

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ АНАЛИЗА
ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

Методические указания для вузов

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета
2008

Утверждено научно-методическим советом химического факультета
7 февраля 2008 г., протокол № 3

Составители: С.И. Карпов, В.Ф. Селеменев, М.В. Матвеева, Н.А. Беланова

Рецензент д-р хим. наук, профессор Г.В. Шаталин

В методических указаниях представлены теоретические основы качественного и количественного определения органических веществ с использованием физико-химических методов анализа: хроматографии (ГЖХ, ВЭЖХ, ТСХ), спектральных методов (спектрофотометрии, ИК-спектроскопии); рассмотрены некоторые теоретические аспекты хроматографии, касающиеся основных параметров удерживания и эффективности разделения компонентов анализируемой смеси. Основное внимание уделяется описанию выполнения лабораторных работ, посвященных рассмотрению приемов и методов идентификации, качественному и количественному анализу органических веществ методами ГЖХ, ВЭЖХ, ТСХ, спектрофотометрией (УФ-, вид-), ИК-спектроскопией.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов 5 курса вечернего отделения химического факультета и составлено в соответствии с программой спецкурса «Физико-химические методы анализа органических соединений», читаемого на кафедре аналитической химии Воронежского государственного университета.

Для специальности: 020101 – Химия

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
1. Хроматографические методы анализа	5
1.1. Классификация хроматографических методов	6
1.2. Колоночная хроматография	7
1.2.1. Теоретические основы газовой хроматографии	7
1.2.2. Теоретические основы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)	8
1.2.3. Параметры удерживания и основные характеристики разделения веществ в колоночной газовой и жидкостной хроматографии	9
1.3. Плоскостная хроматография	12
1.3.1. Стадии хроматографического процесса, материалы и реагенты, применяемые в плоскостной хроматографии	12
1.3.2. Основные характеристики разделения веществ в плоскостной хроматографии.....	14
2. Спектральные методы анализа	18
2.1. Спектральные параметры полосы поглощения	19
2.2. Молекулярная абсорбционная спектроскопия в видимой и УФ-области электромагнитных излучений	22
2.2.1. Характеристика спектрофотометрического определения..	22
2.2.2. Оптимальные условия фотометрического определения	23
2.2.3. Количественный анализ абсорбционными методами	26
2.3. Инфракрасная спектроскопия	28
2.3.1. Некоторые характеристики молекулярных спектров	28
2.3.2. Колебания двухатомной молекулы	30
2.3.3. Групповые частоты и интерпретация спектра	33
3. Практическая часть	36
Работа № 1. Нанесение неподвижной жидкой фазы на твердый носитель и заполнение колонки	36
Работа № 2. Определение оптимальной скорости потока газаносителя	42
Работа № 3. Определение содержания примесей в толуоле	44
Работа № 4. Идентификация органических соединений по индексам Ковача	49
Работа № 5. Определение микроколичеств ацетона в водопроводной воде	55
Работа № 6. Получение изотерм сорбции спиртов методом Глюкауфа	58

Работа № 7. Качественное и количественное определение примесей салициловой кислоты в ацетилсалициловой кислоте (аспирине) методом обращено-фазовой ВЭЖХ	63
Работа № 8. Разделение и идентификация дикарбоновых кислот методом ТСХ в водно-органических подвижных фазах	66
Работа № 9. Определение содержания примесей в препаратах лекарственных веществ по данным ТСХ	68
Работа № 10. Качественное и количественное определение флавоноидов методом ТСХ	72
Работа № 11. Спектрофотометрическое определение содержания никотиновой кислоты в препарате	76
Работа № 12. Спектрофотометрическое определение содержания цианкобаламина для инъекций (витамина В12)	79
Работа № 13. Определение подлинности веществ по ИК-спектрам образцов, диспергированных в бромиде калия	82
Работа № 14. Идентификация веществ по ИК-спектрам образцов в виде суспензии в вазелиновом масле	87
Работа № 15. Количественный анализ смеси изомеров ксилола по ИК-спектрам	89
Список использованной литературы	92

ВВЕДЕНИЕ

Использование физических явлений занимает одно из ведущих мест в анализе химических систем. Сегодня каждый, кто связан с химией или изучает состав вещества, обязан хорошо ориентироваться в физико-химических методах анализа. Можно выделить ряд методов, используемых в аналитической химии. Хроматографические, спектральные методы используют в большинстве научно-исследовательских лабораторий контроля качества производства. Следует отметить огромный интерес и практическое применение этих методов в различных областях деятельности человека и протекания хроматографических и оптических процессов в природе. Достаточно лишь перечислить области применения: *анализ загрязнений окружающей среды, анализ пищи, лекарств, клинический анализ, токсикологическое и судебное применение* и др.

Место хроматографии в области молекулярного анализа органических соединений. Хроматография преобладает над другими методами разделения, не заменяя их. Об этом свидетельствуют данные проведенного в США опроса об использовании различных аналитических приборов в 3000 исследовательских центрах [1]. Хроматографические приборы занимают одно из первых мест как по степени использования, так и по росту потребности в них.

Однако проведение любого хроматографического анализа часто сопряжено с другими физико-химическими методами анализа. Оптические методы позволяют проводить качественное и количественное определение вещества. Для всестороннего анализа вещества на подлинность, наличие примесей количественное определение предполагает применение различных физико-химических методов. Чтобы охарактеризовать любое химическое соединение, необходимо знать его оптические свойства, способность к распределению и адсорбции на различных материалах, а также возможность его выделения. Следует подчеркнуть, что хроматографические, оптические методы (спектрофотометрия (УФ-, вид-), ИК-спектроскопия и др.) не конкурируют между собой, а гармонично дополняют друг друга.

1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

В 2003 г. исполнилось 100 лет с момента открытия одного из наиболее плодотворных методов исследования состава сложных многокомпонентных смесей веществ – *хроматографии*. Это открытие принадлежит русскому ботанику М.С. Цвету, который впервые не ограничился простым наблюдением явлений адсорбции растительных пигментов на порошкообразных адсорбентах, но понял, что в этих простых опытах перед ним приоткрылась завеса неизвестности, за которой поистине необозримые возможности изучения состава и свойств самых разнообразных веществ.

Впервые термины «хроматографический метод» и «хроматограмма» появляются в двух статьях М.С. Цвета в 1906 г., что же касается термина «хроматография», то мы находим его в публикациях того же года [1].

«Хроматография (от греч. хроматос – цвет) – физический метод разделения, в котором разделяемые компоненты распределены между двумя фазами, одна из которых неподвижна (неподвижная фаза), в то время как другая (подвижная фаза) движется в определенном направлении» (терминология ИЮПАК, 1993 г. [2, 3]).

Однако хроматография является не только «физическим методом разделения». *Хроматографию можно определить как науку о методах разделения, а также качественного и количественного определения компонентов жидких и газообразных смесей, основанных на их различной сорбции (адсорбции, распределении и др.) в динамических условиях.* Динамические условия в простейшем случае создаются при движении анализируемой смеси компонентов (подвижная фаза) через слой сорбента (неподвижная фаза). Неподвижной фазой (НФ) в хроматографии могут быть твердые и жидкие сорбенты. Подвижной фазой (ПФ) – газ или жидкость, проходящие через хроматографическую колонку.

1.1. Классификация хроматографических методов

1. По агрегатному состоянию фаз.

Газовая хроматография – подвижная фаза (ПФ) является газом; газотвердофазная (неподвижная фаза (НФ) – твердое вещество), газожидкостная хроматография (неподвижная фаза – жидкость).

Жидкостная хроматография – подвижная фаза – жидкость; жидкость – твердофазная хроматография (неподвижная фаза – твердый сорбент), жидкость – жидкостная хроматография (неподвижная фаза – жидкость).

2. По форме неподвижной фазы.

Колоночная хроматография (КХ).

Планарная хроматография – неподвижная фаза нанесена на плоскость (бумажная хром. (БХ)), хроматография в тонких слоях (ТСХ).

3. По механизму сорбции.

Адсорбционная – поглощение твердым сорбентом за счет сил межмолекулярного взаимодействия.

Распределительная – различная растворимость в подвижной и неподвижной фазах.

Ионообменная – различия в электростатическом взаимодействии ионов с ионогенными группами сорбентов.

Осадочная – различие в растворимости разделяемых веществ.

Лигандообменная – различие в способности образовывать координационные соединения с определяемым компонентом.

Эксклюзионная – разделение, основанное на различии в размерах и формах молекул.

4. По способам проведения хроматографического процесса.

Фронтальная, вытеснительная, элюентная.

1.2. Колоночная хроматография

1.2.1. Теоретические основы газовой хроматографии

Газовая хроматография (ГХ) – метод разделения летучих соединений. Подвижной фазой в газовой хроматографии является газ или пар. В зависимости от состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на *газоадсорбционную*, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент, и *газожидкостную*, когда неподвижной фазой является жидкость, а точнее пленка жидкости на поверхности частиц твердого сорбента.

Газохроматографическими методами могут быть проанализированы газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой меньше 400, удовлетворяющие определенным требованиям: летучесть, термостабильность, инертность.

Газовая хроматография – один из самых современных методов многокомпонентного анализа. Его преимущества: экспрессность, высокая точность, чувствительность, автоматизация. ГХ относится к инструментальным методам анализа, так как для определения состава газовой фазы необходима не только хроматографическая система, но и достаточно сложная система термостатирования, детектирования.

Блок-схема хроматографа приведена на рис. 1.1.

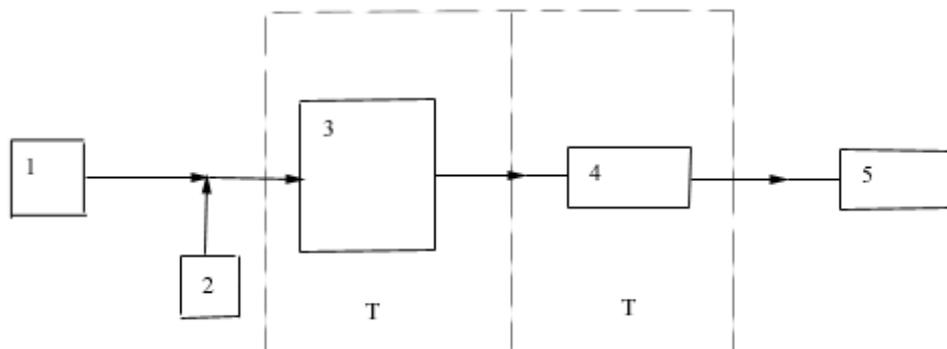


Рис. 1.1. Т – термостатируемые зоны

1. Система подачи газа-носителя (подвижная фаза). Чаще всего это газовый баллон с инертным газом – гелием, аргоном, азотом.

2. Дозатор-система ввода пробы. Представляет собой термостатированный испаритель, в который микрошприцем, шприцем или другим калиброванным устройством вводится заданный точный объем исследуемой смеси. Жидкие вещества, испаряясь, переходят в газообразную фазу, захватываются потоком газа-носителя и поступают в колонку (3).

3. Хроматографическая колонка – стеклянная или металлическая трубка диаметром от 2 до 4 мм и длиной от 0,5 до 10 м, заполненная сорбентом (насадочная колонка). Наряду с насадочными, используются микронасадочные (диаметр 0,8–1,5 мм) и капиллярные (диаметр 0,1–0,8 мм) колонки длиной до 100 м. В колонке происходит разделение компонентов смеси. Поскольку на сорбируемость веществ очень сильно влияет температура, колонки термостатируют.

4. Детектор – устройство, предназначенное для обнаружения изменений в составе газа, прошедшего через колонку. Показания детектора обычно преобразуются в электрический сигнал и передаются на регистрирующее устройство. Наиболее часто применяют детектор по теплопроводности (катарометр) и пламенно-ионизационный (ДИП), термо-ионизационный (ТИД), детектор электронного захвата (ЭЗД). Для регистрации стабильных, воспроизводимых результатов детектор термостатируют.

5. Регистратор – прибор, фиксирующий или записывающий электрический сигнал, поступивший с детектора. Чаще всего в качестве регистратора применяют самописец или интегратор, в современных модификациях приборов – ЭВМ.

Методом ГХ проводят качественный и количественный анализ, более подробно рассмотренный в работах № 1–6.

1.2.2. Теоретические основы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – колоночная или планарная жидкостная хроматография, в которой применяют сорбенты с размером частиц 3–10 мкм, в результате чего резко возрастает эффективность хроматографического разделения.

По полярности контактирующих фаз жидкостную хроматографию (как колоночную, так и планарную) условно разделяют на *нормально-фазовую* (НФХ) и *обращенно-фазовую хроматографию* (ОФХ).

Нормально-фазовая хроматография – жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная. К такому варианту хроматографии относится *жидкостно-адсорбционная хроматография* с силикагелем и оксидом алюминия в качестве НФ. Также к НФХ можно отнести распределительный вариант ВЭЖХ, в котором разделение смеси на компоненты осуществляется за счет различия их коэффициентов распределения между двумя несмешивающимися фазами – растворителем (подвижной фазой) и фазой на сорбенте (неподвижной фазой).

Обращенно-фазовая хроматография – жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза менее полярная, чем подвижная. Это вариант распределительной хроматографии, в котором используют сорбенты с привитыми неполярными (как правило, длинными алкильными или алкил-

силильными) группами и полярный растворитель (например, водно-метанольные, водно-ацетонитрильные смеси).

В ВЭЖХ порядка 70 % всех аналитических разделений проводят методом обращенно-фазовой хроматографии. Работа в режиме ОФХ характеризуется использованием неполярного сорбента и полярного элюента. Сорбентами являются силикагели с привитыми алкилсилильными группами различной длины (от C_2 до C_{22}) с прямой алкильной группой или с фенильными и дифенильными группами. Подвижные фазы (ацетонитрил, вода, спирты и их смеси), используемые в ОФХ, позволяют проводить детектирование в широком УФ-диапазоне, легко растворяют практически все важнейшие соединения, входящие в состав биологических объектов, лекарственных веществ и т. д.

Широкое применение находит ОФ ВЭЖХ при определении чистоты лекарственных препаратов, этому и посвящена работа № 7.

1.2.3. Параметры удерживания и основные характеристики разделения веществ в колоночной газовой и жидкостной хроматографии

Хроматограмма (рис. 1.2) – кривая, отображающая зависимость концентрации вещества в потоке ПФ на выходе из колонки, от времени с момента начала процесса (выходная кривая). Чаще пользуются элюентным (проявительным) методом. Выходная кривая представляется в форме пика (для одного вещества). Экспериментально измеряемыми в газовой и жидкостной хроматографии являются параметры [1–8], представленные на рис. 1.2.

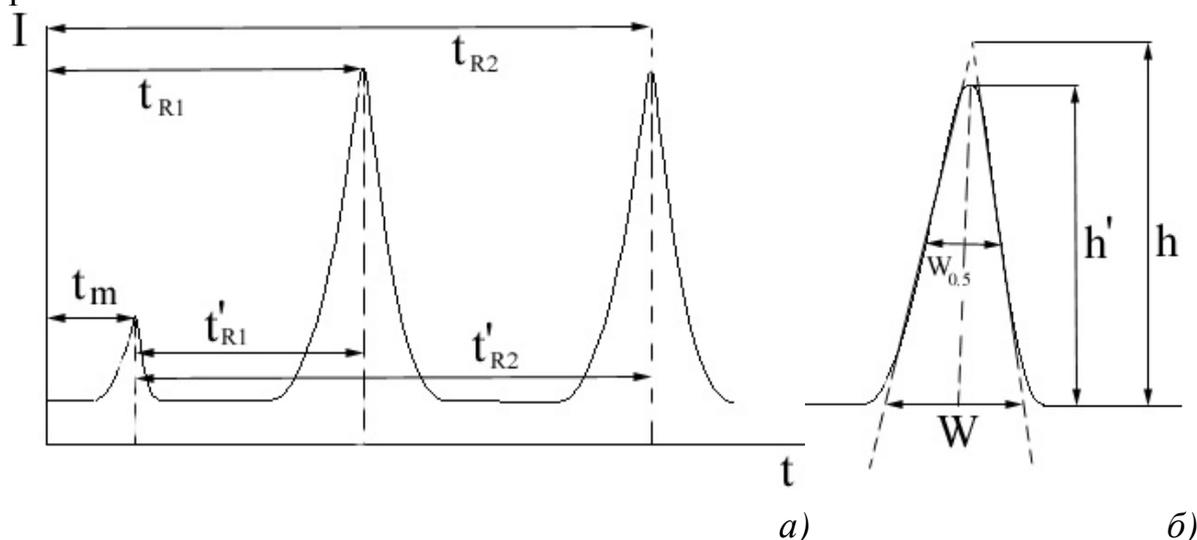


Рис. 1.2. Параметры удерживания веществ (а) и параметры хроматографического пика (б) в колоночной хроматографии

t_m – время прохождения несорбируемого компонента (мертвое время).

t_R – полное время удерживания компонентов – это время от момента ввода

пробы до момента появления на выходе из колонки максимальной концентрации зоны соответствующего вещества.

$$t'_{Ri} = t_{Ri} - t_m \quad (1)$$

– исправленное (приведенное) время удерживания.

Ширина пика (W) – длина сегмента, образованного нулевой линией и двумя касательными в точках перегиба пика – между двумя точками пересечения касательных в точке перегиба с нулевой линией.

Высотой пика считают либо величину h либо h' .

Удерживаемый объем V_R пропорционален времени удерживания t_R :

$$V_R = t_R U,$$

где U – объемная скорость ПФ.

Исправленный (приведенный) объем V'_R удерживания

$$V'_R = V_R - V_m$$

где V_m – объем подвижной фазы, необходимой для элюирования удерживаемого вещества, или мертвый объем.

Фактор удерживания (или коэффициент емкости) k_i представляет собой отношение количеств компонента i в неподвижной ($m_{i,s}$) и подвижной ($m_{i,m}$) фазах, который связан с характеристиками удерживания

$$k_i = t_{Ri}' / t_m$$

или $k_i = \frac{t_{Ri} - t_m}{t_m}.$

Отсюда

$$t_{Ri} = (1 + k_i)t_m \quad (2)$$

Это основное уравнение, характеризующее удерживание в хроматографии. Как видно из уравнений (1, 2), фактор удерживания можно определить из данных хроматограммы.

В практике газовой и жидкостной хроматографии удерживание двух соединений последовательно регистрируемых на хроматограмме характеризуют фактором разделения (α):

$$\alpha = \frac{V'_{R(2)}}{V'_{R(1)}} = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} = \frac{l'_{R(2)}}{l'_{R(1)}} = \frac{k_{(2)}}{k_{(1)}} \quad (3)$$

Фактор разделения α иногда называют селективностью. Численное значение α всегда больше единицы. Однако α не описывает действительного разделения двух хроматографических пиков. Существуют два параметра – это расстояние между пиками и их ширина. Они определяют, полностью ли разрешены (разделены) два хроматографических пика. Расстояние между пиками можно выразить как разность времен удерживания (Δt_R), а ширину пика у его основания W определяют как расстояние между каса-

тельными к направляющим пиков (рис. 1.2б). Разрешение (R_S) двух пиков определяется как

$$R_S = \frac{2(t'_{R(2)} - t'_{R(1)})}{(W_1 + W_2)} = \frac{\Delta t'_R}{(W_{0,5(1)} + W_{0,5(2)})}, \quad (4)$$

где $W_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты;

R_S – безразмерная величина;

$\Delta t'_R$ и W должны быть выражены в одних и тех же единицах.

Разрешение равно единице, если расстояние между двумя пиками равно средней ширине пика. При $R_S > 1$ пики должны быть разрешены. Однако полное разрешение может и не достигаться, если велика ширина пика у основания, т. е. велики размывающие эффекты. Степень размывания пика определяет эффективность колонки.

Эффективность в хроматографии – это способность системы «предотвращать» (ограничивать) размывание зон разделяемых веществ. Эффективность выражается числом теоретических тарелок N или высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ). Теоретическая тарелка (Т.Т.) – это участок слоя сорбента, на котором распределение вещества между двумя фазами завершается установлением равновесия. Число теоретических тарелок можно рассчитать по формуле:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad \text{или} \quad N \approx 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2, \quad (5)$$

где t_R – полное время удерживания или эквивалентное этой величине полное расстояние удерживания вещества – отрезок временной оси хроматограммы, соответствующий времени удерживания.

W и $W_{0,5}$ – ширина пика у основания и на половине его высоты соответственно (рис. 1.2б).

ВЭТТ – это высота слоя сорбента (колонки), необходимая для установления равновесия:

$$H = L / N, \quad (6)$$

где L – длина слоя сорбента.

Чем больше N и меньше H , тем выше эффективность колонки. ВЭТТ зависит от скорости потока подвижной фазы (U). Эту зависимость можно представить в виде кривой в координатах $H-U$, что позволяет определить минимальную ВЭТТ для данной хроматографической системы при некотором оптимальном значении скорости потока.

1.3. Плоскостная хроматография

1.3.1. Стадии хроматографического процесса, материалы и реагенты, применяемые в плоскостной хроматографии (ПХ)

К плоскостным относятся *бумажная* (БХ), в которой в качестве сорбента используется специальная бумага, и *тонкослойная хроматография* (ТСХ), в которой процессы разделения смеси веществ осуществляются в тонких слоях сорбента, нанесенного на инертную твердую подложку или в пленках пористого полимерного материала, а также *электрохроматография*.

Метод ТСХ составляет основу *скрининговых тестов* в химических, промышленных, клинических, фармацевтических, биохимических и биологических лабораториях.

Метод предложен в 1938 г. отечественными учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбером. Однако широкие возможности метода открыты позднее благодаря работам Ю. Кирхнера и Э. Шталя.

Анализ методом ТСХ включает следующие стадии:

- отбор и подготовка к анализу пробы;
- предварительная обработка пластины;
- подготовку хроматографической камеры;
- нанесение образца;
- хроматографическое разделение веществ;
- удаление элюента с пластины;
- детектирование компонентов,
- идентификация веществ и полуколичественный анализ.

Неподвижными фазами, применяемыми в ТСХ, служат те же материалы, что и в ВЭЖХ для разделений, основанных на адсорбции, распределении (нормально- или обращенно-фазовом), ионном обмене или эксклюзии. Сорбент (силикагель, оксид алюминия, целлюлоза, полиамиды, кизельгур) в виде мелко размолотых частиц размером 20 мкм наносится тонким слоем (200–300 мкм) на стеклянную, металлическую или полимерную пластину. В этом случае при развитии хроматограммы и ее длине 12 см достигается около 200 разделений.

Одной из важных задач, которые стоят перед исследователем, является правильный выбор *подвижной фазы (ПФ)*. В *нормально-фазовой* хроматографии (см. также раздел 1.2.2), как и в колоночном исполнении, с увеличением полярности растворителя элюирующая способность растет. Растворители при этом в меньшей степени сорбируются неподвижной фазой, поэтому коэффициенты распределения сорбируемых веществ между ПФ и НФ высокие. В *обращенно-фазовом* варианте с увеличением полярности растворителя элюирующая сила снижается.

Подвижная фаза, поднимающаяся по слою сорбента за счет действия капиллярных сил, взаимодействует с газовой фазой. Поэтому предвари-

тельно, до начала процесса хроматографирования, проводят *насыщение камеры* и слоя сорбента растворителем, находящимся в паровой фазе, т. е. достигается состояние равновесия подвижной фазы с газовой фазой. В обычной камере состояние насыщения достигается примерно через 5–10 мин для растворителя с температурой кипения ниже 100 °С. Для насыщения камеры высококипящим растворителем требуется несколько часов. Предварительное насыщение слоя сорбента любым чистым растворителем увеличивает скорость перемещения фронта растворителя по слою и уменьшает значения *хроматографической подвижности* R_f анализируемых веществ. Предварительному насыщению подвергаются как нормальные, так и обращенные фазы. При разделении веществ на нормальных (полярных) фазах для насыщения слоя сорбента предпочтительно использовать полярные составляющие многокомпонентных элюентов, а на ОФ – неполярные.

По способам хроматографирования различают *линейную, круговую и антикруговую* ТСХ. Наиболее широко используется *линейный* вариант хроматографирования. В этом случае пробы наносят на стартовую линию параллельно одной из сторон бумаги или пластины (см. работы № 8–10). Последние помещают вертикально в хроматографическую камеру, на дно которой налит элюент, и проводят *восходящую* планарную хроматографию (рис. 1.3а). Линейное развитие хроматограмм можно осуществлять и горизонтально с подачей элюента с одной или с двух сторон (рис. 1.3б). Можно также использовать *нисходящую* вертикальную ТСХ и БХ.

В *круговой* ПХ пробы наносят на некотором расстоянии от центра пластины по окружности, а элюент подают в центр (рис. 1.3в).

В *антикруговой* ПХ пробы наносят по окружности по периферии пластины и элюент подают в направлении к центру пластины (рис. 1.3г).

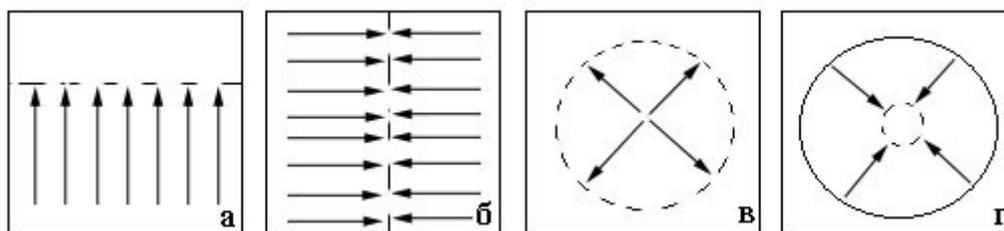


Рис. 1.3. Варианты хроматографирования в ПХ: а – линейное вертикальное; б – линейное горизонтальное; в – круговое; г – антикруговое

При нанесении проб на пластину для получения воспроизводимых результатов необходимо соблюдать ряд требований. Первоначально проводят разметку пластины, отмечая линию старта. Существенным является постоянство расстояния линии нанесения проб от края или центра пластины (обычно 1–2 см) и линии погружения пластины в элюент (около 0,5 см) в случае линейного варианта хроматографирования. Ширина

стартовой зоны на пластине должна быть по возможности минимальной, для ТСХ – 2–3 мм, для ВЭТСХ – 1 мм.

