

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания  
к лабораторным работам

По дисциплине: Б1.В.02.ДВ.02.01 Физико-химический анализ  
указывается цикл (раздел) ОП, к которому относится дисциплина, название дисциплины

для направления подготовки (специальности) 04.04.01 Химия  
код и наименование направления подготовки (специальности)

Физическая и коллоидная химия  
наименование профиля /специализаций/образовательной программы

Квалификация выпускника, уровень подготовки магистр  
(указывается квалификация (степень) выпускника в соответствии с ФГОС ВО)

Форма обучения: очная

Кафедра - разработчик: Химия  
название кафедры - разработчика рабочей программы

Методические указания рассмотрены и одобрены на заседании кафедры химии, протокол № 12 от 24.06.2019

## Лабораторная работа

### Идентификация органических соединений методом инфракрасной спектроскопии

#### *Инфракрасная спектроскопия. Теоретические основы*

Инфракрасная спектроскопия изучает взаимодействие электромагнитного излучения с длиной волны от 800 до 20000 нм с анализируемым веществом.

В инфракрасной области выполняется закон Ламберта-Бугера-Бера; все виды анализа и исследования, характерные для ультрафиолетовой и видимой области спектра можно проводить и в инфракрасной области, кроме того, по инфракрасным спектрам устанавливают строение молекул. Поглощение видимых и ультрафиолетовых лучей сопровождается изменением энергии электронных оболочек атомов и молекул. Энергия квантов инфракрасного излучения значительно ниже интервала между электронными энергетическими уровнями, поэтому состояние электронной оболочки при поглощении инфракрасных лучей не изменяется. В поглощении инфракрасных излучений веществом принимает участие система колебательных энергетических уровней молекул, расстояние между которыми соответствует энергии квантов инфракрасных лучей.

Атомы в молекулах находятся на определенных средних расстояниях друг от друга и занимают в пространстве положение, отвечающее направлениям химических связей. Атомы совершают колебания относительно положения равновесия. Если с помощью какого-то кратковременного воздействия изменить расстояние между связанными атомами, то возникнут механические колебания, собственную частоту которых в простейшем случае вычисляют по уравнениям классической механики.

Рассмотрим колебания связанных атомов водорода и углерода в молекуле метана и определим частоту собственных колебаний, направленных вдоль С-Н. Обозначим массы атомов  $M_C$  –  $M_H$ , а химическую связь, имитируем пружинкой с жесткостью  $k$ , рисунок 4.1.

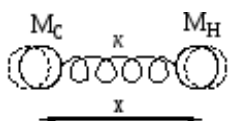


Рисунок 1. Механическая модель связанных атомов.

#### *Связь С-Н в метане*

Если несколько растянуть, а затем отпустить пружинку, то связанные атомы придут в колебательное движение, частоту которого можно определить по уравнению

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \text{ где } \mu = \frac{M_C \cdot M_H}{M_C + M_H}.$$

В отличие от рассмотренной модели колеблющаяся система связанных атомов обладает не любыми, а только вполне определенными, квантованными значениями энергии. Для поглощения инфракрасных лучей необходимо, чтобы величина кванта излучения оказалась равной расстоянию между колебательными уровнями молекулы. Изменяя частоту излучения с помощью монохроматора, записывают спектр поглощения (пропускания) вещества, состоящий из определенной последовательности полос. В двухатомных молекулах CO, HCl и др. существуют только валентные колебания, направленные вдоль линии связи. В многоатомных органических молекулах возможно большое число колебаний различного вида. Валентные колебания подразделяются на симметричные и несимметричные, а деформационные, сопровождающиеся изменениями валентных углов - на веерные, крутильные, ножничные и др. (рис. 2).

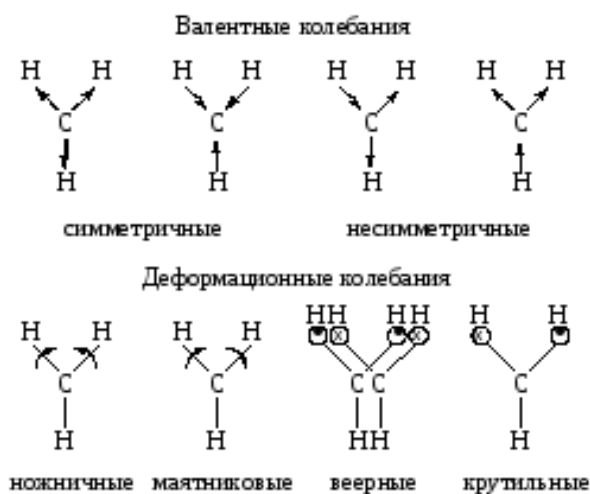


Рисунок 2. Некоторые типы валентных и деформационных колебаний

Частоты взаимодействующих колебаний складываются или вычитаются друг из друга, негармонические колебания приводят к возникновению обертонов – колебаний, кратных основной частоте. Каждому из этих типов колебаний в молекулах и их суперпозициях отвечают соответствующие полосы, что придает инфракрасным спектрам значительную сложность по сравнению с электронными (рис. 3).

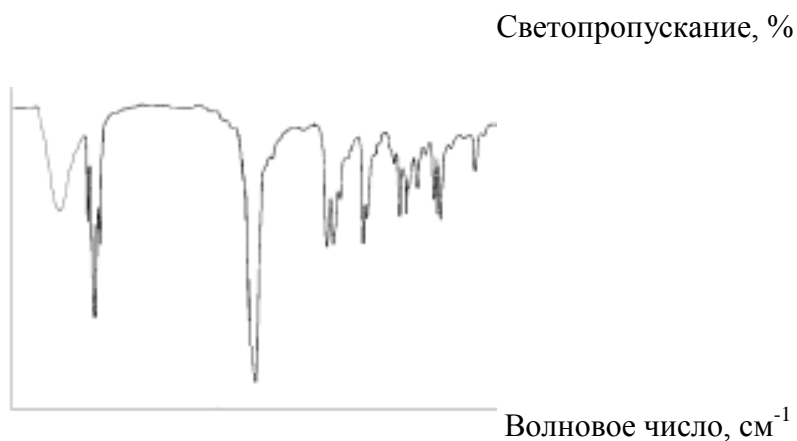


Рисунок 3. ИК-спектр смеси продуктов, полученных при изомеризации 5,6-Эпокси-циклооктена

За время одного акта поглощения молекулой ультрафиолетовых или видимых лучей состояние электронного облака изменяется так быстро, что ядра атомов не успевают сместиться с положения равновесия (принцип Франка-Кондона), благодаря этому электронные спектры несут ограниченную информацию о строении скелета молекулы. Напротив, колебательные спектры обусловлены в первую очередь смещениями ядер атомов, вследствие этого по инфракрасным спектрам можно установить структуру молекул.

