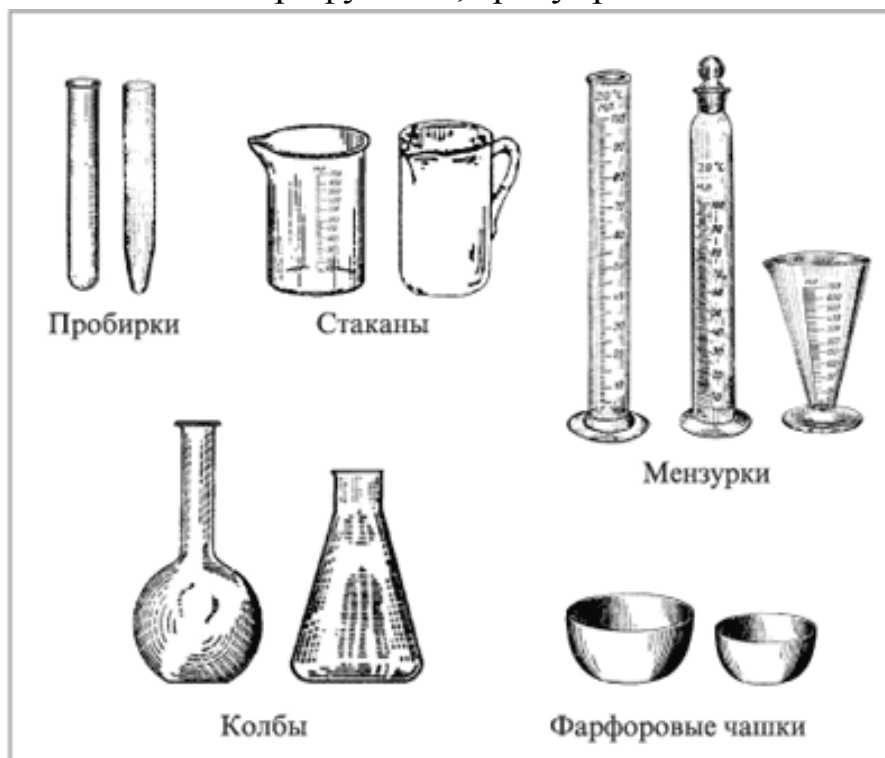


Рисунок 1 Химическая посуда

Химические стаканы служат для работы с разным количеством жидкостей. Они изготавливаются из тонкого стекла и бывают разной емкости. Такие стаканы можно нагревать, но не на открытом огне.

Широко применяются различные колбы, круглые и конические. Круглые бывают круглодонные и плоскодонные (рис. 1). Они могут иметь горло разной ширины и длины. Для специальных целей применяются колбы с двумя и тремя горлами. Мерные колбы имеют узкое длинное горло, на котором нанесена метка, ограничивающая объем. На внешней стороне колбы указывается объем, на который она рассчитана.

Мензурки представляют собой конические стаканы с градуировкой на миллилитры с наружной стороны. Для измерения применяются также и мерные цилиндры. Объем воды измеряют в цилиндре по нижнему уровню мениска, а ртути – по верхнему. Если жидкость не просвечивает, то нижний уровень мениска разглядеть не удастся, и замер делают по верхнему уровню. При измерении мениск должен быть на уровне глаз, а колба или мензурка должно спокойно стоять на неподвижной горизонтальной поверхности.

К вспомогательным принадлежностям относят: штативы, зажимы, тигельные щипцы, держатели и проч.

1.3 Весы

Для взвешивания применяются весы трех видов:

1 весы грубого взвешивания или столовые (нагрузка от 1 до 50 кг)

2 весы для точного взвешивания или техно-химические (нагрузка может быть различной, но не более 100 г) (рис. 2)

3 весы для очень точного взвешивания или аналитические (нагрузки от десятых долей мг до 1 г) (рис. 2)

Весы требуют тщательного ухода. Они не должны подвергаться тряске, запылению, действию кислых паров. Весы для грубого взвешивания могут устанавливаться в любом месте. Точные весы устанавливают на отдельном столике. Аналитические – на специальный укрепленный столик.

Торсионные или пружинные весы относят к типу циферблатных и предназначены для взвешивания небольших грузов (до 500 мг).

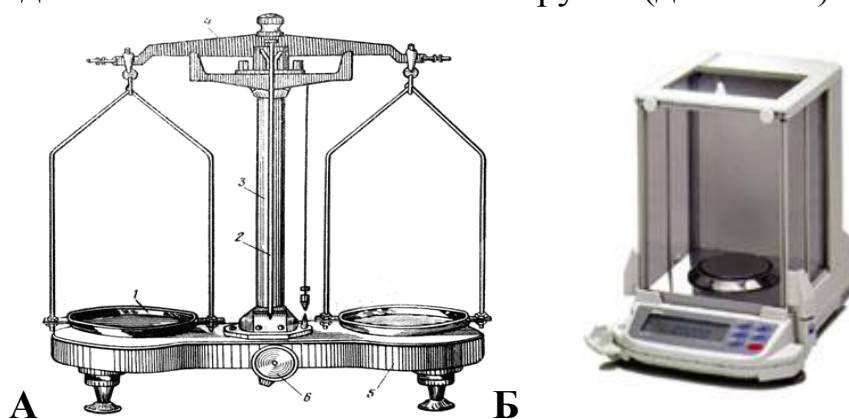


Рисунок 2 Весы

А- точные весы, Б – весы аналитические.

1.4 Фильтрование

Фильтрованием называется отделение от жидкости находящихся в ней частиц твердого вещества при помощи фильтрующей перегородки. Жидкость отделяемая при фильтровании, называется фильтратом. Существуют различные фильтрующие материалы и способы фильтрования.

Самым распространенным материалом применяемым в лабораториях для фильтрования, является фильтровальная бумага. Она отличается от обычной бумаги тем, что изготавливается из более чистого материала и не проклеивается. Из фильтровальной бумаги делают простые, складчатые и экономные фильтры.

Простой фильтр применяется в тех случаях, когда отделяемый осадок нужен для дальнейшей работы. Размер фильтра определяется величиной

осадка, а не объемом фильтруемой жидкости. Осадок должен занимать около одной трети фильтра и ни в коем случае не больше его половины.

Складчатый фильтр применяют только в тех случаях, когда отделяемый осадок не будет нужен. Так как фильтрующая поверхность складчатого фильтра больше, чем простого, фильтрование через него идет быстрее. В данного случае размер фильтра определяют количеством жидкости, а не осадка.

Для фильтрования при комнатной температуре и атмосферном давлении применяют стеклянные воронки. Воронку вставляют в кольцо штатива и под нее ставят стакан для фильтрата. Конец воронки должен быть достаточно высоко от дна стакана, чтобы при наполнении стакана фильтратом воронка не оказалась погруженной в жидкость. Фильтр должен быть меньше воронки на 0.5-1 см.

Часто применяется фильтрование под вакуумом, так называемое отсасывание. Оно применяется для ускорения фильтрования и более полного освобождения осадка от фильтрата.

1.5 Понятие о растворах

Раствор – однородная, внутри себя взаимодействующая, равновесная система переменного состава. Образование раствора сопровождается как физическими так и химическими явлениями.

Количественной характеристикой способности веществ растворяться в данном растворителе является концентрация его насыщенного раствора. Насыщенным при приданной температуре называют раствор, в котором растворенное вещество не способно более растворяться. Растворимость веществ зависит от природы растворенного вещества, природы растворителя и условий протекания процесса растворения. Растворимость твердых и жидких веществ с температурой, как правило возрастает, поэтому при приготовлении растворов часто необходимо нагревание.

По характеру взятого растворителя растворы делятся на водные и неводные. Около 60 % всего живого и неживого нашей планеты состоит из воды. В химической практике применяются органические растворители: спирты, эфиры, ацетон, уксусная кислота и проч.

Каждый раствор характеризуется концентрацией растворенного в нем вещества. Концентрацию обычно выражают в:

- молярности (С), измеряется числом молей растворенного вещества в литре раствора,

- молярности (M_a), измеряется числом молей растворенного вещества в 1000 г растворителя,
- мольных долей (N_i) измеряется отношением числа молей i-го компонента к общему числу молей компонентов раствора,
- процентах, измеряется количеством вещества в граммах, содержащегося в 100 г раствора,
- грамм-эквивалентах, измеряется количеством вещества, в граммах, которое эквивалентно 1 грамм-иону водорода (1,008 г), принимаемому за единицу.

Правила приготовления растворов:

Для приготовления растворов следует применять чистые вещества, дистиллированную воду, чистую посуду. Прежде чем отвешивать необходимое количество соли, необходимо произвести расчеты.

Техника приготовления растворов щелочей и кислот отличается от приготовления растворов солей.

1 Так как щелочь даже очищенная содержит много примесей ее надо взвешивать на 2 -3 % больше рассчитанного количества.

2 Щелочь нельзя класть на бумагу, ее можно взвешивать в стеклянной или фарфоровой посуде.

3 Щелочь и кислоты нельзя растворять в толстостенных сосудах, так как происходит сильное разогревание и бутылка может лопнуть.

4 Даже кислоты не являются 100% и всегда содержат воду, их отмеряют цилиндром.

5 При разбавлении нельзя лить воду в кислоту. В колбу наливают нужное количество воды, а затем тонкой струей, при помешивании, доставляют нужное количество кислоты.

1.6 Методы расчета концентраций.

Независимо от используемого метода инструментального анализа подходы к расчету концентраций на основе измерения значения величины физического сигнала эталона и анализируемого образца идентичны.

Метод сравнения чаще используется при однократных определениях. Для этого измеряют значение величины аналитического сигнала для эталонного образца с известной концентрацией определяемого компонента и значение величины аналитического сигнала для исследуемого образца.

$$S_{эт} = kC_{эт} \quad S_x = kC_x \quad (1)$$

Поскольку коэффициент k – величина постоянная, то расчет концентрации определяемого компонента можно вычислить по формуле:

$$C_x = C_{эт} * S_x / S_{эт} \quad (2)$$

Метод градуировочного графика используют при серийных определениях. В этом случае изготавливается серия эталонов с различным содержанием определяемого компонента. Для всей серии измеряют значения величин аналитического сигнала. Строят график в координатах $S-C$, причем по оси абсцисс откладывают значения величин независимых переменных (C), а по оси ординат – их функции (S). Обычно находят 5-8 точек. Наклон линии определяет чувствительность метода. Незвестная концентрация (C_x) определяется графически по значению величины измеренного сигнала (S_x).

Метод добавок используется в случае трудновоспроизводимого сложного фона для определяемого компонента и при определении малых содержаний. Сначала измеряют аналитический сигнал анализируемой пробы с неизвестной концентрацией (C_x). Затем в эту пробу вводят стандартную добавку с известным содержанием ($C_{эт}$) и снова измеряют значение величины аналитического сигнала. Незвестную концентрацию (C_x) находят расчетным путем:

$$S_x = k C_x \quad (3.1)$$

$$S_{x+эт} = k(C_x + C_{эт}) \quad (3.2)$$

$$C_x = C_{эт} * S_x / (S_{x+эт} - S_x) \quad (3.3)$$

Практическая часть

Работа №1 Приготовление растворов.

Цель:

1. Расчет и приготовление растворов солей.

Для работы необходимо: мерный цилиндр, дистиллированная вода, колбы 5 шт, сухие $NaCl$, KCl , $CaCl_2$, KCl , Na_2HPO_4 , весы, гирьки, кулькулятор, таблица Менделеева.

Ход работы:

1. Рассчитать количество солей необходимое для приготовления следующих растворов:

А 2 кг 10 % раствора азотистого калия KNO_3 .

Б 1 кг 5% раствора хлористого кальция $CaCl_2$, исходя из кристаллической соли $CaCl_2 * 6H_2O$.

В 2 л 15 % раствора серной кислоты H_2SO_4 . Если известно, что 15 % H_2SO_4 при комнатной температуре имеет удельный вес 1,05 и 1 л раствора содержит 166 г H_2SO_4 . Но концентрированная кислота имеет удельный вес 1,84 г и является 98,7 %, 1 л этой кислоты содержит 1816 г.

Г 3 л 0,5 М раствора Na_2CO_3 .

Д 500 мл 0,1н раствора Na_2SO_4 .

2 Рассчитать количество солей необходимое для приготовления следующих растворов: 200мл 1М $NaCl$, по 50 мл 2М $CaCl_2$, 1 М KCl , 1М Na_2HPO_4 . Взвесить соли.

3 Приготовить, используя правила приготовления растворов. Профильтровать полученные растворы.

Сделать выводы.

Контрольные вопросы:

1 Весы. Типы и условия работы на весах.

2 Что такое раствор? Типы растворов.

3 Фильтрование. Правила фильтрования.

4 Перечислите в чем выражают концентрацию вещества в растворе. Дайте определение молярности.

5 Какой раствор называется насыщенным?

2. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Оптические методы анализа основаны на изучении взаимодействия электромагнитного излучения с атомами или молекулами исследуемого вещества. В результате взаимодействия возникает аналитический сигнал, содержащий информацию о свойствах исследуемого вещества: частота сигнала зависит от специфических свойств соединения, а интенсивность пропорциональна количеству вещества. Оптическая область включает инфракрасное, видимое и ультрафиолетовое излучение. По характеру взаимодействия излучения с исследуемым веществом и способу его измерения различают абсорбционную спектроскопию, нефелометрию, люминесцентный анализ.

1 Абсорбционная спектроскопия, т.е. анализ по поглощению излучения:

- спектрофотометрический анализ – основан на определении спектра поглощения или измерении светопоглощения при строго определенной длине волны.

- фотокolorиметрический анализ – основан на измерении интенсивности окраски исследуемого раствора.

2 Анализ, основанный на использовании рассеяния света взвешенными частицами (нефелометрия).

3 Люминесцентный анализ основан на измерении вторичного излучения, возникающего в результате взаимодействия излучения с исследуемым веществом при облучении УФ светом.

Закон Бугера-Ламберта-Бера. Зависимость интенсивности поглощения монохромного излучения от концентрации вещества и толщины поглощающего слоя выражается законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$A = -\lg I/I_0 = \varepsilon l C, \quad (4.1)$$

где A – абсорбция или оптическая плотность, I_0 – интенсивность падающего потока излучения, I – интенсивность потока излучения после прохождения l см поглощающего слоя, C – молярная концентрация, ε – молярный коэффициент поглощения.

Молярный коэффициент поглощения равен оптической плотности раствора при единичных значениях концентрации и толщины поглощающего слоя. Он не зависит от объема раствора, толщины слоя и интенсивности освещения. Он является качественной характеристикой вещества и зависит от природы вещества и длины волны измерения. Поэтому его величина является объективной характеристикой возможной чувствительности фотометрического определения.