Для нанесения проб используют стеклянные или платиновопиридиевые капилляры, микропипетки, шприцы, а также специальные дозирующие устройства. В ТСХ объемы проб составляют 0,5–3,0 мкл, для ВЭТСХ ~ 200 нл. Для сохранения активности слоя адсорбента рекомендуется во время нанесения проб покрывать адсорбент выше линии нанесения стеклянной пластиной и наносить пробу по возможности быстро.

При проведении идентификации наиболее просто эта процедура выполняется при наличии собственной окраски у разделяемых веществ. Идентификация неокрашенных соединений может проводиться с применением специфических химических реагентов или инструментальных методов.

Идентификация по регистрации поглощения веществ в УФ-области или их собственной флуоресценции основана на введении в слой сорбента флуоресцирующих индикаторов (люминофоров), которые при облучении УФ-светом возбуждаются при такой длине волны, при которой детектируемые вещества поглощают. Они становятся хорошо видны в виде темных зон на зеленоватом светящемся фоне сорбента.

При детектировании *с помощью химических реагентов* используют универсальные реагенты (серная кислота, KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, фосфорномолибденовая кислота (ФМК)) и специфические – на индивидуальные соединения отдельных классов. Так, нингидрин используется для визуализации аминогрупп, хлорид железа (III) – для фенолов, комплексообразующие реагенты – для визуализации ионов металлов. Для опрыскивания пластин применяют пульверизаторы. При этом точность количественных определений зависит от качества детектирования. После визуализации разделенных веществ проводят обработку хроматограмм.

1.3.2. Основные характеристики разделения веществ в плоскостной хроматографии

Сорбционные свойства системы в ТСХ характеризуются *относительной скоростью перемещения (хроматографическая подвижностью) R_f* , которая рассчитывается из экспериментальных данных по уравнению:

$$R_f = \frac{l}{L}, \quad (7)$$

где l – расстояние от стартовой линии до центра зоны; L – расстояние, пройденное за это же время растворителем.

Наиболее общий подход к качественному анализу основан на значениях R_f . Хроматографическая подвижность является чувствительной характеристикой вещества, однако она существенно зависит от условий определения. Эта трудность преодолевается путем проведения опыта в строго фиксированных стандартных условиях, которые регламентируют размер пластин, толщину слоя сорбента, объем пробы, длину пути фронта раство-

рителя и другие факторы. При соблюдении стандартных условий получают воспроизводимые значения R_f , которые можно использовать в аналитических целях при сравнении с табличными, если они получены в тех же условиях опыта.

Самым надежным является метод свидетелей, когда на стартовую линию рядом с пробой наносятся индивидуальные вещества, соответствующие предполагаемым компонентам смеси. Влияние различных факторов на все вещества будет одинаковым, поэтому совпадение R_f компонента пробы и одного из свидетелей дает основания для отождествления веществ с учетом возможных наложений. Несовпадение R_f интерпретируется более однозначно: оно указывает на отсутствие в пробе соответствующего компонента.

По смыслу определения R_f как свойство, характерное для данной системы, не должно зависеть от концентрации и других факторов. Опыт показывает, однако, что воспроизводимость и постоянство значений R_f не всегда достаточны, особенно при анализе неорганических ионов. На R_f влияет качество и активность сорбента, его влажность, толщина слоя, качество растворителя и другие факторы, не всегда поддающиеся достаточному контролю. На практике часто пользуются относительной величиной – относительной подвижностью $R_{f, \text{отн}}$:

$$R_{f, \text{отн}} = \frac{R_{f, x}}{R_{f, \text{ст}}}, \quad (8)$$

где $R_{f, x}$ и $R_{f, \text{ст}}$ – подвижность определяемого и стандартного веществ соответственно.

Стандартное вещество (свидетель) в том же растворителе наносится на стартовую линию рядом с анализируемой пробой и, таким образом, хроматографируется в тех же условиях.

Как и в других вариантах хроматографии эффективность разделения в ТСХ определяется числом теоретических тарелок (N) и высотой, эквивалентной теоретической тарелке ВЭТТ (H), которые могут быть рассчитаны по уравнениям:

$$N = 16 \left(\frac{l_f}{w} \right)^2 = 16 \left(\frac{LR_f}{w} \right)^2, \quad (9)$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{w^2}{16 R_f L}, \quad (10)$$

где w – ширина зоны в направлении движения элюента. Величина H характеризует размытие хроматографической зоны, N – эффективность хроматографической пластины.

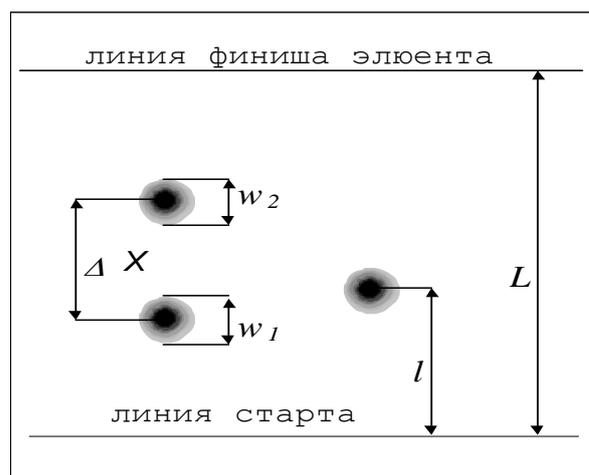


Рис. 1.4. Параметры удерживания веществ в ТСХ

Разрешение R_s (разрешающая способность) двух хроматографических зон определяется расстоянием между их центрами (ΔX), отнесённым к среднеарифметическому их ширины (w_1) и (w_2) (рис. 1.4):

$$R_s = \frac{2\Delta X}{w_1 + w_2}. \quad (11)$$

Коэффициент разделения в тонком слое K_f связан с числом теоретических тарелок и подвижностями R_f уравнением

$$K_f = \frac{R_{f,x1} - R_{f,x2}}{\sqrt{R_{f,x1}} - \sqrt{R_{f,x2}}} \sqrt{n}, \quad (12)$$

где $R_{f,x1}$, $R_{f,x2}$ – подвижности соседних компонентов смеси.

Теоретический анализ показывает, что при небольших значениях $R_{f,x1}$ и уменьшении длительности анализа размывание зоны вещества на сорбенте бывает минимальным, следовательно, концентрация вещества будет максимальна и чувствительность анализа увеличится. Уменьшение диаметра зерна в тонком слое приводит к увеличению продолжительности анализа и усиливает диффузное размывание.

Количественные определения в ТСХ могут быть сделаны или непосредственно на пластинке, или после удаления вещества с пластинки. При непосредственном определении на пластинке измеряют тем или иным методом площадь пятна (например, с помощью миллиметровой кальки) и по заранее построенному градуировочному графику находят количество вещества.

Применяют также прямое спектрофотометрирование пластинки с помощью фотоденситометров. Для количественных расчетов также предва-

рительно строят градуировочный график, используя оптическую плотность в центре пятна.

Наиболее точным считается метод, в котором вещество после разделения удаляется с пластинки и анализируется спектрофотометрическим или иным методом. Удаление вещества с пластинки обычно производят механическим путем, хотя иногда применяют вымывание подходящим растворителем.

2. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Среди физических методов при исследовании органических соединений, наряду с хроматографическими, наибольшее распространение получили спектральные методы. Наибольшую информацию можно получить при изучении взаимодействий вещества с электромагнитным излучением в широком интервале частот, начиная с радиоволн и заканчивая γ -лучами. При этом происходит изменение энергии молекул, которое определяется соотношением

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu, \quad (13)$$

где ΔE – изменение энергии системы; E_1, E_2 – энергии системы в различных состояниях; h – постоянная Планка; ν – частота излучения.

При помещении молекулы в электромагнитное поле поглощение происходит только в случае выполнения условия Бора (13).

При переходе из состояния E_1 в E_2 молекула поглощает энергию, при возвращении из состояния E_2 в E_1 – излучает ее с той же частотой.

Электромагнитный спектр охватывает огромную область длин волн или энергий. Основные области спектра, используемые в спектральном анализе:

Интервал длин волн	Участок спектра
$10^{-4} \dots 0,1$ нм, или $10^{-13} \dots 10^{-10}$ м	γ -излучение
$10^{-2} \dots 10$ нм, или $10^{-11} \dots 10^{-8}$ м	Рентгеновское излучение
$10 \dots 400$ нм, или $10^{-8} \dots 4 \cdot 10^{-7}$ м	Ультрафиолетовое излучение
$400 \dots 760$ нм, или $4 \cdot 10^{-7} \dots 7,6 \cdot 10^{-7}$ м	Видимый свет
$760 \dots 10^6$ нм, или $7,6 \cdot 10^{-7} \dots 10^{-3}$ м	Инфракрасное излучение
$10^{-3} \dots 1$ м	Микроволны, или СВЧ
$\lambda > 1$ м	Радиоволны

1 нм = 10^{-9} м.

Молекулярный спектральный анализ предполагает качественное и количественное определение состава пробы по спектрам поглощения и испускания. Энергию молекулы в первом приближении можно разделить на три составляющие, связанные с вращением молекул как целого, колебаниями образующих молекулу атомов и движением электронов в молекуле.

Молекулярные спектры очень сложны, находятся в различных областях длин волн (частот) и подразделяются на электронно-колебательные, колебательно-вращательные и вращательные. Расположены они обычно в области $10^5 - 8 \times 10^3$ см^{-1} (0,10–1,25 мкм); $8 \times 10^3 - 2,5 \times 10^2$ см^{-1} (1,25–40 мкм); $2,5 \times 10^2 - 20$ см^{-1} (40–500 мкм) соответственно и характери-

зуют электронные переходы в молекулах, а также колебательные переходы с изменением колебательных в вращательных состояниях молекулы.

Методы молекулярной абсорбционной спектроскопии основаны на измерении уменьшения интенсивности электромагнитного излучения, прошедшего через анализируемый образец. В зависимости от длины волны падающего света различают спектрофотометрию в ультрафиолетовой (УФ), видимой (вид) и инфракрасной (ИК) области электромагнитного излучения.

2.1. Спектральные параметры полосы поглощения

Полоса поглощения (рис. 2.1) характеризуется следующими величинами: ν_{max} – значение частоты в максимуме полосы (характеризует положение полосы в ИК спектре); I_λ — пиковая интенсивность (в максимуме), т. е. значение, соответствующее максимальному поглощению энергии, отн. ед.:

$$Q = \int_{\nu_1}^{\nu_2} I(\nu) \Delta \nu \quad \text{– интегральная интенсивность, соответствующая площади фигуры, ограниченной полосой поглощения в пределах } \nu_1\text{–}\nu_2, \text{ см}^{-1};$$

$\Delta \nu_{1/2}$ – полуширина полосы (ширина максимума поглощения на половине максимальной высоты).

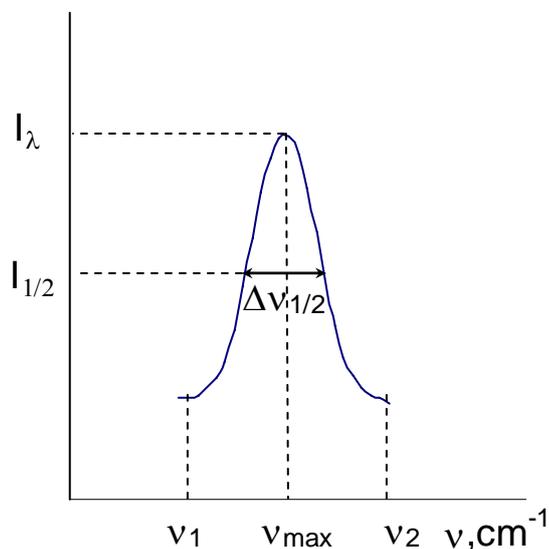


Рис. 2.1. Контур полосы поглощения

При изменении структуры молекулы в спектре наблюдается не только смещение ν_{max} , но и изменение величины $\Delta \nu_{1/2}$.

Физический смысл спектральных величин: ν_{max} – частота света при переходе с одного уровня на другой, см^{-1} ; Q – интегральная интенсивность,

пропорциональная вероятности данного перехода. Чем больше Q , тем более вероятен переход электронов с одного уровня на другой.

Зависимость интенсивности прошедшего через вещество света (с определенным значением длины волны) от концентрации вещества в пробе (если концентрация вещества выражается числом молей в дм^3 (моль/л)) и толщины слоя описывается математическим выражением, установленным опытным путем:

$$dI = -\epsilon c I dl \quad (14)$$

или после интегрирования от нуля до l как

$$I_\lambda = I_{0\lambda} \cdot e^{-k_\lambda lc}, \quad (15 \text{ а})$$

формулируемым как закон Бугера – Ламберта – Бера, где I_λ и $I_{0\lambda}$ – интенсивность прошедшего и падающего излучений, отн. ед.; k_λ – показатель поглощения при данной длине волны (поглощающая способность вещества); c – молярная концентрация вещества, моль/л; l – толщина слоя образца, см.

Подстрочный индекс λ обычно опускают, предполагая проведение определений при данной длине волны.

Записав выражение (15) в логарифмической форме, получим:

$$\ln(I_0/I) = kcl. \quad (15б)$$

При переходе к десятичным логарифмам уравнение (15а) примет вид

$$I = I_0 10^{-\epsilon lc}, \quad (16)$$

где ϵ – показатель поглощения света (молярный коэффициент экстинкции), рассчитанный на единицу концентрации вещества и на единицу толщины слоя (константа, не зависящая от интенсивности падающего света и концентрации вещества, но зависящая от длины волны падающего света). Соотношение между константами k и ϵ составляет $\epsilon = 0,4343 k$.

Закон Бугера – Ламберта – Бера, записанный в форме уравнения (16), в аналитической химии применять неудобно, так как нет удобного способа измерения I и I_0 с одной стороны, и выражение имеет степенную зависимость от концентрации вещества.

Чтобы учесть потери света на отражение и рассеивание, сравнивают интенсивность света, прошедшего через исследуемый раствор (I), с интенсивностью света, прошедшего через кювету с растворителем (I_0). Отношение светового потока, прошедшего через вещество, к потоку, упавшему на вещество I/I_0 , называют коэффициентом пропускания (или просто пропусканием):

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \% \quad (17)$$

Величину отношения потока излучения, поглощенного данным веществом, к потоку излучения, упавшего на него $(I_0 - I)/I_0 = 1 - T$, называют коэффициентом поглощения (или поглощением), а величину, обратную логарифму пропускания, – оптической плотностью вещества. Таким образом,

$$A = -\lg T / 100 = -\lg I / I_0 = \lg I_0 / I, \quad (18a)$$

$$A = \varepsilon l c. \quad (18b)$$

При подчинении растворов закону поглощения наблюдается прямолинейная зависимость оптической плотности от концентрации вещества в растворе при постоянном значении l . Эта пропорциональность строго соблюдается только для монохроматических излучений (при определенной длине волны).

Если концентрацию c выражают числом молекул n в 1 дм^3 , то показатель поглощения k называют молекулярным показателем, относят к одной молекуле и обозначают через γ . Если концентрацию c выражают числом грамм-молей в 1 л раствора, то показатель поглощения k называют молярным коэффициентом поглощения и обозначают через ε ; его размерность – $\text{л} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$. Соотношение между коэффициентами γ и ε записывают следующим образом:

$$\gamma n = c\varepsilon, \quad \varepsilon/\gamma = n/c = 6,06 \cdot 10^{23}/1000 \approx 6 \cdot 10^{20} \text{ или } \varepsilon = 6 \cdot 10^{20} \gamma, \quad \gamma = 1,6 \cdot 10^{-21} \varepsilon.$$

Если вещество не имеет постоянного, точно известного состава и для него нельзя точно указать молярную массу, то в таких случаях принято использовать концентрацию C , которую выражают в мг/мл или в $\%$ ($1 \text{ мг/мл} \approx 0,1\%$), то показатель поглощения k называют удельным коэффициентом поглощения и обозначают E . Его размерность – $\%^{-1} \text{ см}^{-1}$. Основной закон светопоглощения в этом случае следует записать как

$$A = E l C. \quad (18b)$$

Закон аддитивности – важное дополнение к закону Бугера – Ламберта – Бера. Сущность закона заключается в *независимости поглощения индивидуального вещества от наличия других веществ, обладающих собственным поглощением, или безразличных к электромагнитному излучению*. Математическая запись может быть представлена в следующем виде:

$$A = \sum \varepsilon_i l c_i. \quad (19)$$

Для оценки степени поглощения анализируемого вещества проводят сравнение интенсивности излучения, прошедшего через испытуемый раствор с интенсивностью излучения, прошедшего через раствор, поглощение которого принимают равным нулю – раствор сравнения. В качестве растворов сравнения обычно используют растворитель, на основе которого приготовлен раствор с содержанием всех компонентов, за исключением определяемого вещества. Очень важно в этом случае поддерживать постоянство состава растворителя и избегать изменения положения максимума поглощения, а также молярного коэффициента поглощения вещества в зависимости от состава раствора.

2.2. Молекулярная абсорбционная спектроскопия в видимой и УФ-области электромагнитных излучений

2.2.1. Характеристика спектрофотометрического определения

Абсорбционная спектроскопия в видимой и УФ-областях – один из наиболее полезных для химиков методов количественного анализа. Важнейшими достоинствами спектрофотометрического и фотометрического методов являются следующие.

1. *Широта применения.* Многочисленные неорганические и органические вещества поглощают в видимой и УФ-областях, что делает возможным их количественное определение. Кроме того, многие непоглощающие соединения можно определять после превращения их в поглощающие путем соответствующей химической реакции.

2. *Высокая чувствительность.* Молярные коэффициенты поглощения обычно лежат в интервале 10^3 – $4 \cdot 10^3$; поэтому, как правило, можно определять концентрации в интервале 10^{-4} – 10^{-5} М; нижний предел иногда можно довести до 10^{-6} или даже 10^{-7} М путем соответствующих изменений в методике.

3. *Достаточно высокая избирательность.* При правильно выбранных условиях можно найти интервал длин волн, в которых определяемое вещество является единственным поглощающим компонентом в пробе. Более того, перекрытие полос поглощения можно иногда исключить, сделав дополнительные измерения при других длинах волн.

4. *Высокая точность.* Относительная ошибка при определении концентрации спектрофотометрическими и фотометрическими методами обычно лежит в интервале 1–3 %. Используя специальную технику, можно часто снизить ошибки до нескольких десятых процента.

5. *Простота и удобство.* Спектрофотометрические и фотометрические измерения на современных приборах выполняются легко и быстро. Более того, метод часто можно автоматизировать для выполнения серийных анализов. Поэтому абсорбционный анализ широко применяют для химических определений при непрерывном контроле загрязнения атмосферы и воды, а также промышленных процессов.

2.2.2. *Оптимальные условия фотометрического определения*

Выбор длины волны. Оптическую плотность рекомендуется измерять при длине волны, соответствующей максимуму поглощения, так как здесь наблюдается максимальное изменение оптической плотности на единицу концентрации, следовательно, можно ожидать строгого подчинения закону Бугера – Ламберта – Бера и меньшей погрешности из-за неточности при воспроизведении длины волны, установленной на приборе. Если в спектре имеется несколько полос, выбор останавливают на наиболее интенсивной, так как работа в области максимума позволяет обеспечить большую чувствительность определения. Плоские максимумы предпочтительнее, так как при этом меньше сказывается погрешность в установлении длины волны, чем в случае острых или круто спадающих участков кривой.

При выборе оптимальной длины волны в фотометрическом анализе ориентируются также на наибольшее различие поглощения аналитической формы и исходных реагентов (для окрашенных соединений) (рис. 2.2).

Толщина светопоглощающего слоя. Уравнение закона Бугера – Ламберта – Бера показывает, что чем больше толщина слоя (l), тем больше оптическая плотность, и, следовательно, тем больше при прочих равных условиях чувствительность определения. Однако бесконечно увеличивать толщину слоя (l) на практике невозможно: возрастают потери на рассеяние света, особенно при работе с растворами. Кюветы с толщиной слоя больше, чем пять сантиметров, для фотометрирования не применяются.

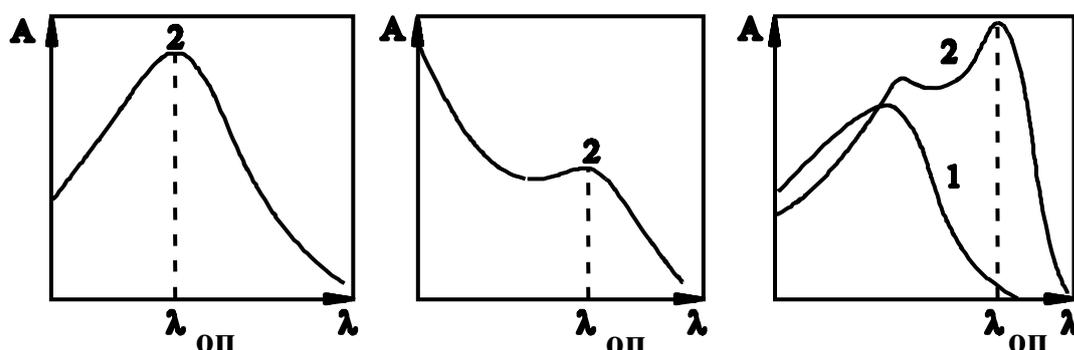


Рис. 2.2. Принцип выбора оптимальной длины волны при фотометрическом определении: 1 – поглощение исходного реагента; 2 – поглощение аналитической формы

Оптическая плотность (или пропускание). Измерительные устройства фотометрических приборов устроены таким образом, что абсолютная ошибка ΔT обычно имеет постоянную величину во всем интервале значений T . На рис. 2.3 показано, что при одной и той же погрешности ΔT абсолютная погрешность Δc существенно возрастает с увеличением концентрации раствора ($\Delta c_2 > \Delta c_1$, хотя $\Delta T_2 = \Delta T_1$).

Относительная ошибка $\Delta c/c$ будет уменьшаться с ростом концентрации и возрастать с увеличением абсолютной ошибки Δc . При каких значениях T относительная ошибка $\Delta c/c$ будет минимальна? Математически показано, что $\Delta c/c$ является функцией величины T (рис. 2.4). Относительная ошибка определения концентрации проходит через минимум при $T = 0,398$ ($A = 0,435$). Расчеты и опыты показали, что измерения растворов, имеющих $A > 2,0$ и $A < 0,03$, характеризуются большими погрешностями. Отсюда концентрация определяемого вещества должна быть такова, чтобы оптическая плотность раствора находилась в пределах $0,03 < A < 2,00$. Например, концентрация определяется: $c = \frac{0,435}{\epsilon_\lambda l}$. Если молярный коэффициент поглощения равен 10^3 , то при толщине светопоглощающего слоя $l = 1$ см

$$c = \frac{0,435}{10^3 \cdot l} = 4,35 \cdot 10^{-4} \text{ М.}$$

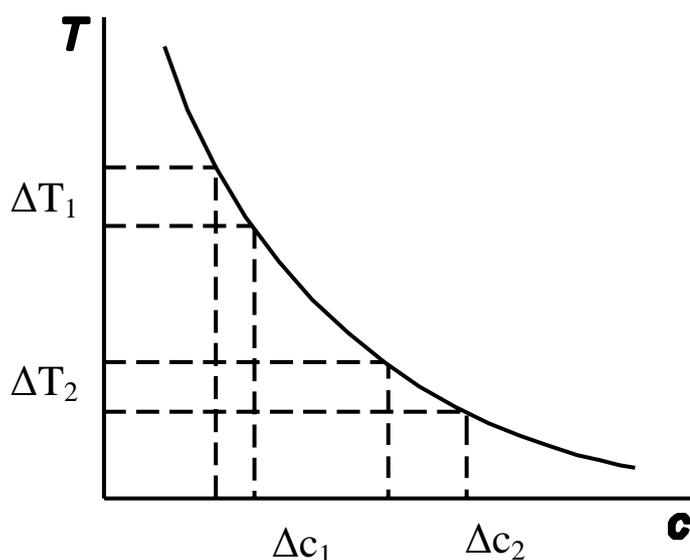


Рис. 2.3. Зависимость T от c

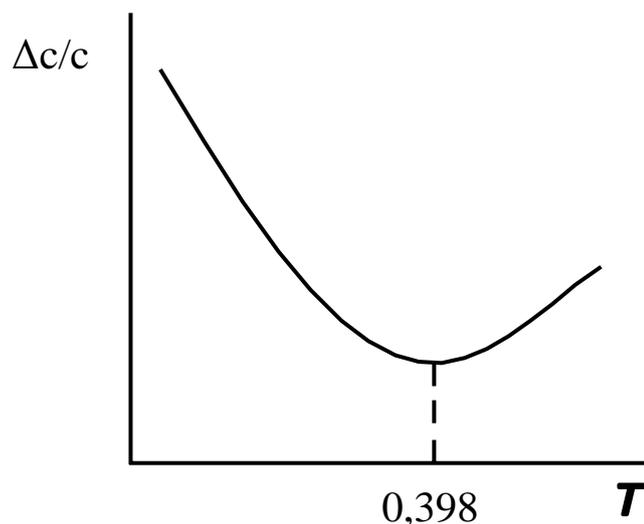


Рис. 2.4. Зависимость относительной погрешности от пропускания раствора

Фотометрическая реакция. Многие органические и неорганические вещества поглощают в видимой и УФ-областях, что делает возможным их определение. Кроме того, многие непоглощающие соединения можно определять после превращения их в поглощающие путем соответствующей (фотометрической) химической реакции. Окрашенные соединения в растворе получают главным образом в результате реакций окисления-восстановления и комплексообразования, к которым предъявляют следующие требования.