Поглощение излучений возможно в том случае, если при изменении расстояния между связанными атомами изменяется дипольный момент молекулы. В симметричных молекулах (например, таких как этан) дипольный момент не зависит от длины связи С-С, и колебания, отвечающие таким связям, не проявляются в инфракрасных спектрах.

### ***Расшифровка инфракрасных спектров***

Для расшифровки инфракрасного спектра необходимо идентифицировать полосы поглощения, то есть установить принадлежность каждой из полос спектра определенным атомным группам. Расшифровка спектров основана на нахождении характеристических частот атомных группировок. Характеристическая частота – это частота, значение которой определяется только природой данной атомной группировки и не зависит от присутствия других атомов в молекуле. Значения характеристических частот (волновых чисел) приведены в корреляционных диаграммах (таблица 1) и в таблицах характеристических частот (таблица 2).

Таблица 1. Корреляционная диаграмма для валентные колебания Х-Н

Группа	3700	3600	3400	3200	3000	2800	2600	2400	2200
	Волновые числа, см <sup>-1</sup>								
СН <sub>3</sub>	<u>Ср.</u> <u>Ср.</u> <u>Ср.</u> <u>Ср.</u> <u>Ср.</u> Сл – слабая полоса <u>Пер.</u> Ср. – средняя <u>Пер.</u> С – сильная Пер. – переменная интенсивность								
СН <sub>2</sub>									
СН=СН									
ОН									
NH <sub>2</sub>									

С помощью корреляционных диаграмм устанавливаются приблизительно, какая часть инфракрасного спектра представляет для данного исследования наибольший интерес. Затем по таблице характеристических частот уточняют положение ожидаемых полос в спектрах. Для малознакомых веществ обычно снимают спектр в широком интервале волновых чисел, чтобы получить о нем общее представление. В расшифровке спектров помогают атласы, объединяющие спектры веществ определенного класса.

Бензольные ядра входят во многие органические молекулы, они характеризуются группами полос валентных и деформационных колебаний для –СН=СН–, –С–Н,

последние могут быть плоскостными (при совпадении плоскости колебаний с плоскостью бензольного ядра) и внеплоскостными (таблица 3).

Таблица 2. Таблица характеристических частот для производных бензола

Группа	Приближенные значения характеристических частот (волновых чисел, см <sup>-1</sup> )	Интенсивность
Колебания ароматического кольца C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (ароматические углеводороды)	3030; 1610-1590; 1500-1480, 3080-3030	сильная, сильная; сильная средняя
Валентные колебания –C–H	3670-3580	переменная
Валентные колебания –OH	2975-2959	сильная
Колебания –CH <sub>3</sub>	2885-2860	сильная
Ароматические нитросоединения	1470-1435	средняя
–C–N–	1385-1370	сильная
Ароматические нитросоединения	849	сильная
–C–NO <sub>2</sub>	610	сильная
Ароматические амины	3540-3480	сильная
–NH <sub>2</sub>	3420-3380	сильная
Галогенопроизводные	780-750	сильная
–C–Cl	730-580	сильная
–C–Br	650	сильная
–C–J	560	сильная
	600-500	сильная

Таблица 3. Внеплоскостные деформационные колебания группы –C–H для бензольного кольца

Тип замещения	Волновое число	Интенсивность
Монозамещенные	770-730;	сильная
1,2-дизамещенные	710-690;	сильная
1,3-дизамещенные	770-735	сильная
1,2,3-тризамещенные	900-860;	сильная
1,3,5-тризамещенные	810-750;	сильная
1,2,4-тризамещенные	800-770	сильная
1,2,3,5-тетразамещенные бензола	725-680	сильная
	800-770	сильная
	720-685	средняя
	900-860;	средняя
	865-810	сильная
	730-675	сильная
	1225-1175;	слабая

	1175-1125;	слабая
	1070-1000;	слабая
	885-870	слабая
	825-805	слабая
	870-855	сильная

При введении заместителей количество –С–Н-групп и характер взаимодействия между ними изменяются, что отражается в ИК-спектрах. Положение и число полос для колебаний –С–Н-групп бензольного ядра позволяет определить характер замещения в бензольном кольце.

При расшифровке некоторых спектров могут встретиться затруднения. Анализ по инфракрасным спектрам требует значительного опыта, хорошего знакомства со справочной литературой и химией исследуемых веществ. Каждый исследователь сохраняет запись инфракрасных спектров и составляет для себя атлас, которым пользуется при анализе и исследовании веществ определенного класса. Особенно помогает расшифровке сопоставление со спектрами более простых веществ, в частности, полупродуктов, используемых в синтезе. Во всех случаях установления структуры сложных молекул рассматривают и сопоставляют друг с другом результаты исследования, полученные разными методами. Строгих правил расшифровки спектров не существует. В каждом случае следует исходить из свойств и ожидаемой структуры веществ и имеющихся возможностей.

### **Блок-схема спектрометра мом-2000**

Блок-схема спектрометра MOM-2000 представлена на рис. 4.

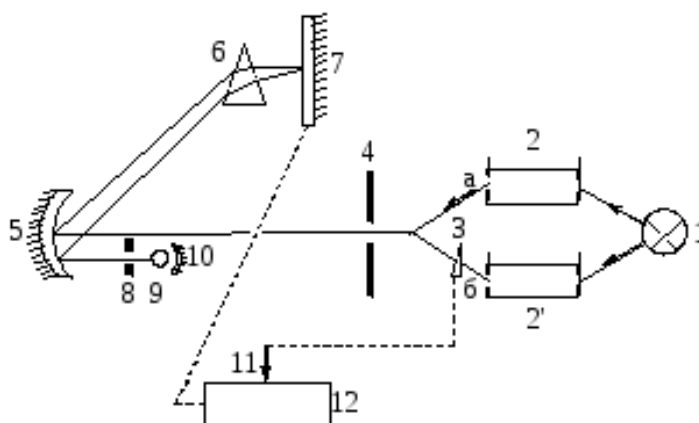


Рисунок 4. Блок-схема спектрометра MOM-2000:

1 – источник ИК-излучения (штифты Глобара и Нернста); 2,2' – кюветы с раствором и растворителем; 3 – светокомпенсатор; 4 – входная щель; 5 – зеркальный объектив-коллиматор; 6 – диспергирующая призма из галоидных солей щелочных и щелочноземельных металлов; 7 – зеркало Литтрова; 8 – выходная щель; 9 – приемник излучения – термоэлемент; 10 – фокусирующее зеркало; 11 – перо самописца, 12 – приемник самописца.