В ИК-области обычно измеряют пропускание T , равное отношению I/I_0 и связанное с оптической плотностью следующим соотношением:

$$-\lg T = A \quad (4.2)$$

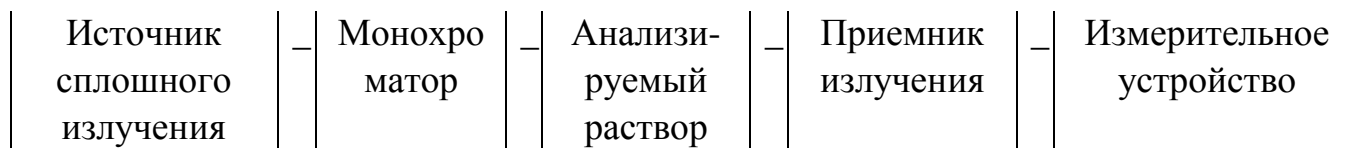
Зависимость оптической плотности или молярного коэффициента поглощения от длины волны выражается кривой, называемой спектром поглощения. По оси абсцисс откладывается длина волны, частота или волновое число, по оси ординат – молярный коэффициент или пропускание. В случае подчинения закону Бугера-Ламберта-Бера спектр поглощения сохраняет свой вид независимо от концентрации.

Поведение поглощающих систем подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера при определенных условиях. При нарушении этих условий наблюдаются отклонения от закона, выражающиеся в нарушении линейной зависимости между концентрацией поглощающего вещества и величиной абсорбции. Причины отклонения от закона светопоглощения можно разделить на инструментальные, вызванные немонахромностью светового потока,

рассеянием света и случайными излучениями; и химические, вызванные дополнительными неучтенными химическими взаимодействиями.

Аппаратура для молекулярно-абсорбционного анализа. Для исследования поглощения излучения в видимой области спектра используют фотоколориметры и спектрофотометры в УФ- и ИК- областях – спектрофотометры.

Вся аппаратура строится по общей схеме:



Ошибки молекулярно-абсорбционного анализа Ошибка любого физико-химического анализа складывается из ошибок, возникающих при подготовке пробы и погрешности измерения аналитического сигнала. Для оценки ошибки при определении концентрации в абсорбционном анализе исходят из допущения, что измерение оптической плотности является основным источником случайных ошибок. Можно показать, что относительная ошибка при определении концентрации, оцениваемая величина $\Delta C/C$, является функцией величины пропускания T (таблица 1). Допускается, что абсолютная ошибка измерения пропускания ΔT равна 0.005 или 0.5%.

Таблица 1

Изменение ошибки определения концентрации в процентах в зависимости от величины пропускания и оптической плотности.

Пропускание, T	Оптическая плотность, A (D)	Ошибки в определении концентрации $\Delta C/C * 100, \%$
0.95	0.022	10.25
0.90	0.046	5.27
0.80	0.097	2.80
0.70	0.155	2.00
0.60	0.222	1.63
0.50	0.301	1.44
0.40	0.399	1.36
0.30	0.523	1.38
0.20	0.699	1.55
0.10	1.000	2.17
0.03	1.523	4.75

Применение в физиологии и медицине Развитие современной биохимии, химии и физики и внедрение их результатов в медицинскую практику происходит во всё более ускоряющемся темпе. Характерной чертой современного этапа развития медицины является активное использование не только в медико-биологических экспериментах, но и в рутинной клинической практике наиболее современных методов исследования физико-химической биологии.

Оптические методы анализа широко используются в биологии и медицине. Эти методы позволяют проводить анализ веществ, получать информацию о строении, структуре, состоянии и превращениях различных компонентов в химических и биологических системах. К наиболее широко распространенным в биологии и медицине оптическим методам принадлежит спектроскопия. Областью применения является определение атомного и молекулярного состава вещества, его структуры, состояния, концентрации и др. Концентрация и свойства оптически активных молекул исследуются специальным оптическим методом - поляризацией, основанным на измерении с помощью поляриметров угла вращения плоскости поляризации проходящего через оптически активную среду поляризованного света.

Метод поляризации используется в медицинской практике для определения концентрации сахара в моче, углеводов в растительном сырье, концентрации и состояния белков и нуклеиновых кислот, для исследования активности ферментов, расщепляющих углеводы, и др. В медицине используется также метод рефрактометрии, основанный на измерении показателя преломления света в исследуемой среде. Он применяется для определения чистоты дистиллированной воды, концентрации сахарозы, содержания белка в сыворотке крови, анализа растворов для инъекций, препаратов лекарственных смесей, для измерения концентрации спирта в настойках. По величине показателя преломления можно определить влажность различных пищевых продуктов, содержание белка в молоке.

Методы рефрактометрии используются при исследовании рефракции глаза. Существуют оптические методы, позволяющие измерить величину рассеяния света объектом (коллоидными растворами, суспензиями, различными взвешиваниями и др.). Приборы, предназначенные для исследования светорассеяния, получили название нефелометров и турбидиметров. С помощью этих методов определяют молекулярную массу и размеры различных макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) и частиц в коллоидных растворах, суспензиях, а также получают информацию о характере межмолекулярных взаимодействий.

В медицине также применяют флуоресцентную микроскопию и флуоресцентный анализ. Так флуоресцентная ангиография - метод исследования кровеносных сосудов глаза, основанный на их контрастировании путем внутривенного введения флюоресцеина и серийного фотографирования. Применяется с целью диагностики и контроля за ходом лечения заболеваний сетчатки, зрительного нерва и сосудистой оболочки глаза.

2.1 Фотоколориметрический анализ

Приборами для фотоколориметрии служат фотоэлектроколориметры (ФЭК), характеризующиеся простотой оптической и электрической схем. Измеряемый диапазон оптической плотности составляет 0.05 – 3.0, что позволяет определять вещества в широком интервале содержаний от 10^{-6} до 50%. Для дополнительного повышения чувствительности и селективности определений существенное значение имеют подбор реагентов, образующих интенсивно окрашенные комплексные соединения с определяемыми веществами. Погрешность измерений колеблется от 5 до 0.2 %

Из отечественной аппаратуры наиболее распространены следующие марки фотоколориметров:

- однолучевой колориметр фотоэлектрический КФО с одним каналом
- двухлучевые типа ФЭК-М, ФЭК-56, ФЭК-56М.

Они предназначены для определения концентрации вещества в окрашенных или коллоидных растворах в диапазоне длин волн 315-670 нм и снабжены 8 светофильтрами.

Фотоколориметры КФК-3 предназначены для измерения коэффициентов пропускания и оптической плотности прозрачных твердых образцов. Спектральный диапазон работы 315-990 нм. Фотоколориметры широко применяются для проведения серийных определений концентраций веществ на предприятиях водоснабжения, химической, пищевой промышленности, медицине, фармакологии.

Практическая часть.

Общие указания к выполнению лабораторных работ по фотометрическим методам анализа

1. Включить прибор за 15-20 минут до начала измерений.

2. Отсчет по шкале прибора производить несколько раз, повторив все операции компенсации до получения воспроизводимых результатов, результат измерения сразу записать в рабочий журнал.

3. Кюветы, в которых предстоит произвести измерения, должны быть предварительно тщательно вымыты водой, а при необходимости и спиртом. Рабочая длина кюветы оговаривается методикой.

4. Кювету можно брать только за боковые грани. Заполнение кюветы производится до уровня риски на боковой грани.

5. Перед помещением кюветы в прибор ее необходимо тщательно обсушить снаружи фильтровальной бумагой и отполировать мягкой тканью грани, через которые будет проходить световой поток.

6. При приготовлении растворов необходимо строго следовать предлагаемой методике.

7. При приготовлении анализируемого раствора в мерной колбе его объем необходимо доводить до метки дистиллированной водой и тщательно перемешать.

8. Объемы растворов можно измерять пипеткой, мерным цилиндром, используя для каждого раствора свою пипетку или цилиндр.

Работа № 2 Знакомство с устройством и работой приборов для фотоколориметрического анализа на примере КФК-2

Цель – ознакомиться с устройством фотоколориметра КФК-2.

1. Назначение

КФК-2 (рис. 3) предназначен для измерения в отдельных участках диапазона длин волн 315-980 нм, выделяемых светофильтрами, коэффициентов пропускания и оптической плоскости жидкостных растворов и твердых тел, а так же определения концентрации веществ в растворах методом построения градуировочных графиков.

КФК-2 позволяет производить измерения коэффициентов пропускания рассеивающих взвесей, эмульсий и коллоидных растворов в проходящем свете.

2. Принцип действия

Принцип измерения коэффициента пропускания состоит в том, что на фотоприемник направляются поочередно световые потоки полный $F_0\lambda$ и прошедший через исследуемую среду $F\lambda$ и определяется отношение этих

потоков. Отношение потоков есть коэффициент пропускания τ исследуемого раствора:

$$\tau = \frac{F\lambda}{F_0\lambda} \times 100 \quad (5)$$

На колориметре это отношение определяется следующим образом. Вначале в световой поток помещают кювету с растворителем или концентрационным раствором. Изменением чувствительности колориметра добиваются, чтобы отсчет по шкале коэффициентов пропускания колориметра n_1 был равен 100. Таким образом, полный световой поток $F_0\lambda$ условно принимается за 100%. Затем, в световой поток помещают кювету с исследуемым раствором. Полученный отсчет n_2 по шкале коэффициентов пропускания колориметра будет соответствовать $F\lambda$. Следовательно, коэффициент пропускания исследуемого раствора в % будет равен n_2 , то есть

$$T \ 100\% = n_2 \quad (6)$$

Оптическая плотность D определяется по формуле:

$$D = -\lg \frac{F\lambda}{F_0\lambda} = -\lg \frac{\tau}{100} = 2 - \lg \tau \quad (7)$$

3. Порядок работы

1. включить колориметр в сеть за 15 мин до начала измерений.
 2. установить нужный цветной светофильтр.
 3. установить чувствительность (1,2,3).
 4. перед измерением открыть крышку фотоприемника и проверить установку «0» (слева на шкале).
 5. закрыть крышку кюветного отделения и ручками чувствительность и установка «100» грубо и плавно установить отсчет 100 (справа по шкале). Ручка чувствительности может быть в одном из трех положений (1,2,3).
 6. В световой пучок поместить кювету с контрольным раствором и провести все операции пунктов 4-5.
 7. заменить кювету с контрольным раствором на кювету с исследуемым раствором. Снять показания 3-4 раза и учесть среднее значение.
- При переключении светофильтров чувствительность должна быть «1», а «100» грубо – в крайнем левом положении.

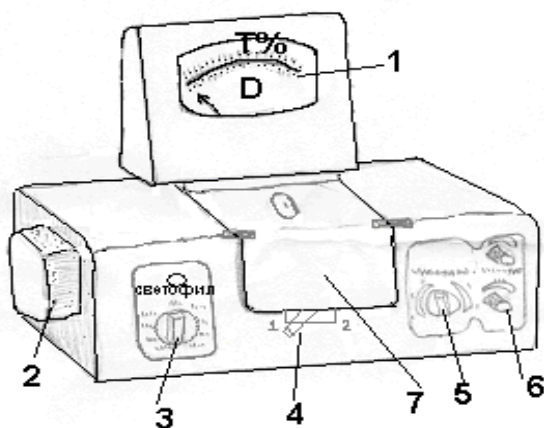


Рисунок 3 - Вид колориметра спереди

1-регистрирующий прибор со шкалой, оцифрованной в коэффициентах пропускания Т и оптической плотности Д, 2-блок питания, 3-ручка установки светофильтра, 4-ручка переключения кювет в световом пучке, 5-ручка переключения чувствительности, 6-ручка установки и регулировки чувствительности, 7-крышка кюветного отделения.

Работа № 3 Фотоколориметрическое определение содержания железа методом сравнения.

Цель:

1 Ознакомиться с определением содержания вещества методом сравнения.

2 Определение содержания железа в исследуемом растворе.

Для работы необходимо: прибор — ФЭК, стандартный раствор с содержанием железа 0.1 мг/мл, азотная кислота, сульфосалициловая кислота либо роданид калия, дистиллированная вода, мерные цилиндры, стаканы.

Ход работы:

1 Выбор светофильтра. Максимальное изменение оптической плотности на единицу концентрации в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера наблюдается при длине волны, соответствующей максимальному значению коэффициента поглощения. Определить требуемую область длин волн можно из справочной литературы или экспериментально, измерив значения оптической плотности поглощающего раствора при различных длинах волн. При работе с ФЭК для выделения нужных областей спектра используют светофильтры. Максимум пропускания светофильтра совпадает с

максимумом поглощения определяемого вещества. Поэтому наиболее подходящим для фотометрирования считается тот светофильтр, при использовании которого получено максимальное значение величины оптической плотности анализируемого раствора.

Измерение абсорбции эталонного раствора железа необходимо проводить не по отношению к воде, а по отношению к смеси всех реактивов, кроме стандартного раствора.

Для приготовления эталонного раствора №1 в мерный цилиндр налить 10 мл стандартного раствора. Добавить 10 мл азотной кислоты концентрацией 4 моль/л и 10 мл роданида калия либо сульфосалициловой кислоты. Довести содержимое до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать.

Раствор сравнения готовить в цилиндре вводя реактивы в той же последовательности к дистиллированной воде.

Измерить оптическую плотность эталонного раствора по отношению к раствору сравнения последовательно при всех светофильтрах, используя кюветы с рабочей длиной 10 мм. Полученные результаты измерений представить в виде графика “Зависимость величины оптической плотности от длины волны”.

На основе анализа полученных данных следует выбрать светофильтр и приступить к дальнейшим измерениям.

2 Определение железа в исследуемом растворе. Приготовить эталонный раствор № 2 с содержанием стандартного раствора 20 мл по описанной выше схеме. Получить у лаборанта анализируемый раствор добавить в него реактивы по описанной выше схеме. Измерить оптическую плотность для анализируемого и эталонного растворов. Результаты занести в таблицу 2.

Таблица 2

Результаты измерений оптической плотности.

	Эталонный раствор №1	Эталонный раствор №2
Содержание железа в эталонных растворах Сэт, мг		
Оптическая плотность эталонных растворов А		
Отношение Сэт/А		

Рассчитать среднее отношение Сэт/А. Вычислить содержание железа в исследуемом растворе Сх, используя формулу 2 (см. Главу 1).

Сделать выводы.

Работа № 4 Определение содержания меди методом калибровочного графика

Цель:

1 Ознакомиться с алгоритмом построения фотометрической методики с использованием метода калибровочного графика.

2 Фотоколориметрическое определение содержания меди.

Для работы необходимо: прибор — ФЭК, раствор медного купороса с содержанием меди 1 мг/мл, дистиллированная вода, мерные цилиндры, стаканы.

Ход работы:

1 Приготовление эталонных растворов Для построения калибровочного графика необходимо приготовить 4-5 эталонных растворов. Для этого имеющийся исходный раствор медного купороса разбавляют в 10, 5, и 2 раза.

2 Выбор светофильтров Для выбора светофильтра для последующей работы используют раствор с минимальным содержанием меди. Раствором сравнения в этой работе является вода. Измерения проводят также как описано в предыдущей работе. По результатам строят график и выбирают подходящий светофильтр.