1. Аналитический реагент должен быть введен в достаточном количестве для превращения всего определяемого вещества в аналитическую форму.

2. Следует выбирать только те реакции, которые протекают с большой скоростью, следовательно, состояние равновесия достигается в короткое время.

3. Исследуемые соединения должны быть устойчивыми во времени, нечувствительными к свету и достаточно интенсивно окрашены.

4. Если окрашенное соединение является комплексным, то оно должно иметь постоянный состав, малую константу диссоциации (т. е. быть достаточно устойчивым).

Для выяснения оптимальных условий фотометрирования каждая система требует специального физико-химического исследования для установления необходимого рН раствора, концентрации реагента, устойчивости образующегося комплекса, влияния конкурирующих реакций и присутствия посторонних ионов на устойчивость комплексных ионов и т. д.

Чувствительность метода. В общем случае чувствительность фотометрического анализа определяют по формуле: $c_{\min} = A_{\min} / \varepsilon l$. Задав $A_{\min} = 0,01$, при котором еще можно вести анализ, и при $l = 1$ см, $\varepsilon = 10^3$

(свойственно многим окрашенным соединениям) получаем

$$c_{\min} = \frac{0,01}{10^3 \cdot l} = 10^{-5} \text{ М.}$$

2.2.3. Количественный анализ абсорбционными методами

Метод градуировочного графика. Основан на построении градуировочного графика в координатах A – c . Для этого при определенной длине волны измеряют оптические плотности серии эталонных растворов, а также анализируемого раствора, затем по градуировочному графику определяют концентрацию вещества c_x . Обычно градуировочные графики представляют собой прямую линию, идущую из начала координат. При отклонениях от закона Бугера – Ламберта – Бера, то есть при нарушении линейной зависимости $A(c)$, число точек на графике должно быть увеличено. Однако линейная зависимость повышает точность определения. Основные ограничения метода связаны с трудностями приготовления эталонных растворов и учетом влияния так называемых третьих компонентов, то есть компонентов, которые находятся в пробе, сами не определяются, но на результат влияют.

Метод молярного коэффициента поглощения. Если заранее известна средняя величина ϵ_λ , определенная для нескольких стандартных растворов в совершенно идентичных условиях, то, зная толщину слоя кюветы, можно рассчитать концентрацию по формуле: $c_x = \frac{A_\lambda}{\epsilon_\lambda \times l}$.

Ограничением метода является обязательное подчинение системы в исследуемом интервале концентраций закону Бера.

Метод добавок. Этот метод применяют при анализе растворов сложного состава, так как он автоматически позволяет учесть влияние третьих компонентов. Сначала определяют оптическую плотность A_x анализируемого раствора с концентрацией c_x . Затем в анализируемый раствор добавляют известное количество определяемого компонента ($c_{ст}$) и вновь измеряют оптическую плотность $A_{x+ст}$.

Так как $A_x = \epsilon l c_x$ и $A_{x+ст} = \epsilon l (c_x + c_{ст})$, то

$$\frac{A_x}{A_{x+ст}} = \frac{c_x}{c_x + c_{ст}},$$
$$c_x = c_{ст} \frac{A_x}{A_{x+ст} - A_x}. \quad (20)$$

Концентрацию анализируемого вещества в методе добавок можно найти также по графику в координатах $A_{x+ст} = f(c_{ст})$ (рис. 2.5).

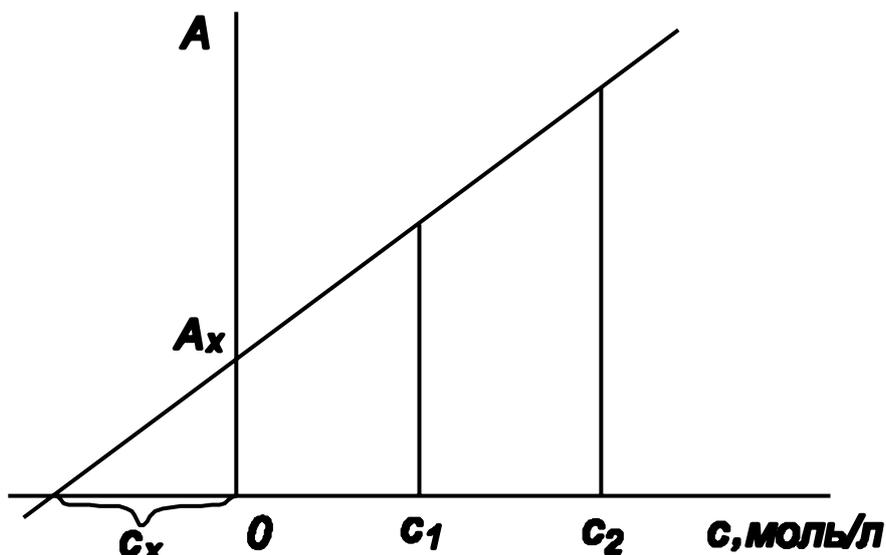


Рис. 2.5. Определение концентрации методом добавок

График представляет прямую, экстраполяция которой до пересечения с осью абсцисс дает отрезок, равный $-c_x$. Действительно, при $A_{x+ст} = 0$ из уравнения (20) $c_x = -c_{ст}$.

Определение смеси светопоглощающих веществ. Спектрофотометрический метод позволяет определить несколько светопоглощающих веществ в одном растворе без предварительного разделения. Большое практическое значение имеет частный случай такой системы – анализ смеси двух окрашенных веществ. В соответствии с законом аддитивности светопоглощения для такой смеси веществ, например А и В, можно записать:

$$A_{\lambda_1} = l(\varepsilon_{A,\lambda_1} c_A + \varepsilon_{B,\lambda_1} c_B),$$

$$A_{\lambda_2} = l(\varepsilon_{A,\lambda_2} c_A + \varepsilon_{B,\lambda_2} c_B).$$

Решение этой системы уравнений при $l = 1$ дает:

$$c_A = \frac{A_{\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - A_{\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1}}{\varepsilon_{A,\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - \varepsilon_{A,\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1}},$$

$$c_B = \frac{A_{\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1} - A_{\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2}}{\varepsilon_{A,\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - \varepsilon_{A,\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1}}. \quad (21)$$

Длины волн λ_1 и λ_2 , при которых следует проводить измерения оптической плотности, выбирают по спектрам поглощения веществ А и В. Особый интерес представляют спектральные участки, в которых одно из веществ свет не поглощает, а другое обладает интенсивным светопоглощением. Если, например, $\varepsilon_{B,\lambda} = 0$, то вместо (21) будем иметь:

$$c_A = \frac{A_{\lambda_1}}{\varepsilon_{A,\lambda_1}}; \quad c_B = \frac{A_{\lambda_2} \varepsilon_{A,\lambda_1} - A_{\lambda_1} \varepsilon_{A,\lambda_2}}{\varepsilon_{A,\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2}},$$

Этот случай реализуется, например, при определении фенилаланина и триптофана. В области длин волн ~ 279 нм поглощает только триптофан,

и он может быть определен по оптической плотности раствора при этой длине волны. При ~ 257 нм свет поглощают оба компонента.

Метод дифференциальной фотометрии. Абсорбционная спектроскопия является разностной, так как из поглощения раствора всегда вычитают поглощение растворителя, реагентов, примесей, кюветы и т. д. Дифференциальной спектроскопией называют такой метод определения, когда в качестве раствора сравнения используют раствор определяемого вещества с известной концентрацией. При дифференциальном способе измерения настройку на нуль прибора проводят с помощью поглощающих растворов с постоянной оптической плотностью. В зависимости от способа настройки различают метод высокого поглощения, метод низкого поглощения и метод предельной точности.

По сути, дифференциальный способ измерения сводится к растяжению измерительной шкалы прибора. В методе высокого поглощения настройку на 100 % пропускания проводят по эталонному раствору с меньшей концентрацией, чем в исследуемом. Данный метод позволяет измерять пропускание сильно поглощающих растворов и таким образом определять сравнительно большие концентрации веществ. Но в подобных случаях высококонцентрированные растворы часто не подчиняются закону Бугера – Ламберта – Бера. Поэтому рекомендуется применять двусторонний дифференциальный способ измерения оптической плотности – при построении градуировочного графика в качестве раствора сравнения выбирают не первый раствор серии эталонов, а тот, для которого произведение εc максимально.

В методе низкого поглощения сначала устанавливают прибор на нуль, но вместо шторки используют раствор с большей концентрацией, чем в исследуемом растворе. Метод применим для растворов с оптической плотностью меньше 0,1.

В методе предельной точности настройку на $T = 0$ и $T = 100$ % проводят по двум растворам. Концентрация в одном из них больше, а в другом меньше, чем в исследуемом растворе. При дифференциальном способе измерения повышается воспроизводимость измерений.

2.3. Инфракрасная спектроскопия

2.3.1. Некоторые характеристики молекулярных спектров

Если молекула поглощает или излучает относительно малые кванты энергии (на один-два порядка меньше, чем для возбуждения электронного спектра), наблюдается колебательный спектр молекулы. Изменение дипольного момента молекулы в момент возбуждения колеба-

тельного состояния является необходимым условием поглощения или испускания энергии. Наличие изменений дипольного момента при колебании зависит от симметрии системы.

В двухатомной молекуле единственно возможным колебанием является движение атомов вдоль оси связи. В таких молекулах, как O_2 , Cl_2 и др., дипольный момент равен нулю, колебания этих молекул не сопровождаются поглощением ИК-излучения. Такие колебания называются неактивными в ИК-спектре. В молекулах типа CO , $HC1$ и др. центры положительных и отрицательных атомов не всегда совпадают, поэтому электронное распределение при поглощении инфракрасного излучения меняется, что приводит к изменению дипольного момента молекулы. Подобные колебания называются активными в ИК-области. Они могут взаимодействовать с электромагнитным излучением, поглощая энергию и приводя к появлению полосы поглощения в спектре.

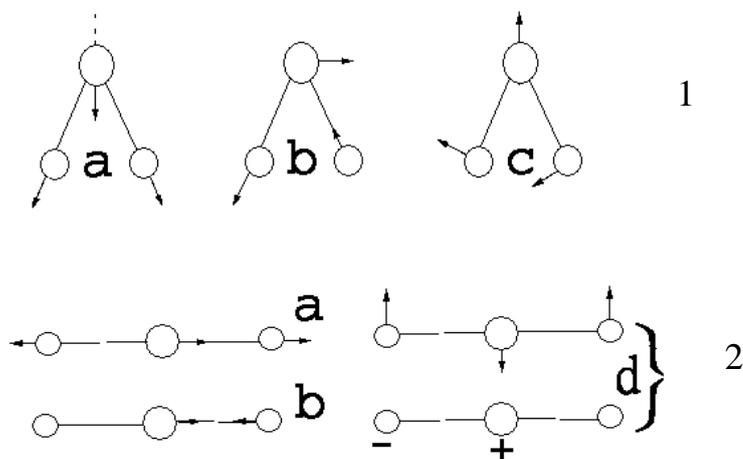


Рис. 2.6. Колебания трехатомных молекул: a – симметричные валентные колебания в нелинейной (1) и линейной (2) молекулах (ν_s); b – асимметричные колебания в нелинейной (1) и линейной (2) молекулах (ν_{as}); c – деформационные колебания в нелинейной молекуле (δ); d – вырожденное колебание в линейной молекуле

Инфракрасное излучение сообщает молекуле, находящейся в основном (самом низком) электронном состоянии, энергию, необходимую для переходов между вращательными и колебательными уровнями энергии. При поглощении молекулой того или иного кванта энергии происходит поглощение света определенной (характеристической) частоты, связанной, как правило, с функциональными группами и атомами в молекуле. Луч, проходящий через образец, ослабляется в области поглощения. Регистрируя интенсивность прошедшего излучения, получают кривую, на которой видны максимумы поглощения.

Колебательные спектры молекул богаты полосами, каждая из которых соответствует возбуждению колебательного состояния определенной

части молекулы. Число возможных колебаний молекулы определяется ее структурой: для нелинейной молекулы, содержащей N атомов, число возможных колебаний равно $3N-6$, для линейной – $3N-5$. Некоторые из этих колебаний имеют одинаковые частоты, поэтому соответствующие им полосы поглощения накладываются друг на друга.

Колебательные движения атомов в молекуле приближенно можно разделить на два типа: 1) валентные колебания, когда наблюдается периодическое смещение атомов вдоль валентной оси связи $X \rightarrow Y$ (рис. 2.6, колебания 1а, 1б, 2а, 2б); 2) деформационные, при которых происходит изменение величины угла между двумя связями (рис. 2.6, колебания 1с, 2д).

Изменение дипольного момента при колебании зависит от симметрии системы. Если молекула обладает симметрией (плоскостью, осью, центром симметрии или зеркально-поворотными осями), то все формы ее нормальных колебаний характеризуются определенными свойствами симметрии. Известны три случая поведения нормальных колебаний по отношению к любой операции симметрии (см. рис. 2.6):

- 1) нормальное колебание остается неизменным (симметричное);
- 2) оно изменяет свой знак на обратный (асимметричное);
- 3) оно переходит в другую форму нормального колебания (вырожденное).

Для трехатомных групп состава YX_2 (например, CH_2 -групп) характерны 4 типа деформационных колебаний: ножничные (bending), веерные (wagging), крутильные (twisting) и маятниковые (rocking) (рис. 2.7).

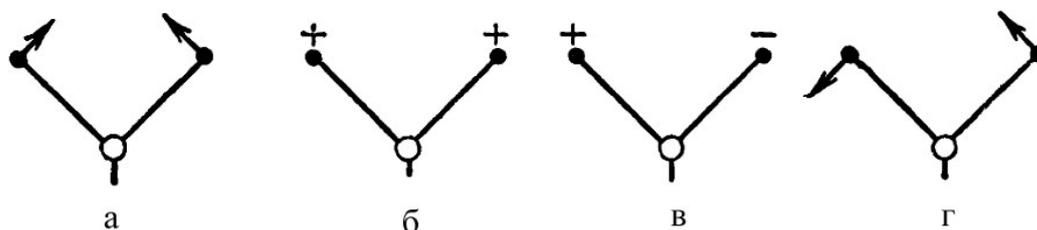


Рис. 2.7. Деформационные колебания групп атомов YX_2 : а) ножничные; б) веерные; в) крутильные (торзионные); г) маятниковые

2.3.2. Колебания двухатомной молекулы

В случае простой двухатомной молекулы $A-B$ имеет место единственный вид колебаний – периодическое растяжение или сжатие вдоль валентной связи $A \rightarrow B$. Этот процесс приближенно описывается по законам классической физики. В таком случае молекулу рассматривают как гармонический осциллятор с приведенной массой M и силовой константой K , для которого применимы законы квантовой механики [9–11]:

$$M = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}, \quad (22)$$

где m_A и m_B – соответственно масса атомов A и B .

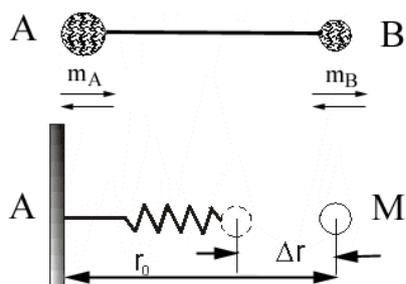


Рис. 2.8. Колебания гармонического осциллятора

При смещении M из положения равновесия на расстояние Δr возникает сила F (рис. 2.8), действующая в обратном направлении, которая пропорциональна изменению расстояния Δr : $F = -K\Delta r$, при этом частота колебания осциллятора

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{K/M}. \quad (23)$$

В ИК-спектроскопии за единицу измерения положения полос в спектре принято волновое число ($\bar{\nu}$), которое выражается в обратных сантиметрах (см^{-1}). Кроме того, можно принять частоту колебаний (ν), имеющую размерность обратной секунды (с^{-1}). Соотношение этих единиц следующее:

$$\nu = 1/\lambda; \quad \bar{\nu} = c/\lambda; \quad \nu = \bar{\nu}/c,$$

где λ – длина волны, мкм; c – скорость света, м/с.

Таким образом, волновое число имеет физический смысл числа длин волн, укладываемых в какой-либо единице длины (например, в одном сантиметре). Подставив в формулу (23) значение ν вместо $\bar{\nu}$, получим выражение для расчета волнового числа:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{K/M}. \quad (24)$$

Влияние массы и силовой константы на частоту колебаний. Из формулы (24) видно, что частоту колебаний ν определяют два параметра – силовая константа K и приведенная масса M . Из табл. 2.1 и 2.2 следует, что увеличение массы атомов при сохранении порядка связи смещает полосы поглощения в сторону меньших частот, тогда как увеличение значений силовой константы, напротив, приводит к увеличению частоты колебаний. В многоатомной молекуле дело обстоит намного сложнее, и, тем не менее, эта зависимость помогает грубо оценить области, в которых проявляются отдельные частоты и их характеристичность.

Таблица 2.1

Зависимость величины ν от приведенной массы M при $K \approx const$

Связь	M , усл. ед.	K , Н/см [9]	ν , см ⁻¹ *
C-H	0,92	5,00	3000
C-C	6,00	4,34	1060
C-Cl	9,00	3,64	700–600

* Значения ν рассчитаны приблизительно, так как они зависят не только от M и K , но и от строения молекулы, в которой находится связь.

Таблица 2.2

Зависимость величины ν от силовой константы K при постоянной M

Связь	M , усл. ед.	K , Н/см [9]	ν , см ⁻¹
C-C	6,0	5	1060
C=C	6,0	10	1600
C≡C	6,0	15	2000
C-N	6,5	5	730
C=N	6,5	10	1650
C≡N	6,5	15	2100

Колебания будут тем характеристичнее, чем больше параметры K и M колеблющейся группы отличаются от параметров остальной части молекулы. Практически любое замещение, небольшое изменение геометрии молекулы приводит к сдвигу полос поглощения. Но если атомы близки по массе и соединены связями, имеющими близкие силовые коэффициенты, то выделить колебания, относящиеся к индивидуальным связям (табл. 2.3), довольно трудно.

Таблица 2.3

Величины ν для связей с близкими значениями K и M

Связь	M , усл. ед.	K , Н/см [2]	ν , см ⁻¹
C-H	0,92	5	3100–3000
N-H	0,93	5	3400–3300
O-H	0,94	5	3500–3400

Зная значения K и M , можно по формуле (24) рассчитать положение полос поглощения в спектрах молекул. На использовании этой же формулы основано применение метода изотопического эффекта, так как при изотопном обмене изменение частот в спектре обусловлено лишь изменением массы молекулы при постоянном значении K , при этом свойства молекулы, связанные с электронной структурой, почти не изменяются. Наиболее распространено дейтерирование, когда частоты $\nu_{\text{X-H}}$ (например, O-H, N-H, C-H) очень близки по значениям и их трудно интерпретировать. Проводят дейтерирование молекулы, при этом частота колебаний связи изменяется и происходит смещение полосы поглощения. Поскольку силовая постоянная и структура молекулы (ее электронное состояние) не претерпевают ника-

ких изменений, это смещение определяется лишь величиной приведенной массы M . Величину смещения полосы поглощения можно с достаточной точностью рассчитать, используя формулу (24).

Пример. Для связи О-Н имеем

$$M_{O-H} = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} = \frac{16 \cdot 1}{16 + 1} = 0,94,$$

при замене атома водорода на дейтерий:

$$M_{O-D} = \frac{m'_A m'_B}{m'_A + m'_B} = \frac{16 \cdot 2}{16 + 2} = 1,78.$$

По формуле (24) рассчитываем значения для ν_{O-H} , ν_{O-D} :

$$\nu_{O-H} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{K / M_{O-H}}; \quad \nu_{O-D} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{K / M_{O-D}}.$$

При постоянных K величину ν_{O-D} можно рассчитать из соотношения

$$\begin{aligned} \nu_{O-D} / \nu_{O-H} &= \sqrt{K / M_{O-D}} / \sqrt{K / M_{O-H}}; \\ \nu_{O-D} &= \nu_{O-H} \sqrt{M_{O-H} / M_{O-D}} = \nu_{O-H} \sqrt{\frac{m_1 m_2 (m'_1 + m'_2)}{(m_1 + m_2) m'_1 m'_2}}. \end{aligned}$$

Если принять $\nu_{O-H} = 3600 \text{ см}^{-1}$, то $\nu_{O-D} = 3600 \sqrt{\frac{0,94}{1,78}} = 2600 \text{ см}^{-1}$.

Дейтерирование приводит к смещению частоты колебаний в сторону уменьшения.

Рассмотренный метод расчета волновых чисел можно использовать в тех случаях, когда при изменении величины приведенной массы M и силовой константы K практически не изменяется электронное состояние молекулы.

2.3.3. Групповые частоты и интерпретация спектра

При экспериментальном исследовании колебательных спектров было установлено, что одинаковые группы имеют поглощение в узком интервале частот, который называется характеристической (групповой) частотой. Существование характеристических частот можно представить следующим образом: колебания отдельных групп атомов или связей могут быть слабо связаны с колебаниями остальной части мо-

лекулы и частота колебаний данной группы или связи зависит только от их строения или характера рассматриваемой связи.

Частоту можно считать характеристической, если ее значение намного отличается от значений всех других частот. Например, частоты валентных колебаний связей С-Н в $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2$ -группах лежат в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, частоты деформационных колебаний, связанных с изменением угла связи Н-С-Н и С-С-Н – в области около 1450 и 1200 см^{-1} соответственно, а частоты, связанные с изменением связей С-С, ниже 1200 см^{-1} . Поэтому частоты валентных и деформационных колебаний групп С-Н следует считать характеристическими. К ним относятся также частоты колебаний, обусловленные изменением расстояния между двумя различающимися по своим массам атомами. Например, для групп С-Н характерны валентные колебания в области 2900 см^{-1} , для О-Н – при 3500 см^{-1} , для N-H – при $3500\text{--}3300\text{ см}^{-1}$, для Si-H – при $2300\text{--}2100\text{ см}^{-1}$, для S-H – при $2600\text{--}2500\text{ см}^{-1}$.

Характеристические частоты установлены для многих органических и неорганических веществ и сведены в таблицы групповых частот [12–27], которые очень удобны для идентификации групп атомов по инфракрасным спектрам. Каких-либо строгих правил интерпретации инфракрасных спектров не существует, однако некоторые их общие положения могут быть использованы при работе.

Прежде всего, необходимо точно определить положение полос поглощения в спектре, рассчитав частоты, соответствующие максимуму каждой полосы. Этому предшествует предварительная калибровка прибора по стандартным образцам (например, по полистиролу), так как неправильная юстировка может служить источником ошибок. При использовании бланков для записи спектрограмм на спектрометрах, оснащенных самописцами, следует четко фиксировать начало и конец записи. Затем можно рассчитать положение каждого максимума в этом интервале частот. При предварительном исследовании спектра надо охватывать области валентных и деформационных колебаний групп и, кроме того, область «отпечатков пальцев» ($1350\text{--}600\text{ см}^{-1}$), где проявляются частоты, характерные для колебаний конкретных групп.

Появление в спектре полосы поглощения, ожидающейся на основании сведений о строении вещества, еще не является доказательством наличия в нем соответствующей группы. Необходимо проверить в других областях спектра наличие полос поглощения, характерных для этой же группы. Напротив, отсутствие сильной характеристической полосы поглощения какой-либо группы указывает на отсутствие ее в исследуемом веществе. Так, для области $1750\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ характерно сильное поглощение карбонильной группы С=О. Отсутствие поглощения в этой области спектра является доказательством отсутствия данной группы в исследуемом веществе. Если же поглощение в этой области наблюдается, то

можно по поглощению в остальных областях спектра определить природу карбонильной группы. Например, поглощение $\text{C}=\text{O}$ обусловлено колебаниями этой группы в группировке $-\text{C}=\text{O}$. Для карбоновых кислот наличие полос при $1720\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ должно дублироваться наличием соответствующих полос валентных (ν) и деформационных (δ) колебаний OH -групп и валентных ν $\text{C}-\text{O}$ колебаний в области волновых чисел $1100\text{--}1200\text{ см}^{-1}$.

В других классах соединений следует ожидать также изменения в положении полос поглощения. Так, для альдегидов при наличии этой группировки $-\text{C}=\text{O}$, кроме сильного поглощения при $1710\text{--}1680\text{ см}^{-1}$, обязательно присутствие полосы ν $\text{C}-\text{H}$ при 2800 см^{-1} . Для кетонной же группировки $\text{C}=\text{O}$ при арилалкильных группах характерно поглощение только при $1700\text{--}1670\text{ см}^{-1}$.

Отнести полосы к каким-либо группам значительно легче при изменении строения молекулы. Например, при идентификации карбонильного поглощения в кислотах перевод кислоты в ее соль приводит к исчезновению поглощения при $3700\text{--}2500\text{ см}^{-1}$ (ν – колебания OH -групп, участвующих в образовании H -связей в $\text{R}-\text{COOH}$), $1750\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ (ν – колебания $\text{C}=\text{O}$ -групп в COOH), $1200\text{--}1100\text{ см}^{-1}$ и появлению максимумов при $1580\text{--}1540\text{ см}^{-1}$ и $1400\text{--}1380\text{ см}^{-1}$, вызванных колебаниями ионизированной группы COO^- (рис. 2.9).