соединенное со светокомпенсатором; 12 – барабан с бланком, связанный с зеркалом Литтрова

### ***Порядок включения и записи спектров на спектрометре мом-2000***

1. Включить последовательно тумблеры **mains**, и **operation** с правой боковой стороны прибора.
2. Закрепить на барабане бланк для записи спектра, при этом ручка рода работы должна быть в положении **stop**.
3. Установить ручку **energy** на значение «2,5».
4. Установить положение барабана на «500 см<sup>-1</sup>».
5. Опустить перо самописца.
6. Повернуть ручку рода работы в положение «5» или «15 мин».
7. После записи спектра переключить ручку рода работы на **stop** и снять бланк.
8. Выключить тумблеры **operation** и **mains**. Закрыть крышку самописца.
- 9.

### ***Выполнение лабораторной работы***

#### **Идентификация органических соединений методом инфракрасной спектроскопии**

**Цель работы:** определение структуры молекулы анализируемого вещества по ИК-спектру.

#### ***Выполнение работы:***

- 1) Работа проводится на спектрометре МОМ-2000. Прибор включает лаборант за 10-15 мин до начала работы.
- 2) Анализируемый раствор или пленку полимера подготавливает лаборант.
- 3) В присутствии лаборанта записывают демонстрационный ИК- спектр.
- 4) Определяют структуру анализируемых веществ по полученным у лаборанта «упрощенным» ИК-спектрам. Перерисовывают спектры в отчет, отмечают значения волновых чисел всех полос поглощения, расшифровывают спектры, пользуясь таблицами 4.1-4.3. Изображают структурную формулу анализируемого вещества
- 5) Оформляют отчет по лабораторной работе.

#### ***Вопросы к отчету по работе***

1. Идентификация органических соединений методом ИКС. Нормальные колебания атомов в молекулах. Виды колебаний, расчет частот колебаний атомов.



2. Механизм поглощения ИК-лучей веществом. Запись ИК-спектров на спектрофотометре. Устройство спектрофотометра МОМ-2000, особенности солевой оптики.
3. Характерные особенности ИК-спектров. Расшифровка ИК-спектров. Область волновых чисел, указывающая на замещение в бензольном кольце.
4. Источники и приемники ИК-излучения, требования к ним.
5. Определение числа заместителей в производных бензола по закону Ламберта-Бугера-Бера (качественный групповой анализ).

## **Лабораторная работа**

### **Анализ смеси красителей с пересекающимися спектрами на фотоколориметрическим методом**

**Цель работы:** определение концентрации красителей в анализируемой смеси.

**Реактивы:** стандартные растворы красителей:  
метилоранж (М.О.), родамин С (Р.С.),  
метиленовая синь (М.С.).

**Посуда:** мерные колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup> (11 шт.), капельницы, кюветы (2 шт).

#### **Выполнение работы**

- 1) Включают фотоколориметр КФК-2 за 10-15 мин до начала работы. Порядок работы на приборе смотри в разделе 1.3.
- 2) Приготавливают пять стандартных растворов чистых красителей путем разбавления исходных стандартных растворов. Выбор красителей и их количество (обычно 2) определяет преподаватель или лаборант. В мерные колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup> отбирают по бюретке заданное лаборантом количество миллилитров исходного стандартного раствора красителя. Объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой, убирают лишние капли воды выше метки фильтровальной бумагой, закрывают пробкой, тщательно перемешивают.
- 3) Получают у лаборанта анализируемую смесь красителей в колбу на 50 см<sup>3</sup>, доводят водой до метки, перемешивают.
- 4) Выбирают светофильтры. Число светофильтров должно соответствовать числу красителей в анализируемой смеси. Для выбора светофильтров используют стандартные растворы чистых красителей в колбах с наибольшей концентрацией. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду. Растворы фотометрируют при всех имеющихся в приборе светофильтрах, результаты записывают в таблицу 1. Для анализа смеси из двух красителей выбирают 2 светофильтра, при которых поглощают оба красителя. Абсорбцией растворов меньше 0,1 отн.ед. можно пренебречь.

5) Определение коэффициентов экстинкции. Коэффициенты экстинкции красителей на выбранных светофильтрах определяют по тангенсу угла наклона графической зависимости абсорбции от концентрации. Для построения графика измеряют абсорбцию стандартных растворов чистых красителей (5 растворов для одного красителя и 5 растворов для другого красителя) на выбранных светофильтрах. Результаты заносят в таблицу 2.

6) Измеряют абсорбцию анализируемой смеси на тех же светофильтрах. Результаты заносят в таблицу 3.

7) Моют посуду, приводят рабочее место в порядок.

### **Расчет результатов анализа**

1) Расчет концентрации приготовленных стандартных растворов

$$C_{ст,i} = \frac{C_{исх} \cdot V_{исх,i}}{V_k},$$

где  $C_{ст,i}$  – концентрация, приготовленного раствора в колбе, моль/дм<sup>3</sup>;  $C_{исх}$  – концентрация раствора красителя в колбе, моль/дм<sup>3</sup>;  $V_{исх,i}$  – объем исходного стандартного раствора, отмеренный по бюретке, дм<sup>3</sup>;  $V_k$  – объем колбы, дм<sup>3</sup>.

2) Выбор светофильтров

Таблица 1. Результаты фотометрирования стандартного раствора на разных светофильтрах

Стандартные растворы	Абсорбция $A$ , отн.ед.						Длина волны выбранных светофильтров
	Длина волны $\lambda$ , нм						
	400	410	490	540	590	670	
Краситель I							$\lambda_1$
Краситель II							$\lambda_2$

3) Расчет коэффициентов экстинкции

Таблица 2. Результаты фотометрирования

№ колбы	Светофильтр 1 ( $\lambda_1$ )				Светофильтр 2 ( $\lambda_2$ )			
	Краситель I		Краситель II		Краситель I		Краситель II	
	$C,$ моль/дм <sup>3</sup>	$A,$ отн.ед	$C,$ моль/дм <sup>3</sup>	$A,$ отн.ед	$C,$ моль/дм <sup>3</sup>	$A,$ отн.ед	$C,$ моль/дм <sup>3</sup>	$A,$ отн.ед
1								
2								
3								
4								
5								

Используя результаты фотометрирования (см. таблицу 2) строят калибровочные графики (рис. 1, а, б).