3 Построение калибровочного графика Производится измерение оптической плотности четырех имеющихся эталонных растворов. Результаты фотометрирования записываются в рабочий журнал, затем по ним строится калибровочный график в координатах оптическая плотность – концентрация меди. Масштаб графика должен соответствовать точности измерений.

Затем получить у лаборанта или преподавателя анализируемый раствор и измерить его оптическую плотность, используя тот же раствор сравнения что и при построении калибровочного графика. Определить по графику содержание меди в анализируемом растворе.

Сделать вывод.

*Работа № 5 Наблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера
и отклонений от него.*

Цель: Проверить соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера

Для работы необходимо: прибор — ФЭК, раствор перманганата калия 1, 0.1, 0.01, 0.001%, дистиллированная вода, мерные цилиндры, стаканы.

Ход работы:

1 Выбор светофильтра Для выбора светофильтра для последующей работы используют раствор с минимальным содержанием перманганата калия с длиной кюветы 50 мм. Раствором сравнения в этой работе является вода. Измерения проводят также как описано в работе 2. По результатам строят график и выбирают подходящий светофильтр.

2 Проверка закона Бугера-Ламберта-Бера Измерить оптическую плотность имеющихся растворов начиная с самой маленькой концентрации и длиной кюветы 50 мм.

Если при увеличении концентрации наблюдаются максимальные значения оптической плотности и нет дальнейших изменений. Применить для измерения кювету с меньшей длиной.

По результатам построить график зависимости оптической плотности от концентрации вещества (для каждой длины кюветы).

Сделать вывод о виде отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера.

2.2 Спектрометрия

Ультрафиолетовая спектроскопия (УФ) (400-200 нм) находит применение для анализа продуктов нефтехимии. В других областях она используется редко из-за перекрывания полос поглощения и малой специфичности.

Неограниченные возможности не только для качественного анализа, но и для определения строения молекул вновь синтезированных веществ, имеет спектроскопия в ИК области. В основе метода – неповторимость ИК спектра соединения. Спектры каждого соединения имеют так называемые характеристические полосы поглощения при определенных длинах или частотах, которые отвечают конкретным атомным связям или функциональным группировкам.

Так, характеристическая полоса поглощения ОН – группы проявляется при различных частотах в соединениях:

- карбоновые кислоты (мономеры) – $1380\text{--}1280\text{К см}^{-1}$;
- карбоновые кислоты (димеры) – $3100\text{--}2500\text{К см}^{-1}$;
- первичные спирты $3400\text{--}3200\text{К см}^{-1}$.

То есть по частоте характеристической полосы можно судить не только о наличии определенной функциональной группы, но и принадлежности вещества к тому или иному классу соединений. Как правило, отсутствие в ИК спектре данной полосы, указывает на то, что соответствующей группы в исследуемом веществе нет.

Но нет правил без исключения. Например, колебания — $\text{C} \equiv \text{C}$ — связи в молекулах с высокой симметрией (например, если связь находится в центре молекулы) не проявляются. Иногда искомая полоса перекрывается за счет примесных соединений, или происходит совпадение частот характеристических полос различных функциональных групп. В этом случае следует прибегнуть к другим методам анализа.

В настоящее время опубликованы атласы и таблица ИК спектров свыше 20 тыс. соединений, что облегчает проведение анализа.

Из аппаратуры отечественного производства наиболее распространены неавтоматические однолучевые спектрофотометры типа СФ-16 и СФ-26, а также автоматические регистрирующие спектрофотометры СФ-10 и СФ-40.

Для анализа органических соединений методом ИК-спектроскопии достаточно широко используются зарубежные спектрофотометры (например «Specord» производства Карл Цейс).

Для расшифровки структуры молекул органических соединений разработаны автоматизированные системы, основанные на использовании микросхем, в память которых заложены спектры поглощения большого числа соединений.

Практическая часть

Работа № 6 Знакомство с устройством и работой приборов спектрометрического анализа на примере СФ-26

Цель – изучить строение и работу спектрофотометра СФ-26.

СФ - предназначен для измерения коэффициента пропускания жидких и твердых веществ в области спектра от 186-1100 нм.

СФ - предназначен для измерения коэффициента пропускания исследуемого образца T , равного отношению интенсивности потока излучения прошедшего через измеряемый образец к интенсивности потока

изучения падающего на измеряемый образец (или прошедшего через контрольный образец, коэффициент пропускания которого принимается за единицу) и выражается формулой:

$$T = I/I_0 * 100.$$

В монохроматический поток излучения вводятся контрольный и измеряемый образцы. При измерении контрольного образца стрелка измерительного прибора устанавливается на делении 100 % регулировкой ширины щели. Величину установившегося светового потока принимают за 100% пропускания. При введении в поток излучения измеряемого образца стрелка измерительного прибора отклоняется пропорционально изменению потока, величина коэффициента пропускания отсчитывается по шкале отрегулированной в процентах пропускания или единицах оптической плотности.

Устройство СФ.

Как показано на рисунке 4 СФ состоит из монохроматора 1 с измерительным прибором 2, кюветного отделения 3, камеры 4, фотоприемниками и усилителем и осветителя 5 с источниками излучения и стабилизатором.

СФ имеет два источника сплошного спектра: дейтериевую лампу, дающую спектр в области от 186 до 350 нм и лампу накаливания - от 340 до 1100 нм. Смена источника излучения производится путем переключения зеркального конденсатора рукояткой 6.

Излучение от источника входит в монохроматор, где находится оптическая схема (система зеркал и призма), пройдя которую поток излучения направляется через входную и выходную щели на измерительный образец, располагающийся в кюветном отделении. Затем поток излучения попадает на фотоэлемент (камера 4).

Для измерения в области спектра от 186 до 650 нм применяется сурьмяно-цезиевый фотоэлемент, для измерения в области спектра от 600 до 1100 нм - кислородно-цезиевый. Переключение элемента производится с помощью рукоятки 7. В положении «К» в схему включен кислородно-цезиевый фотоэлемент, положением «Ф» - сурьмяно-цезиевый. Усилители фотоэлементов имеют 4 положения - чувствительность 1,2,3,4. которые переключаются рукояткой 8. Кроме того на панели камеры 4 имеются рукоятка 9 установки «0» и рукоятка шторы 10.

Входная и выходная щели (11) открываются в пределах от 0,01 до 20 мм с помощью рукоятки 12.

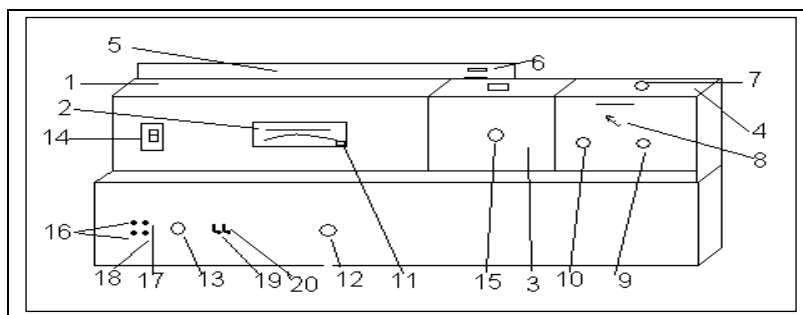


Рисунок 4. Внешний вид СФ-26

1-монохроматор, 2- измерительный прибор, 3- кюветное отделение, 4- камера фотоприемника и усилителя, 5- осветитель, 6- рукоятка конденсора, 7- рукоятка переключения элемента, 8- чувствительность, 9- рукоятка установки нуля, 10- рукоятка шторки, 11- входная и выходная щель, 12- рукоятка входной и выходной щели, 13- рукоятка поворота призмы, 14- шкала длин волн, 15- рукоятка каретки, 16- лампа «СЕТЬ», 17-лампа дейтериевой лампы, 18- сигнальная лампа лампы накаливания, 19- рукоятка включения резисторов, 20- отсчет шкалы измерений.

Рукояткой 13 осуществляется поворот призмы, который ведет к развертке спектра по длине волн. Шкала длин волн 14 имеет вид спирали с оцифровкой от 185 до 1200нм. Кюветное отделение 3 предназначается для установки измеряемых и контрольных образцов. Для исследования жидкостей используются прямоугольные кюветы из кварцевого стекла для слоя жидкостей 10 мм. Кюветы помещаются в держателях с четырьмя гнездами. Каретка с образцами перемещается с помощью рукоятки 15, и может фиксироваться в четырех положениях: «1», «2», «3», «4», соответствующее четырем кюветам, путем плавного выдвижения стержня рукоятки, на котором нанесены деления 1,2,3,4. Измерение коэффициентов пропускания образцов производится при плотно закрытой крышке кюветного отделения.

На передней планке СФ имеются шкалы измерительного прибора 2, оцифрованных в % пропускание T (от 1 до 110) и единицах оптической плотности D от (0.01 до 1).

На основании расположены сигнальная лампа и тумблер «сеть», сигнальная лампа 17 (Д), показывающая включение дейтериевой лампы и сигнальная лампа 18 (Н), показывающая включение лампы накаливания, рукоятка 19 включения резисторов компенсации при растяжке 10% диапазона на всю шкалу, имеющая (положения, обеспечивающих работу в диапазонах коэффициентах пропускания от 110 до 100, 100-90 ... от 10 до 0, рукоятка 20

отсчет для выбора шкалы «измерений», имеющая 4-е положения («х1» - измерения в диапазоне от 100 до 0.1, «х0,1» для растяжки 10% диапазона на всю шкалу, «калибр» - для 100% отсчета при работе с сильно поглощающими образцами, «х0,01» для измерения с пропуском меньше 10% для растяжки 1% из диапазона от 0 до 10% в сто раз на всю шкалу).

Указание мер безопасности

Питание СФ осуществляется от сети переменного тока напряжением 220 В, 50 Гц. Прибор должен быть заземлен. Рабочее значение от +10 до 35° С.

Порядок работы

1. Включить СФ
2. Установить длину волны, вращая рукоятку 13. Если шкала повернется на большую величину, то возвратите ее назад на 3 - 5 нм и снова подведите к требуемому делению.
3. Поставьте рукоятку 8 в положение «1» (рабочее положение). Если поток излучения недостаточен и образцы значительно поглощают излучение, установить рукоятку в положение «2», «3», или «4».
4. Налейте исследуемую жидкость и контрольную (Н О дистил.) в кюветы.
5. Поместите кюветы в каретку. Закройте крышку кюветного отделения.
6. Установите на пути потока излучения контрольную кювету, перемещая каретку рукояткой 15.
7. Установите рукоятку 20 в положение «х1».
8. Установите стрелку измерительного прибора на «0» рукояткой 9.
9. Откройте фотоэлемент, поставив рукоятку 10 в положение ОТКР.
10. Установите стрелку измерительного прибора на деление 100%, вращая рукояткой 12.
11. Установите, перемещая каретку рукояткой 15, в рабочее положение кювету с исследуемой жидкостью. Снимите отсчет по шкале оптической плотности Д
12. Выведите из потока излучения исследуемый раствор и введите воду, при этом стрелка измерительного прибора должна вернуться к делению 100%.

Работа № 7 Измерение спектров поглощения органических и неорганических соединений.

Цель: Получение спектров поглощения различных соединений.

Для работы необходимо: прибор – СФ-26, 0.1н раствор перманганата калия, 0.1% раствор уксусной кислоты, 1% раствор тиамина (витамин В1).

Ход работы:

1 Спектр поглощения раствора перманганата калия Для полной характеристики растворов различных соединений пользуются их спектрами поглощения. Для получения спектра поглощения проводят серию измерений оптической плотности раствора при различных длинах волн в интересующей области спектра.

Перед применением 9.1 мл 0.1 н раствора перманганата калия разбавить водой до 100мл. Раствор содержит 0.1 мг/мл Mn.

Измерения спектра проводить начиная с 380 нм. Измерения проводят через 10-20 нм, а найдя границы максимума, промеряют эту область через 1-2 нм.

Полученным данным построить график спектра поглощения для перманганата калия.

2 Спектр поглощения раствора органического соединения Провести измерения спектра поглощения для уксусной кислоты либо для тиамина начиная со 190 нм по описанной выше схеме.

Полученным данным построить график спектра поглощения для органического соединения.

Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1 Как зависит величина относительной ошибки определения концентрации от величины пропускания?

2 Как выбирается светофильтр для измерения оптической плотности?

3 При каких условиях целесообразно использовать метод сравнения при определении концентрации?

4 При каких условиях целесообразно использовать метод калибровочного графика при определении концентрации?

5 Что такое спектр поглощения?

6 Допустимо ли получение точки на калибровочной кривой по результатам одного измерения?

7 Что такое молярный коэффициент?

8 При каких условиях наблюдаются отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера?

9 Расскажите о законе Бугера-Ламберта-Бера.

10 Назовите аппаратуру для молекулярно-абсорбционного анализа и опишите принцип ее работы.

2.3 Люминесцентный анализ.

Первое описание люминесценции как специфического свечения раствора оставил в 1577 г. испанский врач и ботаник Николас Монардес. В 1852 г. Стокс установил связь между интенсивностью и концентрацией вещества, по другим данным эту зависимость впервые установил русский ученый С.М. Вавилов.

Первый пример практического определения Al (III) по люминесценции его комплексов с морином опубликовал Гоппельшредер в 1867 г. Он же ввел термин «люминесцентный анализ».

Сегодня люминесцентный метод анализа охватывает широкий круг методов определения разнообразных объектов от простых ионов и молекул до высокомолекулярных соединений и биологических объектов. Детектируется люминесценция самого объекта или его производных, возможно также использование изменения люминесценции специфичных агентов. Для сложных проб люминесцентное детектирование сочетается с химическим разделением (хроматография, электрофорез) или с биологическим выделением (иммуноанализ, метод полимеразной цепной реакции - ПЦР).

Любая клетка живого организма обладает собственной люминесценцией, которая обязана своим происхождением различным компонентам ее структуры и метаболизма. Собственная люминесценция лежит в основе ряда исключительно ценных методов исследования процессов внутриклеточной регуляции. В то же время она может служить источником помех и ошибок при изучении функциональных механизмов клетки с помощью люминесцентных меток, так как в ряде случаев интенсивность собственной люминесценции оказывается сравнимой по величине с интенсивностью так называемой вторичной люминесценции, вызванной введением в клетку экзогенных красителей-меток.

Процесс люминесценции включает в себя переход молекул на возбужденный электронный уровень, колебательную релаксацию в возбужденном состоянии, переход на основной электронный уровень либо с

испусканием света (собственно люминесцентное излучение), либо безызлучательно и колебательной релаксации в основном состоянии (рис.5).