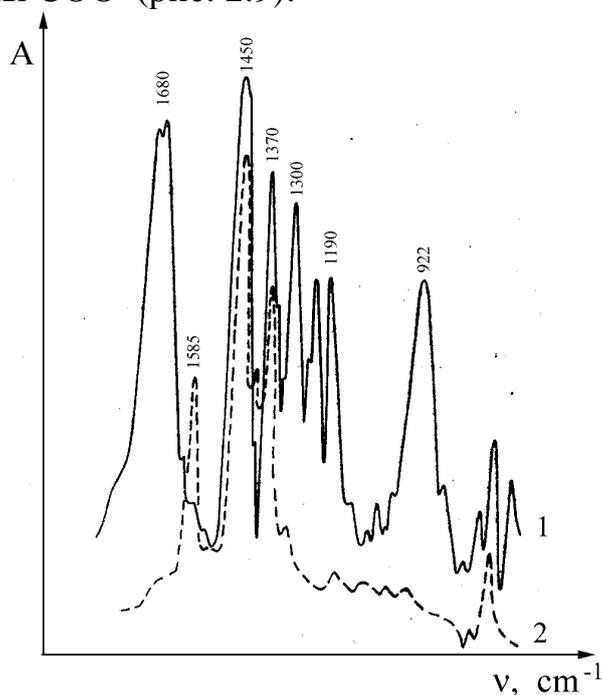


Рис. 2.9. ИК-спектры себаценовой кислоты (1) и ее натриевой соли (2)

Замена протия H дейтерием D полезна при идентификации полос поглощения $\text{C}-\text{H}$ (максимум поглощения $\text{C}-\text{H}$ при 2900 см^{-1} сдвигается до 2600 см^{-1}).

3. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

РАБОТА 1. НАНЕСЕНИЕ НЕПОДВИЖНОЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ НА ТВЕРДЫЙ НОСИТЕЛЬ И ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНКИ [3]

Цель работы: ознакомление с различными приемами нанесения неподвижной жидкой фазы на твердый носитель и с техникой заполнения насадочной колонки.

Этапы работы

1. Нанесение неподвижной жидкой фазы на твердый носитель.
2. Заполнение колонки.
3. Кондиционирование (тренировка) колонок.

Аппаратура, условия, объекты хроматографирования

1. Твердый носитель – хроматон N (или другой, по выбору преподавателя) зернения 0,16–0,20, 0,20–0,25 или 0,25–0,315 мм.
2. Неподвижная жидкая фаза – полиэтиленгликольадипинат (ПЭГА), трикрезилфосфат (ТКФ), или какая-нибудь другая, по выбору преподавателя.
3. Растворитель – ацетон, метанол или метилэтилкетон.
4. Весы технические 1-го класса.
5. Цилиндр мерный на 100 см³.
6. Воронка стеклянная.
7. Колба коническая или стакан на 100 см³.
8. Чашка фарфоровая и шпатель.
9. Вентилятор, фен или другой осушитель.
10. Стеклянный фильтр № 3, желательно диаметром 50–75 мм и высотой 130–150 мм.
11. Промывная склянка (склянка Тищенко).
12. Колба Бунзена для фильтрования под вакуумом.
13. Трехходовой стеклянный кран.
14. Водоструйный насос.
15. Баллон со сжатым газом (азот, аргон), оборудованный редуктором.
16. Сушильный шкаф.
17. Вибратор.
18. Набор стандартных сит.
19. Колонки газохроматографические металлические или стеклянные с воронками для засыпания сорбента.

Выполнение работы

1. Нанесение неподвижной фазы на твердый носитель

Данная практическая работа знакомит студентов с тремя способами приготовления сорбента (насадки) хроматографической колонки и выполняется соответственно в трех вариантах.

Вариант А. Получение сорбента при механическом перемешивании и испарении растворителя. Объем хроматографической колонки заданных размеров определяют по формуле:

$$V = \pi r^2 h.$$

Через воронку порциями по 5–10 см³ засыпают твердый носитель в предварительно взвешенный мерный цилиндр. При этом следует время от времени постукивать цилиндром о стол или ставить его на работающий вибраторный столик для того, чтобы утрамбовать твердый носитель. Его общий объем должен превышать на 20–25 % вычисленный свободный объем колонки. Взвешивают цилиндр с носителем и определяют общую массу (г) и насыпную плотность (г/см³) твердого носителя, взятого для приготовления насадки.

Технический твердый носитель отмучивают дистиллированной водой от пыли и самых мелких частиц, просушивают в сушильном шкафу при 150–160 °С, просеивают и хранят в плотно закрытой таре. В условиях студенческого практикума эту подготовительную операцию лаборант продельывает заранее.

В коническую колбу или стакан берут необходимую навеску неподвижной жидкой фазы (в количестве 10–20 % от массы твердого носителя, по согласованию с преподавателем). В этой же посуде приготавливают раствор неподвижной фазы в ацетоне или другом подходящем растворителе и выливают этот раствор на носитель, перенесенный в фарфоровую чашку. Объем приготовленного раствора неподвижной фазы должен несколько превышать объем твердого носителя, так чтобы при смешивании в фарфоровой чашке над поверхностью твердого носителя образовался слой жидкости высотой около 5 мм. Например, если взято 24 см³ твердого носителя, то следует взять примерно 30 см³ раствора неподвижной фазы.

Для испарения растворителя чашку помещают в вытяжной шкаф на расстоянии 1,0–1,5 м от работающего вентилятора и время от времени осторожно, стараясь не дробить частиц твердого носителя, перемешивают содержимое чашки шпателем.

По испарении растворителя, когда приготовленная насадка станет легкосыпучей и по внешнему виду не будет отличаться от исходного твердого носителя (исчезнет запах растворителя), ее необходимо поместить для просушивания в термостат, нагретый до 70–100 °С. После просушивания в термостате в течение 3–4 ч приготовленный сорбент (насадку) осторожно отсеивают на ситах от пыли и комков. Работа выполняется с перерывом.

Освобождающееся время (в течение которого насадка просушивается) студенты используют для следующей работы. Если твердый носитель не обладает достаточной механической прочностью, отсеивание приготовленной насадки проводить не рекомендуется (диаметр отверстия сит определяется зернением исходного носителя), и студенты приступают к заполнению хроматографической колонки (см. ниже).

Вариант Б. Получение сорбента (насадки) при испарении растворителя и перемешивании потоком газа. Этот способ обеспечивает более равномерное нанесение неподвижной жидкой фазы на зерна твердого носителя (достигается лучшая воспроизводимость при изготовлении новых партий насадок), позволяет использовать даже весьма хрупкие твердые носители (исключается их измельчение) и окисляющиеся на воздухе неподвижные фазы (исключается контакт неподвижной фазы с воздухом).

Стебель стеклянного фильтра № 3 (под тягой) соединяют резиновыми шлангами (через промывную склянку с концентрированной серной кислотой) с редуктором баллона со сжатым газом.

Необходимое для приготовления насадки количество твердого носителя (см. вариант А) помещают в фильтр и осторожно (существует опасность выбрасывания!) начинают подавать газ, контролируя его расход по пузырькам, барботирующим через серную кислоту. Выливают на твердый носитель раствор неподвижной фазы в соответствующем растворителе (объем раствора должен на 20–25 % превышать взятый объем твердого носителя) и одновременно регулируют расход газа, стремясь обеспечить умеренное «кипение» частиц твердого носителя в растворе неподвижной фазы (существует опасность разбрызгивания и переброса!). При этом частицы твердого носителя, прилипающие к стенкам фильтра, могут быть сброшены вниз шпателем.

На испарение легкокипящего растворителя (эфир, ацетон) требуется не более 30 мин. При работе с более высококипящими растворителями (бензол, четыреххлористый углерод) для ускорения испарения фильтр обогревают электронагревателем для горячего фильтрования. По испарении растворителя приготовленную насадку досушивают в термостате и отсеивают от комков и пыли (см. вариант А).

Вариант В. Фильтрационный метод получения сорбента (насадки) с хорошими и воспроизводимыми характеристиками путем поглощения твердым носителем части раствора жидкой фазы. Этот метод особенно широко используется при приготовлении сорбента с низким содержанием неподвижной жидкой фазы (0,1–3 %).

Экспериментально установлено, что при пропускании («фильтровании») раствора неподвижной фазы в подходящем растворителе через слой твердого носителя концентрация раствора не изменяется; вместе с тем на слое зерен носителя задерживается определенное количество раствора. Последующее принудительное испарение растворителя приводит к получе-

нию насадки с массой неподвижной фазы, пропорциональной ее концентрации в растворе. Найденные опытным путем графические зависимости между содержанием неподвижной фазы в растворе и в насадке для ряда комбинаций: неподвижная фаза/растворитель – твердый носитель – представлены на рис. 3.1.

Неподвижная фаза, растворитель, твердый носитель, его зернение, необходимое количество насадки и содержание в ней неподвижной фазы задаются преподавателем.

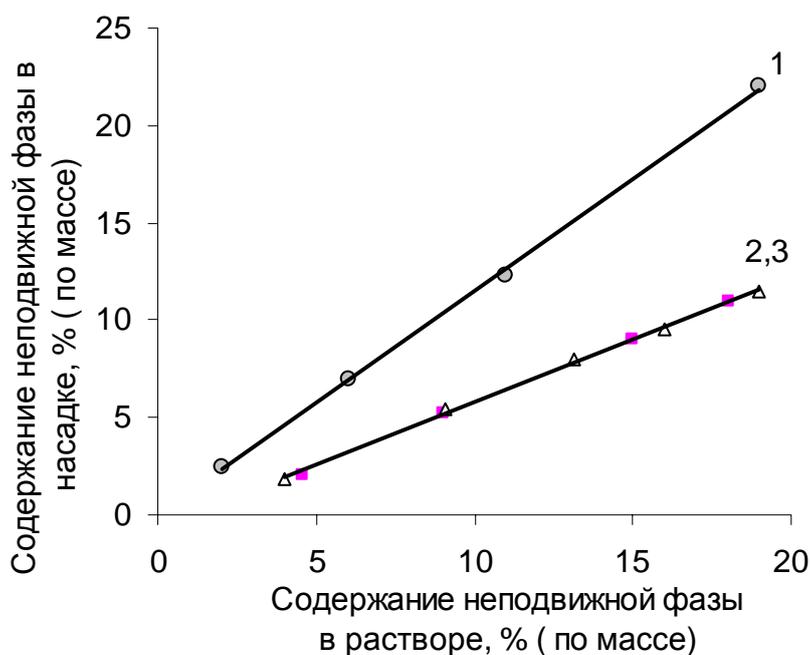


Рис. 3.1. Зависимость между содержанием неподвижной фазы в растворе и в насадке: 1 – полиэтиленгликоль-100/метанол – хроматон N-AW; 2 – диноилфталат/метилэтилкетон – сферохром-1; 3 – 1,2,3-трис(2-цианоэтил)амин/ацетон – сферохром-1 (зернение твердых носителей 0,25-0,315 мм) [3]

Приготавливают раствор неподвижной фазы в растворителе в количестве, вдвое превышающем заданный объем сорбента (необходимую концентрацию раствора находят по одному из графиков, представленных на рис. 3.1). С этой целью рассчитанную навеску неподвижной фазы взвешивают непосредственно в конической колбе или стакане, куда затем вводят отмеренный цилиндром или пипеткой объем растворителя.

Для нанесения неподвижной фазы на твердый носитель используют устройство, изображенное на рис. 3.2. На стеклянный фильтр помещают заданное количество твердого носителя и заливают его приготовленным раствором неподвижной фазы (перед этим втулка трехходового крана должна быть установлена в положение I). Спустя 5–10 с, т. е. после того как весь твердый носитель успеет пропитаться раствором неподвижной

фазы, поворачивают втулку трехходового крана в положение II и отсасывают в вакууме водоструйного насоса раствор неподвижной фазы до тех пор, пока со стебля фильтра не перестанут капать отдельные капли и не исчезнет обильная пена. Затем возвращают втулку трехходового крана в положение I, отсоединяют систему от вакуумного насоса, снимают фильтр и сливают фильтрат в заранее подготовленную для его хранения тару. Этот раствор неподвижной фазы в дальнейшем можно использовать многократно. Вновь устанавливают фильтр с еще непросушенным сорбентом на колбу Бунзена, переводят втулку трехходового крана в положение II и продолжают просасывание воздуха до тех пор, пока сорбент не станет легкосыпучим и по внешнему виду неразличимым с исходным твердым носителем. Отдельные конгломераты слипшихся вначале зерен твердого носителя должны полностью разрушиться, что является признаком завершения данной операции.

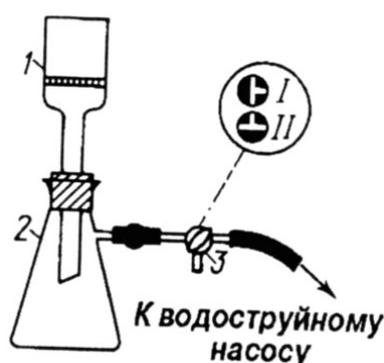


Рис. 3.2. Устройство для нанесения неподвижной фазы на твердый носитель фильтрационным способом: 1 – стеклянный фильтр; 2 – колба Бунзена; 3 – трехходовой кран.

Приготовленный сорбент просушивают в воздушном термостате при 70–100 °С в течение 3–4 ч и заполняют им газохроматографическую колонку.

2. Заполнение колонки

Заполнение U-образной колонки приготовленной насадкой (сорбентом). Предварительно промытую органическими растворителями и высушенную колонку, пропустив через кольца штатива, ставят вертикально на рабочую пластину вибратора. Накладными гайками закрепляют на концах колонки (и узлом отверстия или отверстиях) металлические или пластмассовые воронки для засыпания насадки.

Включают вибратор и равными порциями начинают засыпать предварительно взвешенную насадку в колонку до полного ее наполнения. Заполненную колонку выдерживают на вибраторе не более 1 мин; в случае слишком плотной упаковки частиц при работе возникнет большой перепад давлений на входе в колонку и выходе из нее, что приведет к снижению

эффективности разделения и создаст осложнения при дозировке образцов. Оставшуюся в воронках насадку и небольшое ее количество (примерно по $0,5 \text{ см}^3$) из концов колонки осторожно ссыпают.

Концы колонки закрывают маленькими пробочками (тампонами) из шнурового асбеста, стекловолокна или металлической сетки. Важно, чтобы после отсыпания насадки расстояние от границы слоя сорбента до верхнего фланца колонки составляло не более 5 мм. Тампоны, предотвращающие высыпание насадки, должны быть поставлены «заподлицо» с фланцем колонки. Взвешиванием (по разности масс) определяют количество сорбента, засыпанного в колонку. Свежезаполненная колонка должна пройти тренировку (кондиционирование, см. ниже).

Заполнение спиральной колонки. Один из концов промытой органическими растворителями и высушенной колонки закрывают тампоном из шнурового асбеста, стекловолокна или тонкой металлической сетки и подключают к водоструйному насосу. Колонку закрепляют в штативе таким образом, чтобы спиральные витки располагались горизонтально. К открытому концу колонки прикрепляют воронку для засыпания насадки. Создав разрежение, начинают осторожно присыпать отсеянную от пыли и комков насадку, одновременно постукивая по колонке деревянной палочкой для достижения более равномерного заполнения. Конечно, можно воспользоваться вибратором, но и указанный прием достаточно эффективен для обеспечения равномерности заполнения. О заполненности колонки судят по прекращению убыли насадки в колонке. Сняв воронку, закрывают открытый конец колонки тампоном, как описано выше.

Свежезаполненная колонка нуждается в тренировке.

3. Кондиционирование (тренировка) колонок

В программу практикума не входит и приводится здесь для ознакомления студентов с этой обязательной при самостоятельной работе процедурой. По возможности после кондиционирования студентам поручается исследовать рабочие характеристики приготовленной колонки. Устанавливают свежезаполненную колонку в термостате хроматографа (не забывая о прокладках!), не соединяя выход из колонки с детектором, и в течение 3–4 ч продувают колонку азотом, пропуская его со скоростью 40–60 $\text{см}^3/\text{мин}$ при ступенчатом или непрерывном (режим программирования) повышении температуры примерно от 75 °С до температуры на 20–30 °С выше предполагаемой рабочей (но не выше максимально допустимой для данной неподвижной фазы). Затем охлаждают колонку и соединяют ее выходной конец с детектором (не забудьте поставить прокладки!). Проверяют герметичность газовой линии прибора, выводят хроматограф на рабочий режим и проверяют стабильность нулевой линии на хроматограмме. Шумы и дрейф сигнала свидетельствуют о необходимости продолжить кондиционирование (при подготовке колонки к анализу следовых количеств

компонентов пробы, регистрируемых на максимально чувствительных шкалах прибора, кондиционирование может продолжаться долго – десятки часов). Иногда, при работе с силиконовыми эластомерами, рабочие характеристики сорбента улучшаются, если свежеприготовленная колонка прогревается первые 8–10 ч в отсутствие газа-носителя.

РАБОТА № 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ СКОРОСТИ ПОТОКА ГАЗА-НОСИТЕЛЯ

Цель работы: выяснение влияния скорости потока газа-носителя на ВЭТТ и определение оптимальной скорости потока подвижной фазы.

Этапы работы

1. Хроматографирование анализируемого вещества (например, этанола) при различной скорости подачи подвижной фазы.
2. Расчет числа теоретических тарелок (N) и высоты, эквивалентной теоретической тарелке (H), для всех режимов хроматографирования.
3. Построение графика зависимости H от U и выбор оптимальной скорости подачи газа-носителя при хроматографировании этилового спирта.

Аппаратура, условия, объекты хроматографирования

1. Газовый хроматограф любой марки с детектором по теплопроводности (катарометром) или с пламенно-ионизационным детектором (ПИД).
2. Колонка стальная длиной 3 м, диаметром 3 мм, заполненная полиэтиленгликольадипинатом на диатомитовом кирпиче в количестве 15 % от массы носителя (1,5 г).
3. Хроматографические микрошприцы МШ-1 и МШ-10, объем пробы 1 мкл.
4. Газ-носитель – гелий.
5. Этиловый спирт.
6. Лупа измерительная с ценой делений 0,1 мм.
7. Секундомер.
8. Линейка.
9. Карандаш.
10. Условия газохроматографического анализа.

Режим разделения – изотермический.

Температура колонки 90 °С.

Температура испарителя 125 °С.

Скорость диаграммной ленты 600 мм/ч.

Ток детектора 110 мА.

Эффективность хроматографической колонки, характеризуемая «количеством теоретических тарелок» « N » и высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) « H », определяется многими параметрами опыта

и особенно скоростью потока газа-носителя (U). Зависимость H от U описывается эмпирическим законом Ван-Деемтера. Минимум на кривой определяет наименьшую величину H и оптимальную скорость потока подвижной фазы.

Выполнение работы

Включают хроматограф и выводят на заданный режим работы. Задают расход гелия $20 \text{ см}^3/\text{мин}$. Контроль скорости подачи газа-носителя проводят пенным измерителем скорости. Эту и последующие скорости пропускания подвижной фазы можно установить с отклонением значений $\pm 2 \text{ см}^3/\text{мин}$. Важно знать, при какой именно скорости газа проводится хроматографирование.

По установлении стабильной нулевой линии вводят в испаритель хроматографа микрошприцем 1 мкл этилового спирта, фиксируют момент ввода пробы и записывают хроматограмму. На полученной хроматограмме высота пика спирта должна достигать $70\text{--}90\%$ ширины диаграммной ленты. Если регистрируется значительно меньшие или «зашкаленные» пики, необходимо изменить объем пробы или чувствительность регистрации сигнала детектора. Затем при уточненных условиях хроматографирования записывают хроматограммы при скоростях потока газа-носителя: $25, 30, 35, 40, 50 \text{ см}^3/\text{мин}$. Хроматографирование проводят $2\text{--}4$ раза и приступают к обработке результатов.

Обработка результатов

Для каждой хроматограммы, полученной при выбранной скорости газа-носителя, рассчитывают число теоретических тарелок N и ВЭТТ по формулам:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad \text{или} \quad N = \left(\frac{2l_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad \text{и} \quad H = L/N,$$

где l_R – расстояние на хроматограмме, соответствующее полному удерживанию (t_R), т. е. от момента ввода пробы до вершины пика, см; $W_{0,5}$ – ширина пика на половине его высоты, см.

Рассчитывают число и высоту теоретических тарелок. Результаты определений и расчетов записывают в табл. 3.1. По полученным данным строят график, откладывая по оси абсцисс скорость подачи газа-носителя (U), а по оси ординат – усредненные значения ВЭТТ (H) и выбирают оптимальную скорость газа-носителя. Оптимальной скоростью будет та, которой соответствует точка перегиба на кривой.

Экспериментальные данные для определения оптимальной скорости газа-носителя

U , см ³ /мин	№ хром- мы	l , см	$W_{0,5}$, см	N	H	\bar{H} , сред- нее
20	1					
	2					
	3					
25	1					
	2					
	3					
...						

РАБОТА № 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ В ТОЛУОЛЕ

Цель работы: определение содержания всех или некоторых составляющих в смесях известного качественного состава методом внутренней нормализации и с использованием абсолютного калибровочного коэффициента на примере толуола как основного вещества.

Этапы работы

1. Хроматографирование толуола, содержащего примеси, и идентификация компонентов методом добавок.
2. Определение содержания всех компонентов смеси методом внутренней нормализации.
3. Получение хроматограмм примесей этилбензола, изопропилбензола или бензола в толуоле.
4. Приготовление искусственной смеси, близкой по составу к анализируемой, с известным содержанием всех компонентов.
5. Хроматографирование искусственной смеси и расчет абсолютного калибровочного коэффициента.
6. Хроматографирование контрольной смеси.
7. Расчет количества примесей в толуоле с использованием абсолютного калибровочного коэффициента.
8. Метрологическая оценка результатов количественных определений.

В настоящей работе рассматриваются все этапы количественных определений методом внутренней нормализации, позволяющим рассчитать содержание всех компонентов смеси, и методом с применением абсолют-

ного калибровочного коэффициента для определения содержания примесей в толуоле.

Аппаратура, условия, объекты хроматографирования

1. Хроматограф с детектором по теплопроводности.
2. Колонка стальная (2,5×3 мм).
3. Сорбент – трикрезилфосфат (ТКФ) на диатомитовом кирпиче, нанесенный в количестве 15 % от массы носителя (1,5 г).
4. Шприц медицинский емкостью 1,0 см³.
5. Микрошприц МШ-10.
6. Газ-носитель – гелий, расход 65 см³/мин.
7. Скорость движения диаграммной ленты – 200 мм/ч.
8. Ток детектора 100–110 мА.
9. Температура термостата колонки – 140 °С; термостата детектора – 160 °С, испарителя – 150–170 °С.
10. Объем пробы для анализа – 50 мкл и 5 мкл.
11. Толуол $\rho = 0,86694$ г/см³; этилбензол $\rho = 0,8669$ г/см³; изопропилбензол $\rho = 0,8618$ г/см³ марки х/ч для хроматографии.
12. Объекты хроматографирования:
искусственные градуировочные смеси известного качественного состава;
контрольные смеси известного качественного, но неизвестного количественного состава.

Выполнение работы

Подготавливают газовый хроматограф к работе по инструкции и выводят на заданный режим. Убедившись в регистрации устойчивого фонового сигнала, приступают к хроматографированию.

Вариант 1. Определение содержания толуола и примеси в нем методом внутренней нормализации

В шприц, предварительно промытый несколько раз анализируемой пробой, отбирают 50–100 мкл смеси и хроматографируют, фиксируя момент ввода пробы и время удерживания компонента, т. е. максимального отклонения пера самописца.

На пробных хроматограммах высота пика толуола (как компонента, содержащегося в наибольшей концентрации) должна достигать 70–80 % ширины диаграммной ленты. Если фиксируются значительно меньшие или «зашкаленные» пики, изменяют объем анализируемой смеси или чувствительность регистрации сигнала.

При выбранных параметрах получают несколько воспроизводимых хроматограмм анализируемого толуола, содержащего этилбензол и изопропилбензол. После этого проводят идентификацию пиков. Пик, имеющий наибольшую высоту, принадлежит основному компоненту – толуолу.

Это первый пик на хроматограмме. Затем методом добавок идентифицируют этилбензол или изопропилбензол. Для этого хроматографируют в тех же условиях анализируемую смесь с добавкой одного из компонентов примеси. В шприц набирают 50 мкл смеси и 10 мкл, предположим, этилбензола. Сравнивают полученную хроматограмму с хроматограммой анализируемой смеси. Увеличение высоты одного из пиков на хроматограмме смеси говорит о принадлежности его (в нашем случае) к этилбензолу.

Затем проводят количественный анализ хроматограммы.

Обработка результатов

Количественную расшифровку хроматограмм проводят методом внутренней нормализации, т. к. на хроматограмме зафиксированы все компоненты, присутствующие в анализируемой смеси.

Основным количественным параметром хроматограммы является площадь пика A (см²) или высота h (см). Высота пика – это перпендикуляр, опущенный из вершины пика на нулевую линию. Для нахождения площади пика умножают высоту пика (h) на его ширину, измеренную на половине высоты ($W_{0,5}$), т. е.

$$A = h \times W_{0,5}. \quad (25)$$

Метод внутренней нормализации состоит в отнесении измеренного количественного параметра к суммарным количественным параметрам всех компонентов пробы:

$$C_i (\%) = \frac{P_i}{\sum_{i=1}^n P_i} \cdot 100, \quad (26)$$

где C_i – содержание компонента в смеси, %;

P_i – высота или площадь пика.