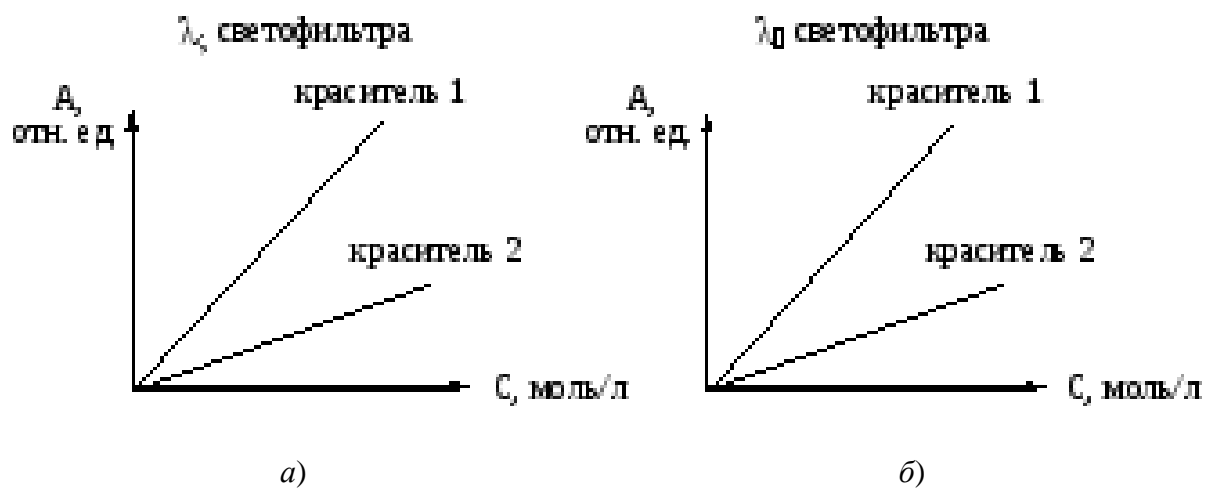


Рисунок 1. Калибровочные графики для расчета коэффициентов

### Экстинкции анализируемых веществ

По тангенсу угла наклона прямых рассчитывают коэффициент экстинкции

$$\epsilon = \frac{A}{C \cdot l},$$

результаты заносят в таблицу 3.

Таблица 3. Результаты эксперимента

Длина волны светофильтра, нм	$\lambda_1$	$\lambda_2$
Абсорбция анализир. смеси, отн. ед.		
$\varepsilon$ красителя I, дм <sup>3</sup> /моль·см		
$\varepsilon$ красителя II, дм <sup>3</sup> /моль·см		

#### 4) Расчет концентрации красителей в анализируемой смеси.

Расчет концентрации красителей основан на использовании закона аддитивности абсорбций компонентов смеси. Для выбранных светофильтров ( $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ ) записывают систему двух уравнений:

$$A'_{\text{ан. смеси}}^{\lambda_1} = A'_{\text{кр.1}}^{\lambda_1} + A'_{\text{кр.2}}^{\lambda_1} = \varepsilon_{\text{кр.1}}^{\lambda_1} \cdot c_{\text{кр.1}} \cdot l + \varepsilon_{\text{кр.2}}^{\lambda_1} \cdot c_{\text{кр.2}} \cdot l$$

$$A'_{\text{ан. смеси}}^{\lambda_2} = A'_{\text{кр.1}}^{\lambda_2} + A'_{\text{кр.2}}^{\lambda_2} = \varepsilon_{\text{кр.1}}^{\lambda_2} \cdot c_{\text{кр.1}} \cdot l + \varepsilon_{\text{кр.2}}^{\lambda_2} \cdot c_{\text{кр.2}} \cdot l$$

Решают систему двух уравнений с двумя неизвестными и находят значения концентрации красителей в анализируемой смеси.

Полученные результаты проверяют у преподавателя или лаборанта, оформляют отчет по работе.

#### **Вопросы к отчету по теме «Фотометрический метод анализа»**

1. Фотометрический метод анализа. Законы поглощения света: закон Ламберта-Бугера-Бера, правило аддитивности абсорбции. Физический смысл коэффициента экстинкции и способы его определения.
2. Графическое изображение зависимости абсорбции от концентрации раствора. Причины, вызывающие отклонение от закона Ламберта-Бугера-Бера. Чувствительность фотометрического метода анализа.
3. Метод собственного поглощения и метод реагентов, область их применения.
4. Метод «обычной» и дифференциальной фотометрии.
5. Блок-схема фотоколориметра КФК-2, основные элементы прибора и их назначение. Относительный способ измерения абсорбции растворов.
6. Абсорбционные светофильтры, их характеристики и способы выбора.

#### **Дополнительные вопросы**

1. Особенности фотометрического анализа смеси красителей с непересекающимися и с пересекающимися спектрами.
2. Источники ультрафиолетового и видимого излучения, их устройство.
3. Фотонные приемники излучения: фотоэлементы с внешним фотоэффектом, фотоэлементы с внутренним фотоэффектом, фотоумножители. Требования к фотонным приемникам излучения, их устройство.

## **Лабораторная работа**

### **Определение константы диссоциации кислотно-основных индикаторов спектрофотометрическим методом**

**Цель работы:** определение константы диссоциации кислотно-основного индикатора.

**Реактивы:** стандартные растворы индикаторов: бромфеноловый синий (Бф.С.), бромкрезоловый зеленый (Бк.З.), буферные растворы.

**Посуда:** мерные колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup> (6 шт.), кюветы с одинаковой толщиной (2 шт.), капельница.

#### **Выполнение работы:**

- 1) Работа выполняется на спектрофотометре СФ-10.
- 2) Приготавливают серию (обычно 6) растворов индикатора в мерных колбах вместимостью 50 см<sup>3</sup>, различающихся между собой только значениями рН. Для этого в каждую колбу отбирают по бюретке одинаковый объем стандартного раствора индикатора (выбор индикатора и его количество определяет лаборант), добавляют заданный объем буферного раствора, доводят объем колб дистиллированной водой до метки, закрывают пробками и перемешивают.
- 3) Приготавливают две кюветы с одинаковой толщиной, моют водой из-под крана, ополаскивают дистиллированной водой. Одну кювету заполняют дистиллированной водой, другую первым анализируемым раствором, предварительно ополоснув ее два раза этим раствором. Снимают капли с внешних сторон кювет фильтровальной бумагой и вставляют кюветы в кюветодержатели.
- 4) Помещают кюветы в кюветное отделение СФ-10, кювету с анализируемым раствором - слева, кювету с дистиллированной водой - справа. Записывают спектры поглощения на специальном бланке. На этом же бланке записывают поочередно спектры поглощения всех остальных анализируемых растворов. Для получения качественных спектров поглощения с четкой изобестической точкой следует точно отбирать объем раствора индикатора и буферных растворов по бюретке во все мерные колбы и тщательно перемешивать растворы.

5) По окончании работы записи спектров выключают спектрофотометр, снимают бланк (обычно бланк снимает лаборант), моют посуду, приводят рабочее место в порядок.