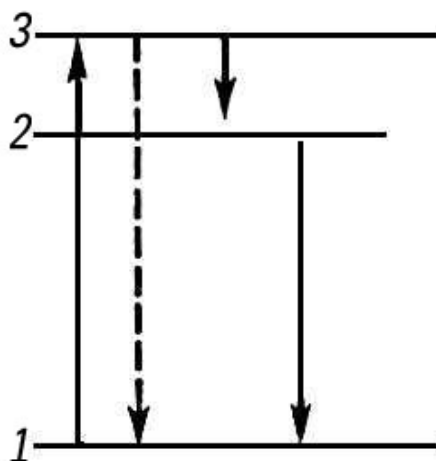


Рисунок 5. [Схема квантовых переходов при элементарном процессе люминесценции: 1 — основной энергетический уровень; 2 — уровень излучения; 3 — уровень возбуждения. Переход 3—1, показанный пунктирной стрелкой, соответствует резонансной люминесценции, переход 2—1 — спонтанной люминесценции.](#)

Эту реакцию можно осуществить за счет: света - фотолюминесценция, рентгеновских лучей – рентгенолюминесценция, радиоактивного излучения – радиолюминесценция, химических реакций - хемилюминесценция. Самый распространенный способ возбуждения – светом, видимым или ультрафиолетовым (фотолюминесценция). Электроны с избыточной энергией могут излучить свет практически сразу – за время порядка стомиллионной доли секунды после поглощения возбуждающего фотона. В таком случае излучение называется флуоресценцией – от названия минерала флюорита CaF_2 , у которого впервые обнаружено это явление. Флуоресцируют синеватым светом кристаллы нафталина на солнечном свете, зеленоватым светом – растворов флуоресцеина или эозина (эти красители иногда добавляют к шампуням и экстрактам для ванн).

Флуоресцентная микроскопия широко используется при изучении собственной флуоресценции внутриклеточных эндогенных химических соединений. В видимой области спектра флуоресценцией обладают некоторые витамины, ряд коферментов ферментов дыхательной цепи в митохондриях и др. Но наиболее многочисленные исследования проводятся при использовании окраски внутриклеточных соединений при помощи специальных красителей - флуорохромов, обладающих высоким сродством к разным эндогенным соединениям и высоким квантовым выходом флуоресценции. Одно из принципиальных достоинств флуоресцентной

микроскопии и микроспектрального флуоресцентного анализа клеток необходимо отметить - возможность прижизненных исследований. Органические люминофоры, выпускаемые под названием люмогенов (например, люмоген светло-желтый, люмоген оранжево-красный), - обычно довольно сложные органические вещества разнообразного строения, обладающие яркой люминесценцией под действием ультрафиолетовой и часто также коротковолновой части видимого света. Они применяются как декоративные краски, в полиграфии, для люминесцентной отбели ткани, в гидрологии — для люминесцентной метки песка, в люминесцентной микроскопии.

Эти методы, обладая очень низким пределом обнаружения ($10^{-4} - 10^{-12} \%$) оказались весьма эффективными при анализе редких и рассеянных элементов, высокочистых веществ. Для изучения люминесценции широко применяются методы спектрофотометрии. На них основано не только измерение спектров люминесценции, но и определение выхода люминесценции. Для исследования люминесценции большое значение имеет измерение релаксационных характеристик, например затухания люминесценции. Для измерения коротких времен затухания порядка $10^{-8} - 10^{-9}$ сек, характерных для спонтанной люминесценции при разрешенных переходах, применяются флуорометры, а также различные импульсные методы. Изучение релаксации более длительной люминесценции например люминесценции кристаллофосфоров производится при помощи фосфороскопов и тауметров.

Анализаторы Флюорат-02 являются примером доступной лабораторной аппаратуры, реализующей возможность фотолюминесцентных и хемилюминесцентных измерений. Примененные в них импульсные плазменные источники света обеспечивают высокую чувствительность, широкий спектральный диапазон и возможность кинетических измерений с разрешением по времени до 10^{-5} степени – 10^{-6} степени секунд. Кроме того, эти приборы позволяют легко регистрировать люминесценцию при низких температурах (77 К), а также могут использоваться в качестве флуоресцентного детектора в жидкостной хроматографии.

Сильной флуоресценцией обладают ряд биологически активных веществ. Так хинин, соединение с исключительно горьким вкусом, используется как лекарство от малярии. Малые добавки хинина придают напиткам чуть горьковатый привкус, а также способность ярко светиться под действием ультрафиолетовых лучей. Тиамин (витамин В1) играет важную роль в ферментной системе, обеспечивающей использование углеводов клетками. Содержание тиамина определяют с помощью тиохромного теста,

основанного на измерении интенсивности флуоресценции тиохрома – производного тиамин. Кристаллы тиохрома имеют жёлтую окраску. Водные растворы в УФ-свете (460 - 470 нм) обладают интенсивной флуоресценцией.

Как было установлено, ответственными за ультрафиолетовую люминесценцию белков являются входящие в их состав ароматические аминокислоты - триптофан, тирозин и фенилаланин (рис. 6).

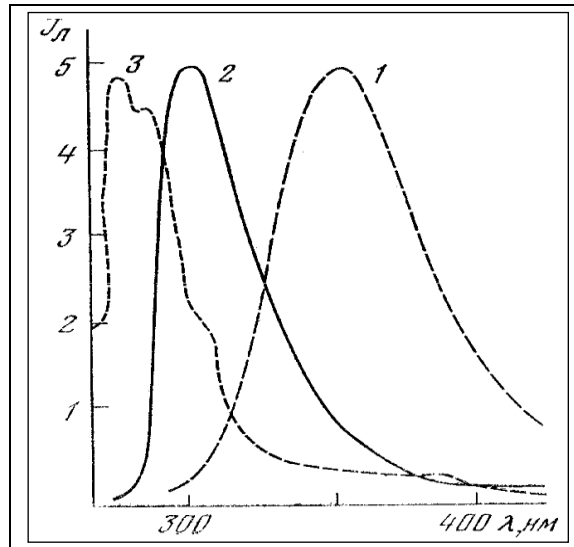


Рисунок 6. Спектры люминесценции аминокислот в нейтральном водном растворе при комнатной температуре. 1 – триптофан; 2 – тирозин; 3 – фениланин.

Наиболее яркой УФ-люминесценцией в клетке характеризуются сократительный аппарат, митохондрии, ядрышки и некоторые другие структуры цитоплазмы. Интенсивность УФ-люминесценции зависит от физиологического состояния клеток и меняется при различных воздействиях, в том числе и при ионизирующем облучении животных.

Среди других, люминесцирующих в синей и желто-зеленой областях спектра соединений при исследовании клеток животных можно встретить различные витамины и продукты метаболизма, в том числе пиридоксали, фолиевую кислоту и ее производные и т.д. В тканях животных люминесценция в красной области спектра чаще всего связана с присутствием порфиринов в живых клетках. Порфириновая структура, обладающая яркой и характерной люминесценцией, лежит в основе простетических групп таких широко распространенных соединений, как цитохромы, пероксидаза, каталаза, гемоглобин и миоглобин. В гемопroteинах люминесценция «погашена» присутствием атома железа. Однако, патологические нарушения в обмене гемосодержащих соединений, например в результате некоторых отравлений, также могут приводить к появлению характерной люминесценции порфиринов в клетках и служить, таким образом, важным

диагностическим тестом.

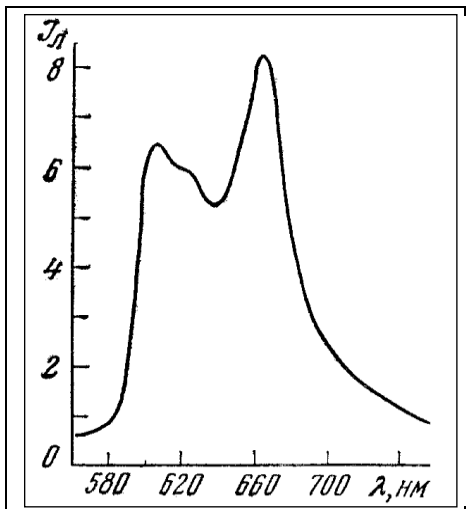


Рисунок 7. Спектр люминесценции гематопорфирина в эритроцитах, обработанных концентрированной кислотой. Длина волны возбуждения 436 нм.

Необходимо отметить, что при обработке тканей животных некоторыми фиксаторами может происходить отрыв атома железа от протетической группы ряда внутриклеточных гемопротеинов (например, миоглобина). В результате на месте локализации этих соединений появляется характерная люминесценция порфиринов, что необходимо учитывать при работе с флуорохромами, люминесцирующими в этой области спектра. Реакция может быть использована также и для разработки цитохимического метода выявления некоторых гемопротеинов в клетках животных. Именно этот прием используется, например, в криминалистике для обнаружения отдельных эритроцитов по их порфириновой люминесценции после обработки объекта серной кислотой.

Таблица 3 Примерные границы основных цветов спектра

Цвет	Диапазон <u>длин волн</u> , нм
<u>Красный</u>	625—740
<u>Оранжевый</u>	590—625
<u>Жёлтый</u>	565—590
<u>Зелёный</u>	500—565
<u>Голубой</u>	485—500
<u>Синий</u>	440—485
<u>Фиолетовый</u>	380—440

Практическая часть

Работа № 8 Знакомство с устройством и работой приборов флуоресцентного анализа на примере флуоресцентного микроскопа – ЛОМО

Цель — изучить устройство и работу флуоресцентного микроскопа ЛОМО.

Внимательно прочитайте инструкцию к микроскопу.

ВНИМАНИЕ! Включение микроскопа производится только преподавателем. Студенты допускаются к работе с микроскопом только после ознакомления с техникой безопасности.

Работа № 9 Исследование прижизненного свечения хлорофилла.

Естественным люминофором растений является зеленый пигмент хлорофилл. Хлорофилл имеет темно-красную люминесценцию, что объясняется сопряженной структурой входящего в его состав порфиринового цикла.

Цель - наблюдение естественной люминесценции органических соединений.

Для работы необходимо: несколько видов растений (хлорелла, элодея, листья сирени, вишни, комнатных растений), иглы, скальпель для препаровки, предметные и покровные стекла, раствор медного купороса.

Ход работы:

1 Каплю взвеси одноклеточных водорослей, листок многоклеточного растения (предварительно отпрепарированный) помещают на предметное стекло, прикрывают покровным и помещают на предметный столик. Наблюдение проводят сначала на малом увеличении (объектив x10). Затем, при большом увеличении рассматривают структуру хлоропластов и отмечают особенности свечения различных объектов. Увиденное необходимо зарисовать.

2 Листок многоклеточного растения помещают на предметное стекло на него капают 1-2 капли красителя через 5 минут промывают водой. Наблюдение проводят сначала на малом увеличении (объектив x10). Затем, при большом увеличении рассматривают структуру клеток и отмечают особенности свечения различных объектов. Увиденное необходимо зарисовать.

Сделать выводы.

Работа № 10 Исследование свечения растворов различных органических соединений.

Известно, что различные органические вещества являются естественными люминофорами. Люминесцируют органические молекулы, в состав которых входят чередующееся одинарные и двойные связи между атомами углерода. Химики часто называют эти связи сопряженными, сопряженной именуют и всю структуру этих молекул. Из природных люминесцирующих соединений встречающихся в некоторых растениях, сопряженными структурами обладают витамин А и умбеллиферон.

Встречается собственная люминесценция и у некоторых белков (альбумина бычьей сыворотки, белка вируса табачной мозаики, рибонуклеазы). Одним из наиболее ярко флюоресцирующих лекарственных соединений является хинин. В кислых растворах он люминесцирует в синей области (450—475 нм). После экстракции возможна количественная регистрация многих витаминов, например витамина Е, максимум флюоресценции которого лежит в УФ-области при 330 нм. Витамин В6 имеет синюю, а витамин А — зеленую флюоресценцию. Витамины С, D, В12 и др. удается определить по вторичной люминесценции. По собственной люминесценции проводят контроль качества пищевых продуктов. Так, при длительном хранении молока и сливок рибофлавин окисляется в люмихром, что сопровождается изменением цвета флюоресценции от желто-зеленого к синему.

Цель - наблюдать свечение растворов различных люминофоров.

Для работы необходимо: флуоресцентный микроскоп ЛОМО, концентрированная серная кислота, 1% раствор хинина, витамин А, прокисшее молоко или сливки, дистиллированная вода, мерные цилиндры, чашки Петри или часовые стекла 6 шт.

Ход работы:

1 Приготовление рабочих растворов

Чашки Петри пронумеровать. В каждую чашку налить 1 мл дистиллированной воды. Затем добавить исследуемые растворы:

- 1 мл хинина+капля серной кислоты
- капля витамина А
- капля прокисшего молока
- капля свежего молока

капля крови+ серная кислота

2 Исследуемые растворы последовательно ставить на предметный столик микроскопа (учитывая спектры свечения и поглощения). Зарисовать цвет увиденного свечения. Сравнить с цветом отраженного света от дистиллированной воды.

Сделать выводы.

Работа № 11. Знакомство с устройством и работой приборов флуоресцентного анализа на примере флуориметра «Флюорат-02»

Цель — изучить устройство и работу флуориметра

Внимательно прочитайте инструкцию к флуориметру «Флюорат-02».

ВНИМАНИЕ! Включение флуориметра производится только преподавателем. Студенты допускаются к работе с флуориметром только после ознакомления с техникой безопасности.

Работа №12 Определение концентрации рибофлавина с помощью флуориметра.

Сущность метода основана окислении витамина марганцовокислым калием и измерении интенсивности флуоресценции при длинах, волн 360—480 нм возбуждающего и 510—650 нм излучаемого света.

Цель — найти количество рибофлавина в анализируемой пробе.

Для работы необходимо: флуориметр, колбы лабораторные стеклянные, водорода перекись 3 %, калий марганцовокислый 3%, серная кислота 93-95%, рибофлавин 0.01 г/л, ледяная уксусная кислота.

Ход работы:

Приготовление растворов. В колбу 1 наливают по 10 мл исследуемого раствора, в колбу 2 - 10 мл дистиллированной воды. В колбу 3 наливают 10 мл исследуемого раствора + 1 мл рибофлавина 0.01 г/л. Во все колбы добавляют по 1 мл ледяной уксусной кислоты, 0.5 мл раствора марганцовокислого калия, перемешивают и выдерживают 2 минуты. Затем добавляют 0.5 мл перекиси водорода опять перемешивают и выдерживают 5 минут. Затем измеряют интенсивность флуоресценции сначала раствора с добавкой рибофлавина, затем без добавки. Измерения проводят относительно пробы с дистиллированной водой.

Обработка результатов Массовую долю витамина В2 вычисляют по формуле 3.3 (см. Главу 1):

$$C_x = C_{эт} * S_x / (S_{x+эт} - S_x),$$

где S_x — интенсивность флуоресценции раствора анализируемой пробы, $S_{эт+x}$ - интенсивность флуоресценции раствора анализируемой пробы с добавкой рибофлавина, $C_{эт}$ – концентрация рибофлавина в стандартной добавке.