Из полученных хроматограмм находят высоты, площади пиков, усредняют эти значения и вычисляют содержание толуола и примесей в анализируемой пробе. Результаты заносят в таблицу.

Таблица 3.2

Результаты определения содержания толуола, этилбензола и изопропилбензола в пробе

№ хр-мы	Компонент	h, см	h _{ср} , см	W _{0,5} , см	W _{0,5} , среднее, см	A, см ²	C _i , %	
							по h	по A
1	Толуол							
2								
3								
1	Этилбензол							
2								
3								
и т. д.								

Затем проводят сравнение полученных данных с истинными (μ), рассчитывают относительную ошибку определения D (%):

$$D (\%) = \frac{\mu - C_i}{\mu} \quad (27)$$

и делают заключение о том, какой параметр (A или h) позволяет более точно определить содержание компонента в пробе.

Вариант 2. Определение примеси этилбензола и изопропилбензола с использованием абсолютного калибровочного коэффициента

В настоящем варианте работы для количественного определения этилбензола и изопропилбензола в толуоле предварительно находят абсолютные калибровочные коэффициенты K_i . Для этого готовят искусственную смесь, близкую по составу к анализируемой, содержащую 1,9 г толуола, 0,1 г изопропилбензола и 0,1 г этилбензола. Смесь готовят в бюксе с притертой крышкой для предотвращения потерь за счет испарения.

Исходя из массы компонентов смеси, величин плотности (ρ) индивидуальных компонентов, рассчитывают их объемы в смеси. Бюкс взвешивают на аналитических весах, пипеткой вносят необходимый объем толуола, закрывают крышку, определяют массу, затем отмеряют последовательно пипеткой объемы этилбензола и изопропилбензола, каждый раз определяя массу бюкса. По полученным данным рассчитывают точное процентное содержание (массовые доли) в искусственной смеси каждого компонента. Затем микрошприцем отбирают 5,0 мкл смеси, определяют массу шприца с пробой на аналитических весах и вводят пробу в испаритель хроматографа, а шприц взвешивают. Затем определяют массу хроматографируемой пробы. После этого аналогичным образом хроматографируют контрольный образец толуола, содержащего примеси.

Обработка результатов

Для определения состава контрольной смеси необходимо рассчитать абсолютный калибровочный коэффициент K_i из данных, полученных для искусственной смеси:

$$K_i = \frac{m_i}{A_i}, \quad (28)$$

где m_i – масса i -го компонента в пробе, мг;

A_i – площадь пика i -го компонента, мм².

Массу i -го компонента в пробе рассчитывают по формуле:

$$m_i = \frac{m_{np} \cdot C_i (\%)}{100}, \quad (29)$$

где m_i – масса пробы, взятой для анализа, мг;

C_i (%) – процентное содержание (массовые проценты) i -го компонента в искусственной смеси.

$$C_i (\%) = \frac{m_i}{\sum_{i=1}^n m_i} \cdot 100. \quad (30)$$

Из хроматограмм контрольной смеси рассчитывают площадь пика этилбензола (2-й пик) и изопропилбензола (3-й пик) и берут среднее значение из трех опытов. Зная массу анализируемой навески, подсчитывают содержание примесей в толуоле по формуле:

$$C_i^x (\%) = \frac{K_i \cdot A_i^x}{m_{np}^x} \cdot 100, \quad (31)$$

где A_i – площадь пика компонента примеси на хроматограмме контрольной смеси, мм²;

m_{np}^x – масса пробы контрольной смеси, мг.

Полученные данные заносят в табл. 3.3–3.5 и проводят метрологическую оценку результатов определения.

Таблица 3.3

Результаты эксперимента для определения калибровочного коэффициента

Компонент	m бюкса (г)		m _i , мг	C _i (%)
	пустого	с навеской		
Толуол				
Этилбензол				
Изопропанол				

Таблица 3.4

Данные для анализа хроматограмм искусственной смеси

Компонент	№ хромомы	h _i , см	W _{0,5} , см	A _i , см ²	A _i среднее, см ²	m ₀ , масса шприца с пробой, г	Масса шприца, г	m _i , мг	K _i	K _i среднее
Изопропилбензол	1									
	2									
	3									
Этилбензол	1									
	2									
	3									

Таблица 3.5

Определение содержания этилбензола и изопропилбензола
в анализируемой смеси

Компонент	№ хр-мы	Масса шприца с пробой, г	Масса шприца, г	Масса пробы $m_{пр}^x$, мг	h_i , мм	$W_{0,5}$, мм	A , см ²	$C_{ср}$, %
Изопропил-бензол	1							
	2							
	3							
Этилбензол	1							
	2							
	3							

Затем рассчитывают относительную ошибку определения D (%) (см. вариант 1 настоящей работы).

Проводят расчет эффективности данной хроматографической системы и величины разрешения пиков этилбензола и изопропилбензола.

Для оценки эффективности разделения изомеров методом нормально-фазовой ВЭЖХ рассчитывают, исходя из полученных хроматограмм, число теоретических тарелок (N) и высоту, эквивалентную теоретической тарелке (H).

Затем вычисляют разрешение пиков R_S по формуле:

$$R_S = 2(t_{R_2} - t_{R_1}) / (W_1 + W_2)$$

или
$$R_S = (t_{R_2} - t_{R_1}) / (W_{0,5_1} + W_{0,5_2}), \quad (32)$$

где t_R – время удерживания пика;

W – ширина пика у основания;

$W_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты.

R_S – величина безразмерная, поэтому t_R и W должны быть выражены в одних и тех же единицах (например, в секундах или сантиметрах на ленте самописца).

Сравнивают полученные данные с истинными и рассчитывают относительную ошибку определения каждого изомера.

РАБОТА № 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПО ИНДЕКСАМ УДЕРЖИВАНИЯ КОВАЧА

Цель работы

1. Определение индексов удерживания Ковача расчетным и графическим способами и идентификация соединений в контрольных образцах. Сопоставление экспериментально найденных значений индексов со справочными данными.

2. Освоение косвенного метода определения времени пребывания в колонке (приборе) неударживаемого соединения (так называемого мертвого времени колонки) по полным временам удерживания трех ближайших гомологов.

Этапы работы

1. Хроматографирование опорной смеси, состоящей из 3–5 н-алканов (например, C_6 – C_{10}), в изотермическом режиме и контрольной смеси, содержащей, наряду с указанными выше н-алканами, неизвестные углеводороды других классов.

2. Расчет времени пребывания в колонке неударживаемого соединения, исходя из времен удерживания трех ближайших гомологов в опорной смеси.

3. Определение индексов удерживания Ковача расчетными и графическими методами.

4. Идентификация неизвестных компонентов в анализируемой смеси путем сопоставления их индексов удерживания Ковача, определенных графическим и расчетным способами, с табличными значениями.

Аппаратура, условия и объекты хроматографирования

1. Хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, расход водорода и воздуха – 30 и 300 $см^3/мин$ соответственно.

2. Разделительная колонка диаметром 0,3 см, и длиной 250 см с нанесенной жидкой фазой полиэтиленгликольадипинат в количестве 15 % от массы носителя.

3. Скорость потока газа-носителя (гелия) – 40 $см^3/мин$ (давление на выходе 5 атм).

4. Температура термостата колонок – 100 $^{\circ}C$.

5. Скорость движения диаграммной ленты 20 мм/мин.

6. Микрошприц МШ-1, объем пробы – 1 мкл.

7. Объемы хроматографирования в изотермическом режиме:

а) опорная смесь: н-алканы C_6 – C_{10} (например, гексан, октан, нонан, декан в объемном соотношении 10:1,0:2,7:3,0:3,3);

б) контрольные смеси н-алканов и углеводороды других классов (бензол, циклогексан, толуол, этилбензол и др.).

В газовой хроматографии для целей идентификации соединений применяют, как правило, интерполяционные характеристики и прежде всего индексы удерживания J . Индекс удерживания J введен в практику газохроматографического анализа в 1958 г. Ковачем.

Индексы удерживания (Ковача) в изотермической газовой хроматографии характеризуют удержание вещества i неподвижной фазы (НФ) при температуре t ($^{\circ}C$) относительно двух стандартных (реперных) н-алканов с числом атомов углерода z и $z + n$ ($n = 1, 2, 3$ и т. д.) и рассчитывается по формуле

$$J_{t,0C(i)}^{н.ф.} = 100 \left[z + n \frac{\lg t'_{R(i)} - \lg t'_{R(z)}}{\lg t'_{R(z+n)} - \lg t'_{R(z)}} \right] \quad (33)$$

при соблюдении условия

$$t'_{R(z)} \leq t'_{R(i)} \leq t'_{R(z+n)}. \quad (34)$$

Здесь $t'_{R(i)}$ – исправленное (приведенное) время удерживания неизвестного вещества;

$t'_{R(z)}$ – исправленное (приведенное) время удерживания n -алкана, регистрируемого на хроматограмме ранее неизвестного вещества;

$t'_{R(z+n)}$ – исправленное (приведенное) время удерживания n -алкана, регистрируемого на хроматограмме после неизвестного вещества.

Использование предложенной Ковачем формулы (1) для расчета J возможно, так как существует линейная зависимость между логарифмами исправленных параметров удерживания членов гомологических рядов (в первую очередь n -алканов) различными неподвижными фазами и числом атомов углерода z в молекулах хроматографируемых соединений:

$$\lg \bar{t}'_R = a + bz.$$

С целью повышения точности определения индексов удерживания следует использовать в качестве стандартных n -алканов ближайшие гомологи, различающиеся на один атом углерода. Уравнение (1) приобретает вид:

$$J_{t,0C(i)}^{н.ф.} = 100 \left[z + \frac{\lg t'_{R(i)} - \lg t'_{R(z)}}{\lg t'_{R(z+1)} - \lg t'_{R(z)}} \right]. \quad (35)$$

Ковач постулировал, что выбранные им в качестве стандартов n -алканы, независимо от природы неподвижной фазы и условий анализа, должны иметь численные значения индексов удерживания, равные числу углеродных атомов в молекуле, умноженному на 100 единиц (например, для метана – 100, для пентана – 500, для декана – 1000). Нулевое значение индекса приписывается водороду.

Возможно нахождение значений J из построенной графической зависимости в координатах $\lg t'_{Ri} - J$ или $\lg t'_{Ri} - n$. Графическое определение индексов удерживания не обеспечивает необходимой точности результатов, и при выполнении ответственных анализов находят индексы расчетным путем.

Исправленное (приведенное) время удерживания анализируемого вещества t'_R находят по уравнению

$$t'_R = t_R - t_m,$$

где t_R – полное время удерживания – это время от момента ввода пробы в хроматографическую колонку до момента выхода максимальной концентрации анализируемого вещества;

t_m – время пребывания в хроматографической системе неудерживаемого вещества (мертвое время).

В газовой хроматографии численные значения t_m могут быть найдены введением вещества, для которого коэффициент распределения очень мал по сравнению с его значением для других компонентов. Обычно (при работе с детектором по теплопроводности) для этой цели используют азот или воздух. При работе с ПИД значение t_m рассчитывают по пику метана, который вводят непосредственно перед дозированием анализируемого образца. Мертвое время колонки определяют расчетным методом по полным временам удерживания трех ближайших гомологов.

Выполнение работы

Выводят хроматограф на заданный режим работы. По установлении стабильной нулевой линии на диаграммной ленте приступают к хроматографированию опорной смеси n-алканов. Затем хроматографируют контрольную смесь. Хроматографирование проводят по несколько раз (по меньшей мере дважды) до получения воспроизводимых результатов по временам удерживания. В рекомендуемых условиях выполнения анализа на хроматограммах запишутся пики, занимающие по высоте 50–90 % ширины диаграммной ленты. Если по каким-либо причинам на хроматограммах будут записываться слишком малые или зашкаленные пики, следует изменить чувствительность регистрации или уменьшить объем пробы.

Обработка результатов

Для определения индексов удерживания Ковача необходимо знать исправленное время удерживания. Из всех полученных хроматограмм сначала находят полное время удерживания реперных n-алканов t_R и неизвестных компонентов. Для расчета времени пребывания в колонке несорбируемого вещества (мертвое время t_m) используем хроматограмму опорных смесей.

Расчет времени пребывания несорбируемого соединения по параметрам удерживания трех гомологов

При хроматографировании в изотермических условиях соединений, принадлежащих к какому-либо гомологическому ряду, имеет место линейная зависимость между $\lg t'_R$ и числом n атомов углерода в молекуле

$$\lg t'_R = a + bz,$$

где a и b – константы.

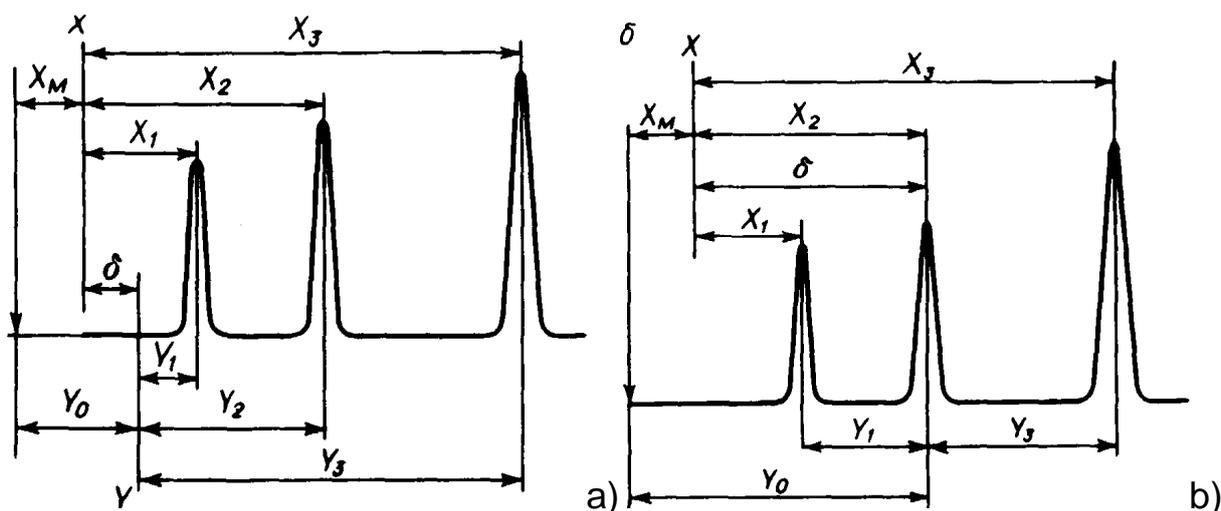


Рис. 3.3. Гипотетические хроматограммы трех последовательно элюируемых ближайших гомологов

Обозначим на гипотетической хроматограмме трех последовательно выходящих из колонки ближайших гомологов исправленные расстояния до вершин пиков через X_1 , X_2 и X_3 соответственно (рис. 3.3а). Если расстояния до вершин пиков гомологов измерять не от вершины пика несорбируемого газа (X), а от произвольно выбранной точки (Y), то расстояния Y_1 , Y_2 , и Y_3 будут отличаться от X_1 , X_2 и X_3 на величину δ :

$$X_i = Y_i + \delta.$$

Так как значение логарифма X_i пропорционально n , что можно представить в виде

$$\lg(Y_i + \delta) \sim z,$$

то при условии $n_2 - n_1 = n_3 - n_2$ (т. е. для трех ближайших гомологов) можно записать

$$\frac{Y_2 + \delta}{Y_1 + \delta} = \frac{Y_3 + \delta}{Y_2 + \delta},$$

откуда

$$\delta = \frac{Y_2^2 - Y_3 Y_1}{Y_3 + Y_1 - 2Y_2}.$$

Зная δ , нетрудно найти X_M (расстояние на хроматограмме от стартовой отметки до вершины пика несорбируемого газа). Если δ положительна, $X_M = Y_0 - \delta$, если δ отрицательна, $X_M = Y_0 + |\delta|$.

Для упрощения расчетов за Y_0 принимают расстояние от стартовой отметки до вершины пика среднего гомолога (см. рис. 3.3.б). В этом случае $Y_0 = 0$, а Y_i становится отрицательной величиной, и тогда:

$$\delta = \frac{Y_3 Y_1}{Y_3 - Y_1}.$$

Окончательно:

$$X_M = Y_0 - [Y_3 Y_1 / (Y_3 - Y_1)]. \quad (36)$$

Экспериментальные данные, необходимые для расчета мертвого времени колонки (прибора) по параметрам удерживания трех n-алканов. Величины Y_0 , Y_1 , и Y_3 измеряют на хроматограммах опорных смесей линейкой с точностью 0,5 мм либо (что предпочтительнее!) находят из данных измерения параметров удерживания с помощью секундомера или интегратора, включенных немедленно после дозирования.

Результаты измерений и расчетов заносят в табл. 3.6.

Таблица 3.6

Параметры хроматографической системы

Номер хроматограммы	Y_3	Y_1	Y_2	$\delta = \frac{Y_3 Y_1}{Y_3 - Y_1}$	$X_M = t_m$ текущее	t_m среднее
1						
2						
3						
.....						

Определение индексов удерживания Ковача веществ, содержащихся в опорных (реперных) и контрольных смесях

Сопоставив величины t_R , найденные из хроматограмм опорной и контрольной смесей, идентифицируют на последней пики n-алканов и приписывают им индексы удерживания (J), равные числу атомов углерода, умноженному на 100 единиц. В параметры удерживания t_R всех компонентов, зарегистрированных на хроматограммах, вносят поправку на время пребывания в колонке неудерживаемого соединения t_m (рассчитанную или найденную экспериментально). Затем усредняют t_R , найденные по нескольким последовательно записанным хроматограммам, и логарифмируют численные значения \bar{t}'_{R_i} .

После этого строят графическую зависимость между $\lg \bar{t}'_{R_i}$ n-алканов (по оси ординат) и приписанными им индексами удерживания $J = z \times 100$ (по оси абсцисс).

Индексы удерживания соединений, присутствующих в анализируемой смеси, находят по построенному графику, определив величины \bar{t}'_{R_i} из хроматограмм.

Много точнее индексы удерживания неизвестных компонентов смесей можно найти по формуле (33). Результаты идентификации компонентов контрольной смеси по индексам Ковача заносят в табл. 3.7.

Таблица 3.7

Результаты идентификации компонентов контрольной смеси по индексам удерживания Ковача

№ хр-мы	№ пика	t_{R_i}	t'_{R_i} текущее	\bar{t}'_{R_i} среднее	$\lg \bar{t}'_{R_i}$	J(i)	Название компонента смеси
1							
2							
...							
1							
2							
...							
...							

Сравнивая найденные значения J для соединений, содержащихся в смесях известного качественного состава с имеющимися справочными данными, оценивают правильность проведенного эксперимента и надежность выполненных измерений и расчетов. Если расхождения между найденными и табличными данными не превышают ± 8 единиц, проводят идентификацию соединений, содержащихся в контрольной смеси. Результаты идентификации представляют в табл. 3.7.

При оформлении лабораторного журнала необходимо: 1) представить все полученные хроматограммы; 2) оценить эффективность работы колонки по одной из хроматограмм числом теоретических тарелок; 3) оценить погрешность измерения параметров удерживания (t_R и t_m) и возможные источники ошибок.

РАБОТА № 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОКОЛИЧЕСТВ АЦЕТОНА В ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЕ

Цель работы: определение микроколичеств ацетона в воде методом абсолютной градуировки с использованием статического парофазного анализа.

Этапы работы

1. Подготовка стандартных растворов и проб водопроводной воды к анализу.
2. Проведение экстракции ацетона воздухом и хроматографирование образцов.
3. Определение количества ацетона в водопроводной воде.

Контроль за содержанием примесей органических соединений в питьевой воде, обладающих токсическим действием, является актуальной проблемой в санитарно-химическом анализе. В водопроводной воде обнаруживаются примеси многих химических веществ: фенолы, хлорфенолы, ароматические углеводороды, альдегиды, кетоны, спирты, эфиры и др. – всего более 70–80 потенциальных экотоскикантов, содержание которых необходимо контролировать. К числу опасных для здоровья человека органических веществ относится ацетон. Предельно допустимая концентрация ацетона в воде (ПДК) составляет 4 мг/дм³. Поэтому необходимо иметь методы, позволяющие контролировать меньшее его содержание в анализируемом образце (~0,1–10 мг/дм³).

Для определения ацетона используют газовую хроматографию. Простейшие методы прямого ввода в хроматографическую колонку водных проб большого объема не получили распространения, т. к. наблюдается снижение чувствительности детектора под действием паров воды. Поэтому требуется предварительное концентрирование летучих компонентов. Использование жидкостной экстракции для этих целей не находит применения из-за необходимости тщательной очистки экстрагентов от примесей. Чаще пользуются методами, предусматривающими экстракцию летучих веществ газом (воздухом) в статических условиях с последующим газохроматографическим анализом равновесной паровой фазы над жидкостью.

В настоящей работе определение ацетона в водопроводной воде проводится методом абсолютной градуировки с использованием приемов статического парофазного анализа.

Аппаратура, условия, объекты хроматографирования

1. Хроматограф с пламенно-ионизационным детектором.
2. Колонка стальная (3 м × 3 мм), заполненная сферохромом с нанесенным на него полиэтиленгликольадипинатом в количестве 15 % от массы носителя.
3. Температура термостата колонок – 100 °С, испарителя – 125 °С.
4. Скорость газа-носителя (гелия) – 40 см³/мин; водорода – 35 см³/мин; воздуха – 300 см³/мин.
5. Скорость движения диаграммной ленты – 600 мм/ч.
6. Рабочий диапазон записи – 50×10^{-12} А.
7. Шприцы медицинские, объемом 5–20 см³.
8. Микрошприц МШ-10.
9. Шкаф сушильный, температура 80 °С.
10. Флаконы стеклянные емкостью 50 см³ (10 см³) с резиновыми пробками и фиксирующими колпачками с отверстиями (диаметр ~ 2 мм) под иглу дозирующего устройства.
11. Мерные колбы, емкостью 500,0 см³ – 1 шт. и 100,0 см³ – 5 шт.
12. Пипетки объемом 5,00, 10,00 и 25,00 см³.
13. Ацетон квалификации «для хроматографии» или «х. ч.».

Выполнение работы

Приготовление стандартных растворов ацетона

Для построения градуировочного графика необходимо приготовить растворы, содержащие 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 мг/дм³ ацетона. Эти растворы приготавливают методом разбавления исходного стандартного раствора, концентрация которого составляет 10 мг/дм³. Для этого в мерную колбу емкостью 500 см³, заполненную дистиллированной водой, вносят микрошприцем 6,3 мкл ацетона. Колбу закрывают пробкой и тщательно перемешивают в течение 5 мин. Приготовленный раствор необходимо сразу использовать для приготовления серии стандартных растворов. В четыре мерные колбы емкостью 100,0 см³, заполненные на 1/3 водой, вносят пипеткой 5,0; 10,0; 20,0 и 50,0 см³ исходного стандартного раствора ацетона, доводят до метки водой, тщательно перемешивают и используют для проведения парофазного анализа.

Подготовка проб градуировочных растворов и водопроводной воды к анализу

В чистые флаконы для парофазного анализа емкостью 15 см³ (50 см³) вносят шприцем 0,6 или 3,0 см³ стандартных растворов ацетона. Немедленно герметизируют их резиновыми пробками и фиксирующими колпачками или используют металлические стаканы-рубашки с завинчивающимися крышками, прижимающими пробки к фланцу флакона. Аналогичным образом подготавливают образцы анализируемой воды. Приготовленная партия с пробами каждого градуировочного раствора и анализируемой воды должна включать не менее трех флаконов.

Закрытые флаконы помещают в воздушный термостат при температуре 60 °С и выдерживают в нем в течение 40 мин. Этого времени достаточно для установления равновесия между жидкой и паровой фазами.

Получение хроматограмм подготовленных образцов

Включают хроматограф и выводят на заданный рабочий режим. По истечении времени достижения равновесия (40 мин) флаконы по одному, начиная с наименьшей концентрации, вынимают из термостата, прокалывают пробку иглой шприца и отбирают 0,7 см³ (2,0 см³) паровой фазы и вводят в испаритель хроматографа. При этом фиксируют момент ввода пробы и время удерживания ацетона, которое в рекомендуемых условиях хроматографирования составляет ~ 1 мин (на хроматограмме первым появляется «зашкаленный» пик воздуха (кислорода)).

Получают по три хроматограммы каждого из стандартных и анализируемых растворов, ограничиваясь однократным отбором порции равновесной паровой фазы из соответствующего флакона.

Обработка результатов

На всех полученных хроматограммах проводят нулевую линию, измеряют высоту пиков ацетона (h , см) их ширину на половине высоты ($W_{0,5}$, см). Усредняют эти величины, относящиеся к каждому градуировочному раствору и контрольному образцу, и рассчитывают площади пиков ацетона по формуле:

$$A = h \times W_{0,5}.$$

Заносят эти данные в таблицу. Полученные данные используют для построения градуировочного графика, откладывая на оси ординат A (или h), а по оси абсцисс – концентрации ацетона в соответствующих стандартных растворах (c , мг/дм³). Пользуясь построенным графиком, находят содержание ацетона в анализируемом растворе (c_x , мг/дм³).

Таблица 3.8

Данные для построения градуировочного графика

№	Объем стандартного раствора, см ³	Концентрация ацетона, мг/дм ³	h_i , см	$W_{0,5}$, см	A , см ²	$A_{cp.}$, см ²
1						
2						
3						
1						
2						
3						

Сверяют найденные величины с истинными (имеющимися у преподавателя) и рассчитывают абсолютную и относительную погрешности определения (см. работу № 3). Относительная ошибка не должна превышать $\pm 15\%$.