### **Расчет результатов анализа**

1) Расчет концентрации приготовленного стандартного раствора красителя

$$C_{к,i} = \frac{C_{исх} \cdot V_{исх,i}}{V_{к}},$$

где  $C_{исх,i}$ ,  $C_{к,i}$  – концентрация исходного стандартного раствора красителя и в колбе соответственно,  $V_{исх}$  – объем исходного стандартного раствора, отмеренный по бюретке  $V_{к}$  – объем колбы.

2) Расчет коэффициентов экстинкции  $\varepsilon(HA)$  и  $\varepsilon(A^-)$ . Для расчета коэффициентов экстинкции используют растворы, в которых равновесие смещено в сторону кислотной ( $HA$ ) и основной ( $A^-$ ) форм красителя, соответственно (1 и 6 колбы). Для растворов 1 и 6 концентрации  $[HA]$  и  $[A^-]$  можно принять равными концентрации приготовленного стандартного раствора  $C_{к}$ . Поскольку, коэффициенты экстинкции на  $\lambda = \text{const}$  не зависят от концентрации растворов, то они остаются постоянными и для растворов (2-5). Выбирают аналитические длины волн  $\lambda(HA)$ ,  $\lambda(A^-)$  в максимумах полос поглощения кислотной и основной форм индикатора и измеряют абсорбцию  $A(HA)$  и  $A(A^-)$ . При расчете коэффициентов экстинкции используют закон Ламберта-Бугера-Бера.

$$\varepsilon(HA) = \frac{A(HA)}{C_{к,i} \cdot l}, \quad \varepsilon(A^-) = \frac{A(A^-)}{C_{к,i} \cdot l}.$$

3) Расчет  $pK$  индикатора. На аналитических длинах волн  $\lambda(HA)$ ,  $\lambda(A^-)$  измеряют абсорбцию  $A(HA)$  и  $A(A^-)$  растворов с промежуточными значениями  $pH$  (колбы 2-5), результаты заносят в таблицу 1. Затем, используя формулу (3.5)

$$pK = pH + \lg \frac{A(HA) \cdot \varepsilon(A^-)}{A(A^-) \cdot \varepsilon(HA)},$$

находят отношения концентраций кислотной и основной форм индикатора и логарифм этих отношений:

Таблица 1. Результаты эксперимента

№ колбы	Значение $pH$	$A(HA)$	$A(A^-)$	$\lg[HA]/[A^-]$	$\lg[HA]/[A^-]$
1					
2					
3		0	0	0	0
4				0	0
5					
6					

По результатам, приведенным в таблице построить график зависимости  $pH$  от  $\lg[HA]/[A^-]$  и определяют  $pK$  индикатора

Строят график, на котором прямая линия получается в осях  $pH - \lg[HA]/[A^-]$  (рис. 1). В случае равенства концентраций основной и кислотной форм  $\lg[HA]/[A^-] = 0$  и  $pK = pH$ .

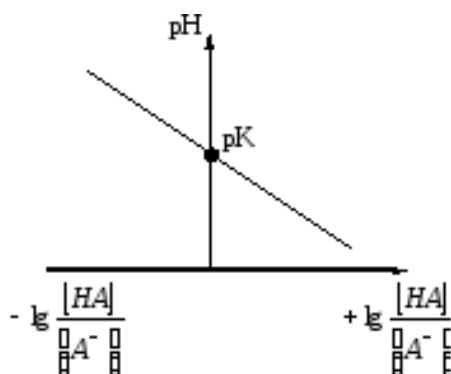


Рисунок 1. График для определения  $pK$

Таким образом, величина  $pK$  определяется по графику значением  $pH$  в точке пересечения прямой с ординатой.

Результат проверяют у преподавателя или лаборанта, оформляют отчет по работе.

### Вопросы к отчету по работе

1. Константа химического равновесия. Термодинамическая и концентрационная константа равновесия.
2. Кислотно-основные индикаторы, интервал перехода индикатора,  $pT$ -индикатора, выбор индикатора для титрования.
3. Основные положения протолитической теории Бренстеда-Лоури.
4. Использование спектров поглощения для расчета констант диссоциации кислотно-основных индикаторов. Изобестическая точка на спектрах поглощения и условие ее существования.
5. Определение  $pH$  растворов. Буферные растворы, основные их свойства.
6. Блок-схема двухлучевого спектрофотометра. Методика выполнения лабораторной работы.

## Лабораторная работа

### Высокоэффективная жидкостная хроматография

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

##### Основные компоненты хроматографа

Принцип действия любого хроматографа заключается в следующем:

раствор анализируемой смеси с помощью узла ввода пробы вводится в верхнюю часть хроматографической колонки. С помощью насоса анализируемая смесь прокачивается элюентом (подвижной фазой – ПФ)

через хроматографическую колонку, в которой происходит разделение анализируемой смеси на отдельные вещества. Вытекающий из колонки элюат, содержащий отдельные компоненты анализируемой смеси,

детектируется детектором, показания которого регистрируются регистратором (ПК).

**Хроматографические колонки**, предназначенные для ВЭЖХ, представляют собой снабженные торцевыми соединениями трубки, заполненные тонкозернистым упаковочным материалом (насадкой). С обеих сторон трубки закрыты фильтрами для предотвращения высыпания сорбента.

В настоящей работе используется колонка "Биохиммак Диасфер" с обращенной фазой C18 (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристики колонки "Биохиммак Диасфер" – C18.

Размер колонки	4,0 мм ×250 мм
Размер зерна	5 мкм
Диапазон pH	2 – 8
Максимально допустимая температура	70°C
Максимальное давление	300 бар

На рис. 1 представлено устройство жидкостного хроматографа Perkin Elmer Series 200.

1) PE Series 200 Autosampler – автоматическая система отбора проб, позволяющая выбирать метод, который может состоять из программируемой серии отбора определенного объема исследуемых образцов или одиночного закола (Таблица 2, Рис. 1).

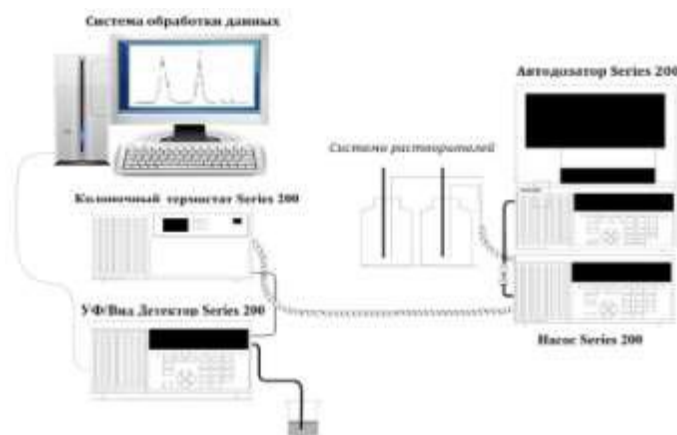
Таблица 2. Характеристики PESeries 200Autosampler.