Сделать вывод

Работа №13 Определение

Цель - рассчитать расстояние между двумя

Для работы необходимо: калькулятор с логарифмами.

Ход работы:

Контрольные вопросы

- 1 Флуоресцентный микроскоп. Устройство, особенности.
- 2 Использование флуоресцентного метода анализа в биологии и медицине.
- 3 Особенности свечения неорганических веществ.
- 4 Особенности свечения органических соединений.
- 5 Строение флуориметра.
- 6 История открытия и развития понятия о флуоресценции.
- 7 Правило Стокса. Виды люминесценции.
- 8 Что такое флуоресценция?

3 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Электрохимические методы анализа основаны на измерении и регистрации электрических параметров системы (аналитических сигналов), изменяющихся в результате протекания химических реакций.

Электрохимическая система обычно состоит из электрохимической ячейки, представляющей собой единое конструктивное оформление сосуда с исследуемым раствором и электродами. Принята следующая классификация этих методов:

1 Классификация, учитывающая природу источника электрической энергии в системе. Различают две группы методов:

– методы без наложения внешнего потенциала. Здесь источник электрической энергии – сама электрохимическая система (гальванический элемент). К таким методам относятся потенциометрические методы.

– методы с наложением внешнего потенциала. К ним относятся: кондуктометрия, вольтамперометрия, кулонометрия, электрогравиметрия.

2 Классификация по способу применения. Различают прямые и косвенные методы.

– прямые методы. Измеряют аналитический сигнал как функцию концентрации раствора и по показаниям прибора находят содержание вещества в растворе (Прямая потенциометрия, прямая кондуктометрия и т. д.).

– косвенные методы – это методы титрования, в которых окончание титрования фиксируют на основании измерения электрических параметров системы (кондуктометрическое, амперометрическое титрование и т. д.).

Развитию и усовершенствованию электрохимических методов анализа способствовали успехи в области электрохимии и приборостроении. Различия между электрохимическими методами анализа в основном обусловлены природой электродов и измерительными приборами.

3.1 Кондуктометрия

Основатель этого метода – немецкий физик Кольрауш, который впервые в 1885 г. предложил уравнение зависимости электропроводности растворов сильных электролитов от концентрации. Электропроводность растворов обусловлена диссоциацией растворенного вещества и миграции образующихся ионов под действием внешнего источника напряжения.

Движущиеся ионы в поле электрического тока испытывают тормозящее действие со стороны молекул растворителя – релаксационный эффект – и со стороны противоположно заряженных ионов –электрофоретический эффект.

В результате этих торможений раствор оказывает сопротивление прохождению электрического тока. То есть электропроводность (W) – это величина обратная сопротивлению: $W = 1/R$, сименс ($См = Ом^{-1}$, обратный Ом).

Зависимость электропроводности от концентрации выражается уравнением

$$W = K S c U / L, \quad (8)$$

где K – коэффициент пропорциональности; S – площадь электродов; c – концентрация ионов; U – подвижность ионов; L – расстояние между электродами. Для данной пары электродов при $S, L = const$ получим:

$$W = K c U \quad (9)$$

Различают удельную (κ , каппа) и эквивалентную электропроводность (λ).

Удельная электропроводность (κ) – это электропроводность 1 см^3 раствора, находящегося между электродами площадью 1 см^2 каждый, расположенными на расстоянии 1 см друг от друга. Размерность: $См/м$.

Эквивалентная электропроводность (λ) – это электропроводность 1 н раствора электролита, измеренная при расстоянии $L = 1\text{ см}$. Размерность: $См \cdot г^{-1} \cdot экв^{-1} \cdot см^2$. Зависимость κ и λ выражается уравнением

$$n = \lambda 1000 \kappa, \quad (10)$$

где n – нормальная концентрация.

Таким образом, в кондуктометрии аналитическим сигналом является электропроводность. Различают: прямую кондуктометрию и кондуктометрическое титрование.

Прямая кондуктометрия Измеряют электропроводность исследуемого раствора и по градуировочному графику, построенному в тех же условиях для стандартных растворов, определяют концентрацию исследуемого раствора. Метод нашел ограниченное применение, так как он неселективен, т. е. электропроводность – величина аддитивная, обусловленная присутствием всех ионов. Тем не менее, метод используется для непрерывного контроля производства: качества пищевых продуктов, определения влажности различных материалов (бумаги, газов, зерна, текстильных материалов) и широко применяется для определения общего солевого состава воды (речной, минеральной, дистиллированной); для определения растворимости малорастворимых электролитов; определения констант диссоциации электролитов в том числе комплексных соединений (K_n). Нередко его сочетают с другими методами, такими как потенциометрия, рефрактометрия, хроматография.

Однако сложности зависимости электропроводимости от концентрации существенно отражаются на этом методе. С ростом концентрации электропроводность вначале растет, а при более высоких концентрациях (> 3 н) резко уменьшается. Этот метод применим для анализа разбавленных растворов.

Кондуктометрическое титрование Точку эквивалентности определяют по резкому излому кривой зависимости электропроводности от объема титранта. При этом могут быть использованы все типы реакций (нейтрализации, осаждения, комплексообразования), при которых достаточно резко изменяется электропроводность.

Для получения резкого излома на кривой титрования следует учитывать эффект разбавления. Его сводят к минимуму, титрованием больших объемов (100 см³) исследуемого вещества концентрированным раствором титранта из микробюретки (2 – 5 см³). Для получения надежных результатов следует учитывать различные факторы, влияющие на электропроводность (константа диссоциации, подвижность ионов, ионная сила раствора и т. д.). При правильном подборе титранта и растворителя создают благоприятные условия кондуктометрического титрования.

Достоинства: возможность раздельного определения смесей кислот и оснований, титрование мутных и окрашенных растворов при точности 2 %.

3.2. Кулонометрия

Высокую чувствительность и точность анализа обеспечивают методы прямой кулонометрии и кулонометрического титрования. В основе метода – определение концентрации исследуемого вещества путем регистрации количества электричества, затраченного на электролиз вещества при потенциале электрода, равном потенциалу выделения анализируемого вещества.

В соответствии с объединенным законом М. Фарадея масса (m , г) и количество электричества (Q , кулон) находятся в зависимости, выраженной уравнением

$$m = Q n M F, \quad (11)$$

где M – молярная масса вещества, г/моль; n – число электронов, участвующих в реакции; F – число Фарадея, равное 96487 Кл/моль.

Кулонометрический анализ проводится как при контролируемом потенциале рабочего электрода, так и при контролируемом токе прошедшего через электролитическую ячейку. При этом важно, чтобы все электричество

тратилось на основной электрохимический процесс, и более точно проводить определение количества электричества (Q).

3.3 Потенциометрия

Метод известен с 90-х гг. XIX в., однако признан как аналитический метод анализа только в 20-х гг. XX в.

Потенциометрический метод, основанный на измерении электродвижущих сил (ЭДС) обратимых гальванических элементов, используют для определения содержания веществ в растворе и измерения различных физико-химических величин. В потенциометрии обычно применяют гальванический элемент, включающий два электрода, которые могут быть погружены в один и тот же раствор (элемент без переноса) или в два различных по составу раствора, имеющих между собой жидкостной контакт (цепь с переносом). Электрод, потенциал которого зависит от активности (концентрации) определяемых ионов в растворе, называется индикаторным.

Для измерения потенциала индикаторного электрода в раствор погружают второй электрод, потенциал которого не зависит от концентрации определяемых ионов. Такой электрод называется электродом сравнения. Величину ЭДС можно рассчитать по разности потенциалов этих электродов.

Зависимость величины электродного потенциала (ЭП) от активности ионов в растворе выражается уравнением Нернста

$$E = E_0 + (R T / nF) \ln a(c f), \quad (12.1)$$

где E_0 – стандартный электродный потенциал; R – универсальная газовая постоянная ($R = 8.314 \text{ Дж/мольК}$); T – абсолютная температура; n – число электронов (e), участвующих в реакции; c – концентрация, моль/дм³; f – коэффициент активности. Так как в потенциометрии используются разбавленные растворы, где $f=1$, то активность (a) заменяют на концентрацию (c). Если перейти от \ln к \lg , то при $T = 298 \text{ К}$ (25 °C) уравнение (12.1) запишется так:

$$E = E_0 + 0,059 n \lg c \quad (12.2)$$

Электроды В потенциометрическом методе анализа используют два основных класса электродов:

– электроды, на межфазных границах которых протекают реакции с участием электронов, так называемые электронообменные (электроды первого, второго рода и окислительно-восстановительные);

– электроды, на межфазных границах которых протекают ионообменные реакции. Такие электроды называют мембранными, или ионообменными, их называют также ионоселективными.

Обратимые электроды – электроды, у которых скачки потенциалов зависят от концентрации в соответствии с термодинамическими уравнениями. На обратимых электродах быстро устанавливается равновесие, и скачки потенциалов остаются неизменными во времени. При прохождении электрического тока скачки потенциалов не должны значительно изменяться; а после выключения тока быстро должно устанавливаться равновесие. Электроды, не удовлетворяющие этим требованиям, называются необратимыми. В потенциометрии используют обратимые электроды.

Электроды I рода – электроды, находящиеся в равновесии с катионами, одноименными с металлом, и обратимые по отношению к ним. Простейший электронообменный электрод – металлическая пластинка, погруженная в раствор или расплав электролита Zn/Zn^{2+} ; Cu/Cu^{2+} и т. д.

В качестве электрода сравнения используют стандартный водородный электрод (СВЭ) – электрод I рода – $Pt(H_2)/2H^+$. Его потенциал определяется величиной рН и при комнатной температуре равен:

$$E = E_0 + 0,059 \lg[H^+] = -0,059 \text{pH} \quad (12.3)$$

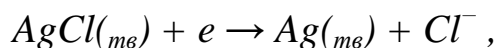
Стандартный водородный электрод (СВЭ) неудобен в работе, его заменяют электродами II рода – насыщенным каломельным электродом (н.к.э.) и хлорсеребряным (х.с.э.).

Электроды II рода – электроды, состоящие из металлической пластинки, покрытой малорастворимой солью этого металла, и обратимые по отношению к анионам соли.



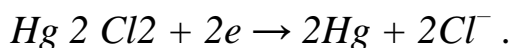
Концентрация Cl^- поддерживается на определенном уровне путем добавления раствора хорошо растворимой соли с тем же анионом (чаще KCl). Отличительной особенностью электродов сравнения, применяемых в аналитической практике, является простота изготовления (доступность), воспроизводимость потенциала и низкий температурный коэффициент. Этим требованиям отвечают х.с.э. и н.к.э.

Хлорсеребряный электрод (х.с.э.) – электрод, чувствительный к анионам Cl^- , которые образуют осадки с катионами металла электрода (Ag^+). Он представляет собой серебряную проволоку, покрытую равномерным слоем $AgCl$, который хорошо проводит электрический ток. Проволоку погружают в насыщенный раствор KCl . В растворе устанавливается равновесие



т.е. его потенциал определяется концентрацией Cl^{-} – ионов. Потенциал данного хлорсеребряного электрода равен +0.201 В. При концентрации KCl 0.1 н он равен +0.29 В, а при 1.0 н – 0.24 В.

Насыщенный каломельный электрод (н.к.э.) изготовлен на основе металлической ртути и каломели Hg_2Cl_2 . Электрохимическое уравнение, характеризующее поведение электрода, описывается полуреакцией



Так же, как и в случае х.с.э. потенциал зависит от концентрации Cl^{-} – ионов. При использовании в качестве электролита насыщенного раствора KCl , потенциал электрода равен +0.244 В. Для 1 н раствора KCl $E = 0.280$ В; для 0.1 – 0.334 В.

Ионоселективные электроды – это электроды, обратимые по катионам или анионам, сорбируемыми твердой или жидкой мембраной. Они делятся на группы:

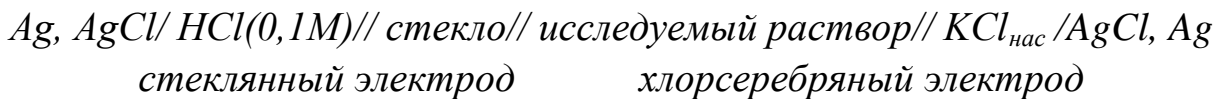
- стеклянные электроды;
- твердые электроды с гомогенной или гетерогенной мембраной;
- жидкостные электроды (на основе ионных ассоциативов, хелатов металлов или нейтральных лигандов);
- газовые электроды;
- электроды для измерения активности (концентрации) биологических веществ.

Мембранные электроды имеют форму пластинок из ионообменного материала, контактирующих с двумя растворами электролита $MX_1(c_1)/мембрана/ MX_2(c_2)$.

Среди ионоселективных электродов наибольшее применение получил стеклянный электрод, предназначенный для измерения рН.

Стеклянный электрод – это несколько условное название несложной системы, включающей небольшой сосуд из изолирующего стекла, к нижней части которого припаян шарик из специального электродного стекла. Такой электрод снабжен токоотводом. В качестве внутреннего стандартного раствора в стеклянном электроде используют 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты обычно с добавкой хлорида натрия и калия. Можно использовать также какой-либо буферный раствор с добавкой хлоридов или бромидов. Токоотводом служит хлорсеребряный электрод,

представляющий собой серебряную проволоку, покрытую хлоридом серебра. К токоотводу припаивают изолированный, экранированный провод. Стекланный электрод обычно используют в паре с хлорсеребряным электродом сравнения. Применяемую при этом электрохимическую цепь можно записать следующим образом:



Потенциал стекланныго электрода обусловлен обменом ионов щелочных металлов, находящихся в стекле с ионами водорода из раствора. Энергетическое состояние ионов в стекле и растворе различно.

Это приводит к тому, что ионы водорода так распределяются между стеклом и раствором, что поверхности этих фаз приобретают противоположные заряды между стеклом и раствором возникает разность потенциалов, значение которой зависит от рН раствора.

В лабораторной практике стекланные электроды применяют, как правило, для измерения рН. Перед началом работы стекланные электроды следует выдержать некоторое время в 0.1 М растворе НСl. Ни в коем случае нельзя вытирать стекланный шарик, так как это может разрушить гелиевую поверхность электрода. Категорически запрещается царапать поверхность электрода острыми предметами, так как толщина стекланныго шарика составляет десятые доли миллиметра и это выведет из строя чувствительный элемент.

Виды потенциометрического метода анализа Различают два вида потенциометрических измерений:

1 Прямая потенциометрия – определение концентрации ионов, в частности [Н⁺], с помощью уравнения Нернста по ЭДС гальванического элемента. Самое известное приложение этого вида потенциометрии – рН-метрия. Крупный вклад в теорию и практику рН-метрии внесли ученые: Б.П. Никольский, М.М. Шульц, Е.Н. Виноградова и др.

2 Потенциометрическое титрование основано на использовании измерений ЭП для нахождения точки эквивалентности в различных реакциях. Аппаратура для проведения прямой потенциометрии и потенциометрического титрования одна и та же. В схему потенциометрических измерений входят индикаторный электрод, электрод сравнения и потенциало-измеряющий прибор. В качестве последних используют различные рН-метры. Перед измерением рН проводят настройку приборов по буферным растворам.