РАБОТА № 6. ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОТЕРМ СОРБЦИИ СПИРТОВ МЕТОДОМ ГЛЮКАУФА

Цель работы: освоение метода построения изотермы сорбции на примере n -спиртов по результатам хроматографического анализа.

Этапы работы

1. Регистрация хроматограммы n -спирта.
2. Расчет и построение изотермы сорбции одного из предложенных преподавателем спирта.

Основой для определения изотерм сорбции методом Глюкауфа является контур хроматографической зоны. При этом считают, что он практически не искажается под влиянием диффузионных и кинетических факторов. Размытие хроматографического пика обусловлено только видом изотермы сорбции. В настоящей работе расчет изотермы сорбции проводят по десорбционной (тыльной) ветви элюционного пика.

Аппаратура, условия и объекты хроматографирования

1. Хроматограф с детектором ионизации пламени.
2. Колонка длиной 3 м, диаметром 3 мм, заполненная полиэтиленгликольадипинатом на диатомитовом кирпиче в количестве 15 % от массы носителя (1,5 г).
3. Шприц медицинский на 5 см³.
4. Линейка логарифмическая.
5. Баллон с газом-носителем гелием.
6. Секундомер.
7. Набор спиртов для хроматографии, бюксы.
8. Условия газохроматографического анализа.

Скорость потоков:

газа-носителя – 40 см³/мин;

водорода – 35 см³/мин;

воздуха – 300 см³/мин.

Режим разделения – изотермический.

Температура колонки – 90 °С.

Температура испарителя – 125 °С.

Скорость диаграммной ленты – 2400 мм/ч (4 см/мин).

Выполнение работы

Выводят хроматограф на заданный режим работы. По установлении стабильной нулевой линии дозируют микрошприцем пробу н-спирта (1,0 мкл) или смесь одного из н-спиртов с воздухом медицинским шприцем ($V_{\text{проб}} = 50$ мкл). При этом фиксируют момент ввода пробы и время удерживания компонентов. В случае хроматографирования н-спирта дополнительно получают хроматограмму воздуха.

Высота пика спирта на хроматограмме должна составлять 70–90 % ширины диаграммной ленты самописца. Если фиксируются значительно меньшие или «зашкаленные» пики, необходимо изменить объем хроматографируемого соединения или чувствительность регистрации детектора. Хроматографирование проводят 2–4 раза и приступают к обработке результатов.

Обработка результатов

Построение изотермы сорбции предусматривает установление зависимости между количеством сорбированного вещества в расчете на 1 г сорбента (a_i) и концентрацией его в газовой фазе или парциальным давлением (p_i).

Распространенным методом определения изотерм сорбции является метод Глюкауфа, основанный на применении фронтального варианта. Основой для расчета изотермы является контур хроматографической зоны. При этом считают, что он практически не искажается под влиянием диффузионных и кинетических факторов. Развитие хроматографического пика обусловлено только видом изотермы сорбции.

Расчет изотермы сорбции проводят по десорбционной (тыльной) ветви элюционного пика.

В общем случае сорбция подчиняется изотерме Ленгмюра:

$$a = \frac{bc}{1 + bc}, \quad (37)$$

где a – количество адсорбированного вещества, c – равновесная концентрация сорбата в газовой фазе; b – константа сорбционного равновесия. Если адсорбированное количество вещества a отнести к 1 г адсорбента, то

$$a = \frac{1}{g} \int_0^c V'_R dc, \quad (38)$$

где g – масса адсорбента, г; V'_R – приведенный объем удерживания, отвечающий концентрации сорбата c .

Поскольку V'_R пропорционален $l_h - l_0$, где l_h и l_0 – расстояния на хроматограмме, отвечающие соответственно удерживанию сорбата и несорбирующегося газа, уравнение (38) можно записать следующим образом:

$$a = \frac{1}{g} \cdot k \int_0^h (l_h + l_0) dh, \quad (39)$$

где k – калибровочный коэффициент, определяемый как отношение введенной пробы к площади полученного пика; $h = c/k$ – отклонение пера регистратора, соответствующее концентрации c . Таким образом, изотерма сорбции определяется как зависимость между площадью пика Q и соответствующим ей отклонением пера регистрации h (рис. 3.4).

Если определение изотермы сорбции проводят по десорбционной тыльной ветви эволюционного пика, то задача сводится к установлению зависимости между площадями полос, ограниченных с одной стороны ординатой, проведенной из точки максимума несорбирующегося компонента, а с другой стороны – десорбционной ветвью пика сорбата и их высотами.

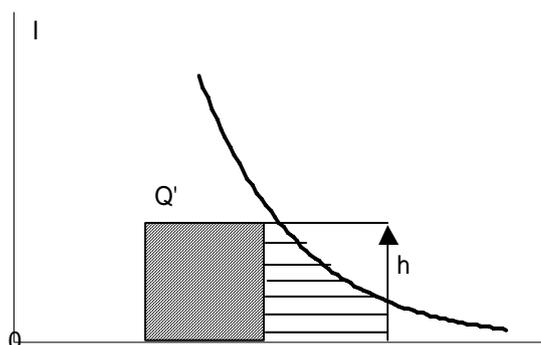


Рис. 3.4. Определение изотермы сорбции по развитой десорбционной ветви элюционного пика

Для построения изотермы сорбции на хроматограмме площадь, ограниченную ординатой, проведенной из точки максимума несорбирующегося компонента (l_0P , см. рис. 3.5), нулевой линией l_0O десорбционной ветвью пика спирта NO и абсциссой максимума пика спирта NP, делят на 10 полос равной высоты. Находят высоту пика спирта h и высоту каждой из полос Δh .

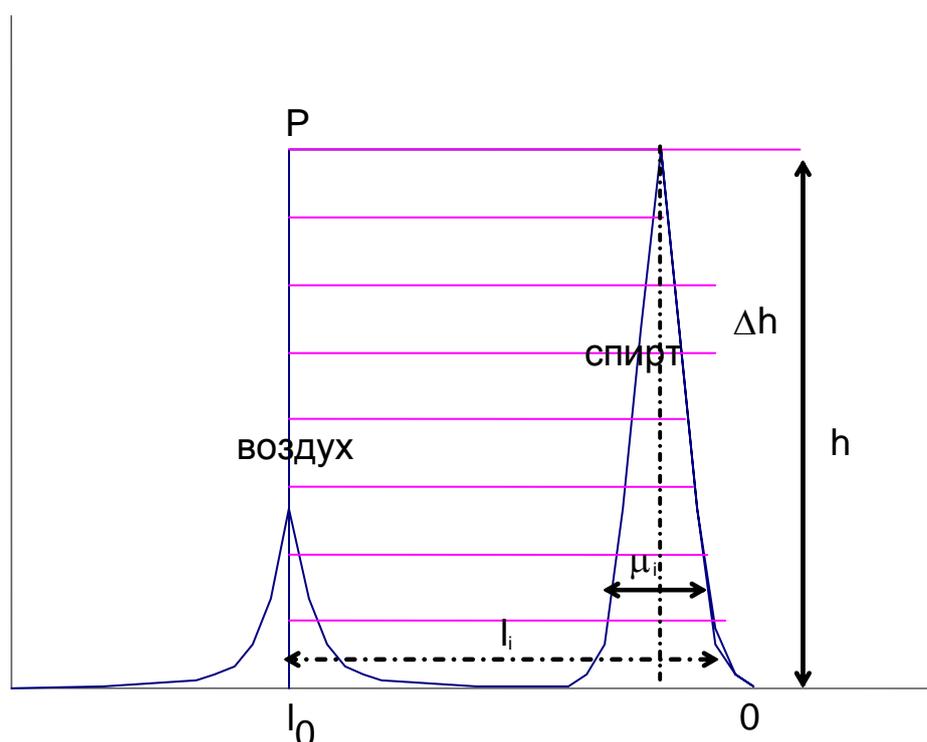


Рис. 3.5. Представление хроматографических пиков в виде трапеций и определение параметров для расчета изотермы

Если аппроксимировать каждую из полос трапецией, то площадь вычисляют как произведение $l_i \Delta h$ (где l_i – средняя линия трапеции).

Для определения площади пика измеряют длины полос, ограниченных адсорбционной и десорбционной ветвями пика μ_i .

Количество адсорбированного вещества, выраженное в ммольях на грамм сорбента, вычисляют по формуле:

$$a_i = \frac{g_{np} \cdot Q_{adc}}{M_2 \cdot g \cdot Q}, \quad (40)$$

где M_2 – молярная масса спирта;

g – масса сорбента, г;

Q – площадь пика, см²;

Q_{adc} – сумма площадей полос, см².

Концентрация сорбата в газовой фазе C_i в мг/см³ будет равна

$$C_i = \frac{g_{np} \cdot B}{Q \cdot V_{np}} \cdot h_i, \quad (41)$$

где h_i – сумма высот i полос ($h_i = \sum_{i=1}^n \Delta h$);

B – скорость диаграммной ленты, см/мин;

V_{np} – скорость газа-носителя, см²/мин.

Парциальное давление спирта в газовой фазе рассчитывают по формуле:

$$P_i = \frac{g_{np} \cdot B}{Q \cdot M_2 \cdot V_{np}} \cdot R \cdot T \cdot h_i, \quad (42)$$

где R – газовая постоянная, равная $8,314 \times 10^3$ Дж/К;

T – температура, К (363 К).

Результаты измерения l_i из 3-х хроматограмм (рис. 2), $Q_i = l_i \Delta h$, сумм площадей полос $Q_{adc} = Q_i + Q_{i+1}$, высот полос $h_i + h_{i+1}$ (начиная с нижней) и длины полос пика спирта μ_i заносят в табл. 3.9.

По формуле $Q = \Delta h_i \Sigma \mu_i$ рассчитывают площадь пика спирта и заносят в табл. 3.9.

Таблица 3.9

Полоса	l_i , см	Δh_i , см	$Q = l_i \Delta h_i$,	Q_{adc} , см	h_i , см	μ_i , см
1						
2						
3						
...						
10						

Парциальное давление p_i (Па) вычисляют по формуле (42). Результаты расчетов заносят в табл. 3.10 и на ее основе строят изотерму адсорбции (график зависимости a_i от p_i).

Таблица 3.10

Полоса	a_i , МКМОЛЬ	P_i , Па
1		
2		
3		
...		
10		

Исходя из вида изотермы сорбции, делают вывод о механизме процесса сорбции спирта данным сорбентом.

РАБОТА № 7. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЕ (АСПИРИНЕ) МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

Цель работы: определить наличие примесей салициловой кислоты и их количество в лекарственном препарате аспирина (ацетилсалициловой кислоте), используя метод обращенно-фазовой хроматографии.

Этапы работы

1. Проведение хроматографирования растворов аспирина и салициловой кислоты.
2. Качественный анализ хроматограммы аспирина и определение количества примеси салициловой кислоты.

Аппаратура, условия и объекты хроматографирования

1. Жидкостный хроматограф «Милихром» или «Стайер».
2. Хроматографическая стальная колонка (62×2 мм) для хроматографа «Милихром» или Luna C18 для хроматографа «Стайер», заполненные сорбентом с обращенной фазой (C₁₈) с размером зерен 5 мкм.
3. Элюент – 40%-й раствор этанола в 1%-м растворе уксусной кислоты.
4. Скорость потока элюента – 50 мкл/мин.
5. Детектор – спектрофотометрический.
6. Длина волны при записи хроматограммы – 280 нм.
7. Диапазон чувствительности – 0,8.
8. Время измерения – 0,6 с.
9. Ацетилсалициловая кислота (аспирин).
10. Салициловая кислота марки «х. ч.».
11. 1% и 5%-ные растворы уксусной кислоты.

Выполнение работы

Перед началом работы подготовленную подвижную фазу надо дегазировать – освободить от растворенного воздуха, который нарушает нормальную работу хроматографа, вызывая дрейф нулевой линии, снижая уровень адсорбции. Дегазацию проводят потоком гелия через элюент в течение 3–5 мин.

Приготовление растворов для хроматографирования

Для работы необходимы растворы салициловой кислоты концентрацией 1 мг/мл и аспирин с концентрацией 4 мг/мл, которые готовят по точной навеске, взятой на аналитических весах (необходимый объем раствора определяет преподаватель).

Растворителем является элюент – 40%-й раствор этанола в 1%-ом растворе уксусной кислоты. Для приготовления подвижной фазы смешивают 40 мл этилового спирта и 60 мл 1%-го раствора уксусной кислоты, которую готовят методом разбавления из ледяной уксусной кислоты. Для проведения хроматографирования приготавливают 5%-ный раствор уксусной кислоты.

Проведение хроматографирования

Включают хроматограф согласно инструкции. Задают условия хроматографирования: длину волны, чувствительность, время измерения, скорость диаграммной ленты. Заполняют насос и колонку элюентом, задают скорость подачи элюента. Затем хроматографируют раствор аспирина и салициловой кислоты. Для этого в устройство для ввода пробы набирают 10 мкл 5%-ного раствора уксусной кислоты (для создания оптимальной величины рН сорбции) 5 мкл раствора салициловой кислоты и 10 мкл 5%-ного раствора уксусной кислоты. Проводят хроматографирование. Пик салициловой кислоты должен занимать не более 30 % ширины диаграммной ленты. Если на хроматограмме пик будет значительно больше или меньше этой величины, то изменяют объем пробы или диапазон чувствительности. При уточненных условиях снимают две–три хроматограммы салициловой кислоты и ацетилсалициловой кислоты. Набор пробы раствора аспирина проводят таким же образом, как и салициловую кислоту. (На хроматограмме аспирина пик ацетилсалициловой кислоты «зашкален».)

Обработка результатов

1. Проводят идентификацию пика салициловой кислоты на хроматограмме аспирина по равенству времени удерживания на хроматограмме индивидуального компонента и в анализируемой пробе. Время удерживания t_R рассчитывают из хроматограммы (см. работу б).

2. Рассчитывают содержание салициловой кислоты в аспирине. Вычисление содержания примеси основано на измерении высот пиков сали-

циловой кислоты на хроматограмме индивидуального раствора салициловой кислоты (h_c , см) и анализируемого раствора (h_a , см). Так как концентрация раствора салициловой кислоты в стандартном растворе известна, то содержание салициловой кислоты в аспирине в процентах

$$C_{Ca}, \% = \frac{h_a}{h_c} \cdot \frac{C_c}{C_a^{ucx}} \cdot \frac{V_c}{V_a} \cdot 100,$$

где h_a – высота пика салициловой кислоты в анализируемом растворе ацетилсалициловой кислоты, см;

h_c – высота пика салициловой кислоты в стандартном растворе, см;

C_c – концентрация стандартного раствора салициловой кислоты, мг/мл;

C_a^{ucx} – концентрация анализируемого раствора ацетилсалициловой кислоты, мг/мл;

V_c – объем пробы стандартного раствора салициловой кислоты, мкл;

V_a – объем пробы анализируемого раствора ацетилсалициловой кислоты, взятой для анализа, мкл.

Полученные данные заносят в таблицу и делают заключение о качестве лекарственного препарата – ацетилсалициловой кислоты. Необходимо заметить, что в лекарственных препаратах допускают наличие примесей в количестве 5 %.

Таблица 3.11

Результаты определения содержания салициловой кислоты в ацетилсалициловой кислоте

№ хр-мы	Салициловая кислота	C, мг/мл	V, об. пр., см ³	h, см	h _{ср} , см	C _i , %	C _{срi} , %
1	Стандартный раствор						
2							
3							
1	Анализируемая кислота						
2							
3							

По результатам хроматографирования делают заключение о наличии примесей салициловой кислоты и их количестве в ацетилсалициловой кислоте.

РАБОТА 8. РАЗДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ТСХ В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ ПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ

Цель работы: определение влияния структуры молекулы на параметры удерживания и эффективность системы по отношению к разделяемым компонентам.

Этапы работы

1. Подготовка хроматографической камеры.
2. Подготовка хроматографической пластинки.
3. Хроматографирование стандартов и анализируемых образцов.
4. Проявление пластинки.
5. Расчет параметров хроматографирования дикарбонových кислот.

Нанесенные на пластину дикарбонové кислоты перемещаются по тонкому слою сорбента с различными скоростями. Чем больше молекулярная масса кислоты, тем с большей скоростью перемещаются ее молекулы, на чем и основано разделение. Появление полярных групп (в винной кислоте) также оказывает влияние на разделение дикарбонových кислот. Формулы некоторых дикарбонových кислот представлены в табл. 3.12.

Таблица 3.12

Исследуемые дикарбонové кислоты

Кислота	Формула
Щавелевая	HOOC-COOH
Янтарная	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH
Глутароная	HOOC-(CH ₂) ₃ -COOH
Адипиновая	HOOC-(CH ₂) ₄ -COOH
Себациновая	HOOC-(CH ₂) ₈ -COOH
Винная	HOOC-CH(OH)CH(OH)-COOH

Аппаратура, условия и объекты хроматографирования

1. Камера стеклянная для ТСХ диаметром 150 мм, высотой 250 мм из химически стойкого стекла.
2. Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.
3. Сушильный шкаф.
4. Микрошприцы Hamilton или МШ-1 на 1.0 мкл.
5. Стандартные этанольные растворы дикарбонových кислот массовой долей 0,5 % (см. табл. 3.12).
6. Индикатор бромкрезоловый пурпурный (бромфеноловый синий или бромкрезоловый синий), 0,04 %-й раствор в 50 % этаноле с подщелачиванием 0,1 М NaOH до pH 10.
7. Пластинки «Силуфол», покрытые тонким слоем силикагеля.

8. Подвижная фаза: этанол, аммиак, дистиллированная вода, смешанные в объемном соотношении 100 : 16 : 12.

9. Источник сжатого воздуха

Подготовка к работе

В камеру для проведения анализа помещают полоску фильтровальной бумаги, ширина которой равна высоте камеры. Наливают 45–50 см³ подвижной фазы, закрывают камеру стеклом и оставляют в таком состоянии на 1,0–1,5 часа до полного насыщения парами подвижной фазы.

На хроматографической пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 20 мм от края. При помощи микрошприца на нее наносят 1,0 мкл стандартных и анализируемых растворов с интервалом 15 мм. Диаметр наносимых капель не должен превышать 3–5 мм. Для этого раствор наносят небольшими порциями при удалении растворителя в потоке воздуха.

Выполнение работы

Пластинку с нанесенными на нее каплями помещают в подготовленную камеру таким образом, чтобы пятна были выше уровня подвижной фазы. Пластинку выдерживают в закрытой камере до тех пор, пока фронт растворителя поднимается на высоту 12 см до линии финиша, нанесенной заранее карандашом. Затем ее вынимают из камеры; высушивают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 60 мин до полного удаления подвижной фазы.

После охлаждения пластинку опрыскивают из пульверизатора раствором бромкрезолового пурпурного (или другого проявителя), подсушивают в шкафу при температуре 80–90 °С в течение 3–6 мин. Карандашом отмечают желтые пятна, которые соответствуют положению дикарбоновых кислот.

Обработка результатов

Для идентификации дикарбоновых кислот рассчитывают значения R_f стандартных растворов кислот и исследуемого вещества, нанесенного на эту же пластинку по формуле (7):

$$R_f = \frac{l}{L}, \quad (7)$$

где l – расстояние от линии старта до центра пятна;

L – расстояние от линии старта до линии финиша растворителя (см. рис. 1.4).

Полученные данные используют для оценки эффективности хроматографического разделения. По данным хроматографического разделения рассчитывают высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ), и число теоретических тарелок (N):

$$N = 16 \left(\frac{l}{w} \right)^2, \quad (43)$$

где l – расстояние от стартовой линии данного вещества до нижней границы пятна, образованного зоной этого вещества;

w – расстояние от нижней до верхней границы того же пятна (см. рис. 1.4).

$$BЭТТ = \frac{l}{N} = \frac{w^2}{16l}. \quad (44)$$

Результаты измерений и вычислений заносят в табл. 3.13.

Таблица 3.13

Результаты хроматографического разделения кислот

Анализируемая кислота	l	L	R_f	w	N	$BЭТТ$
1. Щавелевая						
2. Адипиновая						
3. Янтарная						
4. Себациновая и др.						
Исследуемое вещество						
Пятно № 1						
Пятно № 2						
Пятно № 3 и т. д.						

На основании данных табл. 3.13 делают вывод о качественном составе анализируемой смеси, сравнивая значения R_f пятен смеси и стандартных растворов и эффективности хроматографирования.

РАБОТА 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ В ПРЕПАРАТАХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПО ДАННЫМ ТСХ

Цель работы: определение чистоты веществ в препарате.

Этапы работы

1. Подготовка хроматографической камеры.
2. Приготовление растворов стандартных образцов вещества свидетеля.
3. Подготовка хроматографической пластинки.
4. Хроматографирование стандартов и анализируемых образцов.
5. Высушивание пластинки.
6. Освещение пластинки в УФ-свете или визуализация пятен с помощью индикаторов (в зависимости от хроматографической системы).

Часть 1. Определение содержания примесей в никотиновой кислоте

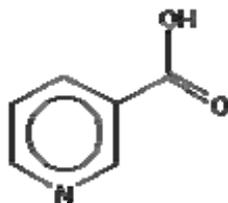
Аппаратура, условия и объекты хроматографирования

1. Камера стеклянная для ТСХ диаметром 90 мм, высотой 150 мм из химически стойкого стекла.
2. Сушильный шкаф.
3. Микрошприц МШ-10.
4. Пластинки, покрытые слоем силикагеля F₂₅₄.
5. Карандаш.
6. Подвижная фаза – смесь растворителей: пропанол-1 – кислота муравьиная безводная – вода (85:10:5).
7. Стандартный раствор никотиновой кислоты массовой долей 0,005 %.
8. Хромоскоп с УФ-излучением при $\lambda = 254$ нм.

Выполнение работы

Приготовление раствора стандартного образца вещества свидетеля (СОВС)

Никотиновая кислота:



Точную навеску никотиновой кислоты 0,5000 г (0,2500 г) растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 50,00 см³ (25,00 см³) при легком нагревании, охлаждают, доводят водой до метки. Мерной пипеткой переносят 0,50 см³ полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100,0 см³, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

Хроматографирование

На линию старта пластинки, покрытой слоем силикагеля F₂₅₄, наносят при подсушивании током холодного воздуха 10 мкл (100 мкг) 1%-ного раствора препарата и рядом в качестве СОВС наносят 10 мкл (0,5 мкг) и 4 мкл (0,2 мкг) 0,005%-ного раствора кислоты никотиновой в воде. Пластинку с нанесенными пробами просушивают на воздухе в течение 15 минут. Помещают в камеру с элюентом, представляющим собой смесь растворителей: пропанол-1 – кислота муравьиная безводная – вода (85:10:5) – и хроматографируют восходящим методом.

Когда фронт подвижной фазы пройдет 80 % высоты пластинки, ее вынимают из камеры, сушат в течение 10 мин при температуре 100–105 °С и просматривают в УФ-свете при $\lambda = 254$ нм. Пятна веществ, видимые в УФ-свете, аккуратно обводят карандашом.

На хроматограмме испытуемого раствора препарата допускается появление только одного пятна примеси, по совокупности величины и интенсивности окраски не превышающего пятна на хроматограмме раствора СОВС (не более 0,5 %). По величине пятен и интенсивности их окраски делают заключение о наличии примесных компонентов. Если интенсивность пятен примесей сравнима с интенсивностью и величиной пятен одного из СОВС с известным содержанием вещества в пробе, то проводят полуколичественное определение примеси относительно содержания стандартных образцов вещества свидетеля.

Примечание: пригодность хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме видно пятно 0,2 мкг никотиновой кислоты с $R_f = 0,65$.

Часть 2. Определение содержания примесей в новокаине

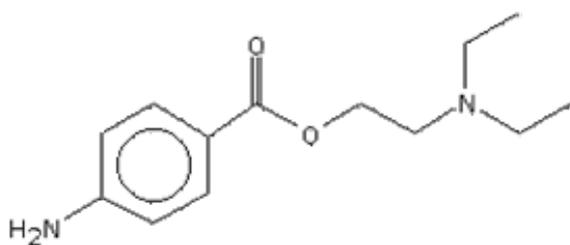
Аппаратура, условия и объекты хроматографирования

1. Камера стеклянная для ТСХ диаметром 90 мм, высотой 150 мм из химически стойкого стекла.
2. Хромоскоп с УФ-излучением при $\lambda = 254$ нм.
3. Сушильный шкаф.
4. Микрошприц МШ-10.
5. Стандартный раствор новокаина массовой долей 0,005 %.
6. Пластинки, покрытые слоем силикагеля F_{254} .
7. Подвижная фаза – смесь растворителей: пропанол-1 – кислота муравьиная безводная – вода (85:10:5).
8. Карандаш.

Выполнение работы

Приготовление раствора СОВС

Новокаин:



Точную навеску новокаина 0,0025 г растворяют в этаноле в мерной колбе вместимостью 25,00 см³.

Хроматографирование

На линию старта пластинки с закрепленным слоем силикагеля G60 F₂₅₄ размером 9×10 см (Kieselgel G 60 F₂₅₄) наносят при подсушивании током сжатого воздуха 0,020 см³ 0,5 % препарата (100 мкг). Рядом в качестве стандартного образца вещества свидетеля (СОВС) наносят 0,020 см³, 0,010 см³ и 0,002 см³ (2,0, 1,0, 0.2 мкг) 0,01% раствора кислоты п-аминобензойной. Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 3 мин, помещают в камеру с элюентом, представляющим собой смесь растворителей: хлороформ – гептан – ацетон – кислота уксусная ледяная (5:1:1:0,5) – и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт подвижной фазы дойдет до конца пластинки, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе 10 мин и просматривают в УФ-свете при $\lambda = 254$ нм.