Характеристики	Значения



Закол	0,1 мкл – 2,5 мл
Точность	< 0,5% RSD* области пика от 3 мкл
Минимальный объем образца	1 мкл в 7 мкл
Выбросы	< 0,02%

\*RSD – Relative Standard Deviation.

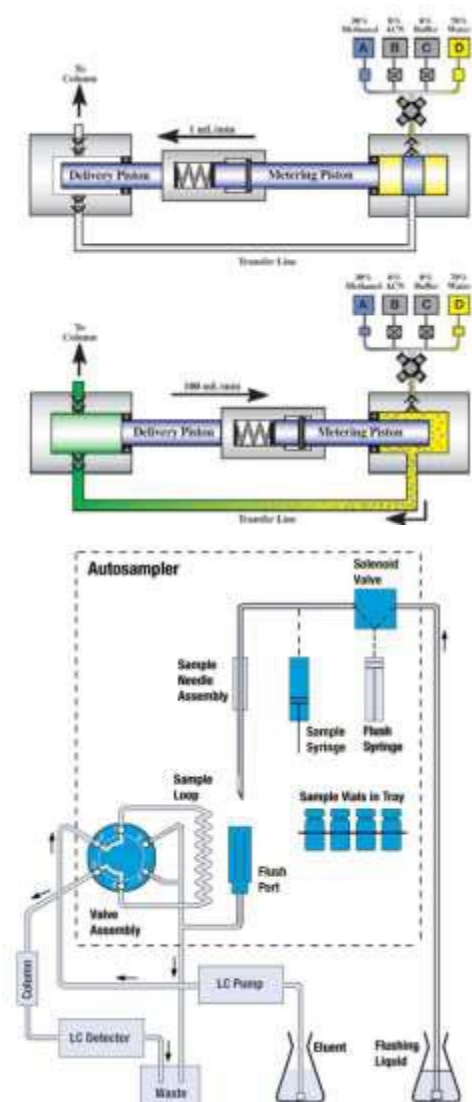


**Рис. 1.** Блок-схема жидкостного хроматографа Perkin Elmer Series 200.

2) PE Series 200 Pump – поршневой насос, способный работать в изократическом и градиентном режиме (рис. 2, Таблица 3). В изократическом режиме предусмотрено изменение скорости потока растворителя, времени пропускания вещества через колонку, процентный состав подвижной фазы. В градиентном режиме, кроме всего, указывается вид кривой зависимости состава растворителя от времени.

Таблица 3. Характеристики PE Series 200 Pump.

Характеристики	Значения
Диапазон давлений	0 – 420 бар
Скорость потока	0,01 – 10 мл/мин
Точность (Precision)	0,3% RSD (часто <0,1%) при 1 мл/мин и давление с подвижной фазой водой
Точность (Accuracy)	±1% RSD при 1 мл/мин и давление с подвижной фазой водой
Диапазон концентраций	0 – 100%
Точность (Accuracy)	±1% при 3 – 97% и 5 мл/мин
Точность (Precision)	< 0,2%
Градиентная кривая	линейная, экспоненциальная от 1 до 9,9 и от – 9,9 — 1
Время шага	0 – 999 мин



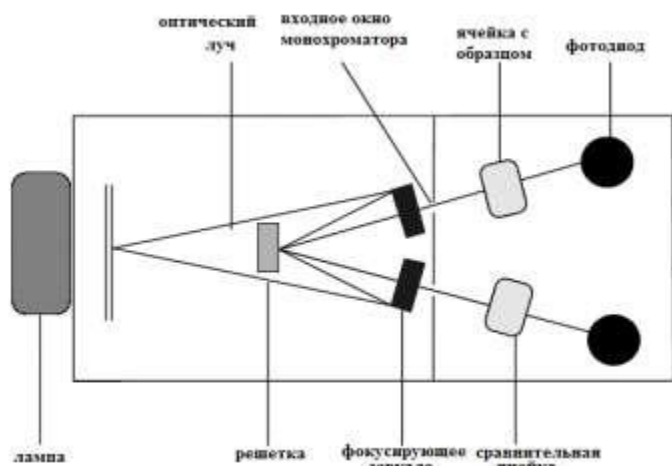
**Рис. 2.** Принцип работы поршневого насоса, системы смешения элюэнта и автосэмплера в хроматографе Perkin Elmer Series 200.

3) PESeries 200 UV/VIS Detector относится к классу аналитических приборов, известных как спектрофотометры (Таблица 4). Этот класс оптических приборов определяет коэффициент пропускания света через кювету, содержащую раствор анализируемых веществ. Свет, прошедший через кювету, собирается и преобразуется в электрический ток с помощью кремневого фотодиода. Ток на фотодиоде прямо пропорционален количеству фотонов падающих на фотодиод. Затем ток преобразуется в напряжение, величина которого связана с оптической плотностью анализируемого раствора.

В основе работы детектора 200 UV/VIS, как и других спектрофотометров, лежит закон Бугера–Ламберта–Бэра:

$$I = I_0 e^{-\epsilon Cl}$$

где  $I_0$  – интенсивность входящего пучка,  $\epsilon$  – коэффициент, характеризующий взаимодействие молекулы поглощающего растворенного вещества со светом с определенной длиной волны,  $C$  – концентрация вещества,  $l$  – толщина слоя вещества, через которое проходит свет.



**Рис. 3.** Схема UV –детектора.

Оптическая плотность, измеряемая прибором, это:

$$D = -\ln(I/I_0) = \varepsilon Cl$$

При фиксированных  $\varepsilon$  и  $l$  получаем линейную зависимость оптической плотности от концентрации. Однако данная зависимость остается линейной только, если пучок света монохроматический, а значение оптической плотности невысоко. Нелинейности также способствуют такие факторы, как подготовка образца, инжектирование, высокая концентрация образца в пробе, обратимая и необратимая адсорбция на колонке, широкая спектральная полоса пропускания и фон, создаваемый подвижной фазой.

В детекторе 200 UV/VIS реализован двулучевой оптический дизайн (рис. 3), который включает в себя: источник света – дейтериевую (для 190 – 360 нм) или вольфрамовую лампу (для 360 – 700 нм), монохроматор (в качестве диспергирующего элемента используется дифракционная решетка), ячейку с образцом и сравнительную ячейку, пару кремниевых фотодиодов.