Потенциометрический анализ широко применяют для непосредственного определения активности ионов, находящихся в растворе (прямая потенциометрия, ионометрия), а также для индикации точки

эквивалентности при титровании по изменению потенциала индикаторного электрода в ходе титрования (потенциометрическое титрование). При потенциометрическом титровании могут быть использованы следующие типы химических реакций, в ходе которых изменяется концентрация потенциалопределяющих ионов: реакции кислотно-основного взаимодействия, реакции окисления-восстановления, реакции осаждения и комплексообразования.

Результаты определения методом потенциометрического титрования более точны, чем при использовании прямой потенциометрии, так как в этом случае вблизи точки эквивалентности небольшому изменению концентрации соответствует большое изменение потенциала индикаторного электрода. В ходе титрования измеряют и записывают ЭДС ячейки после добавления каждой порции титранта. В начале титрант добавляют небольшими порциями, при приближении к конечной точке (резкое изменение потенциала при добавлении небольшой порции реагента) порции уменьшают. Для определения конечной точки потенциометрического титрования можно использовать различные способы. Наиболее простой способ состоит в построении кривой титрования – графика зависимости потенциала электрода от объема титранта (рис. 6а). Другой способ состоит в расчете изменения потенциала на единицу изменения объема реагента $\Delta E/\Delta V$ (рис. 6б).

Кривая титрования, построенная с использованием этого параметра, зависящего от объема титранта, имеет острый максимум в точке эквивалентности. Кривые потенциометрического титрования представлены на рис 6.

Рассмотренные способы основаны на предположении, что кривая титрования симметрична относительно точки эквивалентности и перегиб кривой соответствует этой точке. Это допущение справедливо при условии, что вещества взаимодействуют в эквимолекулярных соотношениях и что электродный процесс полностью обратим.

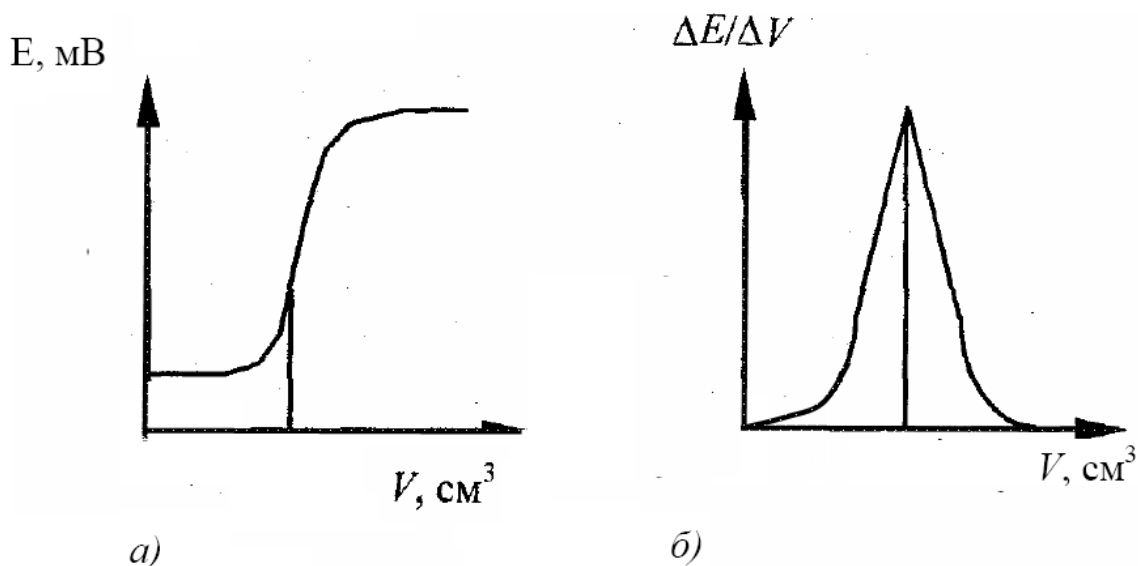


Рисунок 8 Кривые потенциметрического титрования:
 а) зависимость E от V; б) зависимость $\Delta E/\Delta V$ от V

Главное преимущество потенциметрического метода по сравнению с другими методами анализа – быстрота и простота проведения измерений. Время установления равновесного потенциала индикаторных электродов мало, что удобно для изучения кинетики реакций и автоматического контроля технологических процессов. Используя микроэлектроды, можно проводить определения в пробах объемом до десятых долей, см^3 . Потенциметрический метод дает возможность проводить определения в мутных и окрашенных растворах, вязких пастах, при этом исключая операции фильтрации и перегонки. Потенциметрические измерения относят к группе неразрушающих способов контроля, и анализируемый раствор может быть использован для дальнейших исследований. Погрешность определения при прямом потенциметрическом измерении составляет 2 – 10 %, при проведении потенциметрического титрования – 0.5–1.0 %. Интервал определения содержания компонентов потенциметрическим методом в различных природных и промышленных объектах – в пределах от 0 до 14 pH для стеклянных электродов, и от 10^{-5} до 10^{-7} М определяемого иона для других типов ионоселективных электродов.

Одним из достоинств метода потенциметрического титрования является возможность полной или частичной его автоматизации. Автоматизировать можно подачу титранта, запись кривой титрования, отключение подачи титранта в заданный момент титрования, соответствующий точке эквивалентности.

3.4 Электрогравиметрический метод анализа

Электрогравиметрический метод – выделение веществ на электродах при действии постоянного тока, полученного от внешнего источника. По закону Фарадея масса вещества, выделяющегося при электролизе, пропорциональна силе тока, времени и химическому эквиваленту вещества.

Для выделения одного моля эквивалента вещества требуется около 96500 кулонов электричества. Один кулон (1 Кл) – количество электричества, прошедшее через проводник в течение 1 с при силе тока в 1 А.

Количество вещества, выделяемое одним кулоном электричества, называют электрохимическим эквивалентом (Ээ), оно равно молю эквивалента данного вещества, деленному на 96500 ($\text{Ээ} = M / 96500$, г/моль).

Вследствие протекания побочных процессов масса вещества, выделяющегося при электролизе обычно меньше теоретически вычисленной по закону Фарадея, т.е. выход по току (η) чаще всего менее 100 %. Поэтому масса вещества, выделившегося на электроде:

$$m = \text{Ээ} \cdot I \cdot t \cdot \eta \quad (13.1)$$

или

$$m = M / 96500 \cdot n I t \eta, \quad (13.2)$$

где m – масса вещества, I – сила тока, А; t – время, с; Ээ – электрохимический эквивалент, г/моль; M – молярная масса вещества, выделившегося на электроде, г/моль; η – выход по току; n – число электронов, участвующих в электрохимическом процессе.

Электрогравиметрия находится на стыке электрохимического и гравиметрического методов анализа. На электроде выделяют металл и взвешивают. Таким образом, определяют содержание металла в исследуемом растворе. Как выбирают напряжение для проведения электролиза? Это напряжение или разность потенциалов называют потенциалом разложения. Его определяют по кривой зависимости силы тока (I) от напряжения (E) (рис. 7).

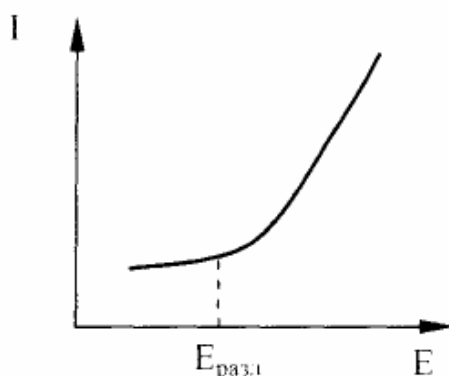


Рисунок 9 Кривая зависимости $I = f(E)$

По достижении $E_{\text{разл.}}$ кривая резко возрастает. Для увеличения скорости электролиза напряжение тока в цепи всегда поддерживают немного выше $E_{\text{разл.}}$. Это избыточное напряжение называют перенапряжением, необходимым для протекания нежелательных сложных физико-химических процессов, протекающих на поверхности электродов.

Если исследуемый раствор содержит смесь различных компонентов, различающихся величинами $E_{\text{разл.}}$, то их легко разделить, строго регулируя напряжение. При этом в первую очередь выделяется металл с меньшим значением $E_{\text{разл.}}$

Известно два варианта электрогравиметрических методов анализа:

1 Наиболее распространенный, применяется при определении макроколичеств вещества. Выделение вещества происходит на электроде под действием источника постоянного тока.

2 Менее распространенный, применяется при определении микроколичеств вещества – метод внутреннего электролиза. В этом варианте постоянный ток возникает при погружении в раствор гальванической пары. Источник постоянного тока не требуется.

Электрогравиметрический метод широко применяется в аналитической практике, особенно при определении цветных металлов и их сплавов.

В качестве источника постоянного тока используют аккумуляторы и выпрямители. Разность потенциалов измеряют с помощью вольтметров, силу тока – при помощи амперметров. Электролиз ускоряется при нагревании и перемешивании растворов.

При использовании электрогравиметрических методов обычно применяют платиновые электроды (сетчатый катод и свернутый в спираль – анод).

Преимуществами метода являются:

- простота, достаточная точность и экспрессность метода позволили применить этот метод к анализу цветных металлов и их сплавов;
- метод исключает фильтрование осадка (в гравиметрии – самый длительный и утомительный процесс);
- возможность анализа многокомпонентных смесей, путем подбора электролита или потенциала электрода.

К ОСАДКАМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫМ В ЭЛЕКТРОГРАВИМЕТРИИ ПРЕДЪЯВЛЯЮТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ:

Определяемый компонент должен выделяться на электроде количественно, получающийся осадок должен быть чистым, мелкозернистым и обладать хорошим сцеплением с поверхностью электрода с тем, чтобы последние операции – промывание, высушивание и взвешивание – не вызвали потери осадка. Для получения таких осадков необходимо: регулировать плотность тока, состав и температуру раствора, поверхность и материал электрода, скорость перемешивания.

3.5 Полярографический метод

В настоящее время для изучения биологических процессов все чаще и шире применяются физические методы исследования. Одним из таких методов является метод полярографического анализа на твердых электродах (полярографический метод анализа предложен известным чешским ученым, лауреатом Нобелевской премии Я. Гейровским). Этот метод позволяет исследовать кинетику быстрых процессов на тканевых препаратах в условиях, близких к условиям *in vivo*.

Электрохимические методы анализа, основанные на изучении и использовании зависимости силы тока, протекающего через ячейку, при изменении внешнего наложенного напряжения называются вольтамперометрическими методами анализа. В качестве индикаторного электрода могут использоваться ртутный, платиновый, графитовый и другие электроды.

При использовании ртутного капающего электрода (РКЭ) в качестве индикаторного электрода метод анализа называется полярографическим.

Классический вариант полярографического метода анализа, предложенный в 1922 году Я.Гейровским, основан на изучении явлений

поляризации при электрохимическом восстановлении (реже окислении) небольших количеств вещества ($10^{-2} - 10^{-5}$ М) на ртутном капающем электроде. С помощью этого метода по одному аналитическому сигналу можно получить информацию о качественном и количественном составе анализируемого вещества.

Несмотря на токсичность ртути, электроды, изготовленные из нее, имеют ряд преимуществ:

1• Из ртути можно изготовить капающий электрод, в котором ртуть будет вытекать из тонкого капилляра, под давлением столба ртути над ним в виде непрерывно растущих и обновляющихся капель. Размеры капель хорошо воспроизводятся, поэтому и результаты измерений хорошо воспроизводимы.

2• Большое перенапряжение при восстановлении водорода на ртути, дает возможность определять ионы металлов, находящиеся в электрохимическом ряду напряжений металлов до водорода.

3• Ртутный электрод поляризуется в широком интервале потенциалов:

+0,4 В - 1,0 В - в кислой среде

+0,15 В ч - 2,0 В - в щелочной среде

+0,15 В ч - 2,5 В - в растворах солей R_4N^+

В качестве электродов сравнения можно использовать донную ртуть, насыщенный каломельный или хлорсеребряный электрод. Преимущество отдается насыщенному каломельному электроду.

При изучении процессов восстановления определяемого вещества на РКЭ, подаваемое напряжение E должно расходоваться на поляризацию анода E_A , поляризацию катода E_K и на преодоление внутреннего сопротивления электролита iR :

$$E = E_A - E_K + iR \quad (14)$$

В полярографии электролиз проводят в специальных условиях: 1) индикаторный РКЭ по площади должен быть намного меньше электрода сравнения; 2) в электрохимической ячейке должен присутствовать довольно концентрированный (0.1-1.0 М) раствор индифферентного фонового электролита, катионы которого не восстанавливаются в изучаемой области потенциалов. Присутствие фонового раствора значительно уменьшает внутреннее сопротивление электролита; 3) концентрация определяемого вещества $10^{-3}-10^{-5}$ М.

При соблюдении этих условий на РКЭ создается достаточно большая плотность тока и все напряжение, подаваемое на ячейку, расходуется только на поляризацию РКЭ: $E = -E_K$

Вещества, восстанавливающиеся на катоде, называются депполяризаторами. Схема установки приведена на рисунке 10.

В начале процесса (рис. 10) при увеличении напряжения ток практически не меняется (остаточный ток), при достижении определенного значения потенциала (E разложения) ток резко возрастает за счет диффузии депполяризатора из объема раствора к катоду (диффузионный ток) и катодной реакции.

Скорость диффузии пропорциональна разности концентраций в приэлектродном слое и в остальной массе раствора. Когда скорость диффузии станет равной скорости разряда ионов, т.е. количество диффундирующих ионов будет равно количеству ионов, разряжающихся на электроде, ток перестанет меняться (предельный ток).