Пятно посторонней примеси на хроматограмме препарата не должно по величине и интенсивности окраски превышать пятно СОВС (не более 2 % в препарате).

Хроматограмма раствора кислоты п-аминобензойной (0,2 мг) в спирте 95% используется для оценки пригодности хроматографической системы.

Посторонние примеси: 0,020 см³ (200 мкг) 1% раствора препарата в смеси воды и кислоты уксусной ледяной в соотношении 1:1 наносят на линию старта пластинки «Силуфол» размером 1×15 см или «Сорбфил» размером 5×10 см.

Пластинку с нанесенной пробой высушивают на воздухе в течение 10 мин, а затем в сушильном шкафу при температуре от 100 до 110 °С в течение 5 мин и хроматографируют в камере со смесью растворителей хлороформ – метиловый спирт – уксусная кислота ледяная в соотношении 95:10:2. Когда фронт растворителей пройдет 10 см (для пластинки «Силуфол») и 7–8 см (для пластинки «Сорбфил»), пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 15 мин, затем в шкафу при температуре 100–110 °С в течение 10 мин.

Охлажденную пластинку опрыскивают 1% раствором п-диметиламинобензальдегида.

На хроматограмме испытуемого раствора препарата по величине пятен и интенсивности их окраски делают заключение о наличии примесных компонентов. Если интенсивность пятен примесей сравнима с интенсивностью и величиной пятен одного из СОВС с известным содержанием вещества в пробе, то проводят полуколичественное определение примеси относительно содержания стандартных образцов вещества свидетеля.

РАБОТА № 10. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ МЕТОДОМ ТСХ

Цель работы: определение качественного и количественного состава смеси флавоноидов методами внутренней нормализации и калибровочного графика с использованием видеоденситометрии.

Этапы работы

1. Приготовление элюента и подготовка камеры для ТСХ.
2. Приготовление растворов флавоноидов.
3. Подготовка пластинки для ТСХ.
4. Нанесение проб на пластину.
5. Хроматографирование анализируемых образцов.
6. Проявление хроматограмм.
7. Сканирование хроматограмм.
8. Качественный анализ хроматограмм.
9. Расчет параметров хроматографирования с использованием видеоденситометра:
 - а) расчет треков;
 - б) качественный анализ состава анализируемой смеси и количественное определение методом внутренней нормализации;
 - в) количественное определение методом градуировочного графика.

Аппаратура, условия и объекты хроматографирования

1. Камера стеклянная для ТСХ диаметром 90 мм, высотой 150 мм из химически стойкого стекла.
2. Хромоскоп с УФ-излучением при $\lambda = 254$ нм.
3. Сушильный шкаф.
4. Микрошприц МШ-1 или Hamilton на 1,00 мкл.
5. Кверцетин ($C_{15}H_{10}O_{27}$), рутин ($C_{27}H_{30}O_{16} \times 3H_2O$), нарингин ($C_{27}H_{32}O_{14}$), +катехин ($C_{15}H_{14}O_6 \times 2H_2O$).
6. Мерные колбы 2-10-2, ёмкостью 10,00 см³.
7. Пластинки, покрытые слоем силикагеля F₂₅₄ марки «Sorbfil», «Sulifol» или «Armsorb».
8. Подвижная фаза – смесь растворителей: амиловый спирт – уксусная кислота – вода (2:1:1).
9. Проявители:
 - аммиак 25 %;
 - диазотированная сульфаниловая кислота (0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 12,5 мл концентрированной HCl и добавляют 75 мл воды). Перед применением смешивают 4 мл приготовленного раствора с 1 мл 0,1 М NaNO₂ и 5 мл 2М NaOH (все растворы отмеряют пипеткой);
 - 5 % водный раствор хлорида железа.

10. Карандаш.
11. Сканер.
12. Пульверизатор.

Выполнение работы

1. Приготовление элюента и подготовка камеры для ТСХ

Хроматографирование проводят в специальных камерах для ТСХ – стеклянных круглых или прямоугольных емкостях с притертой крышкой. На дно камеры наливают подвижную фазу – элюент.

Элюентом в данной работе является смесь растворителей: амиловый спирт – уксусная кислота – вода (2:1:1). Подвижную фазу готовят в отдельной колбе смешением 10 см³ амилового спирта, 5 см³ уксусной кислоты, 5 см³ дистиллированной воды. Высота слоя элюента в камере должна быть ~ 0,5 см.

Камера с элюентом, плотно закрытая крышкой, должна постоять 20 мин, чтобы пространство насытилось парами элюента – это ускоряет процесс хроматографирования.

2. Приготовление растворов флавоноидов.

Растворы флавоноидов приготавливают в мерных колбах на 10,00 см³ с концентрацией 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 4,0 мг/см³ по навескам.

3. Подготовка пластинки для ТСХ:

а) для качественного анализа и количественного определения методом внутренней нормализации пластину для ТСХ марки «Sorbfil», «Sulifol» или «Armsorb» или аналогичную размером кладут на стол и простым карандашом, без нажима, легко проводят линию, параллельную нижнему краю пластины на расстоянии 1,5 см от края. Эта линия называется «линия старта». На линии старта карандашом намечают точки, равно отстоящие друг от друга и от краев пластины. Желательно, чтобы расстояние между точками было не менее 1,5 см. Разметку пластины проводят аккуратно, не нарушая слоя силикагеля.

б) количественное определение методом калибровочного графика. Разметку пластинки проводят, как указано выше, из расчета 5 точек для растворов с определенным содержанием вещества и 1 точка для анализируемого раствора (всего 6 точек).

4. Нанесение проб на пластину:

а) для качественного анализа и количественного определения методом внутренней нормализации в намеченные точки микрошприцем емкостью 1 мкл наносят 2 серии приготовленных растворов, разделяя пластину на две части для последующей визуализации пятен различными проявителями. Возможно использование двух пластин.

Нанесение проб проводят легким прикосновением выдавленной из иглы микрошприца капли к точке на пластине в несколько приемов (диаметр пятна должен быть не более 0,3 см³), проводя осушение поверхности

пластинки с помощью груши или сжатого воздуха. Новую порцию раствора наносят после высыхания предыдущей. Когда все пробы будут нанесены, а пятна высохнут, пластина готова для проведения хроматографирования.

б) количественное определение методом калибровочного графика. Нанесение проб проводится, как описано выше. Калибровочные растворы наносят в порядке возрастания концентрации флавоноидов в пробе.

5. Хроматографирование анализируемых образцов.

Пластину с нанесенными пробами помещают в камеру хроматографирования так, чтобы линия старта с нанесенными пятнами была выше уровня элюента слоем сорбента вниз под углом $45-60^{\circ}$. Камеру закрывают крышкой и ждут, когда элюент поднимется на $2/3$ высоты пластины. Хроматограмму вынимают из камеры, отметив карандашом высоту подъема фронта элюента и сушат на воздухе.

6. Проявление хроматограмм.

Для проявления зон компонентов разделяют две параллельные серии анализируемых растворов, разрезая пластину на две части. Каждую серию обрабатывают различными проявителями. Для визуализации полного состава флавоноидов в качестве проявителя используют диазотированную сульфаниловую кислоту. Хроматограмму обрабатывают реагентами при помощи пульверизатора. После обработки раствором пластину сушат при температуре $100-105^{\circ}\text{C}$ в термостате в течение 1–2 мин до появления желто-коричневых зон. Вторую хроматограмму проявляют в парах аммиака.

7. Сканирование хроматограмм.

Сканирование хроматограмм может осуществляться с использованием любого планшетного сканера с возможностью сканирования в полноцветном режиме с разрешением 300 dpi. Файл должен быть сохранен без сжатия в формате *.bmp.

Возможно также прямое сканирование хроматограммы в программе «Sorbfil Videodensitometr». Для этого предварительно проводят ознакомление с руководством пользователя программы.

Сканирование хроматограммы проводят в следующем порядке:

- в меню **Файл** выбирают пункт **Выбор сканера**;
- после нажатия на **Сканирование хроматограммы** на панели инструментов на экране появляется окно сканирования. Необходимо установить полноцветный режим сканирования с разрешением 300 dpi;
- после сканирования необходимо сохранить изображение для его дальнейшего использования в программе «Sorbfil Videodensitometr».

8. Качественный анализ хроматограмм.

Проводят качественный анализ хроматограмм, т. е. идентифицируют флавоноиды по величине относительных скоростей перемещения веществ по пластине (R_f) при использовании различных проявителей, сравнивая величины R_f с табличными значениями $R_{f(ст)}$ (табл. 3.14).

R_f всех проявляющихся зон на хроматограмме рассчитывают по формуле (7).

Таблица 3.14

Величины R_f флавоноидов

Название флавоноида	Величина R_f стандартов	Величина R_f (проявление парами амиака)	Величина R_f (проявление диазотированной сульфаниловой кислотой)
Кверцитин	0,82±0,01		
Рутин	0,49±0,01		
Нарингин	0,52±0,01		
+Катехин	0,79±0,01		
Другие			

На основании полученных данных делается вывод о качественном составе анализируемой смеси.

9. *Расчет параметров хроматографирования с использованием видеоденситометра.*

Полуколичественное определение содержания флавоноидов. Данный этап работы выполняется с использованием программного обеспечения «Sorbfil Videodensitometr» с использованием планшетного сканера.

Денситометр на базе планшетного сканера не требует изменения существующих методик ТСХ и может обрабатывать любую пластинку с визуализированными пятнами. Денситометр «Сорбфил» позволяет произвести два вида количественных расчетов:

– расчет содержания анализируемых веществ в смеси (выраженной в процентах); может быть проведено методом внутренней нормализации, описанной в работе 3, уравнение (26).

– расчет концентрации вещества в пробе.

Основные этапы определения содержания:

а) расчет треков. Расчет начинается с разметки хроматограммы – расстановки линии старта, фронта и границ треков. Для этого пользуются руководством пользователя к программе «Sorbfil Videodensitometr». Результаты расчета трека представляют собой аналоговую кривую, пики которой соответствуют интенсивности и ширине пятен трека.

Расчет трека после установки **порога чувствительности**. Порог чувствительности выбирается на уровне 10 % от максимальной интенсивности хроматографического пика.

При обработке хроматограммы возможна установка 4-х режимов **сглаживания изображения** (без сглаживания, сглаживание по 3, 5, 7 точ-

кам). В зависимости от качества хроматограммы проводят сглаживание по указанию преподавателя.

Далее проводят **фильтрацию шума базисной линии**;

б) *качественный анализ состава анализируемой смеси и количественное определение методом внутренней нормализации.* Результаты расчета трека приводят в формате программы Excel, с указанием величин R_f , площади пятен (S), процентное содержание вещества в % по площади всех пятен (S %), высота (H), процентное содержание вещества в % по высоте полос на аналоговой хроматограмме (рис. 3.7).

в) *количественное определение рутина методом градуировочного графика.* Для расчета количества вещества в пробе по этому методу все стадии хроматографирования проводят аналогично описанным ранее. Проводят хроматографирование 5-ти стандартных образцов с концентрациями 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 4,0 мг/см³ и строят градуировочный график по величинам S и H в зависимости от содержания вещества в пробе. По калибровочной зависимости определяют содержание рутина в пробе.

Результаты определений приводят в сводной табл. 3.15.

Таблица 3.15

Содержание фосфолипидов

№	C, мкг/см ³	S, отн. ед. пл.	H, отн. ед.
1			
2			
3			
4			
5			
x			

По результатам работы делают заключение о качественном и количественном составе анализируемой смеси.

РАБОТА 11. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРЕПАРАТЕ

Цель работы: количественное определение никотиновой кислоты в препарате для инъекций методом молекулярной абсорбционной спектроскопии (УФ-спектрофотометрии).

Этапы работы

1. Приготовление раствора стандартного образца (PCO).
2. Приготовление растворов из образца препарата.
3. Фотометрирование растворов PCO.
4. Фотометрирование анализируемых растворов препарата, качественный анализ содержания никотиновой кислоты в препарате.
5. Количественное определение никотиновой кислоты.

Аппаратура, материалы и реактивы

1. Спектрофотометр СФ-4А или СФ-26.
2. Кварцевые кюветы с толщиной слоя 10,00 мм.
3. Пипетка на 1,00 и на 10,00 см³.
4. Мерные колбы на 100,0 см³.
5. Никотиновая кислота (ФСП 42-0069115401).
6. Кислота хлористоводородная с концентрацией 0,1 моль/дм³ (хч).
7. Никотиновая кислота (раствор для инъекций 1 %).

Сущность работы

При определении никотиновой кислоты в препарате используется метод молярного (удельного) коэффициента поглощения (ϵ_λ). При работе по этому методу используется известное значение ϵ для стандартного раствора чистого препарата при длине волны, соответствующей максимуму поглощения и определенной толщине слоя l (см). Затем измеряют оптическую плотность анализируемого раствора A_λ и рассчитывают концентрацию c_x по формуле $c_x = \frac{A_\lambda}{\epsilon_\lambda \cdot l}$. Ограничением метода является обязательное подчинение анализируемой системы закону Бугера – Ламберта – Бера.

Выполнение работы

1. Приготовление раствора стандартного образца (PCO).

Около 0,1 г (точная навеска) никотиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100,0 см³ и растворяют в 80 см³ 0,1 М раствора кислоты хлористо-водородной, доводят объем 0,1 М раствором кислоты хлористо-водородной до метки и перемешивают.

1,00 см³ полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100,0 см³ и доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлористо-водородной до метки.

2. Приготовление растворов из образца препарата.

1,0 см³ раствора препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100,0 см³, доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлористо-водородной до метки и перемешивают. 10,00 см³ полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100,0 см³, доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлористо-водородной до метки и перемешивают.

3. Фотометрирование растворов PCO.

Предварительно проводят подготовку спектрофотометра СФ-4А или СФ-26 к работе в соответствии с руководством по эксплуатации. Фотометрирование осуществляют с использованием дейтериевой лампы и с фотоэлементом, соответствующим рабочему диапазону длин волн. Анализируемым раствором и раствором сравнения заполняют кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 10,00 мм. В качестве растворов

сравнения используется вода (бидистиллированная или деионизованная). Проводят грубое фотометрирование раствора РСО в диапазоне длин волн 230–300 нм с шагом 10 нм.

Данные измерений вносят в табл. 3.16. При регистрации значений оптической плотности по аналоговой логарифмической шкале для увеличения точности определений проводят пересчет величин A по уравнению (45).

После выполнения измерений строят зависимость оптической плотности A от λ (нм). В области максимума поглощения анализируемый раствор фотометрируют с шагом 1,0 нм, начиная измерения при длине волны на 10 нм меньше длины волны, характеризующейся максимумом поглощения и заканчивая измерения при λ на 10 нм больше длины волны, соответствующей максимуму поглощения анализируемых растворов. Результаты измерений вносят в табл. 3.16.

Фотометрирование рабочих растворов препарата, качественный анализ содержания никотиновой кислоты в препарате

Для проведения идентификации никотиновой кислоты анализируемый раствор фотометрируют при длинах волн 230–300 нм с шагом 10 нм и 1 нм аналогично тому, как проводили фотометрирование растворов РСО.

Данные измерений вносят в табл. 3.16.

Таблица 3.16

№	λ , нм	A		A	
		PCO	Лек. форма	PCO	Лек. форма
1					
2					
...					

По полученным данным строят график зависимости A от λ , нм. По виду спектров (количество максимумов поглощения), положению максимума поглощения делают заключение о подлинности образца.

4. Количественное определение никотиновой кислоты.

Измеряют оптическую плотность анализируемого раствора на основе препарата на спектрофотометре при длине волны 261 нм (максимум поглощения) в кювете с толщиной слоя 10,00 мм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца (PCO) кислоты никотиновой. В качестве раствора сравнения используют 0,1 М раствор хлористо-водородной кислоты.

Содержание кислоты никотиновой в 1 см³ препарата в граммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 1}{A_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10} = \frac{A_1 \cdot a_0}{A_0 \cdot 10}, \quad (45)$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора РСО кислоты никотиновой;

a_0 – навеска РСО кислоты никотиновой в граммах.

Содержание C₆H₅NO₂ (кислоты никотиновой) в 1 см³ препарата должно быть от 0,0097 до 0,0103 г.

По результатам работы делают заключение о качественном составе препарата и количественном содержании в нем целевого компонента.

РАБОТА № 12. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИАНКОБАЛАМИНА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ (ВИТАМИНА В12)

Цель работы: качественный и количественный анализ цианкобаламина в препарате для инъекций методом молекулярной абсорбционной спектроскопии (УФ-спектрофотометрии); определение наличия примесей в препарате по спектральным отношениям.

Этапы работы

1. Установить подлинность цианкобаламина спектрофотометрическим методом:

- приготовление раствора стандартного образца (PCO);
- приготовление раствора препарата для анализа;
- фотометрирование растворов PCO;
- фотометрирование приготовленного раствора препарата;
- качественный анализ содержания цианкобаламина в препарате.

2. Определение чистоты препарата спектрофотометрическим методом по спектральным отношениям.

3. Количественное определение цианкобаламина в препарате.

Аппаратура, материалы и реактивы

1. Спектрофотометр СФ-4А или СФ-26.
2. Кварцевые кюветы с толщиной слоя 10,00 мм.
3. Пипетка на 1,00 и на 10,00 см³.
4. Мерные колбы емкостью 25,00 см³, 100,0 см³.
5. Цианкобаламин (витамин В12) производства Merck.
6. Вода бидистиллированная или вода деионизованная.

Выполнение работы

1. Подлинность цианкобаламина спектрофотометрическим методом.

Одним из методов, позволяющих подтвердить подлинность вещества в препарате, является молекулярная абсорбционная спектроскопия в УФ и видимой области электромагнитных излучений в совокупности с другими физико-химическими (хроматографическими, электрохимическими, другими оптическими) методами. Для подтверждения подлинности вещества необходимо качественное (положение спектральных максимумов) и количественное соответствие (постоянство соотношений величин оптической плотности при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения).

Приготовление раствора стандартного образца (PCO). Предварительно приготавливается *промежуточный раствор* с концентрацией 0,2 % цианкобаламина в растворе. Для этого 0,1 г (0,05 г) (точная навеска) растворяется в воде бидистиллированной или воде деионизованной в мерной колбе емкостью 50,00 см³ (25,00 см³). Далее промежуточный раствор используется при приготовлении PCO с концентрацией 0,002 %. После растворения вещества и интенсивного перемешивания 1,00 см³ (0,50 см³) переносят в мерную колбу емкостью 100,0 см³ (50,00 см³) и объем колбы доводится водой (бидистиллированной или деионизованной) до метки.

Приготовление анализируемого раствора препарата. Для приготовления рабочего раствора цианкобаламина (витамина В12) содержимое ампулы (1 см³) количественно переносят в мерную колбу объемом 25,00 см³ и доводят до метки водой (бидистиллированной или деионизованной).

Фотометрирование растворов PCO и раствора препарата, качественный анализ содержания цианкобаламина в препарате.

Для проведения фотометрирования подготовку спектрофотометра СФ-4А или СФ-26 проводят в соответствии с руководством по эксплуатации. Фотометрирование проводят с использованием дейтериевой лампы и лампы накаливания и с фотоэлементом, соответствующим рабочему диапазону длин волн. Рабочими и раствором сравнения заполняют кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 10,00 мм. В качестве растворов сравнения используется вода (бидистиллированная или деионизованная). Проводят грубое фотометрирование раствора PCO в диапазоне длин волн 260 до 560 нм с шагом 10 нм.

ВНИМАНИЕ. Все измерения проводят с использованием двух ламп. Сначала выполняют все измерения с использованием дейтериевой лампы (260–350 нм), а после этого проводят измерения с использованием лампы накаливания (350–560 нм).

Данные измерений представляют в виде табл. 3.16 (см. работу 11). При регистрации значений оптической плотности по аналоговой логарифмической шкале для увеличения точности определений проводят пересчет величин А по величинам пропускания Т по уравнению (18а).

После выполнения измерений строят зависимость оптической плотности A от λ (нм). В области максимума поглощения (278, 361, 548 нм) анализируемый раствор фотометрируют с шагом 1,0 нм, начиная с длины волны за 10 нм до максимума поглощения и заканчивая измерения при λ на 10 нм больше длины волны, соответствующей максимуму поглощения анализируемых растворов.

Фотометрирование рабочих растворов препарата. Для подтверждения подлинности цианкобаламина анализируемый раствор фотометрируют при длинах волн 260–560 нм с шагом 10 нм и 1 нм аналогично тому, как проводили фотометрирование растворов РСО.

Данные измерений представляют в виде табл. 3.16 (см. работу 11).

По полученным спектрам делают заключение о подлинности образца.

2. *Определение чистоты препарата спектрофотометрическим методом по спектральным отношениям.* Для определения чистоты препарата спектрофотометрическим методом определяют величину оптической плотности раствора в кювете с толщиной слоя 10,00 мм при 278, 361, 548 нм. Рассчитывают соотношения оптических плотностей растворов A при указанных длинах волн. Отношение A_{361}/A_{548} должно быть от 3,0 до 3,4. Отношение A_{361}/A_{278} должно быть от 1,7 до 1,88. По величинам соотношений делают заключение о чистоте препарата.

3. *Количественное определение цианкобаламина в препарате.* Определить количественное содержание цианкобаламина в лекарственной форме можно по величине оптической плотности раствора при длине волны 361 нм в кювете толщиной слоя 10,00 мм, используя в качестве раствора сравнения воду (бидистиллированную или деионизованную).

3. Содержание цианкобаламина, мг в 1 см³ препарата, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 10 \cdot V_1}{207 \cdot V}, \text{ мг} \quad (46)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора, 207 – удельный показатель поглощения чистого цианкобаламина при длине волны 361 нм, V – объем препарата, взятый для разведения, см³, V_1 – объем приготовленного раствора препарата для анализа, см³.

По результатам качественного и количественного определения делают заключение о подлинности препарата и о содержании в нем цианкобаламина. Допускается изменение содержания цианкобаламина в лекарственной форме от 0,45 до 0,55 мг.

РАБОТА № 13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ ВЕЩЕСТВ ПО ИК-СПЕКТРАМ ОБРАЗЦОВ ДИСПЕРГИРОВАННЫХ В БРОМИДЕ КАЛИЯ

Цель работы: установление подлинности веществ по ИК-спектрам препарата, снятым в таблетках бромида калия.

Этапы работы

1. Подготовка образцов.
2. Подготовка бромида калия:
– измельчение бромида калия;
– высушивание.
3. Прессование таблетки.
4. Регистрация спектра.
5. Идентификация веществ.

Аппаратура, материалы и реактивы

1. ИК-спектрометр с Фурье-преобразованием или дисперсионный ИК-спектрометр.
2. Бромид калия (осч).
3. Ступка с пестиком (агатовые и малахитовые).
4. Бюксы.
5. Сушильный шкаф.
6. Весы аналитические.
7. Пресс-форма.
8. Пресс.
9. Вата.
10. Этанол (хч).
11. Скальпель, пинцет и стеклянная лопатка.

Выполнение работы

1. Пробоподготовка образцов

Качество спектров, а также объем информации, которую можно получить с использованием ИК-спектроскопии часто определяется не только режимом исследования (в режиме пропускания, диффузного отражения или полного внутреннего отражения), но и физико-химическими свойствами пробы, и способом подготовки к анализу.

Подготовка образца должна проводиться в условиях, предотвращающих качественное и количественное изменения в образце. Размер частиц образца должен быть как можно меньше, чтобы избежать рассеивания ИК-излучения и потери информации.



Рис. 3.6. Бромид калия (а), агатовая ступка (b) и цилиндр для заполнения контейнера пробой при использовании приставки на диффузное отражение (с)

На рис. 3.6 представлены некоторые приспособления применяемые для пробоподготовки и получения спектров образцов. Несмотря на то, что многие образцы при измельчении могут изменять свои физико-химические свойства, предварительно пробы тщательно растирают. Особенно это принципиально, когда имеют дело с диффузным отражением и прессованием таблеток образца диспергированного в инертном материале. Кроме того, тщательное измельчение необходимо при диспергировании образца в вазелиновом масле. Для целей уменьшения размера исследуемых частиц могут использоваться материалы, полосы поглощения которых отсутствуют либо не препятствуют качественному (а иногда важно и количественному) анализу пробы. К таким материалам могут быть отнесены ступки из агата, оптически прозрачного в широком диапазоне ИК-излучения.

В то время пока существует много методов пробоподготовки и вариантов ИК-спектроскопии, одним из наиболее широко применяемых методов остается использование солевых стекол, что является одной из наиболее простых методик. При пробоподготовке часто могут использоваться кюветы с солевыми стеклами на основе солей галогенидов щелочных и щелочно-земельных металлов. Многие из них являются гигроскопичными и должны храниться в эксикаторе с предварительно подготовленным осушителем. Однако необходимо быть очень аккуратными при использовании таких стекол, так как они могут быть легко повреждены и поцарапаны. Для хранения используют эксикаторы либо специальные контейнеры с осушителем.

Наиболее распространенным способом подготовки образцов считается прессование исследуемого вещества с KBr. В некоторых случаях в качестве наполнителя при изготовлении таблеток используют другие галогениды щелочных металлов – KCl, NaCl, AgCl. Для изготовления таблеток применяют пресс-формы различных конструкций; большинство из них рассчитано на получение таблеток диаметром или шириной 10–20 мм, для

чего необходимо усилие пресса 10–20 т [9]. Размер таблетки определяется шириной входной щели спектрофотометра.