Таблица 4. Характеристики PE Series 200 UV/VIS Detector

Характеристики	Значения
Диапазон длин волн	190 – 700 нм
Точность	$\pm 1$ нм
Шумы	$< \pm 1 * 10^{-5}$ AU**, 210 – 280 нм
Источники света	Дейтерий (190 – 360 нм) или вольфрам (360 – 700 нм)

\*\*AU – Absorbance Unit (оптическая плотность).

4) PESeries 200 Peltier Column Oven контролирует температуру колонки, его основные характеристики представлены в таблице 5.

Таблица5. Характеристики PE Series 200Peltier Column Oven.

Характеристики	Значения
Диапазон температур	5– 90°C
Рекомендованная скорость потока	до 5 мл/мин
Устойчивость	±1°C
Точность	±0,2°C
Стабильность	0,2°C
Скорость охлаждения и нагревания	до 5°C/мин
Время стабилизации температуры	30 мин после установки

### **ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ**

1. Включите все модули хроматографической системы.
2. Погрузите капилляры для растворителей в соответствующие емкости (А – вода, В – ацетонитрил, С – вода, D – вода, тонкий капилляр для промывки иглы нужно погрузить в воду).
3. Откройте дверцу на панели насоса и открутите (1,5 оборота) сливной клапан.
4. Подсоедините к сливному клапану шприц и прокачайте по 15 мл каждой фазы через систему. Для этого на панели насоса нажмите кнопку **Purge**, при помощи кнопок **F1 – F8** выберите нужную линию и задайте поток 5 мл/мин. Для остановки насоса нажмите кнопку **Stop**.
5. Параллельно 3 раза промойте иглу автосэмплера при помощи кнопки **Flush**.
6. После прокачивания всех линий отсоедините шприц и закрутите сливной клапан.
7. Далее установите 100% В, поток 2 мл/мин (**F2**) и включите насос (**F8**) на одну минуту, чтобы прокачать капилляры, находящиеся после насоса.
8. Подсоедините хроматографическую колонку.
9. Установите температуру термостата 40 С.
10. Установите 100% В, поток 0,7 мл/мин (**F2**) и включите насос (**F8**) на 7 минут, чтобы уравновесить колонку.
11. Включите AZ - Y на детекторе (автоматическое обнуление детектора перед началом анализа)
12. Включите компьютер и запустите программу "Мультихром" (логин и пароль для входа **student**)

### **ЗАДАНИЯ**

#### **Определение мертвого времени колонки**

Для этого оцените время выхода NaCl при 100% В (NaCl не задерживается колонкой при данных условиях).

1. Установите на насосе значение потока 1,0 мл/мин, время анализа 2 минуты, состав подвижной фазы 100% В и запустите насос.
2. На детекторе установите время анализа 2 минуты и значение длины волны равным 200 нм.
3. На автосэмплере задайте номер виалы, содержащей раствор NaCl и установите объем пробы 2 мкл

4. Нажмите на изображение самописца в окне программы и задайте время анализа 2 минуты.
5. Нажмите "Старт" в окне программы и введите имя файла. В имени файла укажите название образца, скорость потока и состав подвижной фазы.
6. Запустите анализ кнопкой "Start" автосэмплера
7. Проверьте наличие соответствующего файла с отчетом в папке "Reports" (ярлык на рабочем столе).
8. Повторите эксперимент еще два раза.
9. Установите на насосе 50% В
10. Включите насос и дождитесь полного уравнивания колонки подвижной фазой (минимум 7 минут)
11. Повторите эксперимент для 50% В ( $\phi = 0.5$ ), сравните результаты.
12. Вычислите среднее значение и погрешность
13. Оцените фазовое отношение  $\phi$ .

### ***Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя***

Для этого снимите зависимость фактора удерживания для бензола и фенола при  $\phi$  от 0.5 до 0.9 (записывайте значение давления для разных  $\phi$ ).

Колонку необходимо уравнивать для каждого значения  $\phi$ !

1. Установите на насосе значение потока 1,0 мл/мин, время анализа 40 минут, состав подвижной фазы 50% В и запустите насос.
2. При необходимости дождитесь полного уравнивания колонки подвижной фазой (минимум 7 минут).
3. На детекторе установите время анализа 40 минуты и значение длины волны равным 254 нм.
4. Если предыдущий анализ был остановлен вручную нажмите кнопку Reset на детекторе.
5. На автосэмплере задайте номер виалы, содержащей смесь бензола и фенола и установите объем пробы 1 мкл.
6. Нажмите на изображение самописца в окне программы и задайте время анализа 40 минуты.
7. Нажмите "Старт" в окне программы и введите имя файла. В имени файла укажите название образца, скорость потока и состав подвижной фазы.
8. Запишите значение давления.
9. Запустите анализ кнопкой "Start" автосэмплера.
10. Остановите анализ после выхода второго пика из колонки.
11. Проверьте наличие соответствующего файла с отчетом в папке "Reports" (ярлык на рабочем столе).
12. Повторите эксперимент для всех значений  $\phi$  из диапазона от 0.5 до 0.9 с шагом 0.1.
13. Определите константу S. Предскажите время выхода бензола при  $\phi = 0$ . Рассчитайте погрешности. Проведите эксперимент при  $\phi = 0.2$ .
14. Определение фактор сопротивления колонки.
15. Повторите эксперимент для толуола.
16. Для бензола и фенола определите зависимость числа теоретических тарелок N, свободной энергией сорбции G, селективности  $\alpha$  и критерия разделения Rs от  $\phi$ .

17. Проанализируйте изменение формы пика бензола/толуола при изменении  $\phi$ . Объясните наблюдаемые закономерности.
18. Используя результаты п. 2 подберите оптимальные условия разделения в изократическом режиме для смеси бензол-толуол (1:1) и в градиентном режиме для смеси бензол-толуол-ксилол (1:1:1).

### **Экспериментальная проверка выполнения уравнения Ван-Деемтера**

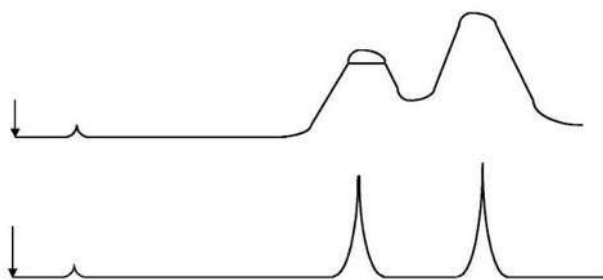
Для этого проведите анализ бензола и фенола при  $\phi = 0.5$  при различных потоках подвижной фазы в диапазоне от 0.4 мл/мин до 1.6 мл/мин.