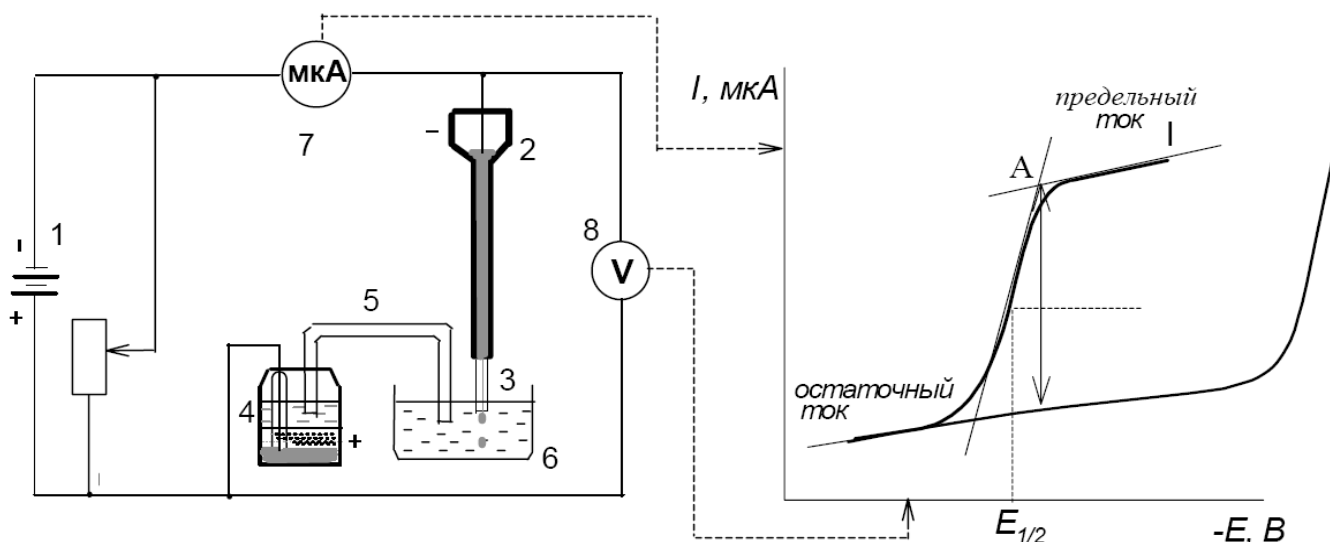


Рисунок 10 Схема полярографической установки (а): 1 – источник постоянного тока; 2 – резервуар с ртутью; 3 – капающий ртутный электрод (катод); 4 – насыщенный каломельный электрод (анод); 5 – солевой мостик; 6 – ячейка; 7 – микро-амперметр; 8 – вольтметр. Типичная полярограмма (б) депполяризатора (I) и фона (II).

Благодаря такому ходу электролиза вольтамперная кривая имеет S-образную форму и называется полярографической волной (полярограммой).

Уравнение полярографической волны записывается следующим образом:

$$E = E_{1/2} - \frac{0,059}{n} \lg \frac{I}{I_{\text{ПП}} - I} \quad (15)$$

где I - ток (мкА) в любой точке восходящего участка полярограммы; $I_{пр}$ - предельный диффузионный ток (мкА); $E_{1/2}$ - потенциал, отвечающий половине диффузионного тока, В.

$$E_{1/2} = E_{M^{n+}/M}^0 - \frac{0,059}{n} \lg \frac{f_M \cdot D_{M^{n+}}}{f_{M^{n+}} \cdot D_M} \quad (16)$$

где $E_{M^{n+}/M}^0$ - стандартный потенциал полуреакции; D_M и $D_{M^{n+}}$ - коэффициенты диффузии атома металла в ртути и иона металла в растворе; f_M и $f_{M^{n+}}$ - коэффициенты активности атома металла в ртути и иона металла в растворе.

$E_{1/2}$ характеризует природу деполяризатора, так как связана с данной окислительно-восстановительной системы и зависит от концентрации и состава фонового раствора. $E_{1/2}$ является постоянной величиной для данного деполяризатора, восстанавливающегося на определенном фоне. Потенциалы полувольт различных элементов на различных фонах сведены в таблицы. Сравнивая полученное значение $E_{1/2}$ с табличными, можно проводить качественный анализ. При наличии в растворе нескольких полярографически активных ионов получается вольтамперная кривая, состоящая из нескольких ступеней, каждая из которых соответствует определенному значению $E_{1/2}$ (полярогра-фический спектр).

Основным уравнением в полярографии является уравнение Ильковича:

$$I_{пр} = 607nD^{1/2} C m^{2/3} \tau^{1/6} \quad (17)$$

где n - число электронов принимающих участие в реакции; D - коэффициент диффузии, см²/с; m - скорость вытекания ртути из капилляра, мг/с; τ - время капания, с; C - концентрация электроактивных ионов, ммоль/л.

При постоянстве условий $I_{пр} = K \cdot C$.

Для проведения количественного анализа готовят серию стандартных растворов с различной концентрацией деполяризатора. Записывают полярограммы этих растворов, определяют значение предельных токов и строят градуировочный график $I = f(C)$, который и используют для количественного определения деполяризатора в исследуемом интервале концентраций.

Перед проведением полярографического анализа необходимо подобрать индифферентный фоновый электролит. Фон не должен разряжаться в исследуемой области потенциалов (рис. 10).

Проведению полярографических измерений мешает растворенный кислород, который восстанавливается. Растворенный кислород удаляют из раствора пропусканием через него инертного газа (азот, аргон). Полярограмма может искажаться появлением максимумов (I и II рода) в области той части кривой, которая соответствует началу предельного тока. Устранить максимумы можно добавлением в раствор различных ПАВ, например желатины.

Так как в полярографической лаборатории используются ртутные капаящие электроды и электроды сравнения с большой поверхностью ртути, следует помнить, что пары ртути опасны для организма. При соблюдении правил техники безопасности возможность заражения воздуха парами ртути сводится к нулю. Поэтому, перед началом работы необходимо пройти инструктаж по технике безопасности и ознакомиться с работой прибора.

Практическая часть.

Общие указания к выполнению лабораторных работ по электрохимическим методам анализа

- 1 Включить прибор за 15-20 минут до начала измерений.
- 2 Отсчет по шкале прибора производить несколько раз, повторив все операции компенсации до получения воспроизводимых результатов, результат измерения сразу записать в рабочий журнал.
- 3 Химические стаканы, в которых предстоит произвести измерения, должны быть предварительно тщательно вымыты водой.
- 4 Перед помещением электродов в раствор и после измерения его необходимо тщательно обсушить снаружи фильтровальной бумагой.
- 5 При приготовлении растворов необходимо строго следовать предлагаемой методике.
- 6 При приготовлении анализируемого раствора в мерной колбе его объем необходимо доводить до метки дистиллированной водой и тщательно перемешать.
- 7 Объемы растворов можно измерять пипеткой, мерным цилиндром, используя для каждого раствора свою пипетку или цилиндр.
- 8 Работать в лабораторном халате во избежание попадания химических веществ на одежду.

Работа № 14 Знакомство с устройством и работой приборов на примере рН метра рН-150

Цель – изучить строение и работу рН-метра рН-150.

Ход работы: 1 Назначение рН-метр рН-150 промышленный и лабораторный предназначен для оперативного определения активности ионов водорода рН, окислительно-восстановительного потенциала Еh и температуры технологических растворов природных и сточных вод (рис. 11). рН-метр применяется в стационарных и передвижных лабораториях предприятий и научно-исследовательских учреждений химической, металлургической, пищевой, фармацевтической и медико-биологической промышленности, агропромышленном комплексе.

К достоинствам рН-метра рН-150 относят:

- Портативность, быстрота отклика, универсальность, точность, простота использования и обслуживания.
- Возможность измерения рН непосредственно в точке контроля.
- Малые габаритные размеры и вес.
- Автономное питание.
- Широкий диапазон рабочих температур.

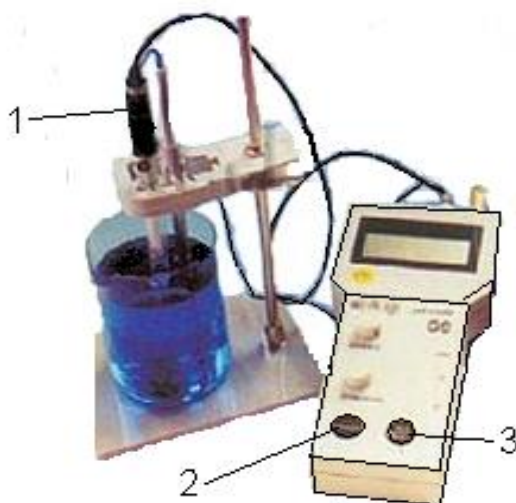


Рисунок 11 рН-метр рН-150

1- электроды, 2- кнопка переключения режимов измерения,
3- кнопка «сеть».

2 Устройство рН метра представлено на рисунке 11. Корпус рН метра имеет дисплей, где показаны параметры измерения, кнопку «сеть» (3) и кнопку переключения режимов (2). рН-метр имеет три режима измерения: рН, температуры и окислительно-восстановительного потенциала. рН-метр

оснащен двумя электродами 1: стеклянным рН-чувствительным и температурным.

Порядок работы

1. Включить рН-метр в сеть за 15 минут до начала работы.
 2. Перед началом работы промыть электрод дистиллированной водой.
 3. Погрузить электрод в исследуемый раствор на 1-2 минуты при постоянном помешивании раствора. Нажать кнопку измерение для перехода в режим рН на панели прибора.
 4. Нажать кнопку измерение для перехода в другой режим. Вытащить электрод из исследуемого раствора, промыть в дистиллированной воде, промокнуть фильтровальной бумагой.
 5. Погрузить электрод в раствор хранения.
 6. Выключить рН-метр.
- 3 Провести измерение стандартных рН-титров. Раствор стандартного титра взять у лаборанта. Измерить рН.
Сделать выводы.

Работа № 15 Исследование содержания уксусной кислоты в сточных водах.

Метод потенциометрического титрования основан на измерении равновесного потенциала индикаторного электрода, меняющегося в процессе титрования в зависимости от изменения состава раствора. В основу определения могут быть положены все типы аналитических реакций. При этом оказывается возможным вести определение в интенсивно окрашенных и мутных растворах, можно титровать микро- и макроколичества вещества. В отличие от прямой потенциометрии в этом методе можно использовать только индикаторные электроды с малым временем отклика, сопоставимым со скоростью титрования.

С другой стороны, в отличие от прямой потенциометрии в этом варианте отсутствует искажение результатов анализа за счет диффузионного потенциала и нет необходимости знать коэффициент активности определяемого иона.

Определение содержания уксусной кислоты основано на потенциометрическом титровании ее раствором гидроксида натрия. В

качестве индикаторного электрода используется стеклянный рН-чувствительный электрод.

Цель:

1. Ознакомление с методом потенциометрического титрования
2. Определение содержания уксусной кислоты в сточных водах.

Для работы необходимо: химические стаканы 200 мл- 2шт, рН-метр, раствор едкого натра (NaOH) 0.1 моль/л, уксусная кислота.

Ход работы:

Определение содержания уксусной кислоты В стакан вместимостью 200 мл вносят 100 мл образца сточной воды. В стакан опускают индикаторный стеклянный электрод и хлорсеребряный электрод сравнения, присоединенные к рН-метру. Проводят титрование раствором едкого натра. По ходу титрования регистрируют изменение рН при прибавлении каждой порции титранта. Результаты заносят в таблицу 3. Точку эквивалентности определяют по скачку рН, который наступает в интервале рН 7-8. При необходимости строят кривую титрования в координатах dE/dV для определения точки эквивалентности.

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

V (NaOH),мл	рНdE/dV

Расчет содержания уксусной кислоты производят по формуле:

$$C(к.)= V1*K*0,006*1000/V0,$$

где V1 - объем раствора NaOH, пошедший на титрование уксусной кислоты в анализируемом образце сточной воды, мл; K - поправочный коэффициент для пересчета концентрации взятого раствора NaOH на концентрацию; 0,006- количество уксусной кислоты, соответствующее 1 мл раствора гидроксида натрия с концентрацией 0,1 моль/л, г/мл; V0 - объем образца сточной воды, взятой для анализа, мл.

Установление поправочного коэффициента Для установления поправочного коэффициента в колбу добавляют 10 мл едкого натра и титруют его уксусной кислотой. Отмечают объем уксусной кислоты пошедшей на титрование V2. Коэффициент рассчитывают по формуле:

$$K=V2/10$$

Сделать выводы.

Работа № 16 Определение рН буферного раствора (Рингера) и наблюдение его способности удерживать рН при действии окружающей среды.

Плазма или сыворотка крови – жидкая часть крови, остающаяся после удаления форменных элементов и состоящая из растворенных в воде солей, белков, углеводов, биологически активных соединений, а также CO_2 и O_2 . Ионный состав плазмы: бикарбонаты, фосфаты, сульфаты, хлориды натрия, калия, кальция, магния, молочная и пировиноградная кислоты.

Согласно правилу Гэмбла плазма крови должна быть электронейтральна, т.е. сумма катионов равна сумме анионов. Ионный состав крови является важнейшим показателем гомеостаза организма: отклонение приводит к развитию патологических явлений, т.к. ионы обеспечивают нормальную функцию всех клеток организма, а также обеспечивают необходимое организму осмотическое давление, концентрацию в крови и тканях водородных ионов (рН). рН существенно влияет на ферментативную деятельность, на физико-химические свойства биомолекул. В норме рН внутри клетки равна - 7.0, внеклеточной жидкости – 7.4, артериальной крови – 7.4, венозной крови – 7.35.

Цель - измерить рН раствора Рингера для холоднокровных животных, наблюдать его способность удерживать рН.

Для работы необходимо: рН метр, дистиллированная вода, колба, химические стаканы, мерные цилиндры, весы, гирьки, растворы NaCl - 1 моль/л, CaCl_2 , KCl , Na_2HPO_4 – 2 моль/л, раствор HCl 0.1н, NaHCO_3 .

Ход работы:

Приготовление раствора Рингера. Для приготовления раствора Рингера в колбу объемом 1 л добавляют 118 мл раствора NaCl , 2 мл — CaCl_2 , 5 мл - KCl , 0.5 мл — Na_2HPO_4 . Содержимое колбы доводим до метки дистиллированной водой. Приготовить 0.1% раствор пищевой соды.

Измерение рН раствора По заданию преподавателя группа делится на две части. Из колбы забираем два стакана по 100 мл полученного раствора. Измеряем рН каждого раствора согласно инструкции. Пробу из стакана № 1 изменяем в щелочную сторону. Пробу из стакана № 2 изменяем в кислую сторону. Результаты заносят в таблицу 5.

Сделать выводы.

Таблица 5

рН раствора Рингера	Объем питьевой соды, мл	рН раствора Рингера	Объем соляной кислоты, мл
	0		0
	0.25		0.25
	0.5		0.5
	1		1

Контрольные вопросы:

1. В каких случаях целесообразно использовать метод потенциометрического титрования?
2. Какие преимущества и недостатки имеет этот метод по сравнению с прямой потенциметрией и с титрованием с визуальной фиксацией конечной точки?
3. Как подбираются электроды для потенциометрического титрования?
4. Какие методы определения конечной точки титрования используются в потенциометрическом титровании?
5. Уравнение диффузионного тока (уравнение Ильковича).
6. Принцип полярографии. Характеристики полярограммы. Применение в биологии и медицине.
7. Максимумы I и II рода в полярографии. Причины возникновения и устранения максимумов.
8. Электрохимические методы анализа. Классификация.
9. Кондуктометрия.
10. Кулонометрия.

4 ХРОМАТОГРАФИЯ

Хроматография – методы разделения и анализа смеси веществ, основанные на различной сорбции компонентов анализируемой смеси (подвижной фазы) определенным сорбентом (неподвижной фазой). В зависимости от строения разделяемые компоненты в различной степени удерживаются той или другой фазами, поэтому они могут быть отделены друг от друга.

Хроматографические методы занимают видное место для разделения, анализа и исследования свойств химических соединений. Отличительной особенностью хроматографических методов анализа являются: высокая эффективность, простота эксперимента, селективность, экспрессность, возможность автоматизации в сочетании с другими физико-химическими методами. Особая ценность этих методов заключается в том, что с помощью хроматографии возможно разделение соединений с близкими свойствами.

В 1903 г. русский ботаник Цвет М.С. опубликовал работу «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу», положившей начало хроматографии.

Сущность метода по Цвету:

«При фильтрации смешанного раствора через слой адсорбента пигменты рассматриваются в виде отдельных различно окрашенных зон. Подобно световым лучам в спектре различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступны качественному определению. Такой расцветенный препарат я называю хроматограммой, а соответствующий метод анализа хроматографическим...»

Так как Цвет пропускал исследуемый раствор через столб адсорбента, находящегося в стеклянной трубке, этот метод был назван колоночной хроматографией.

В 1938 г. Измайлов Н.А. с сотрудниками предложил проводить разделение смеси веществ на пластинке, покрытой тонким слоем адсорбента – тонкослойная хроматография, позволяющая проводить микроанализ биологических веществ. Она основана на различии скоростей перемещения компонентов анализируемой пробы в плоском тонком слое сорбента при движении по нему растворителя (элюента) под действием капиллярных или гравитационных сил. Разделение в этом методе осуществляется посредством многократного пересечения молекулами вещества границы фаз, т.е. вследствие многократного повторения акта распределения вещества между ПФ и НФ. ПФ – подвижная фаза, НФ – неподвижная фаза (сорбент). Ее разновидность – бумажная хроматография.

Распределительная хроматография (1945 г.) основана на различии в распределении компонентов пробы между двумя компонентами системы, содержащей не смешиваемые жидкие фазы – подвижную фазу и неподвижную, которая нанесена на твердый носитель. Компоненты смеси распределяются между жидкими фазами в соответствии с их сродством к этим фазам.

В настоящее время одним из важнейших направлений хроматографии является ионообменная, которая была предложена в 1947 г. Она основана на различной способности разделяемых ионов к ионному обмену с ионитом – специальным веществом, которое вводится в НФ, превращая ее тем самым в ионообменник.

Любые варианты хроматографии, как бы они внешне не отличались друг от друга, имеют общий принцип: распределение компонентов смеси между двумя фазами, одна из которых неподвижна и имеет развитую поверхность (НФ), а другая (ПФ) – поток, фильтрующийся через неподвижный слой.

4.1 Уравнение Ленгмюра.

Фактическое количество адсорбированного вещества (газа) твердым телом является сложной функцией различных параметров, таких как площадь твердой поверхности, число активных центров на единицу площади, прочность связи вещества с твердой поверхностью, температура и т.д.; поэтому количество адсорбированного вещества (x) на один грамм твердого адсорбента (m) характеризующих адсорбцию ($x/m = a$). Эту величину обычно относят к концентрации вещества при помощи эмпирических соотношений, таких как изотерма Ленгмюра. Изотермы адсорбции – это графическая зависимость адсорбции от концентрации при постоянной температуре (уравнение Ленгмюра). Теоретически легче описать адсорбцию паров на твердой поверхности.

$$a = \frac{z \cdot w \cdot c}{1 + w \cdot c} \quad (14)$$

где a – адсорбция; z, w– экспериментальные величины, характеризующие адсорбционную способность поглотителя сорбента по отношению к данному газу; c – концентрация газа.

Если $c \ll 1$, то $a = z \cdot w \cdot c = K \cdot c$, т.е. получаем уравнение прямой, выходящей из начала координат (рис 9).

$$a = \frac{z \cdot w \cdot c}{w \cdot c} = z$$

Если $c \gg 1$, то $a = \frac{z \cdot w \cdot c}{w \cdot c} = z$, то получаем уравнение прямой, параллельной оси абсцисс.

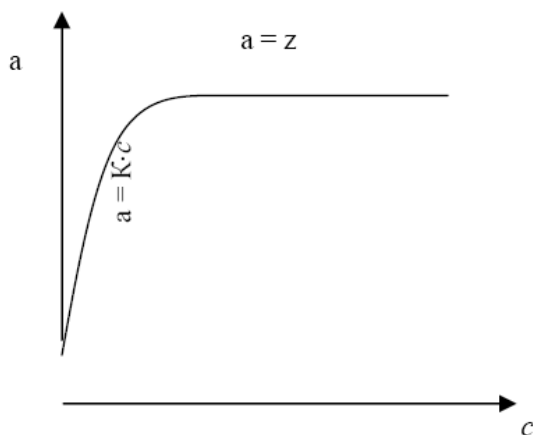


Рисунок 12 Изотерма адсорбции

То есть при малых концентрациях адсорбция прямо пропорциональна концентрации; при больших концентрациях – она является постоянной величиной, так как происходит насыщение поверхности адсорбента.

На практике встречаются три типа изотерм адсорбции: выпуклая, вогнутая и линейная. Каждому адсорбенту присуща своя изотерма, т.е. она является основной характеристикой адсорбционной способности поглотителя.

4.2 Классификация хроматографических методов

В основе классификации хроматографии следующие критерии:

- агрегатное состояние фаз;
- природа элементарного (единичного) акта взаимодействия, т.е. механизм разделения;
- аппаратное оформление процесса;
- способ относительного перемещения фаз;
- конечная цель процесса.

Рассмотрим каждый из перечисленных вариантов более подробно.

1 Агрегатное состояние фаз. Обычно, данный критерий является основным, так как природа элементарных актов сорбции-десорбции на твердой и жидкой фазах принципиально различна. В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы (ПФ) различают жидкостную (ЖХ) и газовую хроматографию (ГХ).

В ЖХ роль неподвижной фазы (НФ) обычно играет сорбент, а в качестве ПФ используется растворитель (элюент). В этом случае процесс разделения в значительной степени определяется составом ПФ, в качестве которой используются различные вещества, при этом для каждого случая необходимо подбирать подходящую систему разделения.

В ГХ в качестве носителя пробы – ПФ – выступает газ, а в основе – процессы распределения между фазами и процессы адсорбции, поэтому ГХ делится на адсорбционную (НФ – твердое вещество) и жидкостную (НФ – жидкость). Свойства газа-носителя имеют второстепенное значение для процесса разделения, так как он служит только для перемещения разделяемой смеси.

2 Природа элементарного (единичного) акта взаимодействия. Известно несколько вариантов единичного акта взаимодействия исследуемой среды с веществами НФ и ПФ.

- Адсорбция разделяемых веществ на поверхности сорбента. Она различна и является основой адсорбционной хроматографии.

- Различия в растворимости веществ. Этот вариант реализуется при использовании жидкой НФ. Элементарный акт взаимодействия, при этом, как правило, является актом растворения компонентов пробы в растворителе (жидкая фаза) и разделении их между ПФ и НФ в соответствии с коэффициентами распределения.

- Водородная связь или химическое сродство компонентов вещества пробы с материалом НФ. Разделение при этом происходит за счет химического взаимодействия с образованием мало растворимого осадка (хемосорбционная, или осадочная хроматография).

3 Аппаратурное оформление (техника выполнения).

По способу размещения НФ различают колоночную (наиболее распространенную) и плоскостную (на бумаге или тонком слое сорбента) хроматографию.

Способ размещения НФ в значительной степени определяет конструкцию хроматографа – прибора, в котором протекает процесс разделения пробы. Результатом выполнения исследования является хроматограмма – графическая запись, отражающая информацию о выделенных компонентах (чаще всего – в виде пиков, амплитуда которых пропорциональна количественному соотношению компонентов).

Метод колоночной жидкостной хроматографии впервые был предложен в 1906 г. как метод разделения смеси веществ. Неподвижную фазу помещают в колонку, затем вносят в нее анализируемую смесь (пробу) и элюируют соответствующим растворителем (ПФ). При продвижении по колонке компоненты смеси по-разному удерживаются сорбентом в зависимости от их физико-химических свойств и, следовательно, перемещаются с разной скоростью. На выходе колонки разделяемые вещества появляются в

определенной последовательности и могут быть собраны в виде отдельных фракций.

Колоночная газовая хроматография является методом разделения летучих веществ: газов (при нормальной температуре) или паров (при повышенной температуре). В качестве НФ используются твердые материалы (насадочные или набивные колонки); твердые материалы, покрытые слоем жидкости, или же капилляры с нанесенным на внутреннюю поверхность слоем жидкости (капиллярные колонки). В качестве ПФ используют газ-носитель, переносящий разделяемые вещества через колонку. Разделение анализируемой смеси осуществляется за счет различного времени удерживания компонентов пробы в неподвижной фазе.

Основные группы органических веществ, которые могут быть определены этим методом: газы, летучие жидкие соединения, жидкие аэрозоли. Жидкостная и газовая хроматография отличаются свойствами ПФ – в газовой хроматографии газ-носитель обладает высокой скоростью диффузии и способностью сжиматься.

4 Способ относительного перемещения фаз. В зависимости от характера перемещения сорбирующихся веществ вдоль слоя сорбента различают проявительный (элюентный), фронтальный и вытеснительный варианты хроматографического процесса.

5 Конечная цель процесса. Хроматографию можно рассматривать как гибридный метод, в котором технологический процесс представляет собой часть аналитической системы, сочетающей разделение и измерение. В связи с этим сам хроматографический процесс может использоваться либо в технологических задачах, связанных с получением материальных продуктов (препаративное применение), либо для получения информации о качественном и количественном составе и физико-химических свойствах исследуемых объектов (аналитическое применение). В последнем случае хроматография может применяться в сочетании с другими физико-химическими методами.

Работа №17 Ознакомление с устройством хроматографа типа АГАТ.

Цель - ознакомиться с устройством лабораторного хроматографа АГАТ.

Внимательно прочитать инструкцию к прибору и технику безопасности для работы с хроматографом АГАТ.

ВНИМАНИЕ! К работе с прибором допускаются лица освоившие технику безопасности, включение прибора и основную работу на нем выполняет преподаватель или старший лаборант.

Контрольные вопросы

- 1 Расскажите об истории хроматографического метода.
- 2 Что такое десорбция; сорбция.
- 3 Уравнение Ленгмюра. Изотерма.
- 4 Применение хроматографических методов в биологии и медицине.
- 5 Критерии классификации хроматографических методов. Классификация по технике выполнения.
- 6 Классификация хроматографии по агрегатному состоянию фаз.
- 7 Классификация по природе единичного акта взаимодействия.
- 8 Строение хроматографа АГАТ. Основные детали.
- 9 Что такое адсорбция и абсорбция.

Список использованной литературы

1. Агаджанян Н.А., Телль Л.З., Циркин В.И., Чеснокова С.А. Физиология человека Учебник М.:«Лениздат» 2000,
- 2 Ноздрачев А.Д, Баженов Ю.И., Баранникова И.А., Батуев А.С. Начала физиологии Учебник для вузов. СПб.: Изд-во «Лань» 2001 – 1088с
- 3 Вавилов С. И., Собрание сочинений, т, 2, М., 1952, с. 20, 28, 29;
- 4 Левшин В. Л., Фотолюминесценция жидких и твердых веществ, М. — Л., 1951
- 5 Баренбойм Г.М., Доманский А.В., Туроверов К. К. Люминесценция биополимеров и клеток. Л., “Наука”, 1966.
- 6 Мецлер Д. Биохимия, тт. 1–3. М., 1980
- 7 Марри Р., Греннер Д., Майес П., Родуэлл В. Биохимия человека, т. 2. М., 1993
- 8 Садименко Л.П. Методическое пособие к практическим занятиям по аналитической химии. Количественный анализ. Часть 2. Полярографический метод анализа. - Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 2004. - 11 с.
- 9 Асатиани В.С. Биохимическая фотометрия. Изд. АН СССР 1968, 835с.
- 10 Лебедева, М.И. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа: учебное пособие. Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2005. 216 с.
11. Зенин Г.С. под ред. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа. Методические указания к выполнению лабораторных работ СПб., СЗТУ, 2002-100с

12. Битуева А.В., Мангутова Е.В., Методические указания к выполнению работ по курсу «Современные методы исследований в биохимии» Улан-Удэ: Изд-во ВСТГУ 2006-74с.
13. Неменова Ю.М., Крючкова Г.М., Любина А.Я., Полеев М.Э. Практикум по технике лабораторных работ Москва Изд-во «Медицина» 1965-208с.
14. Трошина В.А. Растворы Учебно-методическое пособие Москва Изд-во МГУ 1980-79с.
15. Литвин Ф.Ф. Практикум по физико-химическим методам в биологии. Москва Изд-во МГУ: 1981 – 240с. с ил.

Темы рефератов

1. Конфокальный микроскоп. Строение. Применение в биологии и медицине.
2. ИК спектрометрия. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
3. Атомная абсорбция. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
4. Рентгеновская спектрометрия. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
5. Рентгенофлуоресцентный анализ. Теоретические основы. Строение. Применение в биологии и медицине.
6. Пламенная фотометрия. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
7. Рефрактометрия. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
8. Поляриметрия. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
9. Лазеры. Теоретические основы. Приборы, применяемые в биологии и медицине.
10. Газовый анализ. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
11. Вольтамперометрия. Виды. Теоретические основы. Применение в биологии и медицине.
12. Применение ионселективных электродов в биологических исследованиях.
13. Ультрацентрифугирование. Применение в биологии и медицине.

Вопросы для зачета

- Физические и физико-химические методы анализа. Особенности их использования в биологических исследованиях.

- Особенности работы в лаборатории. Химическая посуда. Весы.
- Растворы. Расчет концентраций.
- Классификация физико-химических методов.
- Оптические методы. Фотометрический (абсорбционный) анализ.
- Закон Бугера-Ламберта-Бера и причины отклонения от него.
- Спектр поглощения. Фотоколориметрический метод анализа.
- Спектрофотометрический метод анализа и его преимущество.
- Чувствительность и точность фотометрического анализа. Определение оптимальных условий.
- Метод дифференциальной спектрофотометрии (фотоколориметрии).
Использование фотометрического анализа в биохимических исследованиях.
- Люминесцентный (флуоресцентный) анализ.
- Теоретические основы люминесцентного метода.
- Люминесцентная микроскопия.
- Конфокальный микроскоп.
- Применение люминесцентного анализа в физиологии и медицине.
- Электрохимические методы анализа.
- Потенциометрический метод. Общая характеристика метода и его использование в биологических исследованиях.
- Аппаратура и техника потенциометрии: электроды (редоксэлектроды, ионоселективные и электроды сравнения).
- Полярографический метод. Теоретические основы метода. Схема полярографической установки. Особенности и область применения метода.
- Кондуктометрический метод исследования. Аппаратура для измерения электропроводности и теоретические основы метода.
- Хроматография. Теоретические основы метода. Классификация.
- Электрофорез. Теоретические основы.
- Вискозиметрия белков.