2. Подготовка бромида калия

Бромид калия не имеет полос поглощения в интервале от 4000 до 400 см^{-1} . Прессованная таблетка из KBr толщиной 1 мм пропускает при 250 см^{-1} 30 % излучения. Показатели преломления многих органических растворителей близки к показателю преломления KBr. При работе можно использовать KBr любой марки, предварительно очистив его от сопутствующих примесей и воды. Однако, если имеется KBr, предназначенный специально для спектрального анализа, объем вспомогательных работ сведется лишь к измельчению и высушиванию KBr. Следует учитывать, что тонко измельченный KBr способен поглощать примеси, поэтому высушивать его следует в индивидуальном шкафу. Проверку на чистоту и отсутствие влаги в KBr проводят путем записи спектрограмм.

Монокристаллический бромистый калий растирают в агатовой ступке и высушивают в термостате при 150–160 °С до полного удаления следов воды. Проверяют чистоту растертого KBr и степень его высушивания по отсутствию полос поглощения в области 4000–600 см^{-1} . Сухой и чистый KBr в этом интервале выписывает прямую линию, колебания молекул гидратной воды проявляются в виде интенсивных полос поглощения в области 3700–3300, 1640–1610 и 1400 см^{-1} . Подготовленный KBr хранят в бюксе с крышкой в эксикаторе.

Анализируемый образец растирают в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния ручным способом до состояния «пудры» (при растирании между пальцами не ощущается «жесткости» порошка). Растертые образцы высушивают до постоянного веса в термостате при 50–60 °С или под вакуумом при комнатной температуре.

Для анализа необходимо взять точную навеску (с точностью до 0,0001 г) бромида калия и анализируемого образца. Отношение масс образца к массе бромида калия должно составлять 1:100 или 1,5 мг образца и 150,0 мг подготовленного KBr.

Соотношение может варьироваться в зависимости от природы вещества. Целесообразно готовить таблетки с содержанием исследуемого вещества от 0,5 до 5 %. Для веществ, имеющих большое количество групп атомов, характеризующихся значительным поглощением, снижают содержание вещества до соотношения 1:200.

После взвешивания образца и диспергирующего вещества проводят тщательное перемешивание в агатовой ступке в течение 5–10 мин, после чего берут навеску массой 100,0 мг смеси и переносят в пресс-форму. Смесь прессуют в виде таблетки. Кристаллы KBr при высоком давлении становятся пластичными и образуют прозрачную матрицу, в которой равномерно распределен порошок исследуемого вещества.

3. Прессование таблетки

Рекомендуется использовать пресс-форму с прямоугольным сечением рабочей поверхности, предложенную СКГ ИОХ АН СССР (рис. 3.7). Рабочая поверхность пресс-формы (пластинки), соприкасающаяся с веществом таблетки, изготавливается из закаленной стали, полируется и хромируется. Навеску смеси равномерно распределяют по всему каналу с помощью стеклянной лопатки, пресс-форму закрывают и помещают под пресс. Навеску прессуют в течение 5 мин, затем разбирают пресс-форму и с помощью пинцета переносят готовую таблетку в таблеткодержатель (правильно спрессованная таблетка абсолютно прозрачна и имеет постоянные размеры $25 \times 4 \times 0,5$ мм).

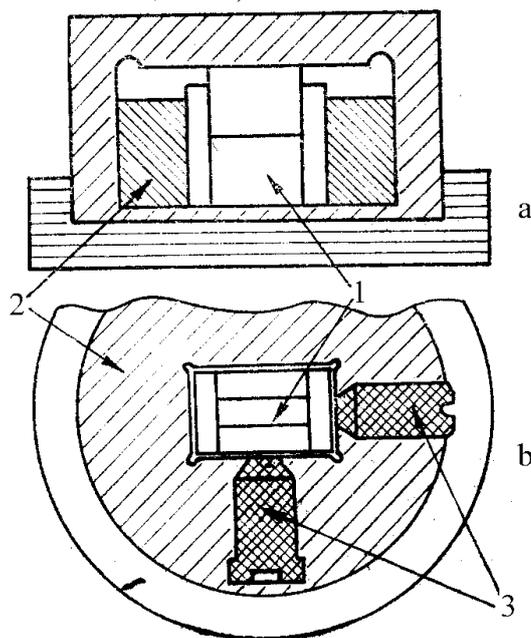


Рис. 3.7. Пресс-форма с прямоугольной рабочей поверхностью: 1 – рабочие пластинки; 2 – держатель пластинок; 3 – регулировочные винты (а: вид сбоку; б: вид сверху)

После изготовления таблетки пресс-форму необходимо очистить от следов галогенидов щелочных металлов во избежание коррозии рабочей поверхности: пресс-форму сначала протирают ватным тампоном, смоченным в дистиллированной воде, потом тампоном, смоченным в спирте-ректификате, и тщательно протирают салфеткой из байки или хлопчатобумажной ткани для полного удаления следов влаги.

Агатовую ступку, скальпели, пинцет и стеклянную лопатку после приготовления каждой таблетки промывают сначала дистиллированной водой, а затем спиртом-ректификатом для удаления следов образца. Расход спирта-ректификата – 30 мл на приготовление одной таблетки.

4. Регистрация спектра

Включение, настройку и юстировку прибора проводят строго по инструкции.

а) Регистрация спектров на ИК-спектрометре с дуолучевой схемой. Для регистрации спектра на подобном ИК-спектрометре предварительно прессуют таблетку бромида калия, которая будет использоваться в первом лучевом канале для исключения фонового поглощения. В рабочий канал спектрофотометра с дуолучевой схемой помещают таблеткодержатель с образцом, в канал сравнения – таблеткодержатель с таблеткой чистого бромистого калия.

б) В случае спектрометра с однолучевой схемой предварительно снимают фоновый спектр с таблеткой из KBr, затем регистрируют ИК-спектр анализируемого образца. Спектрограмму записывают в интервале частот $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$.

Обрабатывают полученные спектрограммы, рассчитывая точное положение максимумов поглощения. Интерпретацию спектров проводят, используя литературу [9–27].

5. Идентификация веществ

Идентификацию веществ по ИК-спектрам проводят по совпадению полос поглощения табличными значениями полос поглощения стандартных веществ.

Идентификация метилурацила.

Метилурацил (2,4-диоксо-6-метил-1,2,3,4-тетрагидропиримидин):

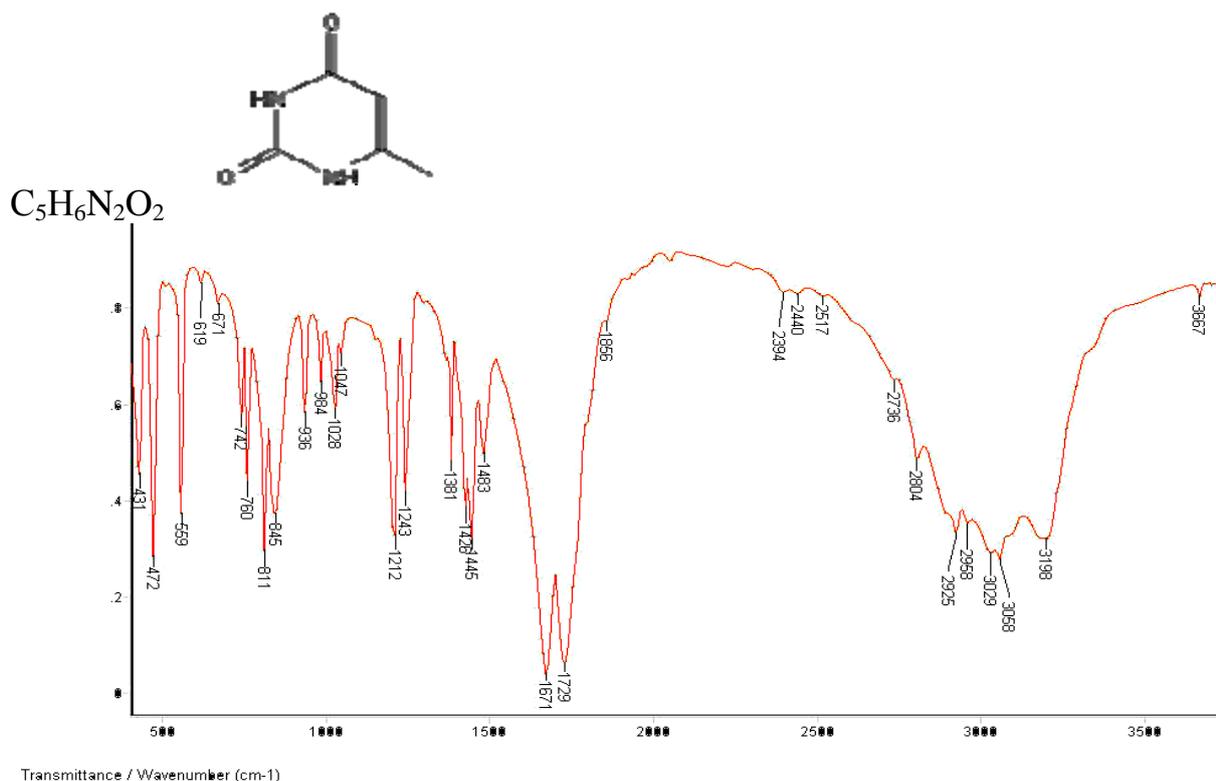


Рис. 3.8. ИК-спектр метилурацила

ИК-спектр метилурацила должен иметь полное совпадение полос поглощения с полосами на прилагаемом рисунке (рис. 3.8).

РАБОТА № 14. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ ПО ИК-СПЕКТРАМ ОБРАЗЦОВ В ВИДЕ СУСПЕНЗИИ В ВАЗЕЛИНОВОМ МАСЛЕ

Цель работы: установление подлинности веществ по ИК-спектрам препарата, диспергированного в вазелиновом масле.

Этапы работы

1. Диспергирование вещества в вазелиновом масле.
2. Регистрация спектра и идентификация веществ.

Аппаратура, материалы и реактивы

1. ИК-спектрометр с Фурье-преобразованием или дисперсионный ИК-спектрометр.
2. Оптически прозрачные окна.
3. Ступка с пестиком (агатовые и малахитовые).
4. Пресс.
5. Вата.
6. Этанол (хч).
7. Скальпель, пинцет и стеклянная лопатка.

Выполнение работы

Наибольшее распространение для приготовления суспензий твердых веществ получило вазелиновое масло (нуйол) – смесь высококипящих фракций нефти. В ИК-спектре вазелинового масла (рис. 3.9) присутствуют лишь полосы поглощения валентных и деформационных колебаний групп $-CH_3$ и $-CH_2-$ в области $3000-2800$, $1500-1300$ и 772 cm^{-1} .

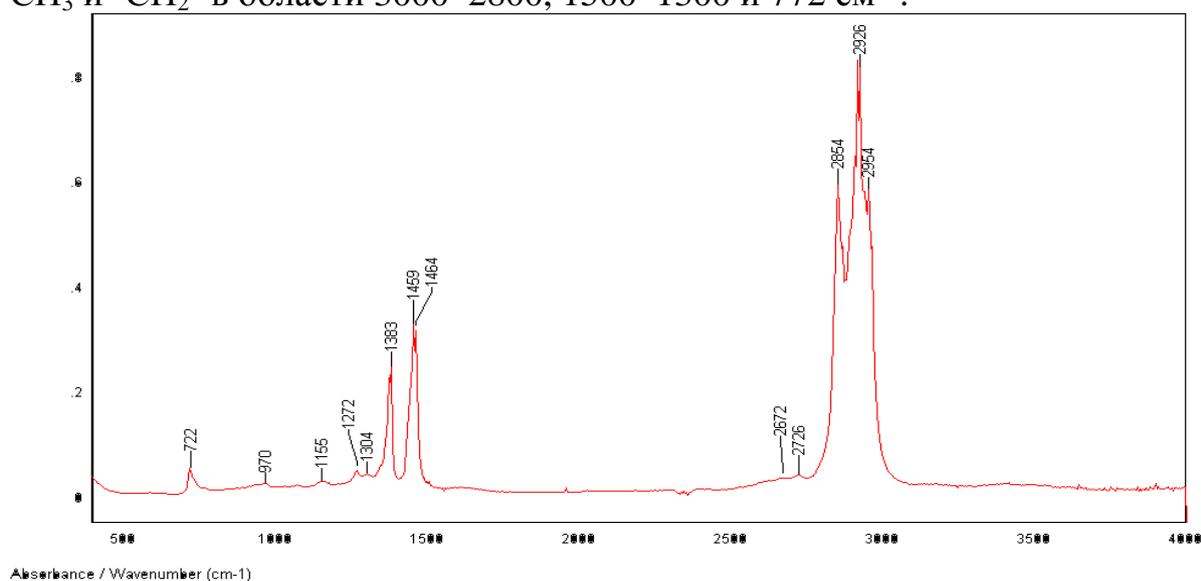


Рис. 3.9. ИК-спектр вазелинового масла (нуйола)

Вазелиновое масло хорошо растворяется в четыреххлористом углероде, который используется для промывки пластинок из KBr. Для исследования области спектра, соответствующей поглощению вазелинового масла, используют фторированное масло, однако смесь фторированных углеводов трудно удаляется с окошек кювет.

1. Диспергирование вещества в вазелиновом масле

Образец измельченного и просушенного вещества в количестве 2–5 мг смешивают в агатовой ступке с 10 каплями вазелинового масла до получения однородной суспензии. Затем 3–4 капли суспензии наносят ровным слоем на крышку от кюветы из KBr (NaCl), зажимают второй крышкой и помещают в держатель кювет. Точно измерить интенсивность полос поглощения в ИК-спектрах суспензий не удастся, так как невозможно определить толщину исследуемого образца (концентрацию вещества в суспензии). При использовании дисперсионных спектрометров для компенсации поглощенного вазелинового масла в канал сравнения помещают кювету, с чистым вазелиновым маслом.

При использовании FTIR-спектроскопии предварительно снимают фоновый спектр, помещая в оптическую ячейку вазелиновое масло, нанесенное на солевые пластины по описанной выше методике. Однако такой вариант может привести к появлению на спектре анализируемого образца полос отрицательной интенсивности.

2. Регистрация спектра и идентификация веществ

Регистрацию спектра проводят аналогично тому, как описано в работе 13. Интерпретацию спектров проводят, используя литературу [9–28], проводя отнесение полос поглощения колебаниям групп атомов.

Результаты отнесения полос вносят в табл. 3.17.

Таблица 3.17

Отнесение полос поглощения групп атомов в ИК-спектрах

№	Волновое число, см ⁻¹	Группа атомов	Колебания	Примечания
1				
2				

По результатам отнесения полос делают заключение о принадлежности вещества к определенному классу соединений.

РАБОТА № 15. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СМЕСИ ИЗОМЕРОВ КСИЛОЛА ПО ИК-СПЕКТРАМ

Цель работы: полуколичественное определение содержания изомеров ксилола по данным ИК-спектроскопии.

Этапы работы

1. Приготовление растворов изомеров веществ.
2. Регистрация спектров растворов в жидкостных кюветах.
3. Построение градуировочных зависимостей для эталонных смесей растворов.
4. Полуколичественное определение изомеров ксилолов методом градуировочного графика.

Аппаратура, материалы и реактивы

1. ИК-спектрометр с Фурье-преобразованием или дисперсионный ИК-спектрометр.
2. Разборная кювета для жидких растворов.
3. Окна из бромида калия или других оптически прозрачных веществ.
4. о-ксилол (хч).
5. м-ксилол (хч).
6. п-ксилол (хч).
7. Циклогексан (хч).

Выполнение работы

Кюветы для жидких растворов. Как было показано выше, качество ИК-спектра, а также объем информации зависит от условий проведения анализа и, в частности, от выбора кювет для жидких растворов.

Обычная кювета представляет собой устройство для помещения в оптический канал, состоящее из металлического корпуса, снабженного зажимами (разборный корпус) и отверстиями для заполнения кюветы жидкостью, двух окон из оптически прозрачного материала, прокладки между окнами, одновременно позволяющей варьировать объем, а точнее толщину поглощающего слоя.

В зависимости от области волновых чисел, в которых могут проявляться полосы поглощения интересующих групп, необходимо варьировать материал (стекла), между которым будет заключен раствор (жидкость). От выбора окон зависит, насколько ваш спектр будет качественен. Наиболее широко используются стекла из KBr, NaCl, CaF₂, AgCl и другие. Некоторых растворители снижают прозрачность материалов (вода, этанол). В табл. 3.18 приведены основные материалы, которые используются при изготовлении окон для ИК-спектроскопии, диапазон применимости и среды, ухудшающие качество материалов.

Таблица 3.18

Материалы, используемые при изготовлении окон для ИК-спектроскопии

Материал окна	Область прозрачности, см ⁻¹	Чувствительность к веществам	Примечание
Кварц	50 000–2500	HF	
NaCl	50 000–625	Вода, этанол	
KCl	33 300–475	Вода, глицерин	
AgCl	16 000–400	Металлы, свет	
KBr	50 000–370	Вода, этанол	гигроскопичный
CsI	33 300–200	Вода, этанол	гигроскопичный
CaF ₂	50 000–900	–	
Ge	5000–500	–	
Si*	6600–615	HF, щелочь	высокоомный монокристалл

* В зависимости от чистоты материала на ИК-спектрах проявляется ряд полос в диапазоне 610–1110 см⁻¹, интенсивность которых зависит от толщины оксидной пленки.

Бромид калия, в свою очередь, является наиболее используемым веществом из-за своей прозрачности в широком диапазоне волновых чисел до 250 см⁻¹. Другим свойством, которое важно в ИК-спектроскопии, является твердость и возможность полировать помутневший материал. С этой точки зрения наиболее удобным является хлорид натрия.

Использование растворов (особенно высокой концентрации) приводит к необходимости контроля за способностью веществ накапливаться на поверхности окон после их использования. После выполнения анализа необходима обязательная многократная промывка пространства между стеклами чистым растворителем для полного удаления следов анализируемых веществ.

Обязательным условием качественной и долговременной работы кювет является уход и поддержание удовлетворительных условий хранения. В соответствии со свойствами материалов, из которых изготовлены окна кювет, необходимо избегать контакт с парами воды (хранение в эксикаторах с осушителями). При эксплуатации избегать контакта с растворителями, веществами, средами, способствующими помутнению, а также избегать потери прозрачности, нанесения царапин.

Загрязнения обнаруживаются при визуальном осмотре, а также при обязательной периодической записи пропускания кюветы без анализируемого вещества. Для удаления загрязнений кюветы можно промывать органическими растворителями, не оказывающими влияния на поверхность окон, таких как ацетон, ДМФА. Хотя в большинстве случаев более действенным будет переполировка поверхности.

1. Приготовление растворов изомеров веществ

Положение полос поглощения замещенных производных бензола весьма специфично для каждого типа замещения. Так, дизамещенные производные имеют не перекрывающиеся характерные области поглощения, что позволяет производить количественный анализ содержания изомеров в растворе (см. табл. 3.19).

Таблица 3.19

Тип замещения	Области поглощения (см ⁻¹)
1,2- замещенные	735–770
1,3- замещенные	690–710; 759–810
1,4- замещенные	800

Для проведения полуколичественного определения изомеров ксилола необходимо приготовить 5 % растворы (по объему) каждого изомера ксилола в циклогексане. Далее приготавливают эталонные смеси ксилолов со следующим содержанием изомеров (см. табл. 3.20).

Таблица 3.20

Вещество	Содержание в смеси, %			
	Раствор № 1	Раствор № 2	Раствор № 3	Раствор № 4
о-ксилол	33	65	5	15
м-ксилол	33	20	75	5
п-ксилол	33	25	20	80

Для приготовления растворов необходимо отбирать пипетками по 1,0 мл каждой из приготовленных смесей и разбавить 20 мл циклогексана.

2. Регистрация спектров растворов в жидкостных кюветах

Для регистрации спектра жидких растворов заполняют кюветы с толщиной слоя $l = 0,2$ мм. ИК-спектры растворов регистрируют в области 600–1000 см⁻¹. Идентифицировать полосы поглощения характерные для каждого типа замещения.

3. Построение градуировочных зависимостей для эталонных смесей растворов

По спектру первого раствора выбирают аналитические полосы поглощения для каждого из ксилолов, затем, используя данные по всем растворам, строят градуировочные графики для каждого ксилола $A = f(C)$. Концентрацию выражают в %.

4. Полуколичественное определение изомеров ксилолов методом градуировочного графика

Анализируемую смесь ксилолов разбавляют циклогексаном в отношении 1:20. Приготовленным раствором заполняют жидкостную кювету и регистрируют ИК-спектр. Пользуясь градуировочным графиком, определяют концентрацию изомеров в смеси. Результаты определений представляют в виде табл. 3.21.

Таблица 3.21

Спектральные данные анализируемых растворов

Вещество	V_{\max}	A	C, %
о-КСИЛОЛ			
м-КСИЛОЛ			
п-КСИЛОЛ			

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. 100 лет хроматографии / отв. ред. Б.А. Руденко. – М. : Наука, 2003. – 738 с.
2. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков [и др.]. – Воронеж : Водолей, – 2004. – 528 с.
3. Практическая газовая и жидкостная хроматография : учебн. пособие / Б.В. Столяров [и др.] – СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2002. – 616 с.
4. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский [и др.] – М. : Химия, 1993. – 462 с.
5. Гольберт К.А. Введение в газовую хроматографию / К.А. Гольберт, М.С. Вигдергауз. – М. : Химия, 1990. – 352 с.
6. Гиошон Ж. Количественная газовая хроматография для лабораторных анализов и промышленного контроля / Ж. Гиошон, К. Гийемен ; пер. с англ. ; под ред. О.Г. Ларионова. – М. : Мир, 1991. – 582 с.
7. Стыскин Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. – М. : Химия, 1986. – 288 с.
8. Сумина Е.Г. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение : учеб. пособие / Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков, Н.В. Тюрина. – Саратов : Изд-во Саратов. гос. ун-та, 2006. – 112 с.
9. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов / В.А. Углянская [и др.]. – Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 1988. – 108 с.
10. Герцберг Г. Колебательные и вращательные спектры многоатомных молекул / Г. Герцберг. – М. : ИЛ, 1949.

11. Инфракрасная спектроскопия полимеров / И. Дехант [и др.]. – М. : Химия, 1976. – 471 с.
12. Збинден В. Инфракрасная структура высокополимеров / В. Збинден. – М. : Мир, 1966. – 356 с.
13. Крос А. Введение в практическую инфракрасную спектроскопию / А. Крос. – М. : ИЛ, 1961. – 110 с.
14. Беллами Л. Инфракрасные спектры молекул / Л. Беллами. – М. : ИЛ, 1957. – 444 с.
15. Беллами Л. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул / Л. Беллами. – М. : ИЛ, 1971. – 318 с.
16. Наканиси К. Инфракрасная спектроскопия и строение органических соединений / К. Наканиси. – М. : Мир, 1965. – 216 с.
17. Литтл Л. Инфракрасные спектры адсорбционных молекул / Л. Литтл. – М. : Мир, 1969. – 514 с.
18. Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений / К. Накамото. – М. : Мир, 1966. – 411 с.
19. Цундель Г. Гидратация и межмолекулярное взаимодействие / Г. Цундель. – М. : Мир, 1972. – 404 с.
20. Либрович Н.Б. Сильные водородные связи в водных растворах кислот и оснований / Н.Б. Либрович, В.П. Сакун, Н.Д. Соколов // Водородная связь. – М. : Наука, 1981. – С. 174-211.
21. Ионобменное изотермическое пересыщение на анионите АВ-17-2П / В.Ф. Селеменев [и др.] // Журн. физ. химии. – 1986. – Т. 60. – № 6. – С. 1461–1464.
22. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков / Ю.Н. Чиргадзе. – М. : Наука, 1965. – 135 с.
23. Пиментел Дж. Водородная связь / Дж. Пиментел, О. МакКлеллан. – М. : Мир, 1964. – 462 с.
24. Мелешко В.П. Инфракрасные спектры поглощения ионов / В.П. Мелешко, В.А. Углянская, Т.А. Завьялова. – Воронеж : ВГУ, 1972. – 80 с.
25. Определение физико-химических характеристик ионобменных материалов методом ИКС / Селеменев В.Ф. [и др.] // Теория и практика сорбционных процессов. – Воронеж : ВГУ, 1989. – № 20. – С. 98–100.
26. Gordon A.J. The chemist's companion. A handbook of practical data, techniques and references / Arnold J. Gordon, Richard A. Ford. – A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and sons, 1972.
27. Гордон А. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография / А. Гордон ; пер. с англ. Е.Л. Розенберга, С.И. Коппель. – М. : Мир, 1976. – 541 с.
28. Hadden J.M. A comparison of infrared spectra of proteins in solution and crystalline forms / J.M. Hadden, D. Chapman, D.C. Lee // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) / Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995. – V. 1248, 2. – P. 115–122.

Учебное издание

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

Методическое указания

Составители:

Карпов Сергей Иванович,
Селеменев Владимир Федорович,
Матвеева Марианна Викторовна,
Беланова Наталья Анатольевна

Редактор О.А. Исаева

Подписано в печать 26.05.08. Формат 60×84/16. Усл. печ. л. 5,4.
Тираж 100 экз. Заказ 596.

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета.
394000, г. Воронеж, пл. им. Ленина, 10. Тел. 208-298, 598-026 (факс)
<http://www.ppc.vsu.ru>; e-mail: pp_center@ppc.vsu.ru

Отпечатано в типографии Издательско-полиграфического центра
Воронежского государственного университета.
394000, г. Воронеж, ул. Пушкинская, 3. Тел. 204-133.