19. Установите на насосе значение потока 1,0 мл/мин, время анализа 40 минут, состав подвижной фазы 50% В и запустите насос.
20. При необходимости дождитесь полного уравнивания колонки подвижной фазой (минимум 7 минут).
21. На детекторе установите время анализа 40 минуты и значение длины волны равным 254 нм.
22. Если предыдущий анализ был остановлен вручную нажмите кнопку **Reset** на детекторе.
23. На автосэмплере задайте номер виалы, содержащей смесь бензола и фенола и установите объем пробы 1 мкл.
24. Нажмите на изображение самописца в окне программы и задайте время анализа 40 минуты.
25. Нажмите "Старт" в окне программы и введите имя файла. В имени файла укажите название образца, скорость потока и состав подвижной фазы.
26. Запустите анализ кнопкой "Start" автосэмплера.
27. Остановите анализ после выхода второго пика из колонки.
28. Проверьте наличие соответствующего файла с отчетом в папке "Reports" (ярлык на рабочем столе).
29. Повторите эксперимент для всех значений потока из диапазона от 0.4 до 1.6 мл/мин с шагом 0.2.
30. Постройте зависимость  $N(F)$ .
31. Сравните константу  $A$  с размером частиц сорбента. Сделайте выводы.
32. Определите – коэффициент диффузии исследуемого вещества в подвижной фазе.
33. Определите оптимальную скорость потока для бензола, соответствующую максимальному числу теоретических тарелок. Объясните, почему предлагается проводить эксперименты при скорости потока 1 мл/мин.

### **ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ**

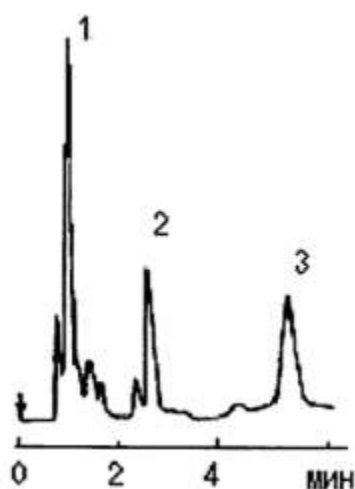
1. Какие особенности хроматографии позволяют достичь лучшего разделения веществ с близкими свойствами (в том числе изомеров) по сравнению с другими методами разделения?
2. Перечислите особенности и преимущества высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Какие варианты метода используют в аналитической практике?
3. Сравните основные параметры хроматографического эксперимента в случае препаративной и аналитической хроматографии.

4. Как можно идентифицировать соединений в смеси после их хроматографического разделения?
5. Перечислите основные положения концепции теоретических тарелок. В чем ее недостатки?
6. Как оценивают эффективность хроматографической колонки? Как величина эффективности отражается на форме хроматографического пика?
7. Какие типы колонок используют в хроматографии? Сравните их между собой.
8. Как зависит высота, эквивалентная теоретической тарелке от скорости потока подвижной фазы?
9. Как влияет форма изотермы сорбции на форму хроматографического пика?
10. Какая величина используется в жидкостной хроматографии для оптимизации условий хроматографического разделения?
11. От каких факторов зависит величина разрешения?
12. Какие сорбенты используют в ВЭЖХ? Каким требованиям они должны отвечать?
13. Почему наиболее популярные сорбенты в ВЭЖХ – силикагель и, особенно, модифицированные силикагели? Как проводят модификацию силикагеля?
14. Перечислите требования к подвижной фазе в ВЭЖХ.
15. Чем определяется элюирующая способность подвижной фазы в жидкостной хроматографии?
16. Как подбирают состав подвижной фазы в жидкостной хроматографии?
17. Что такое градиентный режим элюирования? Какими преимуществами он обладает по сравнению с изократическим элюированием?
18. Как влияет температура на эффективность и селективность разделения в жидкостной хроматографии?
19. Сравните два варианта ВЭЖХ – нормально-фазовый и обращенно-фазовый. Какие неподвижные и подвижные фазы используют в данных вариантах хроматографии?
20. Каков механизм разделения веществ в нормально-фазовой хроматографии?
21. Каков механизм разделения веществ в обращенно-фазовой хроматографии?
22. Какими закономерностями описывается удерживание веществ в нормально-фазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ?
23. Какой метод ВЭЖХ (нормально-фазовый и обращенно-фазовый) предпочтительнее использовать для разделения а) пептидов, б) жирорастворимых витаминов, в) водорастворимых витаминов, г) белков, д) липидов.
24. Как повлияет на форму пиков и эффективность разделения добавление кислоты (щелочи) в элюент?
25. Сравните принцип работы и возможности применения спектрофотометрического и флуориметрического детекторов в ВЭЖХ.
26. За счет подбора условий разделения удалось изменить  $\alpha$  с 1,1 до 1,2. Во сколько раз при этом улучшится разрешение?
27. В результате экспериментов были получены 2 хроматограммы:



Какой параметр изменили для получения второй хроматограммы?

28. Была получена хроматограмма витаминов в пищевых продуктах, полученная на колонке с нуклеосилом NH<sub>2</sub> (250x4 мм, зернение 10 мкм), ПФ гептан–хлороформ (80:20), расход 3,5 мл/мин, 254 нм, проба – 5 мкл. На хроматограмме присутствует пик соответствующий ацетату витамина А, витамину D3 и витамину Е. Определить последовательность выхода веществ из колонки.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Даванков В.А. Хроматография. Основные понятия. Терминология. Москва: Российская академия наук, 1997.
2. Ettre L.S. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993) // *Pure Appl. Chem.* 1993. Vol. 65, № 4. P. 819–872.
3. Ettre L.S. Chromatography: The separation technique of the 20<sup>th</sup> century // *Chromatographia.* 2000. Vol. 51, № 1–2. P. 7–17.
4. Ettre L.S. MS Tswett and the invention of chromatography: article // *LC GC North Am. Advanstar Communications,* 2003. Vol. 21, № 5. P. 458–467.
5. Цвет М.С. О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу // *Труды Варшавского Общества естествоиспытателей, отд. биологии.* 1903. Vol. 14. P. 20–29.
6. Ettre L.S., Sakodynskii K.I. M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903) // *Chromatographia.* 1993. Vol. 35, № 3–4. P. 223–231.
7. Martin A.J.P., Synge R.L.M. A new form of chromatogram employing two liquid phases // *Biochem. J.* 1941. Vol. 35, № 12. P. 1358–1368.
8. Spackman D.H., Stein W.H., Moore S. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids // *Anal. Chem.* 1958. Vol. 30, № 7. P. 1190–1206.
9. Cazes J., Scott R.P.W. *Chromatography theory: book.* CRC Press, 2